



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
CONVÊNIO UFSCar/UNESP



**"MECANISMOS COMPORTAMENTAIS E MOLECULARES
ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO ENTRE AS SUBSTÂNCIAS DE ABUSO
E OS FATORES DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DA
DEPENDÊNCIA"**

RODRIGO MOLINI LEÃO

**ARARAQUARA – SP
2013**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
CONVÊNIO UFSCar/UNESP



**"MECANISMOS COMPORTAMENTAIS E MOLECULARES
ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO ENTRE AS SUBSTÂNCIAS DE ABUSO
E OS FATORES DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DA
DEPENDÊNCIA"**

RODRIGO MOLINI LEÃO

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional 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.

ARARAQUARA – SP
2013

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

L437mc

Leão, Rodrigo Molini.

Mecanismos comportamentais e moleculares envolvidos na interação entre as substâncias de abuso e os fatores de risco para o desenvolvimento da dependência / Rodrigo Molini Leão. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
182 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Psicofarmacologia. 2. Dependência. 3. Nicotina. 4. Etanol. 5. Estresse. 6. Alterações moleculares. I. Título.

CDD: 615.78 (20^a)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

Tese de Doutorado de Rodrigo Molini Leão

Dia 08/03/2013

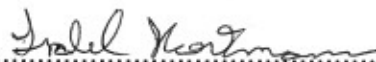
Profª. Drª. Cleopatra da Silva Planeta.....



Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi.....



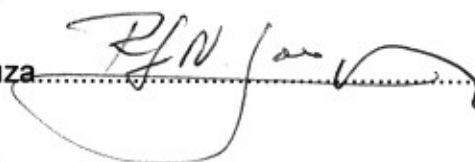
Profª. Drª. Isabel Marian Hartmann de Quadros.....



Profª. Drª. Rosana Camarini.....



Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza.....



DEDICATÓRIA

Dedico esta tese primeiramente a **Deus** que sempre me iluminou durante todo meu doutorado dando-me força para a dedicação em minha pesquisa.

Dedico a minha mãe **Ana Maria Molini Leão**, uma mulher guerreira e vitoriosa que sempre me ensinou o amor e sempre incentivou meus sonhos.

Em memória de meu pai **Oswaldo Videira Leão**, sempre acreditou em mim e me ensinou a lutar sem desistir de meus ideais. Pai: Sinto muitas saudades de você. Esteja onde estiver eu sempre vou te amar!

AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos **Thiago Molini Leão** e **Felipe Molini Leão** pelo apoio e incentivo em todos os momentos de minha vida. Vocês são essenciais para mim!

Às minhas cunhadas **Fernanda Pereira Ramos Leão** e **Priscilla de Cássia Bovolenta** não somente por nossa amizade e apoio, mas também por cuidar muito bem de meus irmãos e os fazerem muito felizes.

À **Profa. Dra. Cleopatra S. Planeta** pela orientação científica em todos esses anos, não somente para a execução deste trabalho mas desde minha iniciação científica. Sempre esteve presente discutindo sobre ciência e ensinando que um bom pesquisador deve ter conhecimento, competência e, acima de tudo, ter ética em suas atitudes. Cleo: Muito obrigado por confiar em mim e me ajudar sempre que precisei. Desde o início foi um prazer e uma honra trabalhar ao seu lado e com seu grupo de pesquisa, sempre, de extrema qualidade!

Ao meu Co-Orientador **Dr. Fábio C. Cruz** por toda ajuda e parceria que tem exercido comigo em todos esses anos. Fábio: Não tenho palavras para descrever o quão importante você foi para o desenvolvimento desse trabalho e para meu aprendizado científico e pessoal. Eu devo todos os méritos desse trabalho ao seu incentivo e colaboração incessantes! Pois desde o primeiro dia que pisei no Laboratório de Farmacologia esteve ao meu lado. Devo a você meu grande interesse pela pesquisa científica e pela carreira acadêmica. Você é e sempre será um grande espelho para mim.

Ao **Dr. George F. Koob** pela orientação e auxílio em meu doutorado sanduíche.

Ao **Dr. Bruce T. Hope** pela orientação, auxílio e amizade em meu doutorado sanduíche.

Aos meus dois irmãos de consideração **Tarciso** e **Quasy**. Vocês são os dois maiores corações que conheço! Obrigado por todo apoio e paciência que tiveram comigo e por serem as pessoas que são. Pessoas ímpares que fazem a diferença na vida de todos que convivem com vocês. Espero ter sempre vocês ao meu lado, mesmo que o lado não seja tão perto, pois por vezes o caminho de cada um de nós nos leva para longe. Mas saibam que aonde estiver podem contar comigo.

Ao **Dr. Leandro F. Vendruscolo** e **Dr. Olivier George** pelo apoio e auxílio na elaboração e desenvolvimento de meu trabalho no TSRI.

À **banca examinadora** pela atenção dispensada na leitura deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza** pela amizade e atenção em todos esses anos que nos conhecemos. Muitas conversas, muitos aprendizados e também muitas risadas. Ricardo: Muito obrigado por ter sido acessível e disponibilizar seu apoio em todos os meus momentos no Laboratório de Farmacologia.

Aos Professores: **Dr. José Francisco Fracasso**, **Dra. Maria do Carmo Longo**, **Dra. Azair Liane Matos Canto de Souza**, **Dr. Carlos César Crestani** e **Dr. José Salvador Lepera** pela amizade e por todos os ensinamentos.

Às técnicas do Laboratório de Farmacologia da FCFAr/UNESP, **Elizabeth Zocal Paro Lepera (Bete)** e **Rosana Finoti Pupin Silva (Rô)**, pela insubstituível ajuda por tantas vezes que nem posso enumerar. Vocês são pessoas iluminadas!

À **República Várzea** pelo amparo e presença em toda minha vida de graduação que continuou mesmo após minha saída quando iniciei minha pós-graduação. Vocês são minha segunda família e terão para sempre minha irmandade. VÁRZEA!

Aos meus amigos de Araraquara: **Cafundó, Alfinete, Di, Latino, Gargamel, Al Jazira e toda República Diretoria, Bião, Gabão, Katchaça, Natashow, Jerusa e toda República Krakatoa, a toda República Puleiro dos Anjos, Anderson Cherobino, Wagner (Pessoa), Luis Gustavo (Cascão), Danuza e Juliano, Paulinha Biazotto, Vitória Picolini, Gabi Barrella, Ana Teresa (Neura), Felipe (Pixoxó), Daniel Rossi, Val e toda equipe Trinity, Cassiano (Kiko) e Márcio (Uai).**

Aos meus amigos extra-Araraquara: **Arthur (Thui), Marinho, André (Mamute), João e Fábio Galhardo, Gabriel (Xopi), Zirda, Mindu, Ronaldo (Gol) e Ariadne, Picanha, Lelo, Bifão e Ruba.**

Aos meus amigos da Pós-Graduação: **Lucas e Dani, Miguel e Michele, Richard e Camila, Silvinha, Mariana Melo, Joelma, Mari Lumar, Ana Nunciato, Fernanda Daher, Natan, Vô, Aline, Vivi Biancardi, Roberta e Ana Paula.**

Aos meus amigos do Laboratório de Farmacologia: **Fábio (Quasy), Marcelo (Pitú), Paulão (Paulete), Sheila, Paula (Pupu), Lígia, Camila Cesário, Juliana (Pimenta), Taísa, Cindy, Tarciso, Karina, Ana Cláudia (Livraria), Ludimila, Diego, Tatiani, Matheus (Capiau), Carol Trovarelli, Nathália (Bang), Josiane, Leandro, Mariane e Flávia** pela amizade e colaboração. Trabalhar com vocês sempre foi muito bom e divertido!

Aos **sujeitos** utilizados na pesquisa, o meu agradecimento e respeito pela incalculável contribuição.

Aos secretários **Alexandre** e **Mara**, pela assistência prestada na secretaria do PIPGCF.

À **Tirene** pela disponibilidade e competência nos serviços prestados na secretaria do PANT, pela amizade e por seu delicioso café!

Ao **Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas** (PIPGCF - UFSCar/UNESP).

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP - Processo 2008/10691-2), pelo apoio financeiro.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES - PDEE Processo 0093/11-4), pelo apoio financeiro em meu doutorado sanduíche.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP**, pelo espaço físico laboratorial, equipamentos e materiais fornecidos para realização desse trabalho.

Ao **The Scripps Research Institute** (TSRI - La Jolla / CA / EUA) pelo espaço físico e laboratorial.

Ao **National Institute on Drug Abuse** (NIDA - Baltimore / MD / EUA) pelo espaço físico e laboratorial.

RESUMO

Tabaco e etanol são as substâncias de abuso mais consumidas no mundo e frequentemente co-abusadas. Apesar do número elevado de pessoas que fazem uso de substâncias de abuso, apenas uma pequena, mas considerável porcentagem se torna dependente. Assim, outros fatores interagem com o efeito da droga influenciando o desenvolvimento da dependência. No presente estudo investigamos em ratos: a) se a exposição prévia ao estresse variado poderia alterar os parâmetros da autoadministração de nicotina, e se este fenômeno poderia estar relacionado à alterações na atividade de CREB e ERK no córtex pré-frontal medial, núcleo acúmbens e amígdala; b) se a administração prévia e repetida de cocaína poderia alterar os parâmetros de autoadministração de nicotina, e se este fenômeno poderia estar relacionado a alterações na expressão de BDNF, TrkB, DYN, Mi-Opio, NPY e CRFR1 no núcleo acúmbens; c) se a exposição prévia à nicotina poderia alterar os parâmetros de autoadministração de etanol; d) o efeito da administração simultânea de nicotina no desenvolvimento da dependência ao etanol, e as áreas encefálicas bem como o fenótipo dos neurônios envolvidos nesse comportamento. Nossos resultados demonstram que a exposição ao estresse variável induziu sensibilização cruzada com nicotina e aumentou a motivação e o consumo dessa substância e reduziu a atividade de CREB em regiões mesoencefálicas. O pré-tratamento com cocaína induziu sensibilização cruzada com nicotina e aumentou a motivação e o consumo dessa substância. O pré-tratamento com cocaína aumentou a expressão gênica de BDNF no núcleo acúmbens desses animais. O pré-tratamento com nicotina aumentou os comportamentos relacionados à ansiedade e a motivação para o consumo de etanol. A administração simultânea de nicotina acelerou a escalada da autoadministração, aumentou o ponto de ruptura e a compulsividade para o consumo de etanol e esses comportamentos podem estar relacionados a ativação da amígdala estendida e do sistema mesocorticolímbico. Desta forma, nossos resultados sugerem que fatores adicionais ao uso de uma substância de abuso como estresse e a pré-exposição a outra substância podem aumentar a vulnerabilidade ao desenvolvimento da dependência.

Palavras Chave: Dependência à substâncias de abuso. Nicotina. Etanol. Estresse. Comportamento animal. Alterações moleculares.

ABSTRACT

Tobacco and ethanol are the most used drugs in the world and often co-abused. An important issue in the field of drug abuse research is the characterization of risk factors related to increased vulnerability to drug addiction. In the present study we investigated in rats: a) the effects of exposure to variable stress on nicotine-induced locomotor activation, CREB and ERK activities in the prefrontal cortex, nucleus accumbens and amygdala and nicotine intravenous self-administration; b) whether previous exposure to cocaine could affect nicotine seeking behaviors, and if this phenomenon could be related to alterations in the BDNF, TrkB, DYN, Mi-Opi, NPY and CRFR1 gene expression in the nucleus accumbens; c) whether repeated nicotine treatment could induce anxiety-like behavior, which in turn increases alcohol intake; d) the effect of simultaneous nicotine treatment during the transition to development of alcohol dependence and whether that is mediated by activation of neuronal ensembles in different parts of the brain. We found: the variable stress exposure caused cross sensitization with nicotine, increased the nicotine self-administration behavior and decreased CREB activity in mesencephalic areas; the pretreatment with cocaine caused sensitization of cocaine motor response, locomotor cross-sensitization with nicotine, and increased motivation to nicotine intake; the pretreatment with nicotine increased the anxiety-like behavior and the motivation to ethanol intake; the simultaneous administration of nicotine and ethanol vapor exposure speed up the escalation of ethanol self-administration, increased the motivation and the compulsivity to ethanol intake and these behaviors could be related to activation of extended amygdala and mesocorticolimbic systems. Our results suggest that additional factors to the drug use such as stress and pre-exposure to other drug could increase the vulnerability to addiction.

Keywords: Drug addiction. Nicotine. Ethanol. Stress. Animal behavior. Molecular alterations.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** - Vias eferentes, diretas ou indiretas ao núcleo acúmbens ativadas por substâncias psicoativas e interação intracelular glutamato e dopamina.....31
- Figura 1.2** - Resposta intracelular após ativação glutamatérgica e/ou dopaminérgica.37
- Figura 3.1** - Caixa de atividade locomotora. (Columbus Instruments, Columbus, OH, USA).....42
- Figura 3.2** - Labirinto em cruz elevado para ratos (INSIGHT®, Ribeirão Preto, SP, Brasil).....43
- Figura 3.3** - Caixa de autoadministração de nicotina ou etanol (INSIGHT®, Ribeirão Preto, SP, Brasil).....45
- Figura 3.4** - Caixa de autoadministração de etanol (Med Associates, St. Albans, VT, EUA).....50
- Figura 3.5** - Visão Frontal de uma unidade de câmara de vapor (La Jolla Alcohol Research, Inc., La Jolla, CA, EUA).....53
- Figura 3.6** - Visão dos componentes descritos e organizados na prateleira superior do equipamento.....53
- Figura 3.7** - Bandas representativas de ensaio de Western Blotting de imunofluorescência.....56
- Figura 3.8** - A esquerda está o esquema das secções encefálicas adaptadas do Atlas Esterotáxico de Paxinos e Watson, (2006), mostrando os locais onde foram feitos os punches para a dissecação do CPFm, NAc e AM. E a direita estão as fatias coronais contendo o NAc , CPFm e AM, coradas pelo método de crisol violeta.....57

| | |
|---|----|
| Figura 3.9 - Eletroforese de RNA total de amostras do núcleo acúmbens em gel de agarose 1,5%, com tampão MOPS. As bandas representam as frações ribossomais 28 S e 18S..... | 60 |
| Figura 3.10 - Fatias coronais representativas da expressão de Fos em células do córtex pré-frontal dorsomedial (CPF-dm), córtex pré-frontal ventromedial (CPF-vm), córtex frontal orbital (CFO), Centro do núcleo acúmbens (NAc Centro), Concha do núcleo acúmbens (NAc Concha), núcleo intersticial da estria terminal (BNST) amígdala basolateral (Am-BL) e central (Am-Ce), área tegmental ventral posterior (VTA-p) e a área tegmental ventral anterior (VTA-a)..... | 67 |
| Figura 3.11 - Fatias coronais representativas da expressão de Fos, CamkII, GAD67, TH e NeuN..... | 69 |
| Figura 4.1 - Delineamento experimental: (A) Sensibilização cruzada entre estresse e nicotina e análise das neuroadaptações no córtex pré-frontal medial, núcleo acúmbens e amígdala; (B) Efeito da sensibilização cruzada na autoadministração de nicotina..... | 70 |
| Figura 4.2 - Delineamento experimental do efeito da administração prévia de cocaína na autoadministração de nicotina e análise da expressão gênica no núcleo acúmbens..... | 72 |
| Figura 4.3 - Delineamento experimental do efeito da administração prévia de nicotina na autoadministração de etanol..... | 74 |
| Figura 4.4 - Delineamento experimental da efeito da administração simultânea de nicotina na autoadministração de etanol..... | 76 |
| Figura 5.1 - Locomoção induzida pela administração de salina ou nicotina de ratos submetidos ao estresse repetido variado e controles..... | 79 |
| Figura 5.2 - Consumo de sacarose pelo peso corpóreo de animais submetidos ao estresse repetido variado e controles..... | 80 |
| Figura 5.3 - Número de reforços (A) e última razão completada (B) durante as sessões de razão progressiva de ratos dos grupos controle e estresse..... | 81 |

| | |
|--|----|
| Figura 5.4 - Consumo cumulativo de nicotina no acesso livre prolongado de 24 horas. (A) e (B) consumo individual de nicotina (mg/Kg) de animais dos grupos estresse e controle ao longo do tempo..... | 81 |
| Figura 5.5 - Bandas representativas das proteínas CREB (vermelho) e p-CREB (verde) no núcleo acúmbens, de animais expostos ao estresse (E) e controle (C), que receberam salina (S) ou nicotina(N) 10 dias após a última exposição ao estresse..... | 83 |
| Figura 5.6 - Quantificação da proteína CREB nas formas total e fosforilada no núcleo acúmbens de animais expostos ao estresse e controle, que receberam salina ou nicotina 10 dias após a última exposição ao estresse..... | 83 |
| Figura 5.7 - Bandas representativas das proteínas ERK (vermelho) e p-ERK (verde) no núcleo acumbens, de animais expostos ao estresse (E) e controle (C), que receberam salina (S) ou nicotina(N) 10 dias após a última exposição ao estresse..... | 85 |
| Figura 5.8 - Quantificação da proteína ERK nas formas total e fosforilada no núcleo acúmbens de animais expostos ao estresse e controle, que receberam salina ou nicotina 10 dias após a última exposição ao estresse..... | 85 |
| Figura 5.9 - Bandas representativas das proteínas CREB (vermelho) e p-CREB (verde) na amígdala, de animais expostos ao estresse (E) e controle (C), que receberam salina (S) ou nicotina(N) 10 dias após a última exposição ao estresse..... | 87 |
| Figura 5.10 - Quantificação da proteína CREB nas formas total e fosforilada na amígdala de animais expostos ao estresse e controle, que receberam salina ou nicotina 10 dias após a última exposição ao estresse..... | 87 |
| Figura 5.11 - Bandas representativas das proteínas ERK (vermelho) e p-ERK (verde) na amígdala, de animais expostos ao estresse (E) e controle (C), que receberam salina (S) ou nicotina(N) 10 dias após a última exposição ao estresse..... | 89 |
| Figura 5.12 - Quantificação da proteína ERK nas formas total e fosforilada na amígdala de animais expostos ao estresse e controle, que receberam salina ou nicotina 10 dias após a última exposição ao estresse..... | 89 |

| | |
|---|----|
| Figura 5.13 - Bandas representativas das proteínas CREB (vermelho) e p-CREB (verde) no córtex pré-frontal medial, de animais expostos ao estresse (E) e controle (C), que receberam salina (S) ou nicotina(N) 10 dias após a última exposição ao estresse..... | 91 |
| Figura 5.14 - Quantificação da proteína CREB nas formas total e fosforilada no córtex pré-frontal medial de animais expostos ao estresse e controle, que receberam salina ou nicotina 10 dias após a última exposição ao estresse..... | 91 |
| Figura 5.15 - Bandas representativas das proteínas ERK (vermelho) e p-ERK (verde) no córtex pré-frontal medial, de animais expostos ao estresse (E) e controle (C), que receberam salina (S) ou nicotina(N) 10 dias após a última exposição ao estresse..... | 93 |
| Figura 5.16 - Quantificação da proteína ERK nas formas total e fosforilada no córtex pré-frontal medial de animais expostos ao estresse e controle, que receberam salina ou nicotina 10 dias após a última exposição ao estresse..... | 93 |
| Figura 5.17 - Atividade locomotora após injeção de salina ou cocaína (15 mg/Kg; i.p.) em ratos pré-tratados com cocaína (20 mg/Kg) ou salina..... | 95 |
| Figure 5.18 - Atividade locomotora após a injeção de salina e nicotina (0,4 mg/Kg; s.c.) em ratos pré-tratados com cocaína (20 mg/Kg) ou salina..... | 96 |
| Figura 5.19 - Média do número de respostas (A) e da última razão alcançada (B) nas sessões de razão progressiva em animais pré-tratados com cocaína ou salina..... | 97 |
| Figure 5.20 - Número de respostas (A), reforços (B) e consumo total de nicotina (C) durante a sessão de acesso livre prolongado de 24 horas em animais pré-tratados com cocaína ou salina..... | 98 |
| Figure 5.21 - Análise semiquantitativa ou relativa da expressão ($2^{\Delta\Delta Ct}$) dos genes DYN, Mu-opio, NPY, BDNF, TrKB e CRF-R1, 24 horas após a sessão de acesso livre prolongado a nicotina..... | 99 |
| Figura 5.22 - A figura representa a análise dos comportamentos relacionados com a ansiedade [(A) porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos, (B) | |

porcentagem do número de entradas nos braços abertos e (C) frequência de entradas nos braços fechados] de animais dos grupos nicotina e salina.....101

Figura 5.23 - Número de respostas (A), número de reforços (B) e última razão completada (C) durante as sessões de razão progressiva por ratos dos grupos salina e nicotina.....102

Figura 5.24 - Consumo cumulativo de etanol (mg/Kg) dos animais dos grupos nicotina e salina na sessão de acesso livre prolongado de 24 horas.....103

Figura 5.25 - Número de reforços ao longo de 16 sessões de autoadministração operante de etanol 10% de animais expostos (A) e não expostos (B) ao vapor de etanol e que foram tratados com nicotina (0,8 mg/Kg; s.c.) ou salina 0,9% (1,0 ml/Kg; s.c.) e (C) animais tratados com nicotina expostos ou não expostos ao vapor de etanol.....106

Figura 5.26 - Número de reforços e a última razão alcançada durante as sessões de razão progressiva por ratos submetidos ao tratamento com salina 0,9% (1,0 ml/Kg; s.c.) ou nicotina (0,8 mg/Kg; s.c.) e expostos (Vapor) ou não expostos (Ar) ao vapor de etanol.....108

Figura 5.27 - Teste de adulteração da solução de etanol por quinino. Em (A) os animais expostos ao vapor de etanol e em (B) os animais que não foram expostos ao vapor de etanol.....110

Figura 5.28 - Cortes do córtex pré-frontal medial demonstrando as regiões ventral (A), dorsal (B) e orbital (C) onde foram quantificadas as células positivas para a proteína Fos. A figura mostra também a imunomarcagem para Fos no córtex pré-frontal medial ventral (D), dorsal (E) e orbital (F) (aumento de 12,5X e 50X).....111

Figura 5.29 - Contagem de células positivas para proteína Fos (mm²) em diferentes regiões do córtex pré-frontal.....112

Figura 5.30 - Cortes do núcleo acúmbens demonstrando as regiões do centro (A) e da concha (B) onde foram quantificadas as células positivas para a proteína Fos. A figura

mostra também a imunomarcção para Fos no centro (C) e na concha (D) do núcleo acúmbens (aumento de 12,5X e 50X).....113

Figura 5.31 - Contagem de células positivas para proteína Fos (mm²) em diferentes regiões do núcleo acúmbens.....114

Figura 5.32 - Cortes da amídala demonstrando as regiões do basolateral (A) e central (B) onde foram quantificadas as células positivas para a proteína Fos. A figura mostra também a imunomarcção para Fos nas porções basolateral (C) e central (D) da amídala (aumento de 12,5X e 50X).....115

Figura 5.33 - Contagem de células positivas para proteína Fos (mm²) em diferentes regiões da amídala.....116

Figura 5.34 - Cortes do núcleo intersticial da estria terminal demonstrando as regiões justa capsular (A), lateral posterior (B) e lateral anterior (C), onde foram quantificadas as células positivas para a proteína Fos. A figura mostra também a imunomarcção para Fos nas regiões da justa capsular (D), lateral posterior (E) e lateral anterior (F) do núcleo intersticial da estria terminal (aumento de 12,5X e 50X).....117

Figura 5.35 - Contagem de células positivas para proteína Fos (mm²) em diferentes regiões do núcleo intersticial da estria terminal.....118

Figura 5.36 - Cortes da área tegmental ventral demonstrando as regiões posterior (A) e anterior (B), onde foram quantificadas as células positivas para a proteína Fos. A figura mostra também a imunomarcção para Fos nas regiões posterior (D) e anterior (E) da área tegmental ventral (aumento de 12,5X e 50X).....119

Figura 5.37 - Contagem de células positivas para proteína Fos (mm²) em diferentes regiões da área tegmental ventral.120

Figura 5.38 - Cortes ilustrativos mostrando a dupla marcação (C) de Neun (A) e Fos (B) aumento de 100X.....121

| | |
|---|-----|
| Figura 5.39 - Cortes ilustrativos mostrando a dupla marcação para Fos e CamKII (A), GAD67 (B) e TH (C) aumento de 100X..... | 122 |
| Quadro 1.1 - Critérios para o diagnóstico de dependência segundo o DSM-V-2013.... | 23 |
| Tabela 3.1 - Protocolo de Estresse Variável..... | 44 |
| Tabela 3.2 - Sequências 5´-3´ dos primers de ida (For) e reverso (Rev)..... | 62 |
| Tabela 3.3 - Resultados dos testes de otimização para verificar a melhor concentração de primer para cada gene..... | 63 |
| Tabela 3.4 - Resultados dos testes de validação..... | 64 |
| Tabela 3.5 - Anticorpos utilizados na reação de dupla marcação por imunofluorescência..... | 68 |
| Tabela 5.1 - Porcentagem de ativação neural induzida pela interação entre etanol e nicotina em ratos dependentes ao etanol (vap) e controles (ar) de células ativadas em diferentes áreas encefálicas: córtex pré-frontal dorsomedial (CPF-dm); centro do núcleo acumbens (NAc-C); núcleo intersticial da estria terminal (BNST); amígdala central (Am-Ce) e basolateral (Am-BL) e área tegmental ventral posterior (VTA-p)..... | 122 |
| Tabela 5.2 - Fenótipo de neurônios que foram ativados durante a autoadministração de etanol em ratos dependentes e controles no córtex pré-frontal dorsomedial de células duplamente marcadas para Fos e CamKII ou GAD67..... | 123 |
| Tabela 5.3 - Fenótipo de neurônios que foram ativados durante a autoadministração de etanol em ratos dependentes e controles no núcleo acumbens na porção central de células duplamente marcadas para Fos e GAD67..... | 124 |
| Tabela 5.4 - Fenótipo de neurônios que foram ativados durante a autoadministração de etanol em ratos dependentes e controles no núcleo intersticial da estria terminal de células duplamente marcadas para Fos e GAD67..... | 124 |

Tabela 5.5 - Fenótipo de neurônios que foram ativados durante a autoadministração de etanol em ratos dependentes e controles área tegmental ventral posterior de células duplamente marcadas para Fos e GAD67 ou TH.....125

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 21 |
| 1.1 Aspectos Gerais..... | 21 |
| 1.2 Teorias da Dependência, Modelos Animais e Neurobiologia..... | 23 |
| 1.3 Autoadministração de Nicotina - Interação com Estresse e Cocaína..... | 31 |
| 1.4 Autoadministração de Etanol - Interação com a Nicotina..... | 37 |
| 2 OBJETIVOS..... | 40 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 41 |
| 3.1 Parecer Ético..... | 41 |
| 3.1.1 Experimentos Realizados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP, Brasil..... | 41 |
| 3.1.2 Experimentos Realizados no The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, Estados Unidos..... | 41 |
| 3.2 Animais..... | 41 |
| 3.2.1 Experimentos Realizados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP, Brasil..... | 41 |
| 3.2.2 Experimentos Realizados no The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, Estados Unidos..... | 42 |
| 3.3 Fármacos..... | 42 |
| 3.4 Equipamentos..... | 42 |
| 3.4.1 Caixa Automática para Avaliação da Atividade Locomotora..... | 42 |
| 3.4.2 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)..... | 43 |
| 3.5 Protocolo de Estresse..... | 43 |
| 3.6 Autoadministração de Nicotina..... | 45 |
| 3.6.1 Caixa para Autoadministração..... | 45 |
| 3.6.2 Treino com Sacarose 6%..... | 46 |
| 3.6.3 Cirurgia para a Implantação do Catéter na Veia Jugular..... | 46 |
| 3.6.4 Aquisição da Autoadministração de Nicotina..... | 46 |
| 3.6.5 Manutenção da Autoadministração de Nicotina..... | 47 |
| 3.6.6 Razão Progressiva..... | 48 |
| 3.6.7 Acesso Livre Prolongado de 24 horas..... | 48 |
| 3.7 Autoadministração de Etanol (Experimentos Realizados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, Brasil)..... | 48 |

| | |
|---|----|
| 3.7.1 Aquisição da Autoadministração de Etanol..... | 49 |
| 3.7.2 Manutenção da Autoadministração de Etanol..... | 49 |
| 3.7.3 Razão Progressiva..... | 49 |
| 3.7.4 Acesso Livre Prolongado de 24 horas..... | 50 |
| 3.8 Autoadministração de Etanol (Experimento Realizado no The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA)..... | 50 |
| 3.8.1 Caixa de Autoadministração..... | 50 |
| 3.8.2. Aquisição da Autoadministração de Etanol..... | 51 |
| 3.8.3 Câmara de Vapor de Etanol..... | 51 |
| 3.8.4 Exposição ao vapor de etanol..... | 54 |
| 3.8.5 Escalada da autoadministração de etanol..... | 54 |
| 3.8.6 Razão Progressiva..... | 55 |
| 3.8.7 Teste de Adulteração por Quinino..... | 55 |
| 3.9 Western Blotting..... | 56 |
| 3.9.1 Dissecção das Áreas Encefálicas..... | 56 |
| 3.9.2 Ensaio..... | 58 |
| 3.10 Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real (RT-PCR)..... | 59 |
| 3.10.1 Dissecção do Núcleo Acúmbens..... | 59 |
| 3.10.2 Ensaio de RT-PCR Quantitativo..... | 59 |
| 3.10.2.1 Extração do RNA Total..... | 59 |
| 3.10.2.2 Determinação da Concentração do RNA Total..... | 60 |
| 3.10.2.3 Eletroforese de RNA..... | 60 |
| 3.10.2.4 Transcrição Reversa de RNA..... | 61 |
| 3.10.2.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)..... | 61 |
| 3.10.2.6 Gel de c-DNA..... | 61 |
| 3.10.2.7 Seleção de Oligonucleotídeos Iniciadores (Primers)..... | 62 |
| 3.10.2.8 Otimização dos Primers..... | 62 |
| 3.10.2.9 Validação dos Primers..... | 63 |
| 3.10.2.10 RT-PCR..... | 64 |
| 3.10.3 Análises dos Resultados..... | 65 |
| 3.11 Imunoistoquímica..... | 65 |
| 3.12 Dupla Marcação por Imunofluorescência..... | 67 |
| 4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL..... | 70 |

| | |
|---|----|
| 4.1 Efeito da Exposição Prévia ao Estresse Variável na Autoadministração de Nicotina e Análise das Neuroadaptações no Córtex Pré-frontal Medial, Núcleo Acúmbens e Amígdala..... | 70 |
| 4.1.1 Efeito do Estresse Variável na Atividade Locomotora..... | 70 |
| 4.1.2 Determinação da Atividade de CREB e ERK no Pré-frontal Medial, Núcleo Acúmbens e Amígdala..... | 71 |
| 4.1.3. Efeito do Estresse Variável na Autoadministração de Nicotina..... | 71 |
| 4.1.4. Análise Estatística..... | 71 |
| 4.2 Efeito da Administração Prévia de Cocaína na Autoadministração de Nicotina e Análise da Expressão Gênica no Núcleo Acúmbens..... | 72 |
| 4.2.1 Avaliação da Sensibilização Locomotora à Cocaína..... | 72 |
| 4.2.2 Sensibilização Locomotora Cruzada entre o Pré-Tratamento com Cocaína e a Administração Aguda de Nicotina..... | 73 |
| 4.2.3. Autoadministração Intravenosa de Nicotina..... | 73 |
| 4.2.4 Análise da Expressão Gênica por RT-PCR..... | 73 |
| 4.2.5 Análise Estatística..... | 73 |
| 4.3 Efeito da Administração Prévia de Nicotina na Autoadministração de Etanol..... | 74 |
| 4.3.1 Pré-Tratamento de Nicotina..... | 74 |
| 4.3.2 Teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE)..... | 74 |
| 4.3.3 Autoadministração de Etanol..... | 75 |
| 4.3.4 Análises Estatísticas..... | 75 |
| 4.4 Efeito da Administração Simultânea de Nicotina no Desenvolvimento da Dependência ao Etanol: Identificação e Caracterização de Pequenos Grupos Neurais (Experimentos Realizados no The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA e no National Institute on Drug Abuse, Baltimore, MD, EUA)..... | 76 |
| 4.4.1 Autoadministração de Etanol..... | 76 |
| 4.4.2 Imunohistoquímica..... | 77 |
| 4.4.3 Análises Estatísticas..... | 77 |
| 5 RESULTADOS..... | 79 |
| 5.1 Efeito da Exposição Prévia ao Estresse Variável na Autoadministração de Nicotina e Análise das Neuroadaptações no Córtex Pré-frontal Medial, Núcleo Acúmbens e Amígdala..... | 79 |
| 5.1.1 Efeito do Estresse Variável na Atividade Locomotora..... | 79 |

| | |
|--|-----|
| 5.1.2 Efeito do Estresse Variável na Autoadministração de Nicotina..... | 80 |
| 5.1.2.1 Consumo de Sacarose..... | 80 |
| 5.1.2.2 Avaliação do Ponto de Ruptura na Autoadministração de Nicotina..... | 80 |
| 5.1.2.2 Avaliação do Ponto de Ruptura na Autoadministração de Nicotina..... | 80 |
| 5.1.2.3 Consumo de Nicotina em 24 horas..... | 81 |
| 5.1.3 Determinação da Atividade de CREB e ERK no Núcleo Acúmbens..... | 82 |
| 5.1.3.1 Determinação da Atividade de CREB..... | 82 |
| 5.1.3.2 Determinação da Atividade de ERK..... | 84 |
| 5.1.4 Determinação da Atividade da CREB e ERK na Amígdala..... | 86 |
| 5.1.4.1 Determinação da Atividade de CREB..... | 86 |
| 5.1.4.2 Determinação da Atividade de ERK..... | 88 |
| 5.1.5 Determinação da Atividade da CREB e ERK no Córtex Pré-frontal Medial..... | 90 |
| 5.1.5.1 Determinação da Atividade de CREB..... | 90 |
| 5.2.5.2 Determinação da Atividade de ERK..... | 92 |
| 5.2 Efeito da Administração Prévia de Cocaína na Autoadministração de Nicotina e Análise da Expressão Gênica no Núcleo Acúmbens..... | 94 |
| 5.2.1 Atividade Locomotora..... | 94 |
| 5.2.1.1 Sensibilização Locomotora à Cocaína..... | 94 |
| 5.2.1.2 Sensibilização Locomotora Cruzada entre o Pré-Tratamento com Cocaína e a Administração Aguda de Nicotina..... | 95 |
| 5.2.2 Autoadministração de Nicotina..... | 96 |
| 5.2.2.1 Razão Progressiva..... | 96 |
| 5.2.2.2 Acesso Livre Prolongado de 24 Horas “Binge”..... | 97 |
| 5.2.3 Reação da Polimerase em Cadeia em Tempo Real (RT-PCR)..... | 98 |
| 5.3 Efeito da Administração Prévia de Nicotina na Autoadministração de Etanol... | 100 |
| 5.3.1 Comportamentos Relacionados a Ansiedade Induzida pela Administração Repetida de Nicotina..... | 100 |
| 5.3.2 Autoadministração de Etanol..... | 101 |
| 5.3.2.1 Razão Progressiva..... | 101 |
| 5.3.2.2 Acesso Livre Prolongado de 24 horas..... | 103 |
| 5.4 Efeito da Administração Simultânea de Nicotina no Desenvolvimento da Dependência ao Etanol: Identificação e Caracterização de Pequenos Grupos Neuronais (Experimentos Realizados no The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA e no National Institute on Drug Abuse, Baltimore, MD, EUA)..... | 104 |

| | |
|---|-----|
| 5.4.1 Escalada da Autoadministração de Etanol..... | 104 |
| 5.4.2 Razão Progressiva..... | 107 |
| 5.4.3 Teste de Adulteração por Quinino..... | 108 |
| 5.4.4 Imunohistoquímica..... | 111 |
| 5.4.4.1 Expressão Neural de Fos (DAB)..... | 111 |
| 5.4.4.1.1 Córtex Pré-Frontal Medial..... | 111 |
| 5.4.4.1.2 Núcleo Acúmbens..... | 113 |
| 5.4.4.1.3 Amígdala..... | 115 |
| 5.4.4.1.4 Núcleo Intersticial da Estria Terminal (BNST)..... | 117 |
| 5.4.4.1.5 Área Tegmental Ventral..... | 119 |
| 5.4.4.2 Porcentagem de Ativação Neural (Dupla Marcação Fos e NeuN)..... | 121 |
| 5.4.4.3 Análise do Fenótipo dos Neurônios Positivos para Fos (Dupla Marcação Fos e CamkII ou TH ou GAD67)..... | 122 |
| 5.4.4.3.1 Córtex Pré-Frontal Dorsomedial..... | 123 |
| 5.4.4.3.2 Núcleo Acúmbens..... | 123 |
| 5.4.4.3.3 Núcleo Intersticial da Estria Terminal..... | 124 |
| 5.4.4.3.4 Área Tegmental Ventral..... | 125 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 125 |
| 6.1 Efeito da Exposição Prévia ao Estresse Variável na Autoadministração de Nicotina e Análise das Neuroadaptações no Córtex Pré-frontal Medial, Núcleo Acúmbens e Amígdala..... | 126 |
| 6.2 Efeito da Administração Prévia de Cocaína na Autoadministração de Nicotina e Análise da Expressão Gênica no Núcleo Acúmbens..... | 130 |
| 6.3 Efeito da Administração Prévia de Nicotina na Autoadministração de Etanol... | 134 |
| 6.4 Efeito da Administração Simultânea de Nicotina no Desenvolvimento da Dependência ao Etanol: Identificação e Caracterização de Pequenos Grupos Neurais (Experimentos Realizados no The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA e no National Institute on Drug Abuse, Baltimore, MD, EUA)..... | 137 |
| 7 CONCLUSÃO..... | 142 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 142 |
| APÊNDICE A..... | 172 |
| APÊNDICE B..... | 182 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais

O uso de substâncias de abuso não é um fenômeno recente. Ele tem acompanhado a humanidade em diversos períodos de sua história, variando de acordo com aspectos culturais e sociais de cada época. O uso dessas substâncias ao longo da história sempre foi associado à procura de um estado de consciência alterado, alívio de desconforto e busca do prazer (ROYCE, 1981; TOSCANO JR, 2001).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) substância de abuso pode ser definida como toda substância natural ou sintética que quando introduzida no organismo pode alterar o funcionamento do sistema nervoso central, proporcionando experiências subjetivas de prazer, capazes de levar parte de seus usuários à dependência (OMS, 2012a).

Vários indicadores mostram que o consumo de drogas tem atingido formas e proporções preocupantes no decorrer das últimas décadas. Por exemplo, o relatório do Escritório das Nações Unidas Sobre Drogas e Crimes (UNODC) da OMS mostrou que, no mundo, cerca de 250 milhões de pessoas fazem uso de substâncias de abuso (não incluindo nicotina e etanol), e que 0,6% da população mundial entre 15 e 64 anos de idade (25 milhões de pessoas) são consideradas dependentes a pelo menos uma dessas substâncias (UNODC, 2012). No Brasil, dados epidemiológicos do Centro Brasileiro de Investigações sobre Drogas (CEBRID) mostram que 3,4 milhões de pessoas entre 18 e 59 anos usaram droga (exceto nicotina e etanol) pelo menos uma vez na vida (CEBRID, 2005).

Entretanto, nicotina e etanol são as mais consumidas no mundo (BOBO; HUSTEN, 2000). Etanol é a substância de abuso mais consumida mundialmente, aproximadamente 12% da população mundial consome etanol diariamente (OMS, 2012b; UNODC, 2012). Dados do CEBRID (2005) revelam que 74,6% da população brasileira consumiu etanol pelo menos uma vez na vida, sendo que 12,3% são consideradas dependentes. Nos países em desenvolvimento com menor taxa de mortalidade, como o Brasil, o consumo de etanol é o maior fator de risco de morbidade e mortalidade (EZZATI et al., 2002).

Em relação à nicotina, dados do CEBRID revelam que 44% da população brasileira já usou esta substância pelo menos uma vez na vida, sendo que a porcentagem de dependentes na população geral é estimada em 10,1% (CEBRID, 2005). O uso do tabaco resulta em mais de 5 milhões de mortes por ano sendo que aproximadamente 90% delas são causadas por câncer de pulmão (PICCIOTTO; KENNY, 2013). Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), o tabaco é a segunda maior causa de mortes no mundo (OPAS, 2009). O consumo diário de tabaco atinge 30% da população mundial, cerca de 1 bilhão de pessoas (OMS, 2012b).

Apesar do número elevado de pessoas que fazem uso de substâncias de abuso, apenas uma pequena, mas considerável porcentagem, torna-se dependente (UHL; GROW, 2004). Assim, como será apresentado adiante, outros fatores interagem com o efeito da substância para influenciar o desenvolvimento da dependência.

Segundo o Manual de Diagnóstico e Estatística da Sociedade Americana de Psiquiatria (DSM) a dependência de substâncias de abuso é conceituada como um padrão mal-adaptado de uso de uma substância psicoativa, que causa consequências adversas ao indivíduo. Sendo este, um processo que geralmente inicia-se com o uso ocasional da substância de abuso e evolui para o uso compulsivo (DSM-V, 2013).

A quinta edição do DSM apresenta onze critérios para o diagnóstico da dependência. Se o indivíduo apresentar pelo menos dois desses critérios, no período de um ano, ele pode ser considerado dependente a uma substância de abuso (Quadro 1.1).

Quadro 1.1: Critérios para o diagnóstico de dependência segundo o DSM-V - 2013.

- 1- Uso recorrente da substância resultando no negligenciamento de compromissos sociais
 - 2- Uso recorrente da substância em situações que coloca em risco a integridade física do indivíduo (por exemplo, dirigir um automóvel)
 - 3- Uso contínuo da droga a despeito dos problemas causados e exacerbados promovido pelo uso da mesma
 - 4- Tolerância (caracterizada pelo aumento do consumo e diminuição do efeito da droga)
 - 5- Síndrome de abstinência (especifica para cada tipo de droga)
 - 6- Uso da substância em grande quantidade e período de tempo maior que o esperado pelo indivíduo antes de iniciar o uso
 - 7- Persistência do uso e tentativas mal sucedidas de interromper o uso
 - 8- Tempo exacerbado dedicado às atividades necessárias para obter a substância, usar e se recuperar dos efeitos causados pela droga
 - 9- Desistência ou redução da realização de práticas recreacionais, sociais e ocupacionais devido ao uso da substância
 - 10- A manutenção do uso da substância a despeito do conhecimento dos efeitos adversos (físicos e psicológicos) que o uso da droga causa
 - 11- Desejo incontrolável de utilizar a substância (compulsividade)
-

Fonte: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-V), 5ª ed., 2013.

1.2 Teorias da Dependência, Modelos Animais e Neurobiologia

Embora exista um critério estabelecido para o diagnóstico da dependência, as causas que levam os indivíduos a passarem do uso ocasional para o uso compulsivo tem sido discutidas ao longo dos anos e algumas teorias foram propostas, porém ainda não existe um consenso entre elas.

Uma das primeiras tentativas de definir dependência foi realizada por uma comissão de especialistas da OMS em 1958. Após anos de discussão essa comissão chegou ao seguinte relato: "o termo mais apropriado para dependência

seria droga-adicção". Segundo essa definição, existiriam dois tipos de dependência, psicológica e física (EDDY et al., 1965).

A definição de dependência física foi baseada na observação das consequências adversas decorrentes da interrupção do uso das drogas, quadro denominado de síndrome de abstinência. A síndrome de abstinência é um conjunto de sinais e sintomas, geralmente opostos aos efeitos agudos das drogas, que promovem desconforto intenso ao indivíduo. Assim, os indivíduos manteriam o uso da droga para evitar o desconforto da retirada. A síndrome de abstinência é observada após o uso prolongado de uma substância. Além desse fenômeno o uso prolongado promove tolerância que é um estado adaptativo caracterizado pela diminuição na resposta à administração da mesma quantidade de droga, fazendo que o indivíduo aumente a dose para obter o mesmo efeito farmacológico do início do uso e evitar os sintomas desagradáveis da síndrome de abstinência (EDDY et al., 1965; JAFFE, 1989; O'BRIEN, 2001).

Por outro lado, dependência psicológica foi caracterizada pela busca contínua da droga para obter um estado de satisfação e euforia (EDDY et al., 1965; SOLOMON, 1980).

Baseados nas definições acima, Solomon e Corbit (1973) propuseram a teoria do processo opoente da motivação. Segundo esses autores no sistema nervoso central existem dois circuitos neurais, um relacionado com a euforia que a substância promove e outro com os sintomas aversivos promovidos pela ausência da substância no organismo. Assim, as drogas seriam capazes de ativar esses dois sistemas promovendo um equilíbrio entre os efeitos euforizante e aversivo. Ainda de acordo com essa teoria, o uso repetido da substância de abuso promoveria tolerância para o efeito prazeroso e sensibilização dos efeitos aversivos da síndrome de abstinência. Assim, segundo esses autores o indivíduo faria o uso dessa substância em doses cada vez maiores (escalada) para evitar os efeitos adversos da retirada da droga e obter o mesmo efeito prazeroso do uso inicial.

Posteriormente, Wise (1978) propôs a teoria do reforço positivo para explicar a dependência. Segundo essa teoria, todas as substâncias de abuso seriam capazes de liberar dopamina no núcleo acúmbens e o aumento de dopamina nessa região seria responsável pela promoção de prazer e euforia. Assim, o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico se consolidou como o circuito de recompensa produzido pelas substâncias de abuso (WISE, 1978). Essa teoria postulava que o

indivíduo fazia o uso da substância apenas pela busca do prazer que a mesma proporcionava.

Porém, essa teoria não explicava a transição do uso ocasional para o uso compulsivo da substância. Desta forma, Robinson e Berridge (1993) propuseram que o desejo compulsivo pela droga resultaria da sensibilização de vias dopaminérgicas mesolímbicas envolvidas com o incentivo motivacional e recompensa. De acordo com esses autores, além de mediar a sensação subjetiva de prazer, o sistema dopaminérgico mesolímbico regularia o impulso motivacional e a atenção a estímulos ambientais relacionados ao uso da droga. Dessa maneira, com o uso repetido, a droga e os estímulos associados a ela se tornariam progressivamente mais atrativos fazendo com que o indivíduo desenvolvesse desejo compulsivo (“fissura”) pela substância que seria capaz de controlar o comportamento (ROBINSON; BERRIDGE, 1993). Essa teoria foi chamada de sensibilização do incentivo motivacional. Segundo esses autores, os efeitos adversos da abstinência seriam de importância secundária para o entendimento do uso compulsivo das drogas (BERRIDGE; ROBINSON, 1998).

Na mesma época, Koob e Le Moal (1997), baseados na teoria dos processos oponentes, propuseram a teoria da alostasia hedônica para explicar o uso compulsivo das drogas. Segundo esses autores, o uso inicial das drogas promoveria ativação da via do prazer e como uma resposta compensatória, o organismo ativaria outra via, chamada via do estresse, que promoveria estados emocionais negativos (disforia, ansiedade, irritabilidade). Com o uso repetido de uma substância de abuso, ocorreria tolerância para os efeitos positivos e sensibilização dos efeitos emocionais negativos. Assim, o indivíduo faria o uso de quantidades cada vez maiores da substância para cessar/evitar esses efeitos emocionais estressantes e aversivos (Alostasia Hedônica) (KOOB, 2009).

Dependência também tem sido considerada um comportamento de aprendizado associativo (JONKMAN; PELLOUX; EVERITT, 2012; WILCOX et al., 2011), no qual os efeitos intraceptivos físicos e emocionais da droga são associados ao ambiente e a parafernália para o uso da droga. Dessa forma, quando o indivíduo é re-exposto ao ambiente ou às dicas ambientais, por exemplo seringas, cachimbo e aromas, os neurônios que armazenam essa associação são ativados e o indivíduo manifesta o desejo incontrolável pela droga, e assim, retoma o uso (DRUMMOND; COOPER; GLAUTIER, 1990; ROBINSON; BERRIDGE, 1993).

Para o avanço do conhecimento das bases neurobiológicas da dependência é necessário a utilização de modelos animais que possam evidenciar alterações comportamentais e moleculares relacionadas à transição do uso ocasional para a dependência (CAPRIOLI et al., 2007).

Segundo a teoria da sensibilização do incentivo, em animais, administrações repetidas de substâncias psicoativas promovem alterações neuroquímicas e moleculares no sistema mesocorticolímbico homólogas àquelas responsáveis pela transição do uso controlado para o uso compulsivo dessas substâncias (COVINGTON; MICZEK, 2001; NESTLER; BARROT; SELF, 2001). Essas alterações são expressas pelo aumento progressivo da atividade locomotora após a administração repetida da substância psicoativa (ROBINSON; BECKER, 1986). Este fenômeno é chamado de sensibilização locomotora (POST; ROSE, 1976; ROBINSON; BECKER, 1986; SHUSTER; YU; BATES, 1977; VANDERSCHUREN; KALIVAS, 2000). A sensibilização locomotora já foi descrita para a cocaína, anfetamina, etanol, morfina, delta-9-THC, heroína e nicotina (CADONI; SOLINAS; DI CHIARA, 2000; CRUZ; DELUCIA; PLANETA, 2005; KALIVAS; DUFFY, 1987; LENOIR; AHMED, 2007; MARIN; PLANETA, 2004; MISERENDINO; NESTLER, 1995; ROBINSON; BECKER, 1986).

As consequências dessas neuroadaptações no consumo de uma substância de abuso podem ser avaliadas através do modelo de autoadministração de drogas que é considerado um dos modelos mais preditivos para o estudo da dependência (LECCA et al., 2007; LU et al., 2003). Esse modelo é fundamentado nos princípios do condicionamento operante no qual cada resposta é reforçada pelos efeitos euforizantes da própria substância de abuso (reforço positivo) (PANLILIO; GOLDBERG, 2007).

Vários estudos demonstram que todas as substâncias que causam dependência em humanos induzem autoadministração em animais. A autoadministração foi demonstrada para cocaína (AHMED; KOOB, 1999; KNACKSTEDT; KALIVAS, 2007), heroína (DEMBO et al., 1988b), etanol (GRANT; SAMSON, 1985; MCBRIDE et al., 1991), anfetamina (ROTHMAN; BAUMANN, 2006), nicotina (RAHMAN et al., 2004; SHOAIB, 2008; SHRAM et al., 2007; COHEN; ETTENBERG, 2007) e delta-9-THC (TANDA; MUNZAR; GOLDBERG, 2000).

Segundo Panlilio e Goldberg (2007) a autoadministração pode predizer vários aspectos que marcam a transição do uso ocasional para a dependência. Por

exemplo, um dos sinais da dependência, segundo o DSM-V (2013) é o aumento da motivação para uso da droga. No modelo de autoadministração esse sinal pode ser avaliado pelo procedimento de razão progressiva (ROBERTS; MORGAN; LIU, 2007). Neste procedimento o número de respostas necessárias para a aquisição de um novo reforço aumenta progressivamente, e em uma determinada razão o animal desiste de se esforçar (para de pressionar a barra) para receber novo reforço. A maior razão alcançada, o maior número de reforços obtidos, bem como o número de respostas, caracterizam o ponto de ruptura. De tal forma que, quanto maior o ponto de ruptura mais motivado o animal está para buscar e obter a substância (BEDFORD; BAILEY; WILSON, 1978).

Outro parâmetro, denominado acesso livre prolongado à substância ou “binge”, no qual o animal é exposto a uma sessão com consumo ilimitado durante um período prolongado, é bastante utilizado para avaliar a quantidade e o padrão de consumo de uma dada substância (MORGAN; ROBERTS, 2004). Por exemplo, o consumo de cocaína por humanos é caracterizado por períodos de uso em grandes quantidades, seguido por períodos de abstinência (O'BRIEN, 2006), o mesmo padrão pode ser observado por animais submetidos a uma sessão de “binge” de cocaína por vinte e quatro horas (COVINGTON; MICZEK, 2001; MORGAN; SMITH; ROBERTS, 2005).

Os comportamentos avaliados na autoadministração são muito sensíveis a manipulações ambientais, como por exemplo, exposição a estresse ou à outra droga, o que confere a este modelo validade de face (COVINGTON; MICZEK, 2001; YAP; MICZEK, 2007).

A maioria dos estudos avalia os comportamentos relacionados à dependência utilizando animais comportamentalmente normais (“não dependentes”), porém para aumentar a previsibilidade desses estudos, seria relevante a utilização de animais que possuíssem fenótipo semelhante a indivíduos dependentes.

Porém, é possível tornar um animal dependente? Nos últimos trinta anos esta questão tem estimulado a produção e a criatividade de muitos pesquisadores (AHMED, 2012). Neste sentido, os modelos mais bem sucedidos para a indução de fenótipos relacionados a dependência em animais foram desenvolvidos para o etanol (GILPIN et al., 2009).

Para o desenvolvimento da dependência ao etanol em ratos, foram desenvolvidas duas metodologias: (1) dieta líquida de etanol; (2) exposição ao vapor de etanol.

Na primeira, os animais são alimentados com dieta líquida nutricionalmente balanceada e enriquecida com etanol que permite um consumo diário de etanol de 14 - 16 g/Kg/dia. A desvantagem desse procedimento é a variabilidade individual, por exemplo, a dose, duração e o padrão de exposição ao etanol são determinados pelo animal (GILPIN et al., 2009).

No segundo modelo, os animais são expostos diariamente a ciclos de vapor de etanol (14 horas) e abstinência (10 horas), utilizando uma câmara própria para a realização deste procedimento. O vapor de etanol apresenta vantagens sobre a dieta líquida. Por exemplo, a inalação de vapor permite ao experimentador controlar a dose, duração e padrão de exposição ao etanol, facilita a realização de outros testes comportamentais e possui maior flexibilidade do protocolo para ajustar a realidade de cada laboratório e de diferentes experimentos (ROGERS; WIENER; BLOOM, 1979; GILPIN et al., 2009).

Os animais submetidos a um desses dois procedimentos apresentam escalada gradativa da autoadministração de etanol, aumento do ponto de ruptura, aumento dos comportamentos relacionados à ansiedade e também da persistência em consumir etanol a despeito do sabor aversivo de uma solução de quinino, fenótipos semelhantes aos apresentados por pacientes dependentes ao etanol e listados no DSM-V (Quadro 1.1) (GILPIN et al., 2009).

Os estudos em animais permitem também a investigação dos mecanismos neurobiológicos subjacentes ao desenvolvimento da dependência que é considerada um transtorno neuroadaptativo caracterizado por alterações neuroquímicas e moleculares do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (ROBINSON; BERRIDGE, 1993; NESTLER, 2005).

Os principais componentes desse circuito são a área tegmental ventral (VTA, sítio com alta densidade de corpos celulares de neurônios dopaminérgicos) e suas projeções para regiões dos sistemas límbico e cortical, incluindo o núcleo acúmbens (NAc), amígdala (AM), córtex pré-frontal medial (CPFm) e hipocampo (Hipp) (KOOB; LE MOAL, 2001) (Figura 1.1).

As substâncias de abuso são capazes de ativar, por diferentes mecanismos, o sistema mesocorticolímbico, promovendo a liberação de glutamato e dopamina no

NAc (DI CHIARA, 2002; LECCA et al., 2007; WISE et al., 1995). A modulação da liberação desses neurotransmissores no NAc pode ser devido a interação das substâncias de abuso com seus receptores presentes nos terminais ou nos corpos celulares de neurônios glutamatérgicos e/ou dopaminérgicos (CHANG et al., 1994, 1997; JONES et al., 2010) ou ainda através de uma ativação indireta desses neurônios mediada pela ação dessas substâncias em outros sistemas de neurotransmissão, por exemplo, opioidérgicos, canabinóides, serotoninérgicos, gabaérgicos e crférgicos (CANNELLA et al., 2013; GEORGE; LE MOAL; KOOB, 2012; GOLDEN; RUSSO, 2012; HOFFMAN; LUPICA, 2012; PASTOR et al., 2012; PETERS; DE VRIES, 2012; VALENTINI et al., 2013).

Vários estudos demonstram que glutamato e dopamina são os dois principais neurotransmissores envolvidos no efeito reforçador e no desenvolvimento da dependência a substâncias psicoativas (BADIANI et al., 2011).

O papel da dopamina na mediação do efeito reforçador das substâncias de abuso foi demonstrada por estudos utilizando a técnica de microdiálise, que mostraram que a administração de cocaína, anfetamina, morfina (PONTIERE et al., 1996), etanol (KIIANMAA et al., 1995), delta-9-THC (TANDA et al., 2000) e nicotina (PONTIERE, et al., 1996) aumentam a liberação de dopamina no NAc. Estes resultados foram confirmados por estudos comportamentais que mostraram que o pré-tratamento com antagonistas dopaminérgicos foi capaz de bloquear a autoadministração de cocaína (BARI; PIERCE, 2005) e nicotina (CORRIGALL; COEN, 1991; CORRIGALL et al., 1992).

Entretanto, estudos *in vivo*, utilizando a técnica de eletrofisiologia mostraram que dopamina *per se* não ativa as células no NAc e que a ativação celular desta região é dependente da atividade glutamatérgica (KIYATKIN; REBEC, 2000; KOYA et al. 2012; ONN; WEST; GRACE, 2000; NICOLA; SURMEIER; MALENKA, 2000). O glutamato quando liberado no NAc se liga em seus receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA) e ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA), promovendo o influxo dos íons sódio e cálcio e, conseqüentemente, a despolarização desses neurônios. Os íons cálcio promovem, por diferentes mecanismos intracelulares, a ativação de alguns substratos como, por exemplo, a enzima Elemento Responsivo à Fatores Externos Cinase (ERK). ERK, quando ativada, fosforila os fatores de transcrição Elk-1 e a Proteína Ligante ao Elemento Responsivo à AMPc (CREB). Esses fatores de transcrição, quando fosforilados,

migram para a região nuclear do neurônio e se ligam, por exemplo, a regiões promotoras do gene de c-fos no DNA, promovendo a transcrição desse gene e posterior tradução da proteína Fos (Figura 1.1).

A dopamina pode modular a atividade glutamatérgica de duas maneiras: 1) ligando-se a receptores D1, promovendo ativação da proteína Gs (estimulatória), que ativa a enzima adenilato ciclase, convertendo ATP em AMPc. O AMPc ativa a Proteína Cinase Dependente de AMPc (PKA) que fosforila CREB, intensificando o efeito do glutamato; PKA também fosforila receptores NMDA, amplificando ainda mais o efeito glutamatérgico sobre a célula (YOUNG; PORRINO; IADAROLA, 1991). 2) dopamina também pode modular a atividade do glutamato ao se ligar a um receptor, tipo D2 (ligado à proteína G inibitória - Gi), inibindo a atividade celular. Trabalhos sugerem que esta ação inibitória é necessária para a diminuição do ruído (ativação celular inespecífica) no NAc, aumentando a seletividade de ativação celular que é necessária para que o indivíduo aumente a atenção à um determinado estímulo, como por exemplo, a associação entre o efeito da substância e o ambiente onde ela está sendo utilizada, sendo esta resposta molecular um importante mecanismo para o aprendizado associativo (PEOPLES; CAVANAUGH, 2003; PEOPLES et al., 1998, 1999).

A ativação constante desse sistema, devido ao uso repetido de uma substância de abuso, pode promover alterações sinápticas duradouras, responsáveis pelo desenvolvimento da dependência (NESTLER, 2005).

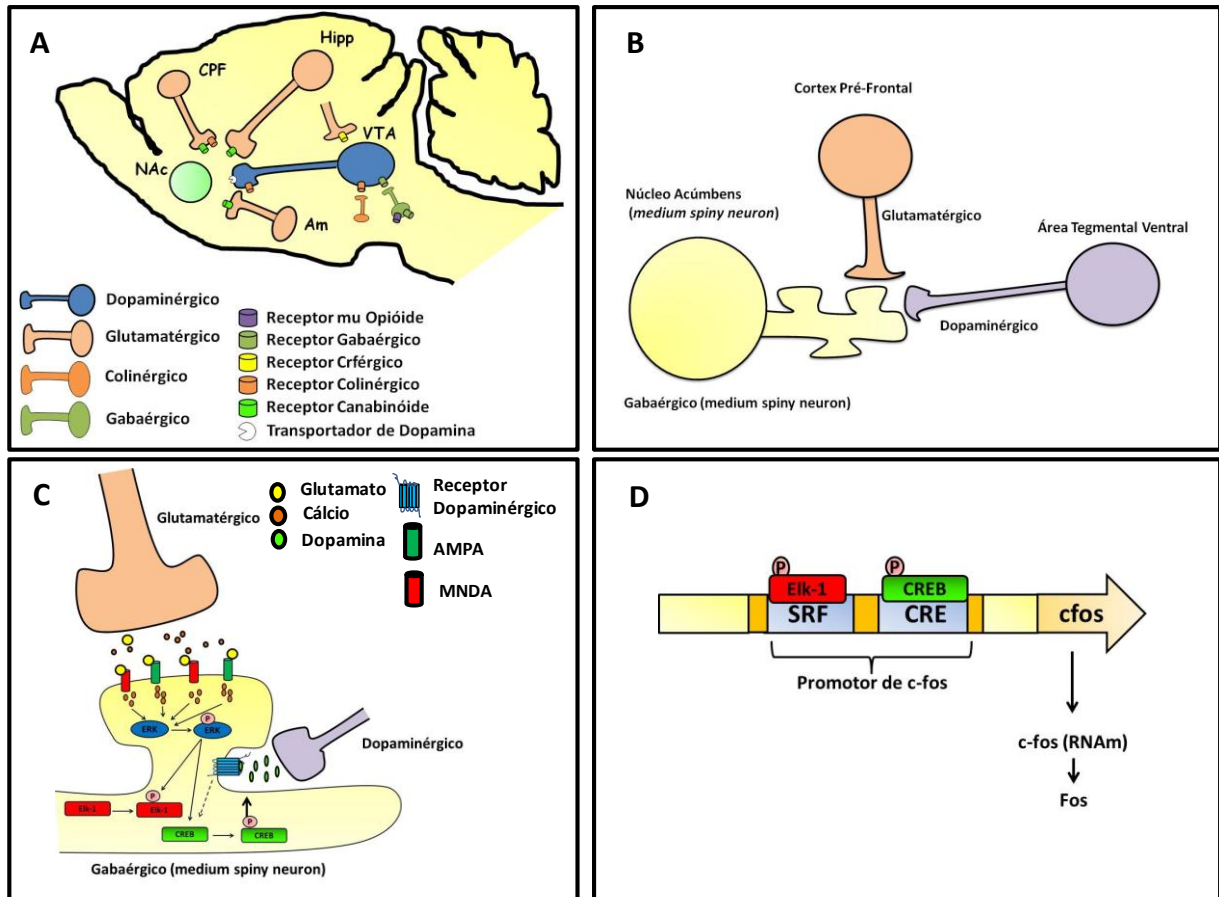


Figura 1.1 - (A) Vias glutamatérgicas e dopaminérgicas eferentes ao núcleo acúmbens ativadas direta ou indiretamente por substâncias psicoativas; **(B)** Localização sináptica entre neurônios glutamatérgicos e dopaminérgicos no núcleo acúmbens; **(C)** Interação intracelular do glutamato e dopamina; **(D)** Ativação da região promotora (Fator responsivo à Soro - SRF e Elemento Responsivo à AMPc - CRE) e expressão de c-fos e consequente tradução de Fos. (Adaptado de CARLEZON; DUMAN; NESTLER, 2005; ZHENG; PATTERSON; BERTHOUD, 2002).

