



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS ASSOCIAÇÃO
AMPLA UFSCar/UNESP**



PAULA CRISTINA BIANCHI

**“AVALIAÇÃO DE COMPORTAMENTOS RELACIONADOS A
ANSIEDADE, AUTOADMINISTRAÇÃO DE ETANOL E EXPRESSÃO DE
PRÓ-DINORFINA E FOS EM REGIÕES ENCEFÁLICAS DE ANIMAIS
ADULTOS EXPOSTOS À NICOTINA DURANTE A ADOLESCÊNCIA”**

ARARAQUARA – SP

2014

PAULA CRISTINA BIANCHI

**“AVALIAÇÃO DE COMPORTAMENTOS RELACIONADOS A
ANSIEDADE, AUTOADMINISTRAÇÃO DE ETANOL E EXPRESSÃO DE
PRÓ-DINORFINA E FOS EM REGIÕES ENCEFÁLICAS DE ANIMAIS
ADULTOS EXPOSTOS À NICOTINA DURANTE A ADOLESCÊNCIA”**

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF) - Associação ampla entre UFSCar/UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta

ARARAQUARA – SP

2014

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

B577ac

Bianchi, Paula Cristina.

Avaliação de comportamentos relacionados a ansiedade, autoadministração de etanol e expressão de pró-dinorfina e Fos em regiões encefálicas de animais adultos expostos à nicotina durante a adolescência / Paula Cristina Bianchi. -- São Carlos : UFSCar, 2015.

121 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Fisiologia. 2. Drogas - efeito fisiológico. 3. Adolescência. 4. Álcool. 5. Nicotina. I. Título.

CDD: 612 (20^a)

Enroll
02

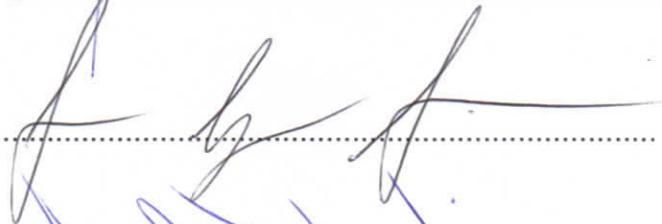
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

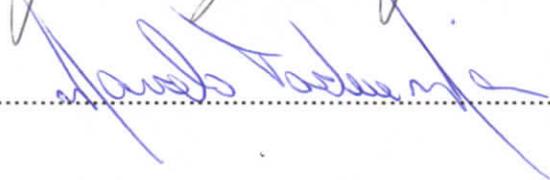
Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de Paula Cristina Bianchi

Dia 07/07/2014

Prof^a. Dr^a. Cleopatra da Silva Planeta.....

Prof. Dr. Fabio Leyser Gonçalves.....

Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin.....

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus queridos e amados pais, **Cleonice Moro Bianchi** e **Paulo José Bianchi**, que acreditaram em mim e me incentivaram a persistir nos meus objetivos. O amor e o apoio de vocês foram fundamentais para eu continuar minha jornada, mesmo quando ela pareceu árdua. Vocês são parte desta conquista.

*“À vocês, que me deram a vida e me ensinaram a
vivê-la com dignidade, não bastaria um obrigado.*

*À vocês, que iluminaram os caminhos escuros,
com afeto e dedicação para que eu trilha-se sem medo e
cheio de esperanças, não bastaria um muito obrigado.*

*À vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos,
para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus.*

*Pela longa espera e compreensão durante
as longas viagens, não bastaria um muitíssimo obrigado.*

*À vocês, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer,
que não tenho palavras para agradecer tudo isso.*

*Mas é o que me acontece agora,
quando procuro arduamente uma forma
verbal de exprimir uma emoção ímpar.*

Uma emoção que jamais será traduzida por palavras”.

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à **Deus** por suas bênçãos e por sua força espiritual durante a minha caminhada.

À minha orientadora **Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta**, uma profissional de extrema competência, que me deu a oportunidade de conhecer o mundo da neurociência e da farmacodependência. Cleo, obrigada por confiar no meu trabalho e por me ajudar quando precisei. Seus ensinamentos, sua paciência e serenidade foram fundamentais. Com certeza aprendi muito com você e com o nosso grupo de pesquisa, do qual sinto imenso orgulho em fazer parte.

Ao meu namorado **Rafael A. Lia Vaccari (Rafa)**, que acreditou no meu trabalho e não mediu esforços para me ajudar. Obrigada pelos finais de semana nos quais você, também, trabalhou comigo; pelo incentivo nos momentos difíceis e por toda atenção e carinho dispensados durante a realização do meu mestrado.

Aos amigos do laboratório: **Adrielle, Ariela, Ana Cláudia (Ana), Diego (Di), Fábio (Fabeta), Gessynger (Gessy), Josiane (Josi), Karina (Ká), Leandro (Lê), Lígia, Lucas, Ludimila (Ludi), Matheus (Capiau), Paulo (Paulão), Rodrigo (Vampeta), Sheila, Tarciso (Tar), Tatiani (Tati), Willian** muito obrigada pela parceria, pelo apoio e por fazerem os dias de trabalho mais divertidos e prazerosos.

Às minhas amigas **Fabíola (Fá), Giuliana (Giu), Helga, Isabela (Isa), Laís (Lá), Lilian (Li), Natália (Nat), Nayara (Ná) e Priscilla (Pri)** que se fizeram presentes e torceram pelo meu sucesso. Muito obrigada, meninas, tenho enorme carinho e admiração por vocês.

Aos amigos da Baltimore Family: **Adrina (Dri), André (Cavalinho), Caroline (Carol-Flor), Cláudia (Clau), Fábio (Fabeta), José Luiz (Zé), Luciane (Lu), Manuela (Manu), Paulo (Belém), Paulo (Paulão), Rodrigo (Vampeta), Viviane (Vivi) e Vitor**

meu agradecimento pelo acolhimento, ajuda e amizade durante meu período de estágio nos Estados Unidos.

À **banca examinadora** pela atenção dispensada na leitura deste trabalho e pelas futuras contribuições.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza** por sua dedicação, ensinamentos, amizade e boas risadas.

Ao Professor **Dr. Carlos Cesar Crestani** por sua dedicação, atenção, apoio e parceria.

Ao **Dr. Fábio Cardozo Cruz** por seu exemplo de profissionalismo e perseverança. Muito obrigada por toda ajuda e suporte no desenvolvimento do meu projeto no exterior; por seu incentivo e confiança no meu trabalho e por sua amizade.

Ao meu orientador durante o estágio no exterior **Dr. Bruce T. Hope**. Obrigada pelos ensinamentos, auxílios e amizade.

À **Profa. Dra. Ana Beatris Lia Vaccari** por sua determinação e competência. Bia, com certeza sua persistência e dedicação à vida acadêmica me incentivam a permanecer neste caminho, por mais difícil que ele pareça. Obrigada pelo carinho e por ser essa pessoa sempre presente.

À secretária **Tirene Pavanelli (Ti)** pela competência nos serviços prestados ao departamento, e principalmente pelo seu delicioso café, sua amizade e inúmeras conversas e risadas.

Às técnicas do Laboratório, **Elizabeth Zocal Paro Lepera (Bete)** e **Rosana Finoti Pupin Silva (Rô)** pela dedicação e auxílios incansáveis nos experimentos e também pela amizade e carinho.

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

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

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio financeiro.

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

Ao **National Institute on Drug Abuse** (NIDA - Baltimore / MD / EUA), pelo espaço físico e laboratorial, necessários para a realização dos meus experimentos.

“O mais importante de tudo é nunca deixar de se perguntar. A curiosidade tem sua própria razão de existir”.

(Albert Einstein)

RESUMO

A adolescência é o período de maior vulnerabilidade ao abuso de drogas. O início precoce do uso de tabaco está significativamente associado ao abuso e dependência de etanol na adolescência e na vida adulta. O presente trabalho teve como objetivo investigar: 1) as alterações nos comportamentos relacionados a ansiedade e na autoadministração operante de etanol em ratos adultos expostos a nicotina durante a adolescência; 2) as alterações na expressão gênica da pró-dinorfina (PDYN) no núcleo acumbens (NAc) na abstinência tardia à nicotina e ao final da autoadministração de etanol; 3) quais as áreas encefálicas ativadas na abstinência, imediata e tardia, à nicotina durante a adolescência. Nossos resultados mostraram que a administração de nicotina durante 10 dias (3mg/kg/dia; s.c), em ratos adolescentes [dia pós-natal (DPN) 28-37], não causou alterações nos comportamentos relacionados a ansiedade no labirinto em cruz elevado 15 dias após a término do tratamento (DPN 52), assim como não alterou a autoadministração operante de etanol na razão progressiva (DPN 75-79) e no “binge” (DPN 81-84). Contudo, animais pré-tratados com nicotina apresentaram aumento da motivação para a busca de sacarina. Não foram observadas alterações na expressão gênica de PDYN 15 dias após a suspensão do tratamento crônico com nicotina ou 24 horas após a última sessão do “binge” de etanol. Quanto às áreas envolvidas na abstinência à nicotina, observamos que ratos adolescentes expostos à nicotina, por meio de mini-bombas, durante 10 dias (DPN 28-37), apresentaram maior ativação de Fos no córtex pré-frontal medial (CPFm) 3 dias após o término do tratamento. A porcentagem de ativação neuronal nesse grupo, foi de 22,03%, sendo que 28,5% desses neurônios ativados eram GABAérgicos e apenas 2,5% eram glutamatérgicos. Entretanto, 15 dias após a retirada das mini-bombas não houve diferença na ativação de Fos nas diferentes áreas encefálicas. Concluímos que: a) a administração de nicotina, durante a adolescência, não foi capaz de alterar os comportamentos relacionados a ansiedade e o comportamento de busca pelo etanol na idade adulta; b) a retirada tardia da nicotina não promoveu alterações na expressão gênica de PDYN no NAc, assim como não promoveu alterações na ativação neuronal da proteína Fos nas regiões do CPFm, NAc e habenula; c) a retirada da nicotina a curto prazo envolve a ativação de grupamentos neurais no CPFm.

Palavras-chave: abstinência, adolescência, dinorfina, etanol, neuroadaptações, nicotina

ABSTRACT

Adolescence marks a period of increased vulnerability to drug abuse. Early initiation of tobacco use is strictly associated with alcohol use and dependence in adolescence and adulthood. The present study aims to investigate: 1) changes in anxiogenic-like effects and on operant ethanol self-administration in adult rats exposed to nicotine during adolescence; 2) changes on pro-dynorphin (PDYN) gene expression in the nucleus accumbens (NAc) on late nicotine withdrawal and after ethanol self-administration; 3) which brain areas are activated on short or long-term nicotine withdrawal during adolescence. Our results showed that pre-exposure to nicotine during ten days (3mg/kg/day; s.c) in adolescent rats, did not change anxiogenic-like effects in the elevated plus maze, 15 days after the treatment cessation [postnatal day (PND) 52], progressive ratio (PND 75-79) and binge (PND 81-84) in the operant ethanol self-administration protocol. However, animals pre-treated with nicotine displayed increased motivation to saccharin seeking. No changes were observed on gene expression of PDYN 15 days after chronic nicotine treatment cessation or 24 hours after the last binge session of ethanol self-administration. Concerning the areas involved on nicotine withdrawal, we observed that adolescent rats exposed to nicotine through the mini-pumps during 10 days (PND 28-37), showed enhanced Fos activation in the medial prefrontal cortex (mPFC) 3 days after nicotine treatment cessation (PND 40). The percentage of neuronal activation in this group was 22.03%, of those activated neurons, 28.5% were GABAergic and only 2.5% were glutamatergic neurons. Meanwhile, 15 days after the mini-pumps were removed, no difference was observed on Fos activation in the different brain areas analyzed. We concluded that: a) administration of nicotine during adolescence was not able to modify anxiety-like behaviors and ethanol seeking behavior in adulthood; b) late nicotine withdrawal did not change gene expression of PDYN in NAc, as well as, did not change Fos protein neuronal activation in the regions of mPFC, NAc and habenula; c) short-term nicotine withdrawal involves the activation of neural ensembles in the mPFC.

Keywords: adolescence, dynorphin, ethanol, neuroadaptations, nicotine, withdrawal

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Representação esquemática do sistema mesocorticolímbico no encéfalo de roedor.....24
- Figura 2** - Representação das mudanças ocorridas na transição do uso ocasional para a dependência de acordo com a teoria dos processos oponentes.....26
- Figura 3** - Labirinto em cruz elevado para ratos (INSIGHT®, Ribeirão Preto, SP, Brasil).....39
- Figura 4** - Esquema da secção do núcleo acumbens adaptado do atlas esterotáxico de Paxinos and Watson (2006).....43
- Figura 5** - Análise dos comportamentos relacionados a ansiedade no labirinto em cruz elevado, 15 dias após a interrupção do tratamento prolongado com nicotina durante a adolescência.....63
- Figura 6** - Análise semiquantitativa da expressão ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) do gene PDYN 15 dias após a interrupção do tratamento prolongado com nicotina durante a adolescência.....64
- Figura 7** - Média do número de respostas nas sessões de razão progressiva na autoadministração de etanol em ratos adultos após a interrupção do tratamento prolongado com nicotina durante a adolescência.....65
- Figura 8** - Média do número de reforços nas sessões de razão progressiva na autoadministração de etanol em ratos adultos após a interrupção do tratamento prolongado com nicotina durante a adolescência.....66

Figura 9 - Média do ponto de ruptura nas sessões de razão progressiva na autoadministração de etanol em ratos adultos após a interrupção do tratamento prolongado com nicotina durante a adolescência.....	67
Figura 10 - Média do número de respostas durante 3 horas na sessão de “binge” na autoadministração de etanol em ratos adultos após a interrupção do tratamento prolongado com nicotina durante a adolescência.....	68
Figura 11 - Média do número de reforços durante 3 horas na sessão de “binge” na autoadministração de etanol em ratos adultos após a interrupção do tratamento prolongado com nicotina durante a adolescência.....	69
Figura 12 - Análise semiquantitativa da expressão ($2^{-\Delta\Delta ct}$) do gene PDYN 24 horas após a sessão de acesso livre prolongado.....	70
Figura 13 - Cortes representativos do córtex pré-frontal mostrando (A) a região medial e (B) sua ampliação, onde foram quantificadas as células positivas para a proteína Fos (aumento de 12,5X e 100X, respectivamente).....	71
Figura 14 - Contagem de células positivas para proteína Fos/mm ² no córtex pré-frontal medial no 3 ^o e no 15 ^o dia após a interrupção do tratamento prolongado com nicotina durante a adolescência.....	72
Figura 15 - Cortes representativos do núcleo acumbens mostrando (A) a região onde foram quantificadas as células positivas para a proteína Fos e (B) a ampliação da região selecionada (aumento de 12,5X e 100X, respectivamente).....	72
Figura 16 - Contagem de células positivas para proteína Fos/mm ² no núcleo acumbens no 3 ^o e no 15 ^o dia após a interrupção do tratamento prolongado com nicotina durante a adolescência.....	73

Figura 17 - Cortes representativos da habenula mostrando a região onde foram quantificadas as células positivas para a proteína Fos (A) e a ampliação da região selecionada (B) (aumento de 12,5X e 100X, respectivamente).....74

Figura 18 - Contagem de células positivas para proteína Fos/mm² na habenula no 3^o e no 15^o dia após a interrupção do tratamento prolongado com nicotina durante a adolescência.....74

Figura 19 - Cortes representativos mostrando a marcação de (A) NeuN e de (B) Fos e a (C) dupla marcação de Fos/NeuN (aumento de 200X).....75

Figura 20 - Cortes representativos mostrando a marcação para GAD67 ou CaMKII, Fos e para a dupla marcação para Fos e GAD67 ou CaMKII (aumento de 400X).....77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências 5´-3´ dos oligonucleotídeos iniciadores senso (For) e anti-senso (Rev).....	46
Tabela 2 - Resultado do teste de validação dos oligonucleotídeos iniciadores.....	48
Tabela 3 - Anticorpos utilizados na reação de dupla marcação por imunofluorescência.....	53
Tabela 4 - Porcentagem de ativação neuronal no 3º ou 15º dia após a interrupção do tratamento prolongado com nicotina durante a adolescência.....	76
Tabela 5 - Fenótipo dos neurônios que foram ativados no 3º ou 15º dia após a interrupção do tratamento prolongado com nicotina durante a adolescência no córtex pré-frontal medial.....	76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Aspectos gerais.....	18
1.2 Teorias neurobiológicas da dependência e modelos animais.....	22
1.3 Nicotina e etanol: mecanismos de ação e neuroplasticidades.....	27
1.4 Adolescência e a interação entre nicotina e etanol.....	31
2 OBJETIVOS.....	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1 Experimento 1 – Efeitos da exposição a nicotina durante a adolescência nos comportamentos relacionados a ansiedade, expressão gênica de pró-dinorfina e autoadministração de etanol.....	38
3.1.1 Parecer Ético.....	38
3.1.2 Animais.....	38
3.1.3 Substâncias.....	38
3.1.4 Administração de nicotina.....	39
3.1.5 Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	39
3.1.6 Caixa de Autoadministração Operante.....	40
3.1.7 Procedimento Operante para Etanol.....	40
3.1.7.1 Treinamento da autoadministração operante de etanol....	41
3.1.7.2 Teste de razão progressiva (RP).....	42
3.1.7.3 Acesso Livre Prolongado (“Binge”).....	42
3.1.8 Dissecção do Núcleo Acumbens.....	43
3.1.9 Reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR).....	43
3.1.9.1 Extração de RNA Total.....	43
3.1.9.2 Determinação da Concentração de RNA Total.....	44
3.1.9.3 Tratamento das amostras com DNase.....	45
3.1.9.4 Transcrição Reversa do RNA.....	45
3.1.9.5 Seleção de Oligonucleotídeos Iniciadores.....	45
3.1.9.6 Otimização dos Oligonucleotídeos Iniciadores.....	46

3.1.9.7 Validação dos Oligonucleotídeos Iniciadores.....	47
3.1.9.8 Amplificação Gênica por RT-PCR.....	48
3.2 Experimento 2 – Áreas encefálicas ativadas na retirada imediata ou tardia da nicotina (experimentos realizados no National Institute on Drug Abuse, Baltimore, MD, EUA).....	49
3.2.1 Parecer Ético.....	49
3.2.2 Animais.....	49
3.2.3 Droga.....	49
3.2.4 Cirurgia.....	50
3.2.5 Tratamento com Nicotina.....	50
3.2.6 Imunoistoquímica.....	50
3.2.7 Dupla Marcação por Imunofluorescência.....	52
4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	55
4.1 Experimento 1 – Efeitos da exposição a nicotina durante a adolescência nos comportamentos relacionados a ansiedade, expressão gênica de pró-dinorfina e autoadministração de etanol.....	56
4.1.1 Efeito da administração prévia de nicotina durante a adolescência na expressão de comportamentos relacionados a ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado (LCE).....	56
4.1.2 Efeito da administração prévia de nicotina durante a adolescência na expressão gênica da pró-dinorfina.....	57
4.1.3 Efeito da administração prévia de nicotina durante a adolescência na autoadministração de etanol.....	57
4.1.4 Efeito da pré-exposição a nicotina na adolescência seguida da autoadministração de etanol na expressão gênica da pró-dinorfina.....	58
4.1.5 Análise dos Resultados.....	58

4.2 Experimento 2 – Áreas encefálicas ativadas na retirada imediata e tardia da nicotina (experimentos realizados no National Institute on Drug Abuse, Baltimore, MD, EUA).....	59
4.2.1 Análise dos Resultados.....	60
5 RESULTADOS.....	61
5.1 Experimento 1 – Efeitos da exposição a nicotina durante a adolescência nos comportamentos relacionados a ansiedade, expressão gênica de pró-dinorfina e autoadministração de etanol.....	62
5.1.1 Efeito da administração prévia de nicotina durante a adolescência na expressão de comportamentos relacionados a ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado (LCE).....	62
5.1.2 Efeito da administração prévia de nicotina durante a adolescência na expressão gênica da pró-dinorfina.....	63
5.1.3 Efeito da administração prévia de nicotina durante a adolescência na autoadministração de etanol.....	64
5.1.3.1 Avaliação das variáveis da razão progressiva na autoadministração.....	64
5.1.3.2 Avaliação do consumo prolongado (“Binge”).....	67
5.1.4 Efeito da pré-exposição a nicotina na adolescência seguida da autoadministração de etanol na expressão gênica da pró-dinorfina.....	69
5.2 Experimento 2 – Áreas encefálicas ativadas na retirada imediata e tardia de nicotina (experimentos realizados no National Institute on Drug Abuse, Baltimore, MD, EUA).....	70
5.2.1 Expressão neuronal de Fos (DAB).....	70
5.2.1.1 Córtex Pré-Frontal Medial.....	70

5.2.1.2 Núcleo Acumbens.....	72
5.2.1.3 Habenula.....	73
5.2.2 Porcentagem de Ativação Neuronal (Dupla Marcação Fos e NeuN).....	75
5.2.3 Análise do Fenótipo dos Neurônios Positivos para Fos (Dupla Marcação de Fos e CamkII ou GAD67).....	76
6 DISCUSSÃO.....	79
7 CONCLUSÃO.....	94
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

O uso de substâncias de abuso tem sido relatado desde os primórdios da humanidade. Ele esteve associado à medicina, ciência, cultos religiosos e celebrações, e variou de acordo com os aspectos culturais e sociais de cada época (ROYCE, 1981; TOSCANO JR., 2001).

