

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

**“AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ESTRESSE E
ESTÍMULOS CONTEXTUAIS NO DESENVOLVIMENTO DA
DEPENDÊNCIA: ABORDAGEM COMPORTAMENTAL E
MOLECULAR”**

PAULO EDUARDO CARNEIRO DE OLIVEIRA

ARARAQUARA – SP

2014

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

**“AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ESTRESSE E
ESTÍMULOS CONTEXTUAIS NO DESENVOLVIMENTO DA
DEPENDÊNCIA: ABORDAGEM COMPORTAMENTAL E
MOLECULAR”**

PAULO EDUARDO CARNEIRO DE OLIVEIRA

Tese 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 Doutor em Ciências Fisiológicas.

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

***Coorientador:* Dr. Fábio Cardoso Cruz**

ARARAQUARA – SP

2014

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

C289ai Carneiro-de-Oliveira, Paulo Eduardo.
Avaliação da influência do estresse e estímulos contextuais no desenvolvimento da dependência : abordagem comportamental e molecular / Paulo Eduardo Carneiro de Oliveira. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
68 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Fisiologia. 2. Adolescentes. 3. Álcool. 4. Estresse. 5. Expressão gênica. I. Título.

CDD: 612 (20^a)



Folha de Aprovação


Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Paulo Eduardo Carneiro de Oliveira, realizada em 05/12/2014:




Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta
UNESP



Profa. Dra. Isabel Marian Hartmann de Quadros
Unifesp



Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin
UNESP



Profa. Dra. Raquel Vecchio Fornari
UFABC



Prof. Dr. Tarciso Tadeu Miguel
UFU

Dedico essa tese aos meus pais José Eduardo e Maria José, aos meus irmãos Maria Sílvia e Luís André e à minha namorada Marília, pelo o amor e suporte emocional. Sem eles a realização desse trabalho não seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora Professora Doutora Cleopatra da Silva Planeta por ter confiado em mim novamente e me ajudado a realizar mais esse sonho.

Ao meu coorientador Doutor Fábio Cardoso Cruz por ser um exemplo de pessoa.

Aos meus queridos amigos, doutores e parceiros de pesquisa Fábio, Rodrigo e Tarciso pelo constante incentivo e por muitas vezes terem sido a minha família.

Às grandes amigas Tirene e Paula pelo companheirismo e incessante ajuda.

Aos professores do departamento Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza, Dr. Marcelo Tadeu Marin e Dr. Carlos César Crestani pela grande amizade.

Às incansáveis Rosana e Elisabete por cuidarem de nós, alunos do Laboratório de Neuropsicofarmacologia.

A todos os amigos do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, do passado e do presente, por compartilharem nossas alegrias e desafios.

Ao Dr. Bruce Hope do *National Institute on Drug Abuse* por ter me dado a oportunidade de ampliar meus conhecimentos e à Dra. Leslie Whitaker pela colaboração durante meu doutorado sanduíche.

A todos os amigos que conheci durante a vida. Tenho cada um de vocês nas minhas lembranças.

A todos os professores e funcionários do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

À Capes pelo suporte financeiro.

À Universidade Estadual Paulista, à Universidade Federal de São Carlos e ao *National Institute on Drug Abuse* por disponibilizarem suas instalações para a realização desse trabalho.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 2.1** - imagem representativa do labirinto em cruz elevado utilizado no capítulo 2.....52
- Figura 2.2** - Esquema da secção encefálica mostrando o local onde foi coletada a amostra de amídala.....53
- Figura 2.3** - Representação esquemática, em forma de linha temporal, do delineamento experimental do capítulo 2.....59
- Figura 2.4** - Concentração plasmática de corticosterona 24 horas após a última exposição ao estresse crônico.....60
- Figura 2.5** - Frequência de entrada nos braços fechados, porcentagem do número de entrada nos braços abertos em relação ao total de entrada em qualquer braço e porcentagem de tempo gasto nos braços abertos em relação ao tempo total gasto em qualquer braço no teste de LCE durante 5 minutos.....61
- Figura 2.6** - Respostas, reforços e última razão alcançada de ratos adolescentes submetidos a 15 dias de estresse social e testados no modelo de autoadministração operante de etanol (6%) no esquema de razão progressiva.....62
- Figura 2.7** - Respostas, reforços e última razão alcançada de ratos adolescentes submetidos a 15 dias de estresse social e testados no modelo de autoadministração operante de sacarina (0,05%) no esquema de razão progressiva.....63
- Figura 2.8** - Respostas, reforços e consumo de ratos adolescentes submetidos a 15 dias de estresse social e testados no modelo de autoadministração operante de etanol (6%) durante o *binge* (acesso livre por 24 horas).....64

Figura 2.9 - Respostas, reforços e consumo de ratos adolescentes submetidos a 15 dias de estresse social e testados no modelo de autoadministração operante de sacarina (0,05%) durante o <i>binge</i> (acesso livre por 24 horas).....	65
Figura 2.10 - Expressão gênica ($\Delta\Delta Ct$) de CRF, CRFr1, BDNF e TrkB na amígdala quantificados através da técnica de RT-PCR.....	66
Figura 3.1 - Representação esquemática do mecanismo de ação do pró-fármaco Daun02.....	88
Figura 3.2 - Imagem representativa da área (intersecção das subáreas <i>core</i> e <i>shell</i>) atingida pela cânula guia e injetor.....	91
Figura 3.3 - Representação esquemática e fotográfica do contexto utilizado nos experimentos do capítulo 3.....	92
Figura 3.4 - Representação esquemática, em forma de linha temporal, do protocolo de sensibilização locomotora e do método de inativação por daun02.....	93
Figura 3.5 - Representação esquemática, em forma de linha temporal, do protocolo de ressensibilização locomotora.....	94
Figura 3.6 - Atividade locomotora dos animais submetidos ao protocolo de sensibilização por 7 dias.....	96
Figura 3.7 - Atividade locomotora dos animais no dia do teste, três dias após a indução e microinjeção de veículo ou daun02, após a administração de salina ou cocaína (15mg/Kg).....	97
Figura 3.8 - Atividade locomotora dos animais submetidos ao protocolo de ressensibilização por 7 dias.....	98

Figura 3.9 - Expressão de β -galactosidase no núcleo acumbens de animais submetidos ao protocolo de ressensibilização.....	99
Figura 3.10 - Imagens representativas de cortes coronais do núcleo acumbens aumentados 20 vezes, e utilizadas para quantificar o número de células que expressaram β -galactosidase.....	100
Figura 4.1 - Imagem representativa de células GFP+ encontradas no núcleo acumbens de camundongos.....	115
Figura 4.2 - Representação esquemática e fotográfica dos contextos utilizados nos experimentos do capítulo 4.....	119
Figura 4.3 - Representação esquemática, em forma de linha temporal, do protocolo de sensibilização contexto-específica.....	120
Figura 4.4 - Registro das EPSCs após a estimulação elétrica.....	122
Figura 4.5 - Atividade locomotora, após a administração de cocaína (20 mg/Kg) no contexto A, em animais machos que receberam injeção diária de 15 mg/kg de cocaína durante 5 dias e colocados no contexto A ou B por 60 minutos, divididos em períodos de 20 minutos.....	124
Figura 4.6 - Atividade locomotora, após a administração de cocaína (20mg/Kg) no contexto A, em animais fêmeas que receberam injeção diária de 15 mg/kg de cocaína durante 5 dias e colocados no contexto A ou B por 60 minutos, divididos em períodos de 20 minutos.....	125
Figura 4.7 - Número de células positivas para a presença de proteína Fos no núcleo acumbens após a administração de cocaína (20 mg/Kg) no contexto A,	

em camundongos machos que receberam injeção diária de 15 mg/kg de cocaína durante 5 dias e colocados no contexto A ou B por 60 minutos.....126

Figura 4.8 - Imagem representativa de corte coronal do núcleo acumbens aumentado 10 vezes utilizado para quantificar o número de células positivas para a presença da proteína Fos.....127

Figura 4.9 - Porcentagem de sinapses silenciosas após a administração de cocaína (20 mg/Kg) no contexto A, em camundongos machos que receberam injeção diária de 15 mg/kg de cocaína durante 5 dias e colocados no contexto A ou B por 60 minutos.....128

Tabela 2.1 - Sequências 5´-3´ dos oligonucleotídeos iniciadores, senso (for) e anti-senso (rev).....56

SUMÁRIO

<u>Resumo geral</u>	15
---------------------------	----

<u>Overview</u>	18
-----------------------	----

Capítulo 1

1. DEPENDÊNCIA	22
1.1. <i>Conceitos gerais</i>	22
1.2. <i>Teorias neurobiológicas da dependência de drogas de abuso</i>	23
2. ETANOL	27
3. COCAÍNA	31
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

Capítulo 2

Estresse social durante a adolescência e consumo de etanol: avaliação da expressão gênica de CRF, CRFr1, BDNF e TrkB na amígdala	41
RESUMO	42
ABSTRACT	43
1. INTRODUÇÃO	44
1.1. <i>Adolescência, estresse e abuso de álcool</i>	44
1.2. <i>Fisiologia do estresse</i>	45
2. OBJETIVOS	49
3. MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1. <i>Animais</i>	50
3.2. <i>Soluções de etanol e de sacarina</i>	50
3.3. <i>Estresse social</i>	50
3.4. <i>Quantificação da corticosterona plasmática</i>	51
3.4.1. <i>Coleta de amostras de sangue</i>	51
3.4.2. <i>Radioimunoensaio</i>	51

3.5. Labirinto em cruz elevado (LCE).....	52
3.6. Auto-administração operante de etanol.....	52
3.7. Reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR).....	53
3.7.1. Dissecção da amígdala.....	53
3.7.2. Extração de RNA total.....	54
3.7.3. Determinação da concentração de RNA total.....	54
3.7.4. Tratamento das amostras com DNase.....	55
3.7.5. Transcrição reversa do RNA.....	55
3.7.6. Seleção de oligonucleotídeos iniciadores.....	55
3.7.7. Otimização dos oligonucleotídeos iniciadores.....	56
3.7.8. Validação dos oligonucleotídeos iniciadores.....	57
3.7.9. Amplificação gênica por RT-PCR.....	57
3.8. Delineamento experimental.....	58
3.9. Análise estatística.....	59
4. RESULTADOS.....	60
4.1. Corticosterona plasmática.....	60
4.2. Labirinto em cruz elevado.....	60
4.3. Auto-administração operante de etanol: razão progressiva.....	61
4.4. Auto-administração operante de sacarina: razão progressiva.....	62
4.5. Auto-administração operante de etanol: binge.....	63
4.6. Auto-administração operante de sacarina: binge.....	64
4.7. Reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR).....	65
5. DISCUSSÃO.....	67
6. CONCLUSÃO.....	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

Capítulo 3

Ressensibilização locomotora após a inibição seletiva de neurônios relacionados à sensibilização comportamental induzida por cocaína.....	83
RESUMO.....	84
ABSTRACT.....	85
1. INTRODUÇÃO.....	86
2. OBJETIVOS.....	90

3. MATERIAIS E MÉTODOS	91
3.1. <i>Animais</i>	91
3.2. <i>Implantação da cânula guia e microinjeção de daun02 ou veículo</i>	91
3.3. <i>Sensibilização locomotora induzida por cocaína</i>	92
3.4. <i>Indução dos neuronal ensembles e teste da atividade locomotora após a microinjeção de daun02 e administração de cocaína</i>	92
3.5. <i>Ressensibilização da atividade locomotora</i>	94
3.6. <i>Reação histoquímica com X-gal</i>	94
3.7. <i>Análise estatística</i>	95
4. RESULTADOS	96
4.1. <i>Sensibilização locomotora induzida por cocaína</i>	96
4.2. <i>Teste da atividade locomotora após a microinjeção de daun02 e administração de cocaína</i>	97
4.3. <i>Ressensibilização da atividade locomotora</i>	98
4.4. <i>Reação histoquímica com X-gal</i>	99
5. DISCUSSÃO	101
6. CONCLUSÃO	104
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

Capítulo 4

Sensibilização contextoespecífica induzida por cocaína em camundongos machos ou fêmeas: avaliação da presença de sinapses silenciosas em neurônios seletivamente ativados no núcleo acumbens	110
RESUMO	111
ABSTRACT	112
1. INTRODUÇÃO	113
1.1. <i>Sensibilização contexto-específica</i>	113
1.2. <i>Sinapses silenciosas</i>	114
2. OBJETIVOS	117
3. MATERIAIS E MÉTODOS	118
3.1. <i>Animais</i>	118
3.2. <i>Contextos utilizados na indução da sensibilização e no teste de atividade locomotora</i>	118

3.3. <i>Sensibilização contexto-específica induzida por cocaína</i>	119
3.4. <i>Imunoistoquímica para marcação de Fos</i>	120
3.5. <i>Avaliação da presença de sinapses silenciosas</i>	121
3.5.1. <i>Coleta e preparação do tecido encefálico</i>	122
3.5.2. <i>Registros eletrofisiológicos</i>	122
3.4. <i>Análise estatística</i>	123
4. RESULTADOS	124
4.1. <i>Sensibilização contexto-específica induzida por cocaína</i>	124
4.2. <i>Imunoistoquímica para marcação de Fos</i>	126
4.3. <i>Avaliação da presença de sinapses silenciosas</i>	127
5. DISCUSSÃO	129
6. CONCLUSÃO	132
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
<u><i>Conclusão geral</i></u>	137

Resumo geral

A presente tese é parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de doutor pelo Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Associação ampla UFSCar/UNESP.

Os resultados apresentados são referentes aos experimentos realizados no Laboratório de Neuropsicofarmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara e no *Behavioral Neuroscience Branch/National Institute on Drug Abuse - National Institute of Health*, Baltimore, EUA.

No capítulo 1 fizemos uma introdução geral sobre as teorias que serviram de base para a elaboração do conceito atual de dependência de drogas de abuso¹. Nesse mesmo capítulo, nós elaboramos um breve histórico sobre a organização social e a relação do homem com as drogas de abuso. Escrevemos especificamente sobre as duas substâncias utilizadas em nossos estudos, o etanol e a cocaína, bem como o impacto delas na saúde pública e seus mecanismos farmacológicos de ação.

