



PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCAR/UNESP



FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA

**N-ACETILCISTEÍNA BLOQUEIA O DESENVOLVIMENTO DA SENSIBILIZAÇÃO
COMPORTAMENTAL AO ETANOL E AS ALTERAÇÕES NA PROTEÍNA (DELTA)FOSB**

Gessynger Morais Silva

Araraquara – SP

2016

Gessynger Morais Silva

**N-ACETILCISTEÍNA BLOQUEIA O DESENVOLVIMENTO DA SENSIBILIZAÇÃO
COMPORTAMENTAL AO ETANOL E AS ALTERAÇÕES NA PROTEÍNA
(DELTA)FOSB**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin

Araraquara – SP

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586n Silva, Gessynger Morais
N-acetilcisteína bloqueia o desenvolvimento da
sensibilização comportamental ao etanol e as
alterações na proteína (Delta)FosB / Gessynger Morais
Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
60 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2016.

1. Dependência ao etanol. 2. N-acetilcisteína. 3.
Glutamato. 4. Córtex préfrontal medial. 5. Núcleo
acumbens. I. Título.




UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS


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

Folha de Aprovação

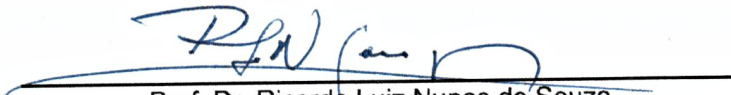
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Gessynger Morais Silva, realizada em 26/02/2016:



Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin
UNESP



Prof. Dr. Fábio Cardoso Cruz
IFSC/USP



Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza
UNESP

AGRADECIMENTOS

Começo esta sessão com um desabafo: nunca subestime um desafio com base nas suas experiências passadas. Apesar de todo o aprendizado que poderia ter me preparado para o mestrado, nada como a experiência para provar o quanto ainda há para aprender! E ainda bem que temos apoio para enfrentar as adversidades! Assim, é com muita felicidade que agradeço a cada uma das pessoas e entidades que de alguma maneira participaram desse trabalho.

Primeiramente agradeço a minha mãe, Selma, pelo amor incondicional. Seu apoio nesse que foi o maior passo em direção ao meu crescimento foi indispensável, me dando forças para que eu me mantivesse firme apesar de qualquer adversidade que possa surgir.

Ao meu irmão Matheus. Espero que eu consiga ser um adulto no qual você possa se espelhar, e que de alguma maneira eu lhe ajude a conquistar todos os seus sonhos.

Aos meus avós Natanael “Tatá” e Raquel. Continuo tentando viver seguindo todo o exemplo de vida que vocês me dão, exemplos de amor, honestidade, caráter e perseverança. Espero conseguir ser um neto que lhes dê muito orgulho.

A toda minha família, ao Douglas, primos (Sérgio, Thamara, Eduardo, Gil, Júnior e João Pedro), tia (Telma), padrinhos (Eduardo e Teresinha), por todo apoio e alegria nos momentos que passamos juntos.

Aos “paranáeus” Danilo, Léia e Pedro, pelos incontáveis momentos de diversão mesmo que separados por quilômetros e mais quilômetros de estrada. Guardo vocês com muito carinho no meu coração.

Agradeço muito aos grandes amigos de Araraquara e São Carlos. Durante esse tempo, vocês se tornaram a minha família, fonte de alegria e descontração. São muitos nomes, o que torna esse agradecimento ainda mais especial. Espero que ao ler cada um de vocês sinta meu sincero e grande obrigado.

A toda a equipe do laboratório de farmacologia: às técnicas Elisabete e Rosana, aos professores Ricardo, Carlos e Cleópatra e a secretária do departamento Tirene pelo apoio e presteza durante a execução deste trabalho. Saibam que considero todos vocês grandes amigos, merecedores de todo o meu respeito e admiração.

A minha companheira Larissa. Sua presença, apoio e incentivo tornaram os dias mais difíceis em obstáculos muito mais

simples de serem ultrapassados. Com você meus dias foram mais leves e felizes. Sinto-me especial por merecer seu amor e carinho.

Marcelo, você tem uma parte especial nesse trabalho. Não somente como orientador e idealizador, mas como amigo. Desde que iniciei minha vida nesse atribulado mundo que é a ciência, você tem sido o meu exemplo de profissional. Sigo esta carreira desejando um dia conseguir ser um profissional tão completo e admirável como você. Obrigado por todo apoio acadêmico e pessoal. Espero poder seguir contando com seu apoio sempre, assim como me tornar futuramente um profissional do qual você possa se orgulhar em ter orientado.

Finalmente agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - FCFar/UNESP pela infraestrutura necessária para realização desse trabalho.

Ao Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP pelo auxílio concedido.

À CAPES, pelo auxílio financeiro e bolsa concedida no período de março/2014 à abril/2015.

À FAPESP, processo nº 2015/01026-9, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro e bolsa concedidos.

“As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP”.

RESUMO

A dependência ao etanol é um grave problema de saúde pública que ainda necessita de tratamentos farmacológicos mais efetivos. Um fator chave no desenvolvimento e manutenção dessa doença são as plasticidades neurais que ocorrem na via mesocorticolímbica mediante o abuso crônico de etanol. Estas plasticidades são, em geral, maladaptativas e afetam inúmeros sistemas de neurotransmissores e moléculas intracelulares. Uma dessas moléculas é a Δ FosB, um fator de transcrição que é alterado após o uso crônico de drogas de abuso. A sensibilização comportamental é um fenômeno decorrente da administração repetida de drogas muito útil no estudo das alterações neurais relacionadas à dependência. Trabalhos recentes tem demonstrado um papel do desequilíbrio da neurotransmissão glutamatérgica nos sintomas encontrados em indivíduos dependentes. Neste sentido, o tratamento com a N-acetilcisteína, um pró-fármaco da L-cisteína que atua restaurando as concentrações extrasinápticas do glutamato através da ativação do trocador cistina-glutamato, tem mostrado resultados promissores no tratamento da dependência de psicostimulantes. Assim, avaliamos os efeitos do tratamento com a N-acetilcisteína nas alterações comportamentais e moleculares induzidas pela administração crônica de etanol. Camundongos suíços machos foram submetidos a administrações diárias de etanol por 13 dias a fim de induzir o desenvolvimento da sensibilização comportamental. Duas horas antes de cada administração, os animais receberam uma administração intraperitoneal de N-acetilcisteína. Imediatamente após a última sessão de teste, os cérebros dos animais foram removidos para quantificação de Δ FosB e do trocador cistina-glutamato. Nós encontramos que o tratamento com a N-acetilcisteína bloqueou o desenvolvimento da sensibilização comportamental ao etanol, o aumento de Δ FosB no córtex pré-frontal medial e a sua redução no núcleo acumbens. Nossos resultados sugerem um possível uso da N-acetilcisteína nas desordens relacionadas ao uso de etanol.

Palavras-chave: dependência ao etanol; n-acetilcisteína; glutamato; córtex pré-frontal medial; núcleo acumbens.

ABSTRACT

Ethanol addiction is a serious public health problem that still needs more effective pharmacological treatment. A key factor in the development and maintenance of this disease is the development of neural plasticity that occurs in the mesocorticolimbic brain pathway upon chronic ethanol abuse. These plasticity events are, in general, maladaptive and affect numerous neurotransmitter systems and intracellular molecules. One of these molecules is Δ FosB, a transcriptional factor that is altered after chronic drug use. Behavioral sensitization is a phenomenon resulting from repeated administration of abuse drugs useful for the study of the neural alterations related to addiction. Recent works have shown a role for the imbalance of glutamatergic neurotransmission in the symptoms found in addicted people. In this line, the treatment with N-acetylcysteine, a L-cysteine prodrug that acts restoring extrasynaptic concentrations of glutamate through the activation of cystine-glutamate antiporter, has shown promising results in the treatment of psychostimulant addiction. Thus, we evaluated the effects of N-acetylcysteine treatment in behavioral and molecular alterations induced by chronic ethanol administration. Swiss mice were subject to thirteen days of daily ethanol administration to induce the development of behavioral sensitization. Two hours before each ethanol administration and locomotor activity assessment, animals received N-acetylcysteine injections i.p.. Right after the last test session, their brains were removed for Δ FosB and cystine-glutamate antiporter quantification. We found that N-acetylcysteine treatment blocked ethanol-induced behavioral sensitization, the increase of Δ FosB content in the medial prefrontal cortex and its reduction in the nucleus accumbens. Our results suggest a possible use of N-acetylcysteine in the ethanol-related disorders.

Key-words: alcohol addiction; N-acetylcysteine; glutamate; xCT antiporter; medial prefrontal cortex; nucleus accumbens

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Metabolismo oxidativo do etanol.	13
Figura 2. Vias dopaminérgicas relacionadas à dependência, ou sistema dopaminérgico de recompensa.	17
Figura 3. Teoria da sensibilização do incentivo.	19
Figura 4. Hipótese glutamatérgica da dependência.	21
Figura 5. Metabolismo da N-acetilcisteína (N-AC).	23
Figura 6. Tela representativa do software de análise comportamental ANY-maze. ...	28
Figura 7. Representação gráfica do protocolo experimental e sensibilização locomotora ao etanol.	32
Figura 8. Efeito do tratamento com a N-AC na expressão de Δ FosB e do xCT no córtex pré-frontal medial (CPFm).	34
Figura 9. Efeito do tratamento com a N-AC na expressão de Δ FosB e do xCT no núcleo acumbens (Acb).	35
Figura 10. Efeito do tratamento com a N-AC na expressão de Δ FosB e do xCT no núcleo caudado-putamen (CPu).	36

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES	ix
SUMÁRIO	x
1. INTRODUÇÃO	11
1.1. <i>Etanol: uso, abuso e dependência</i>	11
1.2. <i>Sensibilização locomotora e a teoria da sensibilização do incentivo</i>	18
1.3. <i>Teoria glutamatérgica da dependência</i>	20
1.4. <i>N-acetilcisteína</i>	22
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. <i>Sujeitos experimentais</i>	27
4.2. <i>Drogas</i>	27
4.3. <i>Sensibilização Comportamental</i>	27
4.4. <i>Dissecação das áreas encefálicas</i>	28
4.5. <i>Western blotting</i>	29
4.6. <i>Análise estatística</i>	30
5. RESULTADOS	31
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXO A – Parecer CEUA/FCFAr 33/2014	60

1. INTRODUÇÃO

Registros históricos revelam que desde o início de sua produção, no momento em que os seres humanos passaram de um estilo de vida nômade para a construção de uma sociedade fixa, o etanol é consumido, seja de forma recreativa ou abusiva (GATELY, 2008). Sua relativa facilidade de obtenção e a disseminação de seu uso tornam essa a substância psicoativa que causa dependência mais utilizada no mundo (WINSTOCK, 2014). Assim como seu uso, os problemas decorrentes do abuso de etanol são altamente prevalentes e causam grande ônus para os cofres públicos. Dentre as inúmeras doenças relacionadas a essa droga, a dependência se destaca por sua gravidade e pela pouca eficácia dos tratamentos hoje existentes.

1.1. *Etanol: uso, abuso e dependência*

Indícios do uso e produção de bebidas alcólicas datam do período neolítico, por meio da simples fermentação de frutas e vegetais. Vasos de cerâmica de mais de 9 milênios encontrados na região onde hoje se encontra a china possuem vestígios de misturas alcólicas fermentadas de arroz, mel e frutas (MCGOVERN *et al.*, 2004). Praticamente em todas as sociedades antigas, independente do nível de desenvolvimento tecnológico, podem ser encontrados indícios do uso de técnicas de fermentação para obtenção de bebidas alcólicas (MCGOVERN, 2003). A escassez de fontes potáveis de água e as propriedades desinfetantes do álcool fizeram com que as bebidas alcólicas fossem, por milhares de anos, as principais bebidas consumidas, superando inclusive a própria água. Além disso, suas propriedades analgésicas e psicoativas atraem tanto a utilização médica dessa substância quanto seu consumo recreativo. Por fim, devemos considerar também as bebidas alcólicas na antiguidade como fonte extra de calorias (VALLEE, 1994).

O etanol, ou álcool etílico, é o princípio psicoativo presente nas bebidas alcólicas. É um hidrocarboneto polar anfipático de baixo peso molecular cuja fórmula química é C_2H_6O . Devido a sua pequena e relativamente simples estrutura, este atravessa a membrana celular por difusão simples e atua em diversos alvos no sistema nervoso central (SNC) (BEGLEITER; KISSIN, 1996).

Os receptores gabaérgicos GABAA são um dos alvos do etanol, que age atuando em um sítio alostérico específico e aumentando a afinidade do ácido gama-aminobutírico (GABA) ao seu receptor (REYNOLDS; PRASAD; MACDONALD, 1992; SANTHAKUMAR; WALLNER; OTIS, 2007). Outro importante receptor ionotrópico que é modulado pelo etanol por meio de um sítio alostérico é o receptor glutamatérgico NMDA (LOVINGER; WHITE; WEIGHT, 1989). Este atua por meio de alterações na abertura do canal iônico, diminuindo a frequência e o tempo de abertura (PEOPLES, R. W.; STEWART, 2000; WRIGHT; PEOPLES; WEIGHT, 1996; ZHAO *et al.*, 2015). Outros alvos de ação do etanol no SNC são os receptores glicinérgicos, serotoninérgicos do subtipo 5-HT₃, colinérgicos nicotínicos, canais de Ca²⁺ voltagem dependente do tipo L e canais de K⁺ ativados por proteína G (FADDA; ROSSETTI, 1998; NUTT, 1999; VENGELIENE *et al.*, 2009). A ligação do etanol com esses sítios primários altera a atividade de diversos neurônios, levando finalmente a mudanças comportamentais como desinibição, sedação e hipnose.