O consumo de álcool pelo ser humano é um costume extremamente antigo. Desde aproximadamente 6000 a.C, aborígenes obtinham bebidas alcoólicas por meio do processo de fermentação de cereais. Como relatado na mitologia, o álcool era considerado uma substância divina, fazendo com que o hábito de beber fosse mantido ao longo do tempo. Na Idade Média, os árabes passaram a produzir bebidas alcoólicas por meio do processo de destilação, aumentando assim, o teor alcoólico das bebidas, que passaram a ser consideradas um remédio para todas as doenças, além de produzirem um alívio eficiente da dor. A partir da Revolução Industrial, registrou-se grande aumento na oferta desse tipo de bebida, o que contribuiu para um maior consumo e, conseqüentemente, problemas de saúde decorrentes do uso excessivo do álcool (CEBRID, 2003).

O tabaco, obtido da planta *Nicotiana tabacum* é utilizado desde aproximadamente 1000 a.C. Inicialmente a planta era utilizada pelos indígenas da América Central em rituais mágico-religiosos e provavelmente chegou ao Brasil pela migração de tribos tupis-guaranis. No século XVI, período de colonização da América, o francês Jean Nicot entrou em contato com a planta e a disseminou pela Europa com propósitos medicinais, tais como: cura de úlceras e cefaleia. Existiam diferentes

métodos para o uso do tabaco, como o fumo em cachimbos e posteriormente charutos; inalação de rapé (um pó fermentado e fino de tabaco) e a mascagem das folhas de tabaco. Somente no ano de 1828 foi que a nicotina, princípio ativo do tabaco, foi isolada das folhas da planta *Nicotiana tabacum*. No final do século XIX, iniciou-se a produção de cigarros e após a segunda guerra mundial, com o aumento da publicidade e o aperfeiçoamento dos instrumentos de produção em massa, ocorreu uma expansão do uso do cigarro mundialmente. A partir da década de 1960, surgiram os primeiros relatórios científicos relacionando o uso do cigarro aos problemas de saúde dos fumantes. Desde então, a saúde pública vem lutando contra o tabagismo, no entanto, só após os anos 80 foi que a nicotina foi incluída como droga que causa dependência (CEBRID, 2003).

Atualmente, a décima edição da Classificação Internacional de Doenças (CID 10) classifica três padrões de uso das drogas: 1) uso ocasional; 2) uso abusivo ou nocivo; 3) uso compulsivo ou dependência.

O uso ocasional refere-se a manutenção de uso regular, não compulsivo e que não interfere com as atividades habituais do indivíduo. O uso abusivo é caracterizado por um padrão mal-adaptado de uso, manifestado por consequências adversas recorrentes e significativas.

A dependência é conceituada como uma síndrome comportamental na qual o uso da droga torna-se prioridade na vida do indivíduo. De acordo com esse conceito, a dependência é caracterizada por um conjunto de sinais e sintomas indicativos de que o indivíduo perdeu o controle do uso da droga e o mantém a despeito das suas consequências adversas. A dependência caracteriza-se, ainda, pelo uso compulsivo da

substância e pelo surgimento de estados emocionais negativos (disforia, ansiedade, irritabilidade) quando o acesso a substância é limitado.

O uso abusivo e a dependência de drogas são considerados, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), problemas de saúde pública mundial.

Levantamento realizado pelo Escritório das Nações Unidas Sobre Drogas e Crimes (UNODC) mostrou que em 2011, no mundo, cerca de 167 a 315 milhões de pessoas entre 15 e 64 anos de idade (3,6 a 6,9% da população adulta) fizeram uso de substâncias de abuso. Estes dados não incluem o uso de nicotina e etanol. Estimativas do UNODC mostram, ainda, que o número de mortes associadas ao uso de drogas ilícitas variou de 102.000 a 247.000, valores que correspondem a uma taxa de mortalidade de 22,3 a 54,0 mortes por milhão. Além disso, o levantamento mostrou alto índice de mortes em indivíduos jovens, causadas pelo uso de drogas (UNODC, 2013).

No Brasil, dados do Centro Brasileiro de Investigações sobre Drogas (CEBRID) mostraram que 3,4 milhões de pessoas entre 18 e 59 anos usaram drogas ilícitas pelo menos uma vez na vida (CEBRID, 2005).

Entretanto, tabaco e etanol, consideradas drogas lícitas no Brasil e em diversos países, são as mais consumidas no mundo (BOBO; HUSTEN, 2000). Aproximadamente 12% da população mundial consome etanol diariamente (OMS, 2012; UNODC, 2012). Dados do II Levantamento Domiciliar Sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil revelaram que 74,6% da população brasileira consumiu etanol pelo menos uma vez na vida, sendo 12,3% a porcentagem de indivíduos que se tornaram dependentes (CEBRID, 2005). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 4% de todas as mortes no mundo são atribuídas ao uso de etanol,

porcentagem essa, maior do que as de mortes causadas por Aids, violência e tuberculose (OMS, 2011).

Ainda segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2012), cerca de 1 bilhão de pessoas no mundo são fumantes. Dados do CEBRID revelaram que 44% da população brasileira já fez uso de nicotina pelo menos uma vez na vida, sendo a porcentagem de indivíduos dependentes estimada em 10,1% (CEBRID, 2005). O uso do tabaco resulta em mais de 5 milhões de mortes por ano causadas, principalmente, por câncer de pulmão (PICCIOTTO; KENNY, 2013).

Apesar de um elevado número de pessoas fazer uso de substâncias de abuso, apenas uma pequena, porém considerável, porcentagem torna-se dependente (UHL; GROW, 2004). Como exemplo, a nicotina é a primeira substância de abuso com maior porcentagem de risco de dependência (31,9%), seguida da cocaína com 16,7%. Dessa forma, o risco de desenvolver dependência entre os indivíduos que experimentam nicotina é cerca de duas vezes maior do que o risco associado ao uso de cocaína (O'BRIEN, 2006).

Muitas variáveis interagem para influenciar a probabilidade de um indivíduo iniciar o uso abusivo de drogas ou se tornar dependente. Essas variáveis são agrupadas em três categorias: droga, indivíduo e ambiente.

Um dos fatores associados a droga é seu potencial de dependência, que deve-se às propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Assim, quanto mais rápido o início do efeito da droga, maior a probabilidade de associação entre a sensação hedônica e o comportamento de uso e, portanto, o risco do desenvolvimento da dependência. A variação individual no efeito das substâncias, pode estar associada a

fatores genéticos; presença de distúrbios psiquiátricos (depressão, transtornos de ansiedade ou obsessivo-compulsivo); idade de uso, entre outros. Outro fator importante é a exposição ao estresse, que tem como exemplos, a perda dos familiares, a violência física, o abuso sexual e o trabalho excessivo. Assim, a vulnerabilidade é determinada por fatores de natureza múltipla, e o indivíduo pode tornar-se dependente por causa de um desses fatores ou, mais comumente pela interação deles (PLANETA; GRAEFF, 2012).

1.2 Teorias neurobiológicas da dependência e modelos animais

Várias teorias neurobiológicas foram propostas para explicar a dependência de substâncias de abuso. As teorias, apesar de possuírem diferentes abordagens, são complementares e contribuem para a compreensão de vários aspectos da dependência.

Nos primeiros estudos sistemáticos com o objetivo de entender a farmacodependência predominaram as investigações das consequências adversas decorrentes da interrupção do uso das drogas. Esses estudos foram realizados com opióides e etanol, substâncias que apresentam tolerância e síndrome de abstinência marcantes (PLANETA; GRAEFF, 2012)

A tolerância é um estado adaptativo caracterizado pela diminuição da resposta à administração da mesma quantidade da droga, ou seja, o indivíduo aumenta a dose para obter o mesmo efeito farmacológico do início do uso. A síndrome de abstinência reflete as neuroadaptações relacionadas ao desenvolvimento da tolerância e ocorre

como consequência da interrupção do uso da droga após seu uso prolongado. Ela é caracterizada por um conjunto de sinais e sintomas (específicos para cada droga), geralmente opostos aos efeitos agudos da substância, que provocam desconforto intenso ao indivíduo (JAFFE, 1989; O'BRIEN, 2006).

Com base nesses conceitos foi proposto que indivíduos dependentes mantinham o uso da droga para evitar o desconforto da retirada e, dessa forma, a droga atuaria como reforçador negativo.

No entanto, algumas limitações foram observadas na teoria do reforço negativo: 1) o tratamento da síndrome de abstinência era pouco eficaz no tratamento da dependência; 2) muitos fármacos utilizados na terapêutica como os antidepressivos e antipsicóticos, produziam síndrome de abstinência, porém não induziam o uso compulsivo; 3) o início do uso das drogas ocorre na ausência da síndrome de abstinência (WISE; BOZARTH, 1987; JAFFE, 1989; O'BRIEN, 2001).

Dessa forma, Wise e Bozarth (1987) propuseram a teoria do reforço positivo. Segundo essa teoria, todas as substâncias que causam dependência têm em comum a propriedade de causar efeitos euforizantes ou prazerosos e, dessa forma, atuam como reforçadores positivos. Várias evidências indicam que o efeito reforçador positivo das drogas é decorrente da ativação de um substrato neurobiológico comum, o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, composto pela área tegmental ventral (VTA) e suas projeções para o córtex frontal e regiões do sistema límbico, como o núcleo acumbens (NAc), conforme ilustrado na figura 1 (WISE; BOZARTH, 1987; KOOB; LE MOAL, 2001). A ativação desse sistema causa aumento da liberação de dopamina (DA) no NAc, evento associado à sensação subjetiva de prazer (WISE, 1978).

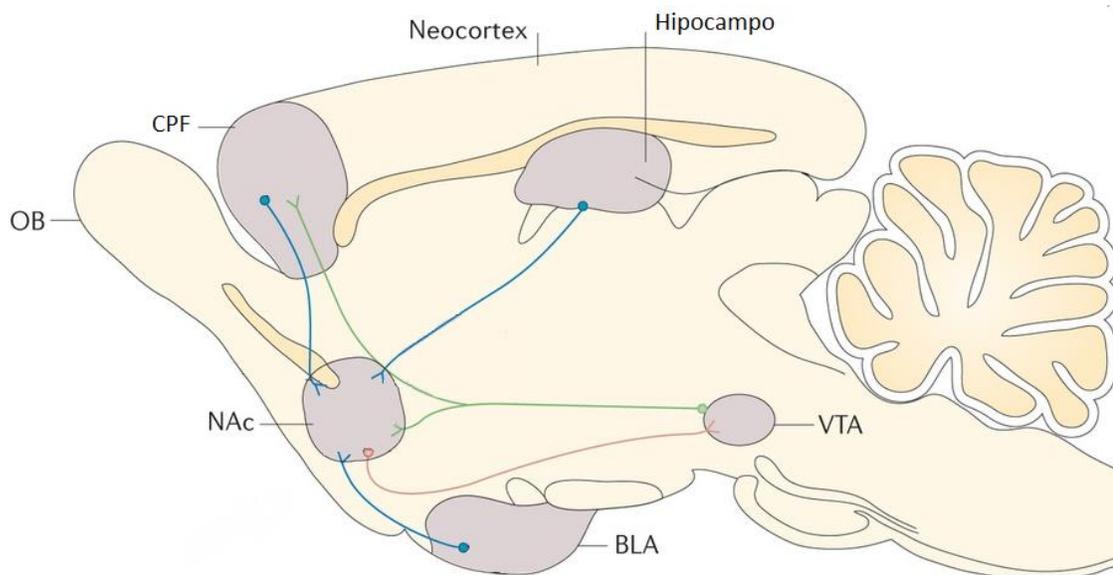


Figura 1. Representação esquemática do sistema mesocorticolímbico no encéfalo de roedor, destacando as principais projeções dopaminérgicas (linhas verdes) oriundas da VTA para o NAc (parte do sistema límbico) e componentes do circuito cortical [córtex pré-frontal (CPF)]. As linhas azuis representam aferências excitatórias glutamatérgicas para o NAc provenientes do CPF, amígdala (BLA) e hipocampo. A linha laranja representa o circuito GABAérgico inibitório aferente do NAc com projeções para a VTA (Adaptado de CRUZ, F. C. et al., 2013).

O efeito reforçador positivo das drogas pode ser demonstrado no modelo animal de autoadministração operante, no qual cada resposta é reforçada pelos efeitos 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. Neste sentido, a autoadministração operante foi demonstrada para cocaína (AHMED; KOOB, 1999; KNACKSTEDT; KALIVAS, 2007), heroína (DEMBO, et al., 1988), etanol (GRANT; SAMSON, 1985; MCBRIDE et al., 1991), anfetamina (ROTHMAN; BAUMANN, 2006), nicotina (RAHMAN et al, 2004; SHOIB, 2008; SHRAM et al., 2007; COHEN; ETTENBERG, 2007) e delta-9-THC (TANDA; MUNZAR; GOLDBERG, 2000).

A autoadministração operante de substâncias de abuso é considerada um dos modelos de maior valor preditivo para o estudo da farmacodependência, pois modela aspectos que marcam a transição do uso ocasional para a dependência (LECCA et al., 2007; PANLILIO; GOLDBERG, 2007). Dentre eles estão o ponto de ruptura, que representa o aumento da motivação para o uso da droga, (ROBERTS; MORGAN; LIU, 2007) e o consumo da substância em acesso livre prolongado (“binge”), que tem como objetivo mimetizar o consumo de substâncias de abuso em humanos em intervalos de tempo prolongados (MORGAN; ROBERTS, 2004).

Os estados afetivos de prazer proporcionados pelas substâncias psicoativas podem explicar a experimentação e o uso ocasional, mas, não explicam a principal característica que define a dependência: a perda do controle do uso da droga (O'BRIEN, 2011).

Koob e Le Moal (1997; 2008) adaptaram a teoria dos processos oponentes, proposta por Solomon e Corbit em 1973, para explicar o uso compulsivo das drogas e a recaída ao uso após períodos de abstinência. Segundo esses autores, o uso inicial das drogas produz euforia, conseqüente à ativação da via de recompensa, denominado “*Estado A*”. Subseqüentemente ao efeito reforçador positivo da droga, emerge um estado negativo e oponente denominado “*Estado B*”, que resulta da ativação da “via de estresse” ou “sistema de antirrecompensa”. Com o uso prolongado da substância o “*Estado B*” se intensifica, tornando a via de “antirrecompensa” sensibilizada, enquanto que o “*Estado A*”, de recompensa, torna-se tolerante. A sensibilização do “*Estado B*” manifesta-se na forma de estados afetivos negativos (disforia, ansiedade e irritabilidade) na retirada da droga. Dessa forma, a combinação da diminuição da

atividade do sistema de recompensa e o recrutamento do “sistema de estresse” ou “antirrecompensa”, seriam responsáveis pela busca, recaída e consumo compulsivo da droga, uma vez que, o indivíduo utiliza a substância novamente para aliviar os estados negativos da retirada (reforço negativo) (Figura 2).

Considerando o efeito recompensador e os estados aversivos evocados pelo uso das drogas, uma região chamada habenula, tornou-se alvo de estudos no processo de dependência, já que ela possui papel central na codificação de estímulos reforçadores e aversivos, regulando os sistemas monoaminérgicos do mesencéfalo e recebendo projeções dopaminérgicas vindas da VTA. Estudos recentes avaliaram a relação entre a habenula e a exposição à nicotina e demonstraram que ao injetarem mecamilamina (antagonista do receptor nicotínico) nesta região, ocorria aumento dos sinais somáticos na retirada da nicotina (SALAS et al., 2004, 2007, 2009).

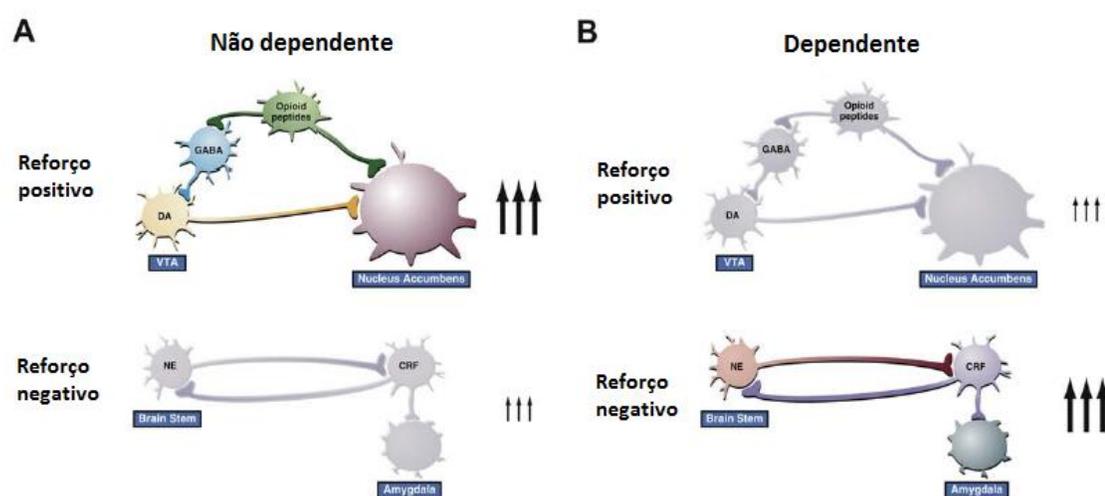


Figura 2. Mudanças ocorridas na transição do uso ocasional para a dependência. (A) Neurocircuito associado aos efeitos reforçadores positivos, agudos das drogas de abuso e (B) neurocircuito relacionado aos os efeitos reforçadores negativos da dependência (Retirado de KOOB; LE MOAL, 2008).

Modelos animais de ansiedade, como o labirinto em cruz elevado (LCE), são amplamente utilizados para avaliar os estados emocionais negativos causados pela retirada da droga, uma vez que, comportamentos ansiogênicos são comuns na síndrome de abstinência e contribuem para a busca da substância (KOOB, 2009).

O LCE possui validação comportamental, fisiológica e farmacológica para o estudo de ansiedade tanto em ratos (PELLOW et al., 1985) como em camundongos (LISTER, 1987). O teste consiste em colocar o animal em um labirinto elevado do solo, constituído por dois braços fechados por paredes e dois abertos; analisando-se a frequência de entradas e o tempo gasto em cada tipo de braço. Através da porcentagem da preferência (entradas e tempo gasto) pelos braços abertos, avalia-se o índice de ansiedade do animal; assim, quanto maiores os níveis de ansiedade, menor a porcentagem de entradas nos braços abertos e de tempo gasto nos mesmos (HANDLEY; MITHANI, 1984; PELLOW; FILE, 1986, MORATO, S., 2006).

A utilização de modelos animais que possam evidenciar alterações comportamentais e moleculares relacionadas ao uso e a dependência das drogas é fundamental para o avanço do conhecimento das bases neurobiológicas da dependência (CAPRIOLI, et al., 2007).

1.3 Nicotina e etanol: mecanismos de ação e neuroplasticidades

O etanol é classificado como uma substância depressora do sistema nervoso central. Seu mecanismo de ação é bastante complexo e envolve, além da alteração da

composição lipídica das membranas celulares, a atuação em diversos tipos de receptores e proteínas efetoras. O etanol pode antagonizar os receptores glutamatérgicos (NMDA), glicinérgicos, serotoninérgicos (5-HT₃), colinérgicos nicotínicos e canais de Ca²⁺ do tipo L ou atuar como agonista dos receptores gabaérgicos (GABA A) e canais de K⁺ ativados por proteína G (FADDA; ROSSETTI, 1998; VENGELIENE et al., 2008). Desse modo, o etanol diminui a neurotransmissão excitatória e acentua a neurotransmissão inibitória do sistema nervoso central.

Estudos indicam que o efeito reforçador do etanol no sistema mesocorticolímbico ocorre devido ao bloqueio dos receptores NMDA, localizados no corpo celular dos interneurônios GABAérgicos na VTA. Dessa forma, a redução da inibição GABAérgica sobre os neurônios dopaminérgicos resulta no aumento da liberação de dopamina no NAc (FADDA; ROSSETTI, 1998). Outras evidências sugerem que o etanol também pode se ligar a receptores μ -opiídeos presentes nos neurônios opioidérgicos da VTA, que por sua vez, inibem os interneurônios GABAérgicos, intensificando a transmissão dopaminérgica e aumentando a liberação de dopamina no NAc (GILPIN; KOOB, 2008).

A nicotina exerce sua ação no sistema nervoso central ligando-se a receptores colinérgicos nicotínicos (nAChR). Os nAChR são constituídos por cinco subunidades proteicas, que formam um canal iônico com condutância para sódio e cálcio, dependendo das subunidades formadoras (ADDY; PICCIOTTO, 2013; TUESTA; FOWLER; KENNY, 2011). No sistema nervoso central, os nAChR são formados pela combinação (homopentamérica ou heteropentamérica) das subunidades α 2-10 e β 2-4 (PICCIOTTO; KENNY, 2013).

No mesencéfalo, as subunidades $\beta 2$ em combinação com as subunidades $\alpha 4$ e/ou $\alpha 6$ dos nAChR são essenciais para a propriedade reforçadora da nicotina. A nicotina se liga nestes receptores, situados nos corpos celulares de neurônios dopaminérgicos na VTA e promove o disparo desses neurônios, aumentando a liberação de dopamina no NAc (DE BIASI; DANI, 2011).