No capítulo 2 o objetivo foi avaliar a influência de fatores como a idade precoce do início do uso do etanol e o efeito do estresse sobre o comportamento de busca e consumo dessa droga. Para isso, utilizamos o modelo animal de autoadministração de etanol e dois tipos de estresse social (privação social e instabilidade social) durante a adolescência de ratos. Para verificar se alterações comportamentais foram promovidas por neuroadaptações moleculares, nós quantificamos a expressão de genes envolvidos no desenvolvimento da dependência de etanol na amígdala, região responsável pela exibição de comportamentos maladaptados ao estresse.

No capítulo 3 nós investigamos se o método de inibição por daun02 é capaz de bloquear a sensibilização locomotora induzida por cocaína em ratos. Esse método baseia-se na teoria que apenas um pequeno grupo de neurônios dispersamente distribuídos (*neuronal ensembles*) são ativados durante a exibição de um comportamento. Para esse propósito utilizamos ratos transgênicos contendo um promotor *c-fos-lacZ* que ao ser ativado induz a expressão da enzima β -galactosidase apenas em neurônios ativados. A β -galactosidase converte o pró-fármaco daun02 num metabólito tóxico que causa

¹**Nota do autor:** O termo droga de abuso é usado nessa tese como sinônimo do termo substância psicoativa de abuso.

apoptose celular. Dessa maneira, nós avaliamos se os *neuronal ensembles* ativados durante o desenvolvimento da sensibilização locomotora são os mesmos que são recrutados na expressão desse comportamento.

No capítulo 4 investigamos se camundongos expressam sensibilização locomotora contexto-específica e se a exibição desse comportamento está relacionada com alterações sinápticas no núcleo acumbens. Para isso nós utilizamos camundongos C57Bl/6 machos e fêmeas adultos transgênicos *Fos-GFP* que expressam uma proteína, sensível à luz verde, apenas em células ativadas. Desse modo, com a ajuda de um microscópio confocal, avaliamos a presença de sinapses silenciosas apenas em neurônios ativados (*neuronal ensembles*) durante a expressão da sensibilização locomotora.

Assim como nós, pesquisadores da área da neurobiologia da farmacodependência vêm estudando os fatores que podem facilitar o início e manutenção do uso da droga e como isso pode desencadear a instalação da dependência. Dessa forma, essa tese teve como objetivo investigar a influência da idade, sexo, estresse, memória, aprendizado associativo, diferentes tipos de drogas (etanol e cocaína) e diferentes tipos de modelos animais (autoadministração e sensibilização) no desenvolvimento da dependência.

Overview

This thesis is part of the requirements for obtaining Ph.D. title by Joint Graduate Program in Physiological Sciences, UFSCar/UNESP.

The results presented refer to experiments developed in Laboratório de Neuropsicofarmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara and Behavioral Neuroscience Branch / National Institute on Drug Abuse - National Institutes of Health, Baltimore, USA.

In chapter 1 we made a general introduction on the theories that formed the basis of the current concept of drug addiction. In this chapter, we elaborate a brief history of social organization and human relationship with drugs. We wrote specifically about both substances used in our studies, ethanol and cocaine, as well as their impact on public health and the pharmacological mechanisms of action.

In chapter 2 the aim was to evaluate the influence of factors such as early age of onset of ethanol use and the effect of stress on the seeking behavior and consumption of this drug. For this, we used the animal model of ethanol self-administration and two types of social stress (social deprivation and social instability) in rats during adolescence. To verify whether behavioral changes were promoted by molecular neuroadaptations, we quantified gene expression involved in the development of ethanol dependence in amygdala, responsible area for stress-induced behaviors.

In chapter 3 we investigated whether *daun02* inactivation method is able to inhibit cocaine-induced locomotor sensitization in rats. This method is based on the theory that only a small group of sparsely distributed neurons (neuronal ensembles) are activated during behavior exhibition. For this purpose, we used transgenic rats carrying a *c-fos-lacZ* promoter which when activated induces the expression of β -galactosidase enzyme only in activated neurons. The β -galactosidase converts the prodrug *daun02* into a toxic metabolite, driving to cell apoptosis. Thus, we evaluated whether the neuronal ensembles activated during the development of locomotor sensitization are the same as those recruited in the expression of this behavior.

In chapter 4 we investigate whether mice express context-specific locomotor sensitization and whether the exhibition of this behavior is related to synaptic changes in the nucleus accumbens. For this we use male and female transgenic C57BL/6 adult mice expressing Fos-GFP, a protein sensitive to

green light, only in activated cells. Thus, using a confocal microscope, we assessed the presence of silent synapses only in activated neurons (neuronal ensembles) related to the expression of locomotor sensitization.

Like us, researchers in the field of neurobiology of drug addiction have been studying the factors that can facilitate the initiation and maintenance of drug use and how it may trigger the addiction. Thus, this thesis aimed to investigate the influence of age, sex, stress, memory, associative learning, different types of drugs (cocaine and ethanol) and different types of animal models (self-administration and sensitization) in the development of drug addiction.

1. DEPENDÊNCIA

1.1. Conceitos gerais

O uso de substâncias psicoativas de abuso ou drogas de abuso acompanha o desenvolvimento da humanidade, desde os primeiros hominídeos, passando pela formação das sociedades sedentárias e chegando até os dias atuais. Normalmente, esse uso estava atrelado à medicina, ciência, cultos religiosos e celebrações, variando de acordo com os aspectos sociais e culturais de cada época. Invariavelmente o consumo dessas drogas sempre esteve associado à procura por estados alterados da consciência, alívio de desconfortos e sensações de euforia (ROYCE, 1981; TOSCANO JR, 2001).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) substância de abuso pode ser definida como qualquer substância natural ou sintética que quando introduzida no organismo pode alterar o funcionamento do sistema nervoso central, proporcionando experiências subjetivas de prazer capazes de levar parte de seus usuários à dependência (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014b).

Segundo a quinta edição do Manual de Diagnóstico e Estatística (DSM-V) da Associação Americana de Psiquiatria, a dependência é conceituada como uma síndrome comportamental na qual o uso da droga adquire 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 à substância é limitado (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

1.2. Teorias neurobiológicas da dependência de drogas de abuso

As primeiras teorias que propunham explicar a dependência focavam-se nas consequências adversas decorrentes da interrupção do uso das drogas, fenômeno fisiológico conhecido como síndrome de abstinência (O'BRIEN, 2001; ROBINSON; BERRIDGE, 1993; SOLOMOM; CORBIT, 1973).

A síndrome de abstinência é caracterizada por um intenso desconforto causado pela retirada da substância. Os sinais e sintomas normalmente são opostos aos efeitos agudos que as drogas promovem. Desse modo, foi proposto que indivíduos que desenvolviam a dependência manteriam o uso da substância para evitar o desconforto da retirada (O'BRIEN, 2001; ROBINSON; BERRIDGE, 1993; SOLOMOM; CORBIT, 1973).

Porém essa teoria apresentou algumas limitações. Por exemplo, embora todas as drogas produzam síndrome de abstinência, esses sinais e sintomas são limitados e específicos para cada tipo de substância. Além disso, nem todas as substâncias que produzem síndrome de abstinência, são capazes de promover dependência (beta bloqueadores, por exemplo), o tratamento da síndrome de abstinência não é eficaz para o tratamento da dependência e essa teoria não explicava por que os indivíduos começavam a usar drogas (ROBINSON; BERRIDGE, 1993, O'BRIEN, 2001).

Em 1978, Wise propôs que todas as drogas capazes de promover dependência produziam efeitos euforizantes e prazerosos que seriam responsáveis por reforçar o comportamento de uso dessas substâncias, fazendo com que o indivíduo tornasse a buscá-la (WISE, 1978). Em 1987, Wise e Bozarth propuseram que os efeitos prazerosos e euforizantes resultavam da ativação de substrato neural comum, a via dopaminérgica mesocorticolímbica (WISE; BOZARTH, 1987). O sistema dopaminérgico mesocorticolímbico é formado pela área tegmental ventral (ATV), onde estão localizados os corpos celulares dos neurônios dopaminérgicos, e suas projeções para o núcleo acumbens e córtex pré-frontal (CPF). A ativação desse circuito é responsável pelo efeito reforçador das substâncias de abuso (KOOB, 1992; KOOB; LE MOAL, 2001; WISE, 1978; OLDS; MILNER, 1954).

Assim, vários estudos demonstraram que a administração de nicotina, cocaína, anfetamina, morfina, etanol ou Δ^9 -THC aumentam a liberação de

dopamina no núcleo acumbens. (CADONI; DI CHIARA, 2000; DI CHIARA; IMPERATO, 1988; IMPERATO; MULAS; DI CHIARA, 1986; KIIANMAA et al., 1995; SCHILSTROM et al., 1998; PONTIERI et al., 1996; TANDA; PONTIERI; DI CHIARA, 1997).

Porém, a sensação de bem-estar e euforia explicava o uso recreacional ou esporádico da droga, mas não a principal característica da dependência, o uso compulsivo a despeito das conseqüências adversas (ROBINSON; BERRIDGE, 1993).

Desse modo, Robinson; Berridge (1993) propuseram que com o uso repetido de uma substância de abuso ocorrem plasticidades no sistema mesocorticolímbico que resultam no aumento da saliência motivacional. Assim, o uso de uma substância de abuso torna-se cada vez mais atrativo, desencadeando, dessa forma, a compulsão pelo uso da substância (ROBINSON; BERRIDGE, 2000, 2001, 2003). O que promove no indivíduo um desejo incontrolável de usar a droga, capaz de controlar seu comportamento (BERRIDGE; ROBINSON, 1998, 2003; BERRIDGE; ROBINSON; ALDRIDGE, 2009).

As plasticidades do sistema mesocorticolímbico expressa-se como sensibilização comportamental. Em roedores a sensibilização comportamental é caracterizada por aumento gradual da atividade locomotora após administrações repetidas de uma substância de abuso. Essa sensibilização locomotora foi demonstrada para cocaína, anfetamina, nicotina, etanol, morfina, Δ^9 -THC e reflete neuroadaptações nos sistema mesocorticolímbico (AIZENSTEIN; SEGAL; KUCZENSKY, 1990; CADONI et al., 2001; CRUZ; DELUCIA; PLANETA, 2005; DOMINO, 2001; KALIVAS; DUFFY, 1987; MARIN; PLANETA, 2004; MISERENDINO; NESTLER, 1995; NESTLER, 2001; PHILLIPS; ROBERBS; LESSOV, 1997; PLANETA; MARIN, 2002; POST; CONTEL, 1983; POWEL; HOLTZMAN, 2001; ROBINSON; BECKER, 1986; SANTOS et al., 2009; SHIM et al., 2001; VEZINA; QUEEN, 2000).

Em 1997, Koob; Le Moal adaptaram a teoria dos processos oponentes, proposta por Solomon; Corbit em 1974, 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. Na retirada da droga a sensibilização do “Estado B” manifesta-se na forma de estados afetivos negativos (disforia, ansiedade e irritabilidade) (KOOB; LE MOAL, 1997, 2008a, 2008b; SOLOMON; CORBIT, 1974). 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 (KOOB; LE MOAL, 1997, 2008a, 2008b). O sistema de antirrecompensa é formado por áreas do sistema límbico responsáveis pelas respostas emocionais ao estresse como a amígdala central (CeA), o núcleo intersticial da estria terminal (BNST) e a concha do núcleo acumbens. Essas regiões formam um circuito neural chamado amígdala estendida (KOOB, 2008; ULRICH-LAI; HERMAN; 2009).

Uma das teorias mais recentes sobre a dependência a substâncias de abuso, propõe que a dependência envolve comportamentos de aprendizado associativo (ANAGOSTARAS; ROBINSON, 1996; BADIANI; ROBINSON, 2004; WISE, 2004; EVERITT; ROBBINS, 2005; VEZINA; LEYTON, 2009). Segundo essa teoria, com o uso repetido da substância de abuso o indivíduo aprenderia a associar o efeito da droga com estímulos ou dicas do ambiente onde a substância está sendo consumida (por exemplo, com a parafernália utilizada para o uso, lugares ou outros usuários) e no decorrer do uso, somente a exposição a essas dicas ambientais poderia desencadear a fissura e fazer com que o indivíduo buscasse a droga (WIKLER, 1973; O'BRIEN; EHRMAN; TERNES, 1984; SIEGEL, 1999; BADIANI; ROBINSON, 2004).

Recentemente, o pesquisador Bruce Hope propôs que a dependência de uma substância de abuso envolveria aspectos de aprendizado e memória na qual o indivíduo associa o ambiente onde ele usa a droga e os efeitos euforizantes da mesma (CRUZ et al., 2013). Baseado na teoria de Donald Hebb (1949) que diz que o aprendizado associativo e memória são armazenados por um pequeno número de neurônios dispersamente

distribuídos pelo encéfalo e conectados entre si através de sinapses bem estruturadas, denominada *neuronal ensembles*, Hope demonstrou que o processo associativo envolvido no desenvolvimento da dependência é codificado nesses *neuronal ensembles* (CRUZ et al., 2013). Dessa maneira, as neuroadaptações decorrentes da administração repetida de drogas ocorreriam nesses grupos neuronais específicos espalhados por diversas regiões do encéfalo (BOSSERT et al., 2011; FANOUS et al., 2012; KOYA et al., 2009, 2012; MATTSON et al., 2008; CRUZ et al., 2014).

2. ETANOL

Evidências sugerem que as primeiras bebidas alcoólicas preparadas pelo homem surgiram há 8000 anos a.C. com a formação das primeiras sociedades sedentárias e conseqüente implantação da agricultura. Análises químicas feitas em jarras encontradas nas tumbas de *Jiahu*, China, datadas de 7000-6600 a.C., indicaram a presença de uma bebida fermentada feita de arroz, mel, uvas e pequenas frutas (GATELY, 2008; STANDAGE, 2006).