Cerca de 10% do etanol administrado é excretado do organismo em sua forma original (pela urina, suor, respiração), enquanto 90% é metabolizado. Seu metabolismo (figura 1) ocorre na maior parte por oxidação por meio da enzima álcool desidrogenase (ADH), principalmente no fígado, que oxida o etanol em acetaldeído, que é subsequentemente oxidado em acetato pela aldeído desidrogenase (ALDH) (BEGLEITER; KISSIN, 1996; MATSUMOTO; FUKUI, 2002; ZAKHARI, 2006). Alguns estudos sugerem um papel dos metabólitos do etanol, em especial o acetaldeído nos efeitos desta droga no organismo (ARIZZI-LAFRANCE *et al.*, 2006; CORREA *et al.*, 2003; DEEHAN; BRODIE; RODD, 2011; MAXWELL *et al.*, 2010; MELIS, M *et al.*, 2007; MELIS, MIRIAM *et al.*, 2009; TAMBOUR *et al.*, 2006; WARD *et al.*, 1997).

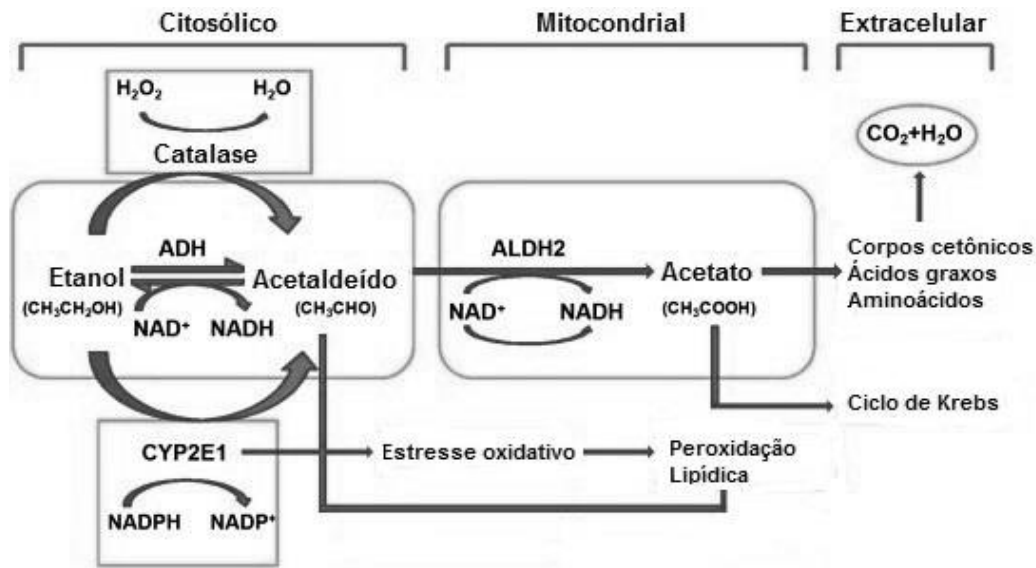


Figura 1. Metabolismo oxidativo do etanol. ADH: álcool desidrogenase; ALDH2: aldeído desidrogenase 2; NAD^+ : dinucleotídeo de nicotinamida e adenina – estado oxidado; $NADH$: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina – estado reduzido; CYP2E1: citocromo P450 2E1. Fonte: adaptado de (ZAKHARI, 2006).

O consumo de bebidas alcólicas está diretamente ligado com o desenvolvimento da humanidade. Esse teve um papel chave no desenvolvimento, tanto cultural quanto tecnológico, dos povos antigos. A partir do domínio dos processos de fermentação, indispensáveis para produção ancestral do etanol, processos de preservação dos alimentos foram desenvolvidos e aprimorados (MCGOVERN; FLEMING; KATZ, 1996).

Não só os benefícios da utilização do etanol acompanham o desenvolvimento da humanidade. Ainda na Grécia antiga, a embriaguez já era motivo de debate entre os filósofos (O'BRIEN, 1992). Na literatura, registros de embriaguez e problemas com o abuso do etanol já podem ser encontrados na mitologia greco-romana. Segundo a lenda, o deus Baco, após embriagar-se, teve de ser amarrado no tronco de roseira pelos deuses Marte e Mercúrio. Em uma passagem no antigo testamento cristão, no livro de Genesis, Noé, depois de passado o dilúvio, desenvolveu o plantio de videiras e então com as uvas produziu o vinho, com o qual se embriagou e foi encontrado nu em sua tenda, motivo de grande vergonha (MATTEDI, 2005). Na Odisseia de Homero, Elpenor cai do telhado de Circe, bêbado, após ali dormir em busca de ar fresco (KELLER, 1979). Especula-se que Alexandre, O Grande, tenha morrido em decorrências de problemas relacionados ao abuso de etanol (LIAPPAS *et al.*, 2003). A produção, uso e abuso

do álcool são controlados e punidos por meio de leis a séculos. Na Mesopotâmia e no Egito antigo, já existiam leis que coíbiam e puniam a embriaguez (MORRIS, 1998). No início do século XX, leis federais nos Estados Unidos baniram a fabricação, distribuição e a venda de bebidas alcóolicas, numa tentativa de coibir o abuso de etanol (KARASOV; OSTACHER, 2014). Esses são apenas alguns exemplos do quão antigo são os problemas relacionados ao uso de bebidas alcóolicas e de como as sociedades progressivamente tentam sua coibição, seja por meio de leis ou de suas lendas e histórias que procuram transmitir algum conhecimento ou mensagem.

Com a descoberta dos processos de destilação, a concentração das bebidas alcóolicas pode ser drasticamente aumentada, facilitando a ingestão de grandes quantidades de etanol em um pequeno volume, aumentando assim os efeitos da droga no organismo, e conseqüentemente as características adversas desse consumo. Esse crescimento resultou também em uma maior atenção acerca dos problemas e doenças relacionados ao álcool, incluindo a dependência (VALLEE, 1994). Entretanto, somente em 1960, por meio do trabalho de Morton Jellinek, o alcoolismo, ou a dependência ao etanol, passou a ser considerado como uma doença crônica, com suas próprias características, e dissociada dos demais transtornos relacionados ao uso do álcool (ANDRADE; ANTHONY; SILVEIRA, 2009; GIGLIOTTI; BESSA, 2004).

A dependência ao etanol é uma doença de caráter progressivo, que abrange sinais e sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos que indicam a perda do controle do uso do etanol pelo indivíduo e a continuação do seu uso apesar das características aversivas do mesmo (KOOB, 2009). São características desse transtorno a compulsão pela procura e consumo da substância, perda no controle do uso e o aparecimento de síndrome de abstinência (estados emocionais e fisiológicos negativos que aparecem quando o acesso ao etanol é impedido) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000).

Dados obtidos pelo II Levantamento nacional de álcool e drogas (II LENAD) mostram que o número de pessoas maiores de 18 anos no Brasil que admitem ter consumido álcool pelo menos uma vez no ano chega a 50%. Destes, 59% relataram o consumo em binge (grandes quantidades da droga em um único episódio), que reflete um padrão de consumo exagerado. A prevalência de indivíduos que relataram o uso nocivo de álcool nesse mesmo estudo foi de

aproximadamente 9%, dos quais 2% foram considerados dependentes (LARANJEIRA, 2014). No planeta, os dados mais recentes mostram que o uso nocivo de álcool causa cerca de 3,3 milhões de mortes todos os anos (WHO, 2014), sendo que no Brasil o uso desta substância é responsável por cerca de 10% dos problemas totais de saúde (MELONI; LARANJEIRA, 2004), acarretando aos cofres públicos custo anual aproximado de 7% do produto interno bruto (GALLASSI *et al.*, 2008). Dentre todos os problemas causados pelo uso de álcool, a dependência é o fator de maior gravidade (REHM *et al.*, 2009).

Mediante o uso crônico de etanol, importantes áreas encefálicas (figura 2) sofrem eventos de plasticidade maladaptativos que levam ao padrão compulsivo e excessivo de consumo e a fissura após a descontinuação do uso (MOST; FERGUSON; HARRIS, 2014). Essas regiões encefálicas são importantes no controle da motivação e na capacidade de escolha entre os diversos estímulos aos quais somos diariamente expostos, o que torna a dependência uma “doença da motivação, do hábito e da impulsividade”, já que essas funções e seu controle se encontram prejudicados (KALIVAS; VOLKOW, 2005).

A via mesocorticolímbica (figura 2, linhas azul e verde) é um sistema neuronal crítico na identificação de estímulos relevantes. Compreende os neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral (ATV) que se projetam para o núcleo acumbens (Acb) e para o córtex pré-frontal medial (CPFm). Pode ser considerada a união de duas vias distintas, a mesocortical (neurônios da ATV que se projetam para o CPFm) e a mesolímbica (neurônios da ATV que se projetam para o Acb). É ativada, por exemplo, quando um indivíduo entra em contato com estímulos reforçadores naturais, como comida e sexo (ADINOFF, 2004). As drogas de abuso também ativam essa via que, mediante uso crônico podem levar a plasticidade maladaptativa relacionada à dependência. Por exemplo, a desregulação da homeostase no CPFm e Acb é crucial na transição do uso recreativo para o uso incontrolado de substâncias psicoativas. Essa desregulação altera a relevância motivacional da droga, tornando-a cada vez mais importante para o indivíduo, independente da característica hedônica da substância. Além disso, a busca pela droga torna-se inconsequente, de modo que o indivíduo perde a capacidade de planejamento e deixa de considerar as consequências relacionadas a tal comportamento (KOOB; VOLKOW, 2010).

Indivíduos dependentes de etanol, cocaína e metanfetamina possuem déficits relacionados à tomada de decisão que se assemelham ao de pacientes que possuem lesão no CPF ventromedial (BECHARA *et al.*, 2001). Usuários dependentes de cocaína ou opióides apresentam prejuízo na ativação do córtex cingulado em tarefas de escolha e identificação de erros (FORMAN *et al.*, 2004; KAUFMAN *et al.*, 2003). A ativação do CPFm para estímulos reforçadores naturais, como a exposição a imagens de sexo, também é prejudicada (GARAVAN *et al.*, 2000). Usuários crônicos de etanol (WRASE; MAKRIS; BRAUS, 2008), heroína (SEIFERT *et al.*, 2015), nicotina (DAS, D. *et al.*, 2012) e cocaína (BARRÓSLOSCERTALES *et al.*, 2011) apresentam redução do volume do Acb. O uso regular, mesmo que recreativo, de Cannabis, por exemplo, altera a funcionalidade do Acb em indivíduos jovens adultos (GILMAN *et al.*, 2014).

Outra via encefálica importante na dependência por meio do controle do hábito é a via nigroestriatal (figura 2, linha vermelha). Esta compreende dos neurônios dopaminérgicos da substância nigra (SN) e suas conexões com o núcleo caudado-putamen (CPu). Assim como o CPFm e o Acb, o CPu também tem sua funcionalidade alterada mediante o uso crônico de drogas de abuso. A associação entre os estímulos relacionados à droga, a substância de abuso em si, e as ações relacionadas ao consumo tornam-se cada vez mais fortes, e os comportamentos relacionados à busca e consumo da droga, automáticos (EVERITT; ROBBINS, 2013).

Indivíduos dependentes possuem aumento da atividade do CPu em resposta a dicas relacionadas às drogas utilizadas (LI, Q. *et al.*, 2012; MCCLERNON *et al.*, 2009). Além disso, as conexões entre o CPu e o Acb e CPFm parecem se tornar mais fortes na dependência, alteração que possui um importante papel na perda do controle do uso da droga, tornando a tomada de decisão rígida, voltada para o consumo da droga, independente do valor motivacional envolvido (BELIN *et al.*, 2013).

Em conjunto, todas essas alterações (aumento da relevância motivacional da droga, impulsividade, formação de hábito e de comportamentos automáticos) levam a perda do controle do uso da droga e a continuação desse uso apesar das consequências adversas do mesmo.