1.3 Autoadministração de Nicotina - Interação com Estresse e Cocaína

A fumaça do cigarro contém mais de quatro mil substâncias químicas, contudo, a maioria dos estudos pré-clínicos e clínicos demonstram que a nicotina é o principal agente responsável pelo desenvolvimento da dependência ao tabaco (STOLERMAN; JARVIS, 1995).

A nicotina exerce sua ação no sistema nervoso central ligando-se a receptores colinérgicos nicotínicos (nAChR) em diferentes regiões (ADDY; PICCIOTTO, 2013).

Os nAChR são formados por cinco sub-unidades protéicas que formam um canal iônico com condutância para sódio e cálcio, dependendo das sub-unidades formadoras (TUESTA; FOWLER; KENNY, 2011). No sistema nervoso central, os nAChR são formados pela combinação (homopentamérica ou heteropentamérica) das sub-unidades α 2-10 e β 2-4. Estudos demonstram que os principais nAChR relacionados aos comportamentos de dependência ao tabaco são os $\alpha 4\beta 2$, os homoméricos $\alpha 7$ e os receptores que contém a sub-unidade $\alpha 5$ (PICCIOTTO; KENNY, 2013).

A nicotina pode atuar no sistema mesocorticolímbico ligando-se aos seus receptores $\alpha 4\beta 2$ situados nos corpos celulares de neurônios dopaminérgicos do VTA ou nos terminais sinápticos desses neurônios no NAc, modulando assim, a liberação de dopamina nessa região encefálica. A nicotina também pode se ligar no NAc à receptores $\alpha 7$ situados em terminais sinápticos de neurônios glutamatérgicos provenientes do CPFm, AM e Hipp. A interação da nicotina com seus receptores em neurônios dopaminérgicos e glutamatérgicos resulta na produção do reforço positivo (FOWLER; KENNY, 2012).

Assim como outras substâncias de abuso a nicotina promove sensibilização locomotora (CRUZ; DELUCIA; PLANETA, 2005), pode ser autoadministrada (SHOAIB, 2008) e esses comportamentos tem sido associados a alterações moleculares no sistema mesocorticolímbico. Neste sentido, evidências indicam que neuroadaptações na expressão e atividade de ERK e CREB, nesse sistema, desempenham papel importante no desenvolvimento de comportamentos relacionados à dependência (Figura 1.2) (MATTSON et al., 2005; LU et al., 2003; PIERCE; KALIVAS, 1997). Por exemplo, em roedores, o tratamento agudo com nicotina aumenta a concentração de ERK fosforilado no NAc, estriado dorsal, CPFm e AM, enquanto o tratamento crônico parece diminuir a concentração nessas regiões, exceto no CPFm (BRUNZELL; RUSSELL; PICCIOTTO, 2003; ZHAI et al., 2008). Estudos mostram também que a atividade de CREB é reduzida no NAc após o tratamento crônico com nicotina (BRUNZELL; RUSSELL; PICCIOTTO, 2003).

Um ponto importante no estudo da dependência é a caracterização dos fatores de risco relacionados à vulnerabilidade ao desenvolvimento dessa psicopatologia (ANTHONY; PETRONIS, 1995). Nesse sentido, a dependência a nicotina é um fenômeno bem complexo que envolve uma série de fatores, além dos relacionados à

droga, tais como fatores ambientais e individuais (O'BRIEN; EHRMAN; TERNS, 1986; MARLATT et al., 1988).

O estresse tem se destacado como um fator importante relacionado com a iniciação, manutenção e recaída ao uso de drogas, em especial ao tabaco (GOEDERS; GUERIN, 1994; PIAZZA; LEMOAL, 1998; SINHA et al., 2006).

O termo estresse pode ser definido como um processo que envolve a percepção, interpretação, resposta e adaptação a eventos aversivos, ameaçadores ou desafiadores. A resposta do organismo ao estresse resulta na ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e do sistema nervoso simpático (SELYE, 1975).

Várias evidências apontam a associação entre o estresse e uso de tabaco. Observações clínicas indicam que o estresse é um fator de risco tanto para o desenvolvimento da dependência quanto para a recaída ao uso do tabaco (DEWART; FRANK; SCHMEIDLER, 2006; MCFALL; MACKAY; DONOVAN, 1992; OUIMETTE et al., 2007). Por exemplo, foi demonstrado que o desejo intenso pelo tabaco aumenta após a exposição a eventos estressantes (BUCHMANN et al., 2010; ROSE, 2010; SCHACHTER, 1978). Estudos pré-clínicos corroboram essas observações clínicas. Por exemplo, demonstramos em nosso laboratório que o estresse de imobilização por trinta minutos foi capaz de reinstalar a preferência condicionada por lugar à nicotina 1 e 15 dias após sua extinção (LEÃO; CRUZ; PLANETA, 2009).

Em roedores, a exposição repetida ao estresse aumenta a resposta locomotora a uma subsequente administração de drogas (ANTELMAN et al., 1980; ARAUJO et al., 2003; CRUZ; DELUCIA; PLANETA, 2008; DEROCHE et al., 1992; HAILE; GRANDPRE; KOSTEN, 2001; HERMAN; STINUS; LE MOAL, 1984; NIKULINA et al., 2004; REID; HO; BERGER, 1998). Este fenômeno tem sido denominado sensibilização cruzada entre estresse e droga. A sensibilização cruzada entre estresse e psicostimulantes tem sido observada depois de exposições repetidas aos protocolos de estresse de choque na pata, imobilização, restrição de comida e derrota social (CABIB et al., 2000; COVINGTON; MICZEK, 2001; HAHN; ZACHARKO; ANISMAN, 1986; KALIVAS; DUFFY 1989; SORG; KALIVAS, 1991; YAP; MICZEK, 2007).

Em relação à nicotina, os dados da literatura parecem ser ainda conflitantes, pois enquanto alguns autores demonstraram que a exposição ao estresse promove sensibilização locomotora a essa substância (CRUZ; DELUCIA; PLANETA, 2008;

KITA et al., 1999), outros estudos não evidenciam esse fenômeno (FARADAY et al., 2003; MCCORMICK; IBRAHIM, 2007).

Além de promover sensibilização cruzada, o estresse também pode interferir na resposta reforçadora e motivacional, um fenômeno que já foi demonstrado para cocaína e anfetamina (COVINGTON et al., 2005; MICZEK et al., 1999; VANDERSCHUREN; NIESINK; VAN REE, 1997; WELCH; HENDLEY; TUREK, 1974). Por exemplo, animais que foram submetidos a quatro sessões de estresse social aprenderam mais rapidamente e com menores doses a autoadministrar cocaína, quando comparados aos animais controles (HANEY et al., 1995), além de apresentarem maior ponto de ruptura (COVINGTON; MICZEK 2001). Porém, esse fenômeno ainda não foi demonstrado para nicotina.

A exposição ao estresse pode aumentar também o consumo de drogas (MICZEK; YAP; COVINGTON, 2008). Por exemplo, foi demonstrado que ratos autoadministram mais psicostimulantes e speedball (mistura de cocaína e heroína) após serem expostos a um protocolo de estresse (COVINGTON; MICZEK, 2001; CRUZ et al. 2011; GOEDERS; GUERIN, 1994; KOSTEN; MISERENDINO; KEHOE, 2000; PIAZZA; LE MOAL, 1998; SHAHAM; STEWART, 1994).

A interação entre estresse e droga pode ocorrer por meio da ativação do sistema mesocorticolímbico, pois ambos são capazes de direta ou indiretamente ativar esse sistema (IMPERATO et al. 1989; KALIVAS; DUFFY, 1989; MARINELLI; PIAZZA, 2002). Por exemplo, tem sido demonstrado que a exposição repetida ao estresse promove alterações em moléculas intracelulares em regiões encefálicas associadas à dependência (ARAÚJO et al., 2003; BILANG-BLEUEL et al., 2002; COVINGTON et al., 2005). Neste sentido, Bilang-Bleuel et al. (2002) demonstraram aumento na ativação de CREB em ratos expostos a sessões de choque na pata.

Embora relevante, a literatura é escassa em relação a investigação dos mecanismos neurobiológicos envolvidos na relação entre estresse e a dependência ao uso do tabaco. Desta forma, seria interessante avaliar se o estresse e nicotina causam alterações moleculares semelhantes.

Além do estresse, outro fator de risco para o desenvolvimento de dependência à nicotina é a pré-exposição a outras substâncias de abuso. Neste sentido, evidências clínicas mostram relação significativa entre o uso de psicostimulantes e dependência à nicotina. Por exemplo, a administração aguda de anfetamina pode aumentar o número de cigarros consumidos por tabagistas (COUSINS; STAMAT;

DE WIT, 2001; HENNINGFIELD; GRIFFITHS, 1981). Dependentes de cocaína frequentemente relatam aumento no consumo de tabaco concomitante ao uso de cocaína (BUDNEY et al, 1993; ROLL et al, 1996; ROLL; HIGGINS; TIDEY, 1997; TORCHALLA et al., 2011).

Estudos pré-clínicos também evidenciam que a cocaína pode aumentar a vulnerabilidade ao abuso e desenvolvimento de dependência à nicotina. Por exemplo, macacos Rhesus autoadministraram maior quantidade de uma solução combinada de nicotina e cocaína quando comparado com a autoadministração dessas soluções em separado (FREEMAN; WOOLVERTON, 2009; MELLO; NEWMAN, 2011).

Muitos estudos demonstram o efeito da exposição à nicotina sobre a autoadministração de cocaína em roedores. Por exemplo, a exposição prévia a nicotina aumenta a porcentagem de animais que aprendem a autoadministrar cocaína (HORGER; GILES; SCHENK, 1992). Além disso, foi observado aumento do ponto de ruptura para cocaína em animais pré-expostos à nicotina (ANKER; CARROLL, 2011). Foi observado, também, que a administração aguda de nicotina reinstala a autoadministração de cocaína e também que a exposição crônica de nicotina promove escalada da autoadministração de cocaína (BECHTHOLT; MARK, 2002)

Embora existam inúmeros trabalhos demonstrando a influência da exposição à nicotina sobre os efeitos comportamentais da cocaína, a literatura é escassa em demonstrar os efeitos da exposição prévia à cocaína sobre os efeitos comportamentais da nicotina.

Estudos demonstraram que os efeitos comportamentais da cocaína relacionados à dependência são causados pela ação farmacológica dessa substância sobre os transportadores de recaptção de dopamina no sistema mesocorticolímbico. Cocaína bloqueia esses transportadores no NAc e desta forma, aumenta a concentração de dopamina nessa região, além disso ativa indiretamente neurônios glutamatérgicos que se projetam para o NAc (KOOB; LEMOAL, 2005). Como discutido acima, os efeitos comportamentais da nicotina também são decorrentes da ativação do sistema mesocorticolímbico, assim a interação comportamental após administração de cocaína e nicotina poderia ser devida às alterações moleculares nesse sistema.

Nesse sentido, estudos demonstram que ambas as drogas são capazes de promover alterações moleculares duradouras nesse sistema (THOMAS; KALIVAS; SHAHAM, 2008; NESTLER, 2001). Por exemplo, a administração repetida de cocaína ou nicotina pode promover alterações em enzimas intracelulares e alguns fatores de transcrição do sistema mesocorticolímbico (BHANG; CHOI; AHN, 2010; MALENKA; BEAR, 2004; POO, 2001; SWEATT, 2001).

A ativação de fatores de transcrição, como CREB, resulta na ativação da expressão gênica (NESTLER, 2005). Nestler (2008) descreveu, em um artigo de revisão, a importância da regulação gênica para a expressão de neuroadaptações e consequente desenvolvimento da dependência. Segundo este autor, a exposição repetida a substâncias psicoativas ou estímulos ambientais, como o estresse, pode promover alterações duradouras na expressão de genes que podem influenciar o desenvolvimento da dependência.

Alguns trabalhos demonstram que a exposição repetida a substâncias de abuso pode alterar a expressão de alguns genes como: o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e seu receptor, tropomiosina cinase B (TrkB); a dinorfina, e seu receptor μ -opióide (Mu-Opio), o neuropeptídeo Y (NPY), além do receptor do hormônio liberador de corticotrofina do tipo 1 (CRFR1) (ANG et al., 2001; EUSKIRCHEN et al., 2004; GEVREY et al., 2002; GHITZA et al., 2010; HOPE et al., 1994; KOOB; LEMOAL, 2005; MULLER; UNTERWALD, 2005; SHIPPENBERG; REA, 1997; TAYLOR et al., 2007). As proteínas traduzidas pela expressão desses genes desempenham função importante em alguns comportamentos relacionados à dependência (KALIVAS, 2007; NESTLER, 2001; RUSSO et al. 2010). Por exemplo, a exposição repetida à nicotina promove aumento na expressão de BDNF (KIVINUMMI et al., 2011). O aumento na expressão de BDNF em regiões límbicas tem sido relacionado ao desenvolvimento da busca compulsiva pela droga e reinstalação da autoadministração (BAHI et al., 2008; LU et al., 2004a;b).

O papel do sistema CRFérgico na dependência de nicotina também tem sido investigado. Neste sentido, Bruijnzeel; Prado; Isaac (2009) demonstraram que injeções intracerebroventricular de CRH promovem a reinstalação da autoadministração de nicotina. Além disso, a administração de um antagonista inespecíficos de CRF-R bloqueia a reinstalação da autoadministração de nicotina (ZISLIS et al., 2007).

A exposição à nicotina também diminui a expressão de peptídeos endógenos como a dinorfina, e aumenta a expressão de receptores mu-opiáceos em roedores (HOUDI; DASGUPTA; KINDY, 1998; WEWERS et al., 1999). Além disso, a administração crônica de nicotina diminuiu a expressão de NPY na AM (AYDIN; OZTAN; ISGOR, 2011).

Todas as neuroadaptações citadas acima foram demonstradas separadamente para exposição repetida à nicotina, ao estresse ou à cocaína. Porém, a literatura é escassa em demonstrar se essas alterações moleculares estariam presentes na interação da nicotina com estresse ou cocaína.

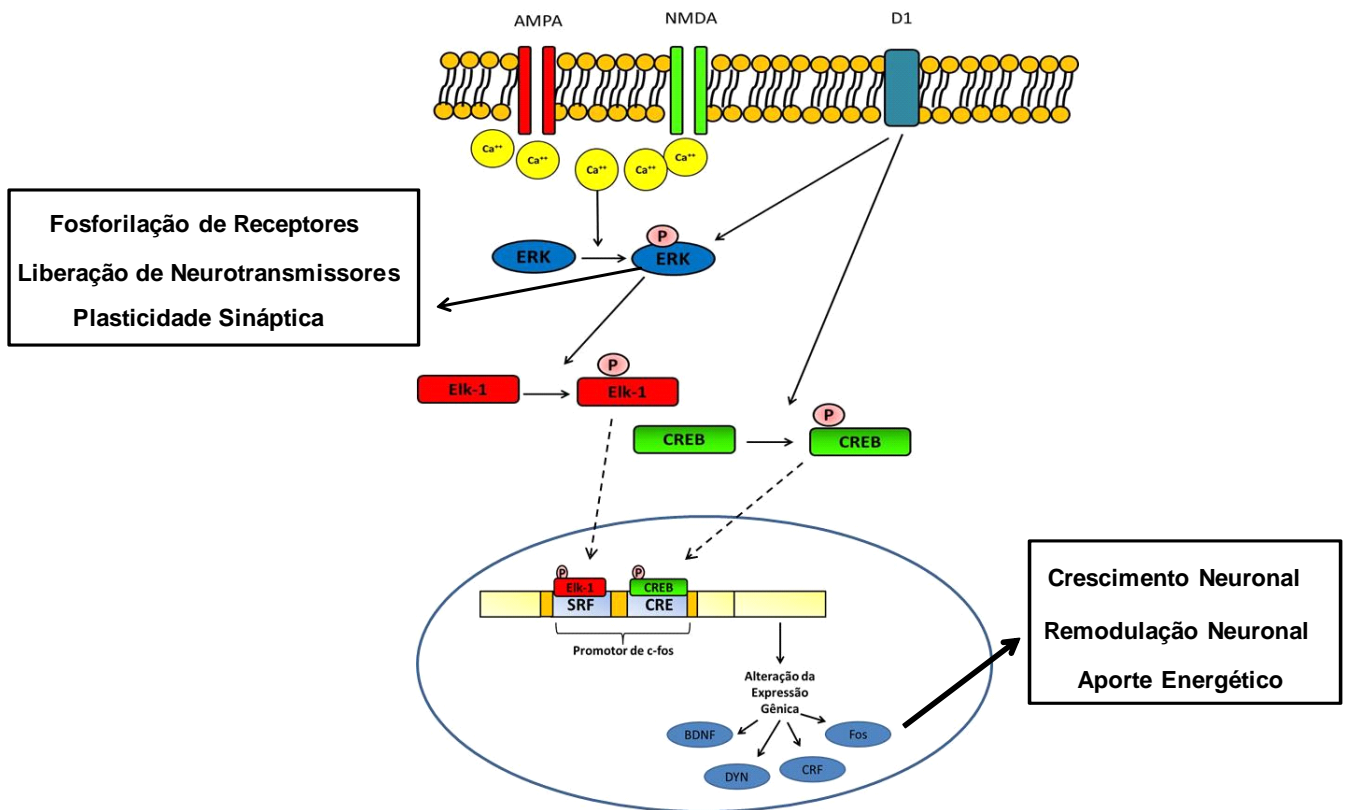


Figura 1.2 - Resposta intracelular após ativação glutamatérgica e/ou dopaminérgica (Adaptado de CARLEZON; DUMAN; NESTLER, 2005; ZHENG; PATTERSON; BERTHOUD, 2002).

1.4 Autoadministração de Etanol - Interação com a Nicotina

A dependência ao etanol é considerada uma doença crônica e recorrente caracterizada por: desejo incontrolável em usar essa substância, perda do controle da quantidade ingerida, estados físicos e emocionais negativos (disforia, ansiedade

e irritabilidade) que são evidenciadas quando o consumo dessa substância é interrompido (KOOB; LE MOAL, 2006). O padrão de uso é caracterizado por ciclos recorrentes de consumo intenso de etanol, seguidos por períodos de abstinência e recaída (FADDA; ROSSETI, 1998; SINHA; LI, 2007).

Segundo Heilig e Koob (2007), a dependência ao etanol apresenta progressão temporal. Na fase inicial, o consumo de etanol acontece devido ao seu efeito reforçador positivo, ou seja, devido ao prazer desencadeado pelo seu consumo. No entanto, após o consumo repetido e prolongado, o indivíduo passa a consumir etanol para aliviar os sintomas negativos da síndrome de abstinência. A abstinência aguda do etanol (24 - 48 horas após a interrupção do uso) é caracterizada por sintomas físicos como: convulsões, distúrbios motores e alterações autonômicas. A abstinência tardia, também chamada de protraída (semanas a anos de duração), é caracterizada por estados emocionais negativos, como ansiedade e depressão (GILPIN et al., 2008; MAJCHROWICZ, 1975).

O etanol é uma substância depressora do sistema nervoso central. Seu mecanismo de ação é bastante complexo e envolve a ação dessa substância em diversos receptores e proteínas efetoras. Em concentrações sanguíneas altas pode promover, também, alteração na composição lipídica das membranas citoplasmáticas. Os alvos primários do etanol são receptores glutamatérgicos (NMDA), gabaérgicos (GABA A), glicinérgicos, serotoninérgicos (5-HT₃), colinérgicos nicotínicos, canais de Ca²⁺ do tipo L e canais de K⁺ ativados por proteína G (FADDA; ROSSETTI, 1998; VENGELIENE et al., 2008). O etanol, ao se ligar nesses receptores, aumenta a atividade depressora e diminui a atividade estimulatória do sistema nervoso central.

O efeito reforçador do etanol se dá devido a sua ação no sistema mesocorticolímbico (WEISS et al., 1993). Evidências sugerem que o etanol se liga a receptores gabaérgicos (GABA A) localizados em neurônios gabaérgicos no VTA, inibindo sua atividade. Assim, essas células reduzem a inibição sobre os neurônios dopaminérgicos o que resulta em aumento da liberação de dopamina no NAc. Algumas evidências mostram que o etanol também age sobre receptores μ -opioides em neurônios opioidérgicos no VTA, e esses, por sua vez, inibem interneurônios gabaérgicos, intensificando a transmissão dopaminérgica e aumentando a liberação de dopamina no NAc (GILPIN; KOOB, 2008).

Os sinais e sintomas da síndrome de abstinência do etanol são mediados por diferentes sistemas (KOOB; LE MOAL, 2006). Os efeitos emocionais negativos são decorrentes da ativação da amígdala estendida que é composta pelo conjunto do núcleo intersticial da estria terminal (BNST), núcleo central da amígdala e concha do NAc (KOOB, 2009). Durante a abstinência ao etanol é observado, na amígdala estendida, aumento nas concentrações extracelulares de CRH, dinorfina e norepinefrina, combinado com a redução do NPY. Segundo Koob (2009), o desequilíbrio entre neurotransmissores causaria desregulação emocional que contribuiria para o surgimento dos estados emocionais negativos. Ainda segundo esse autor, o uso crônico do etanol promoveria tolerância do efeito reforçador e sensibilização dos estados aversivos, fazendo com que o indivíduo consuma quantidades maiores de etanol para obter a mesma sensação subjetiva de prazer e evitar os efeitos emocionais desagradáveis da síndrome de abstinência .

O uso concomitante ou prévio de outras substâncias de abuso pode facilitar o desenvolvimento da dependência ao etanol (MARTÍNEZ-ORTEGA et al., 2006; SCHMITZ; KRUSE; KUGLER, 2003). Etanol e nicotina são as mais frequentemente co-abusadas. Estudos mostram que 37% de americanos adultos são classificados como bebedores regulares e tabagistas (BOBO; HUSTEN, 2000). Existem evidências de que beber precede o ato de fumar e é descrito que a maioria dos etilistas (dependentes ao etanol) são fumantes e entre os não etilistas aqueles que fumam consomem mais etanol, quando comparado aos não fumantes (DANI; HARRIS, 2005).

Alguns estudos sugerem, tanto em animais como em humanos, que o etanol pode aumentar o efeito reforçador da nicotina (BUTT et al., 2004; ROSE et al., 2002). No mesmo sentido, foi demonstrado que a dependência de etanol é 10 vezes mais prevalente em fumantes do que em não fumantes (DIFRANZA; GUERRERA, 1990) e que a nicotina alivia os efeitos negativos da síndrome de abstinência do etanol (BUTT et al., 2004).

Embora os mecanismos de ação primários da nicotina e etanol sejam diferentes, ambas as substâncias modificam a neurotransmissão nos circuitos neurais associados ao abuso e dependência de substâncias psicoativas (CORRIGALL et al., 1992; PONTIERI et al., 1996; WEISS et al., 1993).

O sistema dopaminérgico mesocorticolímbico parece ser um sistema comum de ação para o etanol e para a nicotina (DING et al., 2012). A exposição aguda ao

etanol e nicotina são capazes de promover plasticidades no VTA, aumentando a atividade glutamatérgica e conseqüentemente a atividade dos neurônios dopaminérgicos que projetam para o NAc (SAAL et al., 2003). Ding et al. (2012) demonstraram que administração repetida de nicotina no VTA posterior aumentou a sensibilidade de neurônios dopaminérgicos para a administração de etanol.

A despeito dos estudos citados acima, que sugerem que o uso de tabaco aumente a vulnerabilidade ao desenvolvimento da dependência ao etanol, as regiões encefálicas e os mecanismos moleculares envolvidos nesta interação ainda não estão bem elucidados.

2 OBJETIVOS

Investigar:

a) se a exposição prévia ao estresse variado poderia alterar os parâmetros da autoadministração de nicotina, e se este fenômeno poderia estar relacionado à alterações na atividade de CREB e ERK no córtex pré-frontal medial, núcleo acúmbens e amígdala;

b) se a administração prévia e repetida de cocaína poderia alterar os parâmetros de autoadministração de nicotina, e se este fenômeno poderia estar relacionado a alterações na expressão de BDNF, TrkB, DYN, Mu-Opio, NPY e CRFR1 no núcleo acúmbens;

c) se a exposição prévia à nicotina poderia alterar os parâmetros de autoadministração de etanol;

d) o efeito da administração simultânea de nicotina no desenvolvimento da dependência ao etanol, e a caracterização das áreas encefálicas bem como o fenótipo dos neurônios envolvidos nesse comportamento.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Parecer Ético

3.1.1 Experimentos Realizados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP, Brasil

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP (CEP/FCF/CAr nº 19/2008) e os experimentos foram conduzidos seguindo os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - (COBEA).

3.1.2 Experimentos Realizados no The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, Estados Unidos

Os protocolos foram revisados e aprovados pelo The Scripps Research Institute's Institutional Care and Use Committee e seguiram os padrões disponibilizados no guia do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos: Guia para Cuidados e Uso de Animas em Laboratório.

3.2 Animais

3.2.1 Experimentos Realizados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP, Brasil

Foram utilizados ratos Wistar machos (210-240g), provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista - UNESP. Os animais foram transferidos para o biotério do laboratório de Farmacologia do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia do Câmpus de Araraquara - UNESP no mínimo 7 dias antes do início dos experimentos. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro invertido (ciclo 12/12 horas, luzes acesas às 18h), com livre acesso a alimento e água.

3.2.2 Experimentos Realizados no The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, Estados Unidos

Foram utilizados ratos Wistar machos (275-325g) provenientes do laboratório Charles River (Boston, MA, EUA). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (21,5°C) e ciclo claro-escuro invertido (ciclo 12/12 horas, luzes acesas às 20h), com livre acesso a água e comida.

3.3 Fármacos

- Cloridrato de Cocaína (Sigma, St Louis, MO, EUA)
dose: 20 mg/Kg; i.p. (sensibilização locomotora)

- (-) - Nicotina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA)
dose: 0,4 mg/Kg; s.c. (sensibilização locomotora)
0,03 mg/Kg/infusão; i.v. (autoadministração)
1,0 mg/Kg; s.c. (indução de efeito ansiogênico)

- Etanol 95% (Sigma, St Louis, MO, EUA)
dose: 6% (0,3 ml/reforço; v.o.) (autoadministração)

- Sacarina (Sigma, St Louis, MO, EUA)
dose: 0,05% (0,3 ml/reforço; v.o.) (autoadministração)

- Sulfato de Quinino (Sigma, St Louis, MO, EUA)
dose: 0,005; 0,01; 0,025; 0,05 g/L (0,1 ml/reforço; v.o.) (autoadministração)

3.4 Equipamentos

3.4.1 Caixa Automática para Avaliação da Atividade Locomotora



Figura 3.1 - Caixa de atividade locomotora. (Columbus Instruments, Columbus, OH, USA)

Foi utilizada a caixa de medida automática da atividade locomotora (Columbus Instruments, Columbus, OH, EUA), medindo 51,1 x 9,5 x 69,2 cm (largura x altura x comprimento). Esta caixa possuía 10 emissores de luz infravermelha, distantes 2,5 cm entre si e a 3,0 cm do piso da caixa. Cada unidade de locomoção correspondeu à interrupção de dois feixes de luz.

3.4.2 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)



Figura 3.2 - Labirinto em cruz elevado para ratos (INSIGHT®, Ribeirão Preto, SP, Brasil)

O LCE utilizado foi semelhante ao descrito originalmente por Pellow (1985). O labirinto era composto de dois braços abertos (45 x 10 x 0,25 cm) e dois braços fechados (45 x 10 x 20 cm) conectados via uma plataforma comum (10 x 10 cm). O aparato era feito de acrílico (chão e paredes) e era suspenso 70 cm do chão da sala de experimento.

3.5 Protocolo de Estresse

Foi utilizado o modelo de estresse variável previamente padronizado em nosso laboratório (LEPSCH et al., 2005; MARIN; CRUZ; PLANETA, 2007).

O protocolo do estresse variável consistiu na exposição a vários tipos de estresses (imobilização, natação forçada, privação de água e comida e inversão do

ciclo de luz) em horários variados durante 10 dias (Tabela 3.1). As exposições a todos os tipos de estresse foram realizadas em um ambiente separado dos animais controle. O grupo controle consistiu de animais de mesma idade, mantidos nas mesmas condições laboratoriais, mas não expostos ao estresse.

Tabela 3.1 - Protocolo de Estresse Variável

| Dia | Tipo de Estresse | |
|------------|--|---|
| 1º | Imobilização por 1 hora (Fase Escura) | Serragem Úmida (Fase Clara) |
| 2º | Isolamento/Frio por 1 hora (Fase Escura) | Luz Apagada (Fase Clara) |
| 3º | Luz Acesa por 3 horas (Fase Escura) | Nado Forçado por 4 min. (Fase Escura) |
| 4º | Privação de Água e Comida (Fase Escura) | Luz Estroboscópica por 12 horas (Fase Clara) |
| 5º | Nado Forçado por 3 min. (Fase Escura) | Serragem Úmida (Fase Escura) |
| 6º | Imobilização por 1 hora (Fase Escura) | Privação de Água e Comida (Fase Escura) |
| 7º | Luz Acesa por 2 horas. (Fase Escura) | Serragem Úmida (Fase Clara) |
| 8º | Isolamento/Frio 15 min. (Fase Escura) | Luz apagada (Fase Clara) |
| 9º | Imobilização por 1 hora. (Fase Escura) | Nado Forçado por 4 min. (Fase Escura) |
| 10º | Luz Estroboscópica por 12 horas (Fase Escura) | Privação de Água e Comida (Fase Escura) |

3.6 Autoadministração de Nicotina

O procedimento de autoadministração foi adaptado de GEORGE et al. (2007).

3.6.1 Caixa para Autoadministração



Figura 3.3 - Caixa de autoadministração de nicotina ou etanol (INSIGHT®, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

As caixas para autoadministração de nicotina (INSIGHT®, Ribeirão Preto, SP, Brasil) consistiram de caixas de acrílico medindo 24,5 cm de comprimento, 30 cm de largura e 30,5 cm de altura. O chão da caixa consistiu de uma bandeja de acrílico coberta por uma fina camada de serragem. Em uma das paredes da caixa encontrava-se

um painel removível, com duas barras retráteis nas laterais a 5 cm do chão. Acima de cada barra existia uma luz amarela que sinalizava qual era a barra ativa e outra luz verde que sinalizava a liberação da substância. No centro dessa mesma lateral existia uma luz branca de baixa intensidade (dim 40-lx) a 1 cm do teto que sinalizava o início da sessão de autoadministração. No centro do teto havia um orifício circular de 5 cm de diâmetro que possibilita a passagem e a livre movimentação do cateter, para administração de nicotina. Esse cateter estava conectado a um “swivel” contrabalançado, que estava conectado a uma seringa em uma bomba de infusão de drogas. A caixa experimental ficava alojada dentro de uma caixa de madeira equipada com ventilador. Essa caixa de madeira promovia isolamento acústico e luminoso. O painel e a bomba estavam conectados a uma interface ligada a um computador, contendo um programa específico (Paparato – INSIGHT®, Ribeirão Preto, SP, Brasil) para o controle do esquema de razão das infusões.

3.6.2 Treino com Sacarose 6%

Neste treino os animais ao pressionarem a barra uma vez recebiam 0,3 ml da solução (razão fixa 1 - RF1). Cada sessão tinha a duração de sessenta minutos. Os animais não foram privados de água ou comida. Os ratos que não aprenderam a pressionar a barra para receber o reforço de sacarose foram excluídos do experimento (\pm 5% por experimento). Vinte e quatro horas após este treino os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para o implante do catéter na veia jugular.

3.6.3 Cirurgia para a Implantação do Catéter na Veia Jugular

Os animais foram submetidos à cirurgia para a implantação de um catéter (silicone, diâmetro interno 0,63 mm e diâmetro externo 1,17mm) na veia jugular para autoadministração intravenosa de nicotina.

Com um bisturi foi feita uma incisão de aproximadamente 1 cm paralela ao ombro direito do animal. Com uma tesoura pequena o tecido muscular e adiposo foi dissecado até a visualização da veia jugular. A veia jugular foi então exposta e isolada na porção imediatamente posterior a sua ramificação. Todo o tecido adiposo e conectivo ao redor da veia foi removido.

Após a cirurgia os animais foram submetidos a um período de recuperação de no mínimo 5 dias. Nesse período os animais foram pesados e manipulados diariamente e tiveram livre acesso à água e comida e tratados com injeções diárias de cetoprofeno (5,0 mg/kg; i.m.), heparina 20 UI (0,2 ml, i.v.) e cefazolina (10,0 mg/kg; i.v.) por três dias consecutivos.

3.6.4 Aquisição da Autoadministração de Nicotina

Após cinco dias de recuperação do processo cirúrgico os animais foram submetidos ao processo de aquisição da autoadministração de nicotina, iniciamos o protocolo com administração de solução de sacarose 6%. Este procedimento tinha a finalidade de fazer com que o animal retornasse a pressionar a barra ativa (a barra inativa estava retraída). A sessão foi programada em um esquema de RF1. Cada

sessão teve a duração de sessenta minutos e os animais não foram privados de água ou comida. Após duas sessões de autoadministração de sacarose, foram realizadas sessões de autoadministração simultânea de nicotina (0,03 mg/Kg/infusão, i.v., 0,1ml/ segundo) e sacarose 6% (0,3 ml; v.o.) em esquema RF1. As sessões tinham a duração de uma hora ou era finalizada após 10 reforços de nicotina + sacarose. As sessões de autoadministração simultânea foram encerradas após os animais completarem duas sessões com o critério de finalização de dez reforços. Durante todo o experimento após os animais terem recebido um reforço, qualquer pressão na barra ativa não era mais reforçada durante 10 segundos, esse período é conhecido como “time-out”, que é importante para evitar a intoxicação dos animais.

Na próxima fase, os animais passaram a receber apenas reforços de nicotina. As sessões tiveram uma hora de duração em RF1. Os critérios de finalização de cada sessão foram mantidos como na fase anterior. Quando os animais finalizavam duas sessões com 10 reforços, na sessão seguinte eles passavam de RF1 para RF3. Para essa transição, a sessão iniciava-se com esquema de RF1, após três reforços recebidos a sessão passava para o esquema de RF2 e após três reforços passava para RF3, finalizando após mais 4 reforços, totalizando 10 infusões de nicotina. Os animais que completavam esta etapa passavam para a fase de manutenção.

Foi adotado um critério de exclusão no qual os animais que em cinco sessões não havia completado duas sessões com 10 reforços em RF1, foram excluídos do experimento ($\pm 20\%$ dos animais).

3.6.5 Manutenção da Autoadministração de Nicotina

Esta fase foi programada em esquema de RF3, cada sessão teve a duração de três horas e os animais que completavam três sessões com 10 infusões de nicotina finalizavam a fase de manutenção. Os animais que não completavam a fase de manutenção em no máximo cinco sessões foram excluídos do experimento ($\pm 10\%$ dos animais).

3.6.6 Razão Progressiva

Após a fase de manutenção da autoadministração, um esquema de razão progressiva (RP) de resposta foi implantado, ou seja, o número de respostas para a obtenção de um reforço aumentava a cada reforço obtido (nicotina - 0,03 mg/kg/infusão, i.v., 0,1 ml/segundo; “time-out” 10 segundos). Na razão progressiva foi utilizada a escala aritmética para o incremento do número de respostas para obtenção de um reforço (1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12,...) como descrito por Hodos et al. (1968). A sessão era encerrada quando o animal ficava sessenta minutos sem obtenção de um reforço.

A última razão completada, o número de infusões de nicotina recebidas e o número de respostas durante a sessão de RP, caracterizaram o ponto de ruptura. Foram realizadas três sessões de razão progressiva.

3.6.7 Acesso Livre Prolongado de 24 horas

Um protocolo de acesso contínuo à nicotina (0,03 mg/kg/infusão, i.v., 0,1 ml/segundo, FR1, “time out” 10 segundos) foi implementado por um período de 24 horas. A quantidade de nicotina administrada, o número de respostas na barra ativa e o número de reforços obtidos foram utilizados como variáveis dependentes.

3.7 Autoadministração de Etanol (Experimentos Realizados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, Brasil)

O procedimento foi adaptado de Cruz et al. (2008). A Caixa para autoadministração de etanol foi descrita no item 3.5.1. Porém, para autoadministração de etanol, no centro do painel havia um orifício com um pequeno bebedouro que estava conectado a uma seringa que estava conectada a uma bomba de infusão de drogas.

3.7.1 Aquisição da Autoadministração de Etanol

Os ratos inicialmente tiveram acesso ilimitado para autoadministrar solução de sacarina 0,05%, em que cada resposta na barra o rato recebia um reforço de 0,3 ml de sacarina (esquema de razão fixa 1; RF1), seguido de 20 segundos de intervalo em que cada resposta na barra ativa não era reforçada (“time-out”). Durante as sessões de autoadministração um sinal de luz amarelo acima da barra ativa sinalizava que a sacarina estava disponível e um sinal de luz verde, também acima da barra ativa, sinalizava que a sacarina estava sendo liberada no bebedouro. Durante o período de “time-out” as duas luzes permaneciam apagadas. Cada sessão diária era encerrada após 60 minutos. Foram realizadas três sessões de reforço de sacarina 0,05%. Nas duas subsequentes sessões os ratos receberam como reforço 0,3 ml de solução de etanol 2% (v/v) contendo sacarina 0,05% também em RF1, nas duas sessões seguintes a concentração de etanol foi aumentada para 4% com sacarina 0,05%. E em seguida a concentração foi aumentada para 6% contendo sacarina 0,05%. Esta concentração foi mantida para o resto do experimento.

3.7.2 Manutenção da Autoadministração de Etanol

Após duas sessões de etanol 6%, o esquema de razão fixa foi aumentado para razão fixa 3 (RF 3). Os ratos foram mantidos por cinco sessões com duração de três horas, em um acesso limitado ao etanol por 1 hora em RF3.

3.7.3 Razão Progressiva

Após a fase de manutenção da autoadministração, um esquema de razão progressiva (RP) de resposta foi implantado, ou seja, o número de respostas para a obtenção de um reforço aumentava a cada 2 reforços obtidos. Na razão progressiva foi utilizada a escala para o incremento do número de respostas para obtenção de um reforço segundo Gilpin et al. (2009): 1, 1, 2, 2, 3, 3, 4, 4, 5, 5, 7, 7, 9, 9, 11, 11, 13, 13, 15, 15, 18, 18, 21, 21, 24, 24, 27, 27, 30, 30, 34, 34, 38, 38, 42, 42, 46, 46, 50, 50... A sessão de RP era finalizada uma vez que o animal falhava em obter o próximo reforço num período de 60 minutos. A última razão completada, o número

de reforços de etanol recebidos e o número de respostas durante a sessão de RP caracterizaram o ponto de ruptura.

3.7.4 Acesso Livre Prolongado de 24 horas

Vinte quatro horas após a última sessão de RP, cada rato foi submetido a uma sessão de acesso livre prolongado de 24 horas, com acesso ilimitado a solução de etanol (0,3 mL de solução de etanol 6%, solução contendo sacarina 0,05%; RF1).

3.8 Autoadministração de Etanol (Experimento Realizado no The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA)

3.8.1 Caixa de Autoadministração

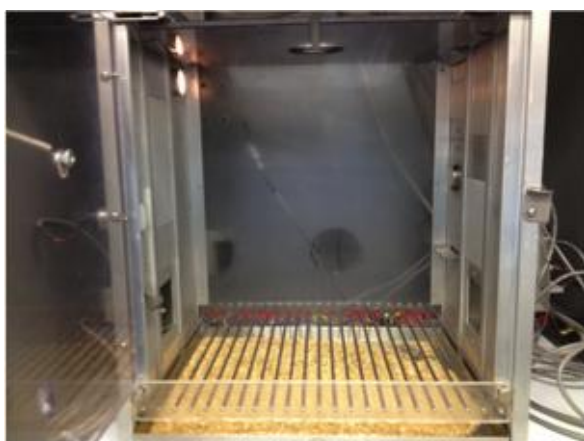


Figura 3.4 - Caixa de autoadministração de etanol (Med Associates, St. Albans, VT, EUA)

As caixas operantes (Med Associates, St. Albans, VT, EUA) tinham duas barras retráteis localizadas 4 cm do chão e lateralmente distantes 4,5 cm dos bebedouros. As caixas continham dois bebedouros que permitiam o acesso a duas soluções diferentes após a barra respectiva ser pressionada. Os bebedouros estavam conectados a seringas diferentes que estavam

conectadas em bombas de infusão diferentes. O registro das respostas operantes e subsequente disponibilidade das soluções foram controlados por um programa instalado a um computador que estava conectado às bombas de infusão (Razel, Stamford, CT, EUA) e às caixas operantes. As caixas estavam individualmente alocadas em uma caixa de madeira com ventilação e isolamento acústico para minimizar possíveis distúrbios ambientais.

3.8.2. Aquisição da Autoadministração de Etanol

Para facilitar o aprendizado do comportamento operante os ratos inicialmente tiveram acesso a duas garrafas, uma contendo etanol 10% e outra contendo água, que foram mantidas em suas caixas viveiro por 48 horas.

O treino para a aquisição da autoadministração foi iniciado com uma sessão de 18 horas durante o ciclo escuro em esquema de reforço de RF1. Durante este treino somente uma barra foi apresentada para o animal. Cada resposta nesta barra ativa resultava na ativação da bomba de infusão com rotação de 15 rpm que disponibilizava 0,1 ml da solução de etanol em 0,5 segundos. Durante os 0,5 segundos da ativação da bomba, as respostas nas barras eram registradas mas não eram reforçadas. Durante esta sessão os animais tiveram livre acesso à comida. A sessão seguinte teve duração de 2 horas, em que os animais tiveram acesso a duas barras uma do lado direito da caixa e outra do lado esquerdo da caixa. A pressão na barra direita resultava na liberação de 0,1 ml de solução de etanol 10%, enquanto a pressão na barra esquerda resultava na liberação 0,1 ml de água, ambas em 0,5 segundos. Durante os 0,5 segundos da ativação da bomba, as respostas nas barras eram registradas, mas não eram reforçadas pela liberação de etanol ou água. A sessão seguinte teve a duração de 1 hora e os animais tiveram acesso a etanol 10% ou água nos mesmo parâmetros da sessão anterior. Após essa sessão os animais seguiram para a fase de estabilização da autoadministração de etanol 10%, nesta fase cada sessão teve a duração de 30 minutos, e os animais tiveram acesso a etanol 10% ou água nos mesmo parâmetros das duas sessões anteriores. À autoadministração de etanol foi considerada estável quando o número de reforços nas três últimas sessões não variavam mais de 5%. Foram realizadas em média, 12 sessões de estabilização. Após a estabilização os animais foram separados em dois grupos distintos: vapor (expostos ao vapor de etanol) e controle (não expostos ao vapor de etanol).

3.8.3 Câmara de Vapor de Etanol

O sistema de vaporização de etanol (La Jolla Alcohol Research Inc., La Jolla, CA, EUA) é composto por oito caixas viveiro padrão com uma tampa desenvolvida

para vedação, acessórios para entrada e saída de ar, garrafas de água e recipiente para armazenagem de alimento (Figura 3.5). Na tampa havia dois orifícios para acoplar um conector para a entrada de ar e/ou vapor de etanol e outro para acoplar um conector para a saída do ar. Quando não estava em uso, esses orifícios permaneciam vedados com uma rolha de borracha. As caixas podiam acomodar mais de um animal (baseado nas regulações da *Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care - AAALAC*). Na tampa havia também dois orifícios que davam acesso a dois compartimentos para o armazenamento de alimento e água. Esses orifícios também eram vedados com rolhas de borracha. A tampa era fixada nas caixas com oito grampos de metal e uma junta de vedação de borracha que percorria o perímetro da tampa para garantir que não houvesse trocas de ar com o ambiente. Uma fina camada de serragem era usada para cobrir o assoalho das caixas, pois o excesso de serragem poderia interferir na exposição dos animais ao vapor.

Outros equipamentos do sistema de vaporização do etanol (Figura 3.6) incluía uma garrafa contendo 95% (v/v) de etanol, uma bomba-“Q” (Fluid Metering, Inc., Long Island, NY, EUA), um frasco esférico posicionado em uma manta de aquecimento (Electrothermal Engineering Ltd., Rochford, Essex, Inglaterra), válvulas de fluxo de ar (Series VF Visi-Float Flowmeter; Dwyer Instruments, Michigan City, IN, EUA) que controlavam o influxo do ar/vapor para dentro das caixas e um sistema de alimentação elétrico para o funcionamento de todos os componentes do sistema.

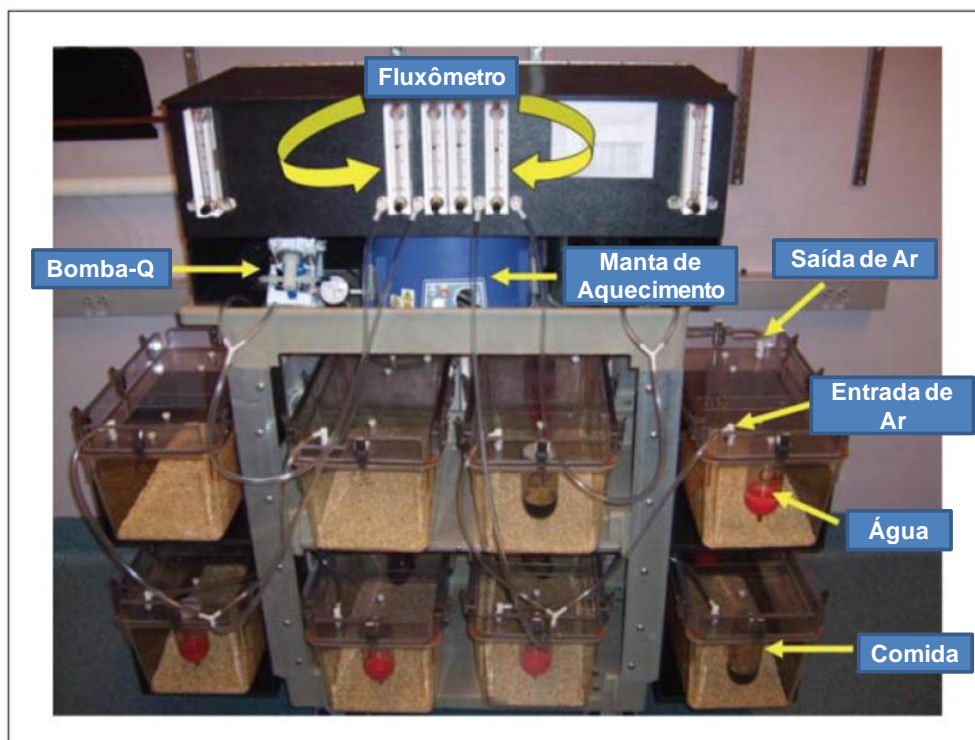


Figura 3.5 - Visão Frontal de uma unidade de câmara de vapor (La Jolla Alcohol Research, Inc., La Jolla, CA, EUA).

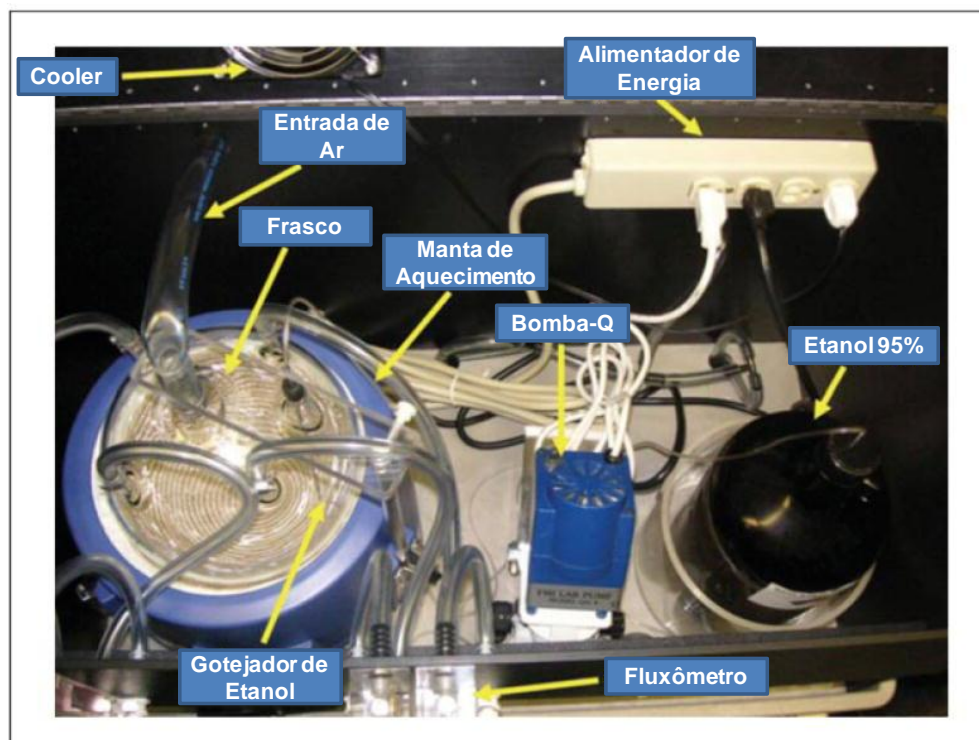


Figura 3.6 - Visão dos componentes descritos e organizados na prateleira superior do equipamento.

3.8.4 Exposição ao Vapor de Etanol

O vapor de etanol foi produzido pelo gotejamento de etanol 95% em um frasco térmico (Erlenmeyer) de 2000 ml mantido a 508°C em uma manta de aquecimento. O oxigênio foi ejetado por um compressor para o fundo do frasco a uma taxa de 11 L/min para misturar-se com o etanol. As concentrações de etanol foram ajustadas e variavam entre 22 mg/L à 27 mg/L. A exposição ao vapor de etanol foi controlada, utilizando as válvulas de fluxo de ar para manter o concentração sanguínea de etanol constante e capaz de induzir a dependência sem colocar em risco a saúde do animal. A etanolemia foi mantida entre 150 e 250 mg/dl. Os animais foram submetidos a ciclos de 14 horas de vapor de etanol e 10 horas de abstinência.

Para a determinação do concentração sanguínea de etanol, amostras de sangue da cauda foram coletadas e analisadas uma vez por semana como descrito previamente por Gilpin et al. (2008). Amostras de sangue da cauda foram coletadas em tubos de centrifuga heparinizados. Após centrifugação, o plasma foi extraído com ácido tricloroacético e o método espectrométrico enzimático NAD-ADH foi utilizado para analisar a concentração sanguínea de etanol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA).

3.8.5 Escalada da Autoadministração de Etanol

As sessões de autoadministração de etanol eram realizadas seis horas após o início do ciclo de abstinência ao vapor de etanol.

Os animais foram expostos à sessões regulares de autoadministração de etanol 10% em esquema de reforço RF1 com duração de 30 minutos. Durante cada sessão eles tiveram acesso a duas barras, uma do lado direito da caixa e outra do lado esquerdo da caixa. A pressão na barra direita resultava na liberação de 0,1 ml de solução de etanol 10%, enquanto a pressão na barra esquerda resultava na liberação 0,1 ml de água, ambas em 0,5 segundos. Durante os 0,5 segundos da ativação da bomba, as respostas nas barras eram registradas, mas não eram reforçadas.

Essas sessões foram realizadas duas vezes por semana para evidenciar o fenômeno de escalada da autoadministração de etanol 10%.

3.8.6 Razão Progressiva

Após a estabilização do fenômeno de escalada da autoadministração de etanol 10% (variação do número de resposta menor de 5 % entre as sessões), um esquema de razão progressiva (RP) de resposta foi implantado. ou seja, o número de respostas para a obtenção de um reforço aumentava a cada 2 reforços obtidos. Na razão progressiva foi utilizada a escala para o incremento do número de respostas para obtenção de um reforço segundo Gilpin et al., 2009: 1, 1, 2, 2, 3, 3, 4, 4, 5, 5, 7, 7, 9, 9, 11, 11, 13, 13, 15, 15, 18, 18, 21, 21, 24, 24, 27, 27, 30, 30, 34, 34, 38, 38, 42, 42, 46, 46, 50, 50... A sessão de RP era finalizada uma vez que o animal ficava sem receber um novo reforço por um período de 60 minutos.

3.8.7 Teste de Adulteração por Quinino

Este teste avaliou a persistência do animal em consumir etanol a despeito do sabor amargo aversivo do quinino. Estudos consideram esse teste como uma medida de consumo compulsivo (VENDRUSCOLO et al., 2012).

Assim, após a última sessão de RP os ratos foram mantidos em esquema de reforço RF1 até estabilizarem novamente a autoadministração de etanol 10%. Após a estabilização os animais foram expostos ao teste de adulteração por quinino onde a cada resposta os animais recebiam um reforço de solução de etanol 10% adicionado uma dada concentração de quinino. A concentração de quinino foi aumentada a cada sessão (0,005; 0,01; 0,025 e 0,05 g/L). A última sessão foi realizada somente com quinino (0,025 g/L) sem a adição de etanol 10%.

3.9 Western Blotting

3.9.1 Dissecação das Áreas Encefálicas

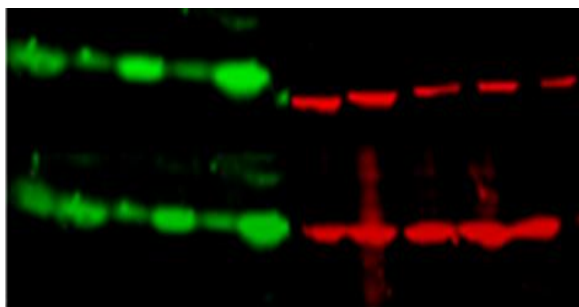


Figura 3.7 - Bandas representativas de ensaio de Western Blotting de imunofluorescência.

Os encéfalos foram dissecados em um criostato sob temperatura de -18 à -20°C. Seguindo-se as coordenadas estereotáxicas do Atlas de Paxinos e Watson (2006). Fatias coronais de cerca de 1mm, que continham ou o córtex pré-frontal medial (CPFm) ou o núcleo acúmbens (NAc) ou a amígdala (AM)

foram selecionadas e essas estruturas foram dissecadas por meio de uma agulha de ponta chata de 12 Gauge para o NAc e 14 Gauge para o CPFm e AM. As fatias foram selecionadas conforme as coordenadas: +3,7mm à +2,7mm para o CPFm; +2,1mm à +1,1mm para o NAc; e -2,2 à -3,2mm para AM. Após a dissecação as amostras foram armazenadas a -80°C até o ensaio de Western Blotting.

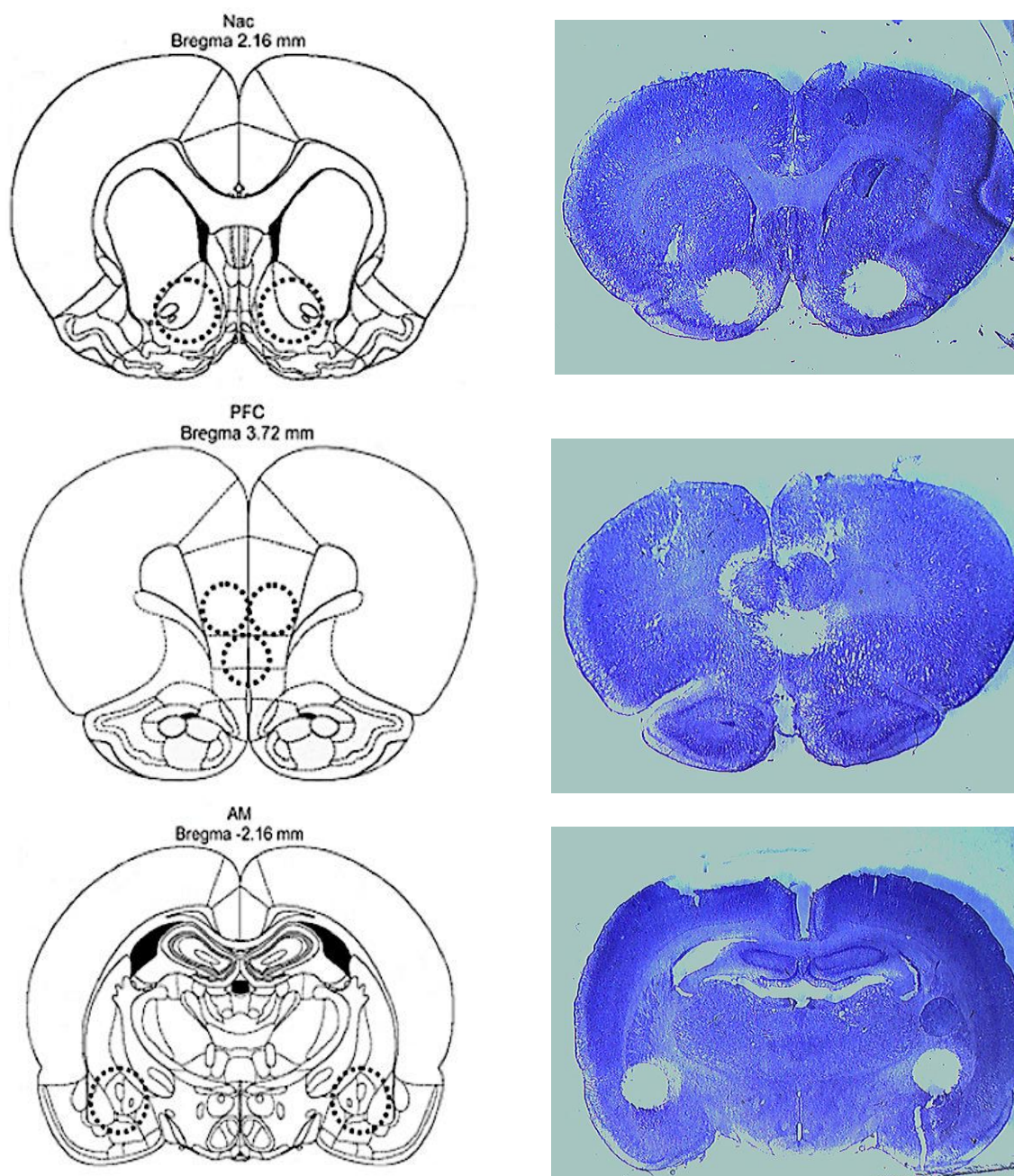


Figura 3.8 – A esquerda está o esquema das secções encefálicas adaptadas do Atlas Esterotáxico de Paxinos e Watson (2006), mostrando os locais onde foram feitos os punches para a dissecação do CPFm, NAc e AM. E a direita estão as fatias coronais contendo o NAc , CPFm e AM, coradas pelo método de crisol violeta.

3.9.2 Ensaio de Western Blotting

As estruturas foram homogeneizadas por meio de ondas de ultra-som em tampão contendo SDS 1%. O conteúdo de proteínas nas amostras foi determinado utilizando o kit Bio-Rad® (Hercules, CA, EUA) para posterior ajuste da quantidade de proteínas. A quantidade de proteína utilizada foi de 30 µg/µl que situa-se dentro da faixa de linearidade de detecção (valor determinado, em nosso laboratório, por experimentos para a padronização da metodologia). Em seguida as amostras foram fervidas por 5 minutos com glicerol 16%, mercaptoetanol 20% e azul de bromofenol 0,05%. O conteúdo total do tampão de amostra com as proteínas foi submetido à eletroforese por cerca de 2:30h a 200V em gel de SDS-poliacrilamida. No mesmo gel foi adicionado um padrão de peso molecular (Precision Plus, BioRad, Hercules, CA, EUA).

Ao final da separação, as proteínas foram transferidas eletroforeticamente do gel para uma membrana de PVDF. Após a transferência, as membranas foram mantidas sob agitação por 1 hora a 4°C numa solução contendo TBS (100mM tris-base; 0,9% de NaCl e água destilada), leite desnatado 0,5% e tween 20 0,05%, para bloquear ligações inespecíficas com o anticorpo.

Após a fase de bloqueio, as membranas foram incubadas durante à noite com os anticorpos primários para as proteínas CREB (1:500; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA) e p-CREB (1:1000; Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA), ERK (1:2000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA) e p-ERK (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). As membranas foram novamente lavadas e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com fluoróforo (kit ECL Plex, GE Healthcare, Pittsburgh, PA, EUA) (Cy3 – anti-camundongo/ 1:5000 e Cy5 – anti-coelho/1:3000) por 1 hora. A luminescência das bandas foi detectada diretamente a partir das membranas secas utilizando-se o scanner Typhoon (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, EUA). O controle e normalização da quantidade de proteínas de cada amostra presente nas membranas foi realizado por meio da quantificação da proteína β -actina (1:500; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

3.10 Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real (RT-PCR)

3.10.1 Dissecção do Núcleo Acúmbens

Os animais foram decapitados rapidamente. Imediatamente após a remoção os encéfalos foram fatiados em fatias coronais de cerca de 1 mm, com auxílio de uma matriz de acrílico (Insight®, Ribeirão Preto, SP, Brasil) imersa em gelo seco. Uma fatia coronal contendo o Nac (-2,2 à -3,2mm do bregma– Figura 3.8), foi banhada com nitrogênio líquido e o Nac foi dissecado bilateralmente por meio de agulhas de ponta chata de 12 Gauges, em seguida o tecido foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C, para posterior análise da expressão dos genes de interesse por RT-PCR.