Em princípio, quando os arqueólogos descobriram vasos e jarras datados de 5400-5000 a.C. na região do Irã, eles acreditavam que essas bebidas eram utilizadas como fonte de alimento e forma de preservar frutos (GATELY, 2008; STANDAGE, 2006). Os primeiros indícios de que as bebidas alcoólicas eram mais do que um alimento vem da Suméria, atual Iraque. Nessa região eles encontraram as primeiras regras de consumo de álcool pela sociedade. Em *Uruk*, a principal cidade da Suméria, o povo já produzia 11 tipos de cerveja, ou *kash*, em larga escala utilizando vários tipos de grãos (GATELY, 2008; STANDAGE, 2006).

Assim como os sumérios, os egípcios eram grandes apreciadores de cerveja. Nas ruínas da cidade de *Hierakonpolis* ainda pode-se encontrar a mais antiga cervejaria do mundo, com cerca de 3400 anos a.C. Nessa cervejaria eram produzidos aproximadamente 1200 litros de cerveja por dia. Em 3100 a.C. os egípcios começaram a produzir vinho e estabeleceram que a cerveja (*htq*) seria consumida pelo povo enquanto o vinho (*irp*) era destinado para a elite egípcia. O rei *Tutankamon*, por exemplo, foi enterrado com 26 jarras de vinho (GATELY, 2008; STANDAGE, 2006).

O consumo de bebidas alcoólicas, na forma de vinho, aumentou drasticamente no auge da civilização grega (700 a.C.). Os gregos consideravam a bebida divina e criaram regras sociais para o consumo da mesma. Eles estabeleceram que o vinho fosse apreciado pelos homens em encontros denominados *symposium*, nos quais eles discutiam sobre filosofia, ciência, arte e o conceito de democracia (GATELY, 2008; STANDAGE, 2006). Entretanto, a expansão da Macedônia, comandada por Alexandre, o Grande (356-323 a.C.), acarretou queda do império grego e das suas idéias democráticas. Alexandre, o Grande, liderou o maior império do mundo antigo

por quase 15 anos, boa parte dele extremamente embriagado (GATELY, 2008; STANDAGE, 2006). Alguns acreditam que a verdadeira causa de sua morte não foi envenenamento, mas sim complicações derivadas do consumo abusivo de álcool (BATTERSBY, 2007; SBAROUNIS, 1997).

Em 160 a.C. o senado romano instituiu o tratado *De Agri Cultura*, de Marcus Cato, como manual oficial para o cultivo de vinhedos. Logo, Roma tornou-se o maior produtor de vinho da época baseando boa parte de sua economia na exportação dessa bebida. Além da importância econômica os romanos descobriram outra função para o vinho. Durante inúmeras invasões os soldados romanos se infiltravam entre os povos bárbaros, que queriam dominar, para estimular o consumo de vinho. No dia seguinte, enquanto seus inimigos se recuperavam da recente embriaguez os romanos impunham verdadeiros massacres (GATELY, 2008; STANDAGE, 2006).

O cristianismo, a nova religião que se espalhava rapidamente pelo império romano tinha como seu principal ritual a eucaristia. Nessa cerimônia os cristãos compartilhavam vinho e pão enquanto disseminavam a palavra de Jesus. O crescimento do cristianismo coincidiu com a idade das trevas na Europa. A deterioração cultural e econômica decorrente do declínio do império romano transformou o continente numa área de escassez intelectual (GATELY, 2008; STANDAGE, 2006).

Esses acontecimentos facilitaram a expansão dos árabes que começou no século VII e durou até o século XV. Durante seu apogeu o território do império islâmico se espalhava do norte da África à Ásia central, Índia e península ibérica. Ao contrário da Europa os árabes criaram grandes centros de conhecimento onde desenvolveram a medicina, matemática, filosofia e criaram a álgebra, o sistema numérico moderno, trigonometria, novas técnicas de navegação e mapas náuticos (GATELY, 2008; STANDAGE, 2006). Apesar do consumo de bebidas alcoólicas ser proibido entre os islâmicos, uma de suas maiores contribuições foi o aprimoramento da destilação utilizando o vinho. A palavra alambique, por exemplo, vem do árabe *al-ambiq*, nome dado a um recipiente específico usado na destilação. Da mesma maneira, a palavra álcool deriva de *al-koh'l*, um pó preto de antimônio purificado usado como cosmético. Posteriormente a palavra passou a referir-se a qualquer substância purificada, dando origem ao termo *al-koh'l* de vinho (GATELY, 2008; STANDAGE, 2006).

No século XV o império islâmico estava dividido e enfraquecido, facilitando a recuperação dos territórios europeus através das cruzadas. Apesar da expulsão dos árabes seu legado cultural foi de extrema importância para a nova aventura dos europeus: as grandes navegações. Boa parte do dinheiro utilizado para a descoberta de novas terras era proveniente do comércio de bebidas alcoólicas (GATELY, 2008; STANDAGE, 2006).

No Brasil, o cultivo da cana-de-açúcar começou a exigir um aumento de mão de obra levando os portugueses a trocarem álcool por escravos. A cana-de-açúcar era duplamente rentável, pois do resto da safra produzia-se a cachaça sem custos adicionais. Para Portugal a produção de cachaça não era um bom negócio visto que ela concorria com o vinho e com a bagaceira (destilado de cascas de uva) no comércio interno e na África (RODRIGUES; RODRIGUES, 2008). Em 1635 a metrópole proibiu pela primeira vez a comercialização da bebida causando grande revolta entre os senhores de engenho. O contrabando de cachaça se intensificou na África levando a coroa a criar um imposto mensal sobre o comércio da bebida. A atitude da coroa gerou o que se acredita ser a primeira insurreição popular no Brasil: a revolta da cachaça. No dia 8 de novembro de 1660 os revoltosos invadiram a câmara do Rio de Janeiro e derrubaram o governador. Apesar da insatisfação de Portugal, em 1661 a produção e comercialização de cachaça foram regulamentadas no Brasil (RODRIGUES; RODRIGUES, 2008).

Atualmente o etanol é considerado uma droga lícita no Brasil e em diversos países, sendo a substância de abuso mais consumida no mundo (BOBO; HUSTEN, 2000). Uma pesquisa realizada pela Organização Mundial de Saúde revelou que a média mundial de ingestão de etanol puro é de 6,2 litros por ano, contudo, entre bebedores essa média aumenta para 17,2 litros por ano de etanol ingerido. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014a). No Brasil, a média anual de consumo de etanol é de 8,7 litros por ano e entre bebedores é de 15,1 litros por ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014a). 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 (CARLINI et al., 2006). Dentre estudantes do ensino fundamental e médio (10 a 18 anos) entrevistados nas 27 capitais

estaduais brasileiras, 60,5% relataram o uso de etanol pelo menos uma vez na vida e 1,6% disseram fazer uso descontrolado de álcool (CARLINI et al., 2010).

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 à ativação dos neurônios opioidérgicos da ATV, que por sua vez, inibem os interneurônios GABAérgicos, intensificando a transmissão dopaminérgica e aumentando a liberação de dopamina no NAc (GILPIN; KOOB, 2008). Outras evidências sugerem que o etanol também pode bloquear a transmissão GABAérgica na ATV. Dessa forma, a redução da inibição GABAérgica sobre os neurônios dopaminérgicos resulta no aumento da liberação de dopamina no NAc (GILPIN; KOOB, 2008).

3. COCAÍNA

A cocaína (benzoilmetilecgonina) é um alcalóide presente em altas concentrações nas folhas do arbusto *Erythroxylon coca*. Achados arqueológicos indicam que a cocaína era usada por civilizações andinas há 4500 anos em cerimoniais religiosos. Resquícios da planta foram encontrados na região bucal de múmias peruanas e até hoje povos dessa região mascam folhas de coca (FERREIRA; MARTINI, 2001; GOLDSTEIN; DESLAURIERS; BURDA, 2009).

O nome coca deriva da palavra *khoka* que na língua aimará, falado por povos andinos do Peru, Chile e Bolívia, significa “a árvore”. Para os Incas a planta era sagrada, considerada um presente do Deus Sol. Em 1507 o italiano naturalizado espanhol Américo Vespúcio publicou as primeiras descrições sobre o uso da droga no novo mundo. Em seus relatos, o navegador chama a atenção para a mastigação de folhas com cinzas, hábito conservado até hoje. Isso ocorre porque a alcalinização da mucosa bucal facilita a absorção da substância aumentando seu efeito (FERREIRA; MARTINI, 2001).

Em 1551 membros da Igreja Católica enviados para a América do Sul decidiram proibir o consumo da coca, pois o uso da mesma dificultava a catequização dos nativos. Essa decisão não durou muito tempo visto que os efeitos agudos da coca melhoravam o rendimento dos índios na exploração de minérios (FERREIRA; MARTINI, 2001; GOLDSTEIN; DESLAURIERS; BURDA, 2009).

A cocaína só foi isolada, em 1859, pelo químico alemão Albert Niemann e sua estrutura descrita em 1898. Em 1902 Willstatt sintetizou o cloridrato de cocaína, o que lhe rendeu um prêmio Nobel (FERREIRA; MARTINI, 2001). Ainda no século XIX o químico Ângelo Mariani misturou folhas de coca com vinho e chamou o composto de Vin Mariani (1863). A bebida era amplamente apreciada, incluindo personalidades como Thomas Edson, Jules Verne e o Papa Leão XIII, que premiou Mariani com uma medalha de ouro do Vaticano. A mistura de etanol com cocaína forma um composto mais potente chamado cocaetilenó (KARCH, 1999; FERREIRA; MARTINI, 2001; GOLDSTEIN; DESLAURIERS; BURDA, 2009).

Em 1886 John Styth Pemberton criou uma bebida sem álcool que continha cocaína e noz de cola. Surgiu a mundialmente conhecida Coca-Cola® que em 1906 teve que substituir a cocaína pela cafeína devido ao *Pure Food and Drugs Act*, assinado pelo presidente Theodore Roosevelt, que restringiu o uso de algumas substâncias na fabricação de alimentos (FERREIRA; MARTINI, 2001; GOLDSTEIN; DESLAURIERS; BURDA, 2009; SOCIETY OF TOXICOLOGY, 2014).

No fim do século XIX e início do século XX a cocaína era considerada uma droga milagrosa e indicada para o tratamento de vários tipos de enfermidades. Um dos grandes responsáveis pela disseminação terapêutica da cocaína foi o médico austríaco Sigmund Freud. Em 1884 Freud publicou o livro *Über Coca* (sobre a cocaína) no qual indica o uso da substância como “estimulante, afrodisíaco, anestésico local, bem como para o tratamento da asma, doenças consuptivas, desordens digestivas, exaustão nervosa, histeria, sífilis e mal-estar relacionado a altitudes”. Um dos pacientes de Freud, o também médico Karl Koller descreveu os primeiros estudos do uso da cocaína como anestésico local. Os trabalhos de Freud e Koller despertaram interesses de grandes indústrias farmacêuticas como Merck e Parke-Davis. As indústrias levavam as folhas da América do Sul para outros países, mas a perda da concentração de coca era considerável durante o transporte, aumentando o custo da produção. Em 1885 a Parke-Davis desenvolveu um método de produzir cocaína semi-refinada nos países de origem. Os preços caíram e o comércio de cocaína cresceu substancialmente (KARCH, 1999; FERREIRA; MARTINI, 2001; GOLDSTEIN; DESLAURIERS; BURDA, 2009).

O consumo descontrolado trouxe consigo problemas de toxicidade, tolerância e dependência. Em 1892 Freud repensou alguns conceitos e publicou a continuação de *Über Coca* desmistificando os “poderes” da cocaína (FERREIRA; MARTINI, 2001).

A viabilização de leis restritivas, como o *The Harrison Narcotics Tax Act* (Estados Unidos) de 1914 e o Decreto-lei Federal nº 4.292 (Brasil) de 1921, e o surgimento de psicoestimulantes sintéticos limitou o comércio de cocaína (FERREIRA; MARTINI, 2001; GOLDSTEIN; DESLAURIERS; BURDA, 2009).

Após 50 anos de ostracismo a cocaína voltou a ser um problema de saúde pública. A partir da década de 80, quando surge o crack, o consumo e

tráfico mundiais de cocaína vêm aumentando. Na América do Sul os cartéis tornaram-se altamente organizados intensificando a produção e distribuição da droga pelo mundo.

Um estudo publicado pelas Nações Unidas mostrou que 0,4% da população mundial (aproximadamente 28 milhões de pessoas), entre 15 e 64 anos, usaram cocaína no ano de 2012. A maior consumidora é a América do Norte, seguida da Oceania, América do Sul, países do leste europeu e Europa Central. Os maiores produtores de cocaína são Bolívia, Colômbia e Peru chegando a 133700 hectares ou 1 bilhão e trezentos e trinta e sete metros quadrados de área cultivada. Esse estudo também destaca que aparentemente a demanda de cocaína vem aumentando já que a apreensão mundial de cocaína aumentou de 634 toneladas em 2011 para 671 toneladas em 2012. As maiores apreensões foram feitas na América do Sul (418 toneladas) e leste europeu (71,2 toneladas) (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, 2014).

No Brasil, uma pesquisa realizada, no ano de 2005, em 108 cidades com mais de 200 mil habitantes, mostrou que 3,6% dos entrevistados já usaram cocaína ou crack pelo menos uma vez na vida (CARLINI et al., 2006). Dentre estudantes do ensino fundamental e médio (10 a 18 anos) entrevistados nas 27 capitais estaduais brasileiras, 3,1% relataram o uso de cocaína ou crack pelo menos uma vez na vida e 0,3% disseram fazer uso pesado dessas substâncias (CARLINI et al., 2010).