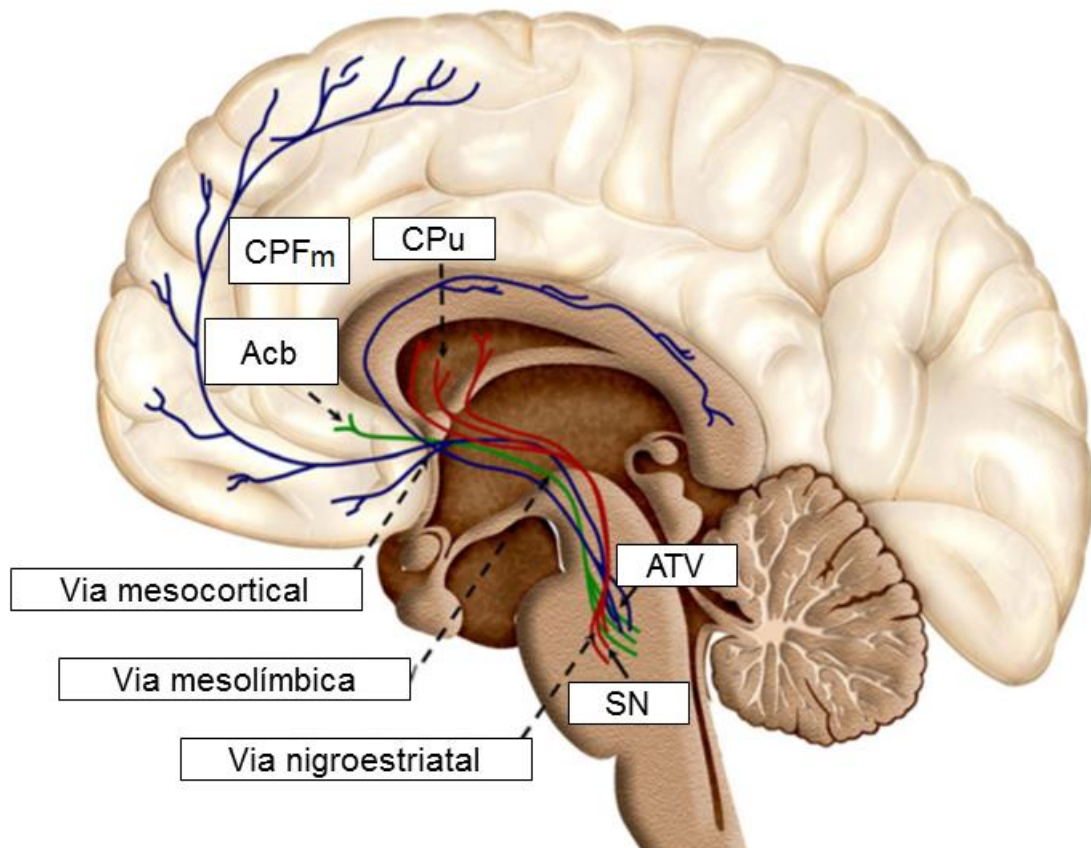


Figura 2. Vias dopaminérgicas relacionadas à dependência, ou sistema dopaminérgico de recompensa. Os neurônios dopaminérgicos localizados no mesencéfalo, mas especificamente na ATV e na SN, se projetam para as estruturas prosencefálicas CPFm, Acb e CPu. Em azul, encontra-se a via dopaminérgica mesocortical, que compreende dos neurônios dopaminérgicos da ATV que se projetam para o CPFm. Em verde, encontra-se a via dopaminérgica mesolímbica, que compreende dos neurônios dopaminérgicos da ATV que se projetam para o Acb. Juntas, essas vias formam a via dopaminérgica mesocorticolímbica, considerada como uma única via devido ao grande número de conexões existentes entre o Acb e o CPFm. Em vermelho encontra-se a via nigroestriatal, que compreende dos neurônios dopaminérgicos da SN que se projetam para o CPu. Acb, núcleo acumbens; ATV, área tegmental ventral; CPFm, córtex pré-frontal medial; CPu, núcleo caudado-putamen; SN, substância nigra. Fonte: adaptado de ARIAS-CARRIÓN *et al.*, 2010.

A proteína Δ FosB é uma variante truncada via *splicing* alternativo do gene *fosb* (do inglês, *Finkel-Biskis-Jinkins murine osteosarcoma viral oncogene homolog B*). Este gene pertence a família de genes de ativação imediata fos (do inglês, *Finkel-Biskis-Jinkins murine osteosarcoma viral oncogene homolog*), que são fatores de transcrição produzidos quando uma célula é ativada pelos estímulos mais variados. Por esse motivo, as proteínas provenientes dessa família de genes são largamente utilizadas no mapeamento da ativação neuronal (KOVÁCS, 1998). Enquanto o fator de transcrição FosB é rapidamente degradado após sua produção, a variante Δ FosB é uma proteína altamente estável, e acumula no interior da célula mediante estímulos repetidos (RUFFLE, 2014).

Um desafio agudo com etanol e outras drogas leva a indução da proteína FosB, enquanto a exposição crônica leva ao acúmulo de Δ FosB (HOPE *et al.*, 1994; PERROTTI *et al.*, 2008; RYABININ; WANG, 1998). O acúmulo dessa molécula é um dos mecanismos pelos quais as drogas de abuso podem produzir alterações neuronais duradouras. Seu acúmulo aumenta as propriedades motivacionais (reforçadoras), o consumo e os efeitos psicomotores das drogas de abuso (NESTLER; BARROT; SELF, 2001).

Diversas alterações decorrentes do uso crônico de drogas de abuso em modelos animais são mediadas pela Δ FosB. A indução de Δ FosB pela cocaína aumenta a transcrição da proteína Cdk5 (do inglês, *Cyclin-dependent kinase 5*), que regula as alterações de longo prazo induzidas pela cocaína (BIBB *et al.*, 2001; KUMAR *et al.*, 2005). A expressão do fator de transcrição NF κ -B (do inglês, *nuclear factor kappa B*), molécula inflamatório do SNC ligada aos processos de expansão dendrítica também é aumentada por meio da Δ FosB (ANG *et al.*, 2008; ASANUMA; CADET, 1998; RUSSO *et al.*, 2009).

1.2. Sensibilização locomotora e a teoria da sensibilização do incentivo

A sensibilização comportamental é um modelo animal usado para o estudo das neuroplasticidades induzidas por drogas de abuso. Esse modelo consiste no aumento gradual dos efeitos psicoestimulantes de substâncias psicoativas (sensibilização locomotora) após administrações repetidas e reflete as neuroadaptações relacionadas à dependência que ocorrem na via mesocorticolímbica (ROBINSON, TERRY E; BERRIDGE, 2008; VANDERSCHUREN; KALIVAS, 2000). Animais sensibilizados apresentam diversas alterações em genes relacionados ao remodelamento da cromatina e a transcrição gênica (BOTIA *et al.*, 2012; LEGASTELOIS; BOTIA; NAASSILA, 2013; LI, H. *et al.*, 2014)

Também chamada de tolerância reversa, esse aumento dos efeitos das drogas de abuso se refere à sua relevância motivacional e não aos efeitos intrínsecos de cada droga (por exemplo, os efeitos sedativos do etanol, a analgesia induzida por opióides, que sofrem tolerância mediante uso crônico). Assim, ocorre um aumento do desejo de usar a droga, independente de sua propriedade em causar prazer, culminando com o aparecimento da fissura (figura 3) (ROBINSON, T

E; BERRIDGE, 1993). Dai surge o termo “sensibilização do incentivo”, indicando um aumento da relevância motivacional das drogas de abuso.

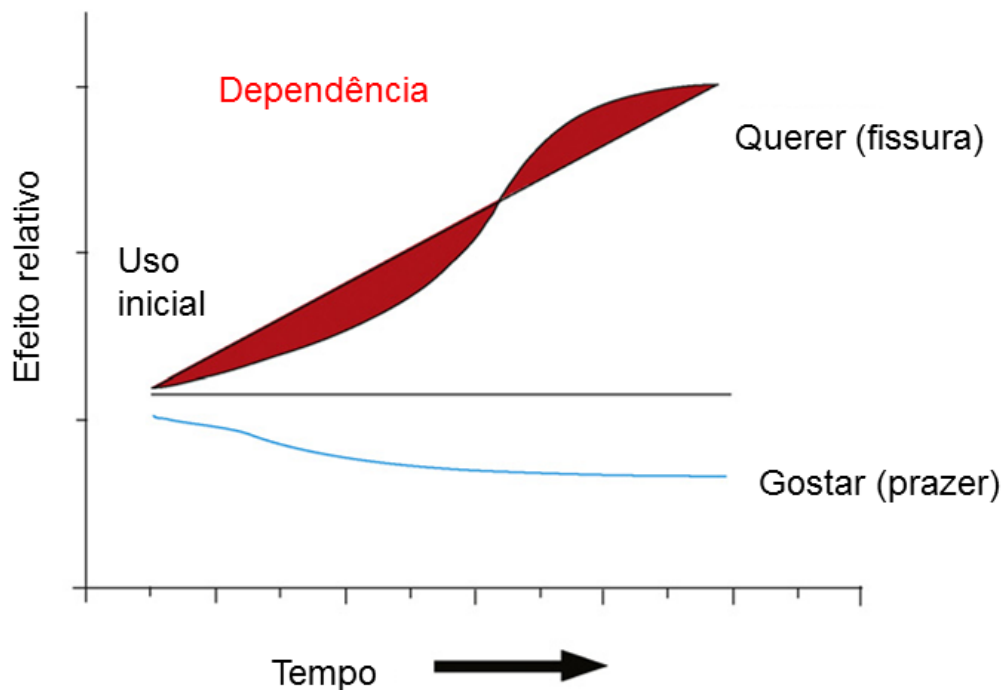
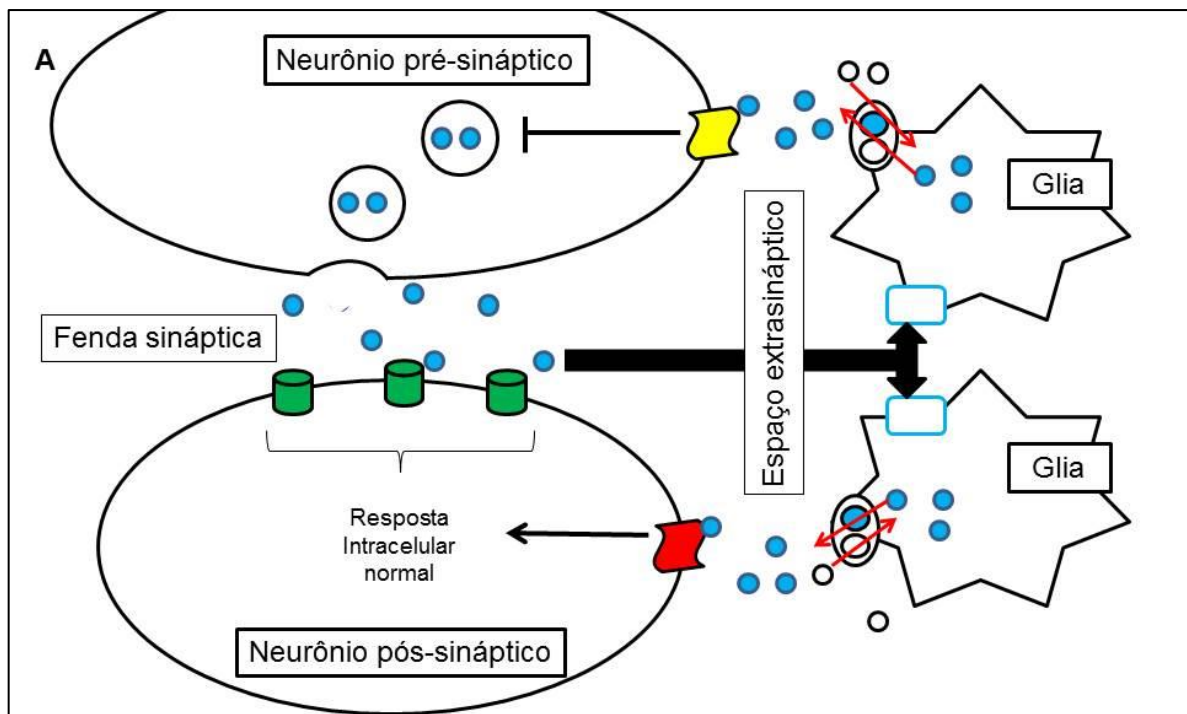


Figura 3. Teoria da sensibilização do incentivo. Modelo representa, durante o desenvolvimento da dependência, o crescimento do “querer” usar a droga, ou seja, a sensibilização da relevância motivacional da droga, e a diminuição do “gostar” de usar a droga, ou seja, a tolerância do prazer relativo relacionado aos efeitos específicos de cada substância. Fonte: adaptado de BERRIDGE; ROBINSON; ALDRIDGE, 2009.

A correlação entre a sensibilização do incentivo e o aumento progressivo da atividade locomotora (sensibilização locomotora) se dá devido ao compartilhamento das estruturas cerebrais que controlam a relevância motivacional de um estímulo, que é alterado mediante o uso crônico de drogas de abuso, e o controle motor (ROBINSON, T E; BERRIDGE, 1993). Tanto o Acb quanto o CPu possuem projeções para a área motora suplementar, região relacionada com o planejamento e concepção de sequências de movimentos (ARIAS-CARRIÓN *et al.*, 2010). Assim, as neuroadaptações duradouras que alteram a funcionalidade do Acb e do CPu aumentando a relevância motivacional das drogas de abuso também alteram a resposta locomotora controlada por essas regiões (BERRIDGE; ROBINSON; ALDRIDGE, 2009; SMITH *et al.*, 2009; VANDERSCHUREN; KALIVAS, 2000).

1.3. Teoria glutamatergica da dependência

Trabalhos recentes têm sugerido que alterações no sistema glutamatergico podem ser as responsáveis pelos sinais e sintomas encontrados em indivíduos dependentes. Nesse sentido, os estudos tem focado na hipótese glutamatergica da dependência (figura 4), que sugere que um desequilíbrio entre o glutamato sináptico e extrasináptico, o que altera o controle da liberação do glutamato e a excitabilidade neuronal por meio dos receptores metabotrópicos de glutamato é, pelo menos em parte, responsável pela dependência (KALIVAS, 2009).