3.10.2 Ensaio de RT-PCR Quantitativo

3.10.2.1 Extração do RNA Total

A extração do RNA foi realizada utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Para tanto, o tecido foi transferido para um tubo criogênico (foi realizado um “pool” de 2 animais para cada amostra, afim de se obter concentrações adequadas de RNA total) e macerado inicialmente com 800µl de Trizol® ,em nitrogênio líquido, com um pistilo de plástico (para evitar a quebra da carioteca). Em seguida, os tubos contendo o macerado foram agitados vigorosamente por 15 segundos e deixados em repouso por 3 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 160 µL de clorofórmio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, EUA) repetindo-se o ciclo de agitação vigorosa por 15 segundos e repouso por 3 minutos em temperatura ambiente Imediatamente após o repouso, a amostra foi centrifugada (12.000 xg à 4°C) por 15 minutos. A fase superior (fase aquosa, ~600 µL) foi transferida para um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL para precipitação do RNA total. Na sequência foi adicionado 360µL de isopropanol e 40µL de solução de acrilamida (5 mg/mL), a solução foi homogeneizada e incubada por uma noite à -20°C. O RNA total foi coletado por centrifugação (12.000 xg à 4°C) por 15 minutos, e depois o precipitado

foi lavado com etanol 75%, secado durante 10 minutos. Em seguida, o RNA total foi solubilizado em 40 μ L de água DEPC e incubado em banho-maria (65°C) por 10 minutos.

3.10.2.2 Determinação da Concentração do RNA Total

A concentração de RNA foi determinada por espectrofotometria a 260 nm, e a relação entre as absorbâncias a 260/280 nm foi analisada. Para isso alíquotas do RNA total em diluição de 1:20 foram analisadas em cubeta de quartzo específica. As concentrações foram calculadas considerando-se a diluição e o fator de 40 μ g/ml por densidade óptica de RNA.

3.10.2.3 Eletroforese de RNA

A qualidade da preparação de RNA total também foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (1,5% de agarose contendo 2,2 M formaldeído em tampão MOPS). Um volume contendo 10 μ g de RNA foi diluído em água DEPC para volume final de 10 μ L e foi adicionado 10 μ L de tampão MOPS (40 mM MOPS pH 7,0; 16 mM acetato de sódio; 2 mM EDTA) contendo 60% de formamida, 10% de glicerol, 5 mg/mL de azul de bromofenol e 0,04 mg/mL de brometo de etídeo. As amostras foram incubadas a 65°C por 15 minutos e foram submetidas à eletroforese em gel de agarose com tampão MOPS à 40 V por 20 minutos e 65 V por 1 hora. Os ácidos ribonucléicos foram corados em solução de brometo de etídeo (0,5 μ g/ml), as bandas foram visualizadas em um transiluminador ultra-violeta e fotodocumentadas.

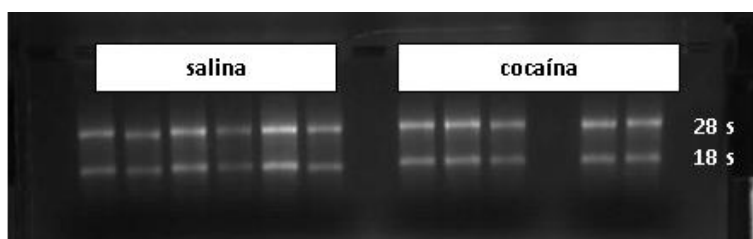


Figura 3.9 - Eletroforese de RNA total de amostras do núcleo acúmbens em gel de agarose 1,5%, com tampão MOPS. As bandas representam as frações ribossomais 28 S e 18S.

3.10.2.4 Transcrição Reversa de RNA

Para a transcrição reversa de RNA foi utilizado o kit High Capacity c-DNA Archive (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante.

Resumidamente, 2 µg de RNA total diluídos em água livre de RNAses foram utilizados para a síntese do DNA complementar (c-DNA). Em cada reação adicionaram-se ao RNA das amostras: 4 µl de oligo dT (100 pmol/µl); 2,5 µl de tampão da reação; 1 µl de dNTP mix (10 mM/µl); 1,3 µl de enzima transcriptase reversa (40 U). O c-DNA sintetizado foi armazenado à -20°C.

3.10.2.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Uma reação em cadeia da polimerase (PCR) com sequências iniciadoras conhecidas foi realizada para verificar a qualidade do c-DNA produzido a partir dos RNA total de cada amostra.

Os c-DNAs provenientes de cada amostra foram submetidos à PCR para amplificação do fragmento dos genes de interesse. Sumariamente, cada reação de 20 µl continha: 18 µl de tampão (água livre de RNAses; tampão Taq 10x + (NH₄)₂SO₄; dNTP mix (10nmol); MgCl₂ à 25 mM; Taq DNA polimerase) e 2 µl de cDNA. A PCR foi realizada em termociclador com a programação: iniciação "hot start" (1 ciclo de 95°C/3 min.); 30 ciclos para amplificação [cada ciclo consistia de: 95°C/1 min. (denaturação), 60°C/30 segundos (anelamento) e 72°C/1 min. (polimerização)] e extensão final (01 ciclo de 72°C/5 min).

3.10.2.6 Gel de c-DNA

Os "amplicons" específicos foram confirmados através de eletroforese em gel de agarose. A cada tubo de reação foi acrescentado 4 µL tampão de leitura 5X [Azul de bromofenol (0,125 %); Xilenocianol (0,125 %); TAE (tampão: tris, ácido acético e edta); glicerol]. Em seguida as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose [1,5% de agarose contendo 5 µL (10mg/ml) em tampão TAE] em tampão TAE a 100 V por 20 minutos e 120 V por 1 hora.

3.10.2.7 Seleção de Oligonucleotídeos Iniciadores (Primers)

As sequências dos "primers" dos genes alvos para a RT-PCR foram selecionados através da análise das seqüências de mRNAs depositadas no banco de genes acessadas através do programa BLASTn do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Os "primers" foram desenhados para que os produtos tivessem entre 80 a 150 pb e apresentassem temperatura de anelamento de aproximadamente 60°C.

Tabela 3.2- Sequências 5'-3' dos primers de ida (For) e reverso (Rev).

| Nome da sequência | Sequência 5' - 3' |
|-------------------|------------------------------|
| CRFR1-For | TTGGCAAACGTCCTGGGGTAT |
| CRFR1-Rev | GCGGACAATGTTGAAGAGAAAG |
| BDNF-For | TCACAGCGGCAGATAAAAAGACT |
| BDNF-Rev | GTGTCTATCCTTATGAACCGCCAGCCAA |
| TrkB-For | CCTCGTTGGAGAAGATCAAG |
| TrkB-Rev | CGTGGTACTCCGTGTGATTG |
| Dyn-For | CTCTCCAGCAGGTTTGGC |
| Dyn-Rev | CTGGGACCGAGTCACCAC |
| Mi-Opio-For | TTACGGCCTGATGATCTTACGA |
| Mi-Opio-Rev | GGTGATCCTGCGCAGATTC |
| NPY-For | GGGGCTGTGTGGACTGACCCT |
| NPY-Rev | GATGTAGTGTTCGCAGAGCGGAG |
| GAPDH-For | ATGGGAAGCTGGTCATCAAC |
| GAPDH-Rev | ACGCCAGTAGACTCCACGAC |

3.10.2.8 Otimização dos Primers

Foram realizadas reações de otimização para escolher a melhor concentração de "primers" para cada par, concentração essa que garantiria a sua saturação para que os "primers" não fossem fatores limitantes na velocidade da amplificação. As concentrações de "primers" testadas foram: 0,25 µM; 0,4 µM; 0,5 µM e 0,7 µM.

As reações de padronização foram processadas em 20 μL , contendo 25 ng de cDNA, 10 μL Promega qPCR master mix e os “primers” cujas concentrações variaram como descrito acima. O Promega qPCR master mix continha todos os componentes para a reação de RT-PCR, exceto o template e os “primers”. As reações foram realizadas em triplicata para cada gene analisado e o c-DNA utilizado nas reações foi feito um pool com todas as amostras que seriam validadas, na concentração de 25 ng/ μL , para minimizar as variações na padronização das reações de otimização dos primers e validação da eficiência. Além disso, para todos os experimentos havia controles negativos.

As reações foram realizadas no equipamento para RT-PCR Applied Biosystem 7500 Real Time PCR System.

Tabela 3.3 - Resultados dos testes de otimização para verificar a melhor concentração de primer para cada gene.

| Nome do Gene | Concentração otimizada dos oligonucleotídeos iniciadores. |
|--------------|---|
| CRFR1 | 0,25 μM |
| BDNF | 0,7 μM |
| TrKb | 0,5 μM |
| Dyn | 0,7 μM |
| Miopio | 0,5 μM |
| NPY | 0,25 μM |
| GAPDH | 0,5 μM |

3.10.2.9 Validação dos Primers

Outro fator importante a considerar em experimentos de RT-PCR quantitativo é a verificação da eficiência de amplificação do gene alvo e do gene de referência em função da concentração de RNA utilizado. Dessa forma, é possível extrair a expressão relativa do gene alvo a partir dos resultados obtidos. Para esta verificação foram realizadas diluições seriadas do pool de c-DNA (500 ng/ μL , 250 ng/ μL , 125 ng/ μL , 62,5 ng/ μL e 31,25 ng/ μL). As amostras de c-DNA nas concentrações citadas

foram submetidas à amplificação por RT-PCR. O teste foi realizado para cada gene utilizando a concentração de primers otimizada anteriormente. O resultado da validação da eficiência foi dado pelo valor da curvatura da reta (slopes) que variou entre -3,1 à -3,7 entre os genes. Estes slopes refletem uma eficiência de amplificação entre 85 a 115% [Eficiência= $(10^{(-1/\text{slope})} - 1) \times 100$].

Tabela 3.4 - Resultados dos testes de validação

| Nome do Gene | Slope | R ² | EFICIÊNCIA |
|--------------|-------|----------------|------------|
| CRFR1 | -3,60 | 0,97 | 89% |
| BDNF | -3,37 | 0,98 | 98% |
| TrkB | -3,21 | 0,99 | 104% |
| Dyn | -3,44 | 0,97 | 95% |
| Mi-Opio | -3,7 | 0,98 | 85% |
| NPY | -3,10 | 0,99 | 115% |
| GAPDH | -3,49 | 0,96 | 93% |

A concentração ideal de c-DNA adotada para análises para verificar a expressão diferencial dos genes selecionados foi de 500 ng/μL.

3.10.2.10 RT-PCR

As reações de RT-PCR foram processadas em 20 μL, baseado na metodologia do fluorocromo SYBR (Promega, Madison, WI, EUA), contendo c-DNA, qPCR master mix (Promega, Madison, WI, EUA) e os primers cujas concentrações variaram como descrito acima. As reações foram realizadas em triplicata para cada gene analisado e o c-DNA foi utilizado na concentração de 500 ng/μL. Além disso, para todos os experimentos havia controles negativos. As reações foram realizadas em equipamento para RT-PCR 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Carlsbad/CA/EUA). A beta-actina e GAPDH foram utilizados como genes controles endógenos.

3.10.3 Análises dos Resultados

A análise da expressão gênica foi semiquantitativa (método delta delta CT) como descrito por Livak e Schmittgen (2001). O valor de CT (threshold cycle) representou o momento da reação de PCR em que a fluorescência de determinada amostra foi detectada inequivocamente acima do ruído de fundo (background). O resultado foi expresso em unidades arbitrárias. O modelo matemático utilizado para a obtenção das unidades arbitrárias para essa análise foi:

- 1- Subtração do valor de CT do gene de interesse pelo CT da β -actina (Δ Ct);
- 2- Média do Δ CT das amostras;
- 3- Δ CT de cada amostra – a média do Δ CT ($\Delta\Delta$ CT);
- 4- Elevação negativa do $\Delta\Delta$ CT na base 2 = $2^{-\Delta\Delta$ CT}.

3.11 Imunoistoquímica

Após a análise comportamental os animais foram anestesiados com -hidrato de cloral 4% (0,2 ml/100g de peso corpóreo). Em seguida os animais foram perfundidos com 100ml de tampão fosfato de sódio (PBS) (3,2 g de KH_2PO_4 ; 7,1 g de K_2HPO_4 ; 9,1 g de NaCl em 100 ml de água destilada) e em seguida com 400 ml de paraformaldeído 4% (4 g de NaOH; 4 g de paraformaldeído; 16,58 g de NaH_2PO_4). Os encéfalos foram pós-fixados em paraformaldeído 4% por duas horas, transferidos para solução de sacarose 30% e armazenados a 4°C por 2 dias. Posteriormente, congelados em gelo seco em pó por 1 hora e mantidos à -80°C até serem fatiados. Os encéfalos foram fatiados em fatias coronais de 40 μm de espessura seguindo as coordenadas a partir do bregma, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson, (2006): Entre +4,2 e +2,76mm para o córtex pré-frontal medial (CPFm); entre +2,2 e +1,0mm para o núcleo acúmbens (NAc); entre 0 e -1,2mm para o núcleo intersticial da estria terminal (BNST); entre -2,2 e -3,0mm para amígdala (AM); entre -5,04 e -5,4 mm para a área tegmental ventral anterior (VTAA) e entre -5,76 e -6,12 mm para a área tegmental ventral posterior (VTAp)

As fatias coronais contendo as regiões cerebrais de interesse foram lavadas 3 vezes (10 minutos cada lavagem) com PBS e em seguida incubadas com solução

bloqueadora (soro de cabra 3%; Triton X-100 0,25% dissolvidos em PBS) por uma hora à temperatura ambiente. Após o bloqueio as fatias foram incubadas com anticorpo anti-Fos (diluição 1:4000; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA; produzido em coelho), diluído em solução bloqueadora por 24 horas a 4°C.

Após essa incubação, as fatias foram lavadas com PBS por 3 vezes (10 minutos cada lavagem) e incubadas com um anticorpo secundário biotilado anti-coelho (diluição 1:400; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) diluído em PBS-Tx (Triton X-100 0,25%) e soro de cabra 3%, por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida elas foram lavadas com PBS por 3 vezes (10 minutos cada lavagem) e incubadas por 1 hora em solução de avidina-biotina-peroxidase (ABC Elite kit, PK-6100; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) preparada em PBS contendo Triton X-100 0,5%. Finalmente, as fatias foram lavadas por 3 vezes (10 minutos cada lavagem) e incubadas em 3,3'-diaminobenzidina por aproximadamente 3 minutos. Na sequência foram lavadas 5 vezes (5 minutos cada lavagem) e transferidas para solução de PBS e montadas em lâminas gelatinizadas com gelatina e alumínio-crômico. Quando secas as lâminas foram desidratadas utilizando gradiente seriado de titulações crescentes de etanol (água destilada; etanol: 30%, 60%, 90%; 95% e 100%) e Citrolsolv (Thermo Fisher Scientific, Hudson, NH, EUA) e finalmente, cobertas com Permount (Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, EUA) e lamínulas.

A imunomarcação de Fos foi capturada usando uma câmera (Coolsnap Photometrics, Roper Scientific Inc., Trenton, NJ, EUA), acoplada a um microscópio Zeiss Axioskop 2. Foram capturadas imagens de 4 hemisférios por ratos e as células positivas para Fos foram contadas automaticamente usando o programa IPLab, versão 3.9.4 r5 (Scanalytics, Inc., Fairfax, VA, Canadá). O valor de células positivas para cada animal representa a média dos 4 hemisférios.

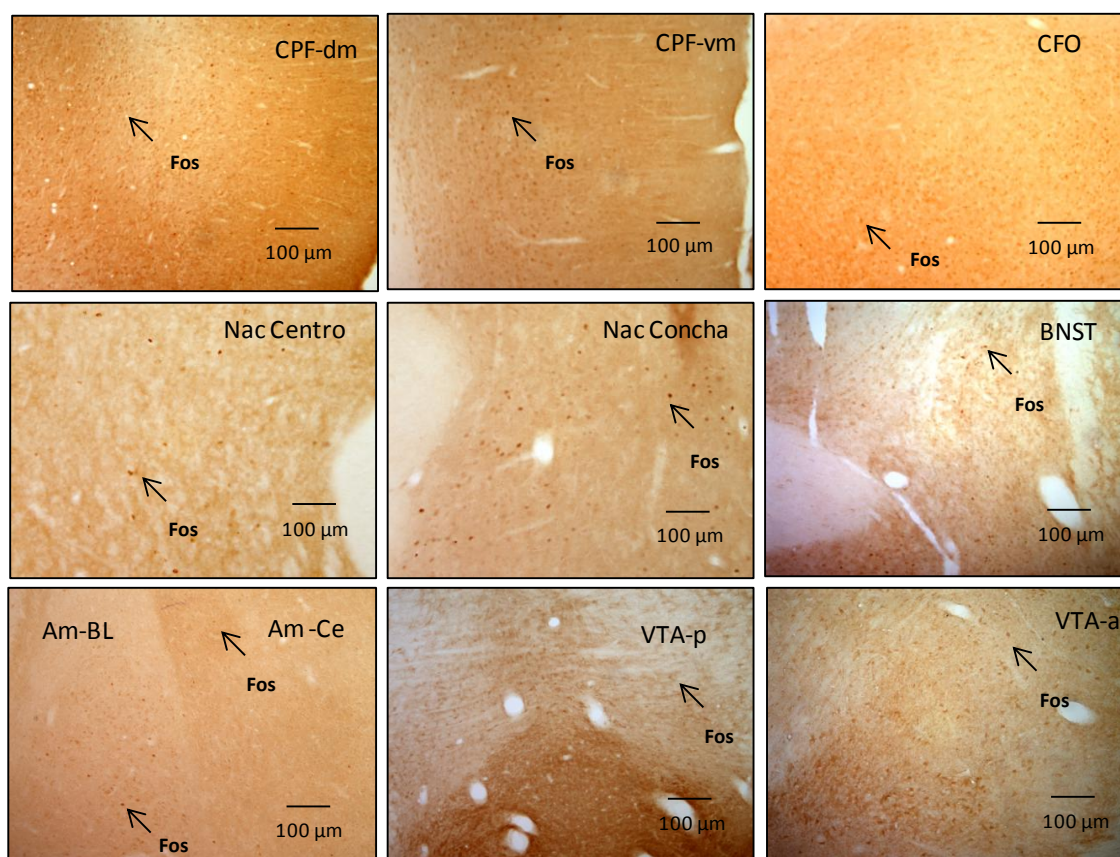


Figura 3.10 - Fatias coronais representativas da expressão de Fos em células do córtex pré-frontal dorsomedial (CPF-dm), córtex pré-frontal ventromedial (CPF-vm), córtex frontal orbital (CFO), Centro do núcleo acúmbens (Nac Centro), Concha do núcleo acúmbens (Nac Concha), núcleo intersticial da estria terminal (BNST) amídala basolateral (Am-BL) e central (Am-Ce), área tegmental ventral posterior (VTA-p) e a área tegmental ventral anterior (VTA-a).

3.12 Dupla Marcação por Imunofluorescência

Para a investigação do fenótipo das células ativadas (Fos positivas) utilizamos alguns marcadores celulares específicos: Fos marcador de ativação celular; NeuN como marcador de neurônios; CamKII como marcador de neurônios glutamatérgicos, no CPF; GAD67 como marcador de neurônios gabaérgicos; Tirosina Hidroxilase (TH) como marcador de neurônios dopaminérgicos.

As fatias coronais com as regiões encefálicas de interesse foram obtidas conforme descrito no item 3.11.

As fatias foram lavadas três vezes (10 minutos por lavagem) com tampão tris-NaCl (TBS) (29 g de NaCl; 50 mL de Tris-HCl pH 8,0 1M em 1 L de água destilada) e em seguida permeabilizadas por 30 minutos com Triton X-100 0,2% (dissolvido em

TBS). Foram realizadas mais três lavagens (10 minutos por lavagem) com TBS e então as fatias foram incubadas com os anticorpos primários de interesse (Tabela 3.5) diluídos em TBS com Triton X-100 0,3%, por 24 horas à 4°C. Posteriormente, as fatias foram lavadas três vezes (10 minutos por lavagem) com TBS e incubadas com os anticorpos secundários diluídos em TBS por 1 hora à temperatura ambiente. Foram utilizados os anticorpos Alexa Fluor 488, anti-coelho, produzido em macaco, (diluição 1:200, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e Alexa Fluor 568, anti-camundongo, produzido em cabra (diluição 1:200, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), como anticorpos secundários. Finalmente, as fatias foram lavadas três vezes (10 minutos por lavagem) com TBS e as lâminas foram montadas em lâminas gelatinizadas com gelatina e alumínio-crômico e cobertas com lamínulas com auxílio de VectaShield hard-set mounting media (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, EUA).

A fluorescência foi detectada através de uma câmera (Coolsnap Photometrics, Roper Scientific Inc., Trenton, NJ, EUA), acoplada a um microscópio Zeiss Axioskop 2 (Carl Zeiss Microscopy, LLC, Thornwood, NY, EUA). Foram capturadas imagens de 4 hemisférios por ratos (3 ratos por grupo) e as células positivas foram contadas automaticamente usando o programa IPLab, versão 3.9.4 r5 (Scanalytics, Inc., Fairfax, VA, Canadá). O valor de células positivas para cada animal representa a média dos 4 hemisférios.

Tabela 3.5 - Anticorpos utilizados na reação de dupla marcação por imunofluorescência

| Anticorpo | Espécie | Diluição | Fabricante |
|------------------|----------------|-----------------|-------------------|
| Anti-Fos | Coelho | 1:4000 | Santa Cruz |
| Anti-CamKII | Camundongo | 1:100 | Pierce antibodies |
| Anti-GAD65 | Camundongo | 1:1000 | Millipore |
| Anti-TH | Camundongo | 1: 50.000 | Millipore |
| Anti-NeuN | Camundongo | 1:2000 | Chemicon |

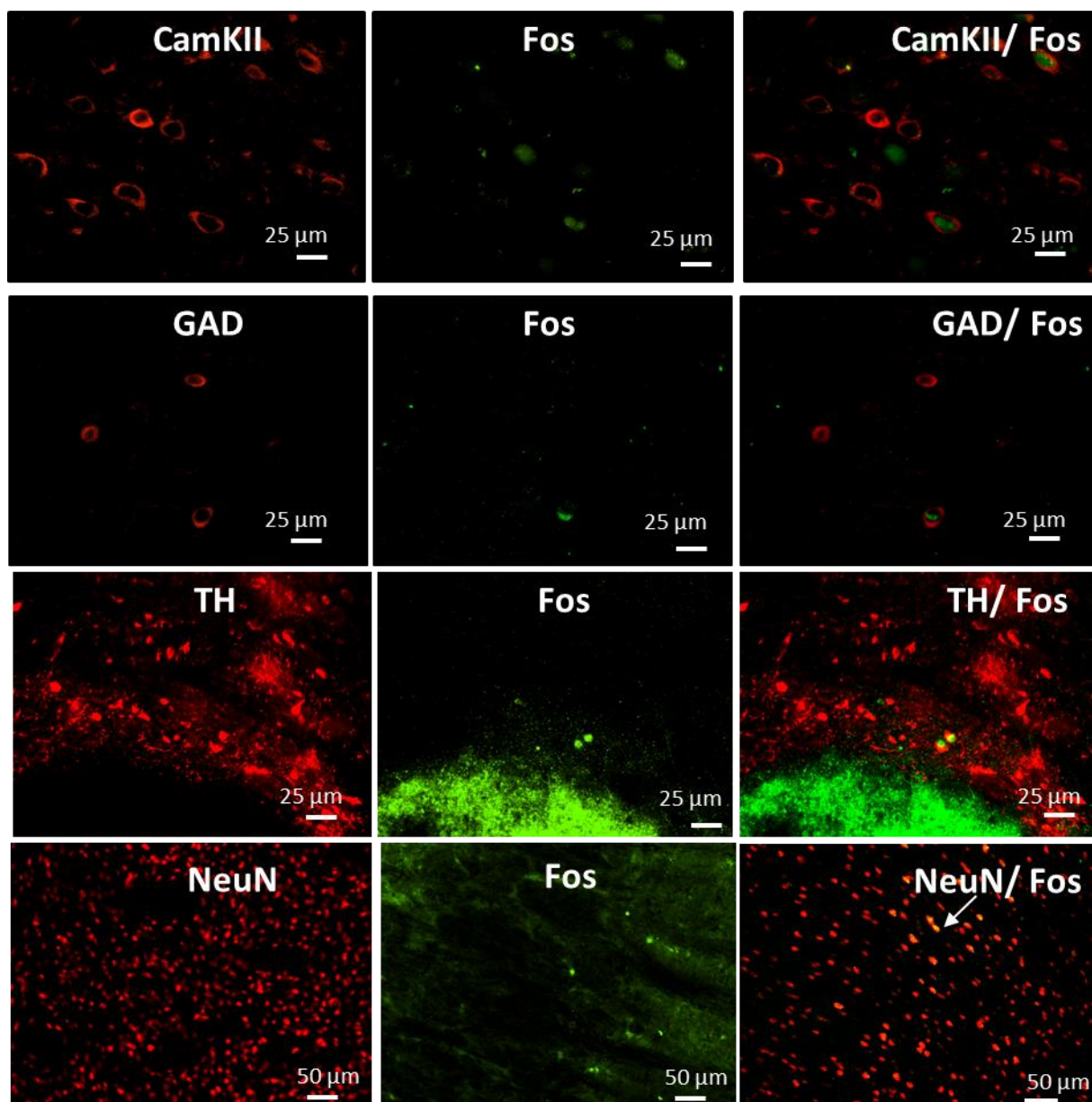


Figura 3.11 - Fatias coronais representativas da expressão de Fos, CamkII, GAD67, TH e NeuN.

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Efeito da Exposição Prévia ao Estresse Variável na Autoadministração de Nicotina e Análise das Neuroadaptações no Córtex Pré-frontal Medial, Núcleo Acúmbens e Amígdala.

Utilizamos o delineamento experimental descrito na Figura 4.1 e detalhado abaixo:

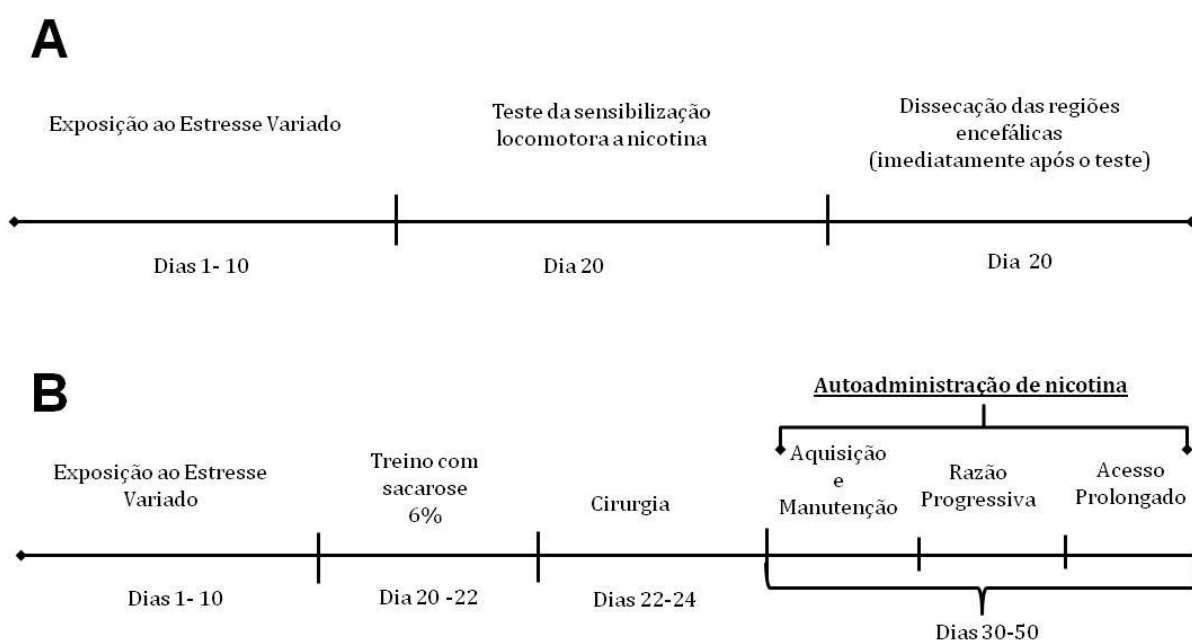


Figura 4.1 - Delineamento experimental: (A) Sensibilização cruzada entre estresse e nicotina e análise das neuroadaptações no córtex pré-frontal medial, núcleo acúmbens e amígdala; (B) Efeito da sensibilização cruzada na autoadministração de nicotina.

4.1.1 Efeito do Estresse Variável na Atividade Locomotora

Os animais foram submetidos ao protocolo de estresse conforme descrito no item 3.5. Dez dias após a última sessão de estresse os animais foram colocados individualmente na caixa de atividade para habituação por 20 minutos. Imediatamente após o término da habituação os animais receberam injeção subcutânea de salina (0,9%; s.c.) ou nicotina (0,4 mg/Kg; s.c.), e a atividade locomotora foi registrada por 15 minutos. Os animais controle foram mantidos em

suas caixas viveiro e foram submetidos aos mesmos tratamentos, para a avaliação da atividade locomotora, descritos para o grupo estresse.

Dessa forma tivemos 4 grupos: Estresse-Salina (EST-SAL), Estresse-Nicotina (EST-NIC), Controle-Salina (CONT-SAL) e Controle-Nicotina (CONT-NIC), (N= 10 - 11 animais por grupo).

4.1.2 Determinação da Atividade de CREB e ERK no Pré-frontal Medial, Núcleo Acúmbens e Amígdala.

Imediatamente após a avaliação da atividade locomotora os animais foram decapitados, o núcleo acumbens, a amígdala e o córtex pré-frontal foram dissecados e armazenados para análise de CREB, fosfo-CREB, ERK e fosfo-ERK por Western Blotting como descrito no item 3.9.

4.1.3. Efeito do Estresse Variável na Autoadministração de Nicotina

Os animais foram expostos ao protocolo de estresse conforme descrito no item 3.5. Dez dias após a última sessão de estresse os animais foram submetidos ao protocolo de autoadministração intravenosa de nicotina conforme descrito no item 3.6.

Dessa forma tivemos 2 grupos: Estresse (N = 8) e Controle (N = 6).

4.1.4. Análise Estatística

Os resultados comportamentais da autoadministração foram analisados pelo teste *t-Student*, comparando-se o grupo submetido a estresse ao grupo controle para cada um dos parâmetros analisados. Os dados referentes a autoadministração de sacarose foram analisados por ANOVA bifatorial de medidas repetidas considerando como fatores estresse (estresse vs controle) e sessões (medida repetida).

Os dados das medidas moleculares e da atividade locomotora foram analisados por ANOVA bifatorial, considerando os fatores estresse (estresse vs controle) e fármaco (nicotina vs salina). Quando ANOVA indicou diferenças significativas a análise foi seguida pelo teste de Newman-Keuls.

4.2 Efeito da Administração Prévia de Cocaína na Autoadministração de Nicotina e Análise da Expressão Gênica no Núcleo Acúmbens.

Utilizamos o delineamento experimental descrito na Figura 4.2 e detalhado abaixo:

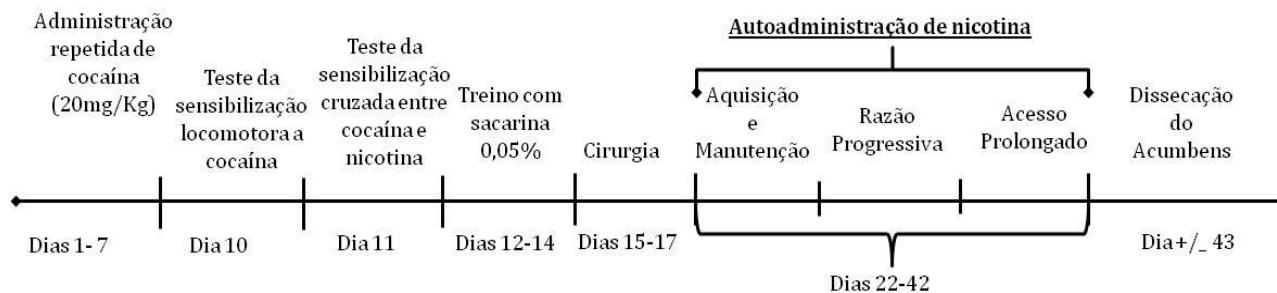


Figura 4.2 - Delineamento experimental do efeito da administração prévia de cocaína na autoadministração de nicotina e análise da expressão gênica no núcleo acúmbens.

4.2.1 Avaliação da Sensibilização Locomotora à Cocaína

Os ratos foram pré-tratados com cocaína (20 mg/ml; i.p.) ou salina 0,9% (1,0 ml/kg; i.p.), por 7 dias. Três dias após a última administração de cocaína ou salina os animais de ambos os grupos foram habituados na caixa de atividade locomotora por 20 minutos. Após o período de habituação, os ratos receberam uma injeção de salina 0,9% (1,0 ml/kg; i.p.) e foram colocados de volta no aparato e a atividade locomotora foi registrada por 15 minutos. Em seguida, os mesmos animais receberam uma injeção teste de cocaína (15 mg/Kg; i.p.) e foram colocados de volta na caixa de atividade locomotora e atividade locomotora foi registrada por mais 45 minutos. O registro da atividade locomotora foi realizado como descrito no item 3.4.1. Os animais dos diferentes grupos foram testados aleatoriamente durante a fase de escuro entre 10:00 e 14:00 horas.

4.2.2 Sensibilização Locomotora Cruzada entre o Pré-Tratamento com Cocaína e a Administração Aguda de Nicotina

Um dia após o teste da sensibilização a cocaína, os mesmos animais foram colocados na caixa de atividade locomotora por 20 minutos para a habituação ao aparato. Em seguida receberam uma injeção de salina 0,9% (1,0 ml/kg; s.c.) e foram colocados de volta no aparato e a atividade locomotora foi registrada por 15 minutos. Então os mesmos animais receberam uma injeção teste de nicotina (0,4 mg/Kg; s.c.) e foram colocados de volta na caixa de atividade locomotora e atividade locomotora foi registrada por mais 15 minutos. O registro da atividade locomotora foi realizado como descrito no item 3.4.1. Os animais dos diferentes grupos foram testados aleatoriamente durante a fase de escuro entre 10:00 e 14:00 horas.

4.2.3 Autoadministração Intravenosa de Nicotina

Vinte e quatro horas após a avaliação da atividade locomotora cruzada entre cocaína e nicotina os animais foram submetidos ao procedimento da autoadministração de nicotina que foi realizado conforme descrito no item 3.6. Com exceção do treino que neste experimento foi realizado com sacarina 0,05% ao invés de sacarose 6%.

4.2.4 Análise da Expressão Gênica por RT-PCR

Vinte quatro horas após o teste de acesso livre prolongado. Os animais foram decapitados e os encéfalos removidos para posterior análise da expressão gênica dos genes BDNF, TrkB; DYN; Mi-Opio, CRFR1 e NPY, conforme descrito no item 3.10.

4.2.5 Análise Estatística

Os dados da atividade locomotora foram analisados por ANOVA bifatorial de medidas repetidas considerando pré-tratamento (salina vs cocaína) e tempo após as injeções como fator repetido. Essa análise foi seguida pelo teste F para contraste entre os pares de média, considerando como significativos $p < 0,05$.

O dados da autoadministração de nicotina e da expressão gênica foram analisados utilizando teste *t-Student* comparando os grupos salina e cocaína. Diferenças significativas, foram observadas quando $p < 0,05$.

4.3 Efeito da Administração Prévia de Nicotina na Autoadministração de Etanol.

Utilizamos o delineamento experimental descrito na Figura 4.3 e detalhado abaixo:

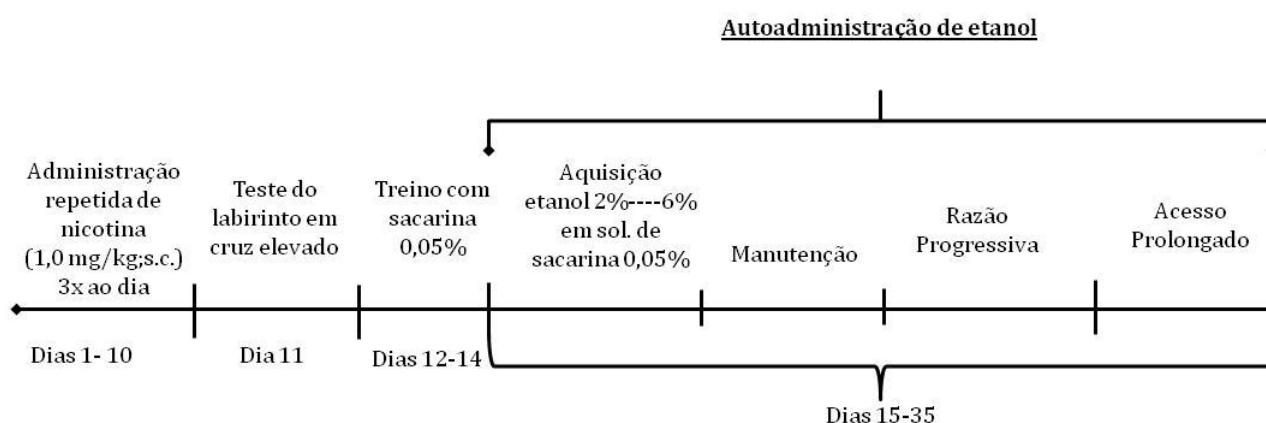


Figura 4.3 - Delineamento experimental do efeito da administração prévia de nicotina na autoadministração de etanol.

4.3.1 Pré-Tratamento de Nicotina

Os ratos foram pré-tratados com nicotina (1,0 mg/Kg; s.c.) ou salina 0,9% (1,0 mL/Kg) por 10 dias, três vezes ao dia (cada administração foi espaçada a cada 4 horas). A dose de nicotina escolhida foi baseada em experimentos prévios, que demonstram que esse regime de administração de nicotina é capaz de produzir síndrome de abstinência em ratos (MALIN et al., 2006).

4.3.2 Teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Vinte e quatro horas após a última administração de nicotina os ratos foram alojados em caixas individuais para o transporte até o labirinto. O teste foi iniciado

colocando o animal na plataforma central do labirinto (de frente para um dos braços abertos), e o experimentador saía imediatamente para um laboratório adjacente. As sessões foram filmadas e gravadas por 5 minutos e o labirinto foi higienizado com álcool etílico 20% entre um rato e outro. Todos os experimentos foram realizados sob às mesmas condições de iluminação durante a fase de escuro do ciclo claro-escuro. As gravações foram analisadas utilizando um programa para análise etiológica desenvolvida pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Francisco Morato na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP. Os comportamentos analisados foram a frequência de entrada nos braços abertos e fechados (entrada = todas as quatro patas dentro do braço) e o tempo de permanência nos braços abertos do labirinto. Esses dados foram usados para calcular a porcentagem de entradas no braço aberto ($[\text{aberto} / \text{total}] \times 100$).

4.3.3 Autoadministração de Etanol

Um dia após o teste de labirinto em cruz elevado os animais iniciaram o protocolo de autoadministração de etanol como descrito no item 3.7.

4.3.4 Análises Estatísticas

Os dados do labirinto em cruz elevado e do acesso livre prolongado de etanol e sacarina foram analisados pelo teste *t-Student* comparando os grupos pré-tratados com salina ou nicotina. E os dados da razão progressiva da autoadministração de etanol e sacarina foram analisados por ANOVA bifatorial considerando os fatores tratamento (salina vs nicotina) e autoadministração (sacarina vs etanol). Foi considerado diferença significativa quando as análises apresentaram $p < 0,05$.

4.4 Efeito da Administração Simultânea de Nicotina no Desenvolvimento da Dependência ao Etanol: Identificação e Caracterização de Pequenos Grupos Neurais (Experimentos Realizados no The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA e no National Institute on Drug Abuse, Baltimore, MD, EUA)

Para avaliar o efeito da nicotina no desenvolvimento da dependência ao etanol, utilizamos o delineamento experimental descrito na Figura 4.4 e detalhado abaixo:

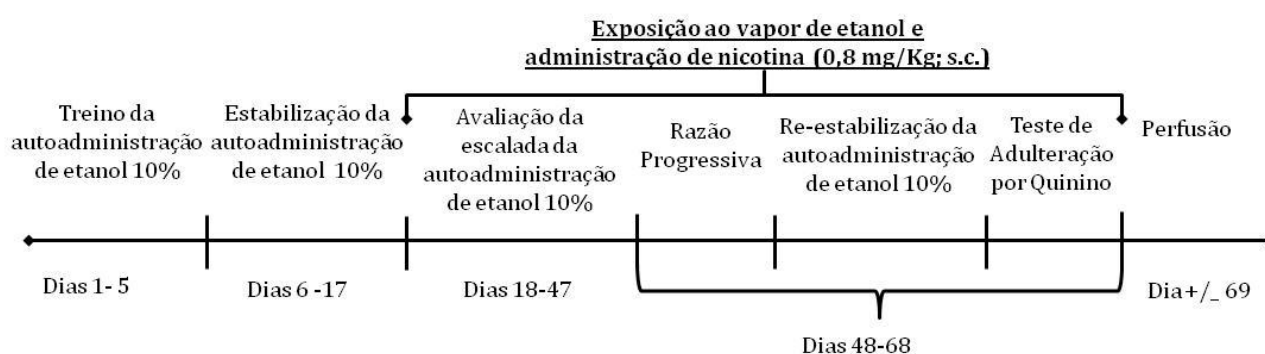


Figura 4.4 - Delineamento experimental da efeito da administração simultânea de nicotina na autoadministração de etanol.

4.4.1 Autoadministração de Etanol

Os animais foram treinados a autoadministrar etanol 10% (v/v) e água até manter um padrão de resposta estável (aproximadamente 12 sessões). Foram realizados três sessões por semana como descrito no item 3.8.2.

Após a aquisição e estabilização da autoadministração de etanol os animais foram divididos em dois grupos: vapor (expostos ao vapor de etanol) e controle (não expostos ao vapor de etanol).

Para a exposição ao vapor de etanol foram utilizadas câmaras de vapor e o procedimento descrito no item 3.8.4.

Após a divisão dos animais entre os grupos vapor e controle esses foram subdivididos em dois outros grupos: vapor-nicotina, vapor-salina, ar-nicotina, ar-salina. Simultaneamente a exposição ao vapor de etanol os animais receberam injeção diária de nicotina (0,8 mg/Kg; s.c.) ou salina 0,9% (1,0 ml/Kg; s.c.), cinco horas após o início do ciclo de abstinência ao vapor de etanol. Nos dias em que havia os testes do comportamento operante de autoadministração de etanol as injeções de nicotina

(0,8 mg/Kg; s.c.) ou salina 0,9% (1,0 ml/Kg; s.c.) eram administradas 15 minutos antes das sessões. Este procedimento foi repetido até o final do experimento. Os animais do grupo ar também receberam o mesmo tratamento (nicotina ou salina, em horários semelhantes), porém não foram expostos ao vapor de etanol.

Após a estabilização da escalada da autoadministração de etanol os animais foram submetidos aos testes de razão progressiva e adulteração por quinino (conforme descrito nos itens 3.8.6 e 3.8.7).

4.4.2 Imunohistoquímica

Os experimentos de imunohistoquímica foram realizados com o objetivo de caracterizar as áreas encefálicas, a porcentagem de neurônios ativados e o fenótipo de pequenos grupos neurais que potencialmente estariam envolvidos na interação entre nicotina e o aumento da vulnerabilidade ao desenvolvimento da dependência ao etanol.

Realizamos este experimentos no laboratório do Dr. Bruce T. Hope (National Institute on Drug Abuse, National Institute of Health, Baltimore, MD, EUA).

Para esse fim, após o último teste de adulteração por quinino, foi realizada uma nova sessão de 30 minutos de autoadministração de etanol em RF1. Ao término dessa sessão os animais foram anestesiados, perfundidos e os encéfalos coletados para posterior análise imunohistoquímica como descrito nos itens 3.11 e 3.12. Para este experimento dois grupos de animais controles foram adicionados: 1) animais que foram expostos ao vapor de etanol; 2) animais que foram apenas retirados da caixa viveiro e perfundidos. Esses dois grupos não foram expostos ao tratamento crônico com nicotina, salina ou autoadministração de etanol. Esses animais receberam injeção aguda de salina 0,9% (1,0 ml/Kg; s.c.) 90 minutos antes de serem perfundidos, este procedimento foi realizado para contrabalancear o estresse da injeção administrada aos outros grupos.

4.4.3 Análises Estatísticas

Os dados da escalada da autoadministração de etanol foram analisados por ANOVA bifatorial de medidas repetidas considerando os fatores tratamento (nicotina

vs salina) e sessões (medida repetida) seguido pelo teste F para o contraste entre os pares de média, considerando significativo $p < 0,05$.

Os dados da razão progressiva foram analisados por ANOVA bifatorial considerando os fatores vapor (vapor vs ar), tratamento (nicotina vs salina), seguido pelo teste F para o contraste entre os pares de média, considerando significativo $p < 0,05$.

O teste de adulteração por quinino foi analisado utilizando ANOVA bifatorial de medida repetida considerando os fatores tratamento (nicotina vs salina) e concentrações de quinino como medida repetida, seguido pelo teste F para contraste entre os pares de média, considerando significativo $p < 0,05$. Os dados da imunohistoquímica foram analisados por ANOVA bifatorial considerando os fatores vapor (vapor vs ar) e tratamento (nicotina vs salina vs controle), seguido pelo teste de Newman-Keuls.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito da Exposição Prévia ao Estresse Variável na Autoadministração de Nicotina e Análise das Neuroadaptações no Córtex Pré-frontal Medial, Núcleo Acúmbens e Amígdala.

5.1.1 Efeito do Estresse Variável na Atividade Locomotora

A figura 5.1 mostra a atividade locomotora de ratos, em resposta a administração de salina ou nicotina, 10 dias após a última exposição ao estresse variável.

ANOVA revelou diferenças significativas para os fatores tempo [$F(1,33)=5.4;p<0.05$] e tratamento [$F(1,33)=5.96;p<0,05$]. Entretanto não foi observado interação entre os fatores [$F(3,33)=1.13;p>0.05$].

O teste de Newman-Keuls mostrou que o grupo estresse-nicotina apresentou maior atividade locomotora quando comparado aos demais grupos ($p<0,05$). A administração de nicotina ao grupo controle não aumentou a atividade locomotora quando comparada a administração de salina. Esses dados indicam que a exposição ao estresse variado promoveu sensibilização cruzada com a nicotina.

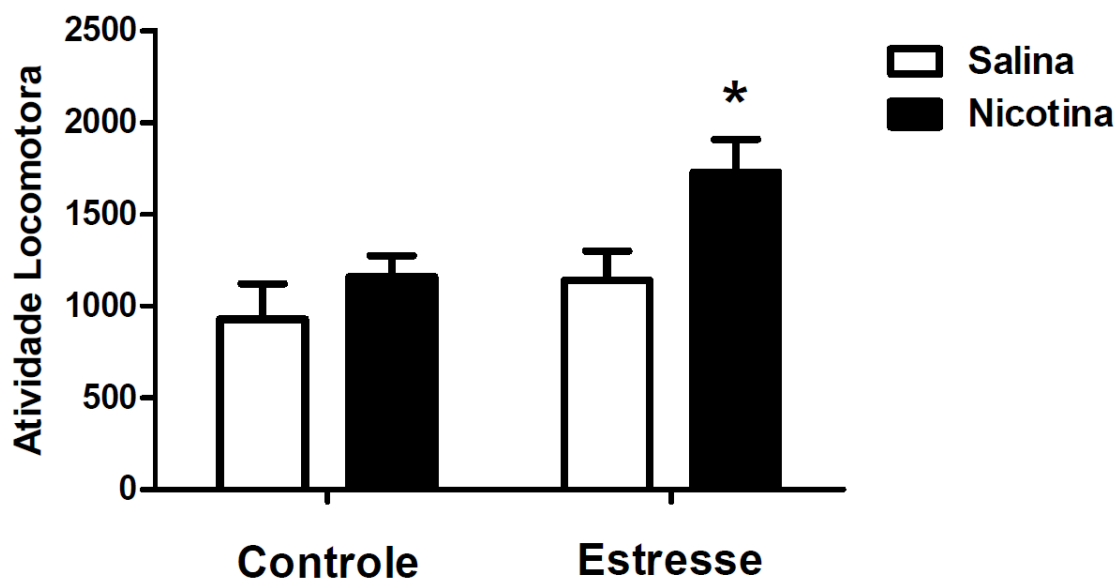


Figura 5.1 - A figura mostra a locomoção induzida pela administração de salina ou nicotina de ratos submetidos ao estresse repetido variado e controles. As barras representam média \pm EPM (N=10 - 11 ratos por grupo) da atividade locomotora. * $p<0,05$ quando comparado aos demais grupos.

5.1.2 Efeito do Estresse Variável na Autoadministração de Nicotina

5.1.2.1 Consumo de Sacarose

A figura 5.2 mostra a média diária do consumo de sacarose 6% pelo peso corpóreo dos animais durante as sessões de aquisição por ratos submetidos ao estresse variável e controles.

ANOVA de medidas repetidas não demonstrou diferença significativa para os fatores grupo [$F(3,33)=0,44;p>0,05$] e tempo [$F(3,33)=0,67;p>0,05$]. Também não foi observada interação significativa entre os fatores [$F(3,33)=0,03;p>0,05$].

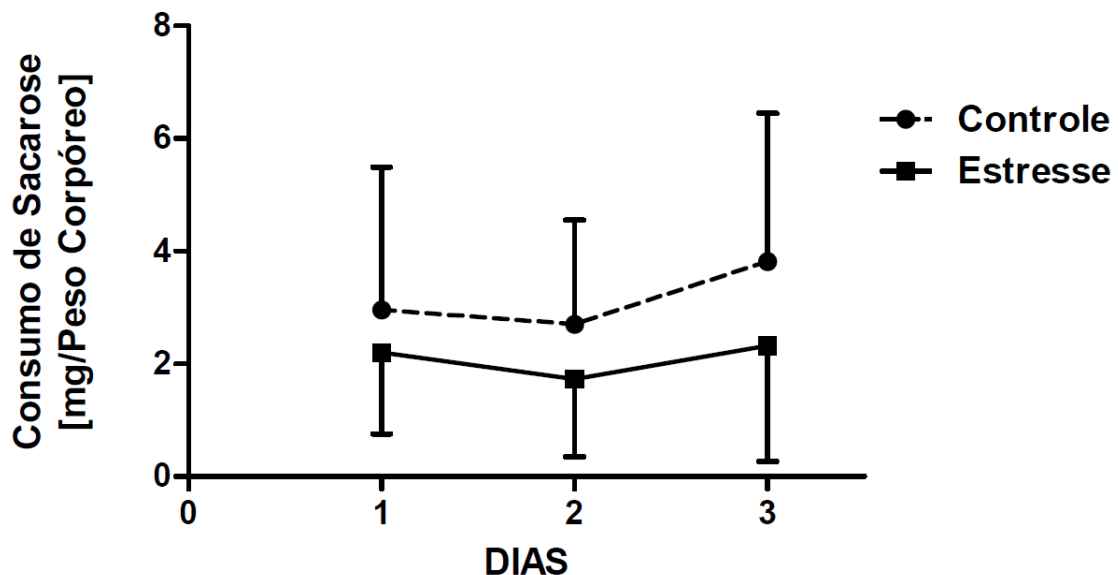


Figura 5.2 - A figura representa a média diária \pm EPM (N = 9, ratos por grupo) da razão do consumo de sacarose pelo peso corpóreo de animais submetidos ao estresse repetido variado e controles.

5.1.2.2 Avaliação do Ponto de Ruptura na Autoadministração de Nicotina

A figura 5.3 (A e B) mostra a média do número de reforços e a última razão alcançada durante as sessões de razão progressiva por ratos submetidos ao estresse variável.

O teste *t-Student* mostrou diferenças significativas no número de respostas ($t(1,15) = 4,346; p<0,001$), bem como na última razão alcançada ($t(1,15) = 3,4; p<0,05$) entre os grupos estresse e controle.

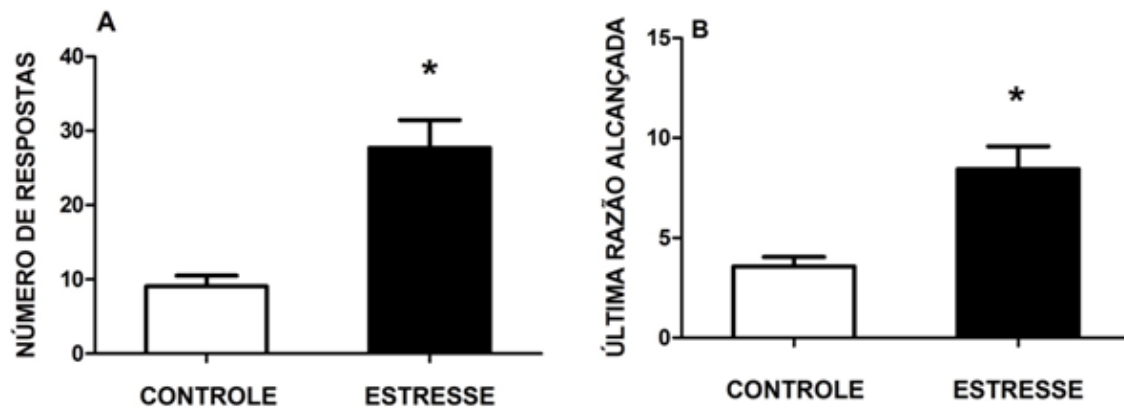


Figura 5.3 - Os histogramas representam média \pm EPM (N = 6-8, ratos por grupo) do número de reforços (A) e da última razão completada (B) durante as sessões de razão progressiva de ratos dos grupos controle e estresse. * $p < 0,05$, quando comparado com o grupo controle.

5.1.2.3 Consumo de Nicotina em 24 horas

A figura 5.4 (A e B) mostra a média do consumo e o consumo individual de nicotina (mg/Kg) durante o acesso livre prolongado por 24 horas, de ratos submetidos ao estresse variável e controles.

Os animais que foram submetidos ao protocolo de estresse variável apresentaram maior consumo de nicotina quando comparados ao grupo controle durante a sessão de “binge” de 24 horas ($t(1,13) = 1,875$; $p < 0,05$; *t-Student*).

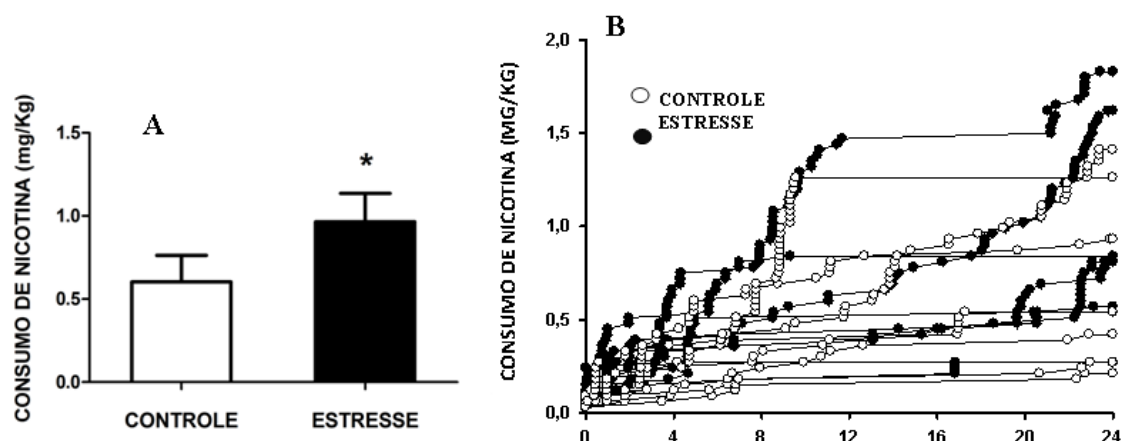


Figura 5.4 - Acesso livre prolongado de 24 horas de nicotina. (A) média \pm EPM do consumo cumulativo e (B) consumo individual de nicotina (mg/Kg) de animais dos grupos estresse e controle ao longo do tempo (N = 7-8 animais por grupo).

5.1.3 Determinação da Atividade de CREB e ERK no Núcleo Acúmbens

5.1.3.1 Determinação da Atividade de CREB

A figura 5.6 mostra a quantidade da proteína CREB e p-CREB no núcleo acúmbens, de animais expostos ao estresse e controle, que receberam salina ou nicotina 10 dias após a última exposição ao estresse.

Para a proteína CREB ANOVA mostrou diferenças significativas para o fator estresse [$F(1,25)=7,73;p<0,01$], porém não foram observadas diferenças para o fator tratamento [$F(1,25)=0,23;p>0,05$]. Nenhuma interação significativa entre os fatores foi observada [$F(1,25)=0,4;p>0,05$].

Nossos resultados mostraram que a exposição ao estresse variável diminuiu a concentração de CREB na forma total.

Para a proteína p-CREB ANOVA mostrou diferenças significativas para os fatores estresse [$F(1,26)=8,60;p<0,01$] e tratamento [$F(1,26)=6,70; p<0,01$]. Nenhuma interação significativa entre os fatores foi observada [$F(1,25)=3,37;p>0,05$].

O teste de Newmam-Keuls demonstrou que a administração de nicotina reduziu a atividade de CREB nos animais controle quando comparado ao grupo controle salina ($p<0,05$). E o estresse variável também reduziu a atividade de CREB em ambos os grupos (nicotina e salina) quando comparado aos seus respectivos grupos controles.

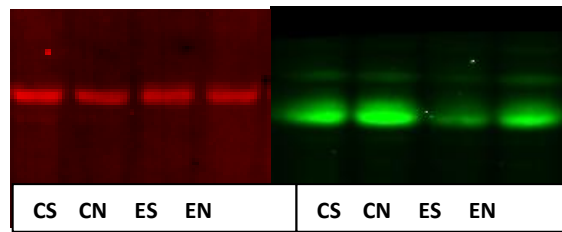


Figura 5.5 - Bandas representativas das proteínas CREB (vermelho) e p-CREB (verde) no núcleo acúmbens, de animais expostos ao estresse (E) e controle (C), que receberam salina (S) ou nicotina(N) 10 dias após a última exposição ao estresse.

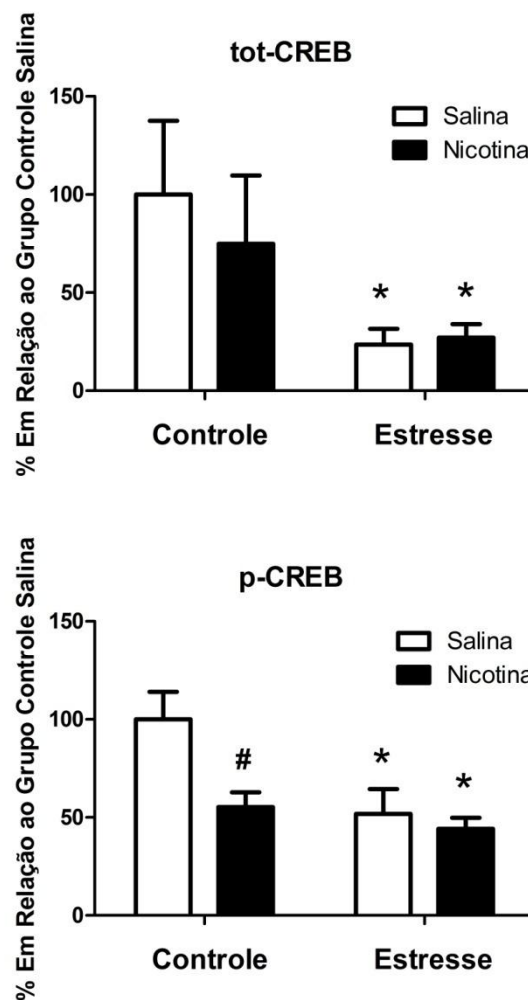


Figura 5.6 - Quantificação da proteína CREB nas formas total e fosforilada no núcleo acúmbens de animais expostos ao estresse e controle, que receberam salina ou nicotina 10 dias após a última exposição ao estresse. Os histogramas representam a média \pm EPM (N = 7-10 animais por grupo) da porcentagem da quantidade das proteínas CREB e p-CREB em relação ao grupo controle-salina. * $p < 0,01$ comparado aos grupos controles; # $p < 0,01$, comparado ao grupo controle-salina.

5.1.3.2 Determinação da Atividade de ERK

A figura 5.8 mostra a quantidade da proteína ERK e p-ERK no núcleo acúmbens, de animais expostos ao estresse e controle, desafiados com salina ou nicotina 10 dias após a última exposição ao estresse.

Para a proteína total ANOVA não demonstrou diferenças significativas para o fatores estresse [$F(1,36)=0,47;p>0,05$] e tratamento [$F(1,36)=0,11;p>0,05$]. Nenhuma interação significativa entre os fatores foi observada [$F(1,36)=0,05;p>0,05$].

Para forma fosforilada ANOVA não demonstrou diferenças significativas para o fatores estresse [$F(1,36)=2,62;p>0,05$] e tratamento [$F(1,36)=0,19;p>0,05$]. Nenhuma interação significativa entre os fatores foi observada [$F(1,36)=0,002;p>0,05$].

Nossos resultados demonstram que a exposição ao estresse variável não foi capaz de produzir alterações na atividade de ERK em resposta a administração de nicotina ou salina.

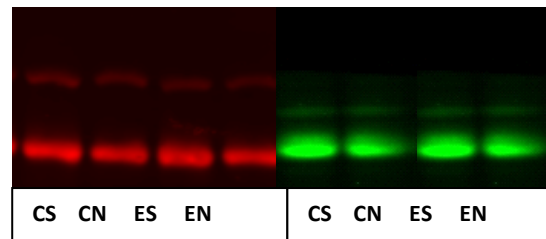


Figura 5.7 - Bandas representativas das proteínas ERK (vermelho) e p-ERK (verde) no núcleo acumbens, de animais expostos ao estresse (E) e controle (C), que receberam salina (S) ou nicotina (N) 10 dias após a última exposição ao estresse.

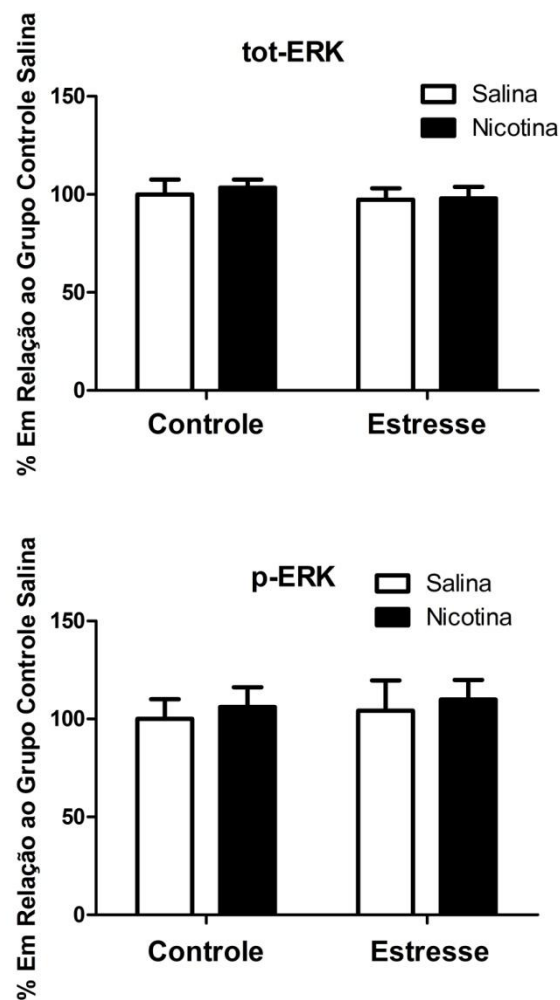


Figura 5.8 - Quantificação da proteína ERK nas formas total e fosforilada no núcleo acumbens de animais expostos ao estresse e controle, que receberam salina ou nicotina 10 dias após a última exposição ao estresse. Os histogramas representam a média \pm EPM ($n=7-10$ animais por grupo) da porcentagem da quantidade das proteínas ERK e p-ERK em relação ao grupo controle-salina.