Embora os mecanismos primários da ação da nicotina e do etanol sejam diferentes, ambas as substâncias modificam a neurotransmissão nos circuitos neurais associados ao abuso e dependência de drogas de forma semelhante (CORRIGALL et al., 1992; WEISS et al., 1993; PONTIERI et al., 1996). Assim, foi demonstrado que ambos, nicotina e etanol, agudamente, aumentam a liberação de DA no NAc (DI CHIARA; IMPERATO, 1988b; WEISS et al., 1993).

Após ser liberada na fenda sináptica a dopamina pode interagir com os receptores dopaminérgicos do subtipo D_1 , o que induz uma sequência de eventos intracelulares que incluem: a estimulação da proteína G estimulatória (Gs), ativação da adenilato ciclase e aumento de AMPc com consequente ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA) (LU et al., 2006). Na sequência de eventos de transdução, a PKA ativada fosforila outras proteínas importantes na atividade intracelular, dentre elas, a proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico (cAMP binding element) (CREB). A forma ativa de CREB (p-CREB) liga-se a sítios CRE (elementos de resposta ao AMP cíclico), presentes em centenas de genes no sistema nervoso central, e promove a transcrição gênica, por exemplo, do gene da pró-dinorfina (PDYN), na região do NAc (MAYR; MONTMINY, 2001).

Alterações na expressão gênica causadas pelas drogas de abuso induzem neuroplasticidades duradouras relacionadas ao desenvolvimento da dependência (NESTLER, 2001). Neste sentido, vários estudos mostram que a exposição crônica às drogas de abuso causa adaptações no sistema dinorfina/kappa opióide (WEE; KOOB, 2010; HOLTER, et al., 2000; ISE, et al., 2002)

A dinorfina, derivada do precursor pró-dinorfina, exerce suas ações ao se ligar aos receptores da classe kappa opióide (KOPr). A estimulação dos KOPr produz aversão, disforia, anedonia, depressão e respostas relacionadas ao estresse (BALS-KUBIK, et al., 1993; CARLEZON, et al., 2006; TODTENKOPF, et al., 2004). Além disso, a ativação dos KOPrs, por agonistas, resulta na inibição da liberação de dopamina no córtex pré-frontal (PFC) e no NAc (DEVINE, et al., 1993; DI CHIARA; IMPERATO, 1988a; SPANAGEL et al., 1990a,b; SPANAGEL et al., 1992; ZHANG, et al., 2004). Esses dados sugerem a existência de sistemas opioidérgicos tonicamente ativos que regulam a liberação de dopamina no PFC e NAc, ou seja, a interação entre os neurônios dopaminérgicos e opioidérgicos, no sistema límbico, é fundamental no processo da dependência.

Foi demonstrado que a autoadministração de cocaína ou heroína induz aumento de RNA mensageiro (RNAm) da PDYN, respectivamente, no estriado e NAc (DAUNAIS, et al., 1993; FAGERGREN, et al., 2003; HURD, et al., 1992; SCHLUSSMAN, et al., 2005; SOLECKI, et al., 2009). De forma semelhante, a autoadministração de etanol aumenta o RNAm da PDYN no NAc após o término do tratamento prolongado (LINDHOLM, et al., 2000; RATTAN et al., 1992; SPANGLER, et al., 1993).

Poucas evidências são encontradas na literatura quanto a exposição repetida à nicotina e suas consequências na expressão gênica da PDYN. Isola et. al. (2008) injetaram nicotina durante 14 dias em camundongos e avaliaram a expressão gênica e conteúdo de dinorfina no sistema dopaminérgico. Esses autores observaram aumento no conteúdo do RNAm da PDYN no estriado ventral (NAc) e dorsal, 4 dias após a retirada da nicotina. Entretanto, os autores observaram diminuição no conteúdo de dinorfina nas mesmas regiões, sugerindo que essa diminuição, estaria relacionada ao aumento da liberação e degradação do peptídeo. Enquanto o aumento da expressão do RNAm da PDYN indicaria aumento da síntese de dinorfina, como efeito compensatório para manter as reservas intracelulares.

De modo geral, a retirada das drogas tende a aumentar a quantidade de RNAm da PDYN ou a concentração de dinorfina, que por sua vez, ativa os KOPrs e promove estados aversivos. Assim, embora o sistema dinorfina/Kappa opióide não esteja diretamente envolvido no mecanismo de recompensa, ele o modula através dos seus efeitos aversivos associados ao estresse (WEE; KOOB, 2010).

1.4 Adolescência e a interação entre nicotina e etanol

Dentre os inúmeros fatores de risco associados ao desenvolvimento da dependência encontram-se a idade de início do uso da droga e o uso prévio ou concomitante de diferentes substâncias de abuso.

Dados do VI Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio, realizado pelo CEBRID em 2010,

mostraram que o início do uso tanto de nicotina como de etanol ocorre precocemente, na faixa etária de 10 a 12 anos. O levantamento apontou, também, que o uso dessas substâncias tende a aumentar nas faixas etárias subsequentes, sendo a porcentagem de uso na vida de etanol e nicotina na faixa etária de 13 a 15 anos equivalente a 60,3% e 16%, respectivamente.

A adolescência é o período de transição da infância para a idade adulta. Ela é caracterizada por mudanças fisiológicas e neuroendócrinas que marcam a maturação sexual. Adolescentes de várias espécies exibem comportamentos típicos desse período que incluem: o aumento da interação social com seus pares, busca por novidades e comportamentos de risco (SPEAR, 2000).

O sistema nervoso central encontra-se em desenvolvimento durante toda a adolescência, porém a velocidade e o tempo de maturação variam nas diferentes áreas encefálicas (GOGTAY, et al. 2004). Estruturas límbicas subcorticais importantes para o processamento emocional, tais como hipotálamo, áreas dopaminérgicas do mesencéfalo, amígdala, NAc e estriado dorsal, apresentam um grande pulso de desenvolvimento no início da puberdade (SOWELL, et al., 2003; CASEY, et al., 2005). Essa maturação é importante para os comportamentos sociais e sexuais e é desencadeado pelos hormônios da puberdade. Por outro lado, o desenvolvimento de áreas corticais frontais do cérebro, responsáveis pelo controle cognitivo do comportamento, dependem da idade e experiência do indivíduo e continuam ao longo da adolescência e da idade adulta (SOWELL, et al., 2003; GIEDD, 2004). Assim, durante a adolescência o estado emocional torna-se forte e predominante, ao passo que as estratégias de tomada de decisão e de autocontrole cognitivo, permanecem em

desenvolvimento. Esse quadro explica os comportamentos de riscos característicos da adolescência (SPEAR, 2000; GAIVAN, et al., 2007), como, por exemplo, a experimentação e abuso das drogas. Evidências clínicas mostram que quanto mais precoce o início de uso das drogas, maior a probabilidade do indivíduo tornar-se dependente (KANDEL, et al., 2007; KING; CHASSIN, 2007; KOOB; O'LOUGHLIN, et al. 2003; PITKANEN; LYYRA; PULKKINEN, 2005).

Além da idade de exposição à substância, outro fator de risco importante para o aumento da vulnerabilidade ao desenvolvimento de dependência é o uso prévio ou concomitante de substâncias de abuso (FUNK; MARINELLI; LE, 2006; MARTÍNEZ-ORTEGA et al., 2006; KANDEL, et al., 1997). Por exemplo, o início precoce do uso de tabaco está significativamente associado à ocorrência de abuso e dependência de etanol na adolescência e na vida adulta (RIALA, et al., 2004).

Estudos pré-clínicos demonstram aumento do consumo de etanol em animais previamente expostos à nicotina (BLOMQUIST, et al., 1996; LE, et al., 2000). Além disso, a interação entre nicotina e etanol é evidenciada, também, pela demonstração de que a injeção aguda de nicotina reinstala o comportamento de busca pelo etanol após a extinção do comportamento condicionado (LE, et al., 2003). Entretanto, estes estudos foram realizados em animais adultos.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar a interação entre nicotina e etanol no modelo animal, tomando como base a teoria dos processos oponentes e as observações de que idade e a exposição prévia são fatores de risco para o desenvolvimento da dependência. Partimos da hipótese que a administração de nicotina na adolescência aumentaria os comportamentos relacionados à ansiedade e

causaria alterações duradouras na expressão gênica de pró-dinorfina, que resultariam no aumento da autoadministração de etanol em etapas posteriores da ontogênese.

2 **OBJETIVOS**

Investigamos:

- 1) as alterações nos comportamentos relacionados a ansiedade e na autoadministração operante de etanol em ratos adultos expostos à nicotina durante a adolescência;
- 2) as alterações na expressão gênica da pró-dinorfina no núcleo acumbens na abstinência tardia da nicotina e ao final da autoadministração de etanol;
- 3) quais as áreas encefálicas ativadas na abstinência a curto e a longo prazo da nicotina, após sua exposição na adolescência.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Experimento 1 – Efeitos da exposição a nicotina durante a adolescência nos comportamentos relacionados a ansiedade, expressão gênica de pró-dinorfina e autoadministração de etanol

3.1.1 Parecer Ético

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP (CEP-19/2011) e os experimentos foram conduzidos seguindo os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.1.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar adolescentes machos (DPN 28), provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista - UNESP. Os animais foram transferidos para o biotério do nosso laboratório no dia pós-natal (DPN 21), e mantidos em condições controladas de temperatura (23-24°C) e ciclo de luz invertido (12/12 h, luz acesa às 19:00h), com livre acesso a alimento e água.

De acordo com Spear (2000) a adolescência em ratos ocorre aproximadamente entre os dias pós-natal 28 e 42.

3.1.3 Substâncias

- (-) – Nicotina ([-]-1-methyl-2[3-pyridyl]pyrrolidine), 99% (Sigma)®
- Álcool etílico 95% (Synth)®
- Sacarina sódica (Synth)®

3.1.4 Administração de nicotina

Animais adolescentes foram tratados durante dez dias (DPN 28-37) com três injeções diárias, com intervalo de 4 a 5 horas entre elas, de nicotina (1,0 mg/kg) ou salina pela via subcutânea (s.c.). A dose e o tempo de administração foram baseados em experimentos prévios, que demonstraram que esse regime de administração de nicotina é capaz de produzir síndrome de abstinência em ratos (MALIN, et al., 2006; LEÃO, et al., 2013).

3.1.5 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)



Figura 3. Labirinto em cruz elevado para ratos (INSIGHT®, Ribeirão Preto, SP, Brasil)

O LCE utilizado foi semelhante ao descrito originalmente por Pellow, et al. (1985). O labirinto é composto de dois braços abertos, medindo 45 x 10 x 0.25 cm (comprimento X largura X altura) e dois braços fechados, medindo 45 x 10 x 20 cm, conectados por uma plataforma comum, denominada centro,

medindo 10 x 10 cm (comprimento X largura). O aparato é feito de acrílico (chão, paredes e pés) e fica suspenso a 70 cm do chão da sala de experimento.

3.1.6 Caixa de autoadministração operante

As caixas de condicionamento operante para autoadministração são feitas de acrílico transparente medindo 25 X 30 X 30 cm (comprimento X profundidade X altura). Uma das paredes da caixa constitui-se de um painel removível, com duas barras retráteis, um reservatório de líquido para ingestão oral de soluções, pelos animais, e pequenas lâmpadas para sinalização da disponibilidade da droga. Esse painel é conectado a uma bomba de infusão que fornece uma dose da solução de sacarina ou etanol no reservatório de líquido para ingestão. Somente uma das barras retráteis aciona o fornecimento da substância (barra ativa), a outra fica desativada. A caixa de condicionamento fica alojada dentro de uma caixa de isolamento acústico equipada com ventilador. O painel e a bomba são conectados a um microcomputador, contendo o programa para o controle das infusões e esquema de razão (Infusyon®, Insight®, Ribeirão Preto-SP).

3.1.7 Procedimento operante para etanol

O procedimento de autoadministração foi padronizado no laboratório a partir da adaptação dos métodos descritos por Economidou, et al. (2006) e Gilpin, et al. (2010).

3.1.7.1 Treinamento da autoadministração operante de etanol

Esse procedimento teve como objetivo treinar os ratos para autoadministração de solução de etanol 6% em razão fixa (RF) 3. O treinamento começou 15 dias após o término do tratamento com nicotina (ratos DPN 52). Nos quatro primeiros dias do experimento os animais foram treinados a pressionarem uma alavanca da caixa de autoadministração em razão fixa 1 (RF1) para receberem solução de sacarina 0,05% no reservatório de ingestão por 1h diária, sendo 0,2ml o volume do reforço. Após essa fase, os ratos foram treinados a autoadministrarem soluções com concentrações crescentes de etanol (2%, 4% e 6%), diluídas em sacarina 0,05%, e a partir de então, as sessões de autoadministração ocorreram em dias alternados. Terminada essa fase, a taxa de respostas foi aumentada para RF3 e a concentração de etanol nessa e demais sessões, foi de 6% de etanol, diluído em solução de sacarina 0,05%. Os animais realizaram cinco sessões em RF3, com duração de 3h cada.

O fornecimento das soluções no bebedouro durante o experimento foi acompanhada pelo acendimento de uma luz verde acima da barra por 2s e ao final do fornecimento foi estabelecido um tempo de inatividade da barra (“time out”) de 20s.

Os animais eram colocados nas caixas de autoadministração somente durante as sessões e depois eram reagrupados nas gaiolas-moradias. Durante todo o tempo nas gaiolas-moradias os animais tiveram livre acesso à água e ração, exceto nos quatro primeiros dias de treino, nos quais os ratos tinham acesso a água apenas por um período de 30 minutos após as sessões de treinamento.

Os grupos controle para autoadministração de etanol foram submetidos ao

procedimento semelhante ao anterior, com exceção de que nunca receberam etanol, sendo o comportamento operante mantido somente pela solução de sacarina.

3.1.7.2 Teste de razão progressiva (RP)

As caixas de autoadministração foram programadas de modo que o número de respostas de pressão da barra fosse crescente para obtenção do mesmo volume do reforço com a solução etanólica ou de sacarina. As razões de respostas seguiram o esquema: 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... proposto por Gilpin, et al. (2010). A sessão era encerrada quando o animal ficava 60 minutos sem a obtenção do reforço.

A última razão alcançada pelo animal durante a sessão é definida como ponto de ruptura. Foram realizadas três sessões de RP em dias alternados. A média da última razão completada pelo animal em cada uma das três sessões de RP foi utilizada como valor do ponto de ruptura.

3.1.7.3 Acesso Livre Prolongado (“Binge”)

O protocolo de acesso contínuo ao etanol ou sacarina foi realizado por um período de 24 horas em RF1. Como o etanol possui efeito depressor, que causa prejuízos na função motora (POHORECKY, 1977), avaliamos somente as três primeiras horas do animal na sessão de “binge”. Um período extenso, de 24 horas, é mais utilizado para substâncias psicoestimulantes, como a cocaína (TANG, et al., 2004;

CRUZ, et al., 2011).

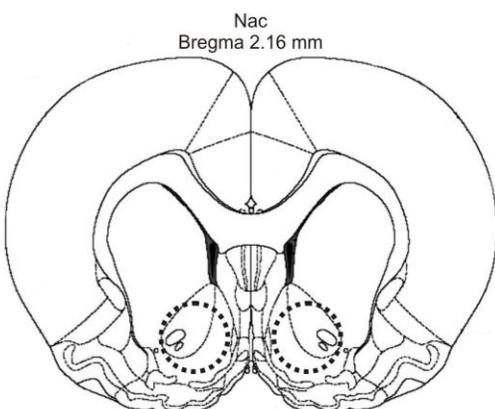


Figura 4. Esquema da seção do núcleo acumbens adaptado do atlas estereotático de Paxinos and Watson (2006).

3.1.8 Dissecação do Núcleo Acumbens

Os animais foram transferidos individualmente para uma sala com temperatura controlada entre 20 e 24°C para decapitação.

Os encéfalos foram removidos e mantidos em freezer -80°C. Posteriormente foram fatiados no

criostato sob temperatura de -15 a -20°C, seguindo-se as coordenadas estereotáticas para ratos do atlas de Paxinos e Watson (2006). A região de interesse, NAc, foi dissecada por meio de agulhas de ponta chata de 14 -16 gauge, e colocada em tubos criogênicos. Os tubos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C, para posterior análise da expressão gênica por RT-PCR.

3.1.9 Reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR)

3.1.9.1 Extração de RNA Total

A extração do RNA foi realizada utilizando-se o reagente Trizol® (Invitrogen®) de acordo com as recomendações do fabricante. O tecido foi macerado no próprio tubo criogênico, inicialmente com nitrogênio líquido, com auxílio de um pistilo de plástico, para evitar a quebra das membranas nucleares e posteriormente, foi adicionado Trizol

(1000 µl) e o tecido continuou sendo macerado. Em seguida, o macerado foi agitado vigorosamente com as mãos por 15 segundos e deixado em repouso por 3 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio, os tubos foram agitados vigorosamente com as mãos por 15 segundos e o macerado permaneceu em repouso por mais 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, a amostra foi centrifugada 12.000 xg a 4°C por 15 minutos. A fase superior (fase aquosa, ~400 µL) foi transferida para outro tubo, para precipitação do RNA total. Na sequência foram adicionados 460 µL de isopropanol e 40 µL de solução de acrilamida (5 mg/mL). A solução foi homogeneizada e, em seguida, centrifugada a 12.000 xg a 4°C por 15 minutos. Posteriormente, o precipitado foi lavado com etanol 75% duas vezes e secado durante 10 minutos. Na sequência, o RNA total foi solubilizado em 40 µL de água DEPC (0.1% dietilpirocarbonato) e incubado em banho-maria (65°C) por 10 minutos. As amostras foram armazenadas à -80°C.

3.1.9.2 Determinação da concentração do RNA total

A concentração de RNA foi determinada por espectrofotometria a 260nm, e a relação entre as absorvâncias 260/280nm foi analisada. Para isso 1,5 µL do RNA total, de cada amostra, foi lido no aparelho de espectrofotometria *NanoDrop 2000 – Thermo Scientific*.

As amostras que obtiveram o valor, na relação de absorvância 260/280nm abaixo de 1,7 foram eliminadas.

3.1.9.3 Tratamento das amostras com DNase

Para o tratamento com DNase, utilizou-se o kit Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen®) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, 1 µg de RNA das amostras, descritas no item 3.1.9.2; foi adicionado a uma mistura contendo: 1 µL 10XDNase I Reaction Buffer; 1 µl DNase I Amp Grade (1U/1 µl) e 1 µl de 25 mM de EDTA.

Essa etapa é importante para garantir que apenas o DNA complementar ao RNA extraído (cDNA) seja amplificado nas etapas posteriores, evitando a contaminação com DNA já existente na amostra.

3.1.9.4 Transcrição Reversa do RNA

A transcrição reversa de RNA foi feita logo após a conclusão das etapas descritas no item 3.1.9.3, utilizando-se o kit High Capacity c-DNA Archive (Applied Biosystems®), de acordo com as recomendações do fabricante.

Resumidamente, adicionou-se nas amostras do item 3.1.9.3: 2 µl 10x RT buffer; 0,8 µl 25X dNTP (100mM); 2 µl 10x RT random primer; 1 µl de transcriptase reversa, e completou-se o volume final de 25 µl com água DEPC. As amostras foram colocadas no termociclador (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700®) e ao término do procedimento o cDNA sintetizado foi armazenado à -20°C.

3.1.9.5 Seleção de oligonucleotídeos iniciadores

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (“*primers*”) dos genes alvos para a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) foram selecionados através da análise das sequências de RNAsm depositadas no Genbank, acessadas através do programa BLAST do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Os oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 1) foram desenhados para que os produtos tivessem entre 80 a 150 pares de base e apresentassem temperatura de anelamento de aproximadamente 60°C.

Tabela 1. Sequências 5´-3´ dos oligonucleotídeos iniciadores, senso (For) e anti-senso (Rev)

Nome da sequência	Sequência 5´ - 3´
PDYN-For	TCTGCGGCGTCAGTTCAAGG
PDYN-Rev	TGAGCCGGACACTGGATGGA
GAPDH-For	ATGGGAAGCTGGTCATCAAC
GAPDH-Rev	ACGCCAGTAGACTCCACGAC

3.1.9.6 Otimização dos oligonucleotídeos iniciadores

Foram realizadas reações de otimização para escolher a melhor concentração de cada oligonucleotídeo iniciador, processo importante para que os oligonucleotídeos não fossem fatores limitantes na velocidade da amplificação. As concentrações de oligonucleotídeos testadas foram 0,25µM; 0,4µM; 0,5µM e 0,7µM.

Em cada tubo, referente a cada concentração de oligonucleotídeos, foram adicionados: 4 µL de cDNA, 50 µL de fluorocromo SYBR green (do kit Promega qPCR master mix) e o volume das diferentes concentrações de iniciadores, descritas

anteriormente. Volumes de 20 µL foram pipetados de cada tudo, em triplicata e transferidos para os poços de uma placa. Sendo o quarto poço, considerado o branco da reação, uma vez que, ele não continha amostra de cDNA. Em seguida, as placas foram colocadas no equipamento para PCR em tempo real (Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR System), para o processo de amplificação.

O resultado do teste de otimização indicou que a melhor concentração para ambos os iniciadores (PDYN e GAPDH) foi de 0,5 µM.