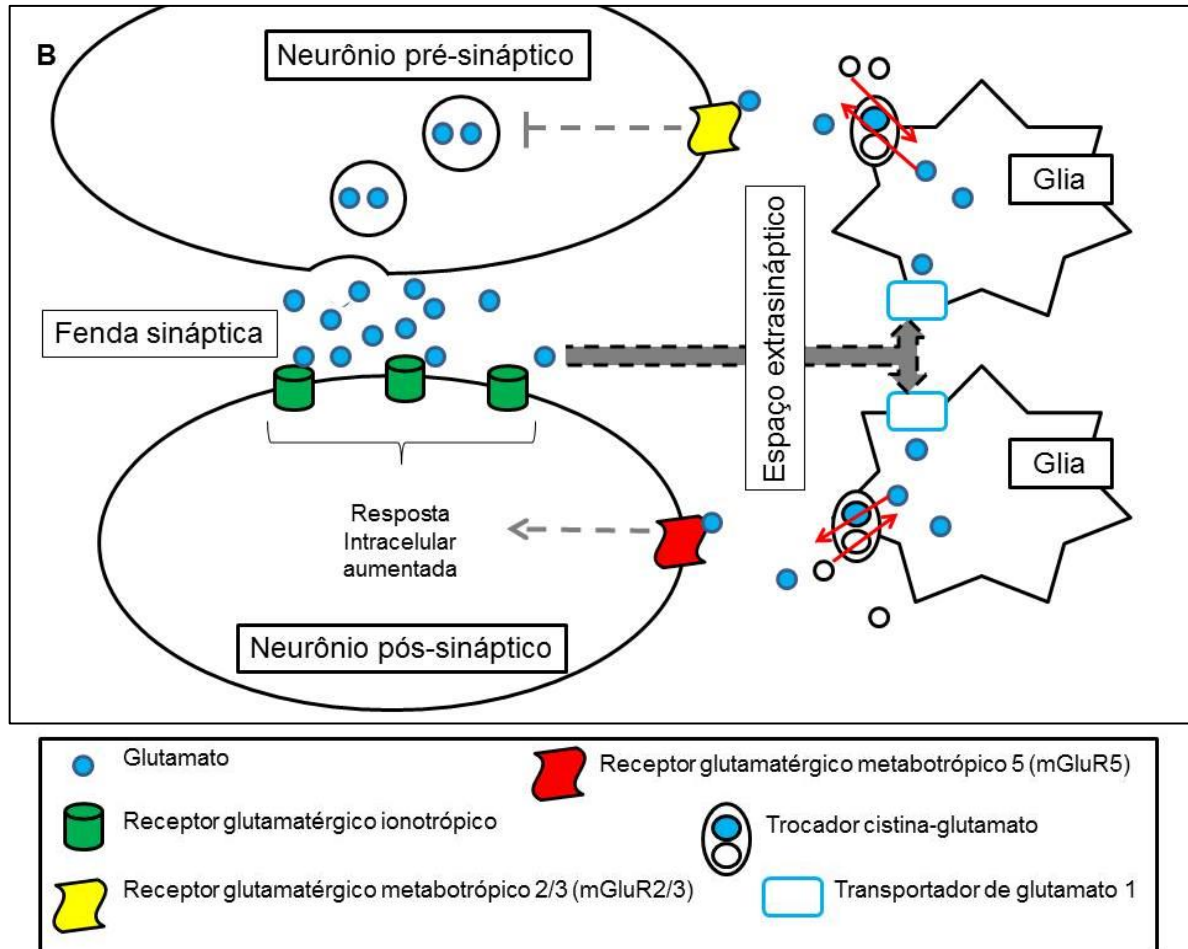


Figura 4. Hipótese glutamérgica da dependência. A figura representa um esquema simplificado das alterações que ocorrem mediante o uso crônico de drogas de abuso. **A**, sinapse glutamérgica normal. O glutamato liberado na fenda sináptica pelo neurônio pré-sináptico atua nos receptores ionotrópicos pós-sinápticos e é captado principalmente pelas células da glia, por meio do transportador de glutamato 1. O glutamato extrasináptico atua nos receptores metabotrópicos, controlando a liberação do glutamato e a excitabilidade do neurônio pós-sináptico. O trocador cistina-glutamato é um dos responsáveis por manter as concentrações extrasinápticas de glutamato reguladas. **B**, sinapse glutamérgica alterada pelo uso crônico de drogas de abuso. As alterações na captação e no controle da liberação de glutamato aumentam a liberação sináptica desse neurotransmissor, alterando assim a resposta celular do neurônio pós-sináptico. A seta tracejada em cinza indicam diminuição do processo ao qual estão relacionadas. Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

A principal forma de controle da concentração extracelular de glutamato é por meio da sua captação. Assim, os transportadores gliais de glutamato exercem um importantíssimo papel na manutenção da concentração sináptica desse neurotransmissor. O transportador de glutamato do tipo 1 existente principalmente nos astrócitos controla tanto a concentração sináptica de glutamato quanto impede que esse glutamato sináptico atue nos receptores extrasinápticos (DANBOLT, 2001). No espaço extrasináptico, a concentração de glutamato é controlada principalmente por meio do trocador astrocitário cistina-glutamato (xCT),

que age como um co-transportador, transportando uma molécula de glutamato para o espaço extrasináptico ao mesmo tempo em que transporta uma molécula de cistina para o espaço intracelular (KARILA *et al.*, 2008).

Corroborando com essa teoria, a exposição crônica ao etanol aumenta a concentração sináptica de glutamato no Acb e a neurotransmissão excitatória, além de alterar os receptores e transportadores glutamatérgicos (RAO; BELL; *et al.*, 2015). As projeções dos neurônios glutamatérgicos do CPFm para o Acb estão relacionadas com a recaída induzida pelo estresse, pelo uso de pequenas quantidades da droga e por meio de dicas ambientais relacionadas ao uso da substância (KALIVAS; VOLKOW, 2005). Diversas evidências apontam que alterações duradouras nas sinapses glutamatérgicas entre os neurônios do CPFm e do Acb possuem um importante papel na dependência (VOLKOW *et al.*, 2011). A sensibilização comportamental à cocaína é relacionada a uma hiperfuncionalidade da neurotransmissão glutamatérgica no CPFm (BLANCO *et al.*, 2015). O uso de antagonistas de receptores glutamatérgicos diminui os efeitos reforçadores do etanol, o consumo e a recaída ao uso dessa droga (BALTIERI *et al.*, 2008; BLEDOV; ADRON HARRIS, 2008; FAROOK *et al.*, 2009; KRYSTAL *et al.*, 2003). A restauração dos níveis do trocador cistina-glutamato e do transportador astrocitário de glutamato do tipo 1 (GLT-1) no CPF e Acb diminuem a recaída ao consumo de etanol (ALHADDAD; DAS; SARI, 2014). Assim, a restauração do equilíbrio glutamatérgico através do reestabelecimento do tônus glutamatérgico extrasináptico age regulando a liberação sináptica do glutamato e a excitabilidade dos neurônios do Acb. O uso de drogas que alteram as concentrações extrasinápticas de glutamato (por exemplo, a ceftriaxona [CEF], a N-acetilcisteína [N-AC]) é um interessante candidato no tratamento da dependência (RAO; BELL; *et al.*, 2015; REISSNER; KALIVAS, 2010).

1.4. N-acetilcisteína

Resultados promissores estão sendo obtidos tanto em estudos pré-clínicos como clínicos em relação ao uso da N-AC no tratamento de doenças psiquiátricas, incluindo a dependência (BERK *et al.*, 2013).

A N-AC é uma pró-droga da L-cisteína clinicamente utilizada como agente mucolítico e no tratamento da overdose do paracetamol (DEAN;

GIORLANDO; BERK, 2011). Ao ser absorvida, a N-AC é rapidamente metabolizada em L-cisteína pelas acetiltransferases. A molécula de L-cisteína livre, devido ao seu grupo reativo sulfidril, se une a outra L-cisteína por meio de pontes dissulfeto para formação da cistina (figura 5).

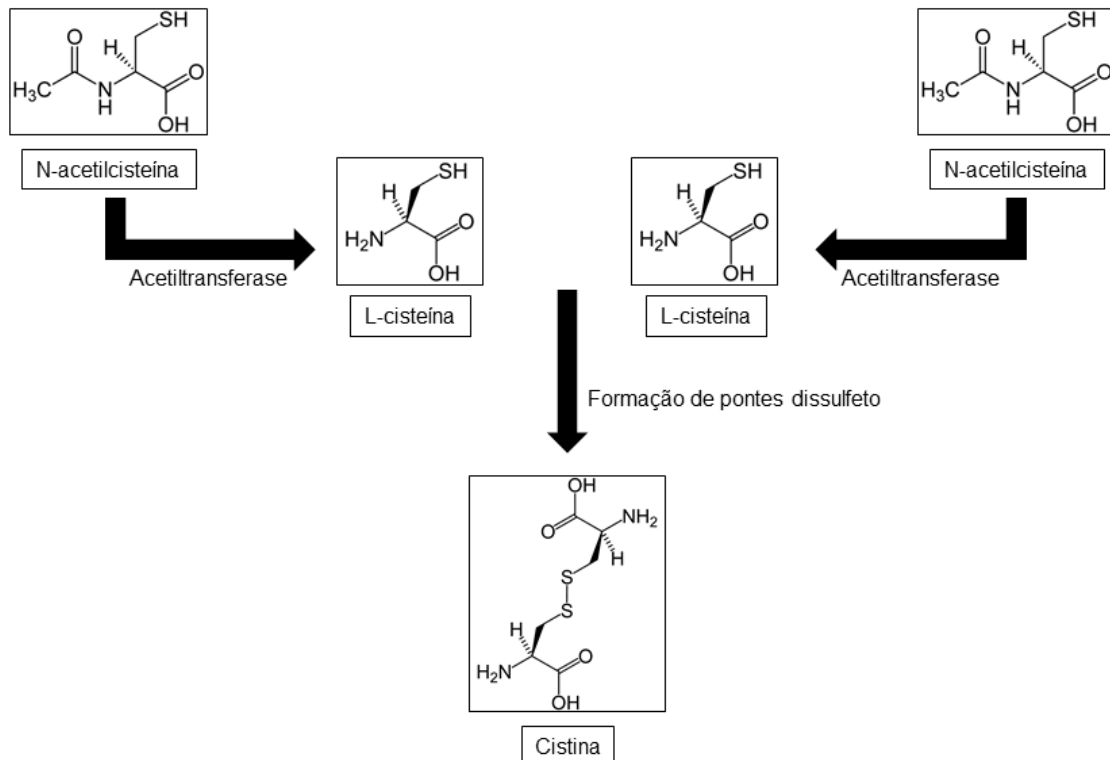


Figura 5. Metabolismo da N-acetilcisteína (N-AC). Ao ser absorvida, a N-AC é rapidamente metabolizada em L-cisteína por ação das acetiltransferases. Duas moléculas de L-cisteína se unem por pontes dissulfeto para formação de uma molécula de cistina, que é o substrato do xCT. Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Além de ser um agente antioxidante, a N-AC age no xCT, aumentando as concentrações extracelulares de glutamato (BROWN, R. M.; KUPCHIK; KALIVAS, 2013). Dados pré-clínicos e clínicos tem mostrado certa eficácia da N-AC contra a dependência à cocaína e à nicotina. O tratamento com a N-AC bloqueia a recaída por meio de uma injeção da droga à procura da cocaína em ratos (BAKER *et al.*, 2003), assim como seu consumo aumentado após a exposição crônica à essa droga e o desenvolvimento da sensibilização comportamental (MADAYAG *et al.*, 2007). A síndrome de abstinência à nicotina é atenuada pela N-AC (KNACKSTEDT *et al.*, 2009). Em humanos, o tratamento com a N-AC em dependentes de cocaína diminui o desejo de usar a droga e o interesse em dicas relacionadas ao uso da cocaína

(LAROWE *et al.*, 2007) e o número de cigarros fumados em dependentes de nicotina (KNACKSTEDT *et al.*, 2009). Em relação ao tratamento do alcoolismo, poucos estudos existem na literatura. O tratamento com a N-AC bloqueia a síndrome de abstinência ao etanol e as alterações neuroendócrinas, como o aumento de leptina, induzidas pelo consumo crônico de etanol em ratos (SCHNEIDER *et al.*, 2015; SEIVA; AMAUCHI; ROCHA; SOUZA; *et al.*, 2009)

2. JUSTIFICATIVA

A gravidade da dependência ao etanol como problema de saúde pública, e suas inúmeras consequências na convivência familiar e saúde do indivíduo (MILLER *et al.*, 2007; REHM; GMEL, 1999), impulsionam o desenvolvimento de mecanismos farmacológicos que possam tratar essa patologia. O entendimento do papel das vias neurais alteradas nesse estado patológico é crucial para o desenvolvimento de novos fármacos.

A N-AC tem apresentado resultados promissores no tratamento da dependência a outras drogas de abuso. Considerando-se que algumas alterações neurais são comuns entre a dependência das diversas substâncias psicoativas e os efeitos da N-AC no controle das neuroadaptações induzidas por estas substâncias, este medicamento pode ser um potencial agente no tratamento da dependência ao etanol. Além disso, estudos têm mostrado alterações na neurotransmissão glutamatérgica em modelos animais de dependência ao etanol.

Assim, o presente estudo colaborou no entendimento da neurobiologia do alcoolismo e forneceu resultados acerca da eficácia da N-AC como um possível fármaco capaz de impedir o aparecimento de algumas neuroadaptações relacionadas à dependência ao etanol.

3. OBJETIVOS

O presente estudo avaliou o efeito da N-AC no desenvolvimento da sensibilização comportamental ao etanol e nas alterações moleculares relacionadas.

Para tanto, os seguintes objetivos específicos foram traçados:

- avaliar o efeito do tratamento com a N-AC no desenvolvimento da sensibilização comportamental ao etanol, por meio da medida da sensibilização locomotora;
- avaliar as alterações na expressão do fator de transcrição Δ FosB e do transportador xCT por meio da técnica de western blotting no CPFm, Acb e CPu relacionadas à sensibilização locomotora ao etanol em camundongos;
- avaliar o efeito do tratamento com a N-AC nas alterações da expressão do fator de transcrição Δ FosB e do transportador xCT relacionadas à sensibilização locomotora ao etanol;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. *Sujeitos experimentais*

Sessenta camundongos suíços machos (pensando entre 36-45 g no início dos experimentos) foram obtidos do biotério da Univ Estadual Paulista – UNESP (Botucatu, SP, Brasil). Os animais foram transferidos para o laboratório onde foram realizados os experimentos pelo menos 7 dias antes do início dos experimentos, onde foram mantidos em grupos de 4-5 animais por caixa (33 x 15 x 13 cm). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo de luz (ciclo 12/12 horas, luzes acesas às 07:00h) com livre acesso a alimento e água. Todos os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo de luz, no qual os animais foram testados aleatoriamente durante este período (12h às 17h). Todo o procedimento envolvendo animais foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais local (CEUA/FCF/CAr) sob número de protocolo 33/2014 e realizado de acordo com os princípios do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.2. *Drogas*

N-acetilcisteína (N-AC) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO-EUA) foi diluído em solução salina (6 ou 12 mg/mL) e administrada intraperitonealmente (i.p.) (0,1 mL/10 g) nas doses de 60 e 120 mg/kg. Etanol 99,8% (Labsynth, Diadema, SP-BR) foi diluído em salina (20% vol/vol) e administrado i.p. (0,125 mL/10g) na dose de 2,0 g/kg.