5.1.4 Determinação da Atividade da CREB e ERK na Amígdala

5.1.4.1 Determinação da Atividade de CREB

A figura 5.10 mostra a quantidade da proteína CREB e p-CREB na amígdala de animais expostos ao estresse e controle, que receberam salina ou nicotina 10 dias após a última exposição ao estresse.

Para a proteína CREB ANOVA não demonstrou diferenças significativas para os fatores estresse [$F(1,22)=0,004;p>0,05$] e tratamento [$F(1,22)=3,89;p>0,05$]. Nenhuma interação significativa entre os fatores foi observada [$F(1,22)=1,42;p>0,05$].

Para a proteína p-CREB ANOVA mostrou diferenças significativas para o fator tratamento [$F(1,21)=5,85;p<0,05$], mas não para o fator estresse [$F(1,21)=0,12;p>0,05$]. Nenhuma interação significativa entre os fatores foi observada [$F(1,21)=2,73;p>0,05$].

Nossos resultados demonstraram que a administração de nicotina reduziu a atividade de CREB apenas no grupo exposto ao estresse variável ($p<0,05$).

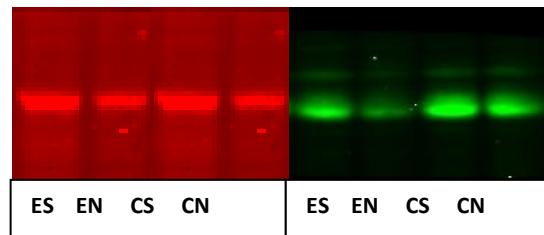


Figura 5.9 - Bandas representativas das proteínas CREB (vermelho) e p-CREB (verde) na amígdala, de animais expostos ao estresse (E) e controle (C), que receberam salina (S) ou nicotina (N) 10 dias após a última exposição ao estresse.

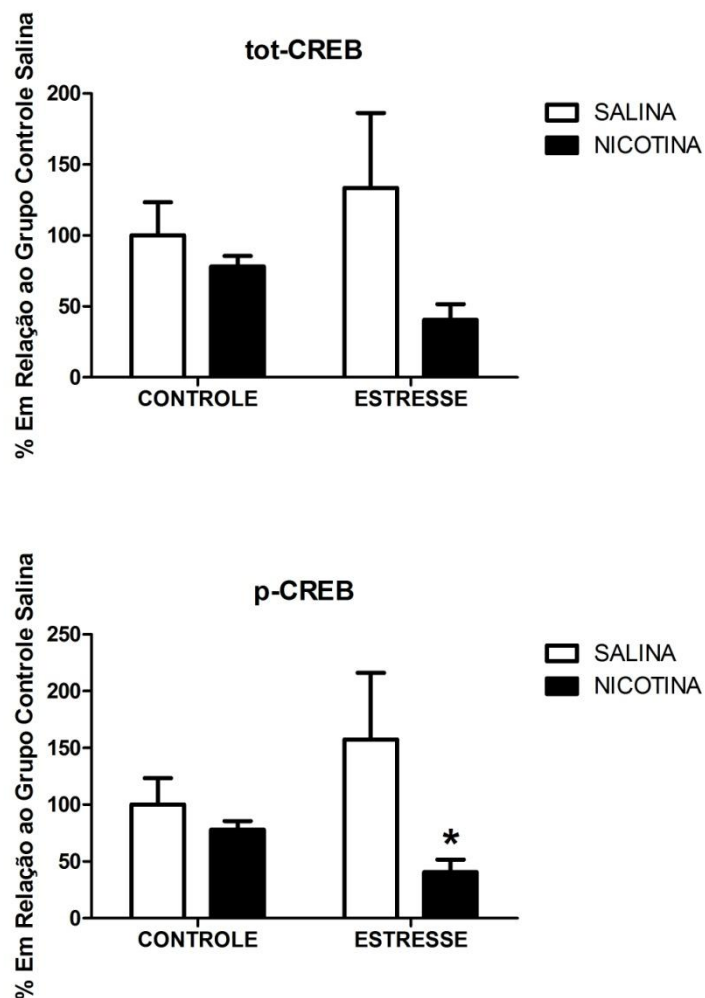


Figura 5.10 - Quantificação da proteína CREB nas formas total e fosforilada na amígdala de animais expostos ao estresse e controle, que receberam salina ou nicotina 10 dias após a última exposição ao estresse. Os histogramas representam a média \pm EPM (N=6-8, animais por grupo) da porcentagem da quantidade das proteínas CREB e p-CREB em relação ao grupo controle-salina. * $p < 0,05$, comparado ao grupo estresse salina.

5.1.4.2 Determinação da Atividade de ERK

A figura 5.12 mostra a quantidade da proteína ERK e p-ERK na amígdala, de animais expostos ao estresse e controle, desafiados com salina ou nicotina 10 dias após a última exposição ao estresse.

Para a proteína total ANOVA não demonstrou diferenças significativas para os fatores estresse [$F(1,32)=0,02;p>0,05$] e tratamento [$F(1,32)=3,44;p>0,05$]. Nenhuma interação significativa entre os fatores foi observada [$F(1,32)=1,66;p>0,05$].

Para forma fosforilada ANOVA não demonstrou diferenças significativas para o fator estresse [$F(1,35)=1,14;p>0,05$], porém foi observada diferenças significativas para o fator tratamento [$F(1,35)=4,13;p<0,05$]. Nenhuma interação significativa entre os fatores foi observada [$F(1,35)=2,53;p>0,05$].

Nossos resultados demonstraram que a administração de nicotina reduziu a atividade de ERK apenas no grupo exposto ao estresse variável.

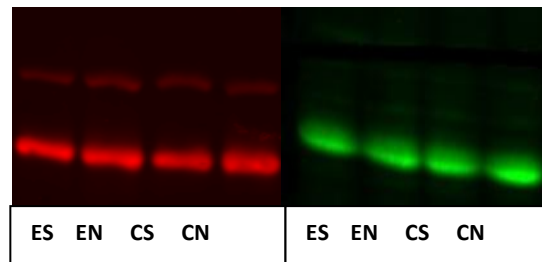


Figura 5.11 - Bandas representativas das proteínas ERK (vermelho) e p-ERK (verde) na amígdala, de animais expostos ao estresse (E) e controle (C), que receberam salina (S) ou nicotina (N) 10 dias após a última exposição ao estresse.

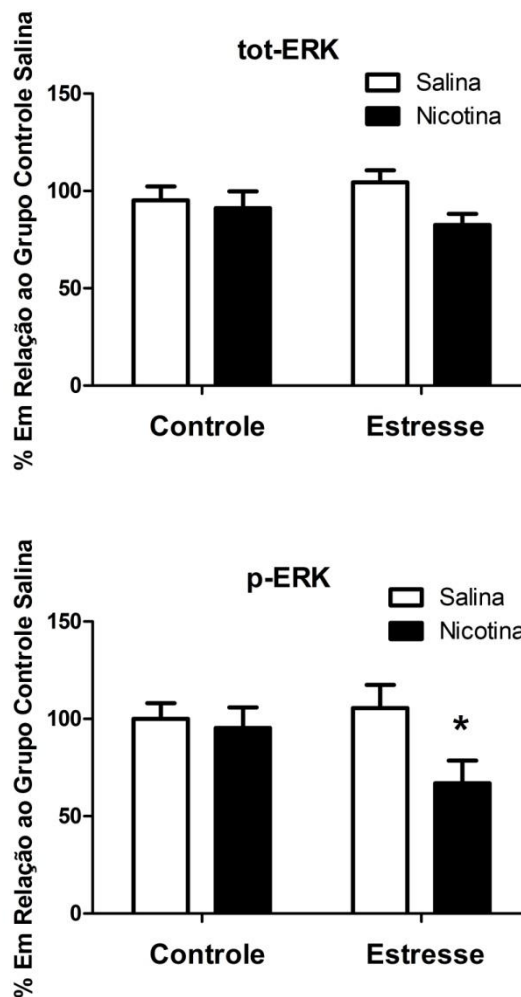


Figura 5.12 - Quantificação da proteína ERK nas formas total e fosforilada na amígdala de animais expostos ao estresse e controle, que receberam salina ou nicotina 10 dias após a última exposição ao estresse. Os histogramas representam a média \pm EPM (N=6-8, animais por grupo) da porcentagem da quantidade das proteínas ERK e p-ERK em relação ao grupo controle-salina. * $p < 0,05$, comparado ao grupo estresse salina.

5.1.5 Determinação da Atividade da CREB e ERK no Córtex Pré-frontal Medial

5.1.5.1 Determinação da Atividade de CREB

A figura 5.14 mostra a quantidade da proteína CREB e p-CREB no córtex pré-frontal medial de animais expostos ao estresse e controle, que receberam salina ou nicotina 10 dias após a última exposição ao estresse.

Para a proteína CREB ANOVA demonstrou diferenças significativas para o fator estresse [$F(1,21)=11,5;p<0,01$], e tratamento [$F(1,21)=0,53;p>0,05$]. Nenhuma interação significativa entre os fatores foi observada [$F(1,21)=2,33;p>0,05$].

O teste de Newman-Keuls demonstrou que a exposição ao estresse variável aumentou a concentração da proteína total CREB para ambos os grupos (nicotina e salina) quando comparado com seus respectivos grupos ($p<0,05$).

Para a proteína p-CREB ANOVA mostrou diferenças significativas para o fator estresse [$F(1,23)=4,99;p<0,05$], mas não para tratamento [$F(1,23)=0,50;p>0,05$]. Nenhuma interação significativa entre os fatores foi observada [$F(1,23)=0,47;p>0,05$].

Nossos resultados demonstraram que a exposição ao estresse variável reduziu a atividade de CREB para ambos os grupos (nicotina e salina) quando comparado com seus respectivos grupos.

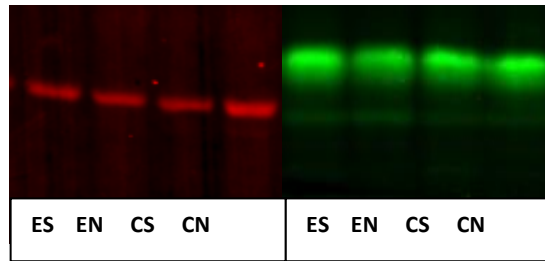


Figura 5.13 - Bandas representativas das proteínas CREB (vermelho) e p-CREB (verde) no córtex pré-frontal medial, de animais expostos ao estresse (E) e controle (C), que receberam salina (S) ou nicotina (N) 10 dias após a última exposição ao estresse.

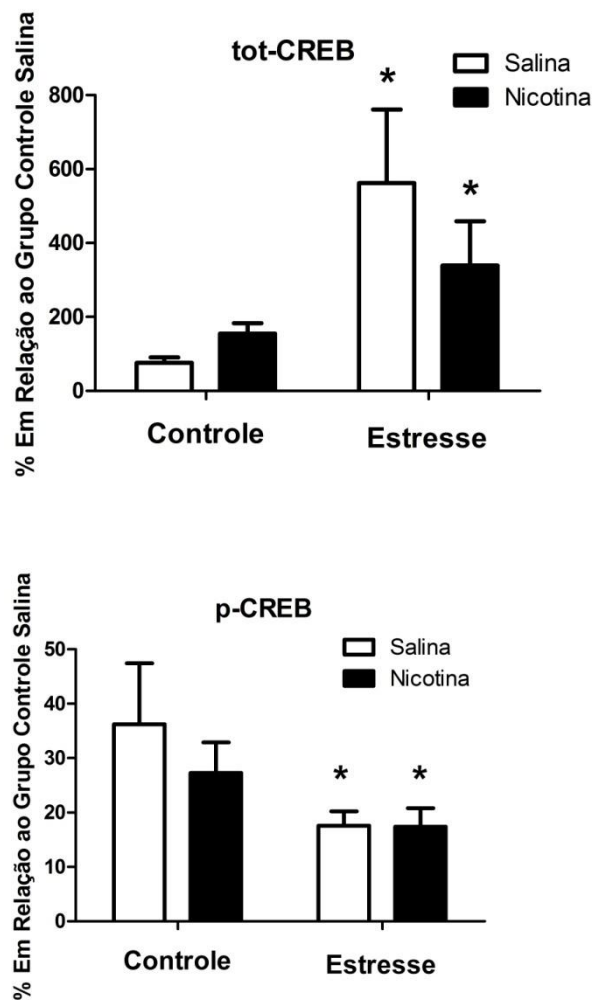


Figura 5.14 - Quantificação da proteína CREB nas formas total e fosforilada no córtex pré-frontal medial de animais expostos ao estresse e controle, que receberam salina ou nicotina 10 dias após a última exposição ao estresse. Os histogramas representam a média \pm EPM (N=6-8, animais por grupo) da porcentagem da quantidade das proteínas CREB e p-CREB em relação ao grupo controle-salina. * $p < 0,05$, comparado aos grupos controles.

5.2.5.2 Determinação da Atividade de ERK

A figura 5.16 mostra a quantidade da proteína ERK e p-ERK no córtex pré-frontal medial, de animais expostos ao estresse e controle, desafiados com salina ou nicotina 10 dias após a última exposição ao estresse.

Para a proteína total ANOVA não demonstrou diferenças significativas para os fatores estresse [$F(1,35)=0,01;p>0,05$] e tratamento [$F(1,35)=0,49;p>0,05$]. Nenhuma interação significativa entre os fatores foi observada [$F(1,35)=0,64;p>0,05$].

Para forma fosforilada ANOVA não demonstrou diferenças significativas para os fatores estresse [$F(1,33)=1,66;p>0,05$] e tratamento [$F(1,33)=1,23;p>0,05$]. Nenhuma interação significativa entre os fatores foi observada [$F(1,33)=1,5;p>0,05$].

Nossos resultados demonstram que a exposição ao estresse variável não foi capaz de produzir alterações na atividade de ERK em resposta a administração de nicotina ou salina.

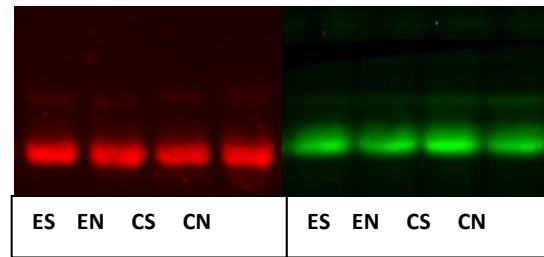


Figura 5.15 - Bandas representativas das proteínas ERK (vermelho) e p-ERK (verde) no córtex pré-frontal medial, de animais expostos ao estresse (E) e controle (C), que receberam salina (S) ou nicotina (N) 10 dias após a última exposição ao estresse.

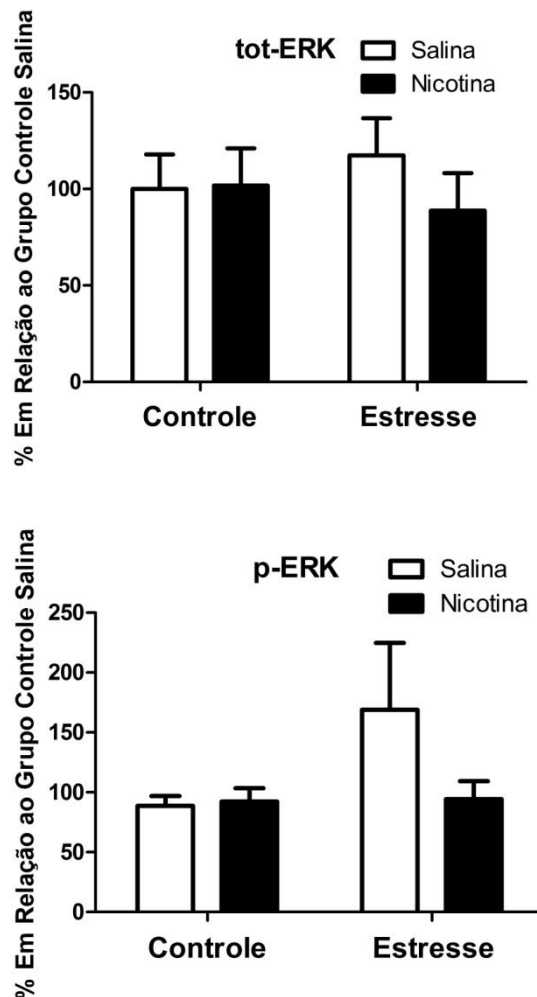


Figura 5.16 - Quantificação da proteína ERK nas formas total e fosforilada no córtex pré-frontal medial de animais expostos ao estresse e controle, que receberam salina ou nicotina 10 dias após a última exposição ao estresse. Os histogramas representam a média \pm EPM (N=6-8, animais por grupo) da porcentagem da quantidade das proteínas ERK e p-ERK em relação ao grupo controle-salina.

5.2 Efeito da Administração Prévia de Cocaína na Autoadministração de Nicotina e Análise da Expressão Gênica no Núcleo Acúmbens.

5.2.1 Atividade Locomotora

5.2.1.1 Sensibilização Locomotora à Cocaína

A figura 5.17 mostra a atividade locomotora de ratos, em resposta a administração de salina e cocaína (15 mg/Kg; i.p.), 3 dias após a último dia do pré-tratamento com cocaína (20 mg/Kg; i.p.) ou salina.

ANOVA revelou diferenças significativas para os fatores pré-tratamento [$F(1,15) = 4,91; p < 0,05$] e tempo [$F(1,15) = 17,33; p < 0,001$]. Também foi observada interação entre esses fatores [$F(1,15) = 7,03; p < 0,001$].

Nossos resultados mostraram que ratos pré-tratados com cocaína apresentaram aumento significativo da atividade locomotora induzida pela cocaína quando comparado ao grupo pré-tratado com salina nos tempos de 5 à 20 minutos (Figura 5.17), evidenciando que o pré-tratamento com cocaína promoveu sensibilização locomotora à cocaína ($p < 0,05$). Também observamos que a resposta locomotora à cocaína foi maior do que a resposta à administração de salina, no grupo pré-tratado com cocaína.

Nenhuma diferença foi observada entre os grupos em resposta a administração de salina.

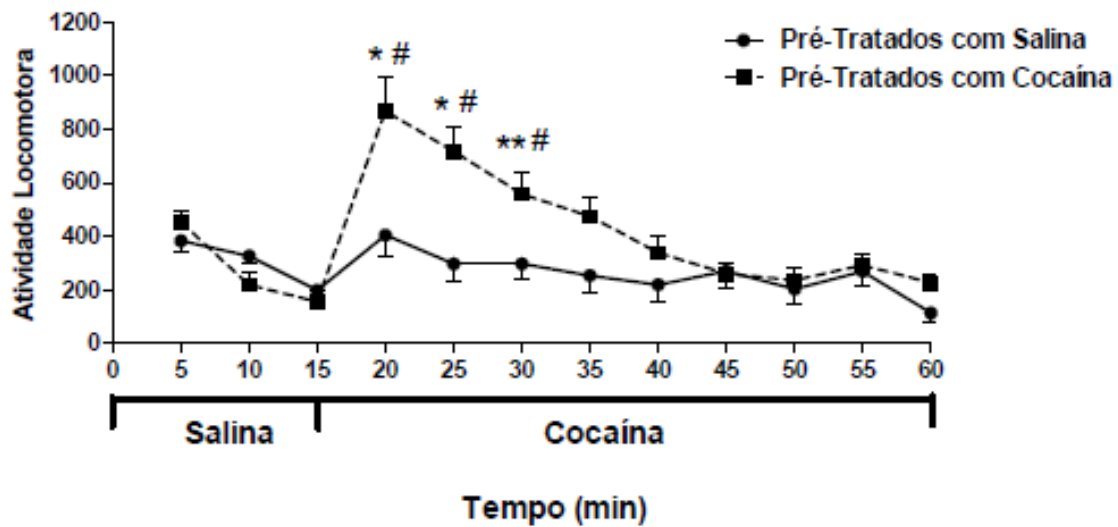


Figura 5.17 - Atividade locomotora após injeção de salina ou cocaína (15 mg/Kg; i.p.) em ratos pré-tratados com cocaína (20 mg/Kg) ou salina. Os valores representam a média \pm EPM (N = 10-11 animais por grupo) das unidades de locomoção acumuladas em intervalos de 5 minutos. * $p < 0,05$ para o grupo pré-tratado com cocaína quando comparado com o grupo pré-tratado com salina no mesmo intervalo de tempo; ** $p < 0,01$ para o grupo pré-tratado com cocaína quando comparado com o grupo pré-tratado com salina no mesmo intervalo de tempo; # $p < 0,05$ para a administração de cocaína comparada a administração de salina nos ratos pré-tratados com cocaína.

5.2.1.2 Sensibilização Locomotora Cruzada entre o Pré-Tratamento com Cocaína e a Administração Aguda de Nicotina

A figura 5.18 mostra a atividade locomotora de ratos, em resposta a administração de salina e nicotina, 1 dia após o teste de sensibilização locomotora à cocaína.

ANOVA não revelou diferença significativa para o fator pré-tratamento [$F(1,10) = 2,90$; $p < 0,05$]. Entretanto foi observada diferença significativa para o fator tempo [$F(6,60) = 5,56$; $p < 0,05$] e interação entre os fatores [$F(6,60) = 2,13$; $p < 0,05$].

Nossos resultados demonstraram que ratos pré-tratados com cocaína apresentaram aumento na atividade locomotora quando comparado com o grupo pré-tratado com salina nos primeiros 5 minutos ($p < 0,05$), evidenciando assim, que o pré-tratamento com cocaína causou sensibilização cruzada com nicotina (figura 5.18). Também observamos que a resposta locomotora a nicotina foi maior do que a resposta à administração de salina, no grupo pré-tratado com cocaína ($p < 0,05$).

Nenhuma diferença foi observada entre os grupos em resposta a administração de salina.

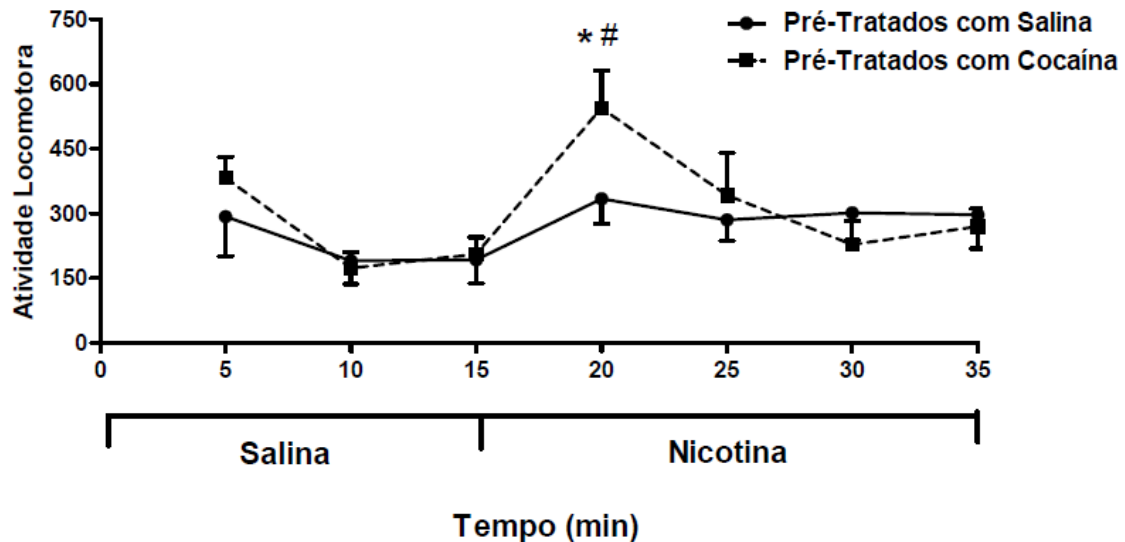


Figure 5.18 - Atividade locomotora após a injeção de salina e nicotina (0,4 mg/Kg; s.c.) em ratos pré-tratados com cocaína (20 mg/Kg) ou salina. Os valores representam a média \pm EPM (N = 10-11 animais por grupo) das unidades de locomoção acumuladas em intervalos de 5 minutos. * $p < 0,05$ para o grupo pré-tratado com cocaína comparado ao grupo pré-tratado com salina no mesmo intervalo de tempo. # $p < 0,05$ para a administração de nicotina comparada a administração de salina nos ratos pré-tratados com cocaína.

5.2.2 Autoadministração de Nicotina

5.2.2.1 Razão Progressiva

A figura 5.19 representa a média de três sessões de razão progressiva do número de respostas e a última razão alcançada (Ponto de Ruptura) de animais pré-tratados com salina 0,9% (1,0 ml/Kg; i.p.) ou cocaína (20 mg/Kg; i.p.).

O *test t-Student* revelou aumento significativo no número de respostas para o grupo pré-tratado com cocaína quando comparado com o grupo salina ($t(14)=5,06; p < 0,01$). Também foi observado aumento da última razão alcançada nos animais do grupo cocaína quando comparado aos animais salina ($t(14)=5,32; p < 0,001$) (figura 5.19).

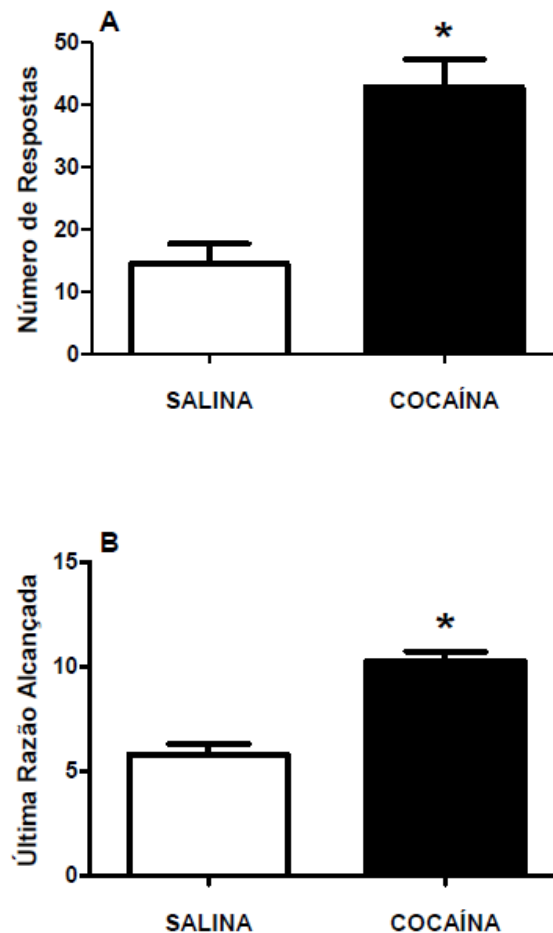


Figura 5.19 - Média do número de respostas **(A)** e da última razão alcançada **(B)** nas sessões de razão progressiva em animais pré-tratados com cocaína ou salina (n= 8 animais por grupo). * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo salina.

5.2.2.2 Acesso Livre Prolongado de 24 Horas “Binge”

A figura 5.20 representa a média do número de respostas, reforços e do consumo total de nicotina durante a sessão de acesso livre prolongado de 24 horas dos animais pré-tratados com cocaína (20 mg/Kg; i.p.) ou salina 0,9% (1,0 ml/Kg; i.p.).

O teste *t-Student* revelou aumento significativo no número de respostas ($t(15)=2,19;p<0,05$), reforços ($t(15)=2,78;p<0,05$), e no consumo total de nicotina ($t(15)=2,80;p<0,05$), nos animais pré-tratados com cocaína quando comparados com os animais do grupo salina.

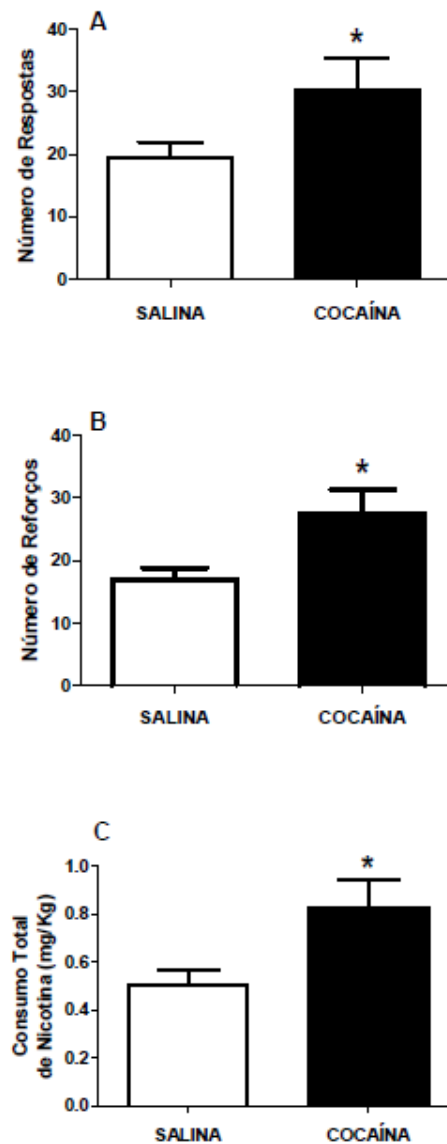


Figure 5.20 - Número de respostas (A), reforços (B) e consumo total de nicotina (C) durante a sessão de acesso livre prolongado de 24 horas em animais pré-tratados com cocaína ou salina (n= 8 animais por grupo). * p < 0,05 quando comparado com o grupo salina.

5.2.3 Reação da Polimerase em Cadeia em Tempo Real (RT-PCR)

A figura 5.21 representa a análise semiquantitativa ou relativa da expressão ($2^{\Delta\Delta Ct}$) dos genes DYN, Mu-Opio, NPY, BDNF, TrkB e CRFR1, 24 horas após a sessão de acesso livre prolongado a nicotina.

O teste *t-Student* revelou um aumento significativo na expressão de BDNF nos ratos pré-tratados com cocaína quando comparado com o grupo salina ($t(7)=2,61;p<0,05$). Nenhuma outra diferença foi observada.

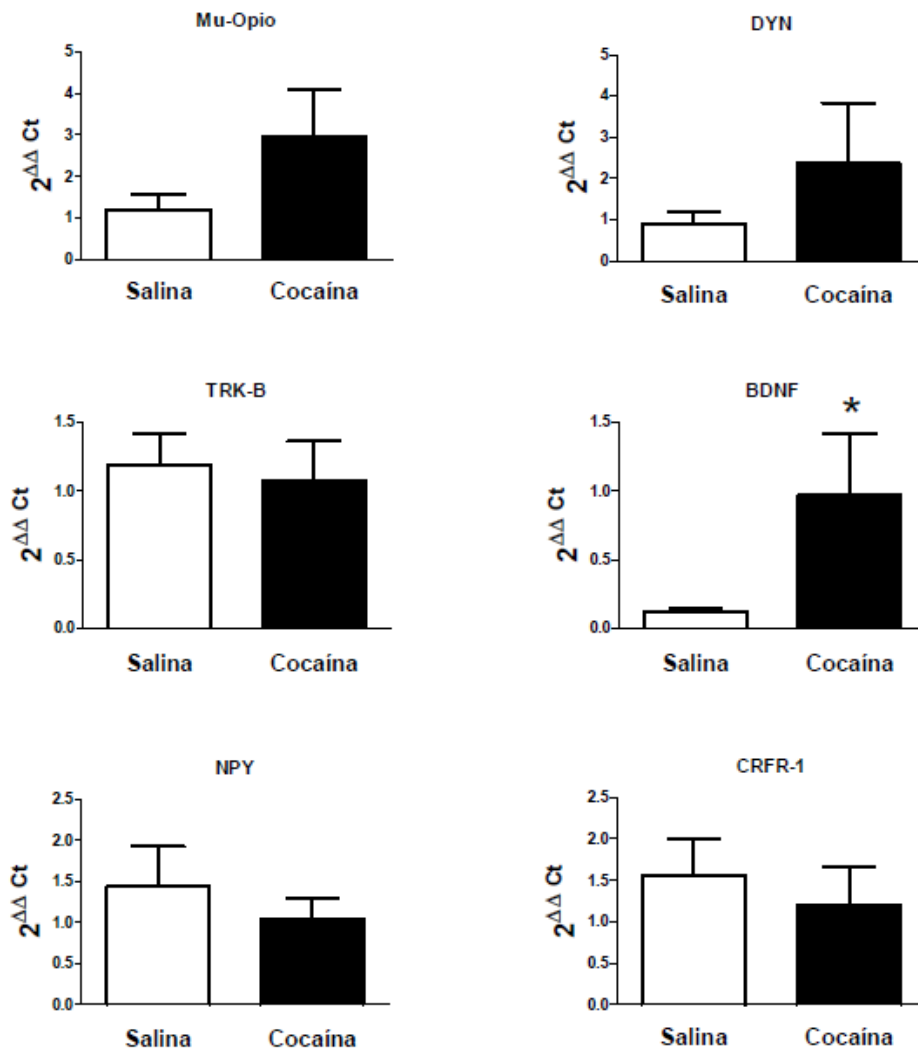


Figure 5.21 - Análise semiquantitativa ou relativa da expressão ($2^{\Delta\Delta Ct}$) dos genes DYN, Mu-Opio, NPY, BDNF, TrkB e CRFR1, 24 horas após a sessão de acesso livre prolongado a nicotina (n = 8 animais por grupo). * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo salina.

5.3 Efeito da Administração Prévia de Nicotina na Autoadministração de Etanol.

5.3.1 Comportamentos Relacionados a Ansiedade Induzida pela Administração Repetida de Nicotina

A figura 5.22 mostra a análise dos comportamentos relacionados com ansiedade [(A) porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos, (B) porcentagem do número de entradas nos braços abertos e (C) frequência de entradas nos braços fechados] de ratos, 24 horas após o pré-tratamento com salina 0,9% (1,0 ml/Kg) ou nicotina (1 mg/Kg; 3 vezes por dia; s.c.) por 10 dias.

O teste *t-Student* revelou diferenças significativas entre os grupos no número de entradas nos braços abertos ($t(17)=2,56$; $p<0,05$), bem como no tempo de permanência nos braços abertos ($t(17)=2,61$, $p<0,05$). Não foi observada diferença significativa na frequência de entradas nos braços fechado entre os grupos ($t(17)=0,98$; $p=0,34$).

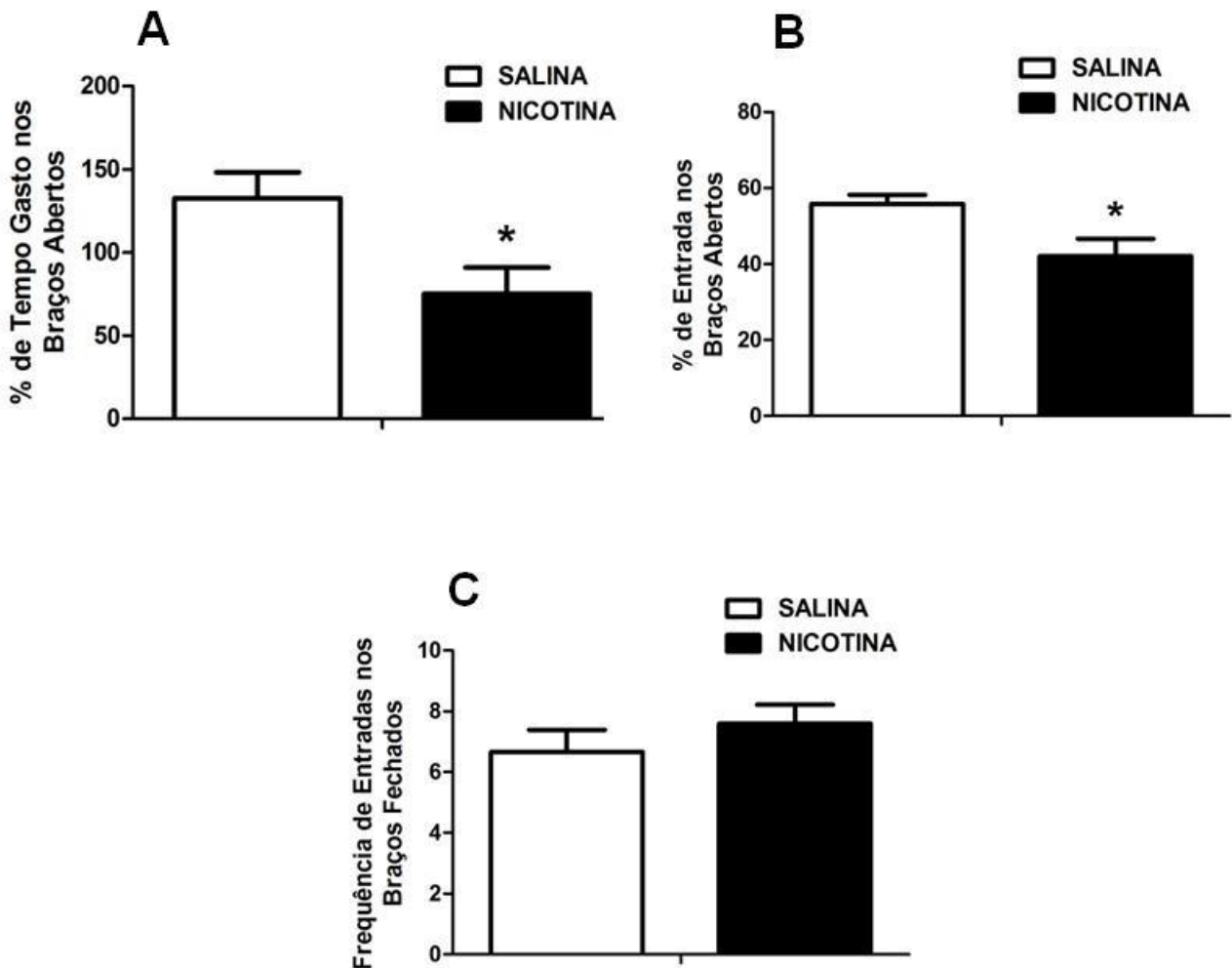


Figura 5.22 - A figura representa a análise dos comportamentos relacionados com a ansiedade [(A) porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos, (B) porcentagem do número de entradas nos braços abertos e (C) frequência de entradas nos braços fechados] de animais dos grupos nicotina e salina (N = 7-8 animais por grupo).

5.3.2 Autoadministração de Etanol

5.3.2.1 Razão Progressiva

A figura 5.23 mostra a média do número de respostas, reforços e a última razão completada durante as sessões de razão progressiva por ratos submetidos ao pré-tratamento com nicotina (1 mg/Kg; s.c.).

Para o número de respostas ANOVA revelou diferenças significativas para os fatores tratamento [$F(1,23)=4,90;p<0,05$], e autoadministração [$F(1,23)=3,92;p<0,05$], entretanto não foi observado interação entre os fatores [$F(1,23)=2,53;p>0,05$].

O teste de Newman-Keuls revelou que o grupo nicotina-etanol apresentou maior número de respostas quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$).

Para o número de reforços ANOVA revelou diferenças significativas para o fator tratamento [$F(1,23)=4,50;p < 0,05$], mas não para o fator autoadministração [$F(1,23)=2,69;p > 0,05$], também não foi observado interação entre os fatores [$F(1,23)=2,13;p > 0,05$].

Para a última razão alcançada ANOVA revelou diferenças significativas para os fatores tratamento [$F(1,23)=4,15;p < 0,05$], e autoadministração [$F(1,23)=3,4;p < 0,05$], entretanto não foi observado interação entre os fatores [$F(1,23)=2,17;p > 0,05$].

O teste de Newman-Keuls revelou que o grupo nicotina-etanol apresentou aumento na última razão alcançada quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$).

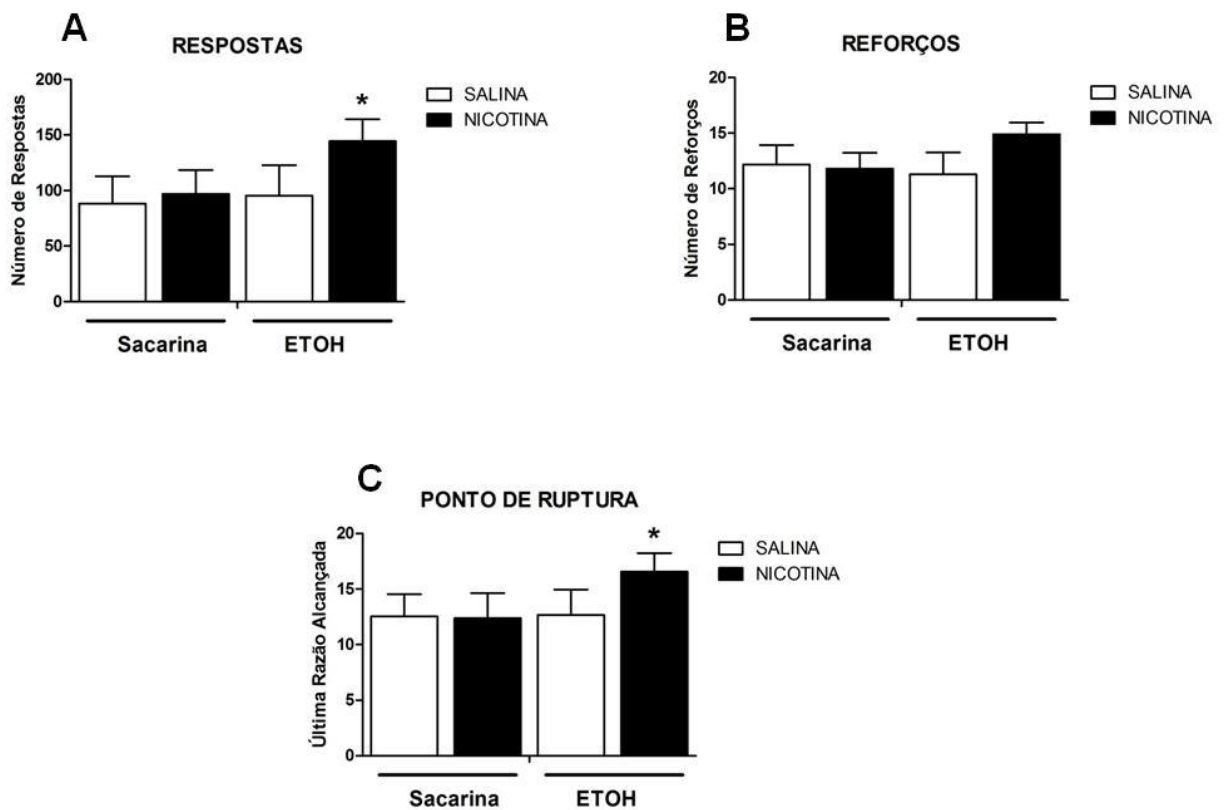


Figura 5.23 - Os histogramas representam média \pm EPM (N = 6-8, animais por grupo) do número de respostas (A), do número de reforços (B) e da última razão completada (C) durante as sessões de razão progressiva por ratos dos grupos salina e nicotina. * $p < 0,05$, quando comparado com o grupo controle.

5.3.2.2 Acesso Livre Prolongado de 24 horas

A figura 5.24 mostra a média do consumo total de etanol 6% e sacarina 0,05% durante a sessão de acesso livre prolongado de 24 horas por ratos submetidos ao pré-tratamento com nicotina (1,0 mg/Kg; s.c.; 3x por dia).

O teste *t-Student* não mostrou diferenças significativas entre os grupos nicotina e salina em nenhum dos parâmetros da autoadministração de etanol 6% [$t(1,16)=0,48;p>0,05$] assim como para sacarina 0,05% [$t(1,10)=0,31;p>0,05$].

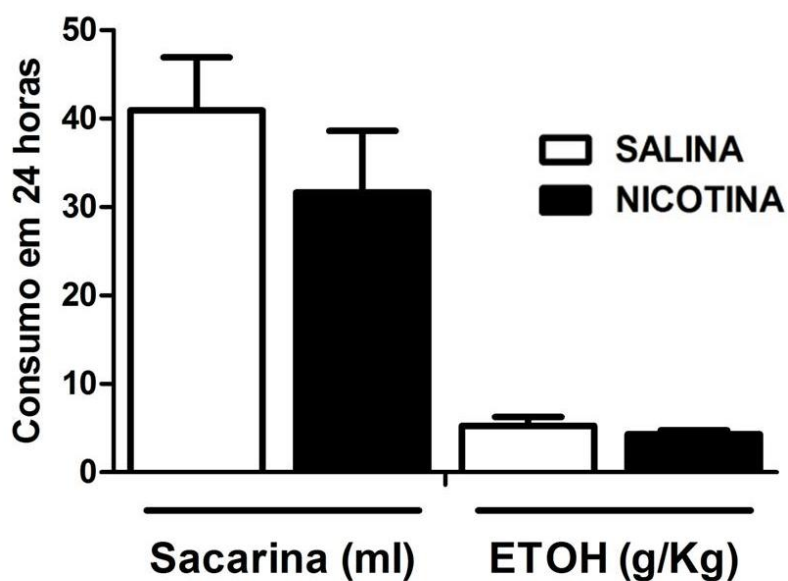


Figura 5.24 - A figura representa a média \pm EPM do consumo cumulativo de etanol (mg/Kg) dos animais dos grupos nicotina e salina na sessão de acesso livre prolongado de 24 horas (N = 6 - 8 animais por grupo).

5.4 Efeito da Administração Simultânea de Nicotina no Desenvolvimento da Dependência ao Etanol: Identificação e Caracterização de Pequenos Grupos Neurais (Experimentos Realizados no The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA e no National Institute on Drug Abuse, Baltimore, MD, EUA)

Como não foram encontradas diferenças significativas para o consumo de água em todos os experimentos realizados, apresentaremos aqui somente os resultados do consumo de etanol 10%.

5.4.1 Escalada da Autoadministração de Etanol

A figura 5.25 mostra a média do número de reforços ao longo de 16 sessões de autoadministração operante de etanol 10% de animais expostos (A) e não expostos (B) ao vapor de etanol e que foram tratados com nicotina (0,8 mg/Kg; s.c.) ou salina 0,9% (1,0 ml/Kg; s.c.) e (C) animais tratados com nicotina (0,8 mg/Kg; s.c.) expostos ou não expostos ao vapor de etanol.

Inicialmente, realizamos uma análise por ANOVA multifatorial considerando os fatores vapor (exposição ao vapor de etanol vs não exposição ao vapor), tratamento (nicotina vs salina) e sessões como medida repetida. Encontramos interação significativa entre os três fatores [$F(15,375)=4,76, p<0,05$]. Como gostaríamos de demonstrar o efeito da administração de nicotina no desenvolvimento da dependência ao etanol optamos por desmembrar a análise.

Assim, a análise estatística foi seguida pela realização de três ANOVA, individuais, de medidas repetidas, uma para os animais expostos e outra para os não expostos à câmara de vapor de etanol, e uma terceira análise para os animais que foram tratados com nicotina (0,8 mg/Kg; s.c.), expostos ou não expostos ao vapor de etanol.

Para os animais expostos ao vapor de etanol ANOVA revelou diferenças significativas para os fatores tratamento [$F(1,15)=54,96, p<0,05$] e sessões [$F(1,15)=23,06; p<0,05$]. Também foi observada interação entre os fatores [$F(1,15)=4,19; p<0,05$].

A análise foi seguida pelo teste F para contraste entre os pares de média que revelou diferença significativa entre os grupos entre as sessões 9 à 12 ($p<0,05$). E mostrou também que o grupo vapor-nicotina apresenta diferença significativa em

relação à última sessão basal à partir da 9ª sessão, enquanto para os animais do grupo vapor-salina essa diferença foi observada apenas à partir da 13ª sessão ($p < 0,05$).

Assim, nossos resultados demonstraram que a administração de nicotina simultaneamente à exposição ao vapor de etanol acelera o desenvolvimento da dependência ao etanol.

Para os animais não expostos ao vapor de etanol ANOVA revelou diferenças significativas para os fatores tratamento [$F(1,15)=2,51, p < 0,05$] e sessões [$F(1,15)=4,04; p < 0,05$]. Também foi observada interação entre os fatores [$F(1,15)=3,06; p < 0,05$].

A análise foi seguida pelo teste F para contraste entre os pares de média que revelou diferença significativa entre os grupos entre as sessões 10 à 14 e na sessão 16 ($p < 0,05$). E mostrou também que o grupo não vapor-nicotina apresenta diferença significativa em relação à última sessão basal à partir da 9ª sessão, enquanto para os animais do grupo não vapor-salina essa diferença não foi observada ($p < 0,05$).

Assim, nossos resultados demonstraram que a administração de nicotina aumentou a autoadministração de etanol.

Para os animais que receberam tratamento com nicotina (0,8 mg/Kg; s.c.) e expostos ou não ao vapor de etanol ANOVA revelou diferenças significativas para os fatores tratamento [$F(1,15)=6,22, p < 0,05$] e sessões [$F(1,15)=17,16; p < 0,05$]. Também foi observada interação entre os fatores [$F(1,15)=1,97; p < 0,05$].

A análise foi seguida pelo teste F para contraste entre os pares de média que revelou diferença significativa entre os grupos entre as sessões 9 à 11 ($p < 0,05$).

Assim, nossos resultados demonstraram que a escalada da autoadministração de etanol é maior nos animais dos grupos expostos ao vapor de etanol.

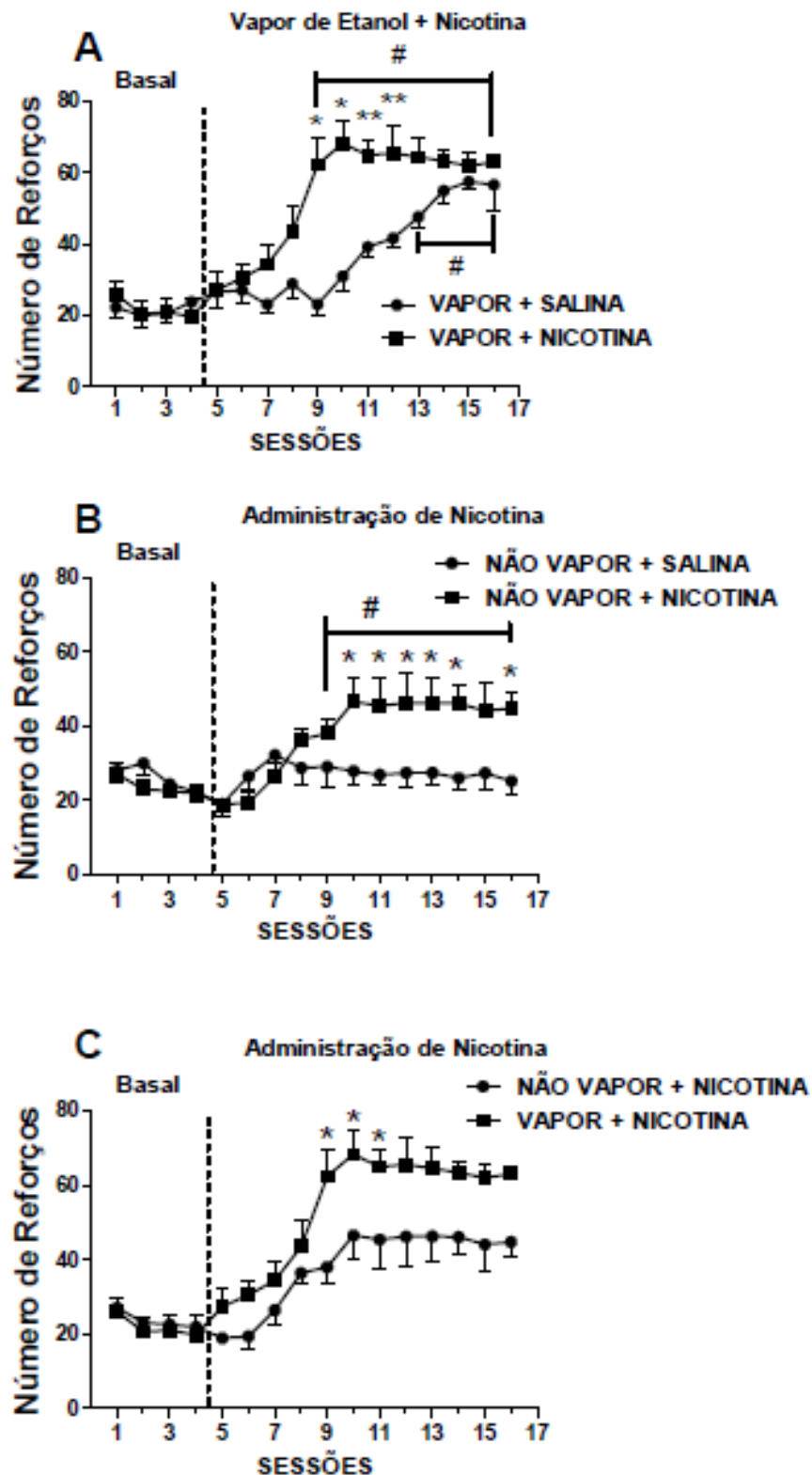


Figura 5.25 - Média do número de reforços ao longo de 16 sessões de autoadministração operante de etanol 10% de animais expostos **(A)** e não expostos **(B)** ao vapor de etanol e que foram tratados com nicotina (0,8 mg/Kg; s.c.) ou salina 0,9% (1,0 ml/Kg; s.c.) e **(C)** animais tratados com nicotina expostos ou não expostos ao vapor de etanol (n= 8-9 animais por grupo). *p<0,05 comparado com o grupo tratado com salina; **p<0,001 comparado com o grupo tratado com salina; #p<0,05 comparado as sessões basais.

5.4.2 Razão Progressiva

A figura 5.26 mostra a média do número de reforços e a última razão alcançada durante as sessões de razão progressiva por ratos submetidos ao tratamento com salina 0,9% (1,0 ml/Kg; s.c.) ou nicotina (0,8 mg/Kg; s.c.) e expostos (Vapor) ou não expostos (Ar) ao vapor de etanol.

Para o número de reforços ANOVA revelou diferenças para os fatores vapor [$F(1,31)=52,62;p<0,05$] e tratamento [$F(1,31)=11,05;p<0,05$]. Entretanto interação entre os fatores não foi observada [$F(1,31)=1,53;p>0,05$]

O teste de Newman-Keuls demonstrou que a administração de nicotina aumentou o número de reforços em ambos os grupos quando comparado ao grupo salina e que o grupo vapor-nicotina apresentou maior número de reforços quando comparado ao grupo ar-nicotina ($p<0,05$).

Para a última razão alcançada ANOVA revelou diferenças para os fatores vapor [$F(1,31)=35,88;p<0,05$] e tratamento [$F(1,31)=7,20;p<0,05$]. Entretanto interação entre os fatores não foi observada [$F(1,31)=0,77;p>0,05$]

O teste de Newman-Keuls demonstrou que a administração de nicotina aumentou a última razão alcançada em ambos os grupos quando comparado ao grupo salina e que o grupo vapor-nicotina apresentou maior número de reforços quando comparado ao grupo ar-nicotina ($p<0,05$).

Nossos experimentos demonstraram que o tratamento com nicotina aumenta a motivação para o consumo de etanol e que essa motivação é maior no animais dependentes ao etanol.

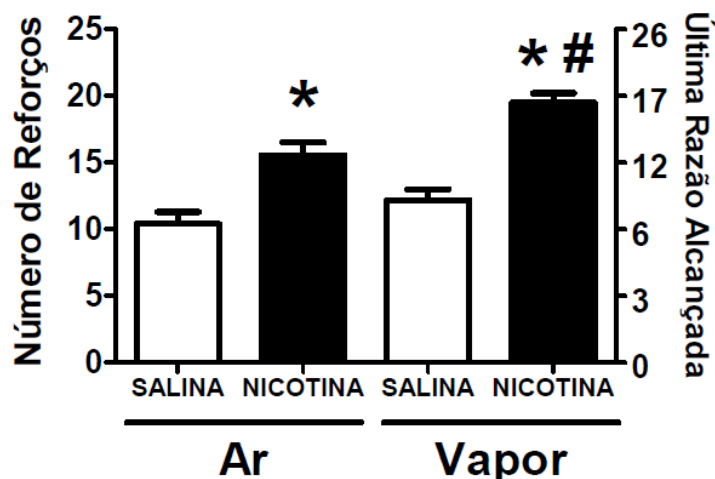


Figura 5.26 - Média do número de reforços e a última razão alcançada durante as sessões de razão progressiva por ratos submetidos ao tratamento com salina 0,9% (1,0 ml/Kg; s.c.) ou nicotina (0,8 mg/Kg; s.c.) e expostos (Vapor) ou não expostos (Ar) ao vapor de etanol (n= 8-9 animais por grupo). * $p < 0,05$, quando comparado com o grupo salina. # $p < 0,05$, quando comparado com o grupo ar-nicotina.

5.4.3 Teste de Adulteração por Quinino

A figura 5.27 mostra a média do número de reforços durante os testes de adulteração por quinino em ratos submetidos ao tratamento com salina 0,9% (1,0 ml/Kg; s.c.) ou nicotina (0,8 mg/Kg; s.c.) e expostos (A) ou não (B) ao vapor de etanol.

O teste t-Student demonstrou diferença significativa entre os valores basais dos grupo salina e nicotina apenas nos animais expostos ao vapor de etanol [$t(16)=3,5; p < 0,05$].

Como no item 5.4.1, inicialmente realizamos uma análise por ANOVA multifatorial considerando os fatores vapor (exposição ao vapor de etanol vs não exposição ao vapor), tratamento (nicotina vs salina) e concentrações de quinino como medida repetida. Encontramos interação significativa entre os três fatores [$F(1,155)=5,36, p < 0,05$]. Como gostaríamos de demonstrar o efeito da administração de nicotina na persistência ao consumo de etanol a despeito do sabor amargo aversivo da solução de quinino optamos novamente por desmembrar a análise.

Assim, a análise estatística foi seguida pela realização de duas ANOVA, individuais, de medidas repetidas, uma para os animais expostos e outra para os não expostos à câmara de vapor de etanol.

Para os animais expostos ao vapor de etanol ANOVA revelou diferença significativa para os fatores tratamento [$F(1,16)=15,43;p<0,05$] e concentração de quinino [$F(5,80)=135,39;p<0,05$]. Também foi observada uma importante interação entre os fatores [$F(5,80)=3,52; p<0,05$].

Nossos resultados mostraram que os ratos tratados com nicotina simultaneamente com a exposição ao vapor de etanol apresentaram menor diminuição no número de reforços comparado com o grupo tratado com salina para as soluções de etanol com a adição de quinino nas concentrações de 0,01 e 0,025 g/L ($p<0,05$).

Evidenciando que o tratamento simultâneo de nicotina com a exposição ao vapor de etanol intensificou a persistência do animal em consumir etanol a despeito do sabor amargo aversivo do quinino, ou seja, aumentado o consumo compulsivo de etanol.

Para os animais não expostos ao vapor de etanol ANOVA revelou diferença significativa para os fatores tratamento [$F(1,16)=30,17;p<0,05$] e concentração de quinino [$F(5,80)=51,97;p<0,05$]. Também foi observada uma importante interação entre os fatores [$F(5,80)=6,06; p<0,05$].

Nossos resultados demonstraram, para este grupo de animais que não foram expostos ao vapor de etanol, um efeito contrário da nicotina em relação aos animais que foram expostos ao vapor de etanol. Os animais que receberam administração de nicotina apresentaram um maior redução do consumo de etanol adulterado com quinino quando comparado com os animais salina nas concentrações de quinino de 0.025 e 0.05 g/L, mostrando que o desenvolvimento da persistência para o consumo de etanol ocasionada pela nicotina é dependente da exposição ao vapor de etanol. Ou seja, a nicotina aumenta o consumo compulsivo apenas em animais dependentes ao etanol.

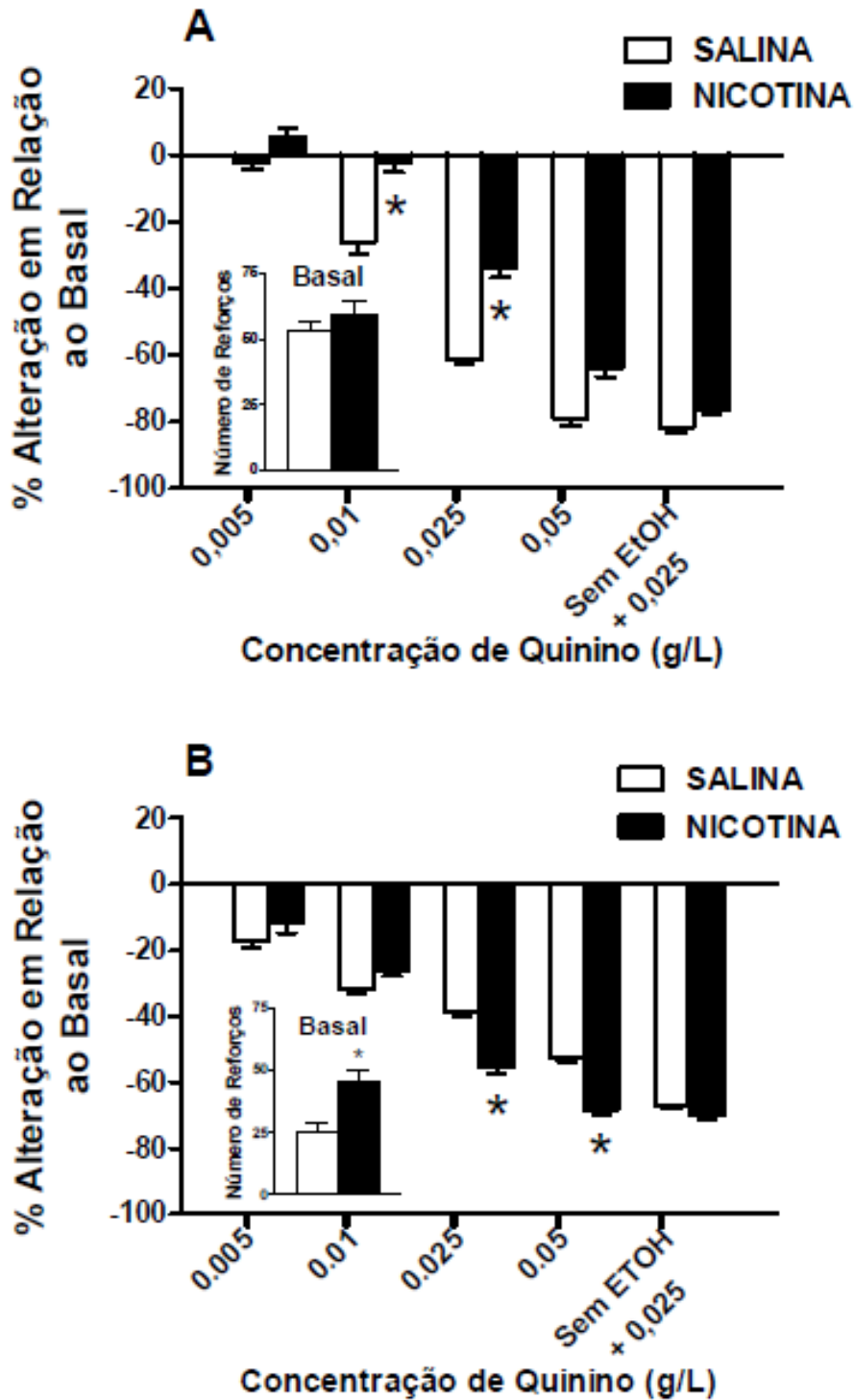


Figura 5.27 - Teste de adulteração da solução de etanol por quinino. As barras representam a porcentagem de alteração do consumo de etanol com adição crescente de quinino (0,005; 0,01; 0,025; 0,05 e 0,025 sem adição de etanol) em relação ao valor basal da autoadministração de etanol (sem adição de quinino). Em **(A)** os animais expostos ao vapor de etanol e em **(B)** os animais que não foram expostos ao vapor de etanol (N = 7-9 animais por grupo). * $p < 0,05$, quando comparado com o grupo salina.