A cocaína pode ser administrada pela via nasal na forma de pó, pela via endovenosa na forma solúvel e pela via pulmonar na forma de base livre (crack) (GOLDSTEIN; DESLAURIERS; BURDA, 2009; NATIONAL INSTITUTE OF DRUG ABUSE, 2014). Seus efeitos psicoestimulantes ocorrem devido a sua ação indireta sobre a neurotransmissão dopaminérgica. A cocaína inibe os transportadores de dopamina aumentando o tempo de permanência desse neurotransmissor na fenda sináptica. Sua ação no NAc é a principal responsável pelas sensações de prazer e euforia (NESTLER, 2005).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIZENSTEIN, M. L., SEGAL, D. S., KUCZENSKY, R. Repeated amphetamine and fencamfamine: sensitization and reciprocal cross-sensitization. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v.7, p.187-194, 1990.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. 5ª edição, Washington, DC, 2013.

ANAGNOSTARAS, S. G., ROBINSON, T. E. Sensitization to the psychomotor stimulant effects of amphetamine: modulation by associative learning. *Behav Neurosci*, v.110, p.1397-1414, 1996.

BADIANI, A., ROBINSON, T. E. Drug-induced neurobehavioral plasticity: the role of environmental context. *Behav Pharmacol*, v.15, p.327-339, 2004.

BATTERSBY, C. What killed Alexander the Great? *ANZ J Surg*, v.77, p.85-87, 2007.

BERRIDGE, K. C., ROBINSON, T. E., ALDRIDGE, J. W. Dissecting components of reward: 'liking', 'wanting', and learning. *Curr Opin Pharmacol*, v.9, p.65-73, 2009.

BERRIDGE, K. C., ROBINSON, T. E. Parsing reward. *Trends Neurosci*, v.26, p.507-513, 2003.

BERRIDGE, K. C., ROBINSON, T. E. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev*, v.28, p.309-369, 1998.

BOBO, J. K., HUSTEN, C. Sociocultural influences on smoking and drinking. *Alcohol Res Health*, v.24, p.225-232, 2000.

BOSSERT, J. M. et al. Ventral medial prefrontal cortex neuronal ensembles mediate context-induced relapse to heroin. *Nat Neurosci*, v.14, p.420-422, 2011.

CADONI, et al. Behavioral sensitization after repeated exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol and cross-sensitization with morphine. *Psychopharmacology (Berl)*, v.158, p.259-266, 2001.

CADONI, C., DI CHIARA, G. Differential changes in accumbens Shell and core dopamine in behavioral sensitization to nicotine. *Eur J Pharmacol*, v.387, p.23-25, 2000.

CARLINI, E. A. et al. *II levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país 2005*. São Paulo, CEBRID, 2006, p.468.

CARLINI, E. A. et al. *VI levantamento nacional sobre o consumo de drogas psicotrópicas entre estudantes do ensino fundamental e médio das redes pública e privada de ensino nas 27 capitais brasileiras 2010*. São Paulo, CEBRID, 2010, p.503.

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

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

CRUZ, F. C. et al. Role of nucleus accumbens shell neuronal ensembles in context-induced reinstatement of cocaine-seeking. *J Neurosci*, v.34, p.7437-7446, 2014.

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

DOMINO, E.F. Nicotine induced behavioral locomotor sensitization. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v.25, p.59-71, 2001.

EVERITT, B. J., ROBBINS, T. W. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci*, v.8, p.1481-1489, 2005.

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

FANOUS, S. et al. Role of orbitofrontal cortex neuronal ensembles in the expression of incubation of heroin craving. *J Neurosci*, v.32, p.11600-11609, 2012.

FERREIRA, P. E. M., MARTINI, R. K. Cocaína: lendas, história e abuso. *Rev Bras Psiquiatr*, v.23, 96-99, 2001.

GATELY, I. *Drink: a cultural history of alcohol*. New York, Gotham Books, 2008, p.644.

GILPIN, N. W., KOOB, G. F. Neurobiology of alcohol dependence: focus on motivational mechanisms. *Alcohol Res Health*, v.31, p.185-195, 2008.

GOLDSTEIN, R. A., DESLAURIERS, C., BURDA, A. M. Cocaine: history, social implications, and toxicity--a review. *Dis Mon*, v.55, p.6-38, 2009.

IMPERATO, A., MULAS, A., DI CHIARA, G. Nicotine preferentially stimulates dopamine release in the limbic system of freely moving rats. *Eur J Pharmacol*, v.132, p.337-338, 1986.

- KALIVAS, P. W., DUFFY, P. Sensitization to repeated morphine injection in the rat: possible involvement of A10 dopamine neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, v.241, p.204-212, 1987.
- KARCH, S. B. Cocaine: history, use, abuse. *J R Soc Med*, v.92, p.393-397, 1999.
- KIIANMAA, K. et al. Effect of ethanol on extracellular dopamine in the nucleus accumbens of alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. *Pharmacol Biochem Behav*, v.52, p.29-34, 1995.
- KOOB, G. F. A role for brain stress systems in addiction. *Neuron*, v.59, p.11-34, 2008.
- KOOB, G. F., LE MOAL, M. Addiction and the brain antireward system. *Annu Rev Psychol*, v.59, p.29-53, 2008a.
- KOOB, G. F., LE MOAL, M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology*, v.24, p.97-129, 2001.
- KOOB, G. F., LE MOAL, M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science*, v.278, p.52-58, 1997.
- KOOB, G. F., LE MOAL, M. Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v.363, p.3113-3123, 2008b.
- KOOB, G. F. Neural mechanisms of drug reinforcement. *Ann N Y Acad Sci*, v.654, p.171-191, 1992
- KOYA, E. Silent synapses in selectively activated nucleus accumbens neurons following cocaine sensitization. *Nat Neurosci*, v.15, p.1556-1562, 2012.
- KOYA, E. et al. Targeted disruption of cocaine-activated nucleus accumbens neurons prevents context-specific sensitization. *Nat Neurosci*, v.12, p.1069-1073, 2009.
- MARIN, M. T., PLANETA, C. S. Maternal separation affects cocaine-induced locomotion and response to novelty in adolescent, but not in adult rats. *Brain Res*, v. 1013, p.83-90, 2004.
- MATTSON, B. J. et al. Context-specific sensitization of cocaine-induced locomotor activity and associated neuronal ensembles in rat nucleus accumbens. *Eur J Neurosci*, v.27, p.202-212, 2008.
- MISERENDINO, M. J., NESTLER, E. J. Behavioral sensitization to cocaine: modulation by the cyclic AMP system in the nucleus accumbens. *Brain Res*, v.674, p.299-306, 1995.

NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE. *DrugFacts: Cocaine*. Disponível em: <<http://www.drugabuse.gov/publications/drugfacts/cocaine>>. Acesso em: 04 de setembro de 2014.

NESTLER, E. J. Molecular neurobiology of addiction. *Am J Addict*, v.10, p.201-217, 2001.

NESTLER, E. J. The neurobiology of cocaine addiction. *Sci Pract Perspect*, v.3, p.4-10, 2005.

O'BRIEN, C. P. Dependência e uso abusivo de drogas. In: HARDMAN, J. G., LIMBIRD, L. E. *Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005, p.465-481.

O'BRIEN, C. P., EHRMAN, R. N., TERNES, J. W. Classical conditioning in opiate dependence. *NIDA Res Monogr*, v.49, p.35-46, 1984.

OLDS, J., MILNER, P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol*, v.47, p.419-427, 1954.

PHILLIPS, T. J., ROBERTS, A. J., LESSOV, C. N. Behavioral sensitization to ethanol: genetics and the effects of stress. *Pharmacol Biochem Behav*, v.57, p.487-493, 1997.

PLANETA, C. S., MARIN, M. T. Effects of cocaine on periadolescent rats with or without early maternal separation. *Braz J Med Biol Res*, v.35, p.1367-1371, 2002.

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.

POST, R. M., CONTEL, N. R. Human and animal studies of cocaine: implications of development of behavioral pathology. In: CREESE, I. *Stimulants: neurochemical, behavioral and clinical perspectives*. New York: Raven, 1983, p.169-203.

POWEL, K. R., HOLTZMAN, S. G. Parametric evaluation of the development of sensitization to the effects of morphine on locomotor activity. *Drug Alcohol Depend*, v.62, p.83-90, 2001.

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

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

ROBINSON, T. E., BERRIDGE, K. C. Incentive-sensitization and addiction. *Addiction*, v.96, p.103-114, 2001.

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

ROBINSON, T. E., BERRIDGE, K. C. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction*, v.95, p.91-117, 2000.

RODRIGUES, P. O., RODRIGUES, A. E. M. *Revolta da cachaça: uma manifestação popular que demonstrou organização em torno dos seus interesses contra o poder excessivo*. Disponível em: <http://www.cerescaico.ufrn.br/mneme/anais/st_suma_pg/st9.html>. Acesso em: 04 de setembro de 2014.

ROYCE, J. E. *Alcohol Problems and Alcoholism - A Comprehensive Survey*. New York Free Press, Royce, 1981, p.35.

SANTOS, G. C. et al. Amphetamine- and nicotine-induced cross-sensitization in adolescent rats persists until adulthood. *Addict Biol*, v.14, p.270-275, 2009.

SBAROUNIS, C. N. Did Alexander the Great die of acute pancreatitis? *J Clin Gastroenterol*, v.24, p.294-296, 1997.

SCHILSTROM, B. et al. Nicotine and food induced dopamine release in the nucleus accumbens of the rat: putative role of alpha7 nicotinic receptors in the ventral tegmental area. *Neuroscience*, v.85, p.1005-1009, 1998.

SHIM, I. et al. Nicotine-induced behavioral sensitization is associated with extracellular dopamine release and expression of c-Fos in striatum and nucleus accumbens of the rat. *Behav Brain Res*, v.121, p.137-147, 2001.

SIEGEL, S. Drug anticipation and drug addiction. The 1998 H. David Archibald Lecture. *Addiction*, v.94, p.1113-1124, 1999.

SOCIETY OF TOXICOLOGY. *The great American fraud and the pure food and drugs act*. Disponível em: <<http://www.toxicology.org/gp/fda.asp>>. Acesso em: 04 de setembro de 2014.

SOLOMON, R. L., CORBIT, J. D. An opponent-process theory of motivation. II. Cigarette addiction. *J Abnorm Psychol*, v.81, p.158-171, 1973.

SOLOMON, R. L., CORBIT, J. D. An opponent-process theory of motivation. I. Temporal dynamics of affect. *Psychol Rev*, v.81, 119-145, 1974.

STANDAGE, T. *A history of world in 6 glasses*. New York, Walker & Company, 2006, p.213.

TANDA, G., PONTIERI, F. E., DI CHIARA, G. Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid mechanism. *Science*, v.276, p.2048-2050, 1997.

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

ULRICH-LAI, Y. M., HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci*, v.10, p.397-409, 2009.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. *World drug report 2014*. New York, United Nations, 2014.

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

VEZINA, P., LEYTON, M. Conditioned cues and the expression of stimulant sensitization in animals and humans. *Neuropharmacology*, v.56, p.160-168, 2009.

VEZINA, P., QUEEN, A. L. Induction of locomotor sensitization by amphetamine requires the activation of NMDA receptors in the rat ventral tegmental area. *Psychopharmacology (Berl)*, v.151, p.184-191, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Global status report on alcohol and health 2014*. Geneva, WHO, 2014a, p.392.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Health topics: substance abuse*. Disponível em: <http://www.who.int/topics/substance_abuse/en>. Acesso em: 04 de setembro de 2014b.

WIKLER, A. Dynamics of drug dependence. Implications of a conditioning theory for research and treatment. *Arch Gen Psychiatry*, v.28, p.611-616, 1973.

WISE, R. A., BOZARTH, M. A. A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev*, v.94, p.469-492, 1987.

WISE, R. A. Catecholamine theories of reward: a critical review. *Brain Res*, v.152, p.215-247, 1978.

WISE, R. A. Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci*, v.5, p.483-494, 2004

**Estresse social durante a adolescência e consumo de etanol:
avaliação da expressão gênica de CRF, CRFr1, BDNF e TrkB na
amígdala.**

**Experimentos realizados no Laboratório de Neuropsicofarmacologia da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UNESP, Araraquara, SP, Brasil.**

RESUMO

Adolescência é um período do desenvolvimento nas quais os indivíduos de várias espécies apresentam características típicas, como busca por novidade, comportamento de risco e interação com os pares. Essas características poderiam facilitar o início do uso de drogas, aumentando a probabilidade de desenvolvimento de dependência em fases posteriores da vida. Estudos epidemiológicos mostram relações entre eventos estressantes em fases precoces da vida e problemas com o abuso de etanol na idade adulta. Pesquisas pré-clínicas corroboram essas evidências demonstrando que o estresse durante a adolescência aumenta os efeitos das drogas de abuso. Nesse estudo avaliamos a influência do estresse social durante a adolescência na autoadministração de etanol, em comportamentos relacionados à ansiedade, nas concentrações de corticosterona plasmática e na expressão dos genes CRF, CRFr1, BDNF e TrkB na amígdala de ratos. Ratos Wistar machos adolescentes foram submetidos a 15 dias de privação social ou instabilidade social. Durante esse período o grupo controle não foi perturbado. Vinte e quatro horas após o último dia de estresse um grupo de animais foi decapitado para coleta de sangue e tecido encefálico (amígdala). Outro grupo foi submetido ao teste do labirinto em cruz elevado (LCE), 48 horas após a última exposição ao estresse. Os índices de ansiedade (% de frequência de entradas e tempo gasto nos braços abertos) foram registrados por 5 minutos. Vinte e quatro horas após o teste de LCE os animais foram submetidos ao protocolo de autoadministração de etanol (6%) ou sacarina (0,05%) e os parâmetros de razão progressiva e 24 horas de acesso livre foram analisados. Os dois tipos de estresse social promoveram diminuição dos índices de ansiedade e da expressão de CRF e BDNF na amígdala. O estresse de privação social diminuiu a concentração plasmática basal de corticosterona. Já a autoadministração de etanol e sacarina não foram alteradas pela exposição aos protocolos de estresse social.

Palavras-chave: Privação social, instabilidade social, estresse, etanol, auto-administração, adolescência, labirinto em cruz elevado, RT-PCR, BDNF, CRF.