3.1.9.7 Validação dos oligonucleotídeos iniciadores

Outro fator importante a ser considerado em experimentos de PCR quantitativo é a eficiência de amplificação do gene-alvo e do gene de referência, em função da concentração de cDNA utilizado. Para esta verificação foram realizadas diluições seriadas do cDNA das amostras controle, obtendo-se a relação: 1, 1/10, 1/100, 1/1000. As amostras de cDNA nas concentrações citadas foram submetidas a amplificação por PCR em tempo real. O teste foi realizado para cada gene utilizando a concentração de oligonucleotídeos iniciadores otimizada anteriormente (item 3.1.9.6). A reação foi a mesma descrita no item 3.1.9.6, com a diferença de que, neste caso, variou-se a concentração de cDNA, mantendo-se a concentração do oligonucleotídeo iniciador fixa (de acordo com a melhor concentração encontrada na otimização). O primer foi considerado eficiente quando o valor da inclinação da reta (slope) variou entre -3,1 a -3,7. Essas inclinações refletem eficiência de amplificação entre 85 a 115% [Eficiência = $(10^{(-1/\text{slope})} - 1) \times 100$].

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos no teste de validação.

Tabela 2. Resultado do teste de validação dos iniciadores PDYN e GAPDH.

Nome do Gene	Slope	R ²	Eficiência (%)
PDYN	-3,56	0,984	90,94
GAPDH	-3,39	0,99	97,23

3.1.9.8 Amplificação gênica por RT-PCR

Com os iniciadores validados e otimizados, as reações de RT-PCR foram processadas. Em cada tubo, referente ao tipo de tratamento e a um iniciador, foram adicionados: 4 µL de cDNA; 50 µL de fluorocromo SYBR green (do kit Promega qPCR master mix) e os oligonucleotídeos iniciadores, de acordo com os valores obtidos na otimização. Volumes de 20 µL foram pipetados de cada tubo, em triplicata, e transferidos para poços individuais da placa. Sendo, o quarto poço, considerado o branco da reação, uma vez que, não continha amostra de cDNA. Ao final, as placas foram colocadas no equipamento para PCR em tempo real, Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR System, para o processo de amplificação.

Os resultados de amplificação gênica foram normalizados em relação aos resultados do gene controle GAPDH. 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). Sendo o resultado expresso em unidades arbitrárias ($2^{-\Delta\Delta CT}$). O

modelo matemático utilizado para a obtenção das unidades arbitrárias para essa análise foi:

- 1- Subtração do valor de CT do gene PDYN pelo CT do gene GAPDH (ΔCt);
- 2- Média do ΔCt das amostras;
- 3- ΔCt de cada amostra – a média do ΔCt ($\Delta\Delta Ct$);
- 4- elevação negativa do $\Delta\Delta Ct$ na base 2 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.2 Experimento 2 – Áreas encefálicas ativadas na retirada imediata ou tardia da nicotina (experimentos realizados no National Institute on Drug Abuse, Baltimore, MD, EUA)

3.2.1 Parecer Ético

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Uso e Cuidados Animais do National Institute on Drug Abuse.

3.2.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar adolescentes machos (DPN 28) (Charles River, Raleigh, NC, EUA). Os animais foram transferidos para o biotério do Instituto no DPN 21 e alojados em duplas nas gaiolas moradias. Eles foram mantidos em condições controladas de temperatura (23-24°C) e ciclo de luz invertido (12/12 h, luz acesa às 20:00h), com livre acesso a alimento e água.

3.2.3 Droga

- (-) – Nicotina ([-]-1-methyl-2[3-pyridyl]pyrrolidine), 99% (Sigma)®

3.2.4 Cirurgia

Mini-bombas osmóticas (modelo Alzet 2ML2, Durect Corporation) foram implantadas subcutaneamente. Os ratos foram anestesiados com cetamina:xilazina (75:7,5 mg/kg, i.p.) e uma pequena incisão foi feita 5 cm abaixo das escápulas. As mini-bombas foram inseridas sob a pele, a incisão foi suturada e os ratos receberam 5 mg/kg (s.c) do analgésico Cetoprofeno e 85 mg/kg (i.m) de antibiótico Gentamicina. As mini-bombas Alzet proporcionaram uma taxa de infusão constante de 5 mL/h durante 10 dias.

3.2.5 Tratamento com nicotina

Ratos adolescentes receberam nicotina (3,16 mg/kg/dia) através das mini-bombas osmóticas durante 10 dias, começando no DPN 28. Para os animais controle, as mini-bombas foram preenchidas com solução salina. No décimo primeiro dia, os animais passaram novamente pelo procedimento cirúrgico para a remoção das mini-bombas.

3.2.6 Imunoistoquímica

Os ratos tratados com solução salina ou nicotina foram perfundidos no terceiro (n = 12 por grupo) ou décimo quinto (n = 12 por grupo) dia após a retirada das mini-bombas, para a realização dos ensaios imunoistoquímicos.

Os ratos foram anestesiados com isoflurano e perfundidos com 100 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS), seguido por 400 ml de paraformaldeído 4%. Os encéfalos foram pós-fixados em paraformaldeído durante 90 minutos e transferidos para solução de sacarose 30% em PBS a 4°C durante 2-3 dias. Posteriormente, os encéfalos foram 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 no criostato, sob temperatura de -15 a -20°C, seguindo-se as coordenadas estereotáxicas para ratos do 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 -3,2mm e -3,84 para o habenula (Hb).

As fatias coronais contendo as regiões encefálicas de interesse foram lavadas 3 vezes (10 minutos cada lavagem) com PBS e em seguida incubadas em solução bloqueadora (soro de cabra 3% e 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), em solução bloqueadora por 24 horas à 4°C.

Após essa incubação, as fatias foram lavadas com PBS por 3 vezes (10 minutos cada lavagem) e incubadas com anticorpo secundário, biotinilado anti-coelho (diluição 1:400; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) 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), Triton X-100 0,5% e PBS. Finalmente, as fatias foram lavadas 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), transferidas para solução de PBS e montadas em lâminas gelatinizadas com gelatina e alumínio-crômico. Quando secas as lâminas foram hidratadas em água destilada, em seguida desidratadas, em gradiente seriado de titulações crescentes de 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 imunomarcagem de Fos foi capturada através de 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 usando-se o programa Axio Vision Rel., versão 4.8. O valor de células positivas para cada animal representa a média dos 4 hemisférios.

3.2.7 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 (marcador neuronal); CamKII (marcador de neurônios glutamatérgicos do CPF) e GAD67 (marcador de neurônios GABAérgicos).

As fatias coronais com as regiões encefálicas de interesse foram obtidas conforme descrito no item 3.2.6.

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) e Triton X-100 0,3% diluídos em TBS, 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 do 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 ao 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 através do programa ImageJ. O valor de células positivas para cada animal representa a média dos 4 hemisférios.

Tabela 3. 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-NeuN	Camundongo	1:2000	Chemicon

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Experimento 1 – Efeitos da exposição a nicotina durante a adolescência nos comportamentos relacionados a ansiedade, expressão gênica de pró-dinorfina e autoadministração de etanol

4.1.1 Efeito da administração prévia de nicotina durante a adolescência na expressão de comportamentos relacionados a ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

Ratos adolescentes (DPN 28) (N= 17 ratos) foram tratados durante dez dias com três injeções diárias de nicotina (1,0 mg/kg) ou salina pela via subcutânea (s.c). Quinze dias após o término do tratamento (DPN 52), os animais foram testados no LCE para avaliarmos comportamentos relacionados a ansiedade na retirada da nicotina. O teste foi iniciado colocando-se o animal na plataforma central do labirinto (de frente para um dos braços abertos). 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 nas mesmas condições de iluminação, durante a fase de escuro do ciclo claro-escuro. As gravações foram analisadas utilizando-se um programa para análise comportamental (X-Plo-Rat) desenvolvido no Laboratório de Comportamento Exploratório da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo – campus Ribeirão Preto.

Os comportamentos analisados foram: a frequência de entrada nos braços abertos; frequência de entradas nos braços fechados (entrada = as quatro patas do animal dentro do braço) e o tempo de permanência nos braços abertos do labirinto.

Esses dados foram usados para calcular a porcentagem de tempo ($[\text{tempo aberto} \times 100] / \text{tempo total}$) e a porcentagem de entradas ($[\text{entrada aberto} / \text{total entradas}] \times 100$) nos braços abertos.

4.1.2 Efeito da administração prévia de nicotina durante a adolescência na expressão gênica da pró-dinorfina

Para verificar se somente a retirada da nicotina era capaz de alterar a expressão gênica de PDYN, ratos adolescentes (DPN 28) (N= 12 ratos) foram tratados durante dez dias com três injeções diárias de nicotina (1,0 mg/kg) ou salina pela via subcutânea (s.c). Quinze dias após o término do tratamento (DPN 52), os animais foram decapitados e seus encéfalos removidos e fatiados. A região do núcleo acumbens foi dissecada, congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C , para posterior análise da expressão gênica de PDYN por RT-PCR descrito no tópico 3.1.9.

4.1.3 Efeito da administração prévia de nicotina durante a adolescência na autoadministração de etanol

Ratos adolescentes (DPN 28) (N= 67 ratos) foram tratados durante dez dias com três injeções diárias de nicotina (1,0 mg/kg) ou salina pela via subcutânea (s.c). Quinze dias após o término do tratamento, os animais foram submetidos ao protocolo de autoadministração operante de etanol para determinação dos parâmetros de razão progressiva (DPN 75-79) e acesso livre prolongado (DPN 81-84) na idade adulta.

Como a solução de etanol é preparada em 0,05% de sacarina os animais do grupo controle receberam sacarina 0,05% como reforço.

Assim formaram-se os seguintes grupos:

- Salina/ sacarina (SAL-SAC)
- Salina/ etanol (SAL-ETOH)
- Nicotina/ sacarina (NIC-SAC)
- Nicotina/ etanol (NIC-ETOH)

4.1.4 Efeito da pré-exposição a nicotina na adolescência seguida da autoadministração de etanol na expressão gênica da pró-dinorfina

Ao final dos experimentos comportamentais (24 horas após a sessão de “binge”) os animais (DPN 82-85), foram decapitados e seus encéfalos removidos e fatiados. A região do NAc foi dissecada, congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C, para posterior análise da expressão gênica de PDYN por RT-PCR descrito no tópico 3.1.9.

4.1.5 Análise dos Resultados

Os resultados foram analisados estatisticamente da seguinte maneira: os experimentos que continham os fatores pré-tratamento (salina x nicotina) e tratamento (sacarina x etanol) foram analisados por ANOVA bifatorial e os experimentos que continham apenas o fator tratamento (salina x nicotina), foram analisados pelo teste *t*-

Student. Foi considerada diferença significativa quando as análises apresentaram $p < 0,05$.

Nos casos nos quais ANOVA mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) os resultados foram analisados pelo teste post hoc de Newman-Keuls.

4.2 Experimento 2 – Áreas encefálicas ativadas na retirada imediata e tardia da nicotina (experimentos realizados no National Institute on Drug Abuse, Baltimore, MD, EUA)

Os experimentos de imunistoquímica 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 abstinência à nicotina a curto e a longo prazo, respectivamente, 3 ou 15 dias após a interrupção do tratamento com nicotina.

Para esse fim, após a remoção das mini-bombas (item 3.2.5), os animais foram divididos em dois grupos, um grupo passou pelo processo de perfusão no 3º dia (DPN 40) após a retirada das mini-bombas e o outro grupo passou por este mesmo procedimento no 15º dia (DPN 52) após a retirada. Após a perfusão, os encéfalos foram coletados para posterior análise por imunistoquímica, como descrito nos itens 3.2.6 e 3.2.7.

Dessa forma, formaram-se os seguintes grupos:

- Salina 3º dia
- Nicotina 3º dia

- Salina 15º dia
- Nicotina 15º dia

4.2.1 Análise dos Resultados

Os dados referentes a expressão de Fos neuronal (DAB) foram analisados por ANOVA bifatorial, considerando-se os fatores tratamento (salina x nicotina) e tempo (3º x 15º dia). Efeitos foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Nos casos nos quais ANOVA mostrou diferenças significativas, os resultados foram analisados pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. Para os dados fenotípicos foram descritas a percentagem de células que expressaram Fos.

5 RESULTADOS

5.1 Experimento 1 – Efeitos da exposição à nicotina durante a adolescência nos comportamentos relacionados a ansiedade, expressão gênica de pró-dinorfina e autoadministração de etanol

5.1.1 Efeito da administração prévia de nicotina durante a adolescência na expressão de comportamentos relacionados a ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

A figura 5 mostra a análise dos comportamentos relacionados a ansiedade no labirinto em cruz elevado em ratos, 15 dias após o pré-tratamento com salina ou nicotina (3mg/kg/dia; s.c.) por 10 dias.

O teste *t-Student* revelou que não houve diferenças significativas entre os grupos em nenhuma das variáveis: % entradas nos braços abertos ($t(15) = -1,21$; $p > 0,05$); % tempo de permanência nos braços abertos ($t(15) = 0,084$, $p > 0,05$) e frequência de entradas nos braços fechados ($t(15) = -0,407$; $p > 0,05$).

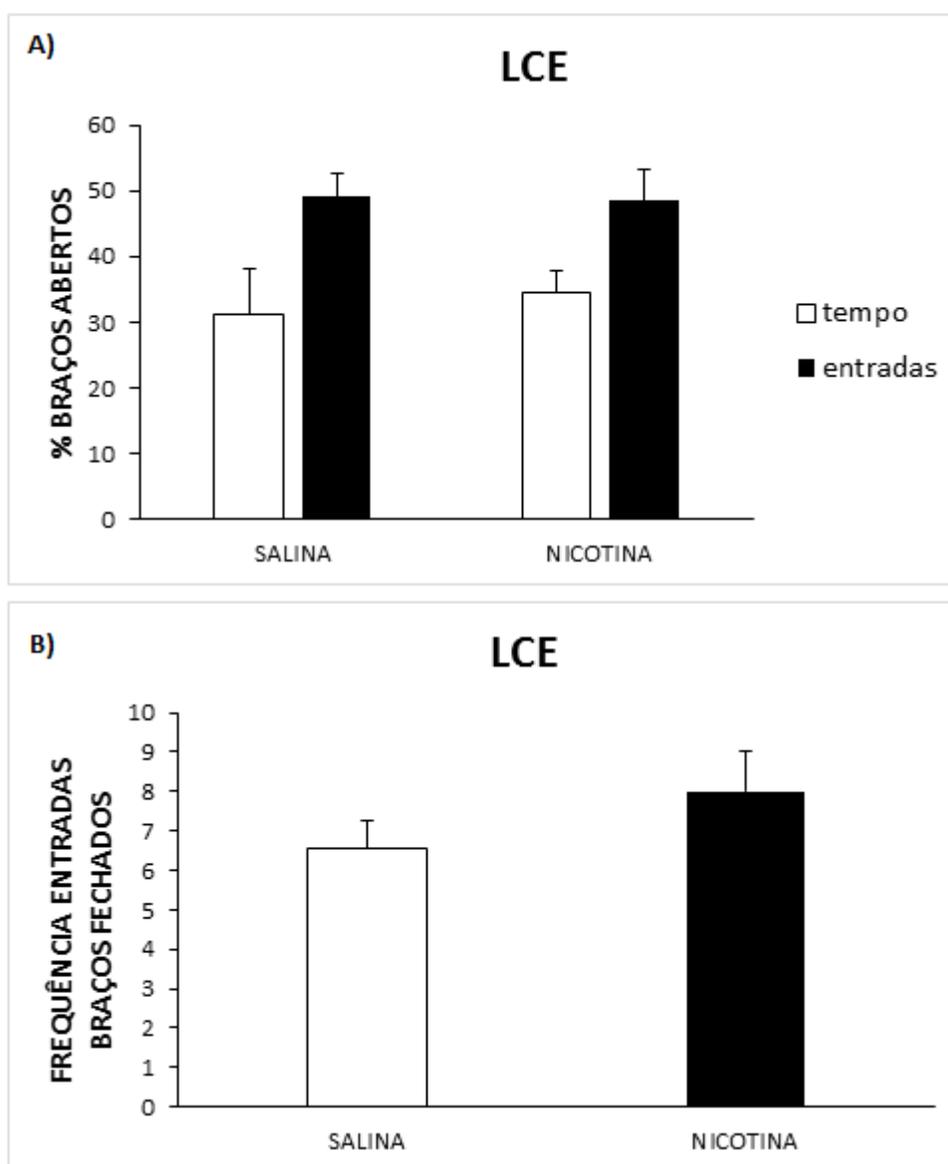


Figura 5. Comportamento dos animais no labirinto em cruz elevado, 15 dias após a interrupção do tratamento prolongado (10 dias) com nicotina (3mg/kg/dia s.c.). (A) porcentagem do número de entradas e do tempo de permanência nos braços abertos; (B) frequência de entradas nos braços fechados (N = 8-9 animais por grupo). Não houve diferença estatística entre os grupos.

5.1.2 Efeito da administração prévia de nicotina durante a adolescência na expressão gênica da pró-dinorfina

A figura 6 representa a análise semiquantitativa da expressão ($2^{-\Delta\Delta ct}$) do gene PDYN, 15 dias após o tratamento com salina (SAL) ou nicotina (NIC). O teste *t-Student* ($t(10) = 0,3397$; $p > 0,05$) mostrou que não houve diferença significativa na expressão gênica de PDYN entre os grupos SAL e NIC.

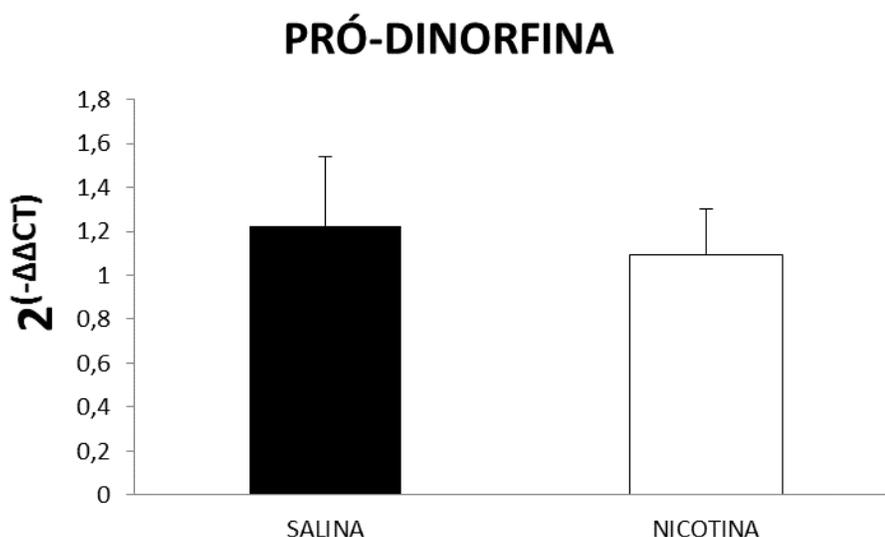


Figura 6. Análise semiquantitativa da expressão do gene PDYN em unidades arbitrárias ($2^{\Delta\Delta ct}$), 15 dias após a interrupção do tratamento prolongado (10 dias) com salina ou nicotina (3mg/kg/dia s.c.) (n = 6 animais por grupo). Não houve diferença estatística entre os grupos.

5.1.3 Efeito da administração prévia de nicotina durante a adolescência na autoadministração de etanol

5.1.3.1 Avaliação das variáveis da razão progressiva na autoadministração

A figura 7 mostra a média do número de respostas, durante as sessões de razão progressiva. ANOVA não indicou diferenças significativas para o fator pré-tratamento [$F(3,62) = 2,59$; $p > 0,05$] e tratamento [$F(3,62) = 2,43$; $p > 0,05$]. Também não foi

observada interação significativa entre os fatores pré-tratamento e tratamento [$F(3,62) = 2,86$; $p > 0,05$].

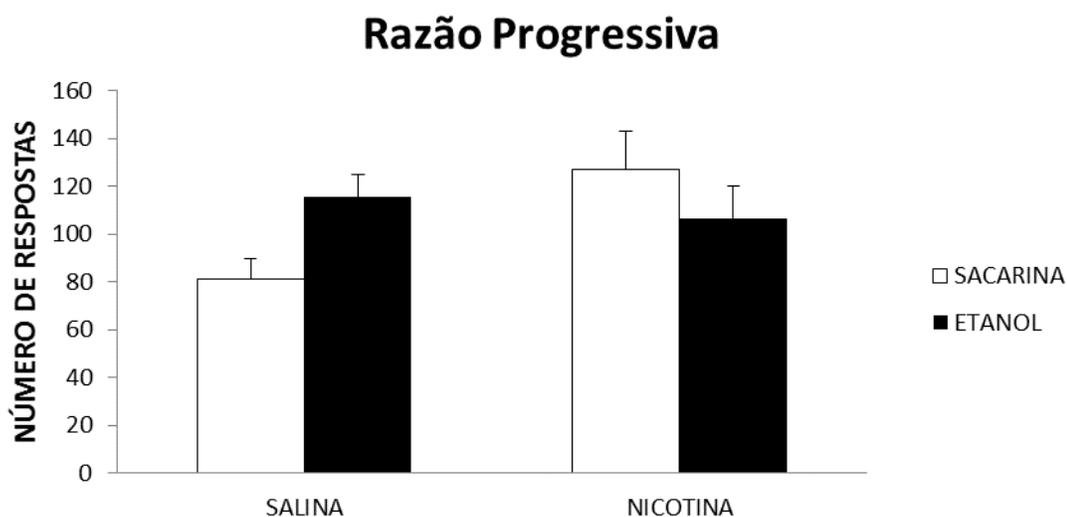


Figura 7. Autoadministração de etanol em ratos adultos após a interrupção do tratamento prolongado (10 dias) com nicotina (3mg/kg/dia s.c.) durante a adolescência. O histograma representa média \pm EPM (N = 11- 22 ratos por grupo) do número de respostas durante as sessões de razão progressiva (RP). Não houve diferença estatística entre as variáveis pré-tratamento e tratamento.