5.4.4 Imunoistoquímica

5.4.4.1 Expressão Neuronal de Fos (DAB)

Nesse experimento, investigamos quais áreas encefálicas poderiam estar relacionadas ao aumento do consumo de etanol induzido pelo tratamento simultâneo com nicotina em animais dependentes ao etanol. Para isso, avaliamos a ativação neural de algumas regiões encefálicas (córtex pré-frontal, núcleos acúmbens, amígdala, núcleo intersticial da estria terminal e área tegmental ventral), através da contagem de células positivas para a proteína Fos (marcador de ativação neuronal).

5.4.4.1.1 Córtex Pré-Frontal Medial

No córtex pré-frontal medial o tratamento simultâneo com nicotina e exposição ao vapor de etanol aumentou significativamente a expressão de Fos apenas na região dorsal quando comparado aos outros grupos [vapor: $F(1,28)=0,86;p>0,05$; tratamento: $F(2,28)=7,69;p<0,05$; interação: $F(2,28)=4,13;p<0,05$], nenhuma diferença entre os grupos foi observada para as regiões ventral e orbital.

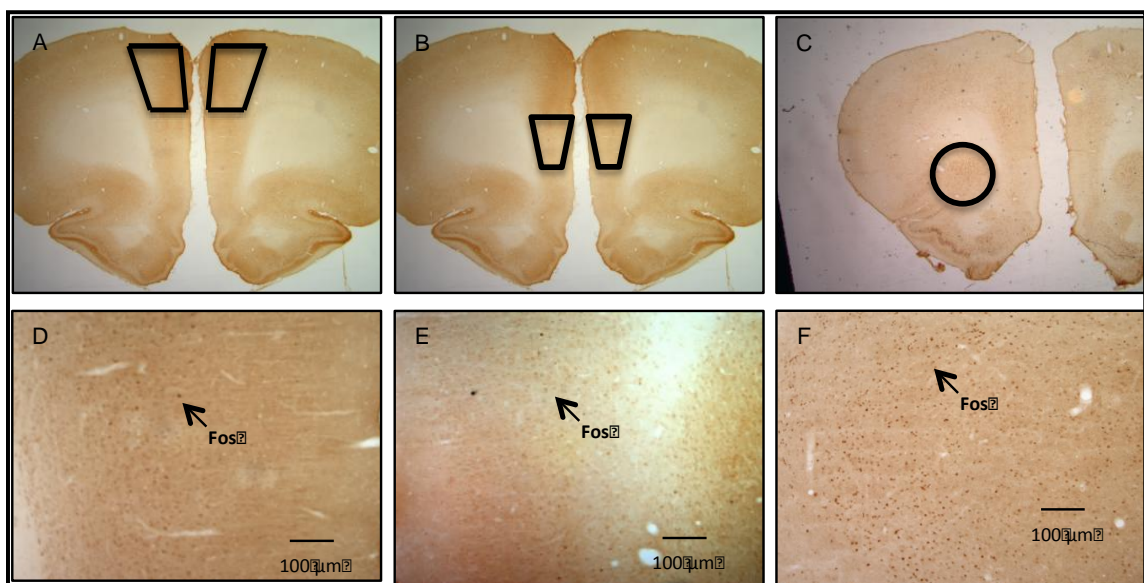


Figura 5.28 - Cortes do córtex pré-frontal medial demonstrando as regiões ventral (A), dorsal (B) e orbital (C) onde foram quantificadas as células positivas para a proteína Fos. A figura mostra também a imunomarcação para Fos no córtex pré-frontal medial ventral (D), dorsal (E) e orbital (F) (aumento de 12,5X e 50X).

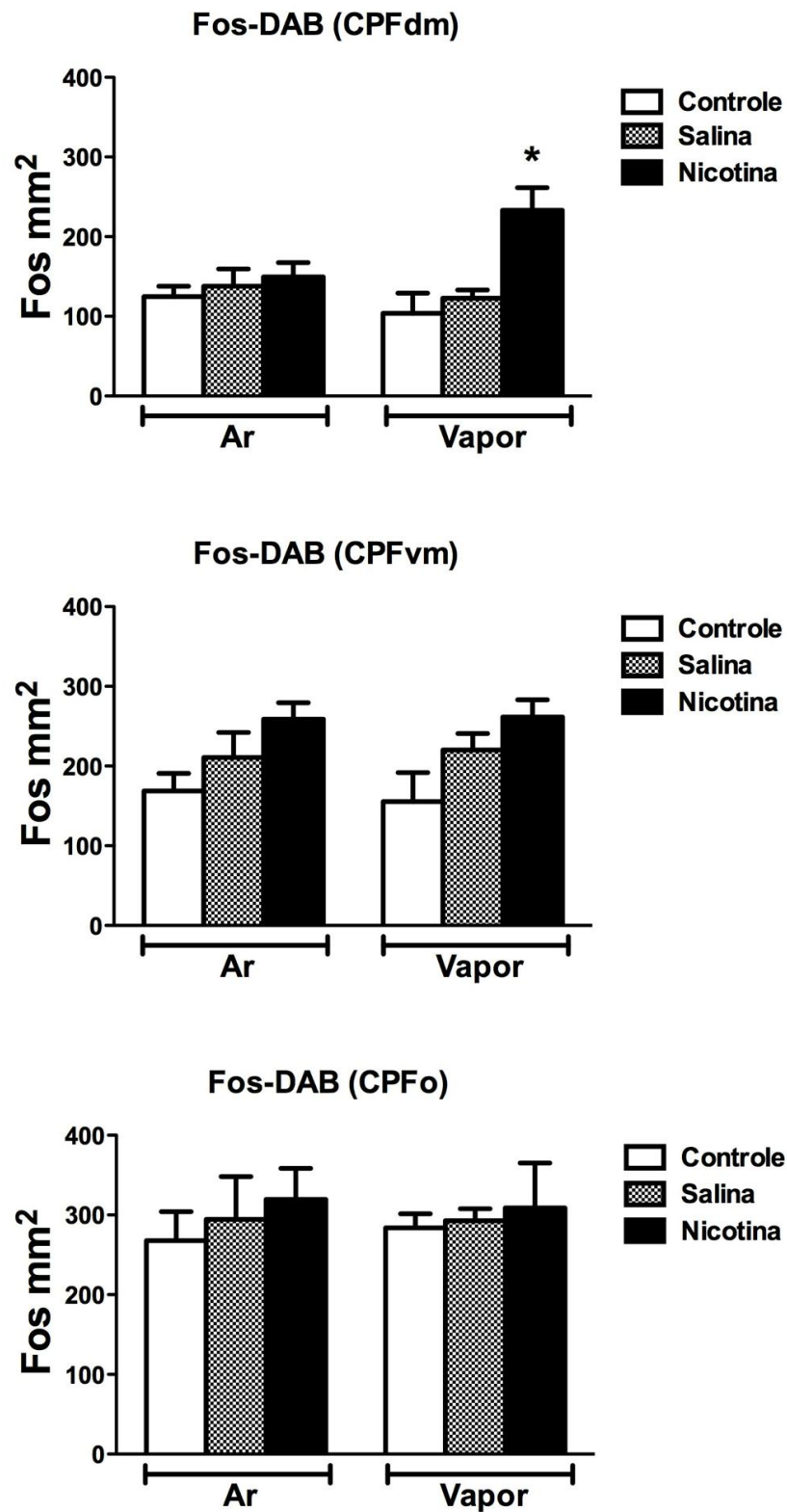


Figura 5.29 - Contagem de células positivas para proteína Fos (mm^2) em diferentes regiões do córtex pré-frontal. Os histogramas representam média \pm EPM (N = 6-8 animais por grupo). O valor de células positivas para cada animal representa a média de 4 hemisférios. * $p < 0,05$ comparado aos demais grupos, Newman-Keuls.

5.4.4.1.2 Núcleo Acúmbens

No núcleo acúmbens o tratamento simultâneo com nicotina e exposição ao vapor de etanol aumentou significativamente a expressão de Fos apenas na região central quando comparado aos outros grupos [vapor: $F(1,23)=2,03;p>0,05$; tratamento: $F(2,23)=4,16;p<0,05$; interação: $F(2,23)=4,42;p<0,05$], nenhuma diferença entre os grupos foi observada para a região da concha.

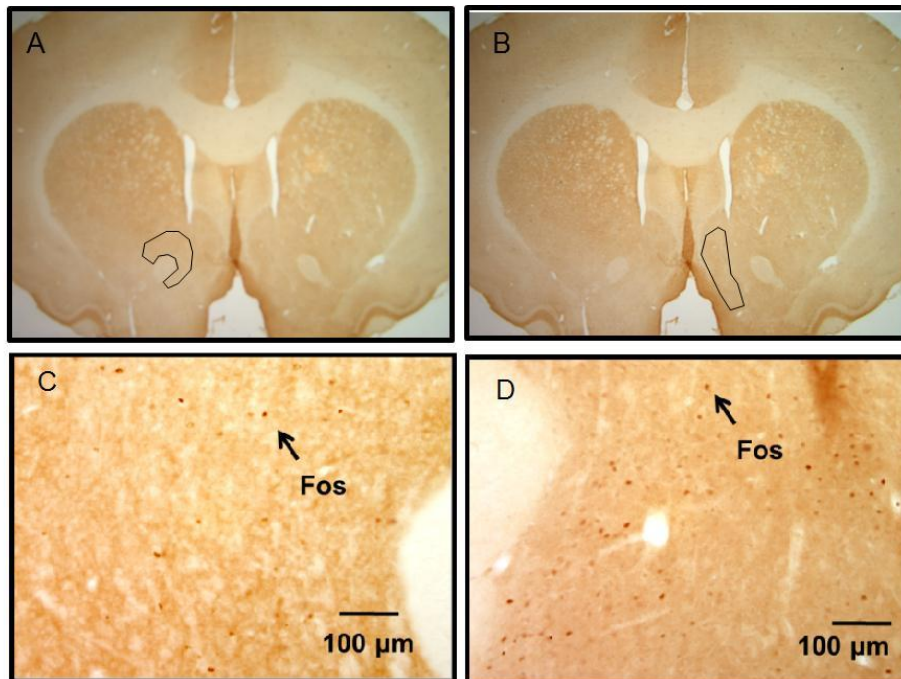


Figura 5.30 - Cortes do núcleo acúmbens demonstrando as regiões do centro (A) e da concha (B) onde foram quantificadas as células positivas para a proteína Fos. A figura mostra também a imunomarcação para Fos no centro (C) e na concha (D) do núcleo acúmbens (aumento de 12,5X e 50X).

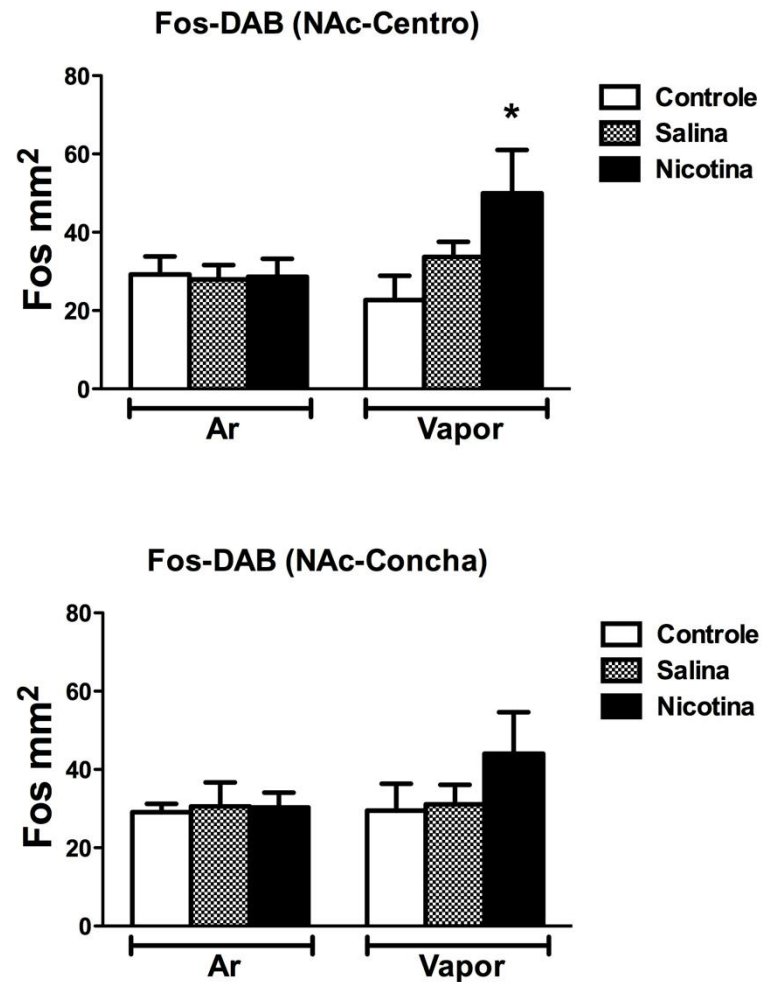


Figura 5.31 - Contagem de células positivas para proteína Fos (mm^2) em diferentes regiões do núcleo acúmbens. Os histogramas representam média \pm EPM (N = 6-8, animais por grupo). O valor de células positivas para cada animal representa a média de 4 hemisférios. * $p < 0,05$ comparado aos demais grupos.

5.4.4.1.3 Amígdala

Na amígdala o tratamento simultâneo com nicotina e exposição ao vapor de etanol aumentou significativamente a expressão de Fos na região central quando comparado aos outros grupos, mas não quando comparado ao grupo ar-nicotina [vapor: $F(1,28)=0,03;p>0,05$; tratamento: $F(2,28)=11,85;p<0,05$; interação: $F(2,28)=2,63;p<0,05$]. Na região basolateral a administração de nicotina aumentou a expressão de Fos nos grupos vapor e ar comparados aos demais [vapor: $F(1,28)=0,56;p>0,05$; tratamento: $F(2,28)=12,94;p<0,05$; interação: $F(2,26)=1,01;p>0,05$]. Nenhuma outra diferença foi observada entre os grupos.

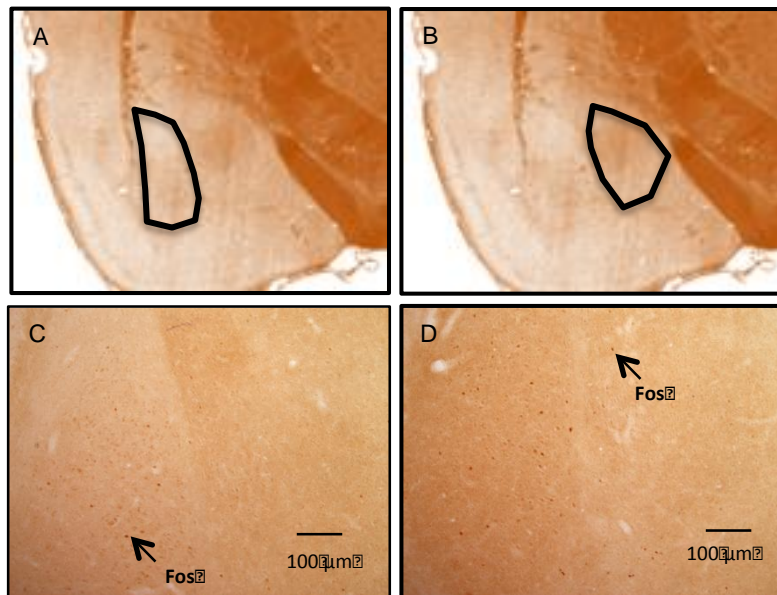


Figura 5.32 - Cortes da amígdala demonstrando as regiões do basolateral (A) e central (B) onde foram quantificadas as células positivas para a proteína Fos. A figura mostra também a imunomarcagem para Fos nas porções basolateral (C) e central (D) da amígdala (aumento de 12,5X e 50X).

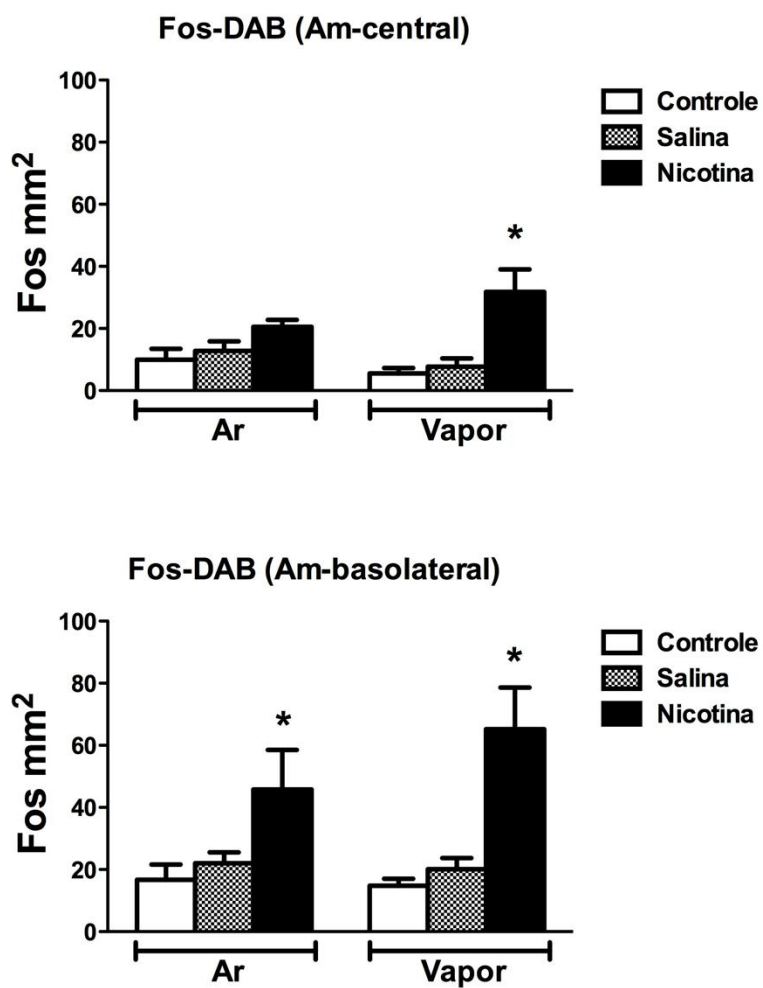


Figura 5.33 - Contagem de células positivas para proteína Fos (mm^2) em diferentes regiões da amígdala. Os histogramas representam média \pm EPM (N = 6-8 animais por grupo). O valor de células positivas para cada animal representa a média de 4 hemisférios. * $p < 0,05$, comparado aos demais grupos.

5.4.4.1.4 Núcleo Intersticial da Estria Terminal (BNST)

No BNST o tratamento simultâneo com nicotina e exposição ao vapor de etanol aumentou significativamente a expressão de Fos nas regiões justa capsular [vapor: $F(1,28)=25,70;p<0,05$; tratamento: $F(2,28)=12,15;p<0,05$; interação: $F(2,28)=9,24;p<0,05$], lateral posterior [vapor: $F(1,28)=18,82;p<0,05$; tratamento: $F(2,28)=19,52;p<0,05$; interação: $F(2,28)=13,03;p<0,05$], e lateral anterior [vapor: $F(1,28)=25,58;p<0,05$; tratamento: $F(2,28)=25,59;p<0,05$; interação: $F(2,28)=11,47;p<0,05$], quando comparado aos outros grupos

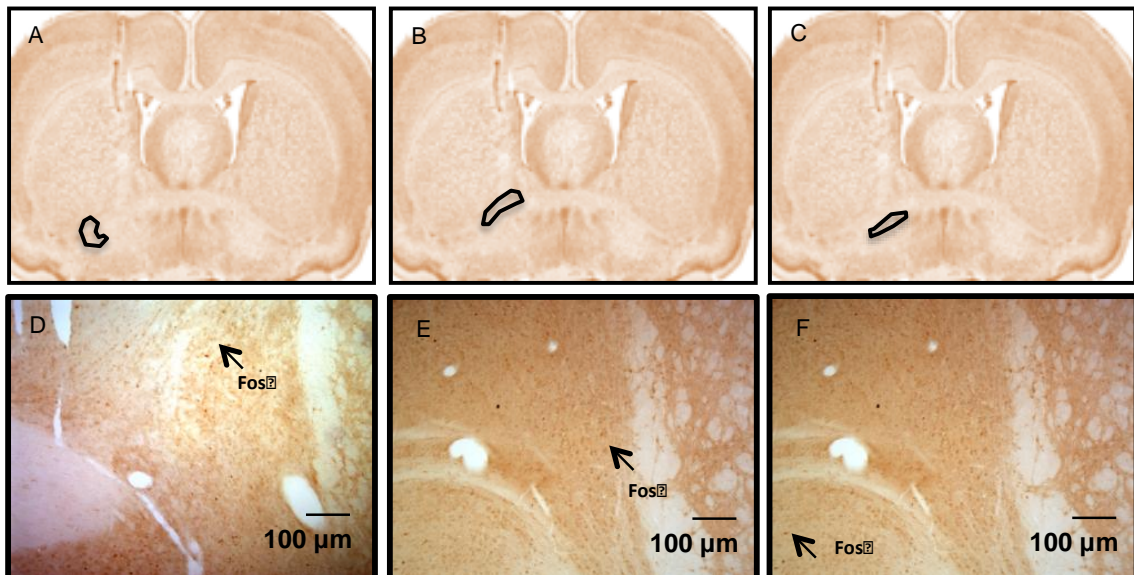


Figura 5.34 - Cortes do núcleo intersticial da estria terminal demonstrando as regiões justa capsular (A), lateral posterior (B) e lateral anterior (C), onde foram quantificadas as células positivas para a proteína Fos. A figura mostra também a imunomarcação para de Fos nas regiões da justa capsular (D), lateral posterior (E) e lateral anterior (F) do núcleo intersticial da estria terminal (aumento de 12,5X e 50X).

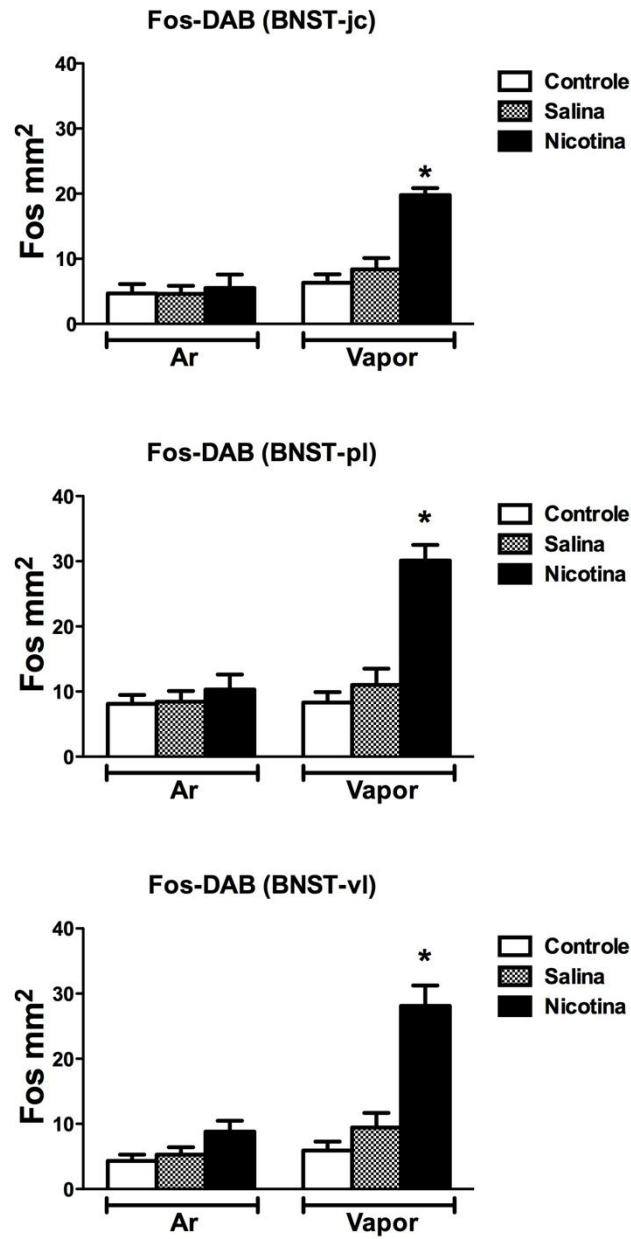


Figura 5.35 - Contagem de células positivas para proteína Fos (mm^2) em diferentes regiões do núcleo intersticial da estria terminal. Os histogramas representam média \pm EPM (N = 6-8 animais por grupo). O valor de células positivas para cada animal representa a média de 4 hemisférios. * $p < 0,05$ comparado aos demais grupos.

5.4.4.1.5 Área Tegmental Ventral

Na área tegmental ventral o tratamento simultâneo com nicotina e exposição ao vapor de etanol aumentou significativamente a expressão de Fos na região posterior, quando comparado aos outros grupos [vapor: $F(1,28)=7,66;p<0,05$; tratamento: $F(2,28)=58,92;p<0,05$; interação: $F(2,28)=38,21;p<0,05$]. Nenhuma diferença entre os grupos foi observado na região anterior.

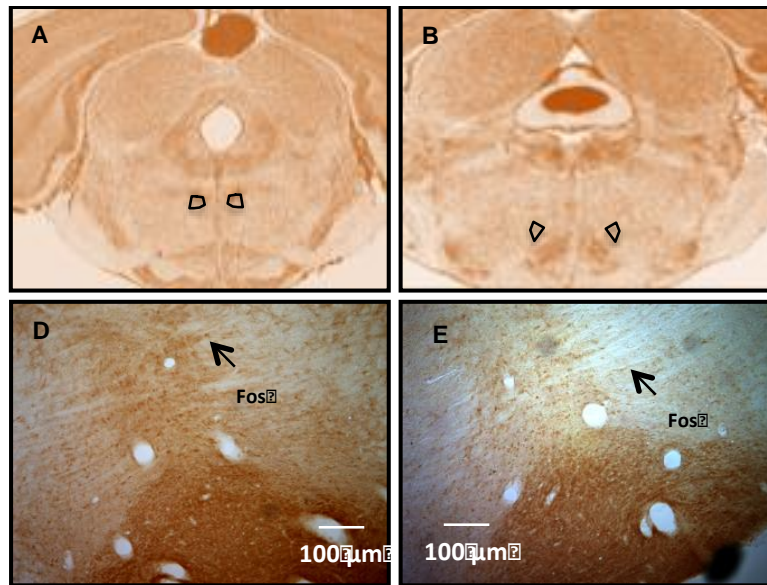


Figura 5.36 - Cortes da área tegmental ventral demonstrando as regiões posterior (**A**) e anterior (**B**), onde foram quantificadas as células positivas para a proteína Fos. A figura mostra também a imunomarcacão para de Fos nas regiões posterior (**D**) e anterior (**E**) da área tegmental ventral (aumento de 12,5X e 50X).

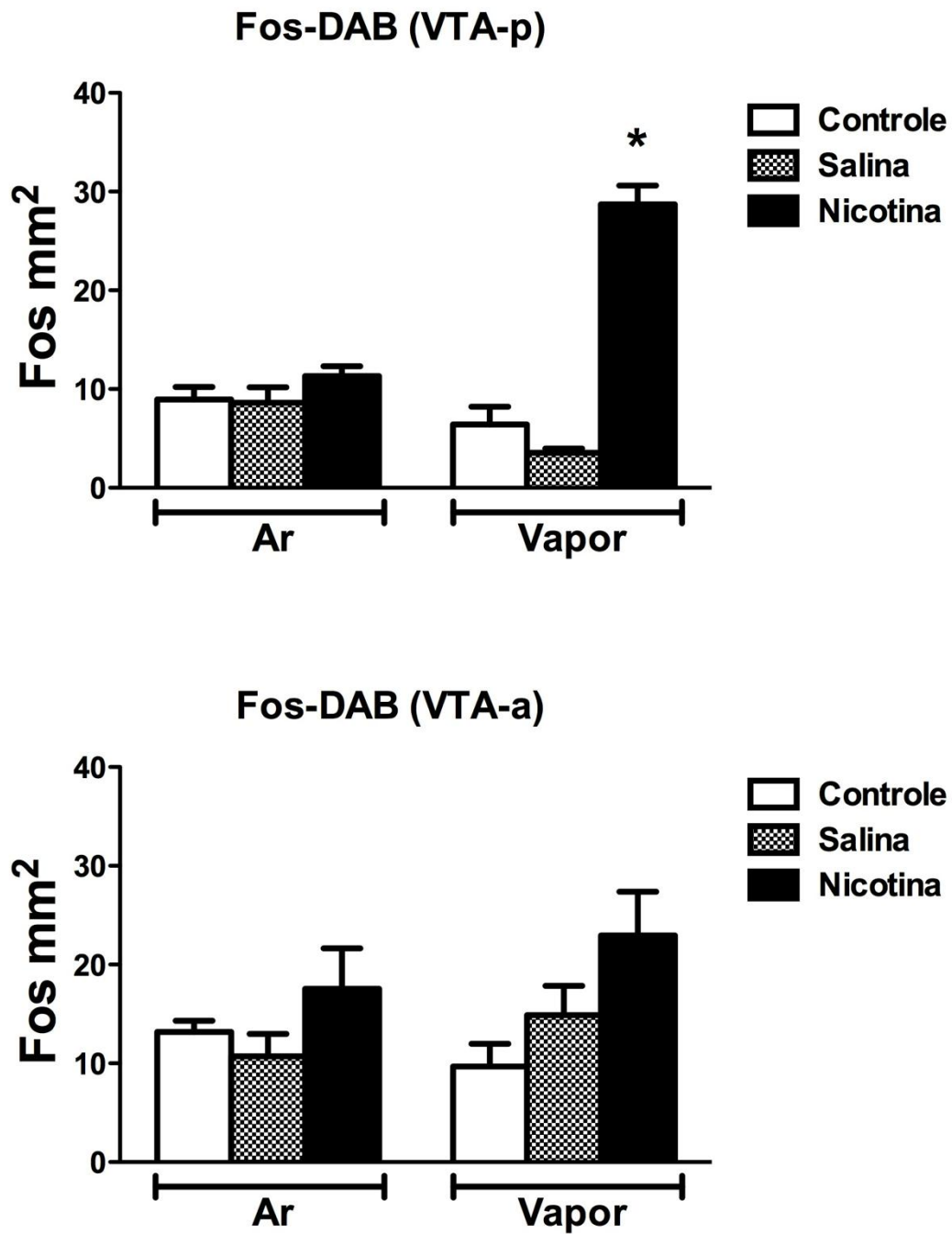


Figura 5.37 - Contagem de células positivas para proteína Fos (mm^2) em diferentes regiões da área tegmental ventral. Os histogramas representam média \pm EPM (N = 6-8 animais por grupo). O valor de células positivas para cada animal representa a média de 4 hemisférios. * $p < 0,05$ comparado aos demais grupos.

5.4.4.2 Porcentagem de Ativação Neuronal (Dupla Marcação Fos e NeuN)

Embora o encéfalo possui inúmeros neurônios, estudos imunohistoquímicos demonstram que apenas uma pequena população de neurônios esparsamente distribuídos em diferentes áreas encefálicas podem mediar comportamentos associativos relacionados com o consumo de substâncias de abuso (BOSSERT et al., 2011). Assim, nesse experimento analisamos a porcentagem de células que realmente foram ativadas nas diferentes áreas e que possam estar relacionadas ao aumento e resistência no consumo de etanol induzido pela interação nicotina e etanol em animais dependentes ao etanol.

Através dessa metodologia observamos para o grupo vapor-nicotina a seguinte porcentagem de ativação após a autoadministração de etanol: 7,6% no córtex pré-frontal dorsomedial; 7,4% no centro do núcleo acúmbens; 4,1% no núcleo intersticial da estria terminal; 3,5% na amígdala central e 6,15% na basolateral e 13,25% área tegmental ventral posterior. Os valores para os outros grupos podem ser observados na tabela 5.1.

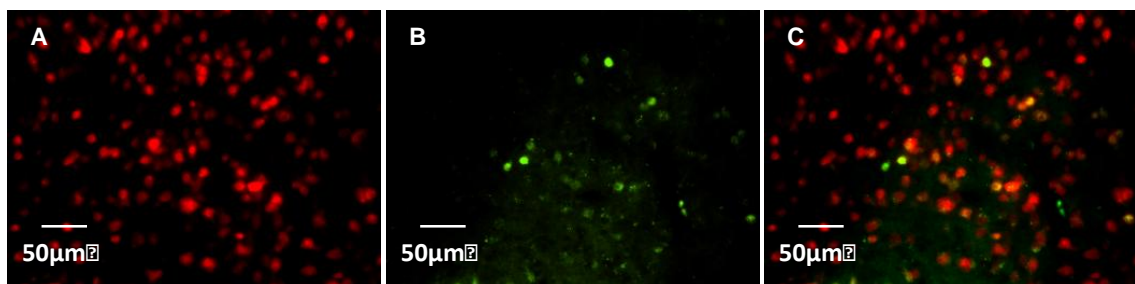


Figura 5.38 - Cortes ilustrativos mostrando a dupla marcação (C) de Neun (A) e Fos (B) aumento de 100X.

Tabela 5.1 - Porcentagem de ativação neural induzida pela interação entre etanol e nicotina em ratos dependentes ao etanol (vap) e controles (ar). Os valores representam a média \pm EPM da porcentagem ($n = 3$ animais por grupo) de células ativadas em diferentes áreas encefálicas: córtex pré-frontal dorsomedial (CPF-dm); centro do núcleo acumbens (NAc-C); núcleo intersticial da estria terminal (BNST); amígdala central (Am-Ce) e basolateral (Am-BL) e área tegmental ventral posterior (VTA-p).

| Grupos | CPF-dm | NAc-C | BNST | Am-Ce | Am-BL | VTA-p |
|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-----------------|
| Ar-controle | 1,8 \pm 0,1 | 2,6 \pm 0,1 | 0,7 \pm 0,1 | 1,4 \pm 0,6 | 2,1 \pm 0,2 | 4,6 \pm 0,7 |
| Ar-salina | 2,2 \pm 0,2 | 3,5 \pm 0,4 | 1,4 \pm 0,1 | 1,4 \pm 1,1 | 1,9 \pm 0,2 | 6,1 \pm 0,1 |
| Ar-nicotina | 1,7 \pm 0,1 | 3,9 \pm 0,2 | 2,5 \pm 0,2 | 1,1 \pm 0,2 | 1,7 \pm 0,1 | 13,5 \pm 2,0 |
| Vap-controle | 1,9 \pm 0,2 | 2,5 \pm 0,5 | 1,0 \pm 0,1 | 0,3 \pm 0,3 | 1,1 \pm 0,1 | 4,6 \pm 0,2 |
| Vap-salina | 1,6 \pm 0,1 | 3,0 \pm 0,5 | 2,3 \pm 0,2 | 0,9 \pm 0,2 | 1,5 \pm 0,4 | 7,7 \pm 1,0 |
| Vap-nicotina | 7,6 \pm 1,4 | 7,4 \pm 0,9 | 4,1 \pm 0,1 | 3,5 \pm 0,6 | 6,2 \pm 0,6 | 13,25 \pm 2,5 |

5.4.4.3 Análise do Fenótipo dos Neurônios Positivos para Fos (Dupla Marcação Fos e CamkII ou TH ou GAD67)

Nesse experimento analisamos o fenótipo das células imuno reativas para Fos. Essa análise é importante pois nos permitirá, em experimentos futuros, fazer uma intervenção farmacológica específica considerando o fenótipo das células envolvidas na interação entre etanol e nicotina. Para essa análise utilizamos marcadores celulares específicos como descrito no item 3.12. Como no experimento anterior, nós analisamos somente as áreas que mostraram aumento na expressão de Fos no grupo vapor-nicotina em relação aos demais grupos.

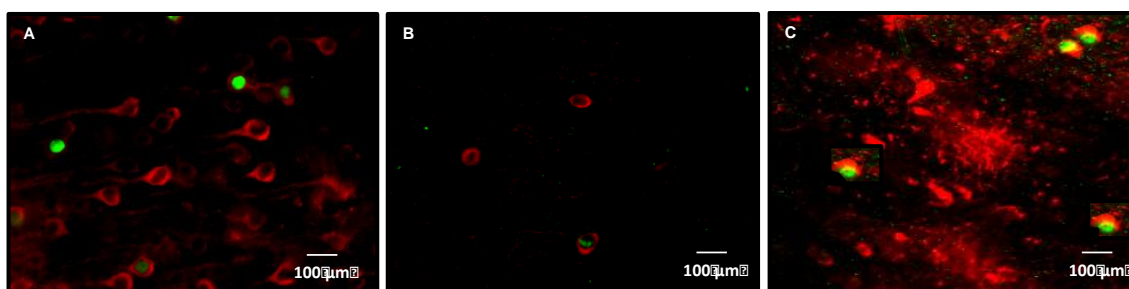


Figura 5.39 - Cortes ilustrativos mostrando a dupla marcação para Fos e CamkII (A), GAD67 (B) e TH (C) aumento de 100X.

5.4.4.3.1 Córtex Pré-Frontal Dorsomedial

Para o grupo vapor-nicotina no córtex pré-frontal dorsomedial a maioria das células ativadas após a autoadministração de etanol foram neurônios glutamatérgicos (CamKII positivas) 54,6% e em menor parte gabaérgicos, 27,8% (GAD65 positivas).

Tabela 5.2 - Fenótipo de neurônios que foram ativados durante a autoadministração de etanol em ratos dependentes e controles no córtex pré-frontal dorsomedial. O valores representam a média \pm EPM da porcentagem (n = 3 animais por grupo) de células duplamente marcadas para Fos e CamKII ou GAD67.

| Grupos | CamKII | GAD67 |
|--------------|------------------|-----------------|
| Ar-controle | 21,6 \pm 7,1 | 52,8 \pm 8,2 |
| Ar-salina | 20,6 \pm 3,7 | 36,4 \pm 6,2 |
| Ar-nicotina | 27,7 \pm 7,7 | 27,2 \pm 5,6 |
| Vap-controle | 5,9 \pm 5,7 | 30,37 \pm 7,5 |
| Vap-salina | 20,28 \pm 2,0 | 30,62 \pm 6,6 |
| Vap-nicotina | 54,58 \pm 1,55 | 27,86 \pm 3,6 |

5.4.4.3.2 Núcleo Acúmbens

Para o grupo vapor-nicotina no núcleo acúmbens na porção central do total de células ativadas após a autoadministração de etanol 71,1% foram neurônios gabaérgicos (GAD67 positivas).

Tabela 5.3 - Fenótipo de neurônios que foram ativados durante a autoadministração de etanol em ratos dependentes e controles no núcleo acumbens na porção central. O valores representam a média \pm EPM da porcentagem (n = 3 animais por grupo) de células duplamente marcadas para Fos e GAD67.

| Grupos | GAD67 |
|--------------|-----------------|
| Ar-controle | 77,7 \pm 10,9 |
| Ar-salina | 46,29 \pm 9,1 |
| Ar-nicotina | 49,3 \pm 6,8 |
| Vap-controle | 50,1 \pm 20,5 |
| Vap-salina | 36,1 \pm 15 |
| Vap-nicotina | 71,1 \pm 6,9 |

5.4.4.3.3 Núcleo Intersticial da Estria Terminal

Para o grupo vapor-nicotina no núcleo intersticial da estria terminal do total de células ativadas após a autoadministração de etanol 17,1% foram neurônios gabaérgicos (GAD67 positivas).

Tabela 5.4 - Fenótipo de neurônios que foram ativados durante a autoadministração de etanol em ratos dependentes e controles no núcleo intersticial da estria terminal. O valores representam a média \pm EPM da porcentagem (n = 3 animais por grupo) de células duplamente marcadas para Fos e GAD67.

| Grupos | GAD67 |
|--------------|-----------------|
| Ar-controle | 11,0 \pm 1,1 |
| Ar-salina | 27,5 \pm 18,7 |
| Ar-nicotina | 29,8 \pm 9,9 |
| Vap-controle | 8,5 \pm 8,2 |
| Vap-salina | 20,8 \pm 6,36 |
| Vap-nicotina | 17,1 \pm 3,2 |

5.4.4.3.4 Área Tegmental Ventral

Para o grupo vapor-nicotina na área tegmental ventral posterior do total de células ativadas após a autoadministração de etanol 62,5% foram neurônios gabaérgicos (GAD67 positivas) e 36,4% dopaminérgicas (TH positivas).

Tabela 5.5 - Fenótipo de neurônios que foram ativados durante a autoadministração de etanol em ratos dependentes e controles área tegmental ventral posterior. Os valores representam a média \pm EPM da porcentagem ($n = 3$ animais por grupo) de células duplamente marcadas para Fos e GAD67 ou TH.

| Grupos | GAD67 | TH |
|--------------|-----------------|-----------------|
| Ar-controle | 17,4 \pm 3,9 | 18,4 \pm 1,7 |
| Ar-salina | 23,8 \pm 10,4 | 18,4 \pm 10,2 |
| Ar-nicotina | 35,7 \pm 16,1 | 26,8 \pm 4,6 |
| Vap-controle | 8,6 \pm 8,1 | 2,2 \pm 4,6 |
| Vap-salina | 41,6 \pm 20,4 | 19,32 \pm 3,4 |
| Vap-nicotina | 62,5 \pm 6,2 | 36,4 \pm 3,1 |

6 DISCUSSÃO

Um desafio para clínicos e pesquisadores é a identificação dos riscos associados à perda do controle do uso de drogas (BLUM et al., 2012; GAWIN, 1991; SÁNCHEZ-HERVÁS; LLORENTE DEL POZO, 2012; SEHGAL; MANCHIKANTI; SMITH, 2012). Entre os inúmeros fatores de risco associados ao desenvolvimento da dependência tem sido dada uma atenção especial para a influência da exposição ao estresse e ao uso concomitante de diferentes substâncias de abuso. E com o objetivo de contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos na interação do uso de drogas e fatores de risco no presente estudo avaliamos os efeitos do estresse e ou a exposição prévia à cocaína na autoadministração de nicotina e o efeito da exposição prévia e simultânea da nicotina na autoadministração de etanol.

Para tornar a discussão mais didática, ela foi dividida em itens de acordo com o delineamento experimental.

6.1 Efeito da Exposição Prévia ao Estresse Variável na Autoadministração de Nicotina e Análise das Neuroadaptações no Córtex Pré-frontal Medial, Núcleo Acúmbens e Amígdala.

Existem evidências de que a exposição repetida ao estresse é um dos fatores de risco para iniciação do uso e conseqüente desenvolvimento da dependência à nicotina (BRUIJNZEEL, 2012; HUNTER, 2012; O'BRIEN, 2011).

Estudos pré-clínicos demonstram que a exposição repetida a diferentes tipos de estresse, como choque nas patas, imobilização, natação forçada ou estresse social, provocam aumento da resposta locomotora à administração subsequente de anfetamina ou cocaína, caracterizando a sensibilização locomotora cruzada entre estresse e essas drogas (ANTELMAN et al., 1980; ARAUJO et al., 2003; BADIANI; CABIB; PUGLISI-ALLEGRA, 1992; DEROCHE et al., 1992; HAILE; GRANDPRE; KOSTEN, 2001; MICZEK et al., 1999; REID; HO; BERGER, 1998).

Nossos resultados demonstraram que a exposição ao estresse variável aumentou a atividade locomotora dos animais em resposta a administração aguda de nicotina (0,4 mg/Kg; s.c.) quando comparado aos animais controle. Estes resultados corroboram observações prévias do nosso laboratório, que demonstraram que a exposição repetida ao estresse de imobilização aumentou a atividade locomotora dos animais após a injeção de nicotina (CRUZ; DELUCIA; PLANETA, 2008; ZAGO et al., 2012). Além disso, são similares a dados da literatura que mostram que a exposição repetida ao estresse psicológico promove sensibilização cruzada com a nicotina (KITA et al. 1999).

Entretanto, Faraday et al. (2003) demonstraram que ratos pré-expostos ao estresse de imobilização por 20 minutos diários durante 10 dias não mostraram aumento na resposta locomotora à nicotina. No mesmo sentido, McCormick e Ibrahim (2007) mostraram que o estresse de isolamento social não causou efeito sobre a atividade locomotora induzida pela nicotina.

Esses resultados sugerem que a natureza e previsibilidade do estímulo aversivo são fatores importantes quando se considera a influência do estresse sobre os efeitos comportamentais da nicotina. Vários estudos sugerem que as diferentes respostas a diferentes tipos de estímulos estressores podem ser mediadas por variações nas respostas adaptativas do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (AGUILERA, 1998; CRUZ et al., 2012; PITMAN; OTTENWELLER; NATELSON,

1990). Por exemplo, foi demonstrado que ratos adultos submetidos ao estresse repetido de imobilização exibem tolerância na resposta do eixo HPA a futuras exposições a esse mesmo tipo de estresse (MAGARIÑOS; MCEWEN, 1995). Por outro lado, a exposição a um protocolo de estresse variado, promoveu sensibilização da resposta desse eixo (MAGARIÑOS; MCEWEN, 1995). Em relação a interação entre o eixo HPA e nicotina, trabalhos prévios de nosso laboratório sugerem que a corticosterona é um importante mediador da resposta locomotora à nicotina (CRUZ, DELUCIA; PLANETA, 2005). Neste mesmo sentido, trabalhos tem demonstrado que o estresse pode modular atividade do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico e promover sensibilização locomotora cruzada devido aos efeitos da corticosterona sobre esse sistema (PIAZZA; LE MOAL, 1998). Porém, os mecanismos de ação da corticosterona sobre esse sistema ainda não foram totalmente elucidados. Considerando as evidências acima poderíamos supor que as adaptações desse eixo promovidas pelo estresse poderiam mediar a resposta locomotora à nicotina.

De acordo com Robinson e Berridge (1993, 2000, 2001), a sensibilização comportamental reflete alterações moleculares no sistema nervoso central que aumentaria a vulnerabilidade ao desenvolvimento da dependência. Assim, nossos resultados sugerem que a exposição repetida ao estresse pode aumentar a vulnerabilidade ao desenvolvimento de dependência à nicotina. E ainda, segundo esses autores, a sensibilização está relacionada ao aumento da motivação para o uso de drogas.

No presente estudo, demonstramos que a exposição ao estresse variável, além de promover sensibilização cruzada com nicotina, causa aumento no ponto de ruptura, observado pelo aumento no número de respostas, reforços e na última razão alcançada (ponto de ruptura) quando comparado com os animais do grupo controle. O presente estudo é o primeiro a demonstrar os efeitos do estresse sobre a motivação para busca de nicotina no modelo de autoadministração operante.

Nossos resultados estão em acordo com estudos da literatura utilizando outras substâncias. Por exemplo, Shaham e Stewart (1994) demonstraram aumento do ponto de ruptura para heroína em ratos que foram expostos previamente a choque nas patas. No mesmo sentido, foi demonstrado que animais expostos ao estresse de derrota social que apresentavam sensibilização comportamental também mostraram aumento do ponto de ruptura à cocaína (CONVINGTON; MICZEK, 2001).

De acordo com a literatura, o ponto de ruptura reflete a motivação do animal para autoadministrar uma substância de abuso (DEPOORTERE; LI; LANE, 1993; HODOS, 1961; RICHARDSON; ROBERTS, 1996). Assim, nossos resultados sugerem que a exposição ao estresse pode aumentar a motivação para o uso de nicotina, como proposto pela teoria da sensibilização do incentivo.

Além de promover aumento na motivação para o uso de drogas, alguns autores demonstram correlação positiva entre exposição a estresse e aumento do consumo de substâncias psicoativas (DEMBO et al. 1988a, b; KOSTEN et al. 1986; SINHA, 2001). Nesse sentido, observamos que os animais submetidos ao protocolo de estresse apresentaram aumento do consumo de nicotina no procedimento de acesso livre prolongado (24 horas de acesso à nicotina), quando comparados ao grupo controle. Novamente, nosso estudo é o primeiro a demonstrar o efeito da exposição a estresse sobre o consumo prolongado de nicotina em roedores.

Esses resultados estão em acordo com outros da literatura, demonstrando que a exposição prévia ao estresse aumenta o consumo de substâncias psicoativas (CONVINGTON; MICZEK, 2001; GOEDERS; GUERIN 1994; HANEY et al., 1995; KOSTEN; MISERENDINO; KEHOE, 2000; MICZEK; MUTSCHLER, 1996; PIAZZA et al. 1990; RAMSEY; VAN REE, 1993; SHAHAM; STEWART, 1994). Por exemplo, Convigton et al. (2005) demonstram que ratos pré-expostos ao estresse de derrota social autoadministravam quantidades significativamente maiores de cocaína durante uma sessão de 24 horas de acesso contínuo à substância em relação aos animais controle. Além disso, estão de acordo com observações clínicas que demonstram que exposição a eventos de estresse aumenta o número de cigarros fumados (KASSEL; STROUD; PARONIS, 2003; NIAURA et al., 2002).

Entre os dados obtidos no protocolo de autoadministração de nicotina destacam-se também os referentes ao consumo de sacarose. Estes resultados mostram que o estresse não altera o consumo deste reforçador natural, indicando assim que as alterações promovidas pelo estresse são específicas para a nicotina.

O efeito do estresse no aumento da motivação e do consumo de substâncias de abuso é associada com plasticidades no sistema mesocorticolímbico (NESTLER, 2005; THOMAS; KALIVAS; SHAHAM, 2008). Assim, investigamos se a exposição ao estresse variável poderia causar modificações pós-sinápticas no sistema mesocorticolímbico, que poderiam estar relacionadas ao aumento da motivação e consumo de nicotina.

Nossos resultados demonstraram que a exposição ao estresse variável diminuiu a quantidade de CREB total e conseqüentemente a atividade dessa proteína (como evidenciado pela redução de CREB fosforilado, sua forma ativa) no núcleo acúmbens. Estes resultados corroboram outros da literatura, que demonstram a diminuição de CREB fosforilado no estriado ventral após a exposição ao estresse crônico e variado (LAIFENFELD et al., 2005; TRENTANI et al., 2002).

Entretanto, a literatura é controversa em relação às alterações na atividade de CREB promovida pelo estresse, assim o aumento ou diminuição da atividade deste fator de transcrição pode ser observado dependendo do protocolo de estresse utilizado (BARROT et al., 2005; MUSCHAMP et al., 2011). Por exemplo, enquanto Pliakas et al. (2001) mostraram que a exposição ao estresse de nado forçado aumentou a atividade de CREB na concha do núcleo acúmbens, Wallace et al. (2009) mostraram que exposição ao isolamento social promoveu diminuição da atividade de CREB nessa mesma região.

No córtex pré-frontal medial, o estresse aumentou CREB total e diminuiu sua forma fosforilada nos grupos tratados com salina e nicotina. Estes resultados estão de acordo com outros apresentados na literatura, por exemplo, Lin et al. (2008) utilizando a técnica de imunohistoquímica, observaram que a exposição, aguda ou crônica, a choque nas patas reduziu significativamente o número de células que expressavam p-CREB no CPFm. No mesmo sentido, Yap et al., (2009) demonstraram que a exposição ao estresse de derrota social diminuiu a concentração de p-CREB no CPFm.

Alguns autores mostraram que o aumento da atividade de CREB em regiões mesolímbicas está relacionado com a diminuição do efeito reforçador de psicoestimulantes. Por exemplo, foi observado que o aumento da expressão e atividade de CREB no núcleo acúmbens dificulta a aquisição da preferência condicionada por lugar induzida por morfina ou cocaína (BARROT et al., 2002; CARLEZON et al., 1998). Também foi demonstrado que o aumento na atividade desse fator de transcrição no estriado diminuiu a motivação do animal para autoadministrar cocaína (HOLLANDER et al., 2010).

Por outro lado, foi observado que o aumento da expressão de mCREB, uma forma mutante desta molécula que diminui a atividade de CREB no núcleo acúmbens, acentua a preferência condicionada por lugar induzida por morfina ou cocaína (BARROT et al., 2002).

De acordo com as observações acima e com os resultados do presente estudo, poderíamos supor que a diminuição da expressão de CREB no núcleo acúmbens, após a exposição ao estresse variável, poderia ser responsável, pelo menos em parte, pelo aumento do ponto de ruptura (motivação) e consumo de nicotina.

Nossos resultados mostraram também que no núcleo acúmbens e na amígdala a administração de nicotina reduziu p-CREB nos animais controles. Estes resultados contrastam com outros da literatura, que demonstram que a administração aguda de nicotina não altera a concentração de p-CREB nessas regiões (BRUNZELL et al.; 2003; PANDEY et al., 2001; PLUZAREV; PANDEY, 2004). Entretanto, nesses estudos foi utilizada uma dose maior de nicotina (2,0 mg/kg), espécie diferente de animal (camundongos) e diferente via de administração (oral), quando comparado ao nosso protocolo.

Estudos demonstraram que ERK pode estar envolvido na mediação de alguns efeitos comportamentais de psicoestimulantes (MILLER; MARSHALL 2005; VALJENT et al., 2006). Por exemplo, foi demonstrado que a administração intraperitoneal de inibidores de ERK (SL327) bloqueou a sensibilização locomotora e a indução de preferência condicionada por lugar à cocaína (VALJENT et al., 2006). Embora esses estudos mostrem a relevância de ERK em comportamentos associados à dependência, nosso estudo não demonstrou alterações significativas na atividade dessa cinase nas áreas estudadas. Porém, mais estudos são necessários para a análise do papel de ERK sobre os parâmetros da autoadministração de nicotina.

6.2 Efeito da Administração Prévia de Cocaína na Autoadministração de Nicotina e Análise da Expressão Gênica no Núcleo Acúmbens.

Estudos clínicos demonstram a relação entre o uso de tabaco e o consumo de psicoestimulantes (MARTÍNEZ-ORTEGA et al., 2006). Neste sentido, foi demonstrado que a intensidade da dependência ao tabaco correlaciona-se positivamente com a frequência de uso de cocaína (GARRETT; GRIFFITHS, 2001). Embora essa interação seja relevante, pouco se conhece sobre os mecanismos neurobiológicos subjacentes a esta relação.

No presente estudo avaliamos se a administração prévia de cocaína poderia promover sensibilização locomotora à cocaína e sensibilização cruzada com

nicotina. Avaliamos também, se esse pré-tratamento com cocaína poderia aumentar a autoadministração intravenosa de nicotina e se os fenômenos comportamentais dessa interação poderiam estar correlacionados às alterações da expressão dos genes DYN, mu opioid, NPY, BDNF, TrkB e CRF-R1.

Nossos resultados demonstraram que a administração repetida de cocaína resultou em sensibilização locomotora a essa substância e promoveu sensibilização cruzada com nicotina.

Esses resultados estão de acordo com outros estudos que mostram que administração repetida de cocaína causa sensibilização locomotora (BROWN et al., 2011; MARIN et al., 2009; MARIN; CRUZ; PLANETA, 2008; WUO-SILVA et al., 2011). Por exemplo, foi demonstrado que a administração diária por 5 dias de cocaína (15 mg/kg; i.p.), promoveu sensibilização comportamental em ratos adultos (KOYA et al., 2012; MARIN et al., 2009).

Um resultado importante obtido em nosso estudo foi a observação da sensibilização locomotora cruzada entre cocaína e nicotina. Nossos resultados estão de acordo com estudos que indicam que administração repetida de anfetamina, também um psicostimulante, aumenta o efeito locomotor de nicotina (COLLINS; MONTANO; IZENWASSER, 2004; SANTOS et al., 2009). Entretanto, Levine et al. (2011) mostraram em camundongos que o pré-tratamento com cocaína não sensibiliza a resposta locomotora à nicotina. A ausência de consenso entre nossos resultados e os resultados de Levine et al. (2011) pode ser devido a algumas diferenças entre os protocolos, tais como: espécie utilizada (ratos vs camundongos), dose de nicotina (0,4 mg/Kg vs 50 µg/ml de água) e via de administração (i.p. vs oral). Nosso resultado é o primeiro a demonstrar que o pré-tratamento com cocaína promove sensibilização locomotora cruzada com nicotina em ratos.

Considerando que a sensibilização comportamental reflete alterações moleculares e celulares envolvidas com a motivação para o consumo de drogas (MOUSSAWI et al., 2009; ROBINSON; BERRIDGE, 2000, 2001, 2008), investigamos se a sensibilização locomotora cruzada induzida entre cocaína e nicotina poderia alterar os parâmetros da autoadministração de nicotina.

Embora, o tabaco mostre um potencial alto de induzir dependência em humanos, em modelos animais o efeito reforçador é considerado fraco e a aquisição da autoadministração de nicotina por roedores é bastante difícil (ROBINSON; PRITCHARD, 1992). Entretanto, observamos que o pré-tratamento com cocaína

facilitou a aquisição da autoadministração de nicotina quando comparado ao grupo salina (número de animais que não aprenderam a autoadministrar nicotina: 1 animal cocaína vs 4 animais salina, dados não apresentados).

Observamos também que administração prévia de cocaína aumentou o ponto de ruptura para a autoadministração de nicotina. A interação entre nicotina e cocaína também foi evidenciada em outros estudos demonstrando que a exposição prévia à nicotina também aumentou o ponto de ruptura à cocaína (BECHTHOLT; MARK, 2002; LEVINE et al., 2011). Embora o efeito da administração prévia de nicotina sobre o efeito reforçador da cocaína já tenha sido demonstrado por outros laboratórios, nosso estudo é o primeiro a observar que o pré-tratamento com cocaína pode aumentar a motivação para o consumo de nicotina.

Observamos também que animais do grupo cocaína demonstraram aumento na autoadministração de nicotina, quando comparado ao grupo salina, durante o protocolo experimental de acesso livre prolongado de 24 horas.

Da mesma forma, estudos demonstraram que macacos Rhesus autoadministraram mais nicotina quando essa substância foi associada com cocaína (FREEMAN; WOOLVERTON, 2009; MELLO; NEWMAN, 2011). A mesma interação foi demonstrada para metilfenidato, outra substância psicoestimulante (HENNINGFIELD; GRIFFITHS, 1981). Esses resultados sugerem que o uso de nicotina ou cocaína pode promover plasticidades neurais semelhantes, aumentando o potencial de reforço ou causando tolerância aos efeitos da outra substância.

Alterações na autoadministração de nicotina tem sido relacionadas a plasticidades no sistema mesocorticolímbico (ADDY; PICCIOTTO, 2013; PICCIOTTO; KENNY, 2013). Além disso, a administração repetida de psicostimulantes pode causar modificações na expressão gênica no sistema mesocorticolímbico relacionados ao aumento do consumo de substâncias de abuso (NESTLER, 2005).

Assim, investigamos se a administração repetida de cocaína seguida pela autoadministração intravenosa de nicotina poderia causar alterações da expressão gênica no núcleo acúmbens. Observamos aumento na expressão de BDNF no NAc dos animais do grupo cocaína quando comparado aos do grupo salina. Nossos resultados estão de acordo com estudos que demonstram que exposição à cocaína ou nicotina pode alterar a expressão gênica de BDNF (BHANG; CHOI; AHN, 2010; GRAHAM et al., 2007; LIU et al., 2006; POO, 2001; ZHANG et al., 2002). Em nosso

estudo não podemos concluir se o aumento de BDNF foi devido à exposição à cocaína ou devido a exposição a ambas substâncias (cocaína e nicotina). Isto se deve ao fato da ausência de um grupo controle adicional (por exemplo, cocaína-sacarina e/ou apenas cocaína), que por motivo de limitação da quantidade disponível de cocaína, não foi possível ser adicionado ao estudo.

Estudos demonstram que a administração contingente e não-contingente de cocaína promove aumento duradouro da expressão de BDNF no núcleo acúmbens e esse efeito tem sido correlacionado com o aumento da autoadministração dessa droga (GRAHAM et al., 2007; GRIMM et al., 2003; LIU et al., 2006; ZHANG et al., 2002). No mesmo sentido, Richardson e Roberts (1996) mostraram que administração de BDNF intra-acumbal foi capaz de aumentar o ponto de ruptura de cocaína. Similarmente, estudos clínicos demonstram aumento da concentração plasmática de BDNF em fumantes (BHANG; CHOI; AHN, 2010).

Da mesma forma, foi demonstrado que administração diária de nicotina foi capaz de aumentar a concentração de BDNF no núcleo acúmbens e esse efeito foi correlacionado com o aumento do consumo de nicotina por roedores (CORRELL et al., 2009; KIVINUMMI et al., 2011).

Considerando as observações acima e nossos resultados poderíamos sugerir que o aumento na autoadministração de nicotina resultante de pré-exposição à cocaína estaria correlacionado com o aumento de BDNF no NAc. Entretanto, devemos salientar que neste estudo avaliamos a expressão gênica de BDNF e nem todo RNAm transcrito é efetivamente traduzido em proteína. Assim, estudos adicionais (western blotting, antagonistas de TrkB no NAc) devem ser realizados.