ABSTRACT

Adolescence is a critical period of ontogeny which individuals of several species presents typical characteristics such as; increasing in novelty-seeking, risk-taking and peer interaction behaviors. These characteristics could facilitate initial drug-seeking, enhancing the vulnerability to addiction in later stages of life. Epidemiological studies have shown links between early life stressors and future alcohol problems. Pre-clinical studies corroborate these evidences, demonstrating that stress during adolescence enhances the behavioral effects of drugs of abuse. In this study we evaluated the influence of early life social stressors on alcohol self-administration, anxiety-like behavior, plasma corticosterone and gene expression (CRF, CRFr1, BDNF and TrkB) in amygdala. Adolescent male Wistar rats were submitted to 15 days of social deprivation or social instability. During this period the control group was left undisturbed. Blood and amygdala samples were collected twenty four hours after the last stress session. EPM test were applied forty eight hours after the end of the stress protocol. Anxiety-like indices in the EPM (% of frequency of entries and time spent in the open arms of maze) were registered during five minutes. Then animals of the three groups were subjected to ethanol (6%) or saccharin (0.05%) self-administration protocol. Progressive ratio schedule and 24h-free access parameters of alcohol (6%) or saccharin (0.05%) reinforcement was analyzed. Rats submitted to chronic social stress have shown increased percentage of open-arms entries and time spent in open-arms compared to control group. Chronic social stress promoted a decrease on CRF and BDNF expression in amygdala. Basal plasma corticosterone was altered by social deprivation stress. Furthermore, alcohol and saccharin self-administration behavior were not modified by previous exposure to stress. In conclusion, social deprivation and social instability during adolescence promote anxiolytic-like behavior and decrease on CRF and BDNF gene expression on amygdala, but were not able to alter alcohol- or saccharin-seeking behavior.

Keywords: Social deprivation, social instability, stress, ethanol, self-administration, adolescence, elevated plus maze, RT-PCR, BDNF, CRF.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Adolescência, estresse e abuso de álcool

A adolescência é um período da ontogenia (desenvolvimento de um organismo de embrião até sua forma plena) nas quais os indivíduos apresentam características típicas. Comportamentos como, busca por novidades, avaliação de risco e interação com os pares, são observados em adolescentes de várias espécies. Esses comportamentos são importantes para preparar os indivíduos para sobreviver sem o cuidado dos pais (SPEAR, 2000). Entretanto, o aumento no comportamento de risco pode facilitar a busca de drogas e por consequência o desenvolvimento da dependência em estágios mais tardios da vida (CHEN; KANDEL, 1995; SPEAR, 2000). Vários trabalhos mostram alta prevalência entre o início precoce do uso de etanol e a ocorrência de problemas ligados ao seu consumo abusivo e dependência (GRANT; STINSON; HARFORD, 2001; GUTTMANNOVA et al., 2011; 2012; HINGSON; HEEREN; WINTER, 2006).

Além da ontogenia, fatores ambientais também podem aumentar o risco de desenvolvimento da dependência. Nesse sentido, muitos trabalhos demonstram os efeitos do estresse no abuso de drogas e consequente desenvolvimento da dependência (KOOB; KREEK; 2007; SINHA, 2001; 2008).

Estudos epidemiológicos mostram ligação entre estresse em fases precoces da vida e problemas futuros com etanol. Esses trabalhos relataram que eventos estressantes durante a infância e adolescência como, por exemplo, abuso sexual, violência, criminalidade e perda ou ausência dos pais, estão associados com o início precoce do consumo e do abuso de etanol (BROOK et al., 2011; ENOCH, 2011; ISOHANNI et al., 1994; KALICHMAN et al., 2006; KEYES; HATZENBUEHLER; HASIN, 2011; WALSH et al., 2012; ZAHRADNIK et al., 2011).

Estudos pré-clínicos demonstram que a exposição ao estresse na adolescência aumenta alguns efeitos das substâncias de abuso (YAJIE et al., 2005; LEPSCH et al., 2005; MATHEWS; MILLS; MCCORMICK; 2008; MCCORMICK et al., 2004; 2005). Por exemplo, dados do nosso laboratório mostraram que a exposição crônica ao estresse de contenção promove

sensibilização cruzada com anfetamina ou nicotina em ratos adolescentes (CRUZ et al., 2012; ZAGO et al., 2012). A exposição ao estresse imprevisível durante a adolescência também causou sensibilização comportamental à cocaína (LEPSCH et al., 2005). Além disso, vários trabalhos demonstraram que a exposição ao estresse crônico aumenta o consumo de etanol em roedores (CRUZ et al., 2008; CALDWELL; RICCIO, 2010; FULLGRABE; VENGELIENE; SPANAGEL, 2007; HALL et al., 1998a; LOPEZ; DOREMUS-FITZWATER; BECKER, 2011; SPERLING et al., 2010). Entretanto, nenhum deles avaliou o efeito do estresse crônico durante a adolescência no comportamento de autoadministração operante de etanol.

Outro ponto importante que deve ser destacado é o emprego do estresse social em experimentos que investigam a influência do estresse na busca e consumo de drogas. O estresse social mimetiza situações aversivas que um animal enfrentaria em um ambiente selvagem, sendo assim um modelo mais etológico e mais preditivo do efeito do estresse em humanos (CRUZ et al., 2011; MCCORMICK et al., 2004; MICZEK; YAP; COVINGTON 3RD, 2008).

1.2. Fisiologia do estresse

O termo estresse é utilizado para definir estímulos ameaçadores ou que são percebidos como ameaça ao estado de balanço fisiológico conhecido como homeostasia. Para combater esses estímulos estressores a maioria dos organismos desenvolveu um sistema de resposta neuroendócrino altamente complexo cuja função é restaurar esse estado de equilíbrio. O sistema de resposta ao estresse é composto pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), pelo sistema autonômico adrenérgico e pelos neurônios CRFérgicos extra-hipotalâmicos (NICOLAIDES, et al. 2015).

Um dos mecanismos mais conhecidos de resposta neuroendócrina é a ativação do eixo HPA. NA presença de um estímulo estressor o eixo HPA é ativado promovendo aumento da liberação do fator de liberação de corticotrofina (CRF) pelo núcleo paraventricular do hipotálamo, que induz a secreção do hormônio adenocorticotrófico (ACTH) pela pituitária anterior, o qual, em roedores, estimula a secreção de corticosterona pelo córtex da

glândula adrenal (LEVINE, 2005). Mudanças nas respostas fisiológicas e comportamentais causadas pelo estresse crônico estão relacionadas com a adaptação do eixo HPA (ARAÚJO et al., 2003; CRUZ et al., 2012). Marin; Cruz; Planeta (2007), por exemplo, demonstraram que a exposição ao estresse crônico aumenta as concentrações basais de corticosterona e a resposta do eixo HPA a situações aversivas. Respostas mal adaptadas ao estresse têm sido associadas ao desenvolvimento da dependência de substância psicoativas de abuso (PIAZZA; LE MOAL, 1998; SINHA, 2001; 2008).

Além do eixo HPA, o estresse também ativa os neurônios CRFérgicos extra-hipotalâmicos localizados principalmente em áreas do sistema límbico como a amígdala central (CeA), o núcleo intersticial da estria terminal (BNST) e a concha do núcleo acumbens. Essas regiões formam um circuito neural chamado amígdala estendida, responsável pelas respostas emocionais ao estresse (KOOB, 2008b; ULRICH-LAI; HERMAN; 2009).

Segundo Koob (2008a; 2008b; 2008c; 2009), a interrupção do uso de uma substância após o consumo crônico aumenta a liberação de CRF na amígdala, levando o indivíduo a um estado emocional negativo responsável pela busca da droga. Nesse sentido, pesquisadores mostraram que a exposição ao estresse crônico causa aumento de comportamentos relacionados à ansiedade no teste de labirinto em cruz elevado (LCE) (BOTELHO; ESTANISLAU; MORATO, 2007; HELLEMANS; BENGGE; OLMSTEAD, 2004; MASLOVA; BULYGINA; AMSTISLAVSKAYA, 2010; WEISS et al., 2004). Desse modo, o estado negativo observado pelo aumento da ansiedade, provocada pela exposição ao estresse crônico, poderia causar aumento do consumo de drogas.

O envolvimento do sistema CRFérgico nesses comportamentos é evidenciado por estudos pré-clínicos mostrando que antagonistas do receptor CRFr1 previne comportamentos relacionados à ansiedade e o consumo excessivo de etanol induzidos pela retirada do álcool. (FUNK et al., 2006; 2007; OVERSTREET; KNAPP; BREESE, 2004; 2005; VALDEZ et al., 2002).

Lodge; Lawrence (2003) mostraram, ainda, que a administração de um antagonista CRFr1 diminui o consumo de etanol em ratos submetidos à privação social. A injeção central de CRF promove aumento de comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado (LCE)

(BRUCHAS et al., 2009) enquanto que a administração de antagonista CRF_{r1} tem efeito ansiolítico nesse teste (LELAS et al., 2004).

Entretanto, o papel dos neurônios CRFérgicos amídalaes nas respostas de busca e consumo de etanol não está totalmente claro. Desse modo, é importante avaliar se o estresse social crônico durante a adolescência é capaz de alterar a expressão de CRF e CRF_{r1} na amídala, e o comportamento de busca pelo etanol.

Além do CRF, o BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) também tem sido correlacionado com os efeitos comportamentais persistentes induzidos pelo estresse. O BDNF é uma neurotrofina com papel importante no crescimento, sobrevivência e diferenciação de neurônios em eventos que envolvem plasticidade sináptica, como aprendizado e memória (CHAO; RAJAGOPAL; LEE, 2006; LU; CHRISTIAN; LU, 2008; THOENEN, 1995).

O BDNF é uma proteína que promove seus efeitos através da ligação com receptor TrkB (*tropomyosin-related kinase B*). A ligação do BDNF com o TrkB induz a dimerização do receptor e como consequência uma autofosforilação que desencadeia a ativação de uma cascata intracelular (AUTRY; MONTEGGIA, 2012; THOENEN, 1995). Muitos estudos mostram que o BDNF é vastamente expresso em regiões com atividade dopaminérgica (ANDRESSOO; SAARMA, 2008; CHIOCCO et al., 2007; CONNER et al., 1997; SEROOGY et al., 1994), como por exemplo, a via mesocorticolímbica, e por isso pode estar envolvido nos comportamentos de busca e consumo de drogas (GHITZA et al., 2010).

Dessa maneira, estudos demonstraram que a deleção gênica de BDNF em camundongos aumenta o consumo de solução etanólica 20% no modelo de livre escolha de garrafas, quando comparados com animais intactos (HENSLER; LADENHEIM; LYONS, 2003; MCGOUGH et al., 2004). McGough e colaboradores (2004) demonstraram também, que a diminuição da expressão central de BDNF promove aumento do consumo de etanol. Nesse mesmo sentido, Pandey e colaboradores (2006) promoveram a deleção gênica de BDNF em subregiões da amídala (central, medial e basolateral) e verificaram que a diminuição da expressão de BDNF na amídala central e medial, mas não na basolateral, promoveu aumento do consumo de álcool no modelo de livre

escolha de garrafas e esse efeito foi revertido com a infusão de BDNF nessas subregiões.

Além disso, estudos que utilizaram ratos com preferência natural pelo etanol (P) e ratos sem preferência natural pelo etanol (NP), mostraram que a expressão basal de BDNF na amígdala central e na amígdala medial é menor em ratos P, quando comparados com ratos NP (MOONAT et al., 2011; PRAKASH; ZHANG; PANDEY, 2008). Assim, a diminuição da expressão de BDNF na amígdala parece favorecer o comportamento de busca e ingestão de etanol.

O efeito do estresse sobre a expressão gênica de BDNF é bastante inconsistente, pois enquanto alguns estudos demonstraram que o estresse não alterou a expressão de BDNF na amígdala de ratos (ALLAMAN et al., 2008), outros demonstraram aumento (AGUILAR-VALLES et al., 2005; FANOUS; HAMMER; NIKULINA, 2010) ou diminuição (SMITH et al., 1995) da expressão desse gene.

Até então nenhum estudo avaliou o efeito do estresse social sobre a expressão de CRF, BDNF e seus receptores na amígdala, bem como a influência desse estresse na autoadministração operante de etanol.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi investigar se a exposição ao estresse social durante adolescência: (I) promoveria alterações comportamentais relacionadas à ansiedade; (II) alteraria as concentrações basais da corticosterona plasmática; (III) modificaria o consumo de etanol ou sacarina no modelo de autoadministração operante; (IV) e se alteraria a expressão gênica de CRF, CRFr1, BDNF e TrKb na amígdala de ratos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Ratos Wistar machos adolescentes, dia pós-natal 28 (DPN28), provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista/ Botucatu, foram mantidos no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/Araraquara em condições controladas de temperatura (23° C), ciclo de luz invertido (12h/12h, luzes apagadas às 07:00) e livre acesso à água e comida. Todos os experimentos foram realizados na fase escura do ciclo. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP (CEUA-18/2011).

3.2. Soluções de etanol e de sacarina

As soluções etanólicas foram preparadas diluindo etanol (Synth) em diferentes concentrações (2, 4 e 6% v/v) contendo 0,05% (m/v) de sacarina. O grupo controle da autoadministração recebeu soluções de sacarina 0,05% (m/v). A sacarina foi utilizada para “mascarar” o sabor aversivo do etanol.

3.3. Estresse Social

Privação social: os animais foram mantidos isolados na sua caixa-moradia, privados de qualquer contato social durante 15 dias (DPN28-DPN42). **Instabilidade social:** esse modelo de estresse foi descrito por McCormick e colaboradores (2004). Nesse protocolo os ratos foram isolados por 1 hora em cilindros plásticos (10 cm diâmetro x 10 cm comprimento). Após o isolamento os animais foram colocados, todos os dias, com pares diferentes que passaram pelo mesmo protocolo de estresse de isolamento nos cilindros. Esse procedimento foi repetido por 15 dias (DPN28-DPN42). **Controle:** Os animais

do grupo controle foram alojados em pares, e só foram perturbados durante a limpeza das caixas-moradia.