A figura 8 mostra a média do número de reforços, durante as sessões de razão progressiva. ANOVA não indicou diferenças significativas para o fator pré-tratamento [$F(3,62) = 2,22$; $p > 0,05$] e tratamento [$F(3,62) = 3,62$; $p > 0,05$]. Porém, foi observada interação significativa entre esses fatores [$F(3,62) = 4,04$; $p < 0,05$].

O teste de Newman-Keuls mostrou que o grupo NIC-SAC foi significativamente diferente do grupo SAL-SAC ($p < 0,05$). Indicando que o número de reforços do grupo NIC-SAC foi maior do que o do grupo SAL-SAC.

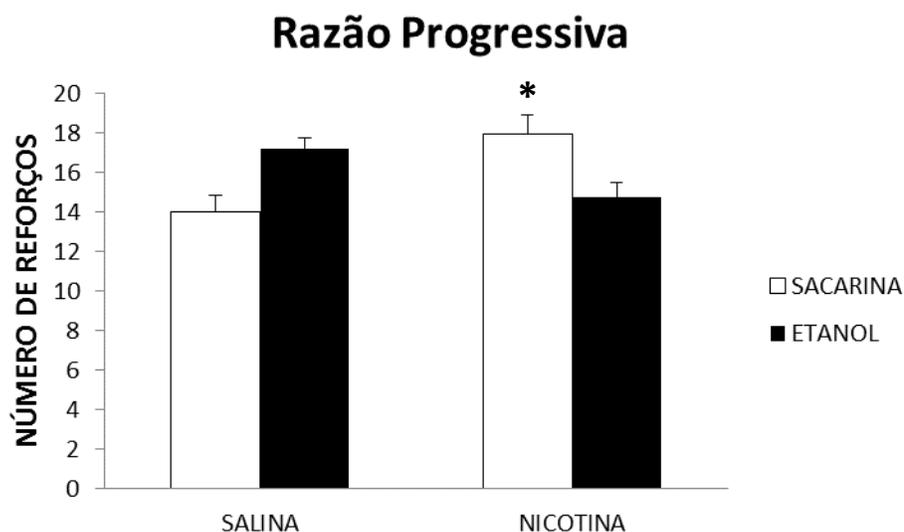


Figura 8. Autoadministração de etanol em ratos adultos após a interrupção do tratamento prolongado (10 dias) com nicotina (3mg/kg/dia s.c.) durante a adolescência. O histograma representa média \pm EPM (N = 11 – 22 ratos por grupo) do número de reforços durante as sessões de razão progressiva (RP). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SAL-SAC.

A figura 9 mostra a média da última razão completada (ponto de ruptura), durante as sessões de razão progressiva. ANOVA não indicou diferenças significativas para o fator pré-tratamento [$F(3,62) = 1,23$; $p > 0,05$] e tratamento [$F(3,62) = 3,55$; $p > 0,05$]. Porém, foi observada interação significativa entre esses fatores [$F(3,62) = 5,62$; $p < 0,05$].

O teste de Newman-Keuls mostrou que o grupo NIC-SAC foi significativamente diferente do grupo SAL-SAC ($p < 0,05$). Indicando que o ponto de ruptura do grupo NIC-SAC foi maior do que o do grupo SAL-SAC.

Razão Progressiva

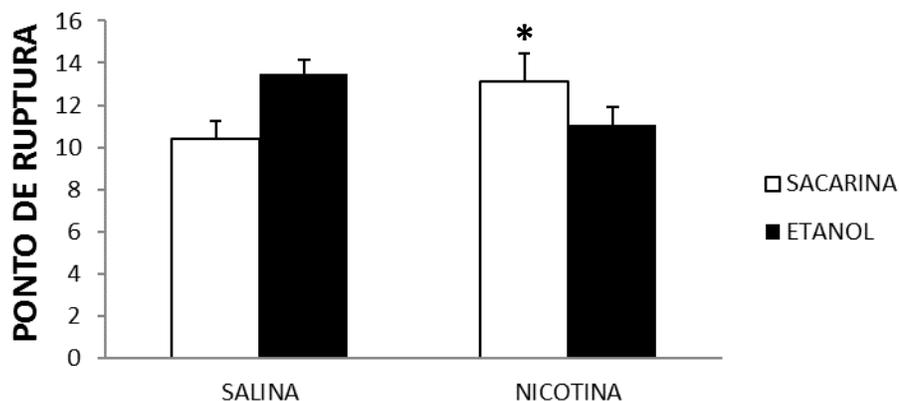


Figura 9. Autoadministração de etanol em ratos adultos após a interrupção do tratamento prolongado (10 dias) com nicotina (3mg/kg/dia s.c.) durante a adolescência. O histograma representa a média \pm EPM (N = 11 – 22 ratos por grupo) da última razão alcançada durante as sessões de razão progressiva (RP). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SAL-SAC.

5.1.3.2 Avaliação do consumo prolongado (“Binge”)

A figura 10 mostra a média do número de respostas, durante as sessões de “binge” por 3 horas. ANOVA não indicou diferença significativa para o fator pré-tratamento [$F(3,59) = 1,41$; $p > 0,05$], porém foi demonstrada diferença para o fator tratamento [$F(3,59) = 12,35$; $p < 0,05$]. No entanto, não foi observada interação significativa entre os fatores [$F(3,59) = 1,59$; $p > 0,05$].

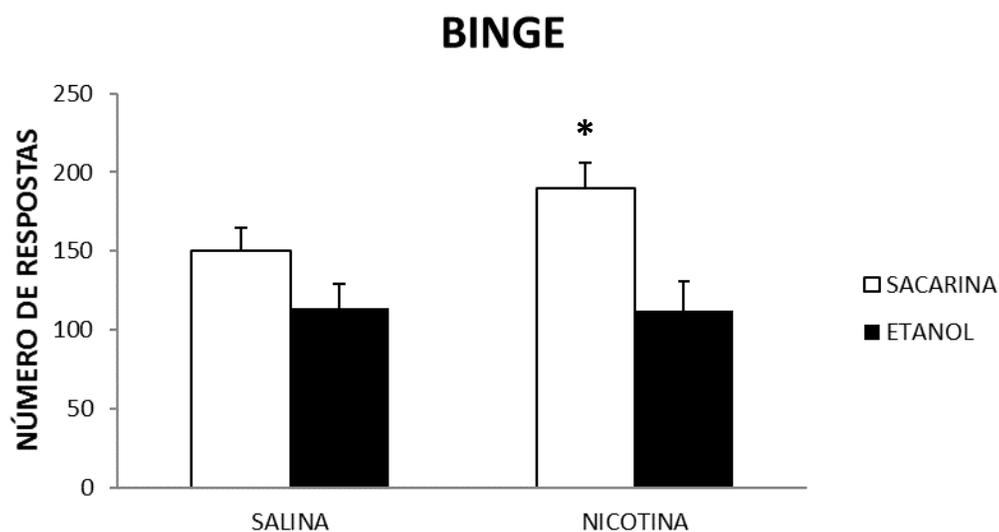


Figura 10. Autoadministração de etanol em ratos adultos após a interrupção do tratamento prolongado (10 dias) com nicotina (3mg/kg/dia s.c.) durante a adolescência. O histograma representa média \pm EPM (N = 14- 20 ratos por grupo) do número de respostas, em RF1, durante as três primeiras horas da sessão de “binge”. * $p < 0,05$, quando comparado aos grupos SAL-ETOH e NIC-ETOH.

A figura 11 mostra a média do número de reforços, durante as sessões de “binge”. ANOVA não indicou diferença significativa para o fator pré-tratamento [$F(3,59) = 0,0028$; $p > 0,05$], porém foi demonstrada diferença para o fator tratamento [$F(3,59) = 23,63$; $p < 0,05$]. No entanto, não foi observada interação significativa entre os fatores [$F(3,59) = 1,066$; $p > 0,05$].

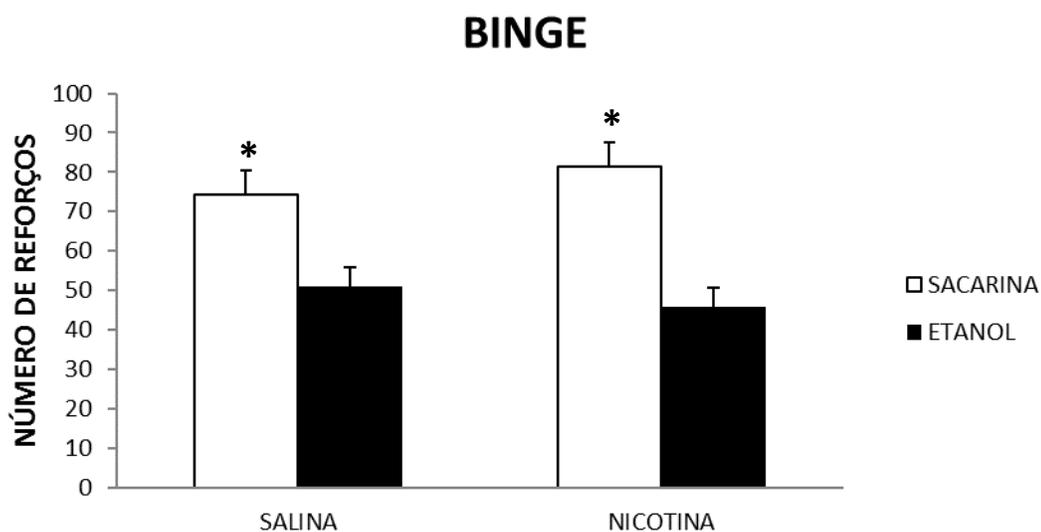


Figura 11. Autoadministração de etanol em ratos adultos após a interrupção do tratamento prolongado (10 dias) com nicotina (3mg/kg/dia s.c.) durante a adolescência. O histograma representa média \pm EPM (N = 14 - 20 ratos por grupo) do número de reforços, em RF1, durante as três primeiras horas da sessão de “binge”. * $p < 0,05$, quando comparado aos grupos SAL-ETOH e NIC-ETOH.

5.1.4 Efeito da pré-exposição a nicotina na adolescência seguida da autoadministração de etanol na expressão gênica da pró-dinorfina

A figura 12 representa a análise semiquantitativa da expressão ($2^{\Delta\Delta ct}$) do gene PDYN, 24 após a sessão de acesso livre prolongado ao etanol. ANOVA não indicou diferença significativa para o fator pré-tratamento [$F(3,25) = 0,01$; $p > 0,05$] e tratamento [$F(3,25) = 0,32$; $p > 0,05$]. Além disso, não foi observada interação significativa entre os fatores pré-tratamento e tratamento [$F(3,25) = 0,001$; $p > 0,05$].

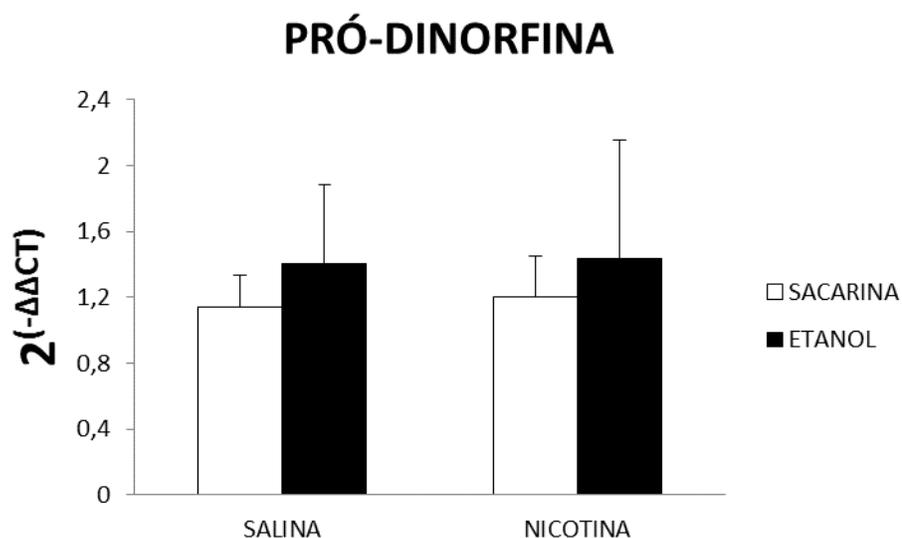


Figura 12. Análise semiquantitativa da expressão do gene PDYN em unidades arbitrárias ($2^{\Delta\Delta CT}$), 24 horas após a sessão de acesso livre prolongado ao etanol em ratos adultos (DPN 82-85) expostos a nicotina (3mg/kg/dia s.c.) na adolescência (n = 8 animais por grupo). Não houve diferença significativa entre os grupos.

5.2 Experimento 2 – Áreas encefálicas ativadas na retirada imediata e tardia de nicotina (experimentos realizados no National Institute on Drug Abuse, Baltimore, MD, EUA)

5.2.1 Expressão neuronal de Fos

Neste experimento avaliamos a ativação neuronal de algumas regiões encefálicas (CPFm, NAc e habenula) através da contagem de células positivas para a proteína Fos (marcador de ativação neuronal) 3 ou 15 dias após a interrupção do tratamento com nicotina.

5.2.1.1 Córtex Pré-Frontal Medial

A Figura 13, mostra cortes representativos do CPFm, indicando a região medial, onde foram quantificadas as células positivas para Fos.

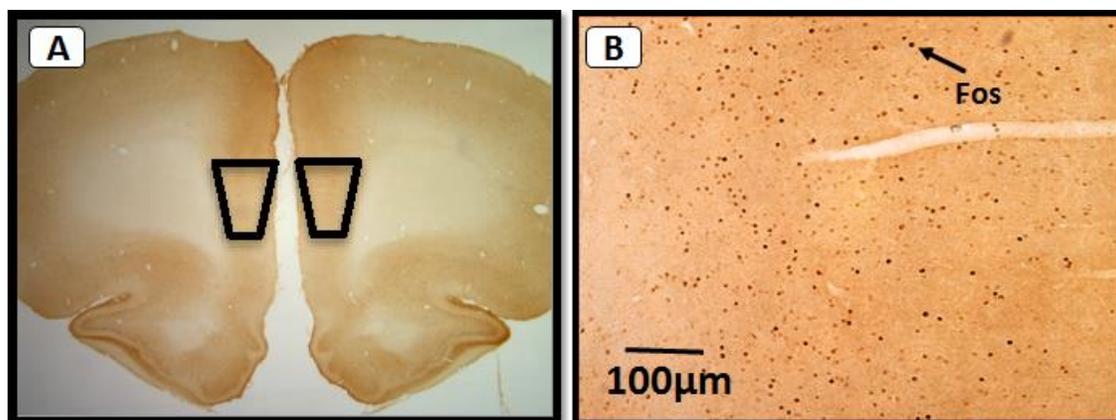


Figura 13. Cortes representativos do córtex pré-frontal mostrando (A) a região medial e (B) sua ampliação, onde foram quantificadas as células positivas para a proteína Fos (aumento de 12,5X e 100X, respectivamente).

A Figura 14 mostra a média de células positivas para Fos por mm² no CPFm. ANOVA bifatorial mostrou diferença significativa para o fator tratamento [$F(3,26) = 5,99, p < 0,05$], porém não foram encontradas diferenças significativas para o fator tempo [$F(3,26) = 1,50, p > 0,05$]. Houve interação significativa entre os fatores tratamento e tempo [$F(3,26) = 4,93, p < 0,05$]. A análise post-hoc indicou que a ativação de Fos estava aumentada no grupo "Nicotina 3^o dia" quando comparado aos demais grupos.

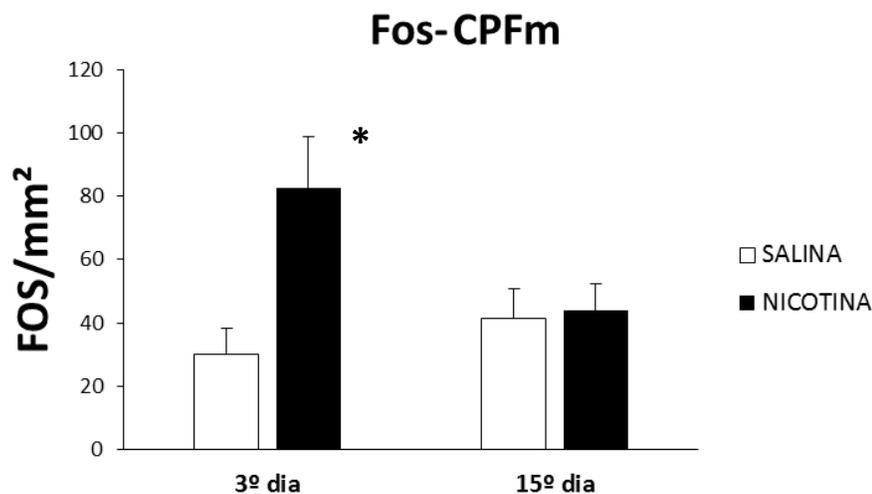


Figura 14. Células positivas para proteína Fos/mm² no córtex pré-frontal medial. O histograma representa a média \pm EPM (n = 7-8 animais por grupo). O valor de células positivas para cada animal representa a média de 4 hemisférios. *p<0,05 quando comparado aos demais grupos.

5.2.1.2 Núcleo Acumbens

A Figura 15, mostra cortes representativos da região do NAc, indicando onde foram quantificadas as células positivas para Fos/mm².

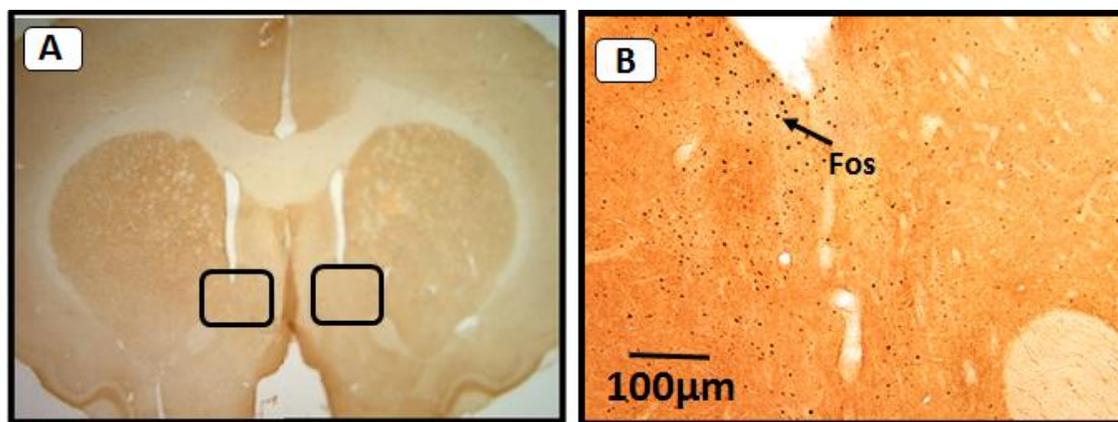


Figura 15. Cortes representativos do núcleo acumbens mostrando (A) a região onde foram quantificadas as células positivas para a proteína Fos e (B) a ampliação da região selecionada (aumento de 12,5X e 100X, respectivamente).

A Figura 16 mostra a média de células positivas para Fos/mm² no NAc.

ANOVA bifatorial não mostrou diferenças significativas para o fator tratamento [F (3,29) = 0,15; p > 0,05], porém foram encontradas diferenças significativas para o fator tempo [F (3,29) = 9,26; p < 0,05]. Não houve interação significativa entre os fatores tratamento e tempo [F (3,29) = 0,56, p > 0,05].

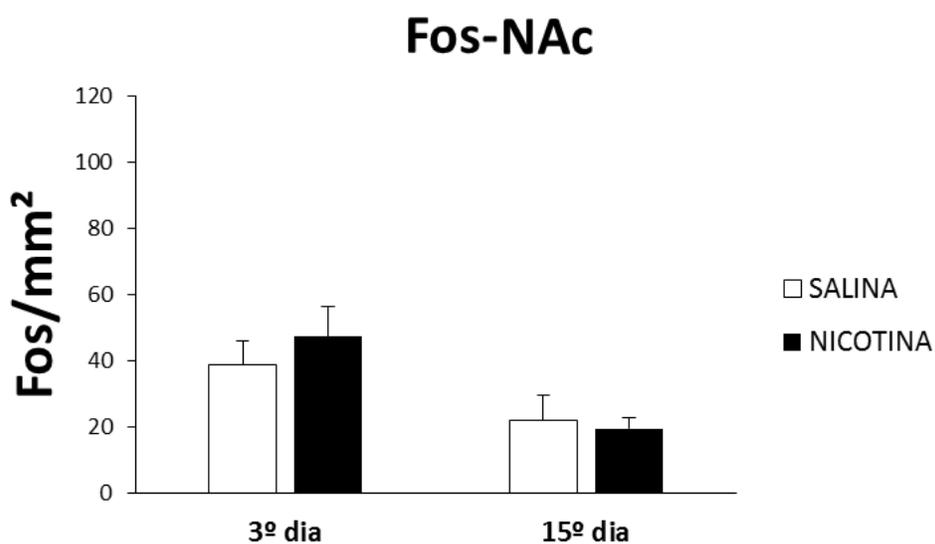


Figura 16. Contagem de células positivas para proteína Fos/mm² no núcleo acumbens. O histograma representa a média ± EPM (n = 7-9 animais por grupo). O valor de células positivas para cada animal representa a média de 4 hemisférios. Não houve diferença significativa entre os grupos salina e nicotina.