Embora muitos estudos mostrem que o efeito de BDNF sobre o consumo de substâncias de abuso ocorrem devido a interação com seu receptor TrkB e que administração de cocaína aumenta a expressão desse receptor (CROOKS et al., 2010), nossos resultados não evidenciaram alterações em sua expressão. Este fato pode ser devido por um efeito da autoadministração de nicotina posterior ao tratamento com cocaína.

Embora nossos resultados não revelem alterações na expressão gênica de DYN, mu opiod, NPY, TrkB e CRF-R1, outros estudos, utilizando ferramentas farmacológicas, mostraram o envolvimento dessas proteínas nos efeitos comportamentais da nicotina. Por exemplo, foi demonstrado que o bloqueio de receptores CRF-R1 diminui o consumo de nicotina em ratos (GEORGE et al., 2007).

Similarmente, foi demonstrado que o antagonismo da neurotransmissão de mu opioid diminui significativamente o número de infusões de nicotina recebidas por ratos durante sessões de autoadministração (LIU; JERNIGAN, 2011). Além dessas evidências também foi demonstrado, que a diminuição na expressão de NPY correlacionou-se com a expressão da sensibilização locomotora à nicotina (AYDIN; OZTAN; ISGOR, 2011).

6.3 Efeito da Administração Prévia de Nicotina na Autoadministração de Etanol.

Estudos mostram que a maioria dos dependentes de etanol é fumante e que, os não dependentes que fumam, consomem mais etanol do que os não fumantes (KAO; SCHNEIDER; HOFFMAN, 2000; SULLIVAN; COVEY, 2002). Embora vários autores já demonstraram clinicamente a importância da nicotina na dependência ao etanol, poucos estudos experimentais foram desenvolvidos para o estudo da neurobiologia desta interação. Nesse sentido, investigamos o efeito do pré-tratamento com nicotina na autoadministração operante de etanol.

Nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento com nicotina aumentou os comportamentos relacionados com ansiedade e os parâmetros de autoadministração de etanol em ratos.

Ansiedade é um dos sintomas mais frequentemente evidenciados durante a abstinência de nicotina (KASSEL; UNROD, 2000). No presente estudo, demonstramos que ratos tratados cronicamente com nicotina (1.0 mg/Kg; s.c.; 3x ao dia por 10 dias) apresentaram diminuição na porcentagem do tempo gasto e da frequência de entradas nos braços abertos, caracterizando aumento nos comportamentos relacionados à ansiedade. Nossos resultados estão de acordo com outros da literatura que mostram que administração crônica de nicotina causa efeitos ansiogênicos em ratos (BIALA; BUDZYNSKA, 2006; IRVINE et al., 2001).

Outros estudos demonstram que a administração crônica de nicotina pode produzir efeitos ansiolíticos (BRIONI et al., 1993, 1994; CAO et al., 1993; COSTALL et al., 1989; FILE; KENNY; OUAGAZZAL, 1998) ou ansiogênicos (FILE; KENNY; OUAGAZZAL, 1998; OUAGAZZAL; KENNY; FILE, 1999) dependendo da dose, via de administração e espécie de animais utilizados (IRVINE et al., 2001). Por exemplo, a administração de doses menores ($0,01 \pm 0,1$ mg/kg) pode produzir efeitos

ansiolíticos, enquanto a administração de doses elevadas (0,5 e 1 mg/kg) causa efeitos ansiogênicos (FILE; KENNY; OUAGAZZAL, 1998).

Ansiedade é um sintoma comum de abstinência para a maioria das drogas, incluindo o etanol (GILPIN, 2012). Nesse sentido, estudos demonstram que indivíduos dependentes ao etanol apresentam aumento dos níveis de ansiedade durante a síndrome de abstinência aguda e protraída (VALDEZ et al., 2002, 2003).

Várias evidências demonstram associação entre ansiedade e consumo de etanol (FUNK et al., 2006; HANSSON et al., 2007; LEE; GREELY; OEI, 1999; MARINELLI et al., 2007; PANDEY; ROY; ZHANG, 2003). Por exemplo, aumento de comportamentos associados à ansiedade foram observados em ratos que apresentam preferência aumentada ao etanol (CICCOCIOPPO et al., 2006). Foi demonstrado, também, que animais considerados geneticamente ansiosos mostram maior preferência e consumo de etanol (IZÍDIO; RAMOS, 2007). Ao contrário, quando os níveis de ansiedade são reduzidos, por meio de uma intervenção farmacológica (administração de benzodiazepínicos), esses animais reduzem o consumo dessa substância (RASSNICK et al., 1993).

Em nosso estudo, o aumento nos comportamentos relacionados à ansiedade está relacionado ao aumento do ponto de ruptura e do consumo de etanol nas sessões operantes de autoadministração.

Nesse sentido, Koob (2009) propõem que a dependência ao etanol e outras drogas poderia estar associada ao aumento da ativação das vias responsáveis pelos efeitos emocionais negativos da abstinência. Estas vias compreendem a amígdala estendida, que é ativada em situações de estresse e ansiedade. Segundo esse autor, os comportamentos emocionais negativos seriam responsáveis pelo desenvolvimento do uso compulsivo das substâncias de abuso, pois a utilização das mesmas durante o período de abstinência poderia diminuir a ativação dessa via aliviando dessa forma, os sintomas desagradáveis da abstinência. Esse autor propõe ainda que estados de estresse e ansiedade aumentariam a ativação da amígdala estendida intensificando os estados negativos da abstinência, promovendo o uso compulsivo de uma substância de abuso. Dessa forma em nosso estudo, a ansiedade promovida pelo tratamento crônico com nicotina poderia colaborar para o aumento da autoadministração de etanol.

Por outro lado, a nicotina poderia aumentar o consumo de etanol devido a alterações nas propriedades de reforço e motivação para esta substância. Nesse

sentido, observamos aumento no ponto de ruptura da autoadministração de etanol nos animais pré-tratados com nicotina quando comparados ao grupo controle.

Estudos demonstram que receptores nicotínicos participam do efeito reforçador promovido pelo uso de etanol (BLOMQVIST et al. 1996; ERICSON et al. 1998; FAROOK et al. 2009; HENDRICKSON; ZHAO-SHEA; TAPPER, 2009; KAMENS; ANDERSEN; PICCIOTTO, 2010). Por exemplo, a administração de um antagonista de receptores nicotínicos (mecamilamina) na área tegmental ventral diminui a liberação de dopamina no núcleo acúmbens induzida por etanol em ratos com fenótipo de preferência ao etanol (BLOMQVIST et al., 1993; ERICSON, et al., 1998).

Recentemente, Ding et al., (2012) demonstraram que a administração repetida de nicotina intra-pVTA aumenta a liberação de dopamina na concha do núcleo acúmbens. Os estudos acima sugerem então que administração repetida de nicotina pode promover plasticidades no sistema mesocorticolímbico aumentando a sensibilidade dessa região ao etanol e promovendo aumento da motivação para o consumo dessa substância.

Nossos resultados não mostraram diferença no consumo de etanol durante o protocolo de acesso livre prolongado de 24 horas entre os animais pré-tratados com nicotina e os pré-tratados com salina. A ausência de diferença pode ser devido ao prejuízo motor ocasionado pelo efeito depressor do etanol. Assim, os animais pré-tratados com nicotina poderiam ter consumido mais etanol que os animais do grupo salina nas primeiras horas, como observado nas sessões de razão progressiva, porém com o prejuízo motor o consumo seria cessado e os animais controle conseguiriam igualar os níveis de consumo de etanol.

Entre os dados obtidos no protocolo de autoadministração de etanol destacam-se também os referentes ao consumo de sacarina. Estes resultados mostram que o pré-tratamento com nicotina não altera o consumo deste reforçador natural, indicando assim que as alterações promovidas pela nicotina são específicas para o etanol.

6.4 Efeito da Administração Simultânea de Nicotina no Desenvolvimento da Dependência ao Etanol: Identificação e Caracterização de Pequenos Grupos Neurais (Experimentos Realizados no The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA e no National Institute on Drug Abuse, Baltimore, MD, EUA)

A dependência ao etanol é caracterizada pela presença de distúrbios físicos e emocionais manifestados durante a abstinência a essa substância (GILPIN; KOOB, 2008; MAJCHROWICZ, 1975). Assim, modelos animais que preditivamente demonstrem esses sinais de abstinência são muito importantes para o entendimento dos componentes comportamentais e neurobiológicos da dependência ao etanol (LIEBER; DECARLI, 1973; MAJCHROWICZ, 1975; ROGERS; WIENER; BLOOM, 1979). Neste sentido, estudos demonstram que para que esses sinais se manifestem em modelos animais é necessário a manutenção da etanolemia constante durante a exposição crônica ao etanol (ROGERS; WIENER; BLOOM, 1979). Alguns laboratórios tem se dedicado ao desenvolvimento de modelos preditivos da síndrome de abstinência ao etanol, entre esses modelos se destaca a exposição ao vapor de etanol (LE MAGNEN; MARFAING-JALLAT, 1984; RIMONDINI et al., 2002; ZHANG et al., 2007). Esse modelo, por exemplo, tem mostrado maior validade de face, quando comparado aos demais. Por exemplo, tem sido demonstrado que acamprosato, gabapentina, baclofen, que são fármacos que em humanos atenuam os efeitos da abstinência e fissura pelo etanol, também são capazes de bloquear esses comportamentos em animais expostos ao vapor de etanol, mas não são eficazes em animais expostos a administração intermitente de etanol (BREESE; KNAPP; OVERSTREET, 2004; KNAPP; OVERSTREET; BREESE, 2007; LE MAGNEN; MARFAING-JALLAT, 1984; MASON; LEHERT, 2009; RIMONDINI et al., 2002; ROBERTO et al., 2008; WALKER; KOOB, 2007; ZHANG et al., 2007).

Assim, procurando aprimorar nossos modelos para o estudo do efeito da nicotina na dependência ao etanol, realizamos estágio de doutoramento no exterior no laboratório do Dr George Koob (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA). Dr Koob colaborou para o desenvolvimento e tem utilizado a exposição de vapor ao etanol como um modelo de dependência a essa substância por anos. Mas não havia até então utilizado esse modelo para investigar as bases neurobiológicas da interação da nicotina no desenvolvimento da dependência ao etanol.

Assim, neste item discutiremos os resultados dos experimentos

comportamentais realizados no laboratório do Dr. Koob e moleculares realizados no laboratório do Dr. Bruce Hope (National Institute on Drug Abuse, Baltimore, MD, EUA).

Evidências clínicas e pré-clínicas sugerem que indivíduos que fazem o uso simultâneo de nicotina e etanol desenvolvem mais rapidamente a dependência ao etanol. Nos últimos anos, maior atenção tem sido dedicada para a elucidação dos mecanismos neurobiológicos envolvidos nessa interação (BRAUN et al., 2012).

No presente estudo investigamos o efeito da administração simultânea de nicotina no desenvolvimento da dependência ao etanol e os aspectos neuromorfológicos dessa interação. Para tanto utilizamos o protocolo de exposição ao vapor de etanol para o desenvolvimento da dependência em ratos (GILPIN et al., 2008).

Nossos resultados demonstraram que a administração simultânea de nicotina e exposição ao vapor de etanol acelerou o fenômeno de escalada da autoadministração de etanol quando comparado com os animais do grupo vapor-salina.

Nossos resultados para os animais não expostos ao vapor de etanol revelaram aumento na autoadministração de etanol nos animais que receberam tratamento diário com nicotina, quando comparado com o grupo salina. Entretanto, esse aumento não foi na mesma magnitude apresentada pelos animais que foram expostos ao vapor de etanol.

Esses resultados sugerem que a administração de nicotina facilita o desenvolvimento da dependência ao etanol e estão de acordo com estudos clínicos que mostram o desenvolvimento de dependência mais severa ao etanol em pacientes que fazem o uso concomitante de tabaco (BATEL et al., 1995).

Entretanto, estudos em roedores são controversos em demonstrar esta relação, por exemplo, enquanto alguns estudos demonstraram aumento da autoadministração de etanol após administração repetida de nicotina (BLOMQUIST et al., 1996; LÊ et al., 2000), outros autores mostram diminuição desse consumo (SHARPE; SAMSON, 2002).

Nosso estudo foi o primeiro a utilizar o modelo de exposição ao vapor de etanol para investigar a interação entre nicotina e etanol, o que dificulta a comparação dos nossos dados e a realização de discussão mais aprofundada.

Uma possível hipótese para a facilitação do fenômeno de escalada e aumento do consumo de etanol observada no presente estudo poderia estar relacionado com aumento da motivação para a busca dessa substância. Nesse sentido, em nosso estudo observamos aumento no ponto de ruptura nos animais que receberam tratamento de nicotina (Vapor e Não Vapor) quando comparados aos animais salina. Esse aumento no ponto de ruptura foi maior no grupo de animais expostos ao vapor quando comparado com os não expostos. Novamente, esse é o primeiro trabalho a demonstrar que o aumento na motivação para a busca de etanol induzida pela nicotina é maior nos animais dependentes ao etanol.

Além da escalada e aumento da motivação para o consumo de etanol outra característica observada em dependentes à essa substância é a compulsão para o uso (VENDRUSCOLO et al., 2012). Em nosso experimento a compulsão foi avaliada através do teste de adulteração por quinino. Nossos resultados demonstraram que os animais tratados simultaneamente com nicotina e expostos ao vapor de etanol apresentaram menor redução no consumo da solução de etanol 10% adulterado com quinino nas concentrações de 0,025 e 0,05 g/L quando comparados ao grupo salina. Esses resultados sugerem que a nicotina aumentou a resistência para o consumo do etanol a despeito das consequências adversas (sabor amargo), caracterizando aumento da compulsão para o uso de etanol.

Nos animais não dependentes, as diferenças observadas no valor basal do consumo de etanol entre ambos os grupos (salina e nicotina) não permitem a avaliação da compulsividade devido ao fato de que os animais apresentem diferenças comportamentais no consumo antes da adulteração da solução de etanol 10% com quinino. Ainda para os animais não dependentes, foi observado que o grupo salina mostrou consumo mínimo de etanol durante as medidas basais (“floor effect”), dificultado assim a observação de uma possível redução do consumo da solução de etanol quando esta foi adulterada com quinino.

Embora evidências clínicas e pré-clínicas demonstrem que a exposição simultânea a nicotina possa aumentar o consumo de etanol (BLOMQVIST et al., 1996; LÊ et al., 2000), as regiões encefálicas e o fenótipo das células envolvidas nessa interação ainda não foram estudadas.

Nossos resultados demonstraram que o grupo vapor-nicotina apresentou maior expressão de Fos no CPFm dorsal, centro do NAc, AM central e basolateral, BNST e VTA posterior quando comparado com os demais grupos, sugerindo que o efeito da

administração simultânea de nicotina sobre o desenvolvimento da dependência ao etanol possa estar relacionada a plasticidades nessas regiões encefálicas.

Neste sentido, tem sido demonstrado que a ativação da amígdala estendida, esta relacionada aos comportamentos relacionados a abstinência ao etanol (KOOB, 2009; KOOB; VOLKOW, 2010). Como discutido no item anterior, a ativação desse sistema levaria ao surgimento de sintomas emocionais desagradáveis (por exemplo, ansiedade e irritabilidade), fazendo que o indivíduo, retomasse o uso da substância de abuso para evitar os efeitos da abstinência. Nesse sentido, estudos em roedores mostram que a inativação farmacológica dessas regiões pode diminuir o consumo de etanol durante o período de abstinência (GILPIN; MISRA; KOOB, 2008).

Em nosso experimento, a autoadministração de etanol foi avaliada seis horas após o início do ciclo de abstinência ao vapor de etanol. Assim, a administração de nicotina que foi realizada também durante esse período (15 minutos antes de cada sessão de autoadministração) pode ter potencializado o efeito da síndrome de abstinência através do aumento da ativação da amígdala estendida, fazendo com que os animais desenvolvessem a escalada da autoadministração de etanol mais rapidamente. Nesse sentido, existem evidências que demonstram que a administração repetida de nicotina é capaz de aumentar a ativação da amígdala estendida (PICCIOTTO; KENNY, 2013).

Por outro lado, estudos demonstram que a ativação do CPFm dorsal e VTA posterior pode promover aumento na liberação de dopamina no núcleo acúmbens aumentando a motivação e a compulsão dos animais para consumir etanol (KOOB; VOLKOW, 2010). Di Chiara, (2000) demonstraram que administração repetida de nicotina aumenta a liberação de dopamina no NAc. Assim, a facilitação da escalada da autoadministração de etanol pela administração simultânea de nicotina pode ter sido devido às plasticidades promovidas por esta substância sobre o sistema mesocorticolímbico.

Considerando as observações acima, poderíamos supor que o aumento da ativação dessas regiões encefálicas, que compõem os circuitos da recompensa e do estresse, revelado em nossos resultados, foi responsável pelo aumento da motivação dos animais do grupo vapor-nicotina para consumir etanol acelerando assim, a escalada da autoadministração dessa substância e fazendo com que esses animais apresentassem compulsão para o consumo de etanol. Reforçando esta hipótese, estudos mostraram que o antagonismo de receptores colinérgicos

nicotínicos nessas regiões bloqueia o aumento do consumo de etanol em ratos (BLOMQUIST et al., 1993; SMITH et al., 1999).

Nossos resultados demonstram que o aumento da expressão de Fos nessas regiões encefálicas no grupo vapor-nicotina está relacionada com a ativação de uma pequena porcentagem de neurônios (CPFdm = 7,6%; NAc centro = 7,4%; AM central = 3,6%; AM basolateral = 6,15%; BNST = 4,1%; VTA_p = 13,15%). Neste sentido, outros autores mostraram que apenas uma pequena porcentagem de células em diferentes áreas do sistema mesocorticolímbico são responsáveis pela expressão de comportamentos relacionados com a dependência às substâncias psicoativas (BOSSERT et al., 2011; FANOUS et al., 2012; KOYA et al., 2009, 2012). Estes trabalhos demonstram ainda que alterações moleculares relacionadas à expressão desses comportamentos ocorrem apenas nessa pequena porcentagem de células ativadas. Assim, em experimentos futuros, investigaremos se essa pequena porcentagem de células é responsável pela alteração nos comportamentos observados em nosso estudo. Para isso utilizaremos manipulação farmacogenética que tem sido desenvolvida pelo grupo do Dr. Hope (KOYA et al., 2009). Essa metodologia consiste no uso de animais transgênicos e um pro-fármaco, que nos permitirá bloquear especificamente apenas a ativação desse pequeno grupo neuronal envolvido com o comportamento em estudo.

Como a neuromorfologia da interação entre nicotina e etanol em animais dependentes ao etanol não foi demonstrado ainda na literatura decidimos investigar os fenótipos desses neurônios que foram ativados durante a nossa análise comportamental.

No CPFdm observamos que a maioria das células ativadas eram glutamatérgicas (54,58%) e gabaérgicas (27,86%), no centro do Nac a maioria foi gabaérgica (71,1%), no BNST tivemos ativação de 17,1% de neurônios gabaérgicos (porém supomos que a maioria dos neurônios ativados nessa região tenha sido CRFérgico, entretanto os resultados imunohistoquímicos que obtivemos foram inconclusivos devido à inespecificidade do anti-corpo), no VTA_p a maioria dos neurônios foram gabaérgicos (62,5%) e dopaminérgicos (36,4%). Nosso trabalho é o primeiro a descrever a neuromorfologia da interação entre etanol e nicotina utilizando animais dependentes ao etanol. Esses resultados nos permitirão realizar experimentos mais específicos que demonstrem o papel de cada neurotransmissor,

bem como de cada uma dessas áreas, na interação da nicotina no desenvolvimento da dependência ao etanol.

7 CONCLUSÃO

Concluimos em nosso estudo que:

a) a exposição ao estresse variável induziu sensibilização cruzada com nicotina, aumentou a motivação e o consumo dessa substância, e reduziu a atividade de CREB em regiões mesoencefálicas;

b) o pré-tratamento com cocaína induziu sensibilização cruzada com nicotina, aumentou a motivação e o consumo dessa substância. E ainda, aumentou a expressão gênica de BDNF no NAc;

c) o pré-tratamento com nicotina aumentou os comportamentos relacionados à ansiedade e a motivação para o consumo de etanol;

d) a administração simultânea de nicotina acelerou a escalada da autoadministração, aumentou o ponto de ruptura e a compulsividade para o consumo de etanol. E esses comportamentos podem estar relacionados a ativação da amígdala estendida e do sistema mesocorticolímbico.

Nossos resultados sugerem que fatores adicionais ao uso de uma substância de abuso como estresse e a pré-exposição a outra substância podem aumentar a vulnerabilidade ao desenvolvimento da dependência. E que esse fenômeno pode estar correlacionado à alterações moleculares duradouras nos circuitos neurais envolvidos com o efeito dessas substâncias de abuso.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDY, N. A.; PICCIOTTO, M. R. Nicotine, striatum, and reward. **Biol Psychiatry**. v. 73, n. 3, p. 205-6, 2013.

AGUILERA, G. Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and the stress response. **Trends Endocrinol Metab**. v. 9, n. 8, p. 329-36, 1998.

AHMED, S. H. The science of making drug-addicted animals. **Neuroscience**. v.211, p.107-25, 2012. Review.

AHMED, S. H.; KOOB, G. F. Long-lasting increase in the set point for cocaine self-administration after escalation in rats. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 146, n. 3, p. 303-12, 1999.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. Ed. 5, American Psychiatric Association, Washington, DC, 2013.

ANG, E. et al. Induction of nuclear factor-kappaB in nucleus accumbens by chronic cocaine administration. **J Neurochem**. v. 79, p. 221–4, 2001.

ANKER, J. J.; CARROLL, M. E. Adolescent nicotine exposure sensitizes cue-induced reinstatement of cocaine seeking in rats bred for high and low saccharin intake. **Drug Alcohol Depend**. v. 118, n. 1, p. 68-72, 2011.

ANTELMAN, S. M. et al. Interchangeability of stress and amphetamine in sensitization. **Science**. v. 207, p. 329-31, 1980.

ANTHONY, J. C.; PETRONIS, K. R. Early-onset drug use and risk of later drug problems. **Drug Alcohol Depend**. v. 40, n. 1, p. 9-15, 1995.

ARAUJO, A. P. et al. 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.

AYDIN, C.; OZTAN, O.; ISGOR, C. Vulnerability to nicotine abstinence-related social anxiety-like behavior: molecular correlates in neuropeptide Y, Y2 receptor and corticotropin releasing factor. **Neurosci Lett**. v. 490, p. 220–5, 2011.

BADIANI, A. et al. Opiate versus psychostimulant addiction: the differences do matter. **Nat Rev Neurosci**. v. 12, n. 11, p. 685-700, 2011.

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, n. 1, p. 53-60, 1992.

BAHI, A. et al. Role of accumbens BDNF and TrkB in cocaine-induced psychomotor sensitization, conditioned-place preference, and reinstatement in rats. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 199, n. 2, p. 169-82, 2008.

- BARI, A. A.; PIERCE, R. C. D1-like and D2 dopamine receptor antagonists administered into the shell subregion of the rat nucleus accumbens decrease cocaine, but not food, reinforcement. **Neuroscience**. v. 135, n. 3, p. 959-68, 2005.
- BARROT, M. et al. CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 99, n. 17, p. 11435-40, 2002.
- BARROT, M. et al. Regulation of anxiety and initiation of sexual behavior by CREB in the nucleus accumbens. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 102, n. 23, p. 8357-62, 2005.
- BATEL, P. et al. Relationship between alcohol and tobacco dependencies among alcoholics who smoke. **Addiction**. v. 90, n. 7, p. 977-80, 1995.
- BECHTHOLT, A. J.; MARK, G. P. Enhancement of cocaine-seeking behavior by repeated nicotine exposure in rats. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 162, n. 2, p. 178-85, 2002.
- BEDFORD, J. A.; BAILEY, L. P.; WILSON, M. C. Cocaine reinforced progressive ratio performance in the rhesus monkey. **Pharmacol Biochem Behav**. v. 9, n. 5, p. 631-8, 1978.
- BERRIDGE, K. C.; ROBINSON, T. E. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? **Brain Res Brain Res Rev**. v. 28, n. 3, p. 309-69, 1998. Review.
- BHANG, S. Y.; CHOI, S. W.; AHN, J. H. Changes in plasma brain-derived neurotrophic factor levels in smokers after smoking cessation. **Neurosci Lett**. v. 468, n. 1, p. 7-11, 2010.
- BIALA, G.; BUDZYNSKA, B. Effects of acute and chronic nicotine on elevated plus maze in mice: involvement of calcium channels. **Life Sci**. v. 79, n. 1, p. 81-8, 2006.
- BILANG-BLEUEL, A. et al. Forced swimming evokes a biphasic response in CREB phosphorylation in extrahypothalamic limbic and neocortical brain structures in the rat. **Eur J Neurosci**. v. 15, n. 6, p. 1048-60, 2002.
- BLOMQVIST, O. et al. The mesolimbic dopamine-activating properties of ethanol are antagonized by mecamylamine. **Eur J Pharmacol**. v. 249, n. 2, p. 207-13, 1993.

BLOMQUIST, O. et al. Voluntary ethanol intake in the rat: effects of nicotinic acetylcholine receptor blockade or subchronic nicotine treatment. **Eur J Pharmacol.** v. 314, n. 3, p. 257-67, 1996.

BLUM, K. et al. The addictive brain: all roads lead to dopamine. **J Psychoactive Drugs.** v. 44, n. 2, p. 134-43, 2012. Review.

BOBO, J. K.; HUSTEN, C. Sociocultural influences on smoking and drinking. **Alcohol Res Health.**, v.24, n.4, p.225-32, 2000. Review.

BOSSERT, J. M. et al. Ventral medial prefrontal cortex neuronal ensembles mediate context-induced relapse to heroin. **Nat Neurosci.** v. 14, n. 4, p. 420-2, 2011.

BRAUN, A. R. et al. The separate and combined effects of alcohol and nicotine on anticipatory anxiety: a multidimensional analysis. **Addict Behav.** v. 37, n. 4, p. 485-91, 2012.

BREESE, G. R.; KNAPP, D. J.; OVERSTREET, D. H. Stress sensitization of ethanol withdrawal-induced reduction in social interaction: inhibition by CRF-1 and benzodiazepine receptor antagonists and a 5-HT_{1A}-receptor agonist. **Neuropsychopharmacology.** v. 29, n. 3, p. 470-82, 2004.

BRIONI, J. D. et al. Anxiolytic-like effects of the novel cholinergic channel activator ABT-418. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 271, n. 1, p. 353-61, 1994.

BRIONI, J. D. et al. Nicotinic receptor agonists exhibit anxiolytic-like effects on the elevated plus-maze test. **Eur J Pharmacol.** v. 238, n. 1, p. 1-8, 1993.

BROWN, T. E. et al. A silent synapse-based mechanism for cocaine-induced locomotor sensitization. **J Neurosci.** v. 31, n. 22, p. 8163-74, 2011.

BRUIJNZEEL, A. W.; PRADO, M.; ISAAC, S. Corticotropin-releasing factor-1 receptor activation mediates nicotine withdrawal-induced deficit in brain reward function and stress-induced relapse. **Biol Psychiatry.** v. 66, n. 2, p. 110-7, 2009.

BRUIJNZEEL, A. W. Tobacco addiction and the dysregulation of brain stress systems. **Neurosci Biobehav Rev.** v. 36, n. 5, p. 1418-41, 2012.

BRUNZELL, D. H.; RUSSELL, D. S.; PICCIOTTO, M. R. In vivo nicotine treatment regulates mesocorticolimbic CREB and ERK signaling in C57Bl/6J mice. **J Neurochem.** v. 84, n. 6, p. 1431-41, 2003.

BUCHMANN, A. F. et al. Cigarette craving increases after a psychosocial stress test and is related to cortisol stress response but not to dependence scores in daily smokers. **J Psychopharmacol.** v. 24, n. 2, p. 247-55, 2010.

BUDNEY, A. J. et al. Nicotine and caffeine use in cocaine-dependent individuals. **J Subst Abuse.** v. 5, n. 2, p. 117-30, 1993.

BUTT, C. M. et al. Interaction of the nicotinic cholinergic system with ethanol withdrawal. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 308, n. 2, p. 591-9, 2004.

CABIB, S. et al. Behavioral and mesocorticolimbic dopamine responses to non aggressive social interactions depend on previous social experiences and on the opponent's sex. **Behav Brain Res.** v. 112, p. 13-22, 2000.

CADONI, C.; SOLINAS, M.; DI CHIARA, G. Psychostimulant sensitization: differential changes in accumbal shell and core dopamine. **Eur J Pharmacol.** v. 388, n. 1, p. 69-76, 2000.

CANNELLA, N. et al. The role of the neuropeptide S system in addiction: Focus on its interaction with the CRF and hypocretin/orexin neurotransmission. **Prog Neurobiol.** v. 100, p. 48-59, 2013.

CAO, W. et al. A genetic comparison of behavioral actions of ethanol and nicotine in the mirrored chamber. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 45, n. 4, p. 803-9, 1993.

CAPRIOLI, D. et al. Modeling the role of environment in addiction. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.** v. 31, p. 1639–53, 2007.

CARLEZON, W.A. JR.; DUMAN, R. S.; NESTLER, E. J. The many faces of CREB. **Trends Neurosci.** v. 28, n. 8, p. 436-45, 2005. Review.

CARLEZON, W. A. JR. et al. Regulation of cocaine reward by CREB. **Science.** v. 282, n. 5397, p. 2272-5, 1998.

CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS. II Levantamento Domiciliar Sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil - 2005. Disponível em: <<http://www.cebrid.epm.br/index.php>>. Acesso em 02 fev. 2013.

CHANG, J. Y. et al. Electrophysiological and pharmacological evidence for the role of the nucleus accumbens in cocaine self-administration in freely moving rats. **J Neurosci.** v. 14, p. 1224-44, 1994.

CHANG, J. Y. et al. Neuronal responses in prefrontal cortex and nucleus accumbens during heroin self-administration in freely moving rats. **Brain Res.** v. 754, p. 12-20, 1997.

CICCOCIOPPO, R. et al. Genetically selected Marchigian Sardinian alcohol-preferring (msP) rats: an animal model to study the neurobiology of alcoholism. **Addict Biol.** v. 11, n. 3-4, p. 339-55, 2006. Review.

COHEN, A.; ETTENBERG, A. Motivational effects of nicotine as measured in a runway model of drug self-administration. **Behav Pharmacol.** v. 18, n. 4, p. 265-71, 2007.

COLLINS, S. L.; MONTANO, R.; IZENWASSER, S. Nicotine treatment produces persistent increases in amphetamine-stimulated locomotor activity in periadolescent male but not female or adult male rats. **Brain Res Dev Brain Res.** v. 153, n. 2, p. 175-87, 2004.

CORRELL, J. A. et al. Nicotine sensitization and analysis of brain-derived neurotrophic factor in adolescent beta-arrestin-2 knockout mice. **Synapse.** v. 63, n. 6, p. 510-9, 2009.

CORRIGALL, W. A.; COEN, K. M. Cocaine self-administration is increased by both D1 and D2 dopamine antagonists. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 39, n. 3, p. 799-802, 1991.

CORRIGALL, W. A. et al. The mesolimbic dopaminergic system is implicated in the reinforcing effects of nicotine. **Psychopharmacology (Berl).** v. 107, n. 2-3, p. 285-9, 1992.

COSTALL, B. et al. The actions of nicotine and cocaine in a mouse model of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 33, n. 1, p. 197-203, 1989.

COUSINS, M. S.; STAMAT, H. M.; DE WIT, H. Acute doses of d-amphetamine and bupropion increase cigarette smoking. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 157, n. 3, p. 243-53, 2001.

COVINGTON III, H. E.; MICZEK, K. A. Repeated social-defeat stress, cocaine or morphine. Effects on behavioral sensitization and intravenous cocaine self-administration "binges". **Psychopharmacology (Berl)**. v. 158, n. 4, p. 388-98, 2001.

COVINGTON III, H. E. et al. Brief social defeat stress: long lasting effects on cocaine taking during a binge and zif268 mRNA expression in the amygdala and prefrontal cortex. **Neuropsychopharmacology**. v. 30, p. 310-21, 2005.

CROOKS, K. R. et al. TrkB signaling is required for behavioral sensitization and conditioned place preference induced by a single injection of cocaine. **Neuropharmacology**. v. 58, n. 7, p. 1067-77, 2010.

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, n. 3, p. 411-7, 2005.

CRUZ, F. C.; DELUCIA, R.; PLANETA, C. S. Effects of chronic stress on nicotine-induced locomotor activity and corticosterone release in adult and adolescent rats. **Addict Biol**. v. 13, p. 63-9, 2008.

CRUZ, F. C. et al. Maternal separation stress in male mice: long-term increases in alcohol intake. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 201, n. 3, p. 459-68, 2008.

CRUZ, F. C. et al. Social defeat stress in rats: escalation of cocaine and "speedball" binge self-administration, but not heroin. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 215, n. 1, p. 165-75, 2011.

DANI, J. A.; HARRIS, R. A. Nicotine addiction and comorbidity with alcohol abuse and mental illness. **Nat Neurosci**. v. 8, n. 11, p. 1465-70, 2005. Review.

DEMBO, R. et al. The relationship between physical and sexual abuse and illicit drug use: a replication among a new sample of youths entering a juvenile detention center. **Int J Addict**. v. 23, n. 11, p. 1101-23, 1988a.

DEMBO, R. et al. The relationship between physical and sexual abuse and tobacco, alcohol, and illicit drug use among youths in a juvenile detention center. **Int J Addict.** v. 23, n. 4, p. 51-78, 1988b.

DEPOORTERE, R. Y.; LI, D. H.; LANE, J. D, Emmett-Oglesby MW. Parameters of self-administration of cocaine in rats under a progressive-ratio schedule. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 45, n. 3, p. 539-48, 1993.

DEROCHE, V. et al. Stress-induced sensitization to amphetamine and morphine psychomotor effects depend on stress-induced corticosterone secretion. **Brain Res.** v. 598, p. 343-8, 1992.

DEWART, T.; FRANK, B.; SCHMEIDLER, J. The impact of 9/11 on patients in New York City's substance abuse treatment programs. **Am J Drug Alcohol Abuse.** v. 32, n. 4, p. 665-72, 2006.

DI CHIARA, G. Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. **Behav Brain Res.** v. 137, n. 1-2, p. 75-114, 2002. Review.

DI CHIARA, G. Role of dopamine in the behavioural actions of nicotine related to addiction. **Eur J Pharmacol.** v. 393, n. 1-3, p. 295-314, 2000. Review.

DIFRANZA, J. R.; GUERRERA, M. P. Alcoholism and smoking. **J Stud Alcohol.** v. 51, n. 2, p. 130-5, 1990.

DING, Z. M. et al. Repeated exposure of the posterior ventral tegmental area to nicotine increases the sensitivity of local dopamine neurons to the stimulating effects of ethanol. **Alcohol.** v. 46, n. 3, p. 217-23, 2012.

DRUMMOND, D. C.; COOPER, T.; GLAUTIER, S. P. Conditioned learning in alcohol dependence: implications for cue exposure treatment. **Br J Addict.** v. 85, n. 6, p. 725-43, 1990. Review.

EDDY, N. B. et al. Drug dependence: its significance and characteristics. **Bull World Health Organ.** v. 32, n. 5, p. 721-33, 1965.

ERICSON, M. et al. Voluntary ethanol intake in the rat and the associated accumbal dopamine overflow are blocked by ventral tegmental mecamylamine. **Eur J Pharmacol.** v. 358, n. 3, p. 189-96, 1998.

ESCRITÓRIO CONTRA DROGAS E CRIMES, NAÇÕES UNIDAS. **Relatório Mundial das Drogas 2012.** Disponível em

<http://www.unodc.org/documents/southerncone//Topics_drugs/WDR/2012/WDR_2012_web_small.pdf>. Acessado em 02 fev. 2013.

EUSKIRCHEN, G. et al. CREB binds to multiple loci on human chromosome 22. **Mol. Cell. Biol.** v. 24, p. 3804–14, 2004.

EZZATI, M. et al. Comparative Risk Assessment Collaborating Group. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. **Lancet.** v. 360, n. 9343, p. 1347-60, 2002. Review.

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

FANOUS, S. et al. Role of orbitofrontal cortex neuronal ensembles in the expression of incubation of heroin craving. **J Neurosci.** v. 32, n. 34, p. 11600-9, 2012.

FARADAY, M. M. et al. Adolescent and adult male rats differ in sensitivity to nicotine's activity effects. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 74, p. 917-931, 2003.

FAROOK, J. M.; et al. Lobeline, a nicotinic partial agonist attenuates alcohol consumption and preference in male C57BL/6J mice. **Physiol Behav.** v. 97, n. 3-4, p. 503-6, 2009.

FILE, S. E.; KENNY, P. J.; OUAGAZZAL, A. M. Bimodal modulation by nicotine of anxiety in the social interaction test: role of the dorsal hippocampus. **Behav Neurosci.** v. 112, n. 6, p. 1423-9, 1998.

FOWLER, C. D.; KENNY, P. J. Habenular signaling in nicotine reinforcement. **Neuropsychopharmacology.** v. 37, n. 1, p. 306-7, 2012.

FREEMAN, K. B.; WOOLVERTON, W. L. Self-administration of cocaine and nicotine mixtures by rhesus monkeys. **Psychopharmacology (Berl).** v. 207, n. 1, p. 99-106, 2009.

FUNK, C. K. et al. Corticotropin-releasing factor within the central nucleus of the amygdala mediates enhanced ethanol self-administration in withdrawn, ethanol-dependent rats. **J Neurosci.** v. 26, n. 44, p. 11324-32, 2006.

GARRETT, B. E.; GRIFFITHS, R. R. Intravenous nicotine and caffeine: subjective and physiological effects in cocaine abusers. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 296, n. 2, p. 486-94, 2001.

GAWIN, F.H. Cocaine addiction: psychology and neurophysiology. **Science.** v. 251, n 5001, p. 1580-6, 1991. Review.

GEORGE, O. et al. CRF-CRF1 system activation mediates withdrawal-induced increases in nicotine self-administration in nicotine-dependent rats. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 104, p. 17198-1203, 2007.

GEORGE, O.; LE MOAL, M.; KOOB, G. F. Allostasis and addiction: role of the dopamine and corticotropin-releasing factor systems. **Physiol Behav.** v. 106, n. 1, p. 58-64, 2012. Review.

GEVREY, J. C. et al. Co-requirement of cyclic AMP- and calcium-dependent protein kinases for transcriptional activation of cholecystokinin gene by protein hydrolysates. **J Biol Chem.** v. 277, p. 22407-13, 2002.

GHITZA, U. E. et al. Role of BDNF and GDNF in drug reward and relapse: a review. **Neurosci Biobehav Rev.** v. 35, n. 2, p. 157-71, 2010.

GILPIN, N. W. Corticotropin-releasing factor (CRF) and neuropeptide Y (NPY): effects on inhibitory transmission in central amygdala, and anxiety- & alcohol-related behaviors. **Alcohol.** v. 46, n. 4, p. 329-37, 2012. Review

GILPIN, N. W.; KOOB, G. F. Neurobiology of Alcohol Dependence: Focus on Motivational Mechanisms. **Alcohol Res Health.** v. 31, n. 3, p. 185-95, 2008.

GILPIN, N. W.; MISRA, K.; KOOB, G. F. Neuropeptide Y in the central nucleus of the amygdala suppresses dependence-induced increases in alcohol drinking. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 90, n. 3, p. 475-80, 2008.

GILPIN, N. W. et al. Operant behavior and alcohol levels in blood and brain of alcohol-dependent rats. **Alcohol Clin Exp Res.** v. 33, n. 12, p. 2113-23, 2009.

GILPIN, N. W. et al. Vapor inhalation of alcohol in rats. **Curr Protoc Neurosci.** Cap. 9, Un. 9.29, 2008.

GOEDERS, N. E.; GUERIN, G. F. Non-contingent electric footshock facilitates the acquisition of intravenous cocaine self-administration in rats. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 114, p. 63-70, 1994.

GOLDEN, S. A.; RUSSO, S. J. Mechanisms of psychostimulant-induced structural plasticity. **Cold Spring Harb Perspect Med**. v. 2, n. 10, p. , 2012.

GRAHAM, D. L. et al. Dynamic BDNF activity in nucleus accumbens with cocaine use increases self-administration and relapse. **Nat Neurosci**. v. 10, n. 8, p. 1029-37, 2007.

GRANT, K. A.; SAMSON, H. H. Oral self administration of ethanol in free feeding rats. **Alcohol**. v. 2, n. 2, p. 317-21, 1985.

GRIMM, J. W. et al. Time-dependent increases in brain-derived neurotrophic factor protein levels within the mesolimbic dopamine system after withdrawal from cocaine: implications for incubation of cocaine craving. **J Neurosci**. v. 23, n. 3, p. 742-7, 2003.

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 (Berl)**. v. 154, p. 213-20, 2001.

HAHN, B.; ZACHARKO, R. M.; ANISMAN, H. Alterations of amphetamine elicited perseveration and locomotor excitation following acute and repeated stressor application. **Pharmacol Biochem Behav**. v. 25, p. 29-33, 1986.

HANEY, M. et al. Social stress increases the acquisition of cocaine self-administration in male and female rats. **Brain Res**. v. 698, p. 46-52, 1995.

HANSSON, A. C. et al. Region-specific down-regulation of Crhr1 gene expression in alcohol-preferring msP rats following ad lib access to alcohol. **Addict Biol**. v. 12, n. 1, p. 30-4, 2007.

HEILIG, M.; KOOB, G. F. A key role for corticotropin-releasing factor in alcohol dependence. **Trends Neurosci**. v. 30, n. 8, p. 399-406, 2007. Review.

HENDRICKSON, L. M.; ZHAO-SHEA, R.; TAPPER, A. R. Modulation of ethanol drinking-in-the-dark by mecamylamine and nicotinic acetylcholine receptor agonists in C57BL/6J mice. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 204, n. 4, p. 563-72, 2009.

HENNINGFIELD, J. E.; GRIFFITHS, R. R. Cigarette smoking and subjective response: effects of d-amphetamine. **Clin Pharmacol Ther.** v. 30, n. 4, p. 497-505, 1981.

HERMAN, J. P.; STINUS, L.; LE MOAL, M. Repeated stress increases locomotor response to amphetamine. **Psychopharmacology (Berl).** v. 84, p. 431-5, 1984.

HODOS, W. Progressive ratio as a measure of reward strength. **Science.** v. 134, p. 943-4, 1961.

HOFFMAN, A. F.; LUPICA, C. R. Synaptic Targets of Δ 9-Tetrahydrocannabinol in the Central Nervous System. **Cold Spring Harb Perspect Med.** 2012 (no prelo).

HOLLANDER, J. A. et al. Striatal microRNA controls cocaine intake through CREB signalling. **Nature.** v. 466, n. 7303, p. 197-202, 2010.

HOPE, B. T. et al. Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments. **Neuron.** v. 13, n. 5, p. 1235-44, 1994.

HORGER, B. A.; GILES, M. K.; SCHENK, S. Preexposure to amphetamine and nicotine predisposes rats to self-administer a low dose of cocaine. **Psychopharmacology (Berl).** v. 107, n. 2-3, p. 271-6, 1992.

HOUDI, A. A.; DASGUPTA, R.; KINDY, M. S. Effect of nicotine use and withdrawal on brain preproenkephalin A mRNA. **Brain Res.** v. 799, n. 2, p. 257-63, 1998.

HUNTER, R. G. Stress and the α 7 nicotinic acetylcholine receptor. **Curr Drug Targets.** v. 13, n. 5, p. 607-12, 2012. Review.

IMPERATO, A. et al. Stress-induced enhancement of dopamine and acetylcholine release in limbic structures: role of corticosterone. **Eur J Pharmacol.** v. 165, n. 2-3, p. 337-8, 1989.

IRVINE, E. E. et al. Different treatment regimens and the development of tolerance to nicotine's anxiogenic effects. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 68, n. 4, p. 769-76, 2001.

IZÍDIO, G. S.; RAMOS, A. Positive association between ethanol consumption and anxiety-related behaviors in two selected rat lines. **Alcohol**. v. 41, n. 7, p. 517-24, 2007.

JAFFE, J. H. et al. Cocaine-induced cocaine craving. **Psychopharmacology**. v.97, p. 59– 64, 1989.

JONES, J. L. et al. The basolateral amygdala differentially regulates conditioned neural responses within the nucleus accumbens core and shell. **Neuroscience**. v. 169, p. 1186-98, 2010.

JONKMAN, S.; PELLOUX, Y.; EVERITT, B. J. Differential roles of the dorsolateral and midlateral striatum in punished cocaine seeking. **J Neurosci**. v. 32, n. 13, p. 4645-50, 2012.

KALIVAS, P. W. Cocaine and amphetamine-like psychostimulants: neurocircuitry and glutamate neuroplasticity. **Dialogues Clin Neurosci**. v. 9, n. 4, p. 389-97, 2007. Review.

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, n. 1, p. 204-12, 1987.

KALIVAS, P. W.; DUFFY, P. Similar effects of daily cocaine and stress on mesocorticolimbic dopamine neurotransmission in the rat. **Biol Psychiatry**. v. 25, p. 913-928, 1989.

KAMENS, H. M.; ANDERSEN, J.; PICCIOTTO, M. R. Modulation of ethanol consumption by genetic and pharmacological manipulation of nicotinic acetylcholine receptors in mice. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 208, n. 4, p. 613-26, 2010.

KAO, T. C.; SCHNEIDER, S. J.; HOFFMAN, K. J. Co-occurrence of alcohol, smokeless tobacco, cigarette, and illicit drug use by lower ranking military personnel. **Addict Behav**. v. 25, n. 2, p. 253-62, 2000.

KASSEL, J. D.; STROUD, L. R.; PARONIS, C. A. Smoking, stress, and negative affect: correlation, causation, and context across stages of smoking. **Psychol Bull**. v. 129, n. 2, p. 270-304, 2003. Review.

KASSEL, J. D.; UNROD, M. Smoking, anxiety, and attention: support for the role of nicotine in attentionally mediated anxiolysis. **J Abnorm Psychol.** v. 109, n. 1, p. 161-6, 2000.

KIIANMAA, K. et al. Effect of ethanol on extracellular dopamine in the nucleus accumbens of alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 52, n. 1, p. 29-34, 1995.

KITA, T. et al. Enhancement of sensitization to nicotine-induced ambulatory stimulation by psychological stress in rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** v. 23, p. 893-903, 1999.

KIVINUMMI, T. et al. Alterations in BDNF and phospho-CREB levels following chronic oral nicotine treatment and its withdrawal in dopaminergic brain areas of mice. **Neurosci Lett.** v. 491, n. 2, p. 108-12, 2011.

KIYATKIN, E. A.; REBEC, G. V. Dopamine-independent action of cocaine on striatal and accumbal neurons. **Eur J Neurosci** v. 12, 1789-1800, 2000.

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, n. 3, p. 1103-9, 2007.

KNAPP, D. J.; OVERSTREET, D. H.; BREESE, G. R. Baclofen blocks expression and sensitization of anxiety-like behavior in an animal model of repeated stress and ethanol withdrawal. **Alcohol Clin Exp Res.** v. 31, n. 4, p. 582-95, 2007.

KOOB, G. F. Dynamics of neuronal circuits in addiction: reward, antireward, and emotional memory. **Pharmacopsychiatry.** v. 42, p. 32-41, 2009. Review.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. **Science.** v. 278, n. 5335, p. 52-8, 1997.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. **Neuropsychopharmacology.** v. 24, n. 2, p. 97-129, 2001. Review.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. **Neurobiology of Addiction**, 1. ed. Elsevier Academic, 2006.

KOOB G. F.; LE MOAL, M. Plasticity of reward neurocircuitry and the 'dark side' of drug addiction. **Nat Neurosci.** v. 8, n. 11, p. 1442-4, 2005.

KOOB, G. F. Neurobiological substrates for the dark side of compulsivity in addiction. **Neuropharmacology.** v. 56, Supl. 1, p.18-31, 2009. Review.

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurocircuitry of Addiction. **Neuropsychopharmacology Reviews.** v. 35, p. 217-38, 2010.

KOSTEN, T. R. et al. Cortisol levels during chronic naltrexone maintenance treatment in ex-opiate addicts. **Biol Psychiatry.** v. 21, p. 217-20, 1986.

KOSTEN, T. A.; MISERENDINO, M. J.; KEHOE, P. Enhanced acquisition of cocaine self-administration in adult rats with neonatal isolation stress experience. **Brain Res.** v. 1875, p. 44-50, 2000.

KOYA, E. et al. Silent synapses in selectively activated nucleus accumbens neurons following cocaine sensitization. **Nat Neurosci.** v. 15, n. 11, p. 1556-62, 2012.

KOYA, E. et al. Targeted disruption of cocaine-activated nucleus accumbens neurons prevents context-specific sensitization. **Nat Neurosci.** v. 12, n. 8, p. 1069-73, 2009.

LAIFENFELD, D. et al. Antidepressants and prolonged stress in rats modulate CAM-L1, laminin, and pCREB, implicated in neuronal plasticity. **Neurobiol Dis.** v. 20, n. 2, p. 432-41, 2005.

LÊ, A. D. et al. Involvement of nicotinic receptors in alcohol self-administration. **Alcohol Clin Exp Res.** v. 24, n. 2, p. 155-63, 2000.

LEÃO, R. M.; CRUZ, F. C.; PLANETA, C. S. Exposure to acute restraint stress reinstates nicotine-induced place preference in rats. **Behav Pharmacol.** v. 20, n. 1, p. 109-113, 2009.

LECCA, D. et al. Reciprocal effects of response contingent and noncontingent intravenous heroin on in vivo nucleus accumbens shell versus core dopamine in the rat: a repeated sampling microdialysis study. **Psychopharmacology (Berl).** v. 194, n. 1, p. 103-16, 2007.

LEE, N. K.; GREELY, J.; OEI, T. P. The relationship of positive and negative alcohol expectancies to patterns of consumption of alcohol in social drinkers. **Addict Behav.** v. 24, n. 3, p. 359-69, 1999.

LE MAGNEN, J.; MARFAING-JALLAT, P. Further study of induced behavioral dependence on ethanol in rats. **Alcohol.** v. 1, n. 4, p. 269-73, 1984.

LENOIR, M.; AHMED, S. H. Heroin-induced reinstatement is specific to compulsive heroin use and dissociable from heroin reward and sensitization. **Neuropsychopharmacology.** v. 32, n. 3, p. 616-24, 2007.

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, n. 3, p. 251-6, 2005.

LEVINE, A. et al. Molecular mechanism for a gateway drug: epigenetic changes initiated by nicotine prime gene expression by cocaine. **Sci Transl Med.** v. 3, n. 107, p. 107ra109, 2011.

LIEBER, C. S.; DE CARLI, L. M. Ethanol dependence and tolerance: a nutritionally controlled experimental model in the rat. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol.** v. 6, n. 3, p. 983-91, 1973.

LIN, Y. et al. Effects of long-term stress and recovery on the prefrontal cortex and dentate gyrus in male and female rats. **Cereb Cortex.** v. 18, p. 2762-74, 2008.

LIU, Q. R. et al. Rodent BDNF genes, novel promoters, novel splice variants, and regulation by cocaine. **Brain Res.** v. 1067, n. 1, p. 1-12, 2006.

LIU, X.; JERNIGAN, C. Activation of the opioid μ 1, but not δ or κ , receptors is required for nicotine reinforcement in a rat model of drug self-administration. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** v. 35, n. 1, p. 146-53, 2011.

LU, L. et al. A single infusion of brain-derived neurotrophic factor into the ventral tegmental area induces long-lasting potentiation of cocaine seeking after withdrawal. **J Neurosci.** v. 24, n. 7, p. 1604-11, 2004a.

LU, L. et al. Incubation of cocaine craving after withdrawal: a review of preclinical data. **Neuropharmacology.** v. 47, Supl. 1, p. 214-26, 2004b. Review.

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 in rats. **J Neurochem.** v. 85, n. 6, p. 1604-13, 2003.

MAGARIÑOS, A. M.; MCEWEN, B. S. Magariños AM, McEwen BS. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. **Neuroscience.** v. 69, n. 1, p. 83-8, 1995.

MAJCHROWICZ, E. Induction of physical dependence upon ethanol and the associated behavioral changes in rats. **Psychopharmacologia.** v. 43, n. 3, p. 245-54, 1975.

MALENKA, R. C.; BEAR, M. F. LTP and LTD: an embarrassment of riches. **Neuron.** v. 44, n. 1, p. 5-21, 2004. Review.

MALIN, D. H. et al. Bupropion attenuates nicotine abstinence syndrome in the rat. **Psychopharmacology (Berl).** v. 184, n. 3-4, p. 494-503, 2006.

MARIN, M. T. et al. Context-specific modulation of cocaine-induced locomotor sensitization and ERK and CREB phosphorylation in the rat nucleus accumbens. **Eur J Neurosci.** v. 30, n. 10, p. 1931-40, 2009.

MARIN, M. T.; CRUZ, F. C.; PLANETA, C. S. Cocaine-induced behavioral sensitization in adolescent rats endures until adulthood: lack of association with GluR1 and NR1 glutamate receptor subunits and tyrosine hydroxylase. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 91, n. 1, p. 109-14, 2008.

MARIN, M. T.; CRUZ, F. C.; PLANETA, C. S. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. **Physiol Behav.** v. 90, n. 1, p. 29-35, 2007.

MARIN, M. T.; PLANETA, C. S. Maternal separation affects cocaine-induced locomotion and response to novelty in adolescent, but not in adult rats. **Brain Res.** v. 1013, n. 1, p. 83-90, 2004.

MARINELLI, M.; PIAZZA, P. V. Interaction between glucocorticoid hormones, stress and psychostimulant drugs. **Eur J Neurosci.** v. 16, n. 3, p. 387-94, 2002. Review.

MARINELLI, P. W. et al. The CRF1 receptor antagonist antalarmin attenuates yohimbine-induced increases in operant alcohol self-administration and reinstatement of alcohol seeking in rats. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 195, n. 3, p. 345-55, 2007.

MARLATT, G. A. et al. Addictive behaviors: etiology and treatment. **Ann Rev Psychol**. v. 39, p. 223-252, 1988.

MARTÍNEZ-ORTEGA, J. M. et al. Nicotine dependence, use of illegal drugs and psychiatric morbidity. **Addict Behav**. v. 31, n. 9, p. 1722-9, 2006.

MASON, B. J.; LEHERT, P. Effects of nicotine and illicit substance use on alcoholism treatment outcomes and acamprosate efficacy. **J Addict Med**. v. 3, n. 3, p. 164-71, 2009.

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. 1481-94, 2005.

MCBRIDE, W. J. et al. Serotonin and dopamine systems regulating alcohol intake. **Alcohol Alcohol Suppl**. v. 1, p. 411-6, 1991.

MCCORMICK, C. M.; IBRAHIM, F. N. Locomotor activity to nicotine and Fos immunoreactivity in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in adolescent socially-stressed rats. **Pharmacol Biochem Behav**. v. 86, p. 92-102, 2007.

MCFALL, M. E.; MACKAY, P. W.; DONOVAN, D. M. Combat-related posttraumatic stress disorder and severity of substance abuse in Vietnam veterans. **J Stud Alcohol**. v. 53, n. 4, p. 357-63, 1992.

MELLO, N.K.; NEWMAN, J. L. Discriminative and reinforcing stimulus effects of nicotine, cocaine, and cocaine + nicotine combinations in rhesus monkeys. **Exp Clin Psychopharmacol**. v. 19, n. 3, p. 203-14, 2011.

MICZEK, K. A.; MUTSCHLER, N. H. Activational effects of social stress on IV cocaine self-administration in rats. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 128, n. 3, p. 256-64, 1996.

MICZEK, K. A. et al. d-amphetamine "cue" generalizes to social defeat stress: behavioral sensitization and attenuated accumbens dopamine. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 147, p. 190-199, 1999.

MICZEK, K. A.; YAP, J. J.; COVINGTON, H. E. Social stress, therapeutics and drug abuse: Preclinical models of escalated and depressed intake. **Pharmacol Ther.** v. 120, p. 102-28, 2008.

MILLER, C. A.; MARSHALL, J. F. Molecular substrates for retrieval and reconsolidation of cocaine-associated contextual memory. **Neuron**. v. 47, n. 6, p. 873-84, 2005.

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. 2, p. 299-306, 1995.

MORGAN, D.; ROBERTS, D. C. Sensitization to the reinforcing effects of cocaine following binge-abstinent self-administration. **Neurosci Biobehav Rev.** v. 27, n. 8, p. 803-12, 2004. Review.

MORGAN, D.; SMITH, M. A.; ROBERTS, D. C. Binge self-administration and deprivation produces sensitization to the reinforcing effects of cocaine in rats. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 178, n. 2-3, p. 309-16, 2005.

MOUSSAWI, K. et al. N-Acetylcysteine reverses cocaine-induced metaplasticity. **Nat Neurosci.** v. 12, n. 2, p. 182-9, 2009.

MULLER, D. L.; UNTERWALD, E. M. D1 dopamine receptors modulate deltaFosB induction in rat striatum after intermittent morphine administration. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 314, n. 1, p. 148-54, 2005.

MUSCHAMP, J. W. et al. Activation of CREB in the nucleus accumbens shell produces anhedonia and resistance to extinction of fear in rats. **J Neurosci.** v. 31, n. 8, p. 3095-103, 2011.

NESTLER, E. J.; BARROT, M.; SELF, D. W. DeltaFosB: a sustained molecular switch for addiction. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 98, n. 20, p. 11042-6, 2001. Review.

NESTLER, E. J. Is there a common molecular pathway for addiction? **Nat Neurosci.** v. 8, n. 11, p. 1445-9, 2005. Review.

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

NESTLER, E. J. Transcriptional mechanisms of addiction: role of DeltaFosB. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** v. 363, n. 1507, p. 3245-55, 2008. Review.

NIAURA, R. et al. Response to social stress, urge to smoke, and smoking cessation. **Addict Behav.** v. 27, n. 2, p. 241-50, 2002.

NICOLA, S. M.; SURMEIER, 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. 857-65, 2004.

O'BRIEN, C. P. Addiction and dependence in DSM-V. **Addiction.** v. 106, n. 5, p. 866-7, 2011.

O'BRIEN, C. P. Drug Addiction and Abuse. In: Hardman, J.G.; Limbird, L.E. (eds). **Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics**, 11th Ed. Pregamon, New York, p. 621-642, 2006.

O'BRIEN, C. P.; EHRMAN, R. N.; TERNS, J. N. Classical conditioning in human opioid dependence. In S.R. Golberg and I.P. Stolorleman (Eds.) **Behavioral Analysis of Drug-dependence**, Academic Pres, London, p. 329, 1986.

O'BRIEN, C. P. Naltrexone for alcohol dependence: compliance is a key issue. **Addiction.** v. 96, n. 12, p. 1857, 2001.

ONN, S. P.; WEST, A. R.; GRACE, A. A. Dopamine-mediated regulation of striatal neuronal and network interactions. **Trends Neurosci.** v. 23, n. 10, p. S48-56, 2000. Review.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE 2012a Disponível em: <http://www.who.int/topics/substance_abuse/en/>. Acessado em: 02 fev. 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE 2012b Disponível em: <http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/EN_WHS2012_Full.pdf> . Acessado em: 02 fev. 2013.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE 2009 Disponível em: <http://www2.paho.org/hq/dmdocuments/2009/epidemiologia_drogas_web.pdf>. Acessado em: 02 fev. 2013.

OUAGAZZAL, A. M.; KENNY, P. J.; FILE, S. E. Stimulation of nicotinic receptors in the lateral septal nucleus increases anxiety. **Eur J Neurosci.** v. 11, n. 11, p. 3957-62, 1999.

OUIMETTE, P. et al. Precipitants of first substance use in recently abstinent substance use disorder patients with PTSD. **Addict Behav.** v. 32, n. 8, p. 1719-27, 2007.

PANLILIO, L. V.; GOLDBERG, S. R. Self-administration of drugs in animals and humans as a model and an investigative tool. **Addiction.** v. 102, n. 12, p. 1863-70, 2007. Review.

PANDEY, S. C. et al. Effects of protracted nicotine exposure and withdrawal on the expression and phosphorylation of the CREB gene transcription factor in rat brain. **J Neurochem.** v. 77, n. 3, p. 943-52, 2001.

PANDEY, S. C.; ROY, A.; ZHANG, H. The decreased phosphorylation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element binding (CREB) protein in the central amygdala acts as a molecular substrate for anxiety related to ethanol withdrawal in rats. *Alcohol Clin Exp Res.* v. 27, n. 3, p. 396-409, 2003.

PASTOR, R. et al. Role of corticotropin-releasing factor and corticosterone in behavioral sensitization to ethanol. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 341, n. 2, p. 455-63, 2012.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Forebrain in stereotaxic coordinates.** 5. ed. USA: Academic Press, 2006.

PELLOW, S. Can drug effects on anxiety and convulsions be separated? **Neurosci Biobehav Rev.** v. 9, n. 1, p. 55-73, 1985. Review.

PEOPLES, L. L.; CAVANAUGH, D. Differential changes in signal and background firing of accumbal neurons during cocaine self-administration. **J Neurophysiol.** v. 90, p. 993-1010, 2003.

PEOPLES, L. L. et al. Phasic firing time locked to cocaine self-infusion and locomotion: dissociable firing patterns of single nucleus accumbens neurons in the rat. **J Neurosci.** v. 18, p. 7588-98, 1998.

PEOPLES, L. L. et al. Tonic firing of rat nucleus accumbens neurons: changes during the first 2 weeks of daily cocaine self-administration sessions. **Brain Res.** v. 822, p. 231-6, 1999.

PETERS, J.; DE VRIES, T. J. Glutamate mechanisms underlying opiate memories. **Cold Spring Harb Perspect Med.** v. 2, n. 9, p. a012088, 2012.

PIAZZA, P. V. et al. Stress- and pharmacologically-induced behavioral sensitization increases vulnerability to acquisition of amphetamine self-administration. **Brain Res.** v. 514, n. 1, p. 22-6, 1990.

PIAZZA, P. V.; LE MOAL, M. The role of stress in drug self-administration. **Trends Pharmacol Sci.** v. 19, p. 67-74, 1998.

PICCIOTTO, M. R.; KENNY, P. J. Molecular mechanisms underlying behaviors related to nicotine addiction. **Cold Spring Harb Perspect Med.** v. 3, n. 1, 2013 (no prelo).

PIERCE, R. C.; KALIVAS, P. W. A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. **Brain Res Brain Res Rev.** v. 25, p. 192-216, 1997.

PITMAN, D. L.; OTTENWELLER, J. E.; NATELSON, B. H. Effect of stressor intensity on habituation and sensitization of glucocorticoid responses in rats. **Behav Neurosci.** v. 104, n. 1, p. 28-36, 1990.