4.3. *Sensibilização Comportamental*

Esse protocolo experimental foi recentemente padronizado em nosso laboratório baseado no descrito por BAHÍ; DREYER, 2012 e avalia o desenvolvimento da sensibilização psicomotora ao etanol pelo campo aberto (CA) em camundongos. O CA (figura 6) é uma arena circular de assoalho preto com 26 cm de diâmetro circundada por paredes opacas de 30 cm de altura.

O protocolo durou 15 dias (figura 7A) de acordo com o descrito a seguir: durante os dois primeiros dias (H1-2), todos os animais receberam salina i.p. e foram colocados no CA para avaliação da atividade locomotora por 20 minutos. Essa fase foi chamada de habituação e foi necessária para eliminar os efeitos da novidade do ambiente na locomoção dos animais. Após essa fase, os animais foram submetidos a fase de sensibilização, a qual durou 13 dias (S1-13). Nessa fase os animais receberam etanol (2 g/kg, i.p.) ou salina (NaCl 0,9%, grupos controle, i.p.) diariamente após as quais foram imediatamente colocados no CA para avaliação comportamental durante 20 minutos. Duas horas antes de cada administração de etanol ou salina, os animais receberam N-AC (60 ou 120 mg/kg) ou veículo (NaCl 0,9%, grupos controle, i.p.). Durante a fase de habituação (H1-2) e os dias S1, S5, S9 e S13 da fase de sensibilização, a distância percorrida (em metros) pelos animais no CA foi medida por uma câmera conectada a um computador contendo o software de análise comportamental ANY-maze (Stoelting Co., Wood Dale, IL-EUA) (figura 6).

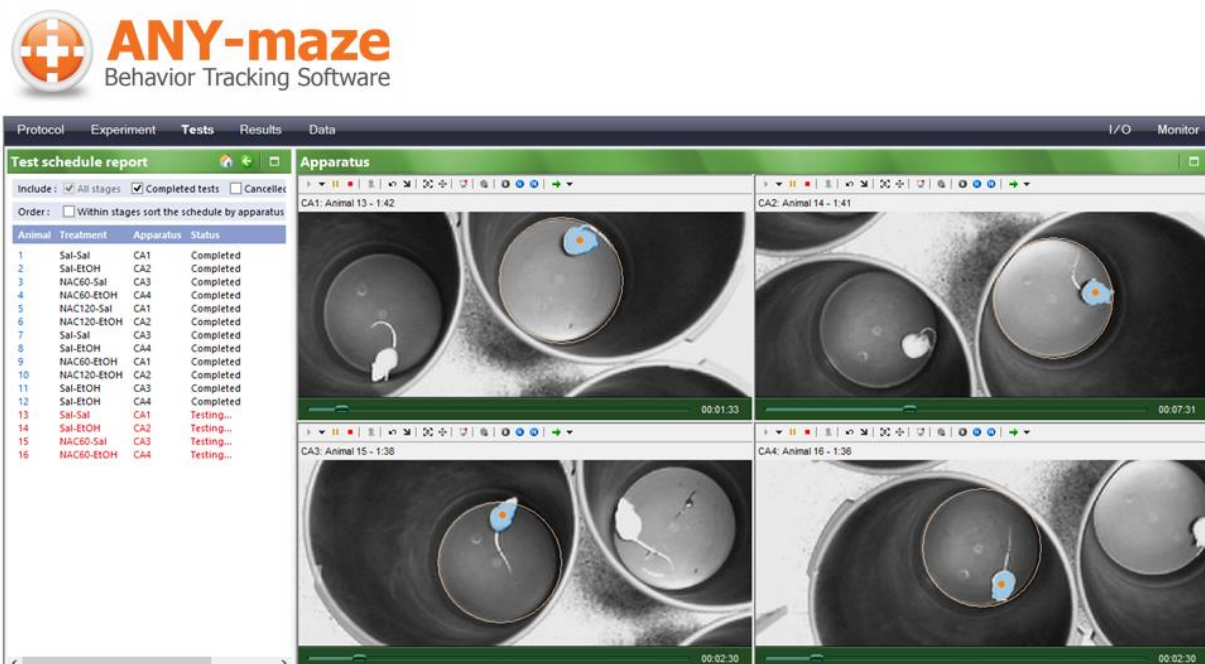


Figura 6. Tela representativa do software de análise comportamental ANY-maze. Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2016.

4.4. Dissecação das áreas encefálicas

Imediatamente após a última sessão de teste (S13), os animais foram decapitados e seus cérebros foram rapidamente removidos da caixa craniana (em

menos de 2 minutos), congelados em metil-butano sobre gelo-seco (-60°C) e mantidos a -80°C até a dissecação. Amostras de cerca de 1 mm de espessura das áreas encefálicas de interesse foram dissecadas em criostato a -20°C com auxílio de agulhas de ponta chata de 1,4 mm de diâmetro de acordo com o atlas de coordenadas estereotáxicas de PAXINOS; FRANKLIN, 2001 como segue: CPFm, face rostral, + 2,34 mm do Bregma; Acb, face rostral + 1,54 mm do Bregma; CPu, face rostral, + 1,10 mm do Bregma.

4.5. Western blotting

Após a dissecação, as amostras foram homogeneizadas em solução de 1% de dodecilsulfato de sódio (SDS) por meio de ondas de ultrassom e a concentração proteica foi determinada por meio do kit Bio-Rad DC protein assay (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA-EUA). Trinta microgramas de proteína de cada amostra foram fervidos por 5 minutos em tampão contendo 5% de β -mercaptoetanol e 0,002% de azul de bromofenol e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 9% por 1 h a 200 V utilizando o sistema Bio-Rad Mini-PROTEAN tetra cell com Bio-Rad Powerpac basic supply (Bio-Rad Laboratories Inc.). As proteínas foram transferidas eletroforicamente para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (LF-PVDF) utilizando o sistema Trans-Blot Turbo (Bio-Rad Laboratories Inc.).

As membranas foram incubadas em tampão de bloqueio contendo 5% de leite desnatado em T-TBS (0,05% de tween-20 em tampão fosfato salino) à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas 3 vezes e incubadas “overnight” a 4°C em T-TBS contendo os anticorpos primários contra FosB/ Δ FosB (1:500, No. Cat. 102: sc-48, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA-EUA, 37 kDa), ou xCT (1:1000, No. Cat. ab37185, Abcam inc., Cambridge, MA-EUA, 35 kDa). As membranas foram lavadas novamente e então incubadas em T-TBS contendo o anticorpo secundário anti-IgG de coelho Cy3 (1:2000, No. Cat. 28901107, GE Healthcare, Little Chalfont, BUX-ING). A fluorescência das bandas foram medidas diretamente na membrana seca usando o scanner TyphoonTrio[®] e quantificadas usando o software Image Quant TL (GE Healthcare). A quantidade de Δ FosB e xCT foram expressas como % em relação ao grupo controle (salina/salina).

A quantidade total de proteínas nas membranas foi quantificada por meio da coloração com Azul de Coomassie para controle da quantidade de amostra nas membranas.

Duas informações são relevantes e merecem ser esclarecidas. Primeiramente, a detecção do xCT foi feita em um peso molecular diferente do informado pelo fabricante (55 kDa). O uso de tecido cerebral adulto e a adição de β -mercaptoetanol altera a banda encontrada para o peso molecular de 35 kDa (SHIH *et al.*, 2006), que foi utilizado neste trabalho para quantificação do xCT. Finalmente, o anticorpo utilizado para detectar Δ FosB também se liga a proteína FosB. Entretanto, o tempo utilizado após os tratamentos para a remoção dos encéfalos (20 minutos após a administração de etanol) é pequeno para causar uma indução significativa da tradução proteica, incluindo FosB. Além disso, o splicing que ocorre no mRNA do gene FosB origina uma proteína mais leve, sendo a Δ FosB detectada na altura de 35-37 kDa e a FosB a 42 kDa (KOVÁCS, 1998; NESTLER; BARROT; SELF, 2001). Em nosso estudo, apenas a proteína detectada na altura de 37 kDa foi quantificada. Assim, nossa quantificação foi específica para Δ FosB.

4.6. Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando-se o software Statistica 13 (Dell Inc., Round Rock, TX-EUA) e os gráficos utilizando-se o software GraphPad Prism 5 (GraphPad software Inc., La Jolla, CA-EUA). Todos os valores foram expressos como média + EPM. Os dados referentes as fases de habituação e sensibilização do protocolo de sensibilização comportamental foram analisados por análise de variância (ANOVA) de três vias considerando os fatores etanol (etanol X salina), tratamento (N-AC x veículo) e o fator de medida repetida dias (H1 X H2 ou S1 X S5 X S9 X S13). Os dados do western Blotting foram analisados por ANOVA de duas vias considerando os fatores etanol e tratamento. Nos casos em que a ANOVA mostrou resultados significantes ($p \leq 0,05$), o teste *post hoc* de Duncan foi realizado.

5. RESULTADOS

A habituação à novidade do CA foi observada no segundo dia de experimento, como mostrado pela diminuição da atividade locomotora dos animais no dia H2 em relação ao dia H1 (figura 7B). A ANOVA de três vias mostrou efeito significativo do fator dias ($F_{1,54} = 68,68$, $p < 0,001$). Assim, os animais estavam habituados ao CA antes do início da fase de sensibilização.

O tratamento com a N-AC e a administração de etanol alteraram a atividade locomotora dos camundongos (figura 7B). A ANOVA de três vias mostrou efeito significativo do fator etanol ($F_{1,54} = 25,91$, $p < 0,001$), fator tratamento ($F_{2,54} = 5,41$, $p < 0,01$), fator dias ($F_{3,162} = 8,10$, $p < 0,001$) e da interação entre os fatores etanol e tratamento ($F_{2,54} = 3,39$, $p < 0,05$), etanol e dias ($F_{3,162} = 2,61$, $p < 0,05$) e entre todos os fatores ($F_{6,162} = 2,39$, $p < 0,05$). O teste *post hoc* de Duncan revelou que os camundongos do grupo veículo/etanol apresentaram aumento da distância percorrida no CA após a administração aguda de etanol quando comparados com o grupo veículo/salina (dia S1, $p < 0,05$).

O tratamento com a N-AC foi efetivo em bloquear a psicoestimulação induzida pelo etanol após uma dose aguda de etanol. O grupo N-AC 120 mg/kg/etanol não mostrou aumento da atividade locomotora após uma administração aguda de etanol quando comparado ao grupo veículo/salina (dia S1, $p = 0,39$), enquanto o grupo N-AC 60 mg/kg/etanol mostrou uma tendência em aumentar sua atividade locomotora quando comparado ao grupo veículo/salina (dia S1, $p = 0,09$). O tratamento com a N-AC em ambas as doses não alterou a atividade locomotora dos animais por si (seguida de uma injeção de salina) em nenhum dos dias da fase de sensibilização (dias S1, S5, S9 e S13, $p < 0,1$ quando comparados ao grupo veículo/salina).

Os grupos veículo/etanol e N-AC 60 mg/kg/etanol apresentaram o desenvolvimento da sensibilização comportamental ao etanol. O grupo veículo/etanol mostrou aumento da atividade locomotora nos dias S5, S9 e S13 em relação a sua locomoção no dia S1 (S1 X S5, $p \leq 0,05$; S1 X S9, $p < 0,05$; S1 X S13, $p \leq 0,001$). O grupo N-AC 60 mg/kg/etanol mostrou aumento da atividade locomotora nos dias S5, S9 e S13 em relação a sua locomoção no dia S1 (S1 x S5, $p \leq 0,001$; S1 x S9, $p < 0,001$; S1 x S13, $p < 0,05$). O grupo N-AC 120 mg/kg/etanol não desenvolveu a sensibilização comportamental, como mostrado pela sua locomoção

similar nos dias S1, S5, S9 e S13 (S1 x S5, $p = 0,70$; S1 x S9, $p = 0,48$; S1 x S13, $p = 0,61$), mostrando que o tratamento com a N-AC na dose de 120 mg/kg bloqueou o desenvolvimento da sensibilização comportamental ao etanol.