5.2.1.3. Habenula

A figura 17 apresenta cortes da região da Hb mostrando onde foram quantificadas as células positivas para Fos.

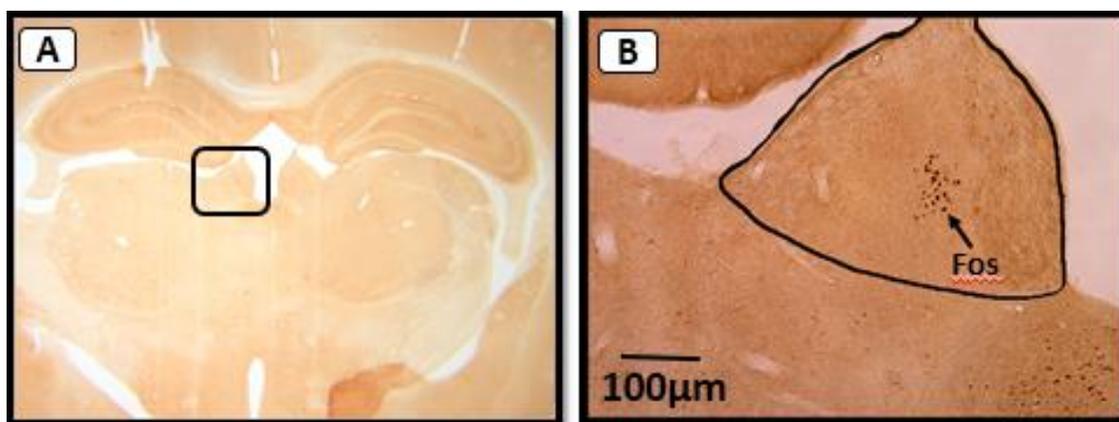


Figura 17. Cortes representativos da habenula mostrando **(A)** a região onde foram quantificadas as células positivas para a proteína Fos e **(B)** a ampliação da região selecionada (aumento de 12,5X e 100X, respectivamente).

A figura 18 mostra a média de células positivas para Fos/mm² na habenula.

ANOVA bifatorial não mostrou diferença significativa para o fator tratamento [F (3,30) = 0,99; $p > 0,05$], no entanto, foi observada diferença significativa para o fator tempo [F (3,30) = 5,34; $p < 0,05$]. Não houve interação significativa entre os fatores tratamento e tempo [F (3,30) = 0,06, $p > 0,05$].

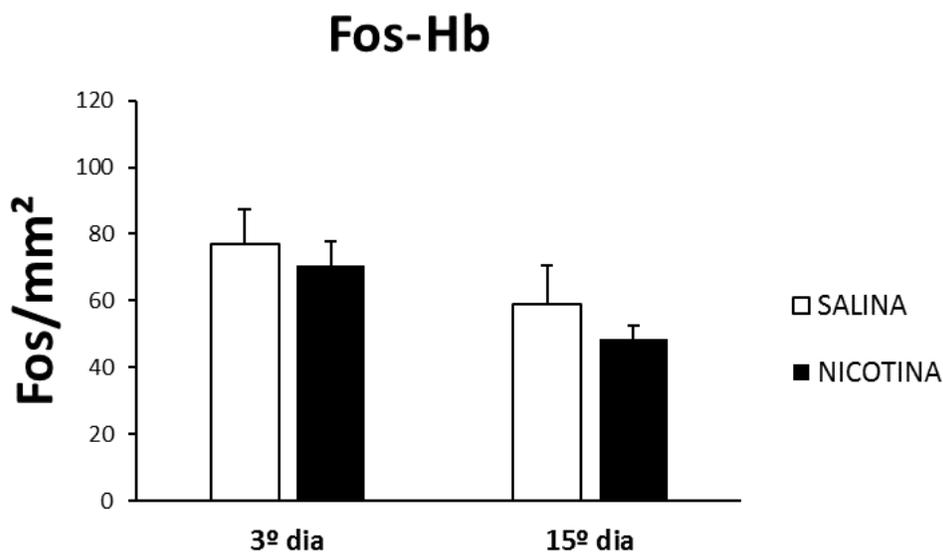


Figura 18. Células positivas para proteína Fos/mm² na habenula. O histograma representa a média \pm EPM (n = 7-10 animais por grupo). O valor de células positivas para cada animal representa a média de 4 hemisférios. Não houve diferença significativa entre os grupos salina e nicotina.

5.2.2 Porcentagem de ativação neuronal (dupla marcação Fos e NeuN)

Determinamos a porcentagem de expressão de Fos neuronal utilizando a técnica de imunistoquímica de dupla marcação para Fos e NeuN. O cálculo da porcentagem de ativação neuronal foi feito através da seguinte fórmula: [(número de Fos / número de NeuN) * 100]. A Figura 19 ilustra um corte representativo para a marcação de Fos e NeuN e também para a dupla marcação (Fos/NeuN).

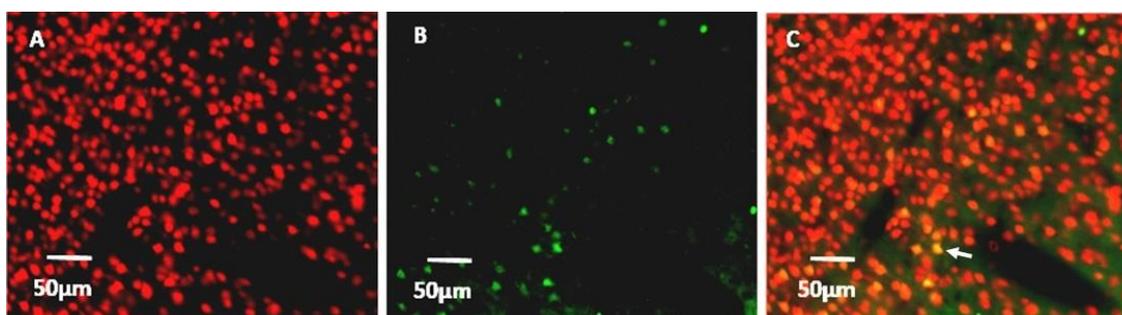


Figura 19. Cortes representativos mostrando a marcação de **(A)** NeuN e de **(B)** Fos e a **(C)** dupla marcação de Fos/NeuN (aumento de 200X).

A dupla marcação para Fos e para o marcador neuronal geral NeuN, indicou que apenas uma pequena porcentagem de neurônios foi ativada após os tratamentos; as porcentagens podem ser observadas na Tabela 4.

Tabela 4. Porcentagem de ativação neuronal no 3^o ou 15^o dia após a interrupção do tratamento com salina ou nicotina durante a adolescência. Os valores representam a média \pm EPM da porcentagem ($n = 3$ animais por grupo) de células ativadas em diferentes áreas encefálicas: córtex pré-frontal medial (CPFm); núcleo acumbens (NAc) e habenula (Hb).

Grupos	CPFm (%)	NAc (%)	Hb (%)
Salina 3 ^o dia	6.55 \pm 3.18	1.55 \pm 1.36	2.72 \pm 0.69
Nicotina 3 ^o dia	22.03 \pm 5.83	0.66 \pm 0.32	12.36 \pm 2.85
Salina 15 ^o dia	0.32 \pm 0.05	0.14 \pm 0.12	1.9 \pm 0.64
Nicotina 15 ^o dia	0.38 \pm 0.005	0.28 \pm 0.1	1.37 \pm 0.2

5.2.3 Análise do fenótipo dos neurônios positivos para Fos (dupla marcação de Fos e CamkII ou GAD67)

Neste experimento analisamos o fenótipo das células imuno reativas para Fos. Utilizamos CaMKII como um marcador de neurônios piramidais glutamatérgicos do córtex e o GAD67 como um marcador de neurônios GABAérgicos. A análise fenotípica foi feita apenas para a região do córtex pré-frontal medial, pois essa foi a única região que apresentou aumento na expressão de Fos 3 dias após a interrupção do tratamento com nicotina. Os dados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Fenótipo dos neurônios que foram ativados no 3º ou 15º dia após a interrupção do tratamento prolongado com salina ou nicotina no CPFm. Os valores representam a média \pm EPM da porcentagem (n = 3 animais por grupo) de células duplamente marcadas para Fos e CaMKII ou GAD67.

Grupos	GAD67 (%)	CaMKII (%)
Salina 3º dia	15.28 \pm 8.45	1.64 \pm 0.56
Nicotina 3º dia	28.53 \pm 6.65	2.6 \pm 0.51
Salina 15º dia	28.70 \pm 14.9	5.66 \pm 1.05
Nicotina 15º dia	22.22 \pm 11.1	7.41 \pm 3.6

A figura 20, mostra cortes representativos da marcação para CaMKII ou GAD67, Fos e da dupla marcação para Fos e GAD67 ou CaMKII.

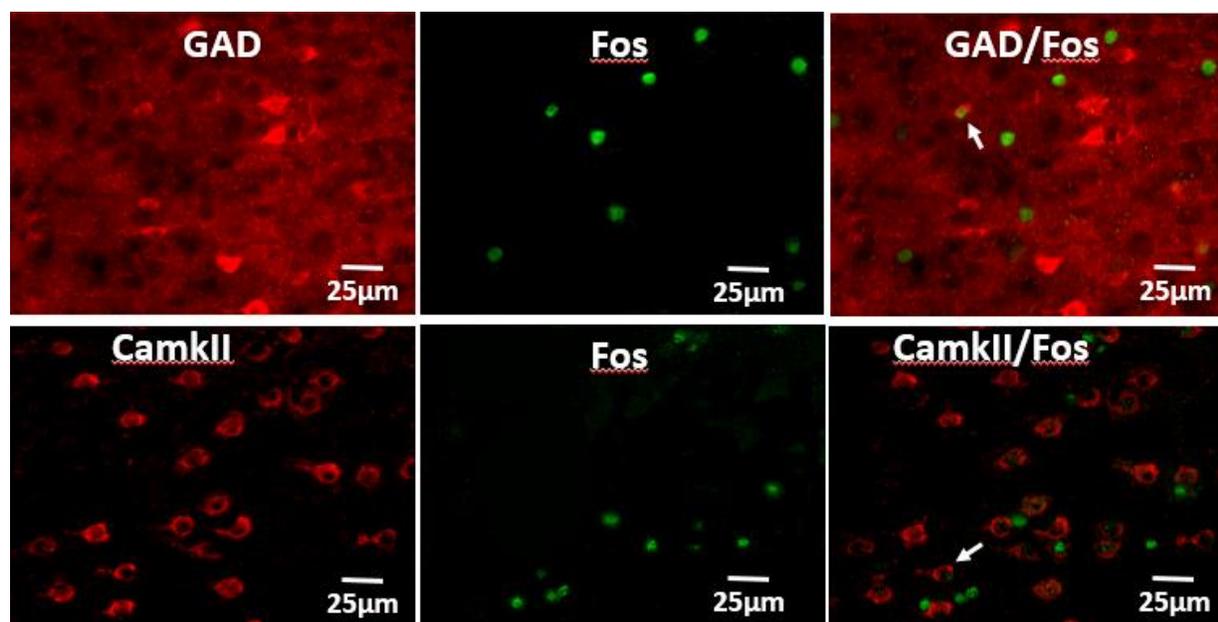


Figura 20. Cortes representativos mostrando a marcação para GAD67 ou CaMKII, Fos e para a dupla marcação para Fos e GAD67 ou CaMKII (aumento de 400X).

Com base nos marcadores neuronais utilizados (GAD67 ou CaMKII), observamos que a maior parte dos neurônios ativados no córtex pré-frontal medial 3 dias após a retirada da nicotina foram neurônios GABAérgicos, que representaram 28,53% de todos os neurônios ativados no CPFm. Os neurônios glutamatérgicos representaram somente 2,6% dos neurônios ativados nessa região. O cálculo da porcentagem para a análise fenotípica foi feito através da seguinte fórmula: $[(\text{número de dupla marcações Fos-GAD67 ou Fos-CaMKII} / \text{número total de Fos}) * 100]$.

6 DISCUSSÃO

A dependência é conceituada pelo uso compulsivo da droga, independentemente de suas consequências adversas. Além disso, ela caracteriza-se pelo surgimento de estados emocionais negativos como disforia, ansiedade e irritabilidade, quando o acesso a substância é limitado (KOOB, 2009; O'BRIEN, 2006, 2011).

Os fatores de riscos associados à perda do controle de uso das drogas ainda é um desafio para clínicos e pesquisadores (BLUM, et al., 2012; GAWIN, 1991; SÁNCHEZ-HERVÁS; LLORENTE DEL POZO, 2012; SEHGAL; MANCHIKANTI; SMITH, 2012). Dentre os inúmeros fatores de risco associados ao desenvolvimento da dependência encontram-se a exposição às drogas no período da adolescência e o uso prévio ou concomitante de diferentes substâncias de abuso (MARTÍNEZ-ORTEGA, et al., 2006; SCHMITZ; KRUSE; KUGLER, 2003; KOOB; LE MOAL, 2005).

O aparecimento de sintomas somáticos e emocionais negativos após a retirada da droga são fatores cruciais para a recaída e o uso compulsivo (KOOB, 1997, 2009; WEST, et al., 1989), dificultando o tratamento dos dependentes (BRANDON; LAZEV; JULIANO, 1998; KRALL; GARVEY; GARCIA, 2002; WETTER, et al., 2004). Apesar da importância da recaída após longos períodos de abstinência, poucos são os estudos que investigam as alterações que ocorrem e/ou permanecem na retirada tardia da nicotina.

No presente trabalho, avaliamos: as alterações nos comportamentos relacionados à ansiedade e na autoadministração operante de etanol em ratos adultos expostos à nicotina durante a adolescência; assim como, as alterações na expressão gênica da pró-dinorfina no NAc na abstinência tardia à nicotina e posteriormente à

autoadministração de etanol. Finalmente, investigamos quais as áreas encefálicas ativadas na abstinência, a curto e a longo prazo, da nicotina, após sua exposição na adolescência.

A ansiedade é um sintoma comum na síndrome de abstinência das drogas de abuso, sendo considerada um estado emocional negativo relacionado à busca de substâncias psicoativas. Neste sentido, diversos estudos mostram uma correlação entre o aumento dos comportamentos relacionados a ansiedade e o aumento do consumo de etanol (CICCOCIOPPO, et al., 2006; FUNK, et al., 2006; LEE; GREELY; OEI, 1999; MARINELLI, et al., 2007; PANDEY; ROY; ZHANG, 2003).

Com base nessas evidências, investigamos se a abstinência tardia de nicotina poderia alterar os comportamentos relacionados à ansiedade, e dessa forma, modificar a autoadministração de etanol. Nossos resultados mostraram que ratos adolescentes, pré-tratados com salina ou nicotina, avaliados no labirinto em cruz elevado, não apresentaram diferenças nos comportamentos relacionados a ansiedade 15 dias após o término do tratamento.

Ao avaliarmos a autoadministração de etanol em ratos adultos (DPN 75-79) que foram expostos à nicotina na adolescência (DPN 28-37), observamos que o pré-tratamento com nicotina não alterou o número de reforços e o ponto de ruptura para a obtenção de etanol no protocolo de razão progressiva. Entretanto, ocorreu aumento desses parâmetros para a autoadministração de sacarina, sugerindo que, a pré-exposição à nicotina na adolescência alterou a motivação dos animais para a busca de sacarina, mas não foi capaz de alterá-la para a busca de etanol.

Quando analisamos o padrão de consumo de sacarina e etanol durante o “binge” (DPN 81-84) de 3 horas, em razão fixa 1, observamos que a exposição prévia à nicotina na adolescência não alterou o número de respostas e o número de reforços nem para sacarina e nem para o etanol. Entretanto, observamos que o consumo de sacarina foi maior do que o consumo de etanol.

Dados do nosso laboratório, obtidos por Leão et al. (2013), mostraram que ratos adultos, expostos ao mesmo pré-tratamento com nicotina utilizado em nossos experimentos, apresentaram aumento nos comportamentos relacionados a ansiedade 24 horas após a retirada da nicotina. Os ratos pré-expostos à nicotina apresentaram, também, aumento de todos os parâmetros (número de respostas, reforços e ponto de ruptura) da razão progressiva; porém não observaram aumento no número de respostas e reforços no “binge”. Além disso, esses autores mostraram que a exposição prévia a nicotina não alterou o consumo de sacarina em nenhuma das variáveis analisadas. Leão et al. (2013), sugeriram que o aumento nos comportamentos relacionados a ansiedade estava correlacionado ao aumento da motivação e busca ao etanol nas sessões de autoadministração.

É importante ressaltar que, diferentemente do nosso protocolo no qual a exposição à nicotina ocorreu na adolescência, no delineamento experimental de Leão et al. (2013) os animais foram expostos à nicotina durante a idade adulta e os testes no LCE e o início do protocolo da autoadministração foram realizados 24 e 48 horas, respectivamente, após a suspensão do tratamento; enquanto que em nossos experimentos eles foram realizados 15 dias após o término do tratamento.

Estudos indicam que roedores adolescentes são menos susceptíveis aos sintomas da abstinência da nicotina do que os adultos (KOTA, et al., 2007; LE, et al., 2006). Por exemplo, Kota et al. (2007) ao avaliarem camundongos adultos e adolescentes no LCE, após o término do tratamento crônico com nicotina, observaram que apenas os camundongos adultos apresentaram aumento dos comportamentos relacionados a ansiedade.

Os dados relativos aos efeitos da exposição à nicotina na autoadministração de etanol ainda são controversos. Alguns estudos mostram aumento na autoadministração de etanol, quando os animais são expostos à nicotina (LE, et al., 2000, 2003; CLARK, et al., 2001; LÓPEZ-MORENO, et al., 2004; LEÃO et al., 2013), enquanto outros indicam que a exposição à nicotina diminui o consumo de etanol (NADAL, SAMSON, 1999; DYR, et al., 1999; SHARPE; SAMSON, 2002). As diferenças encontradas nos trabalhos acima devem-se, principalmente, a diferentes protocolos utilizados. Assim, discutiremos as diferenças e semelhanças entre os protocolos, para a melhor compreensão dos nossos resultados.

Poucos dos trabalhos investigaram o consumo de etanol no modelo de autoadministração operante após um período de abstinência à nicotina e os que fizeram, utilizaram animais adultos. Por exemplo, Nadal; Samson (1999) observaram redução no número de respostas na sessão de autoadministração operante, seis dias após a retirada da nicotina. Enquanto, López-Moreno et al. (2004), observaram aumento na autoadministração de etanol 14 dias após a suspensão do tratamento com nicotina. Vale ressaltar, que no trabalho de López-Moreno et al. (2004), os animais estavam privados de etanol durante o tratamento com nicotina, indicando que o

aumento encontrado na autoadministração de etanol, não estava necessariamente relacionado ao período de retirada da nicotina, mas provavelmente ao período de privação ao etanol.

Outro fato importante é que a diminuição da autoadministração de etanol encontrada por Nadal e Samson (1999) só ocorreu nos primeiros 15 minutos da sessão, após esse período o número de respostas do grupo pré-tratado com nicotina permaneceu igual ao grupo salina.

O aumento no número de respostas ao etanol observado por Le et al. (2000 e 2003) ocorreu quando a administração de nicotina era feita 15 minutos antes dos animais iniciarem as sessões de autoadministração. No entanto, quando Le et al. (2000), analisaram o consumo de etanol, no teste de livre escolha em garrafas, quatro dias após a suspensão das injeções de nicotina, observaram que, o consumo de etanol era o mesmo do grupo salina, dado que condiz com nossos resultados.

Kemppainen; Hyytia; Kiianmaa (2009), compararam as diferenças no consumo de etanol 10% no modelo de livre-escolha em garrafas em ratos adultos, que haviam recebido salina ou nicotina na adolescência ou na idade adulta. Os animais foram expostos ao etanol por um período de 28 dias e durante esse período, os pesquisadores não observaram aumento no consumo de etanol nem nos animais que haviam recebido nicotina na adolescência e nem naqueles expostos à esta substância na idade adulta. Ou seja, mostraram que a pré-exposição à nicotina, tanto na adolescência como na idade adulta, não foi capaz de alterar o consumo de etanol; essa evidência vai ao encontro dos resultados encontrados em nossos experimentos. Entretanto, eles observaram que, ao injetar nicotina 30 minutos antes de

disponibilizarem etanol aos animais, aqueles que haviam sido expostos à nicotina na adolescência apresentaram aumento no consumo de etanol; sugerindo que a reexposição à nicotina pode ser fundamental para o aumento no consumo de etanol nos animais previamente expostos a ela durante a adolescência.

Em relação aos resultados da autoadministração de sacarina, que foi utilizada como grupo controle da autoadministração, observamos aumento do ponto de ruptura, sugerindo aumento da motivação para a busca desta substância.

Estudos em humanos e roedores mostram que a retirada da nicotina aumenta o consumo de alimentos com sabores doces (GRUNBERG, 1982, 1988; GRUNBERG et al., 1985; HATSUKAMI, et al., 1984, 1993; HALL, et al., 1989), corroborando, assim, nossos resultados. Lesage et al. (2006) demonstraram que ratos pré-expostos à nicotina apresentaram aumento no número de respostas e no ponto de ruptura na autoadministração para obtenção de “pellets” de sacarose, no quarto e quinto dia após a retirada da nicotina.