3.4. *Quantificação da corticosterona plasmática*

3.4.1. *Coleta de amostras de sangue*

Amostras de sangue foram coletadas da veia da cauda dos animais. A coleta foi feita 24 horas após o último dia de estresse para determinação da concentração basal de corticosterona. As amostras de sangue foram coletadas em tubos heparinizados, centrifugados a 2000xg por 10 minutos à 4° C e o plasma foi armazenado à -20° C até a realização do radioimunoensaio.

3.4.2. *Radioimunoensaio*

Para o radioimunoensaio utilizamos anticorpos obtidos da Sigma (St. Louis, MO, EUA) e (³H)-corticosterona (corticosterona triciada) da New England Nuclear (Boston, MA, EUA). O método foi adaptado de Cruz et al. (2012). Vinte µL de plasma foram diluídos 50 vezes com PBS 0,01 M e mantido em banho de água à 75° C por 1 hora para inativação das globulinas ligadoras de corticosteroides. Em seguida adicionou-se a cada amostra 100 µL de uma solução que continha anticorpo e (³H)-corticosterona (10,000–20,000 cpm/mL) incubada *overnight* a 4° C. Será utilizado carvão revestido com dextran para a adsorção dos esteróides livres após a incubação. Os tubos foram centrifugados a 2000xg por 15 min a 4° C, o sobrenadante de cada tubo foi transferido para recipientes de cintilação e a radioatividade foi quantificada espectrometria de cintilação líquida. Curvas padrão foram construídas usando 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 e 2000 pg/100 µL de corticosterona (Sigma).

3.5. Labirinto em cruz elevado (LCE)

Aparato: o labirinto, feito de plástico, é elevado 50 cm do chão e possui quatro braços de 50 cm em forma de cruz. Apenas dois braços possuem paredes transparentes e os braços iguais são opostos entre si.

Procedimento: o rato foi colocado no centro do labirinto de frente para um dos braços abertos. O número de entradas em cada tipo de braço é registrado por 5 minutos, no qual

uma entrada foi considerada quando o animal colocava as quatro patas no braço. As razões entre o número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos em relação ao número de entradas e tempo total do experimento foram utilizadas como medidas de ansiedade.



Figura 2.1 - imagem representativa do labirinto em cruz elevado descrito no item 3.5.

3.6. Autoadministração operante de etanol

Aparato: as caixas de autoadministração são feitas de acrílico (Insight®) e ficam alocadas em câmaras de isolamento sonoro e luminoso. Uma das paredes da caixa contém um painel com duas barras localizadas a 5 cm do assoalho, duas lâmpadas de indicação (cor de laranja e verde) e uma lâmpada de luz branca que fica acesa durante toda sessão. Cada pressão na barra foi registrada como uma resposta, e cada infusão foi registrada como um reforço. Um dia após os 15 dias de estresse os animais foram submetidos ao protocolo de autoadministração operante de etanol. **Aquisição:** os ratos tinham acesso ilimitado à solução de sacarina 0,05%, na qual uma pressão na barra era reforçada com 0,2 mL de solução (razão fixa 1; RF1). Cada sessão tinha a duração de 1 hora. Após três sessões de autoadministração de sacarina foram realizadas duas sessões com etanol 2%, seguidas por duas sessões de etanol 4% e duas sessões de etanol 6%, todos em RF1 (as soluções etanólicas foram preparadas diluindo etanol em solução de sacarina 0,05%, como descrito no item 3.2). O grupo controle recebeu sacarina em todas as sessões.

Manutenção: Após as duas sessões de etanol 6% em RF1 a razão foi aumentada para RF3 (três pressões na barra para receber um reforço) em sessões de 3 horas. Esse procedimento foi repetido por 5 dias. **Razão progressiva:** a progressão das razões obedecia à seguinte seqüência 1, 1, 3, 3, 5, 5, 7, 7, 9, 9, 11, 11, 13, 13, 15, 15, 17, 17, 18, 18, 19, 19, 20, 20, 21, 21, 22, 22, ... O final da sessão ocorria quando o animal ficava 1 hora sem receber uma infusão da solução. A última razão alcançada recebe o nome de ponto de ruptura. Após 3 sessões de RP foi feita uma média das respostas obtidas no experimento. **Binge:** Após a RP os animais foram submetidos a uma sessão de acesso prolongado por 24 horas em RF1. O consumo de etanol e sacarina foram obtidos em mg/Kg de peso do animal. Na tradução livre para a língua portuguesa *binge* significa bebedeira ou porre, em outras palavras, um consumo agudo e elevado de etanol em um curto espaço de tempo. No modelo animal de autoadministração *binge* avalia a quantidade de etanol o animal consome agudamente dentro de um período de tempo.

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

3.7.1. Dissecção da amígdala

Os animais foram transferidos individualmente para uma sala com temperatura controlada entre 20 e 24°C para decapitação. Os encéfalos foram removidos e fatiados no criostato sob temperatura de -15 a -20°C, seguindo-se as coordenadas estereotáticas para ratos do atlas de Paxinos; Watson (2006). A amígdala foi dissecada por meio de agulhas de ponta chata de 14-16 gauge e colocada em tubos criogênicos. Os

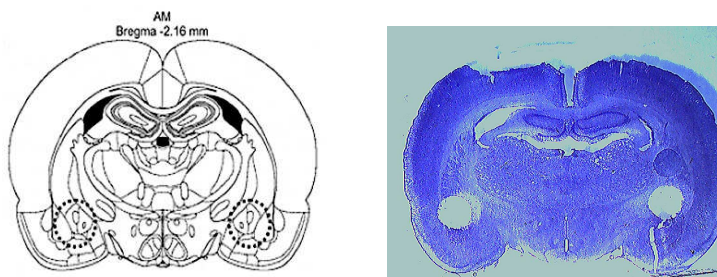


Figura 2.2 - À esquerda está o esquema da secção encefálica adaptadas do Atlas Esterotático de Paxinos e Watson (2006), mostrando o local onde foi coletada a amostra de amígdala. À direita está o corte coronal contendo a amígdala, corada pelo método de crisol violeta.

tubos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C, para posterior análise da expressão gênica por RT-PCR.

3.7.2. 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 12000xg 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 12000xg 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 e incubado em banho de água (65°C) por 10 minutos. As amostras foram armazenadas à -80°C.

3.7.3. 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.

3.7.4. *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 3.7.3; 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.

3.7.5. *Transcrição Reversa do RNA*

A transcrição reversa de RNA foi feita logo após a conclusão das etapas descritas no item 3.7.4, 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 3.7.4: 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.

3.7.6. *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

Genebank, acessadas através do programa BLAST do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Os oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 2.1) foram desenhados para que os produtos tivessem entre 80 a 150 pares de base e apresentassem temperatura de anelamento de aproximadamente 60°C.

Tabela 2.1 - Sequências 5'-3' dos oligonucleotídeos iniciadores, senso (for) e anti-senso (rev).

<i>Nome da sequência</i>	<i>Seqüência 5' - 3'</i>
CRF-for	CTGGGGAACCTCAACAGAAG
CRF-rev	GGTGGAAAGGTGAGATCCAGA
CRFr1-for	TTGGCAAACGTCCTGGGGTAT
CRFr1-rev	GCGGACAATGTTGAAGAGAAAAG
BDNF-for	TCACAGCGGCAGATAAAAAGACT
BDNF-rev	GTGTCTATCCTTATGAACCGCAGCCAA
TrkB-for	CCTCGTTGGAGAAGATCAAG
TrkB-rev	CGTGGTACTCCGTGTGATTG
GAPDH-for	ATGGGAAGCTGGTCATCAAC
GAPDH-rev	ACGCCAGTAGACTCCACGAC

3.7.7. 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.

3.7.8. Validação dos oligonucleotídeos iniciadores

Outro fator importante a ser considerado em experimentos de PCR quantitativo é a eficiência de amplificação do gene de interesse 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 3.7.7). A reação foi a mesma descrita no item 3.7.7, 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= $(10^{(-1/\text{slope})} - 1) \times 100$].

3.7.9. 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; 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: (I) subtração do valor de CT do gene de interesse pelo CT do gene GAPDH (ΔCT); (II) média do ΔCT das amostras; (III) ΔCT de cada amostra – a média do ΔCT ($\Delta\Delta CT$); (IV) elevação negativa do $\Delta\Delta CT$ na base 2 ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

3.8. *Delineamento experimental*

Ratos adolescentes (DPN28) foram submetidos ao estresse de privação social e instabilidade social por 15 dias. Vinte quatro horas após o último dia de exposição ao estresse coletamos amostras de sangue para determinar a concentração basal de corticosterona. No dia seguinte os mesmos animais foram submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado para avaliarmos os comportamentos relacionados à ansiedade. Vinte quatro horas após o LCE iniciamos o protocolo de autoadministração operante de etanol ou sacarina. Separadamente, nós repetimos o protocolo de estresse de privação social e instabilidade social em ratos adolescentes diferentes. Esses animais foram sacrificados 24 horas após o último dia de estresse para coleta da amígdala e posterior análise via RT-PCR (figura 2.3).

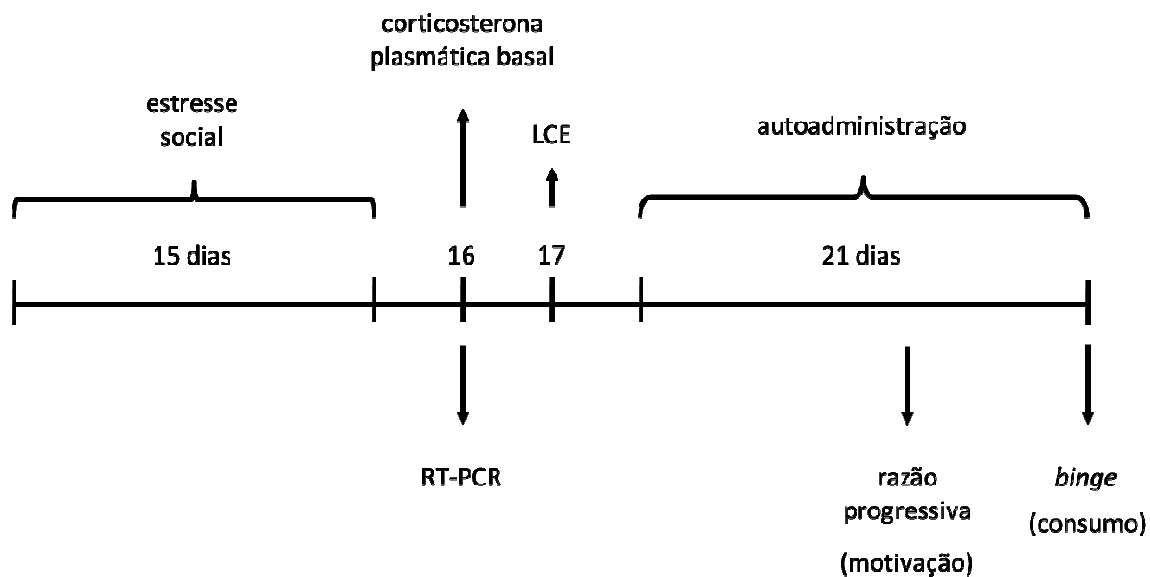


Figura 2.3 - Representação esquemática, em forma de linha temporal, do delineamento experimental descrito no item 3.8.

3.9. Análise estatística

Os dados do labirinto em cruz elevado, corticosterona plasmática, autoadministração e RT-PCR foram analisados através do teste ANOVA de uma via, comparando os grupos controle, privação social e instabilidade social. Quando ANOVA demonstrou diferença significativa entre os grupos a análise foi seguida pelo teste de Newman-Keuls considerando $p < 0,05$. Todos os dados apresentaram homogeneidade (teste Levene; $p > 0,05$) exceto os valores de RT-PCR para o gene CRF. Para esses dados foi utilizada análise não paramétrica (Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para comparações múltiplas).

4. RESULTADOS

4.1. Corticosterona plasmática

A figura 2.4 mostra os dados obtidos na determinação de corticosterona plasmática dos animais dos grupos controle, privação social e instabilidade social. ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos [F(2,18)=3,53;p<0,05]. O teste de Newman-Keuls indicou que o estresse de privação social diminuiu a concentração plasmática basal de corticosterona comparada com o grupo controle (p<0,05).

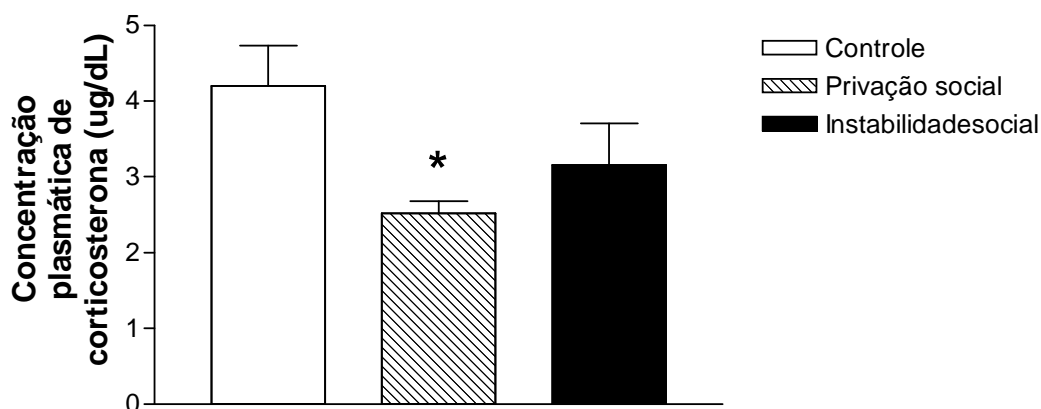


Figura 2.4 - As barras representam a média \pm epm da concentração plasmática de corticosterona dos grupos controle (n=7), privação social (n=7) e instabilidade social (n=7) 24 horas após a última exposição ao estresse crônico.