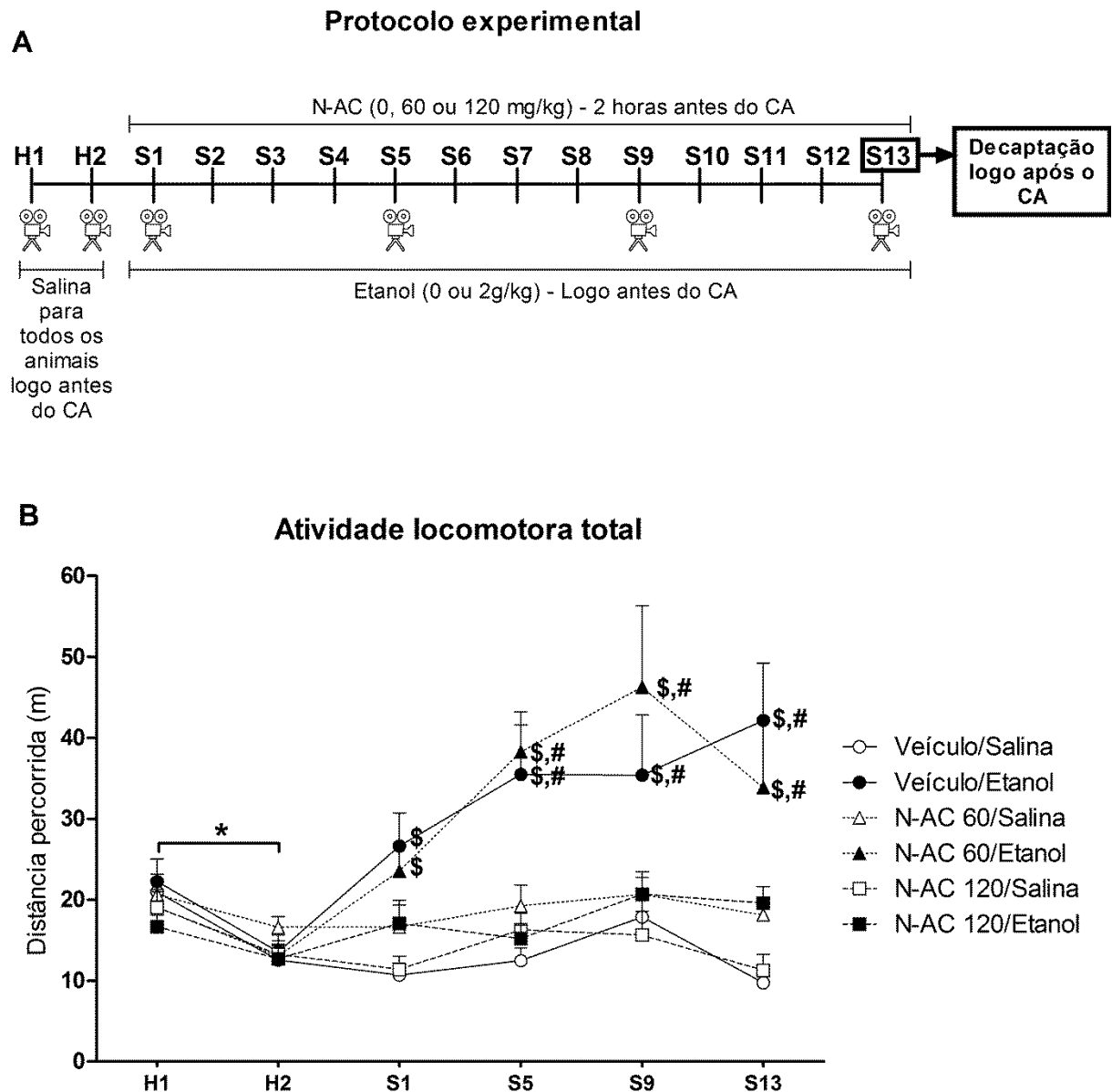


Figura 7. Representação gráfica do protocolo experimental e sensibilização locomotora ao etanol. **A**, representação gráfica do protocolo experimental. Os animais foram submetidos ao protocolo de sensibilização comportamental por 15 dias e a atividade locomotora foi avaliada nos dias marcados com o desenho da câmera. Duas horas antes da administração de etanol (2 g/kg) na fase de sensibilização (S1-13), os animais receberam uma administração de N-AC (60 ou 120 mg/kg) ou veículo. H1-2, dias de habituação; S1-13, dias de sensibilização; CA, campo aberto; N-AC, N-acetilcisteína. **B**, efeito do tratamento com a N-AC na sensibilização comportamental ao etanol. Os pontos representam a média + EPM da distância percorrida no aparato (N = 10 animais/grupo). *, $p < 0,05$ quando comparados H1 X H2; \$, $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo/salina; #, $p < 0,05$ em relação a distância percorrida pelo mesmo grupo no dia S1. Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Considerando que apenas o tratamento com a N-AC na maior dose bloqueou o desenvolvimento da sensibilização comportamental ao etanol, os grupos que receberam N-AC na dose de 60 mg/kg não foram utilizados no western blotting.

A análise por western blotting mostrou que no CPFm, o tratamento com a N-AC bloqueou o aumento no conteúdo de Δ FosB induzido pelo etanol (figura 8). A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do fator etanol ($F_{1,25} = 5,92$, $p < 0,05$) e do fator tratamento ($F_{1,25} = 5,28$, $p < 0,05$). O teste *post hoc* de Duncan revelou que o grupo veículo/etanol mostrou um aumento do conteúdo de Δ FosB em relação aos grupos veículo/salina ($p < 0,05$), N-AC/salina ($p < 0,01$) e N-AC/etanol ($p < 0,05$). Não foram encontradas alterações significativas nos grupos N-AC/salina ($p = 0,46$) e N-AC/etanol ($p = 0,92$) em relação ao grupo veículo/salina. O conteúdo de xCT no CPFm não foi significativamente alterado em nenhum dos grupos experimentais (figura 8).

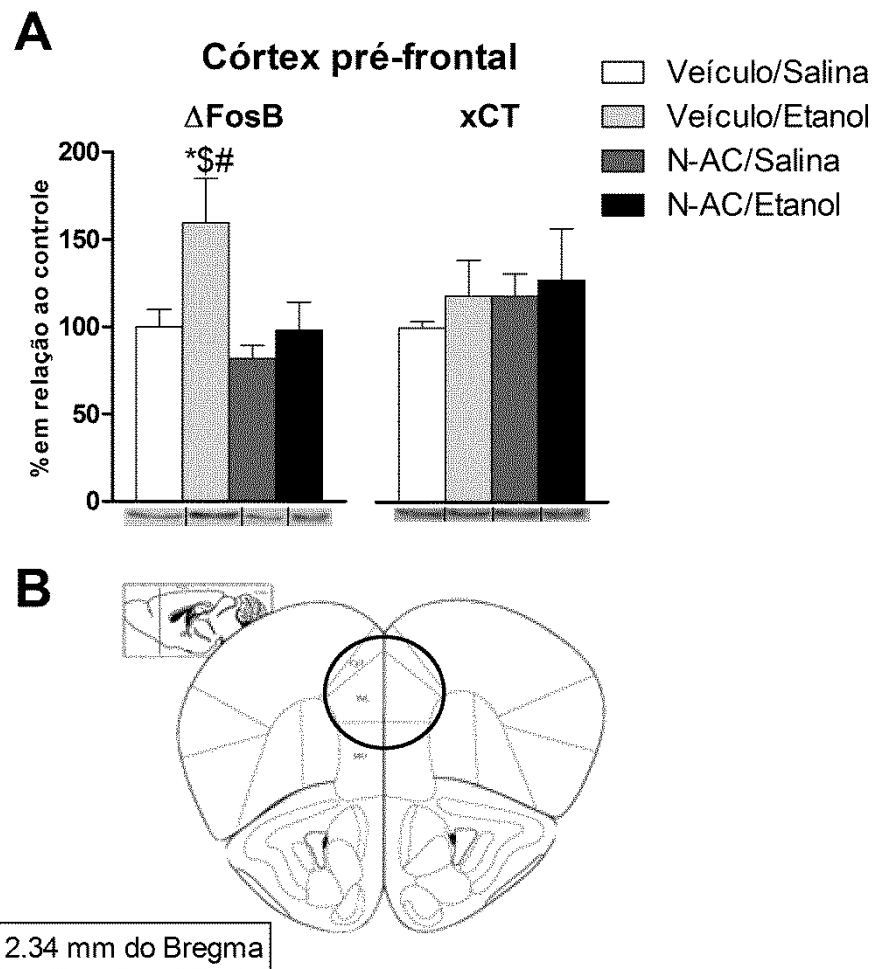


Figura 8. Efeito do tratamento com a N-AC na expressão de Δ FosB e do xCT no córtex pré-frontal medial (CPFm). Vinte minutos após a última administração de etanol no protocolo de sensibilização comportamental, os animais foram decapitados e o CPFm foi removido para análise por western blotting. A, quantificação das proteínas Δ FosB e xCT. As barras representam a média + EPM do percentual de expressão de cada proteína em relação ao grupo veículo/salina ($n = 7-9$ animais/grupo). N-AC, n-acetilcisteína; xCT, trocador cistina-glutamato; *, $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo/salina; #, $p < 0,05$ em relação ao grupo N-AC/etanol. B, secção coronal da região de extração do CPFm para western blotting de acordo com o atlas de coordenadas estereotáticas de Paxinos e Franklin (2001). O círculo preto representa o sítio de extração. Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

No Acb, o tratamento com a N-AC bloqueou a diminuição do conteúdo de Δ FosB induzido pelo etanol (figura 9). A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo da interação entre os fatores etanol e tratamento ($F_{1,29} = 5,36$, $p < 0,05$). O grupo veículo/etanol mostrou uma diminuição na quantidade de Δ FosB em relação ao grupo veículo/salina ($p < 0,05$), sem mostrar nenhuma alteração significativa quando comparado aos grupos N-AC/salina ($p = 0,77$) e N-AC/etanol ($p = 0,23$). Não foram encontradas diferenças significativas nos grupos N-AC salina ($p = 0,07$) e N-

AC/etanol ($p = 0,36$) em relação ao grupo veículo/salina. O conteúdo de xCT no Acb não foi significativamente alterado em nenhum dos grupos experimentais (figura 9).

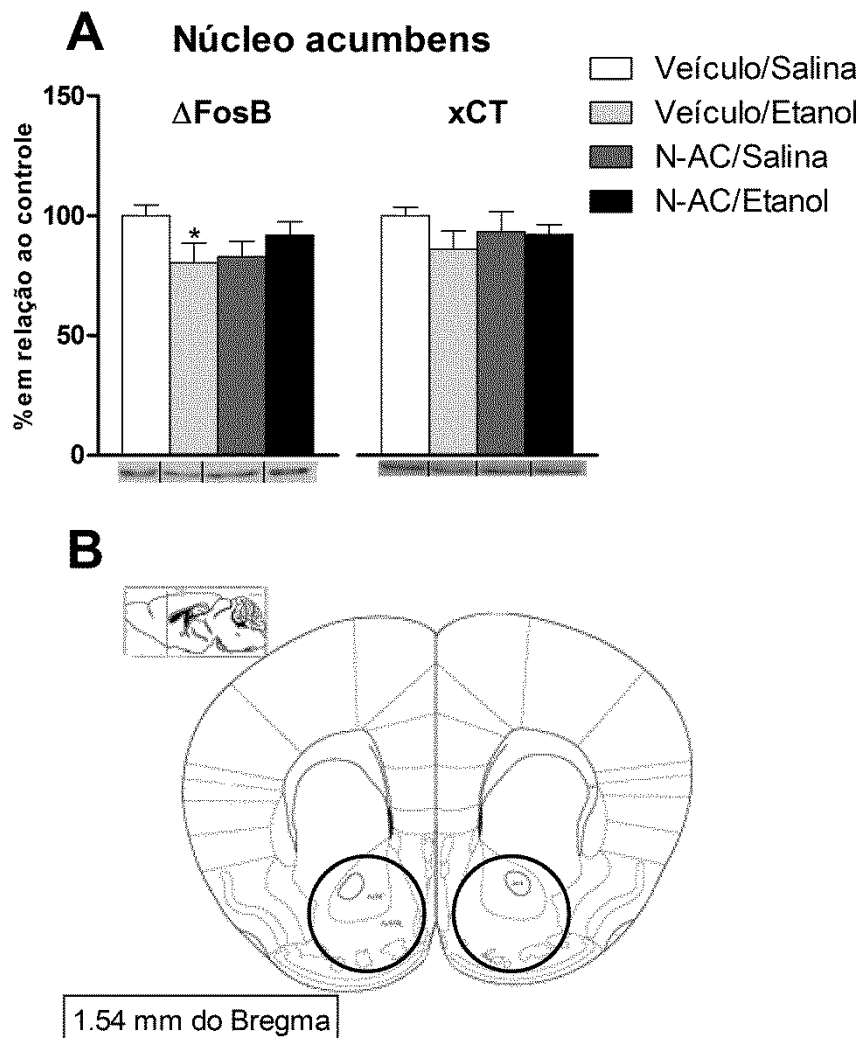


Figura 9. Efeito do tratamento com a N-AC na expressão de Δ FosB e do xCT no núcleo acumbens (Acb). Vinte minutos após a última administração de etanol no protocolo de sensibilização comportamental, os animais foram decapitados e o Acb foi removido para análise por western blotting. A, quantificação das proteínas Δ FosB e xCT. As barras representam a média + EPM do percentual de expressão de cada proteína em relação ao grupo veículo/salina ($n = 7-9$ animais/grupo). N-AC, n-acetilcisteína; xCT, trocador cistina-glutamato; *, $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo/salina. B, secção coronal da região de extração do Acb para western blotting de acordo com o atlas de coordenadas estereotáxicas de Paxinos e Franklin (2001). O círculo preto representa o sítio de extração. Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Todos os grupos experimentais apresentaram uma diminuição no conteúdo de Δ FosB no CPu em relação ao grupo veículo/salina (figura 10). A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo do fator etanol ($F_{1,28} = 6,97$, $p < 0,01$)

e uma tendência de efeito da interação entre os fatores etanol e tratamento ($F_{1,28} = 3,21$, $p = 0,08$). O teste *post hoc* mostrou que os grupos veículo/etanol ($p < 0,01$), N-AC/salina ($p < 0,05$) e N-AC/etanol ($p < 0,01$) apresentaram uma diminuição do conteúdo de Δ FosB em relação ao grupo veículo/salina. Em relação ao conteúdo de xCT no CPu, a ANOVA de duas vias mostrou uma tendência de efeito do fator etanol ($F_{1,29} = 3,78$, $p = 0,06$) em induzir uma diminuição no conteúdo de xCT nos grupos tratados com etanol (figura 10).