Outros dados demonstram também que açúcares reduzem o desconforto da retirada ao tabaco (WEST, 2001) e aliviam o desejo de fumar em fumantes em abstinência a curto e longo prazo (WEST, et al., 1990; WEST, et al., 1999).

Quanto à associação entre o consumo de substâncias doces e o consumo de etanol, evidências na literatura sugerem que o efeito de recompensa do etanol e dos alimentos doces são mediados pelo mesmo mecanismo no sistema nervoso central. Eventos recompensadores como a alimentação, o consumo de etanol, e de outras drogas, são acompanhados da ativação do sistema dopaminérgico mesolímbico (HERNANDEZ; HOEBEL, 1988; LYNESS, et al. 1979; DI CHIARA, et al. 1998). Ou

seja, tanto o etanol, como a sacarina compartilham mecanismos dopaminérgicos comuns que medeiam seus efeitos hedônicos.

Contudo, o etanol apresenta também efeitos aversivos. Assim, Doyon et al. (2004) sugerem que a aversão ao etanol, tanto orrossensorial, como pós-absortiva, influenciam na quantidade de etanol consumida.

Segundo vários pesquisadores a aversão relacionada ao sabor do etanol justifica a adição de sacarina ou sacarose, na solução (CLARK, et al., 2001; LÓPEZ-MORENO, et al., 2004; NADAL; SAMSON, 1999; SHARPE; SAMSON, 2002), uma vez que a sacarina/sacarose mascara o sabor do etanol, fazendo com que os ratos (principalmente os sem preferência ao etanol) aumentem a quantidade de etanol consumida. Muitas vezes, a sacarina/sacarose, é eliminada gradativamente da solução, enquanto a concentração de etanol aumenta ao longo do tempo. Em nosso experimento, a sacarina não foi retirada da solução de etanol, concluímos, portanto, que ela interferiu na interpretação da recompensa ao etanol.

Sabendo-se que ratos sem preferência ao etanol, consomem menores quantidades desta substância, devido a suas propriedades aversivas (POHORECKY, 1977; FROEHLICH, et al. 1987), podemos inferir que o efeito reforçador da sacarina nos nossos resultados de binge, torna-se mais evidente do que o efeito reforçador do etanol, uma vez que, o consumo da sacarina está relacionado apenas ao seu efeito hedônico.

Em resumo, podemos ressaltar algumas diferenças metodológicas que podem ter influenciado os resultados da nossa pesquisa na autoadministração, dentre elas: pré-tratamento com nicotina no período da adolescência; longo período de abstinência;

ratos sem experiência prévia ao etanol (propriedades de reforço do etanol ainda não estão bem estabelecidas) e permanência da sacarina na solução.

O processo de dependência produz adaptações celulares em vários circuitos neurais, entre eles o sistema mesocorticolímbico (KOOB; LE MOAL, 2001). A nicotina ao se ligar aos nAChR, expressos nos neurônios GABAérgicos, glutamatérgicos e dopaminérgicos do mesencéfalo (KALIVAS, 1993; STEFFENSEN, et al., 1998; WALAAS; FONNUM, 1980), ativa algumas vias intracelulares e promove neuroadaptações (WONNACOTT; SIDHPURA; BALFOUR, 2005). A exposição crônica à nicotina, por exemplo, altera a síntese e a liberação dos peptídios opióides endógenos (BERRENDERO, et al. 2010).

Consequentemente, alterações no sistema opióide influenciam estados motivacionais e afetivos (STEINER; GERFEN, 1998). Em particular, o peptídeo opióide, dinorfina, diminui a liberação de dopamina na VTA e no estriado e contribui com os estados emocionais negativos expressos na retirada das drogas, sendo considerada um dos principais neurotransmissores do sistema de estresse ou “antirrecompensa” (DEVINE, et al. 1993; WEE; KOOB, 2010).

Neste sentido, o presente trabalho avaliou se a retirada da nicotina, ou o tratamento com nicotina seguido da autoadministração de etanol, modificaria a expressão gênica da pró-dinorfina no NAc. Nossos resultados mostraram que a expressão gênica da PDYN não foi alterada 15 dias após a interrupção do tratamento crônico com nicotina. No mesmo sentido, não observamos alteração da expressão gênica da PDYN quando a análise foi realizada ao final da autoadministração.

Dados relacionados a expressão gênica de PDYN, após o uso de nicotina, ainda são escassos na literatura. Isola et al., (2008) mostraram aumento da quantidade de RNAm de PDYN no estriato dorsal e ventral (NAc) de camundongos, 4 dias após a retirada da nicotina, dado que difere do nosso resultado. No entanto, o intervalo de tempo após a retirada da droga pode ser um fator importante quando se compara os resultados encontrados. No presente trabalho avaliamos a expressão gênica de PDYN 15 dias após a retirada (abstinência tardia) e Isola et al (2008) avaliaram a abstinência a curto prazo, 4 dias após a interrupção do tratamento. Ou seja, é provável que a quantidade de RNAm tenham retornado aos seus valores basais após um longo período de abstinência.

O sistema dinorfina/receptor Kappa opióide também está envolvido na modulação da ingestão de etanol. Przewlocka et al. (1997) mostraram que a administração crônica de etanol aumenta o conteúdo de RNAm de PDYN no NAc de ratos, em 24 e 48 h após retirada. No mesmo sentido, Lindholm et al. (2000) mostraram que ratos, cronicamente tratados com etanol por 13 dias, apresentam aumento na concentração de dinorfina 30 minutos e 21 dias após o término do tratamento. Nossos resultados, diferentemente dos dados citados anteriormente, não mostraram diferenças na expressão gênica da PDYN 24 horas após o binge, na autoadministração de etanol. Porém, nosso trabalho foi o primeiro a analisar a expressão gênica de PDYN, em animais expostos à nicotina e etanol.

Como não observamos alterações na expressão gênica de PDYN no NAc na abstinência tardia (15 dias) da nicotina, decidimos ampliar a investigação dos mecanismos moleculares associados à retirada. Assim, avaliamos, e comparamos, as

áreas encefálicas ativadas na retirada da nicotina a curto (3 dias) e a longo prazo (15 dias).

Para tanto, investigamos a expressão da proteína Fos no 3^o e no 15^o dia após a retirada da nicotina, em ratos cronicamente expostos à essa substância na adolescência. As análises foram realizadas em três diferentes áreas do sistema nervoso central: CPFm, NAc e Hb. Nossos resultados mostraram aumento na expressão de células positivas para Fos no CPFm no 3^o dia após a retirada da nicotina, entretanto, nenhuma alteração foi observada 15 dias após a retirada desta substância. Na região do NAc e da Hb não foram observadas diferenças na expressão de Fos entre os grupos salina e nicotina. A única diferença observada para essas áreas, independentemente da pré-exposição à nicotina, foi um decréscimo na ativação de células Fos positivas nos grupos salina e nicotina no 15^o dia, quando comparados aos grupos salina e nicotina no 3^o dia.

Os resultados obtidos para a dupla marcação de Fos/NeuN indicaram que o aumento da ativação de Fos no CPFm para o grupo “Nicotina - 3^o” dia correspondeu a uma pequena porcentagem de neurônios ativados (22,03%), que caracterizam, grupamentos neurais. Observamos ainda, que a porcentagem desses neurônios ativados no CPFm era maior para neurônios GABAérgicos (28,53%), quando comparados aos neurônios glutamatérgicos (2,6%).

Nossos resultados corroboram com aqueles que mostram aumento da ativação do CPFm durante a retirada aguda (24 horas) de etanol, morfina, cannabis e nicotina (CHAHL, et al., 1996; HAYWARD et al, 1990; MATSUMOTO, et al., 1993; NISELL, et

al., 1997; RODRÍGUEZ DE FONSECA, et al., 1997). Esses autores relacionam a ativação do CPFm à reação de estresse provocada pela abstinência imediata.

Outro estudo mostrou que o aumento da ativação dos neurônios, aferida pela quantificação de neurônios positivos para Fos, no CPFm após a retirada aguda (24h) de etanol, estava relacionado ao consumo excessivo dessa substância quando os animais eram reexpostos à ela (GEORGE, et al., 2012). Estes autores mostraram, ainda, o recrutamento de um subconjunto de neurônios GABAérgicos e CRFérgicos no CPFm durante a retirada. Nossos estudos mostraram que no terceiro dia de abstinência à nicotina a maior porcentagem dos neurônios ativados no CPFm eram GABAérgicos, (28,53%) seguidos de uma pequena porcentagem de neurônios glutamatérgicos (2,6%). Não avaliamos a porcentagem de ativação de neurônios CRFérgicos, mas sabendo que a região do córtex possui grande quantidade de neurônios glutamatérgicos, GABAérgicos e CRFérgicos (STEKETEE, 2003), e também que o neurotransmissor CRF está intimamente associado a ativação da via de estresse na abstinência (KOOB, 2010), possivelmente, os neurônios CRFérgicos poderiam representar uma porcentagem considerável dos demais neurônios ativados no CPFm.

Alguns autores sugerem que as neuroadaptações, induzidas pelas drogas no CPFm, facilitam a recaída (VAN DEN OEVER, et al., 2010; WEISSENBORN; ROBBINS; EVERITT, 1997). Como o CPFm apresenta desenvolvimento tardio durante a adolescência, fato que compromete o controle cognitivo do indivíduo, os adolescentes tornam-se mais susceptíveis ao uso compulsivo e a recaída as drogas (GOGTAY, et al., 2004; CASEY, et al., 2005).

Recentemente, pesquisadores demonstraram o envolvimento da habenula na síndrome de abstinência aguda à nicotina (SALAS et al., 2004, 2007, 2009). Eles observaram aumento dos sinais somáticos na retirada da nicotina, quando injetaram mecamilamina (antagonista do receptor nicotínico) na Hb medial. Contudo, não observamos alterações na ativação de Fos na Hb no 3º ou no 15º dia após o término do tratamento com nicotina. Esses dados sugerem que a Hb esteja envolvida apenas nas manifestações agudas da síndrome de abstinência.

Panagis et al. (2000) observaram que a indução da síndrome de abstinência aguda à nicotina, 24 horas após a injeção de mecamilamina, não alterou a ativação de Fos no NAc. No mesmo sentido, nossos resultados mostraram que a retirada da nicotina a curto e a longo prazo também não alteraram a ativação de Fos nessa região. Os dados em conjunto, sugerem que o NAc não está intimamente associado a abstinência à nicotina, diferentemente do que é observado na retirada de outras drogas de abuso, como a morfina e canabinóides (CHAHL, et al., 1996; HAYWARD, et al, 1990; RODRÍGUEZ DE FONSECA, et al., 1997).

Análises eletrofisiológicas feitas após tratamento crônico com cocaína em ratos, mostraram a participação da amígdala na abstinência tardia. Fu et al. (2007) mostraram aumento da potencialização a longo prazo entre a via da amígdala basolateral (BLA) e amígdala central no 14º dia após a retirada da cocaína. Fato não observado na retirada a curto prazo (1 a 7 dias). O resultado indica que a amígdala esteja associada a processos neuroadaptativos envolvidos na abstinência a longo prazo. Além disso, indica, também, que o aumento da atividade da amígdala está relacionado ao condicionamento contextual associativo, uma vez que é observado aumento da

atividade neuronal da BLA quando os animais são reexpostos ao ambiente onde recebiam cocaína, vários dias após a retirada (CICCOCIOPPO; SANNA; WEISS, 2001; BROWN, et al., 1992; NEISEWANDER, et al., 2000; THOMAS, et al., 2003). Contudo, a amígdala mostra-se extremamente importante no processo da abstinência tardia e recaída à cocaína, podendo ser uma região importante em estudos futuros para o melhor entendimento da retirada da nicotina a longo prazo.

Apesar da relevância da recaída tardia na dependência da nicotina, os mecanismos envolvidos ainda são pouco conhecidos, uma vez que, os resultados da literatura encontram-se focados na síndrome de abstinência aguda. Nossos resultados mostraram que a ativação de grupamentos neurais no CPFm, estão relacionados a retirada da nicotina a curto prazo. Porém, não observamos diferenças na ativação de células positivas pra Fos no CPFm, NAc e Hb, após a retirada da nicotina a longo prazo. Assim, outros experimentos fazem-se necessários para o melhor entendimento das neuroadaptações na abstinência tardia a nicotina.

Em resumo, nossos resultados mostraram que a retirada da nicotina a longo prazo não causou alterações na expressão do gene da PDYN e nos comportamentos relacionados a ansiedade, em animais expostos à essa substância na adolescência. Fato que pode estar associado à ausência de alteração no comportamento de busca ao etanol.

Por outro lado, observamos que o aumento da motivação para a ingestão de sacarina, permanece na idade adulta dos ratos por mais de um mês após a exposição prolongada a nicotina na adolescência. Mostrando que a pré-exposição a nicotina na

adolescência foi capaz de aumentar a busca para a sacarina, mas não foi suficiente para modificar a busca ao etanol.

Apesar de nossos resultados sugerirem que a exposição à nicotina durante a adolescência não causa alterações duradouras nos comportamentos relacionados à ansiedade e não modifica a autoadministração de etanol nos adultos jovens, é importante ressaltar que esta observação pré-clínica não é suficiente para contradizer as evidências clínicas/epidemiológicas que indicam que a exposição à nicotina durante a adolescência aumenta o risco de abuso e dependência ao etanol em etapas posteriores do desenvolvimento. Todavia, sugere que é necessário estudar melhor essa relação. Nossos dados evidenciam ainda, as dificuldades de se modelar um fenômeno complexo como a dependência ao etanol em animais.

7 CONCLUSÃO

Concluimos com os nossos resultados que:

- a) a retirada tardia da nicotina após da sua administração durante a adolescência, não promoveu alterações em comportamentos relacionados a ansiedade e também não foi capaz de alterar a motivação e a busca pelo etanol, nas etapas posteriores do desenvolvimento, contudo, aumentou a motivação para a busca de sacarina.
- b) a retirada tardia da nicotina não promoveu alterações na expressão gênica de PDYN no NAc; assim como não promoveu alterações na ativação neuronal da proteína Fos nas regiões do CPFm, NAc e Hb.
- c) a ativação de grupamentos neurais, principalmente GABAérgicos, no CPFm, estão associados a retirada da nicotina a curto prazo, após sua exposição durante a adolescência.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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.

BALS-KUBIK, R., et al. Neuroanatomical sites mediating the motivational effects of opioids as mapped by the conditioned place preference paradigm in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 264, p. 489–495, 1993.

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.

BERRENDERO, F., et al. Neurobiological mechanisms involved in nicotine dependence and reward: participation of the endogenous opioid system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35:220–31, 2010.

BLOMQUIST, B. et al. Voluntary ethanol intake in the rat: Effects of nicotinic acetylcholine receptor blockade or subchronic nicotine treatment. *European Journal Pharmacology*, v. 314, p. 257–267, 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.

BRANDON, T. H.; LAZEV, A. B.; JULIANO, L. M. Very delayed smoking relapse warrants research attention. *Psychol Rep.*, v. 83, p. 72 – 74, 1998.

BROWN, E. E.; ROBERTSON, G. S.; FIBIGER, H. C. Evidence for conditional neuronal activation following exposure to a cocaine-paired environment: role of forebrain limbic structures. *J Neurosci.*, v. 12; p. 4112–4121, 1992.

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

CAREY, R. J.; GUI, J. Cocaine conditioning and cocaine sensitization: what is the relationship. *Behav Brain Res.* v. 92, p. 67–76, 1998.

CARLEZON, W. A. JR. Depressive-like effects of the μ -opioid receptor agonist salvinorin on behavior and neurochemistry in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 316, p. 440–447, 2006.

CASEY, B. J. et al. Imaging the developing brain: What have we learned about cognitive development? *Trends Cogn Sci.*, v. 9; p. 104–110, 2005.

CEBRID (CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS). Livroto Informativo Sobre Drogas Psicotrópicas 2003. Disponível em: <<http://www.cebrid.epm.br/index.php>>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2011.

CEBRID (CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS). II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: 2005. Disponível em: <<http://200.144.91.102/cebridweb/download.aspx?cd=54>>. Acesso em: 25 de janeiro de 2011.

CEBRID (CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS

PSICOTRÓPICAS). VI Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio da Rede Pública e Privada nas Capitais Brasileiras 2010. Disponível em: <<http://www.obid.senad.gov.br/portais/OBID/biblioteca/documentos/Publicacoes/328890.pdf>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2013.

CHAHL, L. A. et al. Distribution of *c-fos* in guinea-pig brain following morphine withdrawal. *Brain Res*, v. 717, p. 127–134, 1996.

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.

CICCOCIOPPO, R; SANNA, P. P.; WEISS, F. Cocaine-predictive stimulus induces drug-seeking behavior and neural activation in limbic brain regions after multiple months of abstinence: reversal by D(1) antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 1976–1981, 2001.

CLARK, A. et al. Chronic infusion of nicotine can increase operant selfadministration of alcohol. *Neuropharmacology*, v. 41, p. 108–117, 2001.

CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL DE DOENÇAS (CID 10). Transtornos mentais e comportamentais devidos ao uso de múltiplas drogas e ao uso de outras substâncias psicoativas - síndrome de dependência. Acesso em: 20 de janeiro de 2014. Disponível em: <<http://www.bulas.med.br/cid-10/p/transtornos+mentais+e+comportamentais+devidos+ao+uso+de+multiplas+drogas+e+ao+uso+de+outras+substancias+psicoativas+sindrome+de+dependencia.html>>

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.

CORRIGALL, W. A. et al. The mesolimbic dopaminergic system is implicated in the reinforcing effects of nicotine. *Psychopharmacology*, v. 107, n. 2-3, p. 285-289, 1992.

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, p. 165-75, 2011.

CRUZ, F. C. et al. New technologies for examining the role of neuronal ensembles in drug addiction and fear. *Nature Neuroscience*, v.14, p. 743-754, 2013.

DAUNAIS, J. B.; ROBERTS, D. C.; MCGINTY, J. F. Cocaine self-administration increases preprodynorphin, but not c-fos, mRNA in rat striatum. *Neuroreport*, v. 4, p. 543–546, 1993.

DE BIASI, M.; DANI, J. A. Reward, Addiction, Withdrawal to Nicotine. *Annu. Rev. Neurosci.*, v. 34, p. 105–30, 2011. Review.

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, 1988.

DEVINE, D. P. et al. Differential involvement of ventral tegmental mu, delta and kappa opioid receptors in modulation of basal mesolimbic dopamine release: in vivo microdialysis studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 266, 1236e1246, 1993.

DI CHIARA, G. et al. Homologies and differences in the action of drugs of abuse and conventional reinforcer (food) on dopamine transmission: an interactive framework of the mechanism of drug dependence. *Adv Pharmacol.*, v. 42, p. 983–987, 1998.

DI CHIARA, G.; IMPERATO A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 85, p. 5274-5278, 1988b.

DI CHIARA, G.; IMPERATO, A. Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and dorsal caudate of freely moving rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 244, p. 1067-1080, 1988a.

DIFRANZA, J. R.; GUERRERA, M. P. Alcoholism and smoking. *Journal of Studies on Alcohol* v. 51, n. 2, p. 130–135, 1990.

DOYON, W. M. et al. Accumbal dopamine concentration during operant self-administration of a sucrose or a novel sucrose with ethanol solution. *Alcohol*, v. 34, p. 261–271, 2004.

DYR, W. et al. Involvement of nicotine acetylcholine receptors in the regulation of alcohol drinking in Wistar rats. *Alcohol and Alcoholism*, v. 34, p. 43-47, 1999.

ECONOMIDOU, D. et al. Effect of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR-141716A on ethanol self-administration and ethanol-seeking behaviour in rats. *Psychopharmacology*, v. 183, p. 394–403, 2006.

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

FAGERGREN, P. et al. Temporal upregulation of prodynorphin mRNA in the primate striatum after cocaine self-administration. *European Journal of Neuroscience*, v. 17, p. 2212–2218, 2003.

FROEHLICH, J. C. et al. Differences in Response to the Aversive Properties of Ethanol in Rats Selectively Bred for Oral Ethanol Preference. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, v. 31, p. 215-222, 1987.

FU, Y. et al. Long-Term Potentiation (LTP) in the Central Amygdala (CeA) Is Enhanced After Prolonged Withdrawal From Chronic Cocaine and Requires CRF1 Receptors. *J Neurophysiol.*, v. 97, p. 937–941, 2007.

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.

FUNK, D.; MARINELLI, P. W., LE, A. D. Biological processes underlying co-use of alcohol and nicotine: neuronal mechanisms, cross-tolerance, and genetic factors. *Alcohol Res Health*, v. 29, p. 186–192, 2006.

GALVAN, A. et al. Risktaking and the adolescent brain: *Who is at risk?* *Dev Sci*, v. 10, p. F8–F14, 2007.

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

GEORGE, O. et al. Recruitment of medial prefrontal cortex neurons during alcohol withdrawal predicts cognitive impairment and excessive alcohol drinking. *PNAS*, v. 109, n. 44, p. 1-6, 2012.

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.

GIEDD; J. N. Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain. *Ann NY Acad Sci.*, v. 1021, p. 77–85, 2004.

GILPIN, N. W.; KOOB, G. F. Effects of beta-adrenoceptor antagonists on alcohol drinking by alcohol-dependent rats. *Psychopharmacology*, v. 212, n. 3, p.431-439, 2010.

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.

GOGTAY, N, et al. Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proc Natl Acad Sci*, v. 101, p. 8174–8179, 2004.