4.2. Labirinto em cruz elevado

Como mostrado na figura 2.5, ANOVA mostrou que a exposição ao estresse alterou significativamente o número de entradas [F(2,25)=4,20; p<0,05] e o tempo de permanência nos braços abertos [F(2,25)=5,12, p<0,05]. A frequência de entrada nos braços fechados não foi alterada pela exposição ao estresse [F(2,25)=0,21; p=0,82]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que os animais submetidos à privação social e à instabilidade social aumentaram a porcentagem de entrada e de tempo de permanência nos

braços abertos ($p < 0,05$), quando comparados ao grupo controle. Não há diferença entre os grupos submetidos ao estresse social.

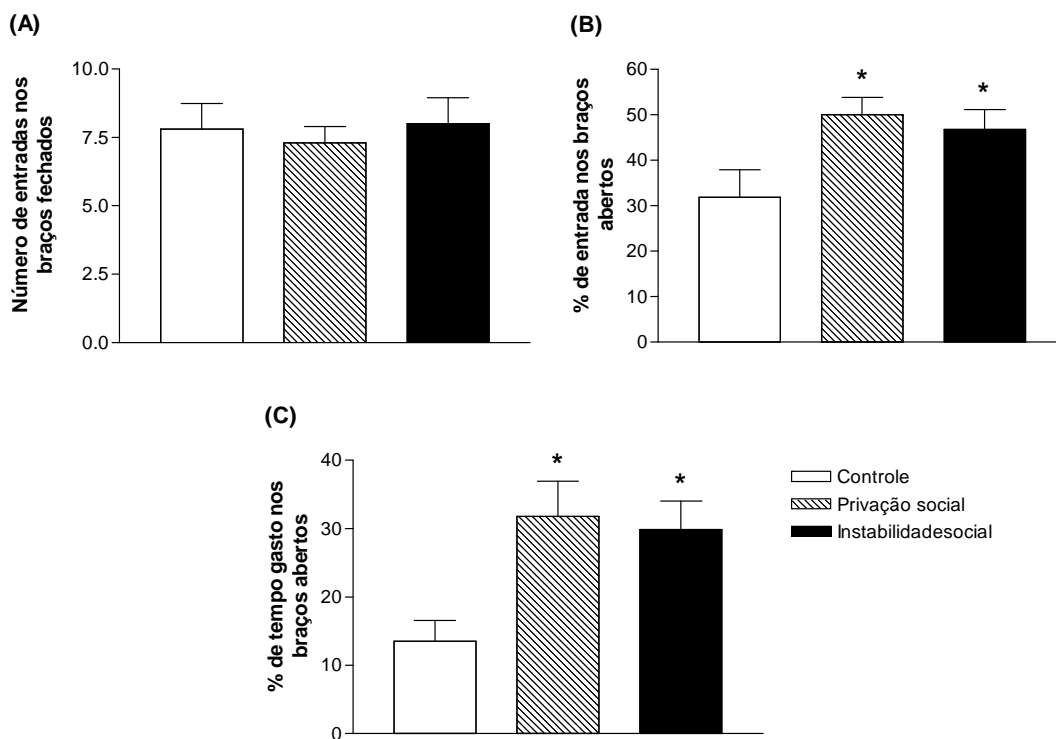


Figura 2.5 - Frequência de entrada nos braços fechados (A); porcentagem do número de entrada nos braços abertos em relação ao total de entrada em qualquer braço (B); porcentagem de tempo gasto nos braços abertos em relação ao tempo total gasto em qualquer braço (C). As barras representam a média \pm epm do registro do comportamento dos grupos controle ($n=9$), instabilidade social ($n=8$) e privação social ($n=11$), submetidos ao teste de LCE durante 5 minutos. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle.

4.3. Autoadministração operante de etanol: razão progressiva

A figura 2.6 mostra os resultados obtidos na razão progressiva para os três grupos. A análise estatística mostrou que não há diferença no número de respostas [$F(2,22)=0,09$; $p=0,91$], reforços [$F(2,22)=0,09$; $p=0,91$] e na última razão alcançada [$F(2,22)=0,04$; $p=0,96$] entre os grupos na autoadministração de etanol.

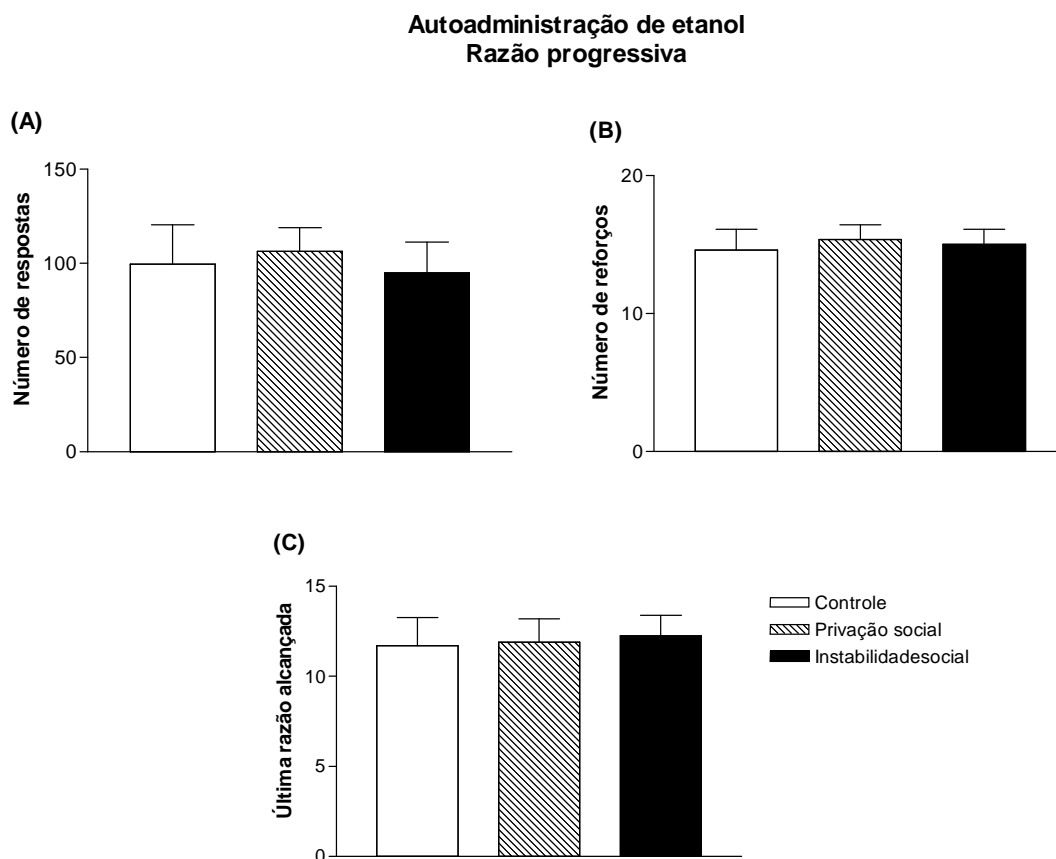


Figura 2.6 - Respostas (A), reforços (B) e última razão alcançada (C) de ratos adolescentes submetidos a 15 dias de estresse social. As barras representam a média \pm epm dos resultados obtidos na autoadministração operante de etanol (6%) no esquema de razão progressiva para os grupos controle (n=9), privação social (n=7) e instabilidade social (n=8).

4.4. Autoadministração operante de sacarina: razão progressiva

A figura 2.7 mostra os resultados obtidos na razão progressiva para os três grupos. A análise estatística mostrou que não há diferença no número de respostas [$F(2,22)=1,50;p=0,25$], reforços [$F(2,22)=1,33;p=0,29$] e na última razão alcançada [$F(2,22)=1,49;p=0,25$] entre os grupos na autoadministração de sacarina.

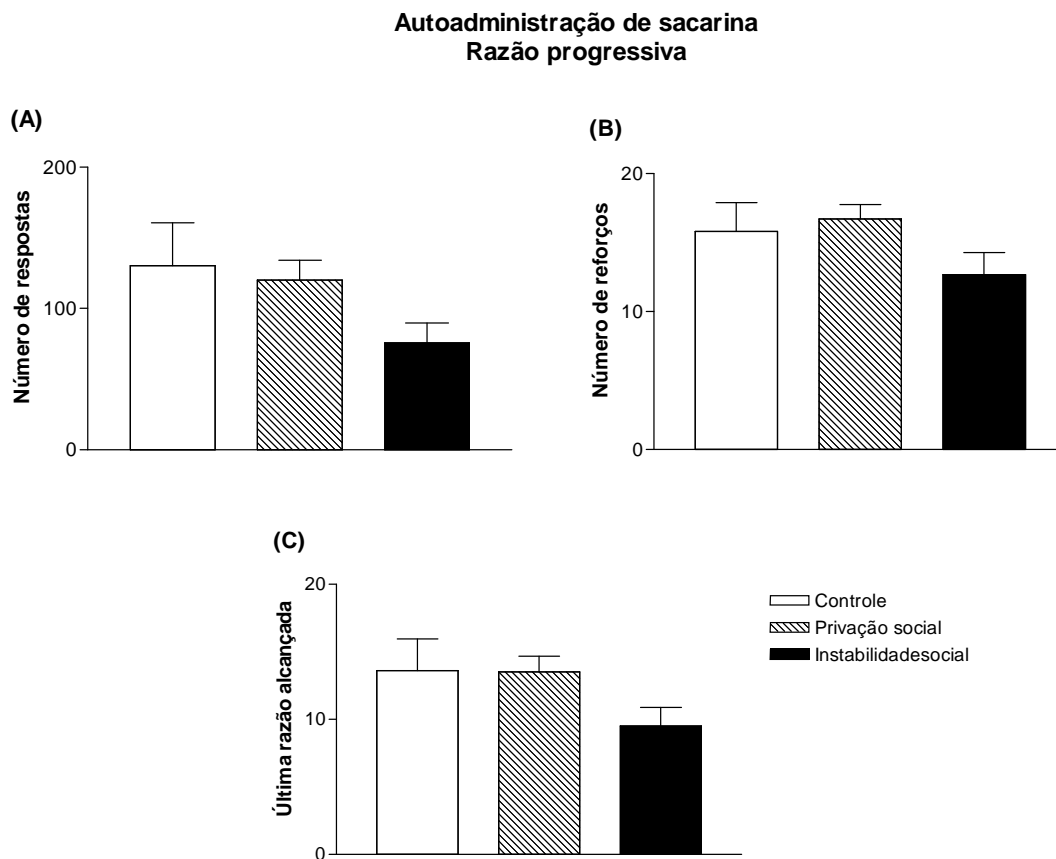


Figura 2.7 - Respostas (A), reforços (B) e última razão alcançada (C) de ratos adolescentes submetidos a 15 dias de estresse social. As barras representam a média \pm epm dos resultados obtidos na autoadministração operante de sacarina (0,05%) no esquema de razão progressiva para os grupos controle (n=8), privação social (n=7) e instabilidade social (n=7).

4.5. Autoadministração operante de etanol: binge

A análise estatística dos parâmetros do *binge* não indicou diferença entre os grupos em nenhum registro (figura 2.8). O estresse crônico não foi capaz de alterar o número de respostas [$F(2,23)=0,23;p=0,80$], reforços [$F(2,23)=0,23;p=0,80$] e consumo de etanol [$F(2,23)=1,64;p=0,22$] na autoadministração de etanol.

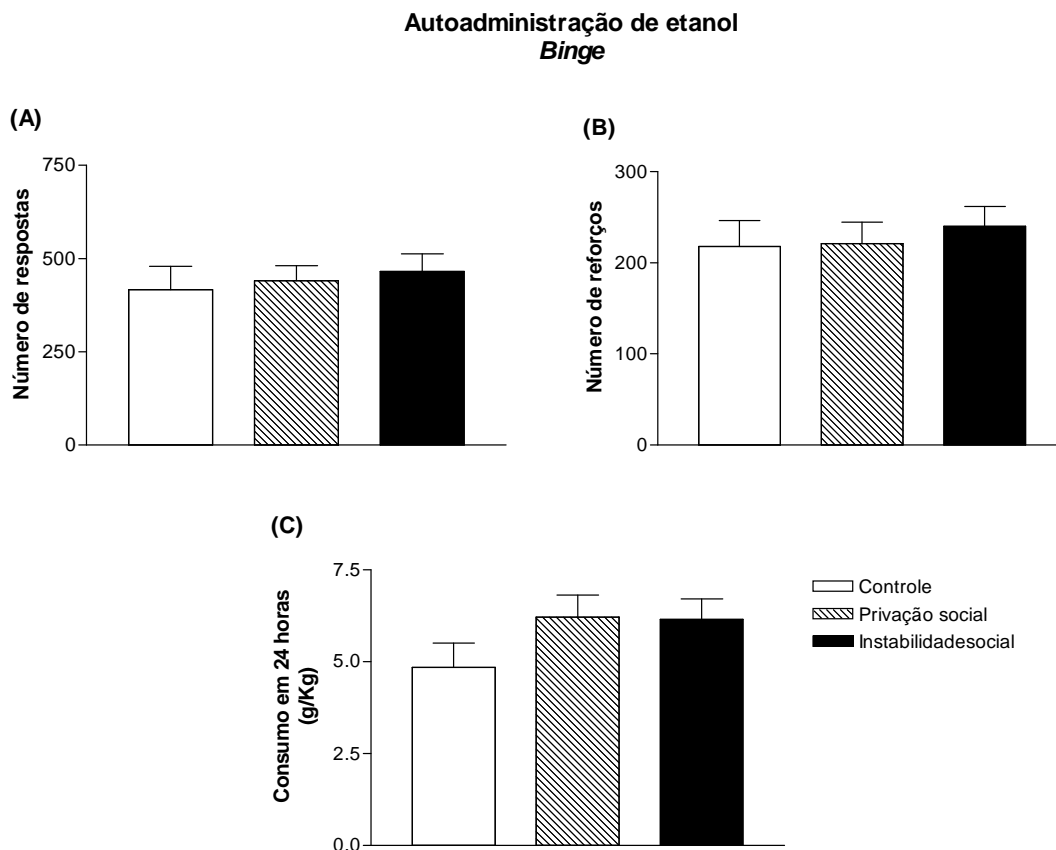


Figura 2.8 - Respostas (A), reforços (B) e consumo (C) de ratos adolescentes submetidos a 15 dias de estresse social. Os valores representam a média \pm epm dos resultados obtidos na autoadministração operante de etanol (6%) durante o *binge* (acesso livre por 24 horas) para os grupos controle (n=9), privação social (n=7) e instabilidade social (n=8).