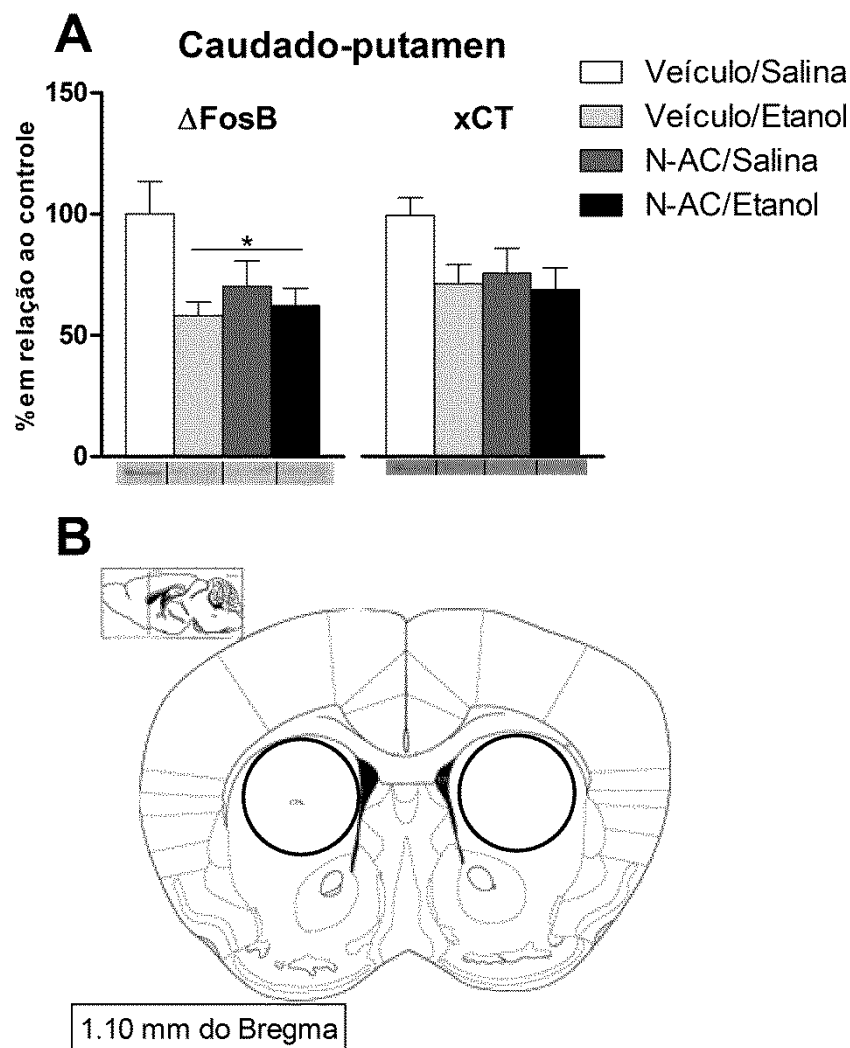


Figura 10. Efeito do tratamento com a N-AC na expressão de Δ FosB e do xCT no núcleo caudado-putamen (CPu). Vinte minutos após a última administração de etanol no protocolo de sensibilização comportamental, os animais foram decapitados e o CPu foi removido para análise por western blotting. A, quantificação das proteínas Δ FosB e xCT. As barras representam a média + EPM do percentual de expressão de cada proteína em relação ao grupo veículo/salina ($n = 7-9$ animais/grupo). N-AC, n-acetilcisteína; xCT, trocador cistina-glutamato; *, $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo/salina. B, secção coronal da região de extração do CPu para western blotting de acordo

com o atlas de coordenadas estereotáticas de Paxinos e Franklin (2001). O círculo preto representa o sítio de extração. Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

6. DISCUSSÃO

Nossos resultados sugerem um possível uso da N-AC nas doenças relacionadas ao uso de etanol. O tratamento com a N-AC bloqueou o desenvolvimento da sensibilização comportamental ao etanol e as alterações moleculares relacionadas, em duas importantes áreas encefálicas intrinsecamente relacionadas à dependência: o CPFm e o Acb.

Como postulado pela teoria da sensibilização do incentivo (ROBINSON, T E; BERRIDGE, 1993), a sensibilização comportamental é um modelo bastante útil para o estudo das neuroadaptações relacionadas à fissura e a recaída, fatores importantíssimos na manutenção da dependência. Essas neuroadaptações aparecem apenas em indivíduos susceptíveis mediante a exposição crônica à drogas de abuso e levam às principais características da dependência: a perda do controle do uso da droga e a continuação do seu uso apesar das características aversivas (ROBINSON, TERRY E; BERRIDGE, 2008). Em conformidade com essa teoria, animais sensibilizados apresentam aumento do consumo de etanol (ABRAHAO *et al.*, 2013; LESSOV *et al.*, 2001) e aumento da taxa de deflagração de potencial de ação basal dos neurônios dopaminérgicos (DIDONE *et al.*, 2015).

A administração crônica de etanol em nosso estudo induziu o acúmulo de Δ FosB no CPFm e a sensibilização comportamental. A sensibilização comportamental a cocaína (BRENHOUSE; STELLAR, 2006), opióides (KAPLAN *et al.*, 2011), metanfetamina (MCDAID; GRAHAM; NAPIER, 2006) e até mesmo para a depleção de sódio (HURLEY *et al.*, 2014) também está relacionada ao acúmulo de FosB/ Δ FosB em diversas áreas encefálicas. Entretanto, nem sempre as alterações de FosB/ Δ FosB estão correlacionadas com as alterações comportamentais. Diferentes linhagens de camundongos possuem diferentes alterações de FosB/ Δ FosB para uma mesma resposta comportamental a anfetamina (CONVERSI *et al.*, 2011). Camundongos que apresentam sensibilização comportamental ao etanol não apresentam alterações na expressão de Δ FosB 18 horas após a última administração de etanol, apenas 5 dias após (DE PAULI *et al.*, 2014). Até onde sabemos, esse é o primeiro estudo que mostra correlação entre alterações em Δ FosB em animais sensibilizados ao etanol.

As alterações na via de sinalização envolvendo a Δ FosB encontradas no CPFm e no Acb podem ser as responsáveis pelas alterações comportamentais

induzidas pelo etanol. De fato, o aumento do consumo voluntário de etanol tem correlação com o acúmulo de FosB/ Δ FosB. O tratamento com Naltrexona bloqueia esse acúmulo e diminui o consumo voluntário de etanol (LI, J. *et al.*, 2010). De maneira similar, a eletroacupuntura diminui o consumo voluntário de etanol e bloqueia o acúmulo de FosB/ Δ FosB (LI, J.; SUN; YE, 2012). O agonista parcial dos receptores nicotínicos citisina modula o consumo de etanol e também a expressão de FosB/ Δ FosB (SAJJA; RAHMAN, 2013). O aumento da expressão de Δ FosB na idade adulta aumenta os efeitos locomotores e reforçadores da cocaína (COLBY *et al.*, 2003; KELZ *et al.*, 1999). Assim, alterações em FosB/ Δ FosB possivelmente possuem um papel nas alterações comportamentais induzidas por drogas de abuso e seu bloqueio previne essas alterações.

Apenas o CPFm mostrou acúmulo de Δ FosB após o tratamento com etanol. No Acb e no CPu, encontramos uma diminuição do conteúdo de Δ FosB nos animais do grupo veículo/etanol. Uma possível explicação pode ser encontrada na teoria dos engramas de memórias relacionada à dependência. Essa teoria, relativamente nova, diz que as associações aprendidas entre os efeitos da droga e o ambiente que cerca o usuário ocorrem apenas em uma minoria de neurônios em uma área encefálica relacionada ao estímulo da droga (CRUZ; JAVIER RUBIO; HOPE, 2014). Assim, sendo a sensibilização comportamental um processo dependente das associações entre a droga e o ambiente (KOYA *et al.*, 2009; MARIN *et al.*, 2009; MATTSON *et al.*, 2007; ZANCHETA *et al.*, 2012), apenas um pequeno número de neurônios são repetidamente ativados pela administração crônica de drogas de abuso. No nosso estudo, o uso da técnica de western blotting para avaliação do acúmulo de Δ FosB não nos permitiu a diferenciação dos neurônios ativados em relação aos não-ativados. A maioria dos estudos que encontraram acúmulo dessa molécula utilizaram a técnica de imunohistoquímica em cortes cerebrais ao invés do western blotting em homogenato do tecido inteiro, o que pode explicar os resultados contraditórios. De fato, utilizando a técnica de western blotting, os níveis de p-CREB, um marcador da ativação neuronal, no Acb, estão diminuídos em animais sensibilização à cocaína, enquanto utilizando a técnica de imunohistoquímica, um número aumentado de neurônios positivos para p-CREB é encontrado (MARIN *et al.*, 2009). Assim, nossa hipótese é que os efeitos depressores do etanol na maioria dos neurônios do Acb e CPu mascarou o acúmulo de Δ FosB na minoria dos neurônios relacionados à sensibilização comportamental.

No CPFm, o número de neurônios ativados provavelmente foi grande o suficiente para sobrepôr os efeitos depressores do etanol na maioria dos neurônios da área (PFARR *et al.*, 2015; WHITAKER *et al.*, 2015).

Alguns trabalhos sugerem um papel da hipoatividade do Acb na dependência à cocaína. Estudos clínicos e pré-clínicos demonstram uma atividade do Acb diminuída após a exposição repetida à cocaína. Essa exposição resulta em uma neuroplasticidade diferente em neurônios que recebem aferências excitatórias fortes em relação àqueles que recebem aferências fracas (PEOPLES, L. L.; KRAVITZ; GUILLEM, 2007). Apesar da contribuição dessa hipoatividade ainda não estar completamente esclarecida, ela pode ser um fator importante na dependência e no desenvolvimento da sensibilização comportamental em nosso estudo.

Independente da direção da alteração molecular (aumento ou diminuição), o tratamento com a N-AC bloqueou a alteração comportamental induzida pela exposição crônica ao etanol e a neuroadaptação na via de sinalização envolvendo a Δ FosB em duas regiões importantes em relação a dependência; o CPFm e o Acb. Esses resultados mostram que nosso tratamento possivelmente preveniu a sensibilização comportamental ao etanol através da prevenção das neuroadaptações maladaptativas que ocorrem nessas regiões cerebrais.

Os efeitos da N-AC se dão, possivelmente, por meio da restauração do tônus glutamatérgico nos receptores metabotrópicos de glutamato, especialmente o mGluR2/3, no Acb. Primeiramente, a exposição crônica ao etanol aumenta os níveis extracelulares de glutamato após sua retirada em diversas áreas encefálicas envolvidas na dependência (DING *et al.*, 2013; HERMANN *et al.*, 2012; MELENDEZ *et al.*, 2005). Uma nova dose de etanol em animais que apresentam sensibilização comportamental causa uma diminuição do glutamato extracelular no Acb (CARRARA-NASCIMENTO *et al.*, 2011). O número de astrócitos, células importantes na captação do glutamato no SNC é aumentado no Acb de ratos após a administração repetida de cocaína (BOWERS; KALIVAS, 2003) e etanol (BULL *et al.*, 2014), e diminuído no CPFm de uma linhagem de alta preferência ao etanol – os *P rats* (do inglês, *ethanol-preferring rats*) (MIGUEL-HIDALGO, 2005). No hipocampo de alcoolistas diversos genes que codificam subunidades de receptores glutamatérgicos se encontram alterados em relação a indivíduos saudáveis (ENOCH *et al.*, 2014). Animais sensibilizados ao etanol apresentam alteração na plasticidade sináptica dependente dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos NMDA

(ABRAHAO *et al.*, 2013). A expressão dos transportadores de glutamato GLT-1 e xCT, proteínas importantes na manutenção do equilíbrio da neurotransmissão glutamatérgica, é diminuída em *P rats* após o consumo crônico de etanol. O tratamento com a CEF, que age restaurando a captação do glutamato, atenua o consumo de etanol e aumenta a expressão de GLT-1 e xCT (ALHADDAD; DAS; SARI, 2014). Nessa mesma linhagem de ratos, o tratamento crônico com a CEF, a ampicilina, a cefazolina, a cefoperazona e o composto sintético (R)-(-)-5-metil-1-nicotinoil-2-pirazolina aumentam a expressão de GLT-1 e xCT e previnem o aumento da ingestão de etanol (AAL-AABODA *et al.*, 2015; ALASMARI; ABUHAMDAH; SARI, 2015; RAO; SARI, 2014; RAO; GOODWANI; *et al.*, 2015). O tratamento com a CEF também bloqueia a sensibilização comportamental à anfetamina (RASMUSSEN; UNTERWALD; RAWLS, 2011) e à cocaína (TALLARIDA *et al.*, 2013). A N-AC reverte a plasticidade sináptica (MADAYAG *et al.*, 2007) e a potenciação sináptica induzidas pela cocaína, através da restauração do tônus mGluR2/3 (MOUSSAWI *et al.*, 2011).

O uso da L-cisteína (produto do metabolismo da N-AC) em estudos pré-clínicos também corrobora com nosso trabalho. Essa droga bloqueou a preferência condicionada por lugar ao etanol e ao acetaldeído (PEANA *et al.*, 2009), a autoadministração de etanol e a recaída ao seu uso (PEANA *et al.*, 2010), a liberação de dopamina no Acb induzida pelo etanol (SIRCA *et al.*, 2011) e a procura, recaída e neuroadaptações relacionadas induzidas pelo etanol (PEANA *et al.*, 2013). Nesses estudos, os autores também discutem a habilidade da L-cisteína como agente sequestrante do acetaldeído, outro possível efeito da N-AC.