GRANT, B. F. The impact of a family history of alcoholism on the relationship between age at onset of alcohol use and DSM-IV alcohol dependence: results from the National Longitudinal Alcohol Epidemiologic Survey. *Alcohol Research & Health*, v. 22, n. 2, p. 144-147, 1998.

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

GRUNBERG, N. E. et al. The importance of sweet taste and caloric content in the effects of nicotine on specific food consumption. *Psychopharmacology*, v. 87, p. 198–203, 1985.

GRUNBERG, N. E. The effects of nicotine and cigarette smoking on food consumption and taste preferences. *Addict Behav*, v. 7, p. 317–331, 1982.

GRUNBERG, N. E.; POPP, K. A.; WINDERS, S. E. Effects of nicotine on body weight of rats with access to 'junk' foods. *Psychopharmacology*, v. 94, p. 536–539, 1988.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'- motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 327, 1-5, 1984.

HALL, S. M. et al. Changes in food intake and activity after quitting smoking. *J Consult Clin Psychol*, v. 57, p. 81–6, 1989.

HATSUKAMI, D. K. et al. Effects of tobacco abstinence on food intake among cigarette smokers. *Health Psychol*, v. 12, p. 499–502, 1993.

HATSUKAMI, D. K. et al. Tobacco withdrawal symptoms: an experimental analysis. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 84, p. 231–236, 1984.

HAYWARD, M. D.; DUMAN, R. S.; NESTLER, E. J. Induction of the *c-fos* proto-oncogene during opiate withdrawal in the locus coeruleus and other regions of rat brain. *Brain Res*, v. 525, p. 256–266, 1990.

HERNANDEZ, L.; HOEBEL, B. G. Feeding and hypothalamic stimulation increases dopamine turnover in the accumbens. *Physiol Behav.*, v. 44, p. 599-606, 1988.

HOLTER, S. M. et al. Kappa opioid receptors and relapse-like drinking in long-term ethanol experienced rats. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 153, p. 93–102, 2000.

HURD, Y. L. et al. Cocaine self-administration differentially alters mRNA expression of striatal peptides. *Molecular Brain Research*, v. 13, p. 165–170, 1992.

ISE Y. et al. Modulation of kappaopioidergic systems on mecamylamine-precipitated nicotine withdrawal aversion in rats. *Neurosci Lett.*, v. 323, p. 164–166, 2002.

ISOLA, R. et al. Dynorphin and prodynorphin mRNA changes in the striatum during

nicotine withdrawal. *Synapse*, v. 62, p. 448-455, 2008.

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.; SHARPE, L. G. Captopril and capsaicin modify opioid withdrawal in the morphine-dependent rat. *Pharmacology, biochemistry and behavior*, v.33, p. 899-902, 1989.

KALIVAS, P. W. Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 18:75–113, 1993.

KANDEL, D. B. et al. On the development of nicotine dependence in adolescence. *Drug Alcohol Depend*, v. 91, p. 26–39, 2007.

KANDEL, D. et al. Prevalence and demographic correlates of symptoms of last year dependence on alcohol, nicotine, marijuana and cocaine in the U.S. population. *Drug Alcohol Depend*, v. 44, p. 11–29, 1997.

KEMPPAINEN, H.; HYYTIA, P.; KIIANMAA, K. Behavioral Consequences of Repeated Nicotine During Adolescence in Alcohol-Preferring AA and Alcohol-Avoiding ANA Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 33, n. 2, p. 340-349, 2009.

KING, K. M.; CHASSIN, L. A Prospective Study of the Effects of Age of Initiation of Alcohol and Drug Use on Young Adult Substance Dependence. *J Stud Alcohol Drugs*, v. [68](#), n. [2](#), p. 256-65, [2007](#).

KNACKSTEDT, L. A.; KALIVAS, P. W. Extended access to cocaine self-administration enhances drug-primed reinstatement but not behavioral sensitization. *J Pharmacol Exp Ther.* v. 322, n. 3, p. 1103-9, 2007.

KOOB, G. F., LE MOAL, M. Addiction and the brain antireward system. *Annual Review of Psychology*, v. 59, p. 29–53, 2008.

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, p. 18–31, 2009. Review.

KOOB, G. F. Opponent process model and psychostimulant addiction. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 57, p. 513–521, 1997.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Drug abuse: Hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278:52–58, 1997.

KOOB, G. F. The role of CRF and CRF-related peptides in the dark side of addiction. *Brain Research*, v. 1314, p. 3–14, 2010.

KOTA, D. et al. Nicotine Dependence and Reward Differ between Adolescent and Adult Male Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 322, n. 1, p. 399-407, 2007.

KRALL, E. A.; GARVEY, A. J.; GARCIA, R. I. Smoking relapse after 2 years of abstinence: findings from the VA Normative Aging Study. *Nicotine Tob Res*; v. 4, p. 95–101, 2002.

LAND, B.B. The dysphoric component of stress is encoded by activation of the dynorphin k opioid system. *J. Neurosci.*, v. 28, p. 407-414, 2008.

LE, A. D. et al. Nicotine increases alcohol self-administration and reinstates alcohol seeking in rats. *Psychopharmacology*, v. 168, p. 216, 2003.

LE, A. D. et al. Involvement of nicotinic receptors in alcohol self-administration. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 24, n. 2, p. 155-63, 2000.

LEÃO, R. M., et al. Mecanismos Comportamentais e Moleculares Envolvidos na Interação entre as Substâncias de Abuso e os Fatores de Risco para o Desenvolvimento da Dependência. Disponível em: <http://www.bdtf.ufscar.br/htdocs/tedeSimplificado//tde_busca/arquivo.php?codArquivo=5931>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2014.

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*, v. 194, p. 103-16. 2007.

LECCA, S; MEYE, L, J; MAMELI, M. The lateral habenula in addiction and depression: an anatomical, synaptic and behavioral overview. *European Journal of Neuroscience*, v. 39, p. 1170–1178, 2014.

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, O. et al. Diminished nicotine withdrawal in adolescent rats: implications for vulnerability to addiction. *Psychopharmacology*, v.186, p. 612–619, 2006.

LESAGE, M. G.; BURROUGHS, D.; PENDEL, P. R. Effects of nicotine withdrawal on performance under a progressive-ratio schedule of sucrose pellet delivery in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 83, p. 585–591, 2006.

LINDHOLM, S. et al. Repeated ethanol administration induces short- and long-term changes in enkephalin and dynorphin tissue concentrations in rat brain. *Alcohol*, v. 22, p. 65–171, 2000.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)*, v.92, n.2, p.180-185, 1987.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $^{-\Delta\Delta}C_T$ Method. [Methods](#), v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LÓPEZ-MORENO, J. A. et al. Nicotine in alcohol deprivation increases alcohol operant self-administration during reinstatement. *Neuropharmacology*, v. 47, p. 1036-1044, 2004.

LU, L. et al. Role of ERK in cocaine addiction. *Trends Neuroscience*, v. 29, p. 695-703, 2006.

LUMENG, L. et al. Different sensitivities to ethanol in alcohol-preferring and – nonpreferring rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 16, p. 125-130; 1982.

LYNESS, W. H.; FRIEDLE, N. M.; MOORE, K. E. Destruction of dopaminergic nerve terminals in nucleus accumbens: effect on *d*-amphetamine selfadministration. *Pharmacol Biochem Behav.*, v. 11, p. 553–556, 1979.

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

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.

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.

MATSUMOTO, I. et al. Immediate early gene expression in the rat brain during ethanol withdrawal. *Mol Cell Neurosci.*, v. 4, p. 485–491, 1993.

MAYR, B.; MONTMINY, M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 2, p. 599-609, 2001.

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

MCLAUGHLIN, J.P. κ -Opioid receptor antagonism and prodynorphin gene disruption block stress-induced behavioral responses. *J. Neurosci.*, v. 23, p. 5674-5683, 2003.

MCMILLEN, B. A. et al. Periadolescent nicotine exposure causes heterologous sensitization to cocaine reinforcement. *Eur J Pharmacol.*, v. 509, p. 161–164, 2005.

MCQUOWN, S. C.; BELLUZZI, J. D.; LESLIE, F. M. Low dose nicotine treatment during

early adolescence increases subsequent cocaine reward. *Neurotoxicol Teratol.*, v. 29, p. 66–73, 2007.

MORATO, S. O Papel da Visão na Aversão aos Espaços Abertos no Labirinto em Cruz Elevado. *Psicologia USP*, v. 17, n. 4, p. 159-174, 2006.

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

NADAL, R.; SAMSON, H. H. Operant ethanol self-administration after nicotine treatment and withdrawal. *Alcohol*, v. 17, p. 139–147, 1999.

NEISEWANDER, J. L. et al. Fos protein expression and cocaine-seeking behavior in rats after exposure to a cocaine self-administration environment. *J Neurosci.*, v. 20, p. 798–805, 2000.

NESTLER, E. J. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 2, p. 119–128, 2001.

NESTLER, E. J. et al. Molecular and Cellular Basis of Addiction. *Science*, v. 278, p. 58-63, 1997.

NESTLER, E. J. Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology*, v. 47, p. 24–32, 2004.

NISELL, M. et al. Chronic Nicotine Enhances Basal and Nicotine-Induced Fos Immunoreactivity Preferentially in the Medial Prefrontal Cortex of the Rat. *Neuropsychopharmacology*, v. 19, n.3, 1997.

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.; DACKIS, C.A. Cocaine dependence: a disease of the brain's reward centers. *Journal of Substance Abuse Treatment*, v. 21, p.111 – 117, 2001.

O'LOUGHLIN, J. et al. Nicotine-dependence symptoms are associated with smoking frequency in adolescents. *Am J Prev Med*, v. 25, p. 219–25, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS) 2011. Global Status Report on alcohol and health. Disponível em: <http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/msbgsruprofiles.pdf>. Acesso em: 02 de setembro de 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS) 2012. Disponível em: <http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/EN_WHS2012_Full.pdf>. Acesso em: 02 de setembro de 2013.

PANAGIS, G. et al. Selective *c-fos* Induction and Decreased Dopamine Release in the Central Nucleus of Amygdala in Rats Displaying a Mecamylamine-Precipitated Nicotine Withdrawal Syndrome. *Synapse*, v. 35, p. 15–25, 2000.

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.

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. 1863-1870, 2007.

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

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods. Amsterdam*, v.14, p.149-167, 1985.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 24, 525-529, 1986.

PICCIOTTO, M. R.; KENNY, P. J. Molecular mechanisms underlying behaviors related to nicotine addiction. *Cold Spring Harb Perspect Med*. v. 3, n. 1, 2013.

PITKANEN, T.; LYYRA, A. L.; PULKKINEN, L. Age of onset of drinking and the use of alcohol in adulthood: a follow-up study from age 8-42 for females and males. *Addiction* 100:652-661, 2005.

PLANETA, C. S.; GRAEFF, F.G. Abuso e dependência de substâncias psicoativas. In: Frederico Guilherme Graeff; Francisco Silveira Guimarães. (Org.). *Fundamentos de psicofarmacologia*. 2 ed. São Paulo: 2012, v. 1, p. 245-268.

POHORECKY, L. A. Biphasic Action of Ethanol. *Biobehavioral Reviews*, v. 1, p. 231-240, 1977.

PONTIERI, F. E. et al. Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to

those of addictive drugs. *Nature*, v. 382, p. 255-257, 1996.

[PRZEWŁOCKA, B.](#) et al. Ethanol withdrawal enhances the prodynorphin system activity in the rat nucleus accumbens. *Neurosci Lett.*, v. 238, p.13-6, 1997.

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.

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.

RATTAN, A. K. et al. The effect of morphine tolerance dependence and abstinence on immunoreactive dynorphin (1–13) levels in discrete brain regions, spinal cord, pituitary gland and peripheral tissues of the rat. *Brain Research*, v. 584, p. 207–212, 1992.

RIALA, K. et al. Teenage smoking and substance use as predictors of severe alcohol problems in late adolescence and in young adulthood. *Journal of Adolescent Health*, v. 35, n. 3, p. 245-254, 2004.

ROBERTS, D. C. S.; MORGAN, D.; LIU, Y. How to make a rat addicted to cocaine. *Progress in NeuroPsychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 31, n. 8, p.1614-24, 2007.

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

RODRÍGUEZ DE FONSECA, F. et al. Activation of corticotropin-releasing factor in the limbic system during cannabinoid withdrawal. *Science*, v. 276, p. 2050– 2054, 1997.

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.

SALAS, R. et al. Nicotinic receptors in the habenulo-interpeduncular system are necessary for nicotine withdrawal in mice. *J. Neurosci.* v. 29, p. 3014–3018, 2009.

SALAS, R. et al. Decreased withdrawal symptoms but normal tolerance to nicotine in mice null for the [alpha]7 nicotinic acetylcholine receptor subunit. *Neuropharmacology*, v. 53, p. 863–9, 2007.

SALAS, R. et al. The alpha3 and beta4 nicotinic acetylcholine receptor subunits are necessary for nicotine-induced seizures and hypolocomotion in mice. *Neuropharmacology*, v. 47, p. 401–7, 2004.

SÁNCHEZ-HERVÁS, E.; LLORENTE DEL POZO, J. M. Relapse in cocaine addiction: a review. *Adicciones.* v. 24, n. 3, p. 269-79, 2012.

SCHLUSSMAN, S. D. Steady-dose and escalating-dose “binge” administration of cocaine alter expression of behavioral stereotypy and striatal preprodynorphin mRNA levels in rats. *Brain Research Bulletin*, v. 67, p. 169–175, 2005.

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.

SHARPE, A. L.; SAMSON, H. H. Repeated nicotine injections decrease operant self-administration. *Alcohol*, v. 28, p. 1–7, 2002.

SHIFFMAN, S. et al. Dynamic effects of self-efficacy on smoking lapse and relapse. *Health Psychology*, v. 19, p. 315-323, 2000.

SHIFFMAN, S. et al. Analyzing milestones in smoking cessation: Illustration in a nicotine patch trial in adult smokers. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, v. 74, p. 276–285, 2006.

SHIRAYAMA, Y.; CHAKI, S. Neurochemistry of the nucleus accumbens and its relevance to depression and antidepressant action in rodents. *Curr. Neuropharmacol.*, v. 4, p. 277-291, 2006.

SHOAI B, 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.

SODERPALM, B. et al. Nicotinic mechanisms involved in the dopamine activating and reinforcing properties of ethanol. *Behavioural Brain Research*, v. 113, p. 85–96, 2000.

SOLECKI, W. et al. Alterations of prodynorphin gene expression in the rat mesocorticolimbic system during heroin self-administration. *Brain Research*, v. 1255, p. 113–121, 2009.

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.

SOWELL, E. R. et al. Mapping cortical change across the human life span. *Nat Neurosci*, v. 6, p. 309–315, 2003.

SPANAGEL, R., HERZ, A., SHIPPENBERG, T. S. Identification of the opioid receptor types mediating beta-endorphin-induced alterations in dopamine release in the nucleus accumbens. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 190, p. 177-184, 1990b.

SPANAGEL, R.; HERZ, A.; SHIPPENBERG, T. S. Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 89, p. 2046-2050, 1992.

SPANAGEL, R.; HERZ, A.; SHIPPENBERG, T. S. The effects of opioid peptides on dopamine release in the nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study. *J. Neurochem.*, v. 55, p. 1734-1740, 1990a.

SPANGLER, R., UNTERWALD, E. M., KREEK, M. J. “Binge” cocaine administration induces a sustained increase of prodynorphin mRNA in rat caudate-putamen. *Molecular Brain Research*, v. 19, p. 323–327, 1993.

SPEAR, L. P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, v. 24, p. 417–463, 2000.

STAFFORD, D.; LESAGE, M.G.; GLOWA, JR. Progressive-ratio schedules of drug delivery in the analysis of drug self-administration: a review. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 139, p. 169-84, 1998.

STEFFENSEN, S. C. et al. Electrophysiological characterization of GABAergic neurons in the ventral tegmental area. *J. Neurosci.* v. 18, p. 8003–15, 1998.

STEINER, H.; GERFEN, C. R. Role of dynorphin and enkephalin in the regulation of striatal output pathways and behavior. *Exp. Brain Res.* 123:60–76, 1998.

STEPHENS, D. N. et al. Does the excitatory amino acid receptor antagonist 2-APH exhibit anxiolytic activity? *Psychopharmacology (Berl)*, Berlin v.90, n.2, p.166-169, 1986.

STEKETEE, J. D. Neurotransmitter systems of the medial prefrontal cortex: potential role in sensitization to psychostimulants. *Brain Research Reviews*, v. 41, p. 203–228, 2003.

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.

TANG, W. et al. Alterations in ionotropic glutamate receptor subunits during binge cocaine self-administration and withdrawal in rats. *Journal of Neurochemistry*, v. 89, p. 1021–1033, 2004.

The ICD 10 Classification of mental and behavioral disorders, diagnostic criteria for research (CID 10). *Geneva World Health Organization*, 2007.

THOMAS, K. L.; ARROYO, M.; EVERITT, B. J. Induction of the learning and plasticity-associated gene Zif268 following exposure to a discrete cocaine-associated stimulus. *Eur J Neurosci* 17: 1964–1972, 2003.

TIRELLI, E.; LAVIOLA, G.; ADRIANI, W. Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 27, p. 163–178, 2003.

TODTENKOPF, M. S. et al. Effects of μ -opioid receptor ligands on intracranial self-stimulation in rats. *Psychopharmacology*, v. 172; p. 463–470, 2004.

TOSCANO JR., A. “Um breve histórico sobre o uso de drogas”. In: SEIBEL, S. D.; TOSCANO JR. (orgs). *Dependência de drogas*. ed. Atheneu; 2001.

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.

UNODC (*United Nations Office on Drugs and Crime*). [World Drug Report 2011](http://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/WDR2011/World_Drug_Report_2011_ebook.pdf). Disponível em: <[http://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/WDR2011/World Drug Report 2011_ebook.pdf](http://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/WDR2011/World_Drug_Report_2011_ebook.pdf)>. Acesso em: 10 de janeiro de 2014.

UNODC (*United Nations Office on Drugs and Crime*). [World Drug Report 2012](https://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/WDR2012/WDR_2012_web_small.pdf). Disponível em: <https://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/WDR2012/WDR_2012_web_small.pdf>. Acesso em: 10 de janeiro de 2014.

UNODC (*United Nations Office on Drugs and Crime*). World Drug Report 2013.

Disponível em:

<http://www.unodc.org/unodc/secured/wdr/wdr2013/World_Drug_Report_2013.pdf>.

Acesso em: 10 de janeiro de 2014.

VAN DEN OEVER, M. C. et al. Prefrontal cortex plasticity mechanisms in drug seeking and relapse. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 35, p. 276–284, 2010.

VENGELIENE, V. et al. Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br J Pharmacol.*, v. 154, n. 2, p. 299-315, 2008. Review.

WALAAS, I.; FONNUM, F. Biochemical evidence for gamma-aminobutyrate containing fibres from the nucleus accumbens to the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Neuroscience* 5:63–72, 1980.

WALTON, R. G. Smoking and alcoholism: a brief report. *The American Journal of Psychiatry*, v. 128, p. 1455–1456, 1972.

WARD, K. D. et al. Gender differences in the outcome of an unaided smoking cessation attempt. *Addictive Behaviors*, v. 22, p. 521–533, 1997.

WEE, S.; KOOB, G. F. The role of the dynorphin- κ opioid system in the reinforcing effects of drugs of abuse. *Psychopharmacology*, v. 210, p. 121–135, 2010.

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

WEISS, F. et al. Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat

nucleus accumbens: genetic and motivational determinants. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 267, n. 1, p. 250-258, 1993.

WEST, R. et al. Acute effect of glucose tablets on desire to smoke. *Psychopharmacology*, v. 147, p. 319–321, 1999.

WEST, R. Glucose for smoking cessation: does it have a role? *CNS Drugs*, v. 15, p. 261–265, 2001.

WEST, R. J.; HAJEK, P.; BELCHER, M. Severity of withdrawal symptoms as a predictor of outcome of an attempt to quit smoking. *Psychol. Med.*, v. 19, p. 981–85, 1989.

WEST, R.; HAJEK, P.; BURROWS, S. Effect of glucose tablets on craving for cigarettes. *Psychopharmacology*, v. 101, p. 555–559, 1990.

WETTER, D. W. et al. Late relapse/sustained abstinence among former smokers: a longitudinal study. *Preventive Medicine*, v.39, p. 1156– 1163, 2004.

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

WISE, R. A. Catecholamine theories of reward: a critical review. *Brain Res.*, v. 152, n. 2, p. 215-47, 1978. Review.

WONNACOTT, S. et al. Presynaptic nicotinic receptors modulating dopamine release in the rat striatum. *Eur. J. Pharmacol.* v. 393, p. 51–58, 2000.

WONNACOTT, S; SIDHPURA, N; BALFOUR, D. J. 2005. Nicotine: from molecular mechanisms to behaviour. *Curr. Opin. Pharmacol.*, v. 5, p. 53–59, 2005.

ZHANG, Y. et al. Effect of the endogenous kappa opioid agonist dynorphin A (1e17) on cocaine-evoked increases in striatal dopamine levels and cocaine-induced place preference in C57BL/6J mice. *Psychopharmacology*. v. 172, p. 422-429, 2004.

ZIMMER, A. et al. Absence of D-9-tetrahydrocannabinol dysphoric effects in dynorphin-deficient mice. *J. Neurochem.*, v. 21, p. 9499-9505, 2001.