4.6. Autoadministração operante de sacarina: *binge*

A análise estatística dos parâmetros do *binge* não indicou diferença entre os grupos em nenhum registro (figura 2.9). O estresse crônico não foi capaz de alterar o número de respostas [$F(2,22)=1,61;p=0,23$], reforços [$F(2,22)=1,37;p=0,28$] e consumo de sacarina [$F(2,22)=2,44;p=0,11$] na autoadministração de sacarina.

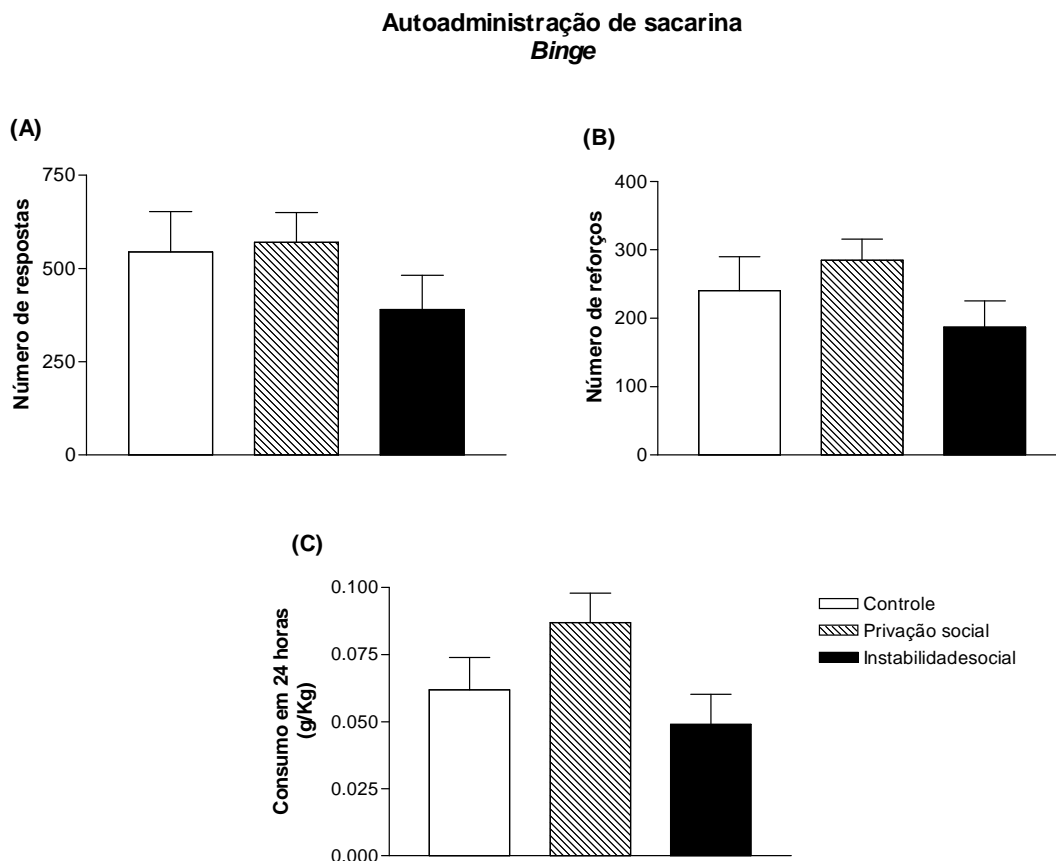


Figura 2.9 - Respostas (A), reforços (B) e consumo (C) de ratos adolescentes submetidos a 15 dias de estresse social. Os valores representam a média \pm epm dos resultados obtidos na autoadministração operante de sacarina (0,05%) durante o *binge* (acesso livre por 24 horas) para os grupos controle (n=8), privação social (n=7) e instabilidade social (n=7).

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

A figura 2.10 mostra os resultados da expressão dos genes CRF, CRF_{r1}, BDNF e TrkB na amígdala de ratos submetidos ao estresse social crônico durante a adolescência. A análise estatística indicou que o estresse crônico alterou a expressão de BDNF [$F(2,22)=26,78;p<0,05$], mas não de CRF_{r1} [$F(2,23)=0,52;p=0,60$] e TrkB [$F(2,23)=2,54;p=0,10$]. O teste de Newman-Keuls mostrou que o estresse de privação social e instabilidade social por 15 dias diminuíram a expressão de BDNF na amígdala de ratos, quando comparados com o grupo controle ($p<0,05$). O teste de Levene para igualdade de variâncias indicou que os dados obtidos da expressão de CRF não eram homogêneos ($p<0,05$). Dessa maneira, utilizamos o teste de Kruskal-Wallis que indicou diferença significativa entre os grupos [$H(2,14)=8,90;p<0,05$]. O teste

de Dunn para comparações múltiplas mostrou que os protocolos de estresse social crônico diminuíram a expressão de CRF na amígdala quando comparados com o grupo controle ($p < 0,05$).

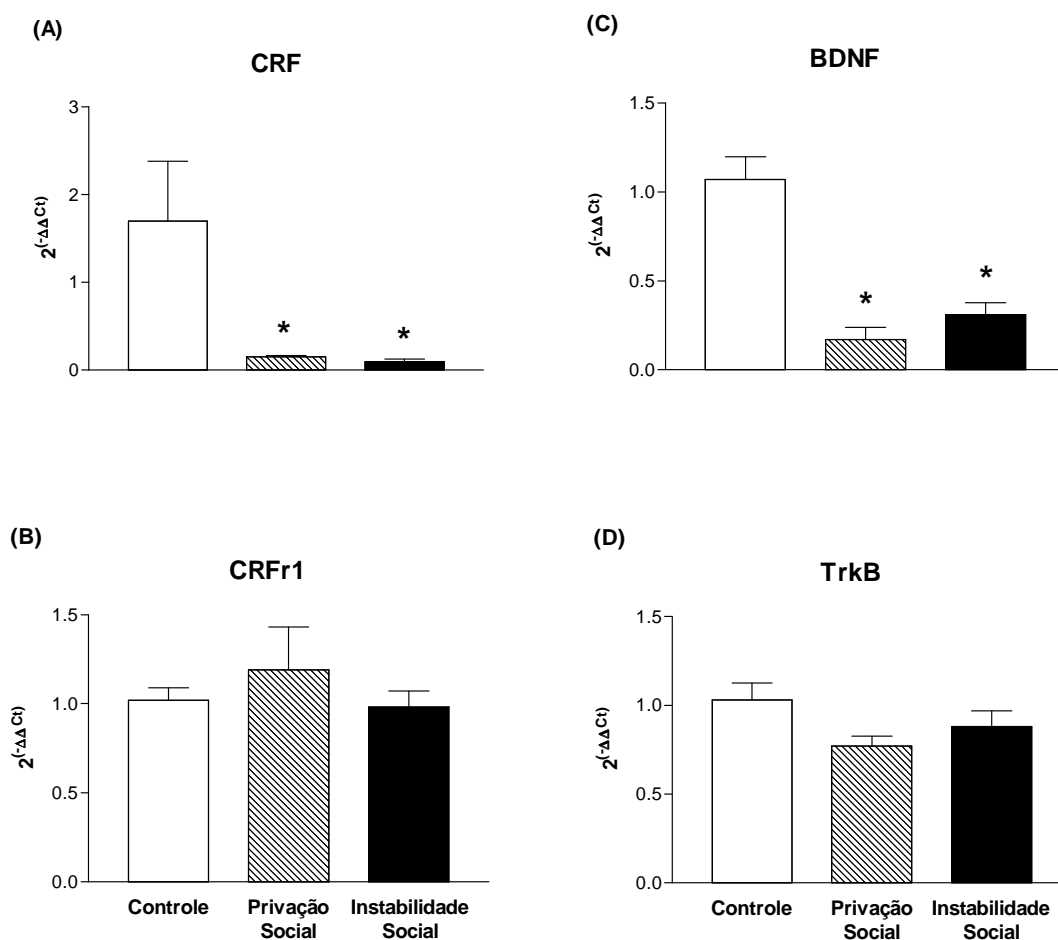


Figura 2.10 - Expressão gênica ($\Delta\Delta Ct$) de CRF (A), CRFr1 (B), BDNF (C) e TrkB (D) dos grupos controle, instabilidade social e privação social, quantificados através da técnica de RT-PCR. As barras representam a média \pm epm. CRF: controle (n=7); privação social (n=3); instabilidade social (n=5); CRFr1: controle (n=8); privação social (n=8); instabilidade social (n=8); BDNF: controle (n=8); privação social (n=7); instabilidade social (n=8); TrkB: controle (n=8); privação social (n=8); instabilidade social (n=8). * $p < 0.05$ comparado com o grupo controle.

5. DISCUSSÃO

Investigamos os efeitos do estresse crônico, em ratos, durante a adolescência, sobre a autoadministração de etanol e sacarina. Avaliamos também se a exposição ao estresse modifica os comportamentos relacionados à ansiedade, a secreção plasmática de corticosterona e a expressão gênica na amígdala de ratos submetidos ao estresse social durante a adolescência.

Nossos resultados mostraram que a exposição a estresse social durante a adolescência: (I) diminuiu a expressão de comportamentos relacionados à ansiedade no LCE; (II) diminuiu a concentração plasmática basal de corticosterona no grupo submetido à privação social; (III) não alterou a busca e o consumo de etanol e sacarina; (IV) diminuiu a expressão gênica de CRF e BDNF na amígdala.

O teste de labirinto em cruz elevado foi validado como um modelo animal para avaliar comportamentos relacionados à ansiedade por Pellow e colaboradores (1985). Nesse modelo, o animal tem acesso livre a braços abertos e fechados, mas em situações normais o número de entradas e o tempo de permanência nos braços fechados são maiores. Os registros nos braços abertos são usados como índice de ansiedade e a frequência de entrada nos braços fechados como atividade locomotora. Nossos resultados no teste do LCE demonstraram que 15 dias de exposição ao estresse social aumentou a frequência de entrada e o tempo de permanência nos braços abertos 48 horas após a última sessão de estresse. Assim, nossos resultados sugerem que a exposição repetida ao estresse social reduz os comportamentos relacionados à ansiedade. Esses dados contradizem resultados prévios da literatura, visto que vários trabalhos mostraram que ratos submetidos à privação social aumentaram a aversão aos braços abertos (BOTELHO; ESTANISLAU; MORATO, 2007; HALL et al., 1998b; HELLEMANS; BENGE; OLMSTEAD, 2004; LODGE; LAWRENCE, 2003; MAISONNETTE; MORATO; BRANDÃO, 1993; MASLOVA; BULYGINA; AMSTISLAVSKAYA, 2010; WEISS et al., 2004; WRIGHT; UPTON; MARSDEN, 1991). Entretanto, é importante notar que esses estudos possuem algumas diferenças metodológicas. Enquanto nosso estudo foi realizado após 15 dias de privação social, outros pesquisadores mostraram aumento dos comportamentos

relacionados à ansiedade após 4, 6, 8, 9 e 13 semanas de privação social (HALL et al., 1998b; LODGE; LAWRENCE, 2003; MASLOVA; BULYGINA; AMSTISLAVSKAYA, 2010; WEISS et al., 2004; WRIGHT; UPTON; MARSDEN, 1991). Além disso, nosso estudo foi realizado com ratos da linhagem Wistar enquanto outros mostraram efeitos ansiogênicos em Long-Evans (HELLEMANS; BENGGE; OLMSTEAD, 2004), Fawn-Hooded (LODGE; LAWRENCE, 2003) e Sprague-Dawley (WEISS et al., 2004). Embora alguns estudos tenham mostrado efeitos ansiogênicos também em ratos Wistar submetidos à privação social, na maioria deles o estresse foi realizado durante a vida adulta (BOTELHO; ESTANISLAU; MORATO, 2007; MAISONNETTE; MORATO; BRANDÃO, 1993).

Além disso, nossos resultados no LCE com ratos submetidos à instabilidade social também contradizem os resultados obtidos por McCormick; Smith; Mathews (2008). Eles demonstraram efeito ansiolítico em ratos fêmeas, mas não em machos. Porém, nossos estudos também têm diferenças metodológicas. Nosso teste de LCE foi realizado 48 horas após o último dia de estresse, apenas com ratos machos, enquanto eles submeteram ratos machos e fêmeas da linhagem Long-Evans ao LCE de 2 a 4 horas após o término da exposição ao estresse crônico. Desse modo, esses resultados sugerem que comportamentos relacionados à ansiedade no LCE podem ser influenciados pela duração do estresse, o tempo de latência entre o fim do estresse e o teste, gênero, idade e linhagem dos animais.

Recentemente o conceito de resiliência vem ganhando destaque nas pesquisas que envolvem o efeito do estresse em respostas comportamentais. Nesse contexto resiliência é a habilidade de um indivíduo em manter funções psicológicas normais diante da exposição crônica a estímulos estressantes e traumáticos, evitando o surgimento de patologias psiquiátricas (RUSSO et al., 2012; SOUTHWICK; CHARNEY, 2012). Embora seja necessário aprofundar a investigação dos mecanismos da resiliência, alguns pesquisadores sugerem que o estresse crônico moderado durante estágios precoces da vida aumenta a probabilidade de um animal tornar-se resiliente ao estresse na vida adulta. Suo e colaboradores (2013), por exemplo, demonstraram que ratos adolescentes (DPN28) submetidos ao estresse de contenção (5 minutos por dia) por 28 dias apresentaram comportamentos relacionados à diminuição da ansiedade no