PLIAKAS, A. M. et al. Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated cAMP response element-binding protein expression in nucleus accumbens. **J Neurosci.** v. 21, n. 18, p. 7397-403, 2001.

PLUZAREV, O.; PANDEY, S. C. Modulation of CREB expression and phosphorylation in the rat nucleus accumbens during nicotine exposure and withdrawal. **J Neurosci Res.** v. 77, n. 6, p. 884-91, 2004.

PONTIERI, F. E. et al. Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. **Nature.** v. 382, n. 6588, p. 255-7, 1996.

POO, M. M. Neurotrophins as synaptic modulators. **Nat Rev Neurosci.** v. 2, n. 1, p. 24-32, 2001. Review.

POST, R. M.; ROSE, H. Increasing effects of repetitive cocaine administration in the rat. **Nature.** v. 260, n. 5553, p. 731-2, 1976.

RAHMAN, S. et al. Neuroadaptive changes in the mesoaccumbens dopamine system after chronic nicotine self-administration: a microdialysis study. **Neuroscience.** v. 129, n. 2, p. 415-24, 2004.

RAMSEY, N. F.; VAN REE, J. M. Emotional but not physical stress enhances intravenous cocaine self-administration in drug-naive rats. **Brain Res.** v. 608, n. 2, p. 216-22, 1993.

RASSNICK, S. et al.. GABA antagonist and benzodiazepine partial inverse agonist reduce motivated responding for ethanol. **Alcohol Clin Exp Res.** v. 17, n. 1, p. 124-30, 1993.

REID, M. S.; HO, L. B.; BERGER, S. P. Behavioral and neurochemical components of nicotine sensitization following 15-day pretreatment: studies on contextual conditioning. **Behav Pharmacol.** v. 9, p. 137-48, 1998.

RICHARDSON, N. R, ROBERTS, D. C. Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. **J Neurosci Methods.** v. 66, n. 1, p. 1-11, 1996. Review.

RIMONDINI, R. et al. Long-lasting increase in voluntary ethanol consumption and transcriptional regulation in the rat brain after intermittent exposure to alcohol. **FASEB J.** v. 16, n. 1, p. 27-35, 2002.

ROBERTO, M. et al. Cellular and behavioral interactions of gabapentin with alcohol dependence. **J Neurosci.** v. 28, n. 22, p. 5762-71, 2008.

ROBERTS, D. C.; MORGAN, D.; LIU, Y. How to make a rat addicted to cocaine. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. v. 31, n. 8. p. 1614-24, 2007. Review.

ROBINSON, J. H.; PRITCHARD, W. S. The role of nicotine in tobacco use. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 108, n. 4, p. 397-407, 1992. Review.

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**. v. 396, n. 2, p. 157-98, 1986. Review.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. Incentive-sensitization and addiction. **Addiction**. v. 96, n. 1, p. 103-14, 2001. Review.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. v. 363, n. 1507. p. 3137-46, 2008. Review.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. **Brain Res Brain Res Rev**. v. 18, n. 3, p. 247-91, 1993. Review.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. **Addiction**. v. 95, Supl 2, p. S91-117, 2000. Review.

ROGERS, J.; WIENER, S. G.; BLOOM, F. E. Long-term ethanol administration methods for rats: advantages of inhalation over intubation or liquid diets. **Behav Neural Biol**. v. 27, n. 4, p. 466-86, 1979.

ROLL, J. M. et al. A comparison of cocaine-dependent cigarette smokers and non-smokers on demographic, drug use and other characteristics. **Drug Alcohol Depend**. v. 40, n. 3, p.195-201, 1996.

ROLL, J. M.; HIGGINS, S. T.; TIDEY, J. Cocaine use can increase cigarette smoking: evidence from laboratory and naturalistic settings. **Exp Clin Psychopharmacol**. v. 5, n. 3, p. 263-8, 1997.

ROSE, J. E. et al. Potentiation of nicotine reward by alcohol. **Alcohol Clin Exp Res**. v. 26, n. 12, p. 1930-1, 2002.

ROSE, J. E. Stress alleviation and reward enhancement: two promising targets for relapse prevention. **Biol Psychiatry**. v. 68, n. 8, p. 687-8, 2010.

ROTHMAN, R. B.; BAUMANN, M. H. Balance between dopamine and serotonin release modulates behavioral effects of amphetamine-type drugs. **Ann N Y Acad Sci**. v. 1074, p. 245-60, 2006. Review.

ROYCE, J. E. Alcohol Problems and Alcoholism - A Comprehensive Survey. **New York Free Press, Royce**. p.35; 1981.

RUSSO, S. J. et al. The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. **Trends Neurosci**. v. 33, n. 6, p. 267-76, 2010. Review.

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

SÁNCHEZ-HERVÁS, E.; LLORENTE DEL POZO, J. M. Relapse in cocaine addiction: a review. **Adicciones**. v. 24, n. 3, p. 269-79, 2012. Review.

SANTOS, G. C. et al. Amphetamine- and nicotine-induced cross-sensitization in adolescent rats persists until adulthood. **Addict Biol**. v. 14, n. 3, p. 270-5, 2009.

SCHACHTER, S. Pharmacological and psychological determinants of smoking. A New York University honors program lecture. **Ann Intern Med**. v. 88, n. 1, p. 104-14, 1978.

SCHMITZ, N.; KRUSE, J.; KUGLER, J. Disabilities, Quality of Life, and Mental Disorders Associated with Smoking and Nicotine Dependence. **Am J Psychiatry**. v. 160, p. 1670-76, 2003.

SEHGAL, N.; MANCHIKANTI, L.; SMITH, H. S. Prescription opioid abuse in chronic pain: a review of opioid abuse predictors and strategies to curb opioid abuse. **Pain Physician**. v. 15, p. ES67-92, 2012. Review.

SELYE, H. Stress and distress. **Compr Ther**. v. 1, n. 8, p. 9-13, 1975.

SHAHAM, Y.; STEWART, J. Exposure to mild stress enhances the reinforcing efficacy of intravenous heroin self-administration in rats. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 114, p. 523–527, 1994.

SHARPE, A. L.; SAMSON, H. H. Repeated nicotine injections decrease operant ethanol self-administration. **Alcohol**. v. 28, n. 1, p. 1-7, 2002.

SHIPPENBERG, T. S.; REA, W. Sensitization to the behavioral effects of cocaine: modulation by dynorphin and kappa-opioid receptor agonists. **Pharmacol Biochem Behav**. v. 57, n. 3, p. 449-55, 1997. Review.

SHOAIB, M. The cannabinoid antagonist AM251 attenuates nicotine self-administration and nicotine-seeking behaviour in rats. **Neuropharmacology**. v. 54, n. 2, p. 438-44, 2008.

SHRAM, M. J. et al. Acute nicotine enhances c-fos mRNA expression differentially in reward-related substrates of adolescent and adult rat brain. **Neurosci Lett**. v. 418, n. 3, p. 286-91, 2007.

SHUSTER, L.; YU, G.; BATES, A. Sensitization to cocaine stimulation in mice. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 52, n. 2, p. 185-90, 1977.

SINHA, R. How does stress increase risk of drug abuse and relapse? **Psychopharmacology (Berl)**. v. 158, p. 343-59, 2001. Review.

SINHA, R. et al. Stress-induced cocaine craving and hypothalamic-pituitary-adrenal responses are predictive of cocaine relapse outcomes. **Arch Gen Psychiatry**. v. 63; p. 324-31; 2006.

SINHA, R.; LI, C. S. Imaging stress- and cue-induced drug and alcohol craving: association with relapse and clinical implications. **Drug Alcohol Rev**. v. 26, n. 1, p. 25-31, 2007. Review.

SMITH, B. R. et al. Exposure to nicotine enhances acquisition of ethanol drinking by laboratory rats in a limited access paradigm. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 142, n. 4, p. 408-12, 1999.

SOLOMON, R. L.; CORBIT, J. D. An opponent-process theory of motivation. II. Cigarette addiction. **J Abnorm Psychol**. v. 81, n. 2, p. 158-71, 1973.

SOLOMON, R. L. Recent experiments testing an opponent-process theory of acquired motivation. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**. v. 40, n. 1, p. 271-89, 1980.

SORG, B. A.; KALIVAS, P. W. Effects of cocaine and footshock stress on extracellular dopamine levels in the ventral striatum. **Brain Res.** v. 559, p. 29-36, 1991.

STOLERMAN, I. P.; JARVIS, M. J. The scientific case that nicotine is addictive. **Psychopharmacology (Berl).** v. 117, n. 1, p. 2-10, 1995. Review.

SULLIVAN, M. A.; COVEY, L. S. Current perspectives on smoking cessation among substance abusers. **Curr Psychiatry Rep.** v. 4, n. 5, p. 388-96, 2002. Review.

SWEATT, J. D. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. **J Neurochem.** v. 76, n. 1, p. 1-10, 2001. Review.

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, n. 11, p. 1073-4, 2000.

TAYLOR, J. R. et al. Inhibition of Cdk5 in the nucleus accumbens enhances the locomotor-activating and incentive-motivational effects of cocaine. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 104, n. 10, p. 4147-52, 2007.

THOMAS, M. J.; KALIVAS, P. W.; SHAHAM, Y. Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. **Br J Pharmacol.** v. 154, n. 2, p. 327-42, 2008. Review.

TORCHALLA, I. et al. Smoking and predictors of nicotine dependence in a homeless population. **Nicotine Tob Res.** v. 13, n. 10, p. 934-42, 2011.

TOSCANO JR., A. "Um breve histórico sobre o uso de drogas". In: SEIBEL, S. D.; TOSCANO JR. (orgs). **Dependência de drogas.** ed. Atheneu; 2001.

TRENTANI, A. et al. Selective chronic stress-induced in vivo ERK1/2 hyperphosphorylation in medial prefrontocortical dendrites: implications for stress-related cortical pathology? **Eur J Neurosci.** v. 15, n. 10, p. 1681-91, 2002.

TUESTA, L. M.; FOWLER, C. D.; KENNY, P. J. Recent advances in understanding nicotinic receptor signaling mechanisms that regulate drug self-administration behavior. **Biochem Pharmacol.** v. 82, n. 8, p. 984-95, 2011.

UHL, G. R.; GROW, R. W. The burden of complex genetics in brain disorders. **Arch Gen Psychiatry**. v. 61, n. 3, p. 223-9, 2004.

VALDEZ, G. R. et al. Antagonism of corticotropin-releasing factor attenuates the enhanced responsiveness to stress observed during protracted ethanol abstinence. **Alcohol**. v. 29, n. 2, p. 55-60, 2003.

VALDEZ, G. R. et al. Increased ethanol self-administration and anxiety-like behavior during acute ethanol withdrawal and protracted abstinence: regulation by corticotropin-releasing factor. **Alcohol Clin Exp Res**. v. 26, n. 10, p. 1494-501, 2002.

VALENTINI, V. et al. Evidence for a role of a dopamine/5-HT₆ receptor interaction in cocaine reinforcement. **Neuropharmacology**. v. 65, p. 58-64, 2013.

VALJENT, E. et al. Role of the ERK pathway in psychostimulant-induced locomotor sensitization. **BMC Neurosci**. v. 7, p. 20, 2006.

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

VANDERSCHUREN, L. J.; NIESINK, R. J.; VAN REE, J. M. The neurobiology of social play behavior in rats. **Neurosci Biobehav Rev**. v. 21, n. 3, p. 309-26, 1997. Review.

VENDRUSCOLO, L. F. et al. Corticosteroid-dependent plasticity mediates compulsive alcohol drinking in rats. **J Neurosci**. v. 32, n. 22, p. 7563-71, 2012.

VENGELIENE, V. et al. Neuropharmacology of alcohol addiction. **Br J Pharmacol**. v. 154, n. 2, p. 299-315, 2008. Review.

WALKER, B. M.; KOOB, G. F. The gamma-aminobutyric acid-B receptor agonist baclofen attenuates responding for ethanol in ethanol-dependent rats. **Alcohol Clin Exp Res**. v. 31, n. 1, p. 11-8, 2007.

WALLACE, D. L. et al. CREB regulation of nucleus accumbens excitability mediates social isolation-induced behavioral deficits. **Nat Neurosci**. v. 12, n. 2, p. 200-9, 2009.

WEISS, F. et al. Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus accumbens: genetic and motivational determinants. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 267, n. 1, p. 250-8, 1993.

WELCH, B. L.; HENDLEY, E. D.; TUREK, I. Norepinephrine uptake into cerebral cortical synaptosomes after one fight or electroconvulsive shock. **Science.** v. 183, p. 220-1, 1974.

WEWERS, M. E. et al. The effect of chronic administration of nicotine on antinociception, opioid receptor binding and met-enkephalin levels in rats. **Brain Res.** v. 822, n. 1-2, p. 107-13, 1999.

WILCOX, C. E. et al. Enhanced cue reactivity and fronto-striatal functional connectivity in cocaine use disorders. **Drug Alcohol Depend.** v. 115, n. 1-2, p. 137-44, 2011.

WISE, R. A. Catecholamine theories of reward: a critical review. **Brain Res.** v. 152, n. 2, p. 215-47, 1978. Review.

WISE, R. A. et al. Elevations of nucleus accumbens dopamine and DOPAC levels during intravenous heroin self-administration. **Synapse.** v. 21, n. 2, p. 140-8, 1995.

WUO-SILVA, R. et al. Addictive potential of modafinil and cross-sensitization with cocaine: a pre-clinical study. **Addict Biol.** v. 16, n. 4, p. 565-79, 2011.

YAP, J. J. et al. Functional activity of ERK in the VTA upon social defeat stress-induced sensitization and escalated cocaine intake. In: Neuroscience Annual Meeting, 2009, Chicago, IL, EUA. **Abstracts/Annual Meeting Publications...** Chicago: Society for Neuroscience, 2009. Disponível em: <<http://www.abstractsonline.com/Plan/ViewAbstract.aspx?mID=2285&sKey=b93f4ff6-c294-4785-93a0-34549abe597a&cKey=b0a812da-cf99-4441-a114-bb8aa77677aa&mKey=%7b081F7976-E4CD-4F3D-A0AF-E8387992A658%7d>>. Acessado em: 02 fev. 2013.

YAP, J. J.; MICZEK, K. A. Social defeat stress, sensitization, and intravenous cocaine self-administration in mice. **Psychopharmacology (Berl).** v. 192, n. 2, p. 261-73, 2007.

YOUNG, S. T.; PORRINO, L. J.; IADAROLA, M. J. Cocaine induces striatal c-fos-immunoreactive proteins via dopaminergic D1 receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 88, n. 4. p. 1291-5, 1991.

ZAGO, A.; LEÃO, R. M.; CARNEIRO-DE-OLIVEIRA, P. E.; MARIN, M.T.; CRUZ, F. C.; PLANETA, C. S. Effects of simultaneous exposure to stress and nicotine on nicotine-induced locomotor activation in adolescent and adult rats. **Braz J Med Biol Res**. v. 45, n. 1, p. 33-7, 2012.

ZHAI, H. et al. Drug-induced alterations in the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signalling pathway: implications for reinforcement and reinstatement. **Cell Mol Neurobiol**. v. 28, n. 2, p. 157-72, 2008.

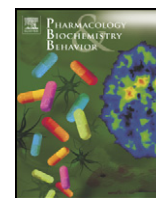
ZHANG, D. et al. The dopamine D1 receptor is a critical mediator for cocaine-induced gene expression. **J Neurochem**. v. 82, n. 6, p. 1453-64, 2002.

ZHANG, Z. et al. Dose- and time-dependent expression of anxiety-like behavior in the elevated plus-maze during withdrawal from acute and repeated intermittent ethanol intoxication in rats. **Alcohol Clin Exp Res**. v. 31, n. 11, p. 1811-9, 2007.

ZHENG, H.; PATTERSON, L. M.; BERTHOUD, H. R. CART in the dorsal vagal complex: sources of immunoreactivity and effects on Fos expression and food intake. **Brain Res**. v. 957, n. 2, p. 298-310, 2002.

ZISLIS, G. et al. Effects of the CRF receptor antagonist D-Phe CRF(12-41) and the alpha2-adrenergic receptor agonist clonidine on stress-induced reinstatement of nicotine-seeking behavior in rats. **Neuropharmacology**. v. 53, n. 8, p. 958-66, 2007.

APÊNDICE A - Stress induces behavioral sensitization, increases nicotine-seeking behavior and leads to a decrease of CREB in the nucleus accumbens



Stress induces behavioral sensitization, increases nicotine-seeking behavior and leads to a decrease of CREB in the nucleus accumbens

Rodrigo Molini Leão^{a,b}, Fábio Cardoso Cruz^a, Marcelo Tadeu Marin^a, Cleopatra da Silva Planeta^{a,b,*}

^a Laboratory of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Univ. Estadual Paulista—UNESP, Rod. Araraquara-Jaú Km 1, 14801-902, Araraquara, São Paulo, Brazil

^b Interinstitutional Graduate Program in Physiological Sciences, Federal University of São Carlos, Rod. Washington Luiz, Km 235, São Carlos, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 September 2011
Received in revised form 26 January 2012
Accepted 30 January 2012
Available online 6 February 2012

Keywords:

Stress
Nicotine
Self-administration
CREB
ERK

ABSTRACT

Experimental evidence shows that exposure to stress engenders behavioral sensitization and increases drug-seeking and leads to intense drug taking. However the molecular mechanisms involved in these processes is not well known yet. The present experiments examined the effects of exposure to variable stress on nicotine-induced locomotor activation, cAMP-response element-binding protein (CREB) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity and nicotine intravenous self-administration in rats. Male Wistar rats were exposed to variable stress that consisted of the exposure to different stressors twice a day in random order for 10 days. During this period the control group was left undisturbed except for cage cleaning. Ten days after the last stress episode, rats were challenged with either saline or nicotine (0.4 mg/kg s.c.) and the locomotor activity was recorded for 20 min. Immediately after behavioral recordings rats were sacrificed and their brains were removed to posterior western blotting analysis of CREB, phosphoCREB, ERK and phosphoERK in the nucleus accumbens. An independent set of control and stressed animals were subjected to an intravenous nicotine self-administration protocol. The break point during a progressive ratio schedule and nicotine intake patterns during a 24-hour binge was analyzed. Repeated variable stress caused a sensitized motor response to a single challenge of nicotine and decreased CREB in the nucleus accumbens. Furthermore, in the self-administration experiments previous stress exposure caused an increase in the break point and nicotine intake.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Several data point to a positive correlation between exposure to stress and increased vulnerability to drug addiction (Dembo et al., 1988; Gordon, 2002; Koob, 2008; Perkins, 1999; Sinha, 2001, 2008). In this sense, exposure to stress appears to increase the number of cigarettes smoked and is strongly associated with craving and relapse to tobacco smoking (Cohen and Lichtenstein, 1990; Kassel et al., 2003; Niaura and Abrams, 2002).

Pre-clinical studies have demonstrated that stress facilitated the acquisition of drug self-administration and promoted reinstatement of drug-seeking (Cruz et al., 2010; Haney et al., 1995; Kabbaj et al., 2001; Leão et al., 2009; Shalev et al., 2002). Several studies have demonstrated that rodents exposed to repeated stress procedures such as restraint, footshock or social defeat, displayed increased cocaine-taking and -seeking behaviors (Covington and Miczek, 2005; Piazza et al., 1990; Quadros and Miczek, 2009; Shaham and Stewart, 1994). Moreover, it has been shown that exposure to four social defeat sessions promoted escalated cocaine self-administration and increased the break-point

on progressive ratio sessions (Covington and Miczek, 2001; Cruz et al., 2011). Although the interplay between exposure to stress and cocaine self-administration has been well characterized, little is known about how repeated stress changes nicotine self-administration.

Repeated administration of drugs of abuse induces behavioral sensitization, as evidenced by an enhanced locomotor response to a subsequent injection of the drug (Clarke and Kumar, 1983; Domino, 2001; Kita et al., 1999; Shim et al., 2001). Similarly, repeated exposure to stress also induces augmented sensitivity to drug-induced hyperactivity that has been termed “cross-sensitization” between stress and drug (Miczek et al., 2008). Behavioral sensitization has been suggested as an animal model of neuroplasticity associated mainly with the development of drug addiction (Robinson and Becker, 1986; Robinson and Berridge, 1993; Vanderschuren and Kalivas, 2000) and drug-induced psychosis (Robinson and Becker, 1986). Although nicotine causes behavioral sensitization in rats (Cruz et al., 2005; Faraday et al., 2005), stress-induced cross-sensitization to nicotine remains controversial and seems to depend on intensity, duration or frequency of stressful events (Cruz et al., 2008; Kita et al., 1999). For example, Kita et al. (1999) demonstrated that rats subjected to repeated exposure to social stress displayed enhanced nicotine-induced behavioral sensitization. However, a study of our laboratory showed that previous exposure to restraint stress for 7 days did not affect nicotine-induced locomotor-activating effects in adult and adolescent rats (Cruz et al., 2008).

* Corresponding author at: Laboratory of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Univ. Estadual Paulista—UNESP, Rod. Araraquara-Jaú Km 1, 14801-902, Araraquara, São Paulo, Brazil. Tel.: +55 16 3301 6981; fax: +55 16 3301 6980.

E-mail address: cplaneta@fcar.unesp.br (C.S. Planeta).

Studies in animals have demonstrated that stress-induced cross-sensitization to psychostimulants might facilitate acquisition of cocaine self-administration and increase the break-point and cocaine intake during a 24-hour “binge” session (Covington and Miczek, 2001, 2005; Covington et al., 2008). Although prior exposure to stress, particularly when inducing sensitization, influences subsequent drug taking behavior (Covington and Miczek, 2001; Piazza et al., 1990), little is known about the interplay between sensitization to nicotine and its self-administration.

Stress-induced locomotor sensitization and escalated psychostimulant self-administration has been related to neuroplasticity in mesolimbic system (Nestler, 2005; Robinson and Berridge, 1993). Evidence points that changes in the expression and activity of cAMP-response element-binding protein (CREB) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) are involved in the development of behavioral sensitization and increased drug-taking behavior (Lu et al., 2006; Mattson et al., 2005; Pierce and Kalivas, 1997).

Recently, it has shown that repeated administration of cocaine enhanced the amount of phosphorylated ERK and CREB in the nucleus accumbens (NAc) (Berhow et al., 1996; Mattson et al., 2005). In contrast, chronic nicotine treatment decreased phosphorylated CREB in the NAc and this effect persisted at least for 18 h (Pandey et al., 2001; Pluzarev and Pandey, 2004). Exposure to stress is also related to changes in CREB and ERK activity. In this sense, Muschamp et al. (2011) demonstrated that the exposure to footshock stress enhanced CREB activity within the nucleus accumbens shell. In addition, Bruchas et al. (2008) reported that exposure to repeated forced swim stress caused a significant increase in phosphorylation of ERK in both the caudate and NAc regions of the mouse striatum. However changes in ERK and CREB pathways and its relation to the interplay between the exposure to stress and changes in nicotine effects have been poorly investigated.

Thus, the present study investigated the consequences of repeated exposure to variable stress on nicotine-induced locomotor activity and self-administration. The progressive-ratio schedule was used to assess possible elevations in the break-point parameter to receive nicotine. In addition, a 24-hour “binge” was employed to measure nicotine intake under conditions of prolonged access. In addition, we investigated whether changes in ERK and CREB activity in the NAc could be involved in stress-induced changes in nicotine behavioral effects.

2. Methods

2.1. Subjects

Male Wistar rats, 225–250 g at arrival, obtained from the animal breeding facility of the Univ. Estadual Paulista–UNESP were individually housed in plastic cages 19 cm (width) × 30 cm (length) × 14 cm (height).

Rats were continuously maintained on a reversed light cycle (12-hour:12-hour, lights off at 08:00 am) with controlled temperature (21 °C) and humidity (35–40%). During the entire nicotine self-administration protocol rats received 18 g rat chow per day provided in their home cage after each daily experimental session during the entire self-administration protocol. This feeding schedule resulted in a gradual weight gain of approximately 15 g/week. This observation is in line with other studies which have shown that the acquisition and maintenance of nicotine self-administration is extremely sensitive to conditions of feeding, and weight gain (Lang et al., 1977; Corrigan and Coen, 1989; Donny et al., 1995). Unlimited access to water was available throughout all experiments. All experiments were performed during the dark phase.

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Use of Human or Animal Subjects of the School of Pharmaceutical Science, UNESP (CEP-19/2008) and the experiments were conducted according to

ethics principles of the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, based on the NIH Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals.

2.2. Chronic stress

The chronic variable stress protocol, modified from Ortiz et al. (1996), consisted of exposure to different stressors twice a day for 10 days (Table 1). All stress sessions were performed in an adjacent room to the animal's facility. The control group was left undisturbed except for cleaning the cages. Ten days after the last stress session the animals were subjected either to the locomotor test or to the self-administration protocol.

2.3. Locomotor response to nicotine

2.3.1. Apparatus

Locomotor activity measures were conducted in commercially available (Columbus Instruments, Columbus, OH, USA) activity monitoring chambers, consisting of Plexiglas cages. The chambers, measuring 44 cm (width) × 44 cm (length) × 20 cm (height) cm included 10 pairs of photocells beams, which were used to measure the horizontal locomotor activity. The consecutive interruption of two beams was recorded as one locomotor count.

2.3.2. Locomotor measurement

Ten days after the last exposure to stress, animals were injected with a challenge dose of saline (1.0 ml/kg s.c.) (control n = 10; stress n = 11) or nicotine (0.4 mg/kg s.c.) (control n = 10; stress n = 10). Immediately following the injections, animals were put in an activity chamber and their locomotor activity was recorded during a 20-minute testing session as described above. Animals were allowed a 20-minute habituation period to the photocell apparatus immediately prior to injections. Animals from different groups were tested randomly during the dark phase between 10:00 am and 14:00 pm.

2.4. Molecular analysis

2.4.1. Collection of brains

Immediately after locomotor test brains were extracted and frozen in isopentane (−50 °C) within 30–45 s of decapitation and stored at −80 °C until dissection.

Table 1

Chronic variable stress protocol, consisting of exposure to different stressors twice a day for 10 days.

| Day | Stress procedure | |
|----------|--|--|
| 1st day | Restraint for 1 h (dark phase) | Wet bedding for 12 h (light phase) |
| 2nd day | Cold exposure (4 °C) for 1 h (dark phase) | Turn off the lights for 12 h (light phase) |
| 3rd day | Turn on the lights for 3 h (dark phase) | Forced swim for 4 min (dark phase) |
| 4th day | Food and water deprivation for 12 h (dark phase) | Stroboscopic light for 12 h (light phase) |
| 5th day | Forced swim for 3 min (dark phase) | Wet bedding for 12 h (dark phase) |
| 6th day | Restraint for 1 h (dark phase) | Food and water deprivation for 12 h (dark phase) |
| 7th day | Turn on the lights for 2 h (dark phase) | Wet bedding for 12 h (light phase) |
| 8th day | Cold exposure (4 °C) for 15 min (dark phase) | Turn off the lights for 12 h (light phase) |
| 9th day | Restraint for 1 h (dark phase) | Forced swim for 4 min (dark phase) |
| 10th day | Stroboscopic light for 12 h (dark phase) | Food and water deprivation for 12 h (dark phase) |

2.4.2. Western blotting analysis of CREB, phosphoCREB, ERK and phosphoERK

One-millimeter coronal slices of brain (rostral face approximately 2.0 mm from Bregma based on the atlas of Paxinos and Watson (2005)) were cut in a cryostat at -20°C . Tissue punches (blunt 14-gauge needle) were obtained from nucleus accumbens (see Fig. 1) and then sonicated in 1% sodium dodecyl sulfate (SDS). Tissues were kept frozen until sonication in SDS. Protein concentrations of the samples were determined using the method of Lowry (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Sample protein concentrations were equalized by diluting with 1% SDS. Samples of 30 μg of protein were then subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis for 3 h at 200 V. Proteins were transferred electrophoretically to polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane for immunoblotting (Hybond LFP transfer membrane—GE Healthcare, UK) at 0.3 Å for 3.5 h. Then 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 and then incubated overnight at 4°C in fresh blocking buffer (2% nonfat dry milk and 0.1% Tween 20 in Tris buffer (TTBS, pH 7.5)) containing two primary antibodies for each signaling protein: one antibody specifically labeled the phosphorylated form of the protein while the second antibody labeled non-phosphorylated (total CREB) of the same protein. Each pair of antibodies was chosen so that one was a rabbit antibody while the other was a mouse antibody. CREB phosphorylation levels were assessed using antibodies against total CREB (1:500; Cat# 9197; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) and phosphoCREB (1:1000; Cat# 05-807; Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). ERK activity levels were assessed using antibodies against total ERK (1:2000; Cat# 9102; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) and phospho ERK (1:1000; Cat# 7383; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). After incubation with primary antibodies, blots were washed and incubated for 1 h with anti-rabbit secondary antibodies labeled with fluorophor (ECL Plex, GE Healthcare®, Pittsburgh, PA, USA) (Cy5-anti-rabbit/1:3000 and Cy3-anti-mouse/1:5000). Fluorescence was assessed using a fluorescence scanner (Typhoon—GE Healthcare®, Pittsburgh, PA, USA), and bands were quantified using suitable software (Image Quant™—GE Healthcare®, Pittsburgh, PA, USA).

Equal protein loading was confirmed by stripping the blots and re-probing them with a monoclonal actin antibody (1:500; Cat# A5316 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), followed by incubation with respective secondary antibody (Cy5-anti-rabbit/1:3000) and visualization as described above.

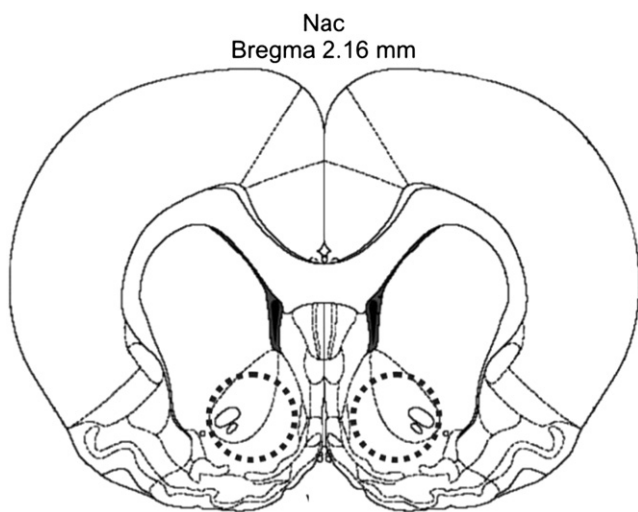


Fig. 1. Schematic sections of the rat brain, adapted from the stereotaxic atlas of Paxinos and Watson (2005), showing the location of punches in the nucleus accumbens (NAcc).

2.5. Intravenous drug self-administration

The general procedure to establish nicotine self-administration was adapted from George et al. (2007).

2.5.1. Apparatus

For nicotine self-administration the animals were put individually in Plexiglas experimental chambers ($30 \times 30.5 \times 24.5$ cm), enclosed in light- and sound attenuating boxes. The floor of the chambers consisted of a Plexiglas tray covered with sawdust. A hole in the ceiling allowed the passage and free movement of the tethered catheter (Strategic Applications Inc., Libertyville, IL, USA) that was connected to a counterbalanced swivel and an infusion pump (Insight Equipments®, Ribeirão Preto, SP, Brazil). The front wall of the chamber contained one interchangeable panel (Insight Equipments®, Ribeirão Preto, SP, Brazil). The panel was equipped with two levers, located 5 cm from the floor, two cue lights (red and green) above each lever and a session light in the middle of the panel (12 cm from the floor).

2.5.2. Drug

Nicotine 99% was obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). The dose of nicotine was chosen based on previous experiments conducted in our laboratory.

2.5.3. Training

Ten days after the last exposure to stress, animals were subjected to the training sections. Training consisted of three 60-minute sessions, in which each response on the active lever (alternated between left and right sides) was reinforced with the delivery of 0.2 ml sucrose (6%) (fixed ratio schedule of reinforcement; FR 1), followed by a 10-second time-out. Each rat was allowed continuous access to sucrose solution during the entire 60 min. Responding on the inactive lever had no scheduled consequence. Rats were deprived of water for 8 h before the beginning of the first sucrose training session.

2.5.4. Surgery

Twenty-four hours after the last training session, stressed and control rats were implanted with permanently indwelling catheters (Silastic™ silicon tubing, inner diameter = 0.63 mm, outer diameter = 1.17 mm) into the right jugular vein under a combination of ketamine (100.0 mg/kg) and xylazine (6.0 mg/kg) anesthesia. The catheter was passed subcutaneously to the rat's back where it exited through a small incision and was affixed to a plastic pedestal (Strategic Applications Inc., Libertyville, IL, USA) mounted inside a harness system (Strategic Applications Inc., Libertyville, IL, USA). Rats were allowed to recover from surgery for 5 days in their home cage with free access to food and water. To prevent inflammation and infection rats received cetoprophen 1% (5.0 mg/kg; i.m.), and cefazolin (10.0 mg/kg; i.v.) for three consecutive days following surgery.

The catheter was flushed daily with heparinized saline (20 IU/ml) and 0.2 ml of saline in order to maintain the catheter's patency.

2.5.5. Nicotine self-administration

After recovering from surgery all rats were initially given unlimited access to sucrose (6%) self-administration, in this procedure each lever press was reinforced with the delivery of 0.2 ml sucrose (6%) (fixed ratio schedule of reinforcement; FR 1), followed by a 10-second time-out. During self-administration sessions, a green cue light above the active lever signaled sucrose availability and a red cue light, also above the active lever, signaled sucrose delivery. During the time-out period, the green and red cue lights were extinguished and lever press were recorded but had no consequences. Each daily session was terminated after 60-minute of access. After three sessions of sucrose reinforcement nicotine self-administration was assessed during 3-hour sessions. Initially, nicotine (0.03 mg/kg per infusion) was infused (0.1 ml/s)

associated to sucrose 6% (0.2 ml v.o.) delivered on schedule of reinforcement (FR1) for the active lever. Responses on the inactive lever were recorded but had no programmed consequence. Each daily session was terminated after 10 drug infusions or 3 h of access, whichever occurred first. Simultaneous administration of sucrose and nicotine sessions was ended after completing 10 drug infusions within 3 h over two consecutive days. Following this period only nicotine (0.03 mg/kg per infusion) was infused (0.1 ml/s) on schedule of reinforcement (FR1) for the active lever. After completing 10 infusions of nicotine within 3 h over two consecutive days, the FR schedule was progressively increased to fixed ratio 3 (FR 3). Rats were maintained for at least four additional days on a limited access on FR 3 schedule before being examined during a progressive ratio schedule of reinforcement.

2.5.6. Progressive ratio schedule of drug reinforcement

After the acquisition and maintenance phase, self-administration according to a progressive ratio (PR) schedule of drug reinforcement was verified. The progression of response requirements followed the algorithm used in Hodos (1961): 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26... The final infusion delivered was defined as the break point. The PR session was terminated once the rat failed to obtain an infusion during 60 min. The average number of total responses and the last ratio completed across three PR trials for each individual rat was calculated.

2.5.7. 24-Hour unlimited access drug "binge"

After the final PR session, each rat was allowed one additional day of limited drug access (0.03 mg/kg per infusion of nicotine, FR3 schedule, total of 10 infusions). The very next day, a 24-hour binge protocol was implemented starting at 10:00 am. Each rat was allowed continuous access to drug infusions (0.03 mg/kg per infusion–0.1 ml/s) on FR1 schedule during the entire 24-hour binge. The amounts of drug self-administered as well as the pattern of responding were recorded. Lights were off during the whole binge session (Covington and Miczek, 2001). A bottle of water and 18 g rat chow were put in self-administration boxes in the beginning of the binge session.

2.6. Statistics

Data from the locomotor activity and molecular analysis were analyzed by two-way ANOVA considering group (stress vs control) and treatment (saline vs nicotine) factors. Newman–Keuls' test was employed for individual post-hoc comparisons.

Nicotine self-administration data were analyzed using Student's *t*-tests comparing stress and control groups. Significant differences are reported for $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Locomotor activity

Fig. 2 depicts the locomotor activity following a challenge injection of nicotine or saline, 10 days after the last exposure to variable stress.

Two-way ANOVA revealed significant differences in locomotor activity considering group [$F(1,33) = 5.4; p < 0.05$] and treatment factors [$F(1,33) = 5.96; p < 0.05$]. No significant interaction between factors was detected [$F(3,33) = 1.13; p > 0.05$]. Unprotected comparisons by Newman–Keuls test was performed, which revealed that stress-nicotine group showed higher locomotor activity when compared to the other groups, $p < 0.05$, revealing that exposure to variable stress promoted behavioral cross-sensitization to nicotine.

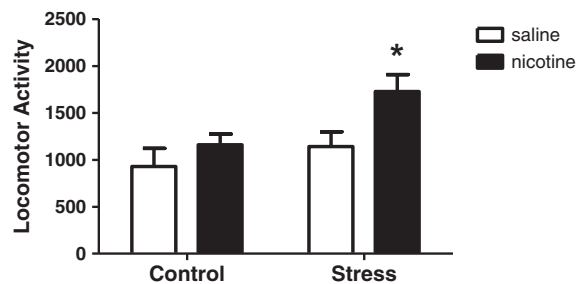


Fig. 2. Locomotor activity following saline or nicotine (0.4 mg/kg i.p.) challenge injections in rats exposed to chronic variable stress. Data represent mean \pm SEM (N = 10–11 animals per group) of cumulative locomotion counts recorded for 20 min immediately after injections. * $p < 0.05$ stress-nicotine group when compared to other groups.

3.2. Sucrose self-administration

Fig. 3 shows the daily sucrose consumption (3 days) in the stress and control group.

There were no significant differences for group or days factors [$F(3,33) = 0.44; p > 0.05$ and $F(3,33) = 0.67; p > 0.05$, respectively]. No significant interaction between factors was detected [$F(3,33) = 0.03; p > 0.05$].

3.3. Nicotine self-administration

3.3.1. Progressive ratio schedule

Fig. 4 shows the number of responses (A) and the last ratio achieved (B) in a progressive ratio schedule of control and stress group.

Student's *t*-test revealed a significant increase in the number of responses in the stress when compared to the control group ($t_{(15)} = 4.346; p < 0.001$). In addition, the final ratio achieved was higher in the stress group as compared to the control one ($t_{(15)} = 3.4; p < 0.05$) (Fig. 4).

3.3.2. Twenty-four hours unlimited access drug "binge"

Fig. 5 shows individual (A) and the mean (B) of total nicotine intake during 24-hour "binge" session of control and stressed animals.

Animals exposed to variable stress showed higher nicotine intake during a 24-hour "binge" session when compared to the control group ($t_{(13)} = 1.875; p < 0.05$; Student's *t*-test).

3.4. Western blotting analysis of CREB and ERK activity

3.4.1. CREB activity

Fig. 6 shows the western blotting analysis of total CREB and phospho-CREB in the nucleus accumbens of samples collected after locomotor activity tests.

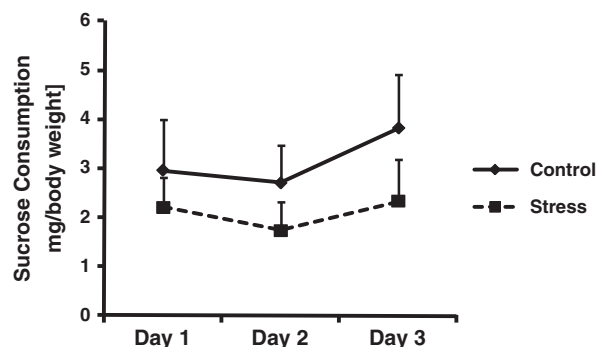


Fig. 3. Sucrose consumption of control or variable stress groups (mean \pm SEM of 9 animals per group).

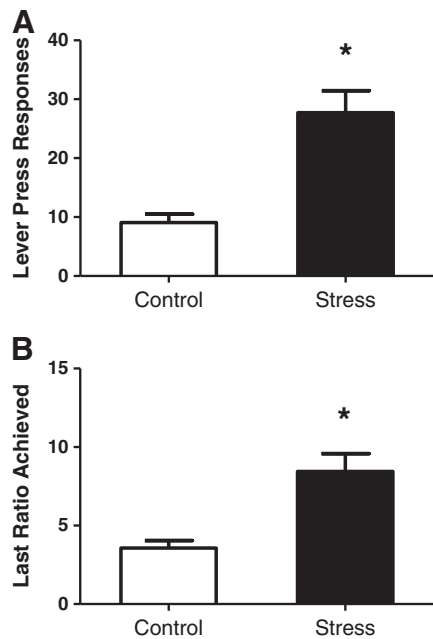


Fig. 4. Number of responses (A), and last ratio achieved (B) of nicotine (0.03 mg/kg per infusion; i.v.) in a progressive ratio schedule. Data represent mean \pm SEM of $N=8$ animals per group. * $p<0.05$ compared to the control group (Student's t -test).

For total CREB, ANOVA indicated a main effect for the stress [$F_{(1,25)}=7.73$; $p<0.01$], but not for the treatment factor [$F_{(1,25)}=0.23$; $p>0.05$]. No interaction between factors was detected [$F_{(1,25)}=0.4$; $p>0.05$].

Concerning phosphoCREB, ANOVA showed significant differences for stress [$F_{(1,26)}=8.60$; $p<0.01$] and treatment factors [$F_{(1,26)}=6.70$; $p<0.01$]. However, significant interaction between factors was not observed [$F_{(1,25)}=3.37$; $p>0.05$]. Unprotected Newman–Keuls post hoc test indicated that nicotine administration decreased phosphoCREB levels in the control group ($p<0.05$). In general, exposure to stress per se decreased total CREB and consequently CREB phosphorylation levels.

3.4.2. ERK activity

Fig. 7 shows the western blotting analysis of total ERK and phosphoERK in the nucleus accumbens of samples collected after locomotor activity test.

Two-way ANOVA of total ERK did not reveal significant differences for stress [$F_{(1,36)}=0.47$; $p>0.05$] or treatment factors [$F_{(1,36)}=0.11$; $p>0.05$]. No interaction was observed between the factors [$F_{(1,36)}=0.05$; $p>0.05$].

Concerning phosphoERK, ANOVA did not show significant differences for stress [$F_{(1,36)}=2.62$; $p>0.05$] or treatment factors [$F_{(1,36)}=0.19$; $p>0.05$]. No interaction was observed between the factors [$F_{(1,36)}=0.002$; $p>0.05$].

4. Discussion

The findings of the present study suggest that exposure to chronic variable stress promotes long-lasting behavioral consequences as well as neural plasticity that can be related to enhanced nicotine self-administration. Specifically, exposure to variable stress promoted locomotor sensitization to nicotine and increased patterns of nicotine self-administration when assessed by progressive ratio and escalated intake of nicotine during the unlimited access binge. Additionally, exposure to variable stress reduced total CREB and phosphoCREB within the nucleus accumbens. To our knowledge this is the first study on the interplay between neural plasticity induced by repeated exposure to stress and nicotine self-administration.

Our findings on cross-sensitization between variable stress and nicotine are in accordance with a previous study showing that exposure to psychological stress daily, for 10 days, caused sensitization to nicotine-induced ambulatory stimulation (Kita et al., 1999). In contrast, other studies have demonstrated that exposure to repeated restraint stress did not promote cross-sensitization to nicotine (Cruz et al., 2008; Faraday et al., 2003; McCormick and Ibrahim, 2007). These data suggest that stress-induced sensitization to the locomotor effects of nicotine might depend on kind and intensity of the stress regimen. Our results also corroborate studies for other substances demonstrating that chronic exposure to stress enhanced the locomotor response to a subsequent drug administration. For instance, cross-sensitization to psychostimulants has been observed after repeated footshock (Kalivas and Duffy, 1989; Sorg and Kalivas, 1991), restraint (Araujo et al., 2003; Hahn et al., 1986), food restriction (Cabib and Puglisi-Allegra, 1994), and social defeat stress (Covington and Miczek, 2001; Yap and Miczek, 2007).

Behavioral sensitization has been proposed as an animal model that may reflect molecular changes in mesocorticolimbic system related to drug addiction (Berridge and Robinson, 1998; Robinson and Berridge, 1993). The mesocorticolimbic pathway is involved with many complex drug responses such as psychomotor and motivated behavioral responses (Everitt and Robbins, 2005; Robinson and Berridge, 2003). Thus, changes in this system might cause locomotor sensitization and alterations in motivated responses as well (Robinson and Berridge, 2003; Berridge, 2007). To address this issue we evaluated the effects of stress on nicotine-seeking behavior through intravenous self-administration, which is considered the most reliable and predictive experimental model for evaluation drug-reinforcing effects in animals (Panlilio and Goldberg, 2007). Although this method is considered a

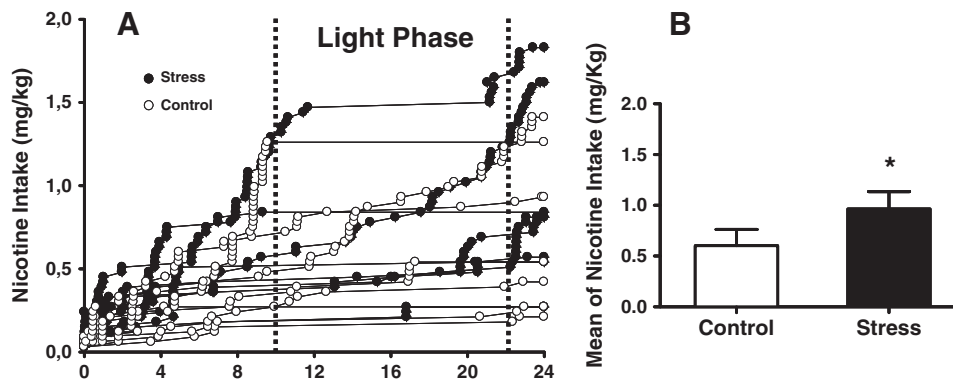


Fig. 5. Individual intake of nicotine (A) (0.03 mg/kg per infusion; i.v.) of control or stress groups; total nicotine intake (mg/kg) during a 24-hour binge session (B). Data represent mean \pm SEM of 8–9 animals per group. * $p<0.05$ compared to the control group (Student's t -test).

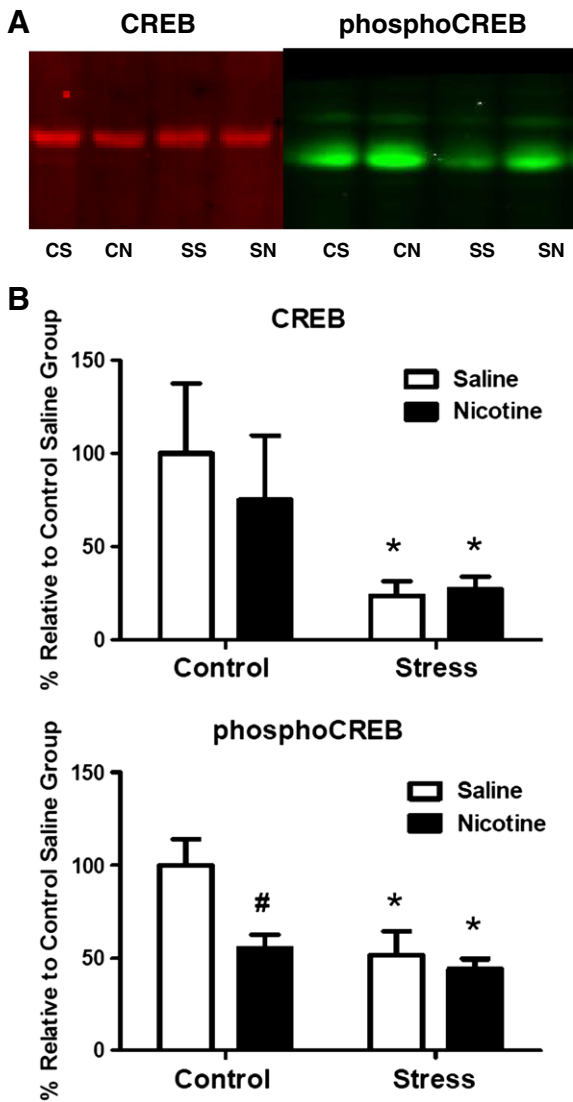


Fig. 6. (A) Representative membrane with fluorescent bands from Western blots of CREB and phosphoCREB (CS: control-saline; CN: control-nicotine; SS: stress-saline; SN: stress-nicotine). (B) Western blotting analysis of total CREB and phosphoCREB in the nucleus accumbens in samples collected after locomotor activity tests. Data represent \pm SEM of 9–10 animals per group. * $p < 0.05$ when compared to the control saline group; # $p < 0.01$ when compared to the control saline group.

model with a high face and predictive validity (Clemens et al., 2010; Thomsen and Caine, 2007), the nicotine self-administration protocol is difficult to perform because the reinforcing effect of this drug is relatively lower compared to other drugs of abuse (Caggiula et al., 2002; Donny et al., 1995, 2000). To obtain a robust pattern of nicotine self-administration the association between environmental cues and lever pressing is strictly necessary (Caggiula et al., 2002). We used a protocol in which each nicotine reinforcement was paired to an environmental cue (light). Using this procedure our animals showed a pattern of nicotine self-administration similar to that observed by Clemens et al. (2010) and Wouda et al. (2011).

In the self-administration protocol the break-point under PR schedule presumably reflects the motivation of the animal to self-administer a drug (Depoortere et al., 1993; Hodos, 1961; Richardson and Roberts, 1996). In our study, the PR schedule revealed a significant increase in the break-point in stress-sensitized rats relative to controls, suggesting that exposure to stress increases the motivation to nicotine self-administration. These data are consistent with other findings showing that exposure to four episodes of defeat stress produces behavioral sensitization and increases the break-point to obtain cocaine during a

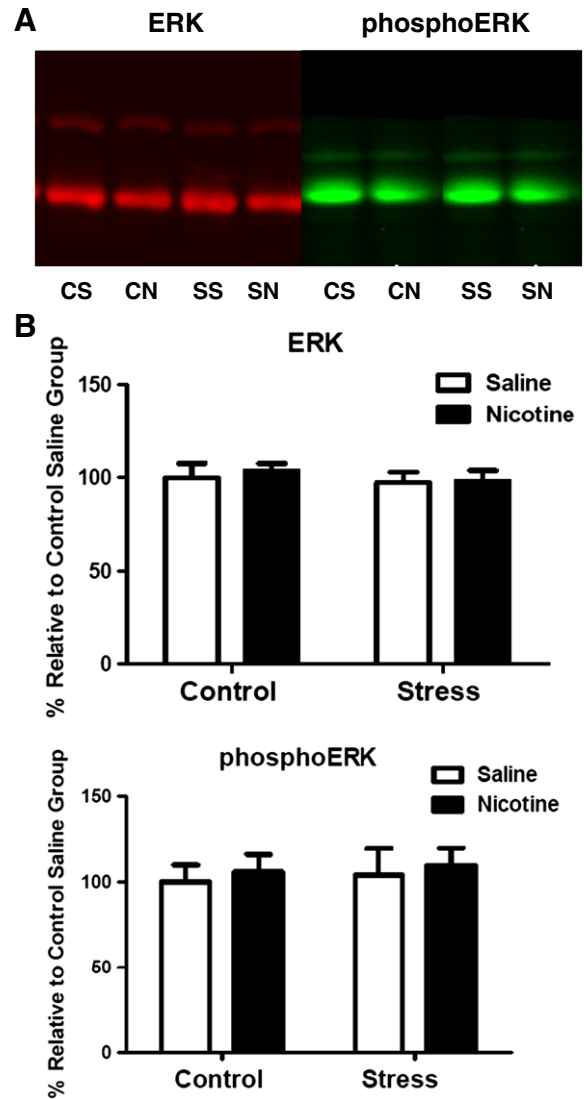


Fig. 7. (A) Representative membrane with fluorescent bands from Western blots of ERK and phosphoERK (CS: control-saline; CN: control-nicotine; SS: stress-saline; SN: stress-nicotine). (B) Western blotting analysis of total ERK and phosphoERK in the nucleus accumbens in samples collected after locomotor activity tests. Data represent \pm SEM of 9–10 animals per group.

PR schedule (Covington and Miczek, 2001). Similarly, it was demonstrated that rats exposed to footshock stress displayed augmented PR break points for heroin relative to their controls (Shaham and Stewart, 1994).

Our protocol of prolonged access (binge) to nicotine self-administration produced a robust cumulative intake (24 h) (0.6 mg/kg) that was similar to data reported in other studies (0.18–1.5 mg/kg/day) (Caggiula et al., 2001, 2002; LeSage et al., 2003). Using this protocol we demonstrated that exposure to variable stress increased nicotine-seeking behavior assessed during a 24-hour binge session. These results corroborate with others showing that previous exposure to stress increase cocaine and amphetamine intake (Covington and Miczek, 2005; Goeders and Guerin, 1994; Haney et al., 1995; Miczek and Mutschler, 1996; Piazza et al., 1990; Shaham and Stewart, 1994). Our findings are also in accordance with clinical data showing that stress exposure increases the number of cigarettes smoked (Cohen and Lichtenstein, 1990; Kassel et al., 2003; Niaura et al., 2002).

It is important to note that the relationship between stress-induced sensitization to nicotine and increased nicotine self-administration has been poorly investigated. The lack of literature limits further discussions. Most of studies cited above concerns to psychostimulants. However, in

spite of the similar behavioral responses of nicotine and psychostimulants to stress, we should consider that nicotine has a different mechanism of action on the dopaminergic system (Barik and Wonnacott, 2009).

Concerning sucrose consumption no significant differences were observed in the sucrose intake between stress and control groups. Thus, these results suggest that sucrose did not influence the acquisition of nicotine self-administration. Moreover, our results show that stress did not alter the consumption of the natural reinforce, suggesting that stress promotes changes in mesolimbic system that could be specific to drugs.

Long-lasting stress-induced sensitization to drugs and increased drug self-administration, as demonstrated in our study, has been associated with enduring changes in central dopaminergic system (del Rosario et al., 2002; Miczek et al., 2008; Paulson et al., 1991; Rougé-Pont et al., 1995; Yap et al., 2006). Indeed, it has been demonstrated that exposure to chronic stress induces several neuroadaptations in the NAc (Cadoni et al., 2003; Der-Avakian et al., 2006; Miczek et al., 2008; Prasad et al., 1995; Shirayama and Chaki, 2006). For instance, Miczek et al. (2011) showed that rats exposed to intermittent sessions of social defeat stress displayed a sensitized dopamine response to stress in the nucleus accumbens.

Stress can also alter the activity of CREB (via phosphorylation) in the NAc and this may affect motivated behaviors (Carlezon et al., 1998; Pliakas et al., 2001). Both increase and decrease in CREB activity in nucleus accumbens has been observed depending on the stress protocol (Barrot et al., 2005; Muschamp et al., 2011). Pliakas et al. (2001) showed that forced swim stress increase CREB in the NAc shell. In contrast, Wallace et al. (2009) showed that the exposure to social isolation stress leads to decreases in CREB activity within the NAc shell. Our results demonstrated that exposure to variable stress decreased total CREB and consequently CREB activity (evidenced by a reduction of phosphoCREB) in the nucleus accumbens. These results corroborate others showing that exposure to chronic unpredictable stress leads to decreases in phosphoCREB in the striatum (Laifenfeld et al., 2005; Trentani et al., 2002). However, it is important to point out that total CREB levels were also diminished by stress, suggesting changes in the CREB gene expression.

Decreased CREB activity in the nucleus accumbens has been associated with enhanced drug reward (Briand and Blendy, 2010; Carlezon et al., 1998). For example, it was reported that elevated CREB in the NAc impairs cocaine- and morphine-induced conditioned place preference (Barrot et al., 2002; Carlezon et al., 1998). Moreover, increased CREB activity in the striatum has also been related to a decrease in motivation of rats to self-administer cocaine (Hollander et al., 2010). Conversely, Barrot et al. (2002) showed that elevated CREB in the NAc reduced the sensitivity to rewarding brain stimulation. Taken together, our results suggest the increase in break-point and escalation of nicotine self-administration in stressed animals might be related to the decrease in CREB activity in the NAc observed after exposure to variable stress.

We also observed that acute nicotine administration reduces CREB phosphorylation in both control and stress groups. These results contrast with other findings showing that acute nicotine treatments did not alter phosphoCREB levels in the NAc (Brunzell et al., 2003; Pandey et al., 2001; Pluzarev and Pandey, 2004). However, in these studies they used a higher dose of nicotine (2.0 mg/kg) (Pandey et al., 2001; Pluzarev and Pandey, 2004) a different specie (mouse), and route of administration (oral) (Brunzell et al., 2003) when compared to our study.

Evidence shows that ERK can be activated by phosphoCREB (Nakayama et al., 2001; Ying et al., 2002). Since we found decreased CREB activation in the NAc, we could expect that phosphoERK levels would also be reduced in this brain area. However, our results did not show changes in phosphorylated ERK following exposure to variable stress or acute nicotine. Indeed ERK activity can be regulated by other pathways such as cAMP-dependent protein kinase (PKA) and calcium/calmodulin-dependent kinases (CaMKs) (Sgambato et

al., 1998; Thomas and Haganir, 2004; Xing et al., 1996). Future studies should address this issue.

In summary, the current results show that exposure to variable stress induces long-lasting behavioral sensitization and increases the motivation to nicotine intake corroborating clinical findings showing the relationship between stress exposure and tobacco addiction.

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) fellowship 2008/10691-2 to RML and grant 08/01744-5 to CSP.

References

- Araujo AP, DeLucia R, Scavone C, Planeta CS. Repeated predictable or unpredictable stress: effects on cocaine-induced locomotion and cyclic AMP-dependent protein kinase activity. *Behav Brain Res* 2003;139(1–2):75–81.
- Barik J, Wonnacott S. Molecular and cellular mechanisms of action of nicotine in the CNS. *Handb Exp Pharmacol* 2009(192):173–207. Review.
- Barrot M, Olivier JD, Perrotti LI, DiLeone RJ, Bertoni O, Eisch AJ, et al. CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(17):11435–40.
- Barrot M, Wallace DL, Bolaños CA, Graham DL, Perrotti LI, Neve RL, et al. Regulation of anxiety and initiation of sexual behavior by CREB in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(23):8357–62.
- Berhow MT, Hiroi N, Nestler EJ. Regulation of ERK (extracellular signal regulated kinase), part of the neurotrophin signal transduction cascade, in the rat mesolimbic dopamine system by chronic exposure to morphine or cocaine. *J Neurosci* 1996;16(15):4707–15.
- Berridge KC. The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology (Berl)* 2007;191(3):391–431. Review.
- Berridge KC, Robinson TE. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev* 1998;28(3):309–69. Review.
- Briand LA, Blendy JA. Molecular and genetic substrates linking stress and addiction. *Brain Res* 2010;1314:219–34. Review.
- Bruchas MR, Xu M, Chavkin C. Repeated swim stress induces kappa opioid-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Neuroreport* 2008;19(14):1417–22.
- Brunzell DH, Russell DS, Picciotto MR. In vivo nicotine treatment regulates mesocorticolimbic CREB and ERK signaling in C57Bl/6j mice. *J Neurochem* 2003;84(6):1431–41.
- Cabib S, Puglisi-Allegra S. Opposite responses of mesolimbic dopamine system to controllable and uncontrollable aversive experiences. *J Neurosci* 1994;14:3333–40.
- Cadoni C, Solinas M, Valentini V, Di Chiara G. Selective psychostimulant sensitization by food restriction: differential changes in accumbens shell and core dopamine. *Eur J Neurosci* 2003;18(8):2326–34.
- Caggiola AR, Donny EC, White AR, Chaudhri N, Booth S, Gharib MA, et al. Cue dependency of nicotine self-administration and smoking. *Pharmacol Biochem Behav* 2001;70(4):515–30. Review.
- Caggiola AR, Donny EC, White AR, Chaudhri N, Booth S, Gharib MA, et al. Environmental stimuli promote the acquisition of nicotine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2002;163:230–7.
- Carlezon Jr WA, Thome J, Olson VG, Lane-Ladd SB, Brodick ES, Hiroi N, et al. Regulation of cocaine reward by CREB. *Science* 1998;282(5397):2272–5.
- Clarke PBS, Kumar R. The effects of nicotine on locomotor activity in nontolerant and tolerant rats. *Br J Pharmacol* 1983;78:587–94.
- Clemens KJ, Caillé S, Cadore M. The effects of response operandum and prior food training on intravenous nicotine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2010;211(1):43–54.
- Cohen S, Lichtenstein E. Perceived stress, quitting smoking, and smoking relapse. *Health Psychol* 1990;9:466–8.
- Corrigall WA, Coen KM. Nicotine maintains robust self-administration in rats on a limited access schedule. *Psychopharmacology (Berl)* 1989;99:473–8.
- Covington III HE, Miczek KA. Repeated social-defeat stress, cocaine or morphine: effects on behavioral sensitization and intravenous cocaine self-administration “binges”. *Psychopharmacology (Berl)* 2001;158:388–99.
- Covington III HE, Miczek KA. Intense cocaine self-administration after episodic social defeat stress, but not after aggressive behavior: dissociation from corticosterone activation. *Psychopharmacology (Berl)* 2005;183(3):331–40.
- Covington III HE, Tropea TF, Rajadhyaksha AM, Kosofsky BE, Miczek KA. NMDA receptors in the rat VTA: a critical site for social stress to intensify cocaine taking. *Psychopharmacology (Berl)* 2008;197(2):203–16.
- Cruz FC, DeLucia R, Planeta CS. Differential behavioral and neuroendocrine effects of repeated nicotine in adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;80(3):411–7.
- Cruz FC, DeLucia R, Planeta CS. Effects of chronic stress on nicotine-induced locomotor activity and corticosterone release in adult and adolescent rats. *Addict Biol* 2008;13(1):63–9.

- Cruz FC, Leão RM, Marin MT, Planeta CS. Stress-induced reinstatement of amphetamine-conditioned place preference and changes in tyrosine hydroxylase in the nucleus accumbens in adolescent rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2010;96(2):160–5.
- Cruz FC, Quadros IM, Hogenelst K, Planeta CS, Miczek KA. Social defeat stress in rats: escalation of cocaine and “speedball” binge self-administration, but not heroin. *Psychopharmacology (Berl)* 2011;215(1):165–75.
- del Rosario CN, Pacchioni AM, Cancela LM. Influence of acute or repeated restraint stress on morphine-induced locomotion: involvement of dopamine, opioid and glutamate receptors. *Behav Brain Res* 2002;134(1–2):229–38.
- Dembo R, Dertke M, Borders S, Washburn M, Schmeidler J. The relationship between physical and sexual abuse and tobacco, alcohol, and illicit drug use among youths in a juvenile detention center. *Int J Addict* 1988;23(4):351–78.
- Depoortere RY, Li DH, Lane JD, Emmett-Oglesby MW. Parameters of self-administration of cocaine in rats under a progressive-ratio schedule. *Pharmacol Biochem Behav* 1993;45:539–48.
- Der-Avakian A, Bland ST, Schmid MJ, Watkins LR, Spencer RL, Maier SF. The role of glucocorticoids in the uncontrollable stress-induced potentiation of nucleus accumbens shell dopamine and conditioned place preference responses to morphine. *Psychoneuroendocrinology* 2006;31(5):653–63.
- Domino F. Nicotine induced behavioral locomotor sensitization. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2001;25:59–71.
- Donny EC, Caggiula AR, Knopf S, Brown C. Nicotine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 1995;122(4):390–4.
- Donny EC, Caggiula AR, Rose C, Jacobs KS, Mielke MM, Sved AF. Differential effects of response-contingent and response-independent nicotine in rats. *Eur J Pharmacol* 2000;402(3):231–40.
- Everitt BJ, Robbins TW. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 2005;8(11):1481–9. Review. Erratum in: *Nat Neurosci* 2005;9(7):979.
- Faraday MM, Elliott BM, Phillips JM, Grunberg NE. Adolescent and adult male rats differ in sensitivity to nicotine's activity effects. *Pharmacol Biochem Behav* 2003;74:917–31.
- Faraday MM, Blakeman KH, Grunberg NE. Strain and sex alter effects of stress and nicotine on feeding, body weight, and HPA axis hormones. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;80(4):577–89.
- George O, Ghazizadeh S, Azar MR, Cottone P, Zorrilla EP, Parsons LH, et al. CRF-CRF1 system activation mediates withdrawal-induced increases in nicotine self-administration in nicotine-dependent rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:17198–203.
- Goeders NE, Guerin GF. Non-contingent electric footshock facilitates the acquisition of intravenous cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 1994;114(1):63–70.
- Gordon HW. Early environmental stress and biological vulnerability to drug abuse. *Psychoneuroendocrinology* 2002;27:115–26.
- Hahn B, Zacharko RM, Anisman H. Alterations of amphetamine elicited perseveration and locomotor excitation following acute and repeated stressor application. *Pharmacol Biochem Behav* 1986;25(1):29–33.
- Haney M, Maccari S, Le Moal M, Simon H, Piazza PV. Social stress increases the acquisition of cocaine self-administration in male and female rats. *Brain Res* 1995;698(1–2):46–52.
- Hodos W. Progressive ratio as a measure of reward strength. *Science* 1961;134:943–4.
- Hollander JA, Im HI, Amelio AL, Kocerha J, Bali P, Lu Q, et al. Striatal microRNA controls cocaine intake through CREB signalling. *Nature* 2010;466(7303):197–202.
- Kabbaj M, Norton CS, Kollack-Walker S, Watson SJ, Robinson TE, Akil H. Social defeat alters the acquisition of cocaine self-administration in rats: role of individual differences in cocaine-taking behavior. *Psychopharmacology (Berl)* 2001;158(4):382–7.
- Kalivas PW, Duffy P. Similar effects of daily cocaine and stress on mesocorticolimbic dopamine neurotransmission in the rat. *Biol Psychiatry* 1989;25(7):913–28.
- Kassel JD, Stroud LR, Paronis CA. Smoking, stress, and negative affect: correlation, causation, and context across stages of smoking. *Psychol Bull* 2003;129:270–304.
- Kita T, Okamoto M, Kubo K, Tanaka T, Nakashima T. Enhancement of sensitization to nicotine-induced ambulatory stimulation by psychological stress in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1999;23:893–903.
- Koob GF. Neurobiological substrates for the dark side of compulsivity in addiction. *Neuropharmacology* 2008;1:18–31. Review.
- Laifenfeld D, Karry R, Grauer E, Klein E, Ben-Shachar D. Antidepressants and prolonged stress in rats modulate CAM-11, laminin, and pCREB, implicated in neuronal plasticity. *Neurobiol Dis* 2005;20(2):432–41.
- Lang WJ, Latif AA, McQueen A, Singer G. Self-administration of nicotine with and without a food delivery schedule. *Pharmacol Biochem Behav* 1977;7:65–70.
- Leão RM, Cruz FC, Planeta CS. Exposure to acute restraint stress reinstates nicotine-induced place preference in rats. *Behav Pharmacol* 2009;20(1):109–13.
- LeSage MG, Keyler DE, Collins G, Pentel PR. Effects of continuous nicotine infusion on nicotine self-administration in rats: relationship between continuously infused and self-administered nicotine doses and serum concentrations. *Psychopharmacology (Berl)* 2003;170(3):278–86.
- Lu L, Koya E, Zhai H, Hope BT, Shaham Y. Role of ERK in cocaine addiction. *Trends Neurosci* 2006;29(12):695–703. Review.
- Mattson BJ, Bossert JM, Simmons DE, Nozaki N, Nagarkar D, Kreuter JD, 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* 2005;95(5):1481–94.
- McCormick CM, Ibrahim FN. Locomotor activity to nicotine and Fos immunoreactivity in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in adolescent socially-stressed rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2007;86(1):92–102.
- Miczek KA, Mutschler NH. Activational effects of social stress on IV cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 1996;128(3):256–64.
- Miczek KA, Yap JJ, Covington III HE. Social stress, therapeutics and drug abuse: preclinical models of escalated and depressed intake. *Pharmacol Ther* 2008;120(2):102–28.
- Miczek KA, Nikulina EM, Shimamoto A, Covington III HE. Escalated or suppressed cocaine reward, tegmental BDNF, and accumbal dopamine caused by episodic versus continuous social stress in rats. *J Neurosci* 2011;31(27):9848–57.
- Muschamp JW, Van't Veer A, Parsegian A, Gallo MS, Chen M, Neve RL, et al. Activation of CREB in the nucleus accumbens shell produces anhedonia and resistance to extinction of fear in rats. *J Neurosci* 2011;31(8):3095–103. Feb 23.
- Nakayama H, Numakawa T, Ikeuchi T, Hatanaka H. Nicotine-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase and CREB in PC12h cells. *J Neurochem* 2001;79(3):489–98.
- Nestler EJ. The neurobiology of cocaine addiction. *Sci Pract Perspect* 2005;3(1):4–10.
- Niaura R, Abrams DB. Smoking cessation: progress, priorities, and prospectus. *J Consult Clin Psychol* 2002;70(3):494–509.
- Niaura R, Shadel WG, Britt DM, Abrams DB. Response to social stress, urge to smoke, and smoking cessation. *Addict Behav* 2002;27:241–50.
- Ortiz J, Fitzgerald LW, Lane S, Terwillinger R, Nestler EJ. Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to repeated stress. *Neuropsychopharmacology* 1996;14:443–52.
- Pandey SC, Roy A, Xu T, Mittal N. Effects of protracted nicotine exposure and withdrawal on the expression and phosphorylation of the CREB gene transcription factor in rat brain. *J Neurochem* 2001;77(3):943–52.
- Panlilio LV, Goldberg SR. Self-administration of drugs in animals and humans as a model and an investigative tool. *Addiction* 2007;102(12):1863–70. Review.
- Paulson PE, Camp DM, Robinson TE. Time course of transient behavioral depression and persistent behavioral sensitization in relation to regional brain monoamine concentrations during amphetamine withdrawal in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 1991;103:480–92.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.
- Perkins KA. Nicotine self-administration. *Nicotine Tob Res. Suppl* 1999;2:S133–7. discussion S139–140. Review.
- Piazza PV, Deminiere JM, Le Moal M, Simon H. Stress- and pharmacologically-induced behavioral sensitization increases vulnerability to acquisition of amphetamine self-administration. *Brain Res* 1990;514(1):22–6.
- Pierce RC, Kalivas PW. A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Brain Res Rev* 1997;25(2):192–216. Review.
- Pliakas AM, Carlson RR, Neve RL, Konradi C, Nestler EJ, Carlezon Jr WA. Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated cAMP response element-binding protein expression in nucleus accumbens. *J Neurosci* 2001;21(18):7397–403.
- Pluzarev O, Pandey SC. Modulation of CREB expression and phosphorylation in the rat nucleus accumbens during nicotine exposure and withdrawal. *J Neurosci Res* 2004;77(6):884–91.
- Prasad BM, Sorg BA, Ulibarri C, Kalivas PW. Sensitization to stress and psychostimulants. Involvement of dopamine transmission versus the HPA axis. *Ann N Y Acad Sci* 1995;771:617–25.
- Quadros IM, Miczek KA. Two modes of intense cocaine bingeing: increased persistence after social defeat stress and increased rate of intake due to extended access conditions in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2009;206(1):109–20.
- Richardson NR, Roberts DC. Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *J Neurosci Methods* 1996;66(1):1–11.
- 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* 1986;396(2):157–98. Review.
- Robinson TE, Berridge KC. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Rev* 1993;18:247–91.
- Robinson TE, Berridge KC. Addiction. *Annu Rev Psychol* 2003;54:25–53. Review.
- Rougé-Pont F, Marinelli M, Le Moal M, Simon H, Piazza PV. Stress-induced sensitization and glucocorticoids. II. Sensitization of the increase in extracellular dopamine induced by cocaine depends on stress-induced corticosterone secretion. *J Neurosci* 1995;15(11):7189–95.
- Sgambato V, Pagès C, Rogard M, Besson MJ, Caboche J. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) controls immediate early gene induction on corticostriatal stimulation. *J Neurosci* 1998;18(21):8814–25.
- Shaham Y, Stewart J. Exposure to mild stress enhances the reinforcing efficacy of intravenous heroin self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 1994;114(3):523–7.
- Shalev U, Grimm JW, Shaham Y. Neurobiology of relapse to heroin and cocaine seeking: a review. *Pharmacol Rev* 2002;54(1):1–42. Review.
- Shim I, Javadi JJ, Wirtshafter D, Jang SY, Shin KH, Lee HJ, 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* 2001;121:137–47.
- Shirayama Y, Chaki S. Neurochemistry of the nucleus accumbens and its relevance to depression and antidepressant action in rodents. *Curr Neuropharmacol* 2006;4(4):277–91.
- Sinha R. How does stress increase risk of drug abuse and relapse? *Psychopharmacology (Berl)* 2001;158:343–59.
- Sinha R. Chronic stress, drug use, and vulnerability to addiction. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1141:105–30. Review.
- Sorg BA, Kalivas PW. Effects of cocaine and footshock stress on extracellular dopamine levels in the ventral striatum. *Brain Res* 1991;559(1):29–36.

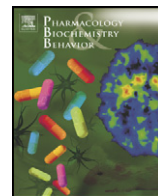
- Thomas GM, Huganir RL. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 2004;5(3):173–83. Review.
- Thomsen M, Caine SB. Intravenous drug self-administration in mice: practical considerations. *Behav Genet* 2007;37(1):101–18. Review.
- Trentani A, Kuipers SD, Ter Horst GJ, Den Boer JA. Selective chronic stress-induced in vivo ERK1/2 hyperphosphorylation in medial prefrontocortical dendrites: implications for stress-related cortical pathology? *Eur J Neurosci* 2002;15(10):1681–91.
- Vanderschuren LJ, Kalivas PW. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl)* 2000;151:99–120.
- Wallace DL, Han MH, Graham DL, Green TA, Vialou V, Iñiguez SD, et al. CREB regulation of nucleus accumbens excitability mediates social isolation-induced behavioral deficits. *Nat Neurosci* 2009;12(2):200–9.
- Wouda JA, Riga D, De Vries W, Stegeman M, van Mourik Y, Schetters D, et al. Varenicline attenuates cue-induced relapse to alcohol, but not nicotine seeking, while reducing inhibitory response control. *Psychopharmacology (Berl)* 2011;216(2):267–77.
- Xing J, Ginty DD, Greenberg ME. Coupling of the RAS–MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 1996;273(5277):959–63.
- Yap JJ, Miczek KA. Social defeat stress, sensitization, and intravenous cocaine self-administration in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 2007;192(2):261–73.
- Yap JJ, Takase LF, Kochman LJ, Fornal CA, Miczek KA, Jacobs BL. Repeated brief social defeat episodes in mice: effects on cell proliferation in the dentate gyrus. *Behav Brain Res* 2006;172(2):344–50.
- Ying SW, Futter M, Rosenblum K, Webber MJ, Hunt SP, Bliss TV, et al. Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis. *J Neurosci* 2002;22(5):1532–40.

APÊNDICE B - Enhanced nicotine-seeking behavior following pre-exposure to repeated cocaine is accompanied by changes in BDNF in the nucleus accumbens of rats.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Pharmacology, Biochemistry and Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh

Enhanced nicotine-seeking behavior following pre-exposure to repeated cocaine is accompanied by changes in BDNF in the nucleus accumbens of rats[☆]

Rodrigo M. Leão^{a,b}, Paulo E. Carneiro-de-Oliveira^{a,b}, Daniella B. Rossetto^c, Sandro R. Valentini^c, Clelei F. Zanelli^c, Fábio C. Cruz^a, Cleopatra S. Planeta^{a,b,*}

^a Laboratory of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Univ. Estadual Paulista UNESP, Rod. Araraquara-Jaú Km 1, 14801-902, Araraquara, São Paulo, Brazil

^b Joint Graduate Program in Physiological Sciences UFSCar/UNESP, Rod. Washington Luis, km 235 – São Carlos, São Paulo, Brazil, 13565-905/Faculdade de Odontologia de Araraquara - Rua Humaitá, 1680, Araraquara, São Paulo 14801-903, Brazil

^c Department of Biological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, UNESP - Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 August 2012

Received in revised form 26 December 2012

Accepted 10 January 2013

Available online xxxx

Keywords:

BDNF

Cocaine

Gene expression

Locomotor activity

Nicotine

RT-PCR

Self-administration

ABSTRACT

We investigated the behavioral and molecular interactions between cocaine and nicotine, through evaluating locomotor activity, nicotine intravenous self-administration and gene expression. Locomotor sensitization was induced in male Wistar rats by repeated cocaine (20 mg/kg; i.p.) or saline injections once a day over 7 days. Three days after the last injection, rats were challenged with either saline or cocaine (15 mg/kg; i.p.) and the locomotor activity was measured. The very next day animals received either saline or nicotine (0.4 mg/kg; s.c.) and the locomotor cross-sensitization was tested. Animals were then prepared with intrajugular catheters for nicotine self-administration. Nicotine self-administration patterns were evaluated using fixed or progressive ratio schedules of reinforcement and a 24-h unlimited access binge. Immediately after the binge sessions animals were decapitated, the brains were removed and the nucleus accumbens was dissected. The dynorphin (DYN), μ -opioid receptor (mu opioid), neuropeptide Y (NPY), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), tropomyosin-related tyrosine kinase B receptor (TrkB) and corticotropin-releasing factor receptor type 1 (CRF-R1) gene expression were measured by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Pretreatment with cocaine caused sensitization of cocaine motor response and locomotor cross-sensitization with nicotine. In the self-administration experiments repeated cocaine administration caused an increase in the nicotine break point and nicotine intake during a 24 h binge session.

© 2013 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

An important issue in the field of drug abuse research is the characterization of risk factors related to increased vulnerability to drug addiction (Anthony and Petronis, 1995). There is growing clinical evidence suggesting that previous exposure to cocaine increase the vulnerability to nicotine addiction. Controlled human studies have demonstrated that acute cocaine administration increases cigarette smoking (Roll et al., 1996). Moreover, cocaine-dependent smokers often report smoking more cigarettes during cocaine use (Budney et al., 1993, 1997; Torchalla et al., 2011).

Pre-clinical studies also provide evidences for cocaine-induced increase in the vulnerability to nicotine abuse and addiction. For example, in rhesus monkeys, higher rates of combined nicotine and cocaine self-administration were observed, relative to isolated cocaine or nicotine self-administration (Freeman and Woolverton, 2009; Mello and Newman, 2011).

In rats, several studies have demonstrated the effects of nicotine exposure on cocaine self-administration (Horger et al., 1992; Anker and Carroll, 2011). For example, it has been reported that nicotine exposure increases the acquisition rates of cocaine self-administration (Horger et al., 1992) and its break point under a progressive-ratio (PR) schedule of reinforcement (Anker and Carroll, 2011). While, several studies have demonstrated the influence of nicotine exposure on cocaine self-administration, the effect of previous exposure to cocaine on nicotine self-administration has been poorly investigated.

Repeated nicotine administration may also lead to a sensitized locomotor response following psychostimulant challenge (Santos et al., 2009). This phenomenon is termed behavioral cross-sensitization. Behavioral sensitization is suggested to reflect neuroadaptive processes

[☆] Support: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – 2011/07469-9).

* Corresponding author at: Laboratory of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Univ. Estadual Paulista UNESP, Rod. Araraquara-Jaú Km 1, 14801-902, Araraquara, São Paulo, Brazil. Tel.: +55 16 3301 6981; fax: +55 16 3301 6980.

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

associated to drug addiction (Robinson and Berridge, 1993). Recently, it was demonstrated that nicotine priming enhances cocaine-induced behavioral sensitization. However the effect of previous cocaine treatment on nicotine-induced locomotor sensitization has not demonstrated yet.

Many studies indicate that neuroadaptations of the mesocorticolimbic dopamine system are related to drug abuse and addiction (Wise, 2009; Pierce and Kumaresan, 2006; Nestler, 2001; Kalivas, 2007). In this way, it has been demonstrated that repeated cocaine or nicotine exposure produces many long-lasting alterations in the mesocorticolimbic system that contribute to addiction-like behaviors (Cao et al., 2011; Koya et al., 2009; Guez-Barber et al., 2011).

It has been proposed that cocaine and nicotine produce persistent alterations in the mesolimbic system due to changes in gene expression (Russo et al., 2010; Dreyer, 2010). Studies suggest that administration simultaneous of equipotent doses of nicotine and cocaine, produce additive effects on nucleus accumbens dopamine release (Sziraki et al., 1999; Gerasimov et al., 2000). However, change in gene expression, associated with the effect of cocaine on increased vulnerability to nicotine addiction is still poorly understood.

Cocaine and nicotine modulate the release of neurotransmitters, which activate their different receptors, leading to the activation of transcription factors. Transcriptional activation in the mesocorticolimbic system has been associated to neural plasticity related to the development of drug addiction (Chandrasekar and Dreyer, 2009).

Indeed, repeated cocaine or nicotine administration may change the expression of neurotransmitters (e.g. dynorphine (DYN), neuropeptide Y (NPY)), receptors (e.g. μ -opioid receptor, tropomyosin-related tyrosine kinase B receptor (TrkB) and corticotropin-releasing factor receptor type 1 (CRF-R1)), and transcription factors (e.g. brain-derived neurotrophic factor (BDNF)) (Ang et al., 2001; Ghitza et al., 2010; Hope et al., 1994; Houdi et al., 1998; Kivinummi et al., 2011; Nestler, 2005a, 2005b, 2008; Shippenberg and Rea, 1997). These changes may increase drug-seeking behavior.

Thus, the goal of the present study was to investigate the behavioral and molecular changes that result from the interactions between cocaine and nicotine. To this end we evaluated whether the pretreatment with cocaine could modify cocaine- or nicotine-induced locomotor activity, nicotine intravenous self-administration, and the expression of DYN, mu opioid, NPY, BDNF, TrkB and CRF-R1 genes.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

Male Wistar rats, 225–250 g at arrival, obtained from the animal breeding facility of the Univ. Estadual Paulista – UNESP were individually housed in plastic cages 19 cm (width) \times 30 cm (length) \times 14 cm (height).

Rats were continuously maintained on a reversed light cycle (12-h:12-h, lights off at 08:00 a.m.) with controlled temperature (21 °C) and humidity (35–40%), with unrestricted access to food and water. During the experiment, rats received 18 g rat chow per day provided in their home cage after each daily experimental session. This feeding schedule results in the gradual weight gain of approximately 15 g/week (Donny et al., 1995). Unlimited access to water was available throughout all experiments. All experiments were performed during the dark phase.

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Use of Human or Animal Subjects of the School of Pharmaceutical Science – UNESP (CEP-19/2008).

2.2. Locomotor response to cocaine and nicotine

2.2.1. Apparatus

Locomotor activity measures were conducted in commercially available (Columbus Instruments, Columbus, OH, USA) activity monitoring

chambers, consisting of Plexiglas cages. The chambers, measuring 44 cm (width) \times 44 cm (length) \times 20 cm (height) cm included 10 pairs of photocells beams, which were used to measure the horizontal locomotor activity. The consecutive interruption of two beams was recorded as one locomotor count.

2.2.2. Locomotor measurement

Rats were pretreated with cocaine (20 mg/kg; i.p.) or saline for 7 days (Marin et al., 2008). Three days after the last cocaine (COC) or saline (SAL) administration, rats were challenged with saline (COC-SAL n=10; SAL-SAL n=10) or cocaine (15 mg/kg; i.p.) (COC-COC n=10; SAL-COC n=10). Immediately following the injections, animals were put in an activity chamber and their locomotor activity was recorded during a 30-minute testing session as described above. In the very next day the same animals received saline (COC-SAL n=10; SAL-SAL n=10) or nicotine (NIC) (0.4 mg/kg; s.c.) (COC-NIC n=10; SAL-NIC n=10). Immediately following the injections, animals were put in an activity chamber and their locomotor activity was recorded during a 15-minute testing session as described above. In both tests, animals were allowed a 20-minute habituation period to the photocell apparatus immediately prior to injections. Animals from different groups were tested randomly during the dark phase between 10:00 a.m. and 14:00 p.m.

2.3. Intravenous drug self-administration

Seven days after the locomotor test, animals were subjected to intravenous nicotine self-administration procedures. The general procedure was adapted from George et al. (2007).

2.3.1. Apparatus

For nicotine self-administration the animals were put individually in Plexiglas experimental chambers (30 \times 30.5 \times 24.5 cm), enclosed in light- and sound attenuating boxes. The floor of the chambers consisted of a Plexiglas tray covered with sawdust. A hole in the ceiling allowed the passage and free movement of the tethered catheter (Strategic Applications Inc., Libertyville, IL, USA) that was connected to a counterbalanced swivel and an infusion pump (Insight Equipments®, Ribeirão Preto, SP, Brazil). The front wall of the chamber contained one interchangeable panel. The panel was equipped with two levers, located 5 cm from the floor, two cue lights (red and green) above each lever and a session light in the middle of the panel (12 cm from the floor).

2.3.2. Drug

(–) – Nicotine 99% was obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). The dose of nicotine was chosen based on previous experiments conducted in our laboratory (Leão et al., 2012).

2.3.3. Training

Training consisted of three 60-minute training sessions, in which each response on the active lever (alternated between left and right sides) was reinforced with the delivery of 0.2 ml sucrose (6%) (fixed ratio schedule of reinforcement; FR 1), followed by a 10-second time-out. Each rat was allowed continuous access to sucrose solution during the entire 60-min. Responding on the inactive lever had no scheduled consequence.

2.3.4. Surgery

Twenty-four hours after the last training session, cocaine and saline pretreated rats were implanted with permanently indwelling catheters (Silastic™ silicon tubing, inner diameter = 0.63 mm, outer diameter = 1.17 mm) into the right jugular vein under a combination of ketamine (100.0 mg/kg) and xylazine (6.0 mg/kg) anesthesia. The catheter was passed subcutaneously to the rat's back where it exited through a small incision and was affixed to a plastic pedestal

(Strategic Applications Inc., Libertyville, IL, USA) mounted inside a harness system (Strategic Applications Inc., Libertyville, IL, USA). Rats were allowed to recover from surgery for 7 days in their home cage with free access to food and water. To prevent inflammation and infection rats received cetoprophen 1% (5.0 mg/kg; i.m.), and cefazolin (10.0 mg/kg; i.v.) for three consecutive days following surgery.

The catheter was flushed daily with heparinized saline (20 IU/ml) and 0.2 ml of saline in order to maintain the catheter's patency.

2.3.5. Nicotine self-administration

After recovering from surgery all rats were initially given unlimited access to sucrose (6%) self-administration, in which each lever press was reinforced with the delivery of 0.2 ml sucrose (6%) (fixed ratio schedule of reinforcement; FR 1), followed by a 10-second time-out. During self-administration sessions, a green cue light above the active lever signaled sucrose availability and a red cue light, also above the active lever, signaled sucrose delivery. During the time-out period, the green and red cue lights were extinguished and lever press were recorded but had no consequences. Each daily session was terminated after 60-min of access. After three sessions of sucrose reinforcement nicotine self-administration was assessed during 3-hour sessions. Initially, nicotine (0.03 mg/kg per infusion) was infused (0.1 ml/s) associated to sucrose 6% (0.2 ml, v.o.) delivered on schedule of reinforcement (FR1) for the active lever. Responses on the inactive lever were recorded but had no programmed consequence. Each daily session was terminated after 10 drug infusions or 3-h of access, whichever occurred first. Simultaneous administration of sucrose and nicotine sessions was ended after completing 10 drug infusions within 3-h over two consecutive days. Following this period only nicotine (0.03 mg/kg per infusion) was infused (0.1 ml/s) on schedule of reinforcement (FR1) for the active lever. After completing 10 infusions of nicotine within 3-h over two consecutive days, the FR schedule was progressively increased to fixed ratio 3 (FR 3). Rats were maintained for at least four additional days on a limited access on FR 3 schedule before being examined during a progressive ratio schedule of reinforcement. The acquisition and maintenance took about 15 days.

2.3.6. Progressive ratio schedule of drug reinforcement

After the acquisition and maintenance phase, self-administration according to a progressive ratio (PR) schedule of drug reinforcement was verified. The progression of response requirements followed the algorithm: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26... The final infusion delivered was defined as the break point. The PR session was terminated once the rat failed to obtain an infusion during 60-min. The average number of total responses and the last ratio completed across three PR trials for each individual rat was calculated.

2.3.7. 24-h unlimited access drug "binge"

After the final PR session, each rat was allowed one additional day of limited drug access (0.03 mg/kg per infusion of nicotine, FR3 schedule, total of 10 infusions). The very next day, a 24-hour binge protocol was implemented starting approximately at 10:00 a.m. Each rat was allowed continuous access to drug infusions (0.03 mg/kg per infusion – 0.1 ml/s) on FR1 schedule during the entire 24-hour binge. The amounts of drug self-administered as well as the pattern of responding were recorded.

2.4. Real time-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Posterior, RT-PCR was used to determine changes of DYN, mu opioid, NPY, BDNF TrkB and CRF-R1, twenty-four hour after the "binge" session. Briefly, animals were killed by rapid decapitation and the nucleus accumbens was isolated, frozen in liquid nitrogen and stored in -80C freezer for posterior RT-PCR assay. mRNA was extracted homogenizing individual samples in TRIzol® Reagent (Invitrogen, cat#

15596-026) according to the manufacturer's instructions. Briefly, TRIzol® Reagent was added to each sample and the aqueous layer was isolated following centrifugation. Total mRNA was precipitated with isopropanol in the presence of linear acrylamide overnight. Samples were centrifuged and the extracted mRNA pellets were washed with 70% ethanol and re-suspended in diethylpyrocarbonate water. Total mRNA was quantified and its quality was examined through the ratio 260/280 and the integrated of the bands was seen in gel of agarose. Next the total mRNA was reverse-transcribed into cDNA with random hexamers using Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The primer sequences used to amplify DYN, mu opioid, NPY, BDNF TrkB and CRF-R1, were listed in Table 1. Real-time RT-PCR was performed in a total volume of 25 µl buffer solution containing 5 µl of template cDNA, 12.5 µl 2× SYBR Green Master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 1.5 µl MQ and 15 pM of each primer. The absolute cDNA quantities were determined, using standard curves, with Applied Bioscience 7500 System Software. Cycle thresholds (Ct) were calculated from triplicate reactions using the second derivative of the amplification curve. DYN, mu opioid, NPY, BDNF TrkB and CRF-R1 Ct values were normalized to GAPDH Ct values (DCt) since GAPDH was not regulated by cocaine/nicotine. Fold changes were calculated using the DDCT method as described (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

2.5. Statistics

Data from the locomotor activity were analyzed by two-way ANOVA for repeated measure considering pretreatment (saline vs. cocaine) and time after saline and cocaine or nicotine test injections as the repeated factor. When a significant ($p < 0.05$) main effect was observed F-tests for contrast analysis were applied.

Nicotine self-administration and gene expression data were analyzed using Student's *t*-tests comparing saline and cocaine groups. Significant differences are reported for $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Locomotor activity

3.1.1. Cocaine locomotor sensitization

Two-way ANOVA revealed significant differences for pretreatment [F(1,15) = 4.91; $p < 0.05$] and time after injection [F(1,15) = 17.33; $p < 0.001$] factors. In addition, the interaction between factors was also detected [F(1,15) = 7.03; $p < 0.001$].

Further analysis (F-Test) showed that rats pretreated with cocaine showed significantly higher cocaine-induced locomotor activity when compared to the saline pretreated ones from 5 to 20 min after cocaine injection (Fig. 1), evidencing that the pretreatment with cocaine caused sensitization to its motor response ($p < 0.05$).

Table 1

| Genes | 5'-3' sequence | |
|------------|-----------------------------|-------|
| CRFR1-For | TTGGCAAACGTCCTGGGGTAT | t1.1 |
| CRFR1-Rev | GCGGACAATGTTGAAGAGAAAG | t1.2 |
| BDNF-For | TCACAGCGGCAGATAAAAAGACT | t1.3 |
| BDNF-Rev | GTGTCTATCTTATGAACCCGCCAGCAA | t1.4 |
| TrKb-For | CCTCGTTGGAGAAGATCAAG | t1.5 |
| TrKb-Rev | CGTGGTACTCCGTGTGATTG | t1.6 |
| Dyn-For | CTCTCCAGCAGGTTTGGC | t1.7 |
| Dyn-Rev | CTGGGACCGAGTCACCAC | t1.8 |
| Miopio-For | TTACGGCCTGATGATCTTACGA | t1.9 |
| Miopio-Rev | GGTGATCTCTCGCAGATTC | t1.10 |
| NPY-For | GCGGGCTGTGGACTGACCCT | t1.11 |
| NPY-Rev | GATGTAGTGTCCGACAGCGGAG | t1.12 |
| GAPDH-For | ATGGGAAGCTGGTCATCAAC | t1.13 |
| GAPDH-Rev | ACGCCAGTAGACTCCACGAC | t1.14 |
| | | t1.15 |

Q8

3.1.2. Nicotine locomotor cross-sensitization

Two-way ANOVA did not reveal significant differences for the pretreatment factor [$F(1,15) = 2.90; p < 0.05$]. However, ANOVA revealed a main effect of time after injection [$F(1,15) = 5.56; p < 0.05$]. ANOVA did show the interaction between factors [$F(1,15) = 2.13; p < 0.05$].

Further analysis (F-Test) showed that rats pretreated with cocaine showed significantly higher nicotine-induced locomotor activity when compared to the saline pretreated ones in the first 5 min (Fig. 2), evidencing the cross-sensitization between cocaine and nicotine ($p < 0.05$).

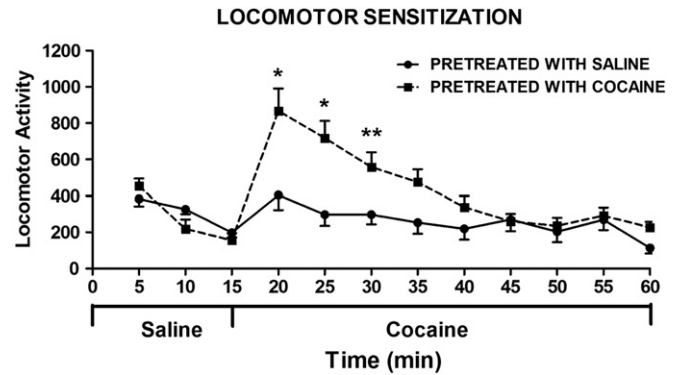


Fig. 2.

3.2. Nicotine self-administration

3.2.1. Progressive ratio schedule

Fig. 3 depicts the number of responses and the last ratio achieved (break point) in a progressive ratio schedule to nicotine in animals pretreated with cocaine or saline.

Student *t*-test revealed a significant increase in the number of responses to obtain nicotine in the cocaine pretreated group when compared to the saline pretreated one ($t(15) = 5.06; p < 0.01$). In addition, the last ratio achieved was higher in the cocaine group as compared to the saline one ($t(15) = 5.32; p < 0.001$) (Fig. 3).

3.2.2. Twenty-four hour unlimited access nicotine (“binge”)

Fig. 4 depicts the number of responses, reinforcement and the total nicotine intake during 24-hour “binge” session in cocaine or saline pretreated animals.

Student *t*-test revealed a significant increase in the number of responses ($t(15) = 2.19; p < 0.05$), reinforcements ($t(15) = 2.78; p < 0.05$), and nicotine intake ($t(15) = 2.80; p < 0.05$), in the cocaine pretreated rats when compared to the saline pretreated ones.

3.3. Real time-polymerase chain reaction

Fig. 5 depicts the quantitative RT-PCR of DYN, mu opioid, NPY, BDNF, TrkB and CRF-R1 twenty-four hours after the “binge” session.

Student *t*-tests revealed a significant increase in BDNF expression in the cocaine pretreated rats when compared to the saline pretreated ones ($t(11) = 2.61; p < 0.05$). The expression of DYN, mu opioid, NPY, TrkB or CRF-R1 was not significantly modified by the pre-treatment with cocaine.

4. Discussion

In the present study we evaluated whether the pretreatment with cocaine could modify cocaine- or nicotine- induced locomotor activity, nicotine intravenous self-administration, and the expression of DYN, mu opioid, NPY, BDNF, TrkB and CRF-R1 genes (Fig. 6).

Repeated cocaine administration resulted in cocaine and nicotine locomotor sensitization followed by an enhanced in nicotine break-point and intake during a 24 h binge session. Furthermore, these alterations in nicotine addiction-like behaviors were accompanied by a selective increase in BDNF expression in the nucleus accumbens. Our results suggest that previous cocaine exposure may increase the vulnerability to nicotine addiction.

In rodents, depend on the dose, repeated exposure to drugs of abuse may induce behavioral sensitization, that has been defined as a progressive and enduring enhancement of the motor stimulant effects of these drugs (Robinson and Berridge, 2000).

Our results are in accordance with other showing that repeated cocaine injections cause locomotor sensitization (Brown et al., 2011; Marin et al., 2008, 2009; Wuo-Silva et al., 2011). However, an important finding of our study is the observation of cross-sensitization between cocaine and nicotine. There are evidences that repeated nicotine injections increase the locomotor effects of cocaine. For instance, it has been shown that adult and adolescent rats pre-treated with nicotine displayed locomotor sensitization to psychostimulants, such as, cocaine or amphetamine (Collins and Izenwasser, 2004; Santos et al., 2009). However, Levine and colleagues (2011) showed in mice, that the pretreatment with cocaine did not sensitize the locomotor response to nicotine. The lack of consensus between our results and Levine’s results may be due to differences in the species used (rats vs. mice), and nicotine challenge dose and route. To our knowledge, we have shown for the first time that the repeated pretreatment with cocaine causes cross-sensitization to nicotine.

Considering that behavioral sensitization is thought to reflect molecular and cellular changes involved with the increase in the motivation to drug self-administration (Robinson and Berridge, 2000, 2001, 2008; Moussawi et al., 2009), we investigate whether repeated cocaine exposure could also increase the motivation and self-administration.

We observed that previous repeated cocaine administration combined with the nicotine self-administration caused an increase in nicotine break point. Although nicotine self-administration in rodents has been demonstrated in a number of laboratories (see Le Foll and Goldberg, 2009 for review), to our knowledge this is the first study to demonstrate that repeated cocaine exposure increases nicotine self-administration.

In our study, the PR schedule revealed a significant increase in the break-point in rats pretreated with cocaine relative to those pretreated with saline, suggesting that they may be more motivated to obtain nicotine when pre-exposed to cocaine. In the same way, it has been demonstrated that previous exposure to nicotine increased the PR response to cocaine self-administration (Bechtholt and Mark, 2002).

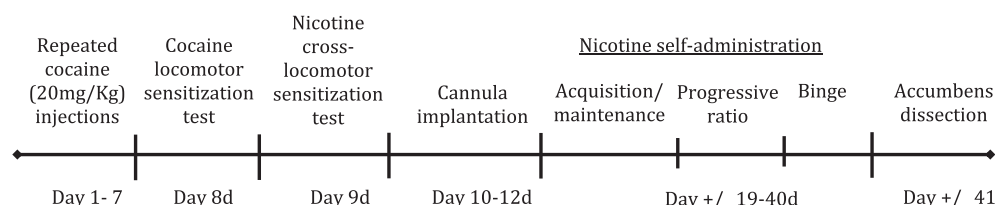


Fig. 1.

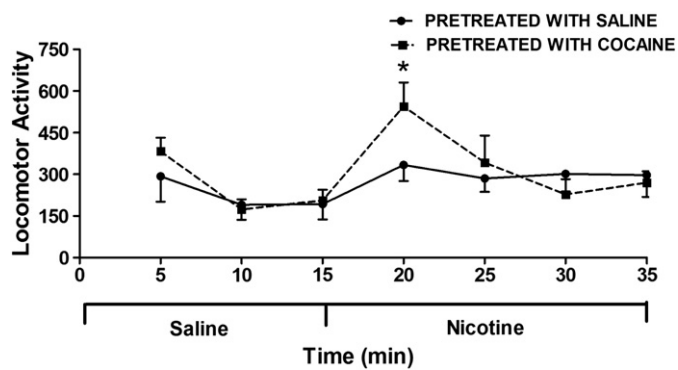


Fig. 3.

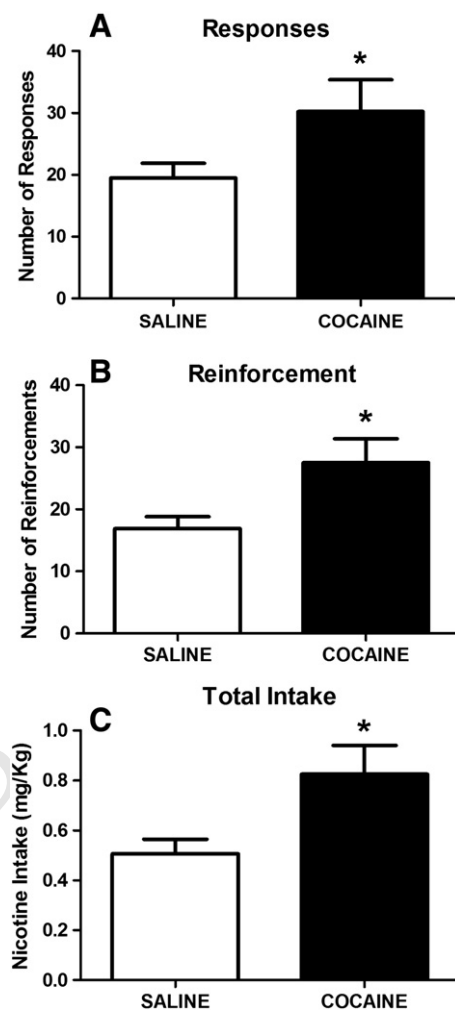


Fig. 5.

Q4

Although tobacco is considered highly addictive in humans, in animal models the reinforcing efficacy of nicotine is weak (Robinson and Pritchard, 1992). Thus our data, showing that cocaine-induced increase in nicotine the PR schedule is quite relevant since they corroborate the clinical hypothesis that cocaine intake is a risk factor for tobacco addiction (Cousins et al., 2001).

Similarly, studies carried out in rhesus monkeys, showed that combined self-administration of nicotine and cocaine was higher relative to isolated cocaine or nicotine (Freeman and Woolverton, 2009; Mello and Newman, 2011). This interaction has also been demonstrated to other drugs, as previously reported by Henningfield and Griffiths (1981). These authors showed that the previous exposure to methylphenidate increased nicotine-taking in a fixed ratio schedule.

We observed that repeated cocaine treatment also caused escalation of nicotine-taking behavior during a 24 h binge session, which was accompanied by persistent increase in lever pressing response. The 24-h/day-access model is relevant, in special for nicotine self-administration, because it is able to evaluate possible interferences of the circadian pattern, which appears to be present in human smokers (Chandra et al., 2007; Frederiksen and Frazier, 1977; Morgan et al., 1985).

This increase in nicotine intake could be due to cocaine withdrawal symptoms, which could do the rats take more nicotine to relief these symptoms. But more studies should be performed to address this issue.

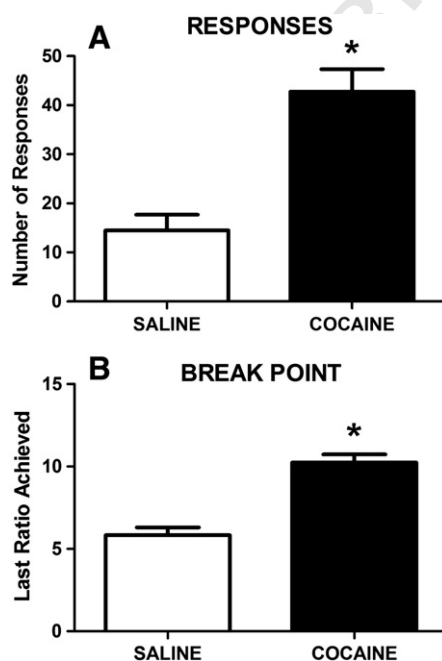


Fig. 4.

Q5

Also, evidence has shown that previous nicotine administration can increase the cocaine reward, measured by conditioned place preference (Levine et al., 2011). Taken together, these findings suggest that the repeated exposure to these substances can promote similar neuroadaptations in the brain reward pathway. Since, studies have demonstrated that the capacity of drugs and other environmental manipulations to promote increased sensitivity to drug's stimulant effects and escalation of drug intake has been associated with neuroadaptations in the dopaminergic mesolimbic system (Nestler, 2005a,b; Thomas et al., 2008). Repeated cocaine or nicotine exposure can promote alterations on selected signaling cascades and growth factors of excitatory transmission implicated in neuroplasticity underlying addiction-related behaviors (Bhang et al., 2010; Malenka and Bear, 2004; Muñoz et al., 2011; Poo, 2001; Sweatt, 2009). Multiple lines of evidence suggest that BDNF is involved in processes of addiction, craving and withdrawal (Grimm et al., 2003; Horger et al., 1999; Pu et al., 2006). Evidences show an association between nicotine dependence and alterations in BDNF expression level (Andresen et al., 2009; Bhang et al., 2010; Kenny et al., 2000).

Our results show a selective increase in the levels of BDNF mRNA twenty-four hours after the end of the "binge" session in rats pretreated with cocaine. These results suggest that pretreatment with cocaine on its own or in combination of nicotine self-administration increased BDNF mRNA levels in the nucleus accumbens. Indeed, it has been demonstrated that contingent and noncontingent cocaine exposure increase BDNF protein levels in the striatum (Graham et al., 2007; Liu et al., 2006; Zhang et al., 2002). Moreover, it was demonstrated that repeated

Q6

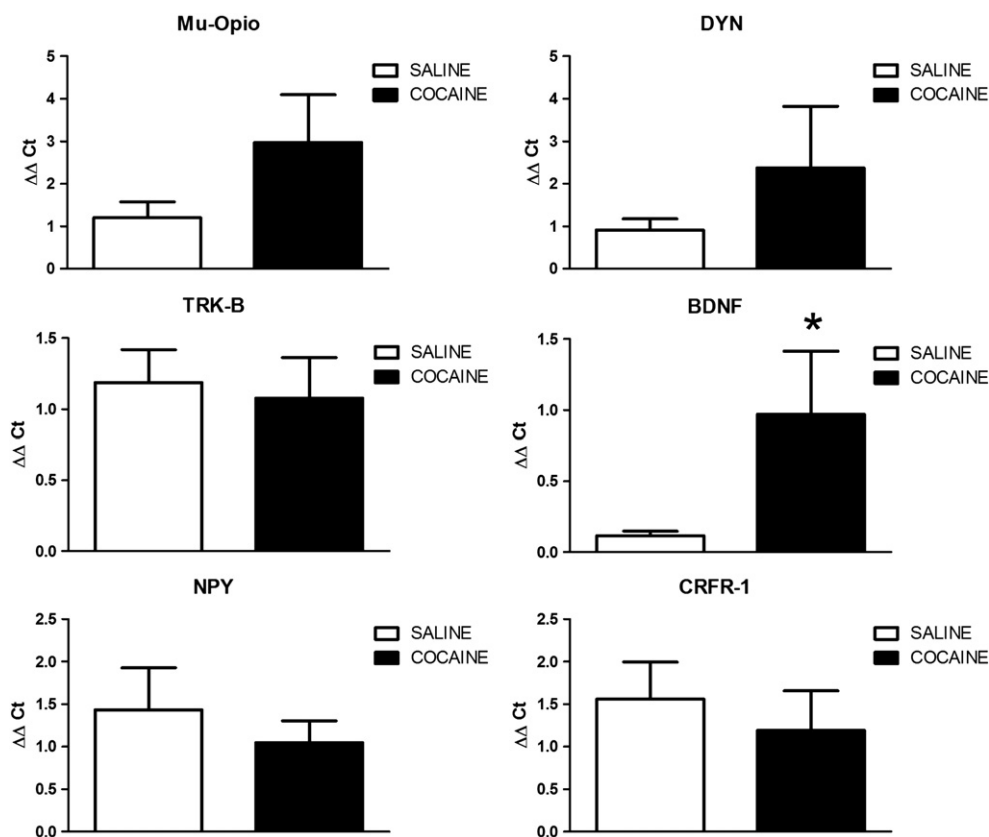


Fig. 6.

exposure to cocaine produced long-lasting increase in BDNF levels in the nucleus accumbens that is associated with enhanced responsiveness to cocaine self-administration (Grimm et al., 2003). In addition, Richardson and Roberts (1996) studies showed that injections of BDNF into the nucleus accumbens increased rats' motivation to work for cocaine in a progressive ratio reinforcement schedule of cocaine self-administration. Recently, a clinical study reported increased BDNF plasma levels in abstinent smokers (Bhang et al., 2010). In animals, it was demonstrated that repeated daily injections nicotine increased accumbal BDNF in adolescent mice (Correll et al., 2009). Furthermore, Kivummi and colleagues (2011) showed that a chronic oral nicotine treatment, which promotes increase in nicotine intake, promoted enhanced BDNF levels in the nucleus accumbens.

Unfortunately, our experimental design makes difficult to state which manipulation could be mediating these alterations. Future studies in our laboratory will specifically address this issue.

Although, studies have showed that BDNF-induced neural plasticity is mediated by the TrkB receptor and that repeated cocaine administration increase TrkB expression (Crooks et al., 2010), we did not find up-regulation of this gene.

Although we have not found changes in DYN, mu opioid, NPY, TrkB and CRF-R1 mRNA levels, other studies have demonstrated their involvement in the behavioral effects of nicotine. For example, blockade of the brain stress system using a corticotropin-releasing factor-1 (CRF1) receptor antagonist decreases nicotine intake in rats (George et al., 2007). Similarly, the antagonism of opioid neurotransmission by pretreatment with naloxonazine, a mu opioid antagonist, significantly reduced the number of nicotine infusions during a self-administration session (Liu and Jernigan, 2011). Moreover, it has been demonstrated that nicotine locomotor sensitization was accompanied by downregulation in NPY mRNA levels in the medial nucleus of amygdala (Aydin et al., 2011).

Overall, pretreatment with cocaine induced sensitized locomotor response to cocaine and nicotine, and escalated of nicotine self-administration accompanied by enhancement of BDNF expression in of accumbens neurons.

5. Conclusion

Pretreatment with cocaine caused sensitization of cocaine motor response and locomotor cross-sensitization with nicotine. In the self-administration experiments repeated cocaine administration caused an increase in the nicotine break point and nicotine intake during a 24 h binge session.

6. Uncited references

- Corominas et al., 2007 480
- Lu et al., 2005 481
- Mao et al., 2010 482
- McAllister et al., 1999 483
- Roll et al., 1997 484
- Thoenen, 2000 485
- Yuferov et al., 2005 486

Acknowledgments

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) fellowships to RML (2008/10691-2) and FCC (07/57541-2), grant to CSP (2011/07469-9) and CAPES fellowship to PEC. CSP is a CNPq research fellowship.

494 References

- 495 Andresen JH, Loberg EM, Wright M, Goverud IL, Stray-Pedersen B, Saugstad OD. Nicotine affects the expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the hippocampus of hypoxic newborn piglets. *J Perinat Med* 2009;37:553–60.
- 496 Ang E, Chen J, Zagouras P, Magna H, Holland J, Schaeffer E, et al. Induction of nuclear factor-kappaB in nucleus accumbens by chronic cocaine administration. *J Neurochem* 2001;79:221–4.
- 497 Anker JJ, Carroll ME. Adolescent nicotine exposure sensitizes cue-induced reinstatement of cocaine seeking in rats bred for high and low saccharin intake. *Drug Alcohol Depend* 2011;118:68–72.
- 498 Anthony JC, Petronis KR. Early-onset drug use and risk of later drug problems. *Drug Alcohol Depend* 1995;40:9–15.
- 499 Aydin C, Oztan O, Isgor C. Vulnerability to nicotine abstinence-related social anxiety-like behavior: molecular correlates in neuropeptide Y, Y2 receptor and corticotropin releasing factor. *Neurosci Lett* 2011;490:220–5.
- 500 Bechtolt AJ, Mark GP. Enhancement of cocaine-seeking behavior by repeated nicotine exposure in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2002;162:178–85.
- 501 Bhang SY, Choi SW, Ahn JH. Changes in plasma brain-derived neurotrophic factor levels in smokers after smoking cessation. *Neurosci Lett* 2010;468:7–11.
- 502 Brown TE, Lee BR, Mu P, Ferguson D, Dietz D, Ohnishi YN, et al. A silent synapse-based mechanism for cocaine-induced locomotor sensitization. *J Neurosci* 2011;31:8163–74.
- 503 Budney AJ, Higgins ST, Hughes JR, Bickel WK. Nicotine and caffeine use in cocaine-dependent individuals. *J Subst Abuse Treat* 1993;5:117–30.
- 504 Cao J, Dwyer JB, Mangold JE, Wang J, Wei J, Leslie FM, et al. Modulation of cell adhesion systems by prenatal nicotine exposure in limbic brain regions of adolescent female rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 2011;14:157–74.
- 505 Chandra S, Shiffman S, Scharf DM, Dang Q, Shadel WG. Daily smoking patterns, their determinants, and implications for quitting. *Exp Clin Psychopharmacol* 2007;15:67–80.
- 506 Chandrasekar V, Dreyer JL. microRNAs miR-124, let-7 d and miR-181a regulate cocaine-induced plasticity. *Mol Cell Neurosci* 2009;42:350–62.
- 507 Collins SL, Izenwasser S. Chronic nicotine differentially alters cocaine-induced locomotor activity in adolescent vs. adult male and female rats. *Neuropharmacology* 2004;46:349–62.
- 508 Corominas M, Roncero C, Ribases M, Castells X, Casas M. Brain-derived neurotrophic factor and its intracellular signaling pathways in cocaine addiction. *Neuropsychobiology* 2007;55:2–13.
- 509 Correll JA, Noel DM, Sheppard AB, Thompson KN, Li Y, Yin D, et al. Nicotine sensitization and analysis of brain-derived neurotrophic factor in adolescent beta-arrestin-2 knockout mice. *Synapse* 2009;63:510–9.
- 510 Cousins MS, Stamat HM, de Wit H. Acute doses of d-amphetamine and bupropion increase cigarette smoking. *Psychopharmacology* 2001;157:243–53.
- 511 Crooks KR, Kleven DT, Rodriguez RM, Wetsel WC, McNamara JO. TrkB signaling is required for behavioral sensitization and conditioned place preference induced by a single injection of cocaine. *Neuropharmacology* 2010;58:1067–77.
- 512 Donny EC, Caggiola AR, Knopf S, Brown C. Nicotine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 1995;122:390–4.
- 513 Dreyer JL. New insights into the roles of microRNAs in drug addiction and neuroplasticity. *Genome Med* 2010;2:92.
- 514 Frederiksen LW, Frazier M. Temporal distribution of smoking. *Addict Behav* 1977;2:187–94.
- 515 Freeman KB, Woolverton WL. Self-administration of cocaine and nicotine mixtures by rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* 2009;207:99–106.
- 516 George O, Ghazizadeh S, Azar MR, Cottone P, Zorrilla EP, Parsons LH, et al. CRF-CRF1 system activation mediates withdrawal-induced increases in nicotine self-administration in nicotine-dependent rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:17198–203.
- 517 Gerasimov MR, Franceschi M, Volkow ND, Rice O, Schiffer WK, Dewey SL. Synergistic interactions between nicotine and cocaine or methylphenidate depend on the dose of dopamine transporter inhibitor. *Synapse* 2000;38:432–7.
- 518 Ghitzza UE, Zhai H, Wu P, Airavaara M, Shaham Y, Lu L. Role of BDNF and GDNF in drug reward and relapse: a review. *Neurosci Biobehav Rev* 2010;35:157–71.
- 519 Graham DL, Edwards S, Bachtell RK, DiLeone RJ, Rios M, Self DW. Dynamic BDNF activity in nucleus accumbens with cocaine use increases self-administration and relapse. *Nat Neurosci* 2007;10:1029–37.
- 520 Grimm JW, Lu L, Hayashi T, Hope BT, Su TP, Shaham Y. Time-dependent increases in brain-derived neurotrophic factor protein levels within the mesolimbic dopamine system after withdrawal from cocaine: implications for incubation of cocaine craving. *J Neurosci* 2003;23:742–7.
- 521 Guez-Barber D, Fanous S, Golden SA, Schrama R, Koya E, Stern AL, et al. FACS identifies unique cocaine-induced gene regulation in selectively activated adult striatal neurons. *J Neurosci* 2011;31:4251–9.
- 522 Henningfield JE, Griffiths RR. Cigarette smoking and subjective response: effects of d-amphetamine. *Clin Pharmacol Ther* 1981;30:497–505.
- 523 Hope BT, Nye HE, Kelz MB, Self DW, Iadarola MJ, Nakabeppu Y, et al. Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments. *Neuron* 1994;13:1235–44.
- 524 Horger BA, Giles MK, Schenk S. Preexposure to amphetamine and nicotine predisposes rats to self-administer a low dose of cocaine. *Psychopharmacology (Berl)* 1992;107:271–6.
- 525 Horger BA, Iyasere CA, Berhow MT, Messer CJ, Nestler EJ, Taylor JR. Enhancement of locomotor activity and conditioned reward to cocaine by brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 1999;19:4110–22.
- 526 Houdi AA, Dasgupta R, Kindy MS. Effect of nicotine use and withdrawal on brain preproenkephalin A mRNA. *Brain Res* 1998;799:257–63.
- 527 Kalivas PW. Cocaine and amphetamine-like psychostimulants: neurocircuitry and glutamate neuroplasticity. *Dialogues Clin Neurosci* 2007;9:389–97. [Review].
- 528 Kenny PJ, File SE, Ratnayak M. Acute nicotine decreases, and chronic nicotine increases the expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 2000;85:234–8.
- 529 Kivimäki T, Kaste K, Rantamäki T, Castrén E, Ahtee L. Alterations in BDNF and phospho-CREB levels following chronic oral nicotine treatment and its withdrawal in dopaminergic brain areas of mice. *Neurosci Lett* 2011;491:108–12.
- 530 Koya E, Uejima JL, Wihbey KA, Bossert JM, Hope BT, Shaham Y. Role of ventral medial prefrontal cortex in incubation of cocaine craving. *Neuropharmacology* 2009;1:177–85.
- 531 Le Foll B, Goldberg SR. Effects of nicotine in experimental animals and humans: an update on addictive properties. *Handb Exp Pharmacol* 2009;192:335–67. [Review].
- 532 Leão RM, Cruz FC, Marin MT, Planeta Cda S. Stress induces behavioral sensitization, increases nicotine-seeking behavior and leads to a decrease of CREB in the nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav* 2012;101:434–42.
- 533 Levine A, Huang Y, Drisaldi B, Griffin Jr EA, Pollak DD, Xu S, et al. Molecular mechanism for a gateway drug: epigenetic changes initiated by nicotine prime gene expression by cocaine. *Sci Transl Med* 2011;3:107–9.
- 534 Liu X, Jernigan C. Activation of the opioid μ 1, but not δ or κ , receptors is required for nicotine reinforcement in a rat model of drug self-administration. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011;35:146–53.
- 535 Liu QR, Lu L, Zhu XG, Gong JP, Shaham Y, Uhl GR. Rodent BDNF genes, novel promoters, novel splice variants, and regulation by cocaine. *Brain Res* 2006;1067:1–12.
- 536 Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:603–14.
- 537 Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 2004;44:5–21. [Review].
- 538 Mao LM, Fibuch EE, Wang JQ. Decoding BDNF-LTP coupling in cocaine addiction. *Neuron* 2010;67:679–81.
- 539 Marin MT, Cruz FC, Planeta CS. Cocaine-induced behavioral sensitization in adolescent rats endures until adulthood: lack of association with GluR1 and NR1 glutamate receptor subunits and tyrosine hydroxylase. *Pharmacol Biochem Behav* 2008;91:109–14.
- 540 Marin MT, Berkow A, Golden SA, Koya E, Planeta CS, Hope BT. Context-specific modulation of cocaine-induced locomotor sensitization and ERK and CREB phosphorylation in the rat nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* 2009;30:1931–40.
- 541 McAllister AK, Katz LC, Lo DC. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 1999;22:295–318. [Review].
- 542 Mello NK, Newman JL. Discriminative and reinforcing stimulus effects of nicotine, cocaine, and cocaine + nicotine combinations in rhesus monkeys. *Exp Clin Psychopharmacol* 2011;19:203–14.
- 543 Morgan SF, Gust SW, Pickens RW, Champagne SE, Hughes JR. Temporal patterns of smoking topography in the natural environment. *Int J Addict* 1985;20:613–21.
- 544 Moussawi K, Pachionis A, Moran M, Olive MF, Gass JT, Lavin A, et al. N-Acetylcysteine reverses cocaine-induced metaplasticity. *Nat Neurosci* 2009;12:182–9.
- 545 Muñoz MÁ, Sanjuan R, Fernández-Santaella MC, Vila J, Montoya P. Neuropsychological aspects of nicotine craving. *Adicciones* 2011;23:111–23.
- 546 Nestler EJ. Molecular neurobiology of addiction. *Am J Addict* 2001;10:201–17. [Review].
- 547 Nestler EJ. Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci* 2005a;8:1445–9.
- 548 Nestler EJ. The neurobiology of cocaine addiction. *Sci Pract Perspect* 2005b;3:4–10. [Review].
- 549 Nestler EJ. Transcriptional mechanisms of addiction: role of DeltaFosB. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2008;363:3245–55. [Review].
- 550 Pierce RC, Kumaresan V. The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neurosci Biobehav Rev* 2006;30:215–38.
- 551 Poo MM. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:24–32. [Review].
- 552 Pu L, Liu QS, Poo MM. BDNF-dependent synaptic sensitization in midbrain dopamine neurons after cocaine withdrawal. *Nat Neurosci* 2006;9:605–7.
- 553 Richardson NR, Roberts DC. Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *J Neurosci Methods* 1996;66:1–11. [Review].
- 554 Robinson TE, Berridge KC. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* 1993;18:247–91. [Review].
- 555 Robinson TE, Berridge KC. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction* 2000;2:S91–S117. [Review].
- 556 Robinson TE, Berridge KC. Incentive-sensitization and addiction. *Addiction* 2001;96:103–14. [Review].
- 557 Robinson TE, Berridge KC. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2008;363:3137–46. [Review].
- 558 Robinson JH, Pritchard WS. The role of nicotine in tobacco use. *Psychopharmacology (Berl)* 1992;108:397–407. [Review].
- 559 Roll JM, Higgins ST, Budney AJ, Bickel WK, Badger GJ. A comparison of cocaine-dependent cigarette smokers and non-smokers on demographic, drug use and other characteristics. *Drug Alcohol Depend* 1996;40:195–201.
- 560 Roll JM, Higgins ST, Tidey J. Cocaine use can increase cigarette smoking: evidence from laboratory and naturalistic settings. *Exp Clin Psychopharmacol* 1997;5:263–8.
- 561 Russo SJ, Dietz DM, Dumitriu D, Morrison JH, Malenka RC, Nestler EJ. The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. *Trends Neurosci* 2010;33:267–76.
- 562 Santos GC, Marin MT, Cruz FC, Delucia R, Planeta CS. Amphetamine- and nicotine-induced cross-sensitization in adolescent rats persists until adulthood. *Addict Biol* 2009;14:270–5.
- 563 Shippenberg TS, Rea W. Sensitization to the behavioral effects of cocaine: modulation by dynorphin and kappa-opioid receptor agonists. *Pharmacol Biochem Behav* 1997;57:449–55. [Review].

- 665 Sweatt JD. Experience-dependent epigenetic modifications in the central nervous system. 676
666 *Biol Psychiatry* 2009;65:191–7. 677
- 667 Sziraki I, Sershen H, Benuck M, Hashim A, Laitha A. Differences in receptor system partici- 678
668 pation between nicotine- and cocaine-induced dopamine overflow in nucleus 679
669 accumbens. *NY Acad Sci* 1999;877:800–2. 680
- 670 Thoenen H. Neurotrophins and activity-dependent plasticity. *Prog Brain Res* 2000;128: 681
671 183–91. 682
- 672 Thomas MJ, Kalivas PW, Shaham Y. Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system 683
673 and cocaine addiction. *Br J Pharmacol* 2008;154:327–42. [Review]. 684
- 674 Torchalla I, Strehlau V, Okoli CT, Li K, Schuetz C, Krausz M. Smoking and predictors of 685
675 nicotine dependence in a homeless population. *Nicotine Tob Res* 2011;13:934–42. 686
- Wise RA. Roles for nigrostriatal-not just mesocorticolimbic-dopamine in reward and 676
addiction. *Trends Neurosci* 2009;32:517–24. 677
- Wuo-Silva R, Fukushiro DF, Borçoi AR, Fernandes HA, Procópio-Souza R, Hollais AW, 678
et al. Addictive potential of modafinil and cross-sensitization with cocaine: a 679
pre-clinical study. *Addict Biol* 2011;16:565–79. 680
- Yuferov V, Nielsen D, Butelman E, Kreek MJ. Microarray studies of psychostimulant-induced 681
changes in gene expression. *Addict Biol* 2005;10:101–18. [Review]. 682
- Zhang D, Zhang L, Lou DW, Nakabeppu Y, Zhang J, Xu M. The dopamine D1 receptor is a 683
critical mediator for cocaine-induced gene expression. *J Neurochem* 2002;82: 684
1453–64. 685

UNCORRECTED PROOF