A N-AC pode trazer outros benefícios para a saúde de indivíduos dependentes de etanol além do tratamento da dependência, o que pode aumentar a eficácia de um possível tratamento. A N-AC possui a propriedade de aumentar os níveis de glutatona no organismo (KERKSICK; WILLOUGHBY, 2005), sendo assim um potente antioxidante (RUSHWORTH; MEGSON, 2014). O metabolismo do etanol aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio, o que, por sua vez, aumenta o estresse oxidativo, levando a inúmeros danos ao organismo, especialmente considerando-se o consumo dessa droga de modo crônico (DAS, S. K.; VASUDEVAN, 2007). Diversas doenças relacionadas ao uso de etanol tem sua etiologia relacionada ao estresse oxidativo causado pelo seu metabolismo (ALBANO, 2006; BLOCK, 2002). O tratamento com a N-AC protege contra a úlcera

gástrica induzida pelo etanol em camundongos (JACCOB, 2015). O estresse oxidativo e a oxidação do LDL (do inglês, *low density lipoprotein*) causados pelo consumo crônico de etanol são inibidos pela N-AC (OZARAS *et al.*, 2003; SEIVA; AMAUCHI; ROCHA; SOUZA; *et al.*, 2009). O alcoolismo é um fator de risco para a síndrome da insuficiência respiratória aguda, doença caracterizada por uma inflamação generalizada dos pulmões (KAPHALIA; CALHOUN, 2013). O etanol aumenta a apoptose das células alveolares, assim como diminui a fagocitose dos macrófagos alveolares, aumentando o risco de infecções e inflamações pulmonares. O tratamento com N-AC reverte esses efeitos do consumo crônico de etanol (BROWN, L. A. S.; HARRIS; GUIDOT, 2001; BROWN, L. A. S. *et al.*, 2001; TANG *et al.*, 2009). No fígado, a N-AC diminui o estresse oxidativo induzido pelo etanol e o aumento da produção da citocina pró-inflamatória TNF- α (do inglês, *tumor necrosis factor alpha*), importantes fatores na progressão da doença alcoólica hepática (CARO *et al.*, 2014; HILL *et al.*, 1999). A teratogênese induzida pelo consumo materno de etanol durante a gravidez é diminuída pela N-AC (PARNELL *et al.*, 2010). O consumo exagerado de etanol leva a um aumento do risco de desenvolvimento de diversas doenças cardiovasculares (WALKER *et al.*, 2013). O tratamento com a N-AC diminui a lipotoxicidade, o aumento do gasto energético e o estresse oxidativo no miocárdio induzidos pelo etanol (SEIVA; AMAUCHI; ROCHA; EBAID; *et al.*, 2009). Vale ressaltar que nem todos os efeitos nocivos do etanol no organismo são revertidos pela N-AC. O tratamento com esse pró-fármaco não impede o estabelecimento da resistência hepática à insulina induzida pelo etanol (SETSHEDI *et al.*, 2011).

Aparentemente, são necessários períodos prolongados de exposição ao etanol para que alterações na expressão do xCT ocorram. Alguns autores encontraram diminuição da expressão de xCT após pelo menos 3 semanas de exposição crônica ao etanol (ALHADDAD; DAS; SARI, 2014; PEANA; MUGGIRONI; BENNARDINI, 2014). Em nosso estudo não encontramos alterações no conteúdo de xCT, provavelmente devido ao período relativamente curto (menos de duas semanas) de exposição ao etanol.

Trabalhos recentes tem focado no equilíbrio glutamatérgico como alvo no tratamento da dependência ao etanol. Resultados pré-clínicos promissores tem sido encontrados utilizando-se principalmente antibióticos que também possuem atuação na captação do glutamato como possíveis tratamentos contra o alcoolismo.

Apesar de promissor, o uso clínico de antibióticos é perigoso devido a seleção de cepas bacterianas resistentes (WANG; CHOU, 2013). Por outro lado, a N-AC é uma droga segura e bem tolerada, comumente utilizada desde 1978. Assim, os resultados positivos aqui encontrados apoiam estudos futuros que avaliem o uso da N-AC no tratamento da dependência ao etanol.

.

7. CONCLUSÃO

A administração crônica de etanol induziu a sensibilização comportamental ao etanol e a plasticidade neuronal em regiões encefálicas relacionadas à relevância motivacional, planejamento e ponderação das consequências de um determinado comportamento e formação de hábito. O tratamento com a N-AC impediu o desenvolvimento da plasticidade neural no CPFm e Acb e o da sensibilização comportamental ao etanol, provavelmente por meio da manutenção do equilíbrio entre o glutamato sináptico e extrasináptico nessas duas regiões. Assim, podemos concluir que o desequilíbrio da sinapse glutamatérgica é um importante fator no desenvolvimento das alterações comportamentais e neurais relacionadas à dependência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAL-AABODA, M. *et al.* Effects of (R)-(-)-5-methyl-1-nicotinoyl-2-pyrazoline on glutamate transporter 1 and cysteine/glutamate exchanger as well as ethanol drinking behavior in male, alcohol-preferring rats. **Journal of Neuroscience Research**, v. 93, n. 6, p. 930–937, 2015.

ABRAHAO, K. P. *et al.* Locomotor Sensitization to Ethanol Impairs NMDA Receptor-Dependent Synaptic Plasticity in the Nucleus Accumbens and Increases Ethanol Self-Administration. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 11, p. 4834–4842, 2013.

ADINOFF, B. Neurobiologic Processes in Drug Reward and Addiction. **Harvard Review of Psychiatry**, v. 12, n. 6, p. 305–320, 2004.

ALASMARI, F.; ABUHAMDAH, S.; SARI, Y. Effects of ampicillin on cystine/glutamate antiporter and glutamate transporter 1 isoforms as well as ethanol drinking in male P rats. **Neuroscience Letters**, v. 600, p. 148–152, 2015.

ALBANO, E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 65, n. 03, p. 278–290, 2006.

ALHADDAD, H.; DAS, S. C.; SARI, Y. Effects of ceftriaxone on ethanol intake: a possible role for xCT and GLT-1 isoforms modulation of glutamate levels in P rats. **Psychopharmacology**, v. 231, n. 20, p. 4049–4057, 2014.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revision (DSM-IV-TR)**. Arlington: American Psychiatric Association, 2000.

ANDRADE, A. G. DE; ANTHONY, J. C.; SILVEIRA, C. M. **Álcool e suas conseqüências: uma abordagem multiconceitual**. 1^a edição. Barueri: Minha Editora, 2009.

ANG, E. *et al.* Induction of nuclear factor-κB in nucleus accumbens by chronic cocaine administration. **Journal of Neurochemistry**, v. 79, n. 1, p. 221–224, 2008.

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

ARIZZI-LAFRANCE, M. N. *et al.* Motor stimulant effects of ethanol injected into the substantia nigra pars reticulata: importance of catalase-mediated metabolism and the

role of acetaldehyde. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 5, p. 997–1008, 2006.

ASANUMA, M.; CADET, J. L. Methamphetamine-induced increase in striatal NF- κ B DNA-binding activity is attenuated in superoxide dismutase transgenic mice. **Molecular Brain Research**, v. 60, n. 2, p. 305–309, 1998.

BAHI, A.; DREYER, J. Involvement of nucleus accumbens dopamine D1 receptors in ethanol drinking, ethanol-induced conditioned place preference, and ethanol-induced psychomotor sensitization in mice. **Psychopharmacology**, v. 222, n. 1, p. 141–53, 2012.

BAKER, D. A. *et al.* Neuroadaptations in cystine-glutamate exchange underlie cocaine relapse. **Nature neuroscience**, v. 6, n. 7, p. 743–9, 2003.

BALTIERI, D. A. *et al.* Comparing topiramate with naltrexone in the treatment of alcohol dependence*. **Addiction**, v. 103, n. 12, p. 2035–2044, 2008.

BARRÓS-LOSCERTALES, A. *et al.* Reduced striatal volume in cocaine-dependent patients. **NeuroImage**, v. 56, n. 3, p. 1021–1026, 2011.

BECHARA, A. *et al.* Decision-making deficits, linked to a dysfunctional ventromedial prefrontal cortex, revealed in alcohol and stimulant abusers. **Neuropsychologia**, v. 39, n. 4, p. 376–389, 2001.

BEGLEITER, H.; KISSIN, B. **The Pharmacology of Alcohol and Alcohol Dependence**. 1. ed. Oxford: Oxford University Press, 1996.

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

BERK, M. *et al.* The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. **Trends in pharmacological sciences**, v. 34, n. 3, p. 167–77, 2013.

BERRIDGE, K. C.; ROBINSON, T. E.; ALDRIDGE, J. W. Dissecting components of reward: “liking”, “wanting”, and learning. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 1, p. 65–73, 2009.

BIBB, J. A. *et al.* Effects of chronic exposure to cocaine are regulated by the neuronal protein Cdk5. **Nature**, v. 410, n. 6826, p. 376–380, 2001.

BLANCO, E. *et al.* Cocaine-Induced Behavioral Sensitization Is Associated With

Changes in the Expression of Endocannabinoid and Glutamatergic Signaling Systems in the Mouse Prefrontal Cortex. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 1, p. pyu024–pyu024, 2015.

BLEDNOV, Y. A.; ADRON HARRIS, R. Metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) regulation of ethanol sedation, dependence and consumption: relationship to acamprosate actions. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 11, n. 06, p. 775–93, 2008.

BLOCK, G. Factors Associated with Oxidative Stress in Human Populations. **American Journal of Epidemiology**, v. 156, n. 3, p. 274–285, 2002.

BOTIA, B. *et al.* Expression of Ethanol-Induced Behavioral Sensitization Is Associated with Alteration of Chromatin Remodeling in Mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e47527, 2012.

BOWERS, M. S.; KALIVAS, P. W. Forebrain astroglial plasticity is induced following withdrawal from repeated cocaine administration. **European Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 6, p. 1273–1278, 2003.

BRENHOUSE, H. C.; STELLAR, J. R. c-Fos and Δ FosB expression are differentially altered in distinct subregions of the nucleus accumbens shell in cocaine-sensitized rats. **Neuroscience**, v. 137, n. 3, p. 773–780, 2006.

BROWN, L. A. S. *et al.* Effect of Chronic Ethanol Ingestion on Alveolar Type II Cell: Glutathione and Inflammatory Mediator-Induced Apoptosis. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 25, n. 7, p. 1078–1085, 2001.

BROWN, L. A. S.; HARRIS, F. L.; GUIDOT, D. M. Chronic ethanol ingestion potentiates TNF- α -mediated oxidative stress and apoptosis in rat type II cells. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 281, n. 2, p. L377–86, 2001.

BROWN, R. M.; KUPCHIK, Y. M.; KALIVAS, P. W. The Story of Glutamate in Drug Addiction and of N -Acetylcysteine as a Potential Pharmacotherapy. **JAMA Psychiatry**, v. 70, n. 9, p. 895, 2013.

BULL, C. *et al.* Rat Nucleus Accumbens Core Astrocytes Modulate Reward and the Motivation to Self-Administer Ethanol after Abstinence. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 12, p. 2835–2845, 2014.

CARO, A. A. *et al.* N -Acetylcysteine Inhibits the Up-Regulation of Mitochondrial

Biogenesis Genes in Livers From Rats Fed Ethanol Chronically. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 38, n. 12, p. 2896–2906, 2014.

CARRARA-NASCIMENTO, P. F. *et al.* Changes in extracellular levels of glutamate in the nucleus accumbens after ethanol-induced behavioral sensitization in adolescent and adult mice. **Alcohol**, v. 45, n. 5, p. 451–460, 2011.

COLBY, C. R. *et al.* Striatal cell type-specific overexpression of DeltaFosB enhances incentive for cocaine. **The Journal of neuroscience**, v. 23, n. 6, p. 2488–93, 2003.

CONVERSI, D. *et al.* Association between striatal accumulation of FosB/ Δ FosB and long-term psychomotor sensitization to amphetamine in mice depends on the genetic background. **Behavioural Brain Research**, v. 217, n. 1, p. 155–164, 2011.

CORREA, M. *et al.* Open field locomotor effects in rats after intraventricular injections of ethanol and the ethanol metabolites acetaldehyde and acetate. **Brain Research Bulletin**, v. 62, n. 3, p. 197–202, 2003.

CRUZ, F. C.; JAVIER RUBIO, F.; HOPE, B. T. Using c-fos to study neuronal ensembles in corticostriatal circuitry of addiction. **Brain Research**, v. 1628, p. 157–173, 2014.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology**, v. 65, n. 1, p. 1–105, 2001.

DAS, D. *et al.* Lifetime cigarette smoking is associated with striatal volume measures. **Addiction Biology**, v. 17, n. 4, p. 817–825, 2012.

DAS, S. K.; VASUDEVAN, D. M. Alcohol-induced oxidative stress. **Life Sciences**, v. 81, n. 3, p. 177–187, 2007.

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

DEAN, O.; GIORLANDO, F.; BERK, M. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v. 36, n. 2, p. 78–86, 2011.

DEEHAN, G. A.; BRODIE, M. S.; RODD, Z. A. What is in that Drink: The Biological Actions of Ethanol, Acetaldehyde, and Salsolinol. In: SOMMER, W. H.; SPANAGEL,

R. (Org.). . *Behavioral Neurobiology of Alcohol Addiction*. 1. ed. Berlin: Springer, 2011. p. 163–184.

DIDONE, V. *et al.* Correlation between ethanol behavioral sensitization and midbrain dopamine neuron reactivity to ethanol. **Addiction Biology**, 2015.

DING, Z.-M. *et al.* Alcohol drinking and deprivation alter basal extracellular glutamate concentrations and clearance in the mesolimbic system of alcohol-preferring (P) rats. **Addiction biology**, v. 18, n. 2, p. 297–306, 2013.

ENOCH, M.-A. *et al.* Expression of glutamatergic genes in healthy humans across 16 brain regions; altered expression in the hippocampus after chronic exposure to alcohol or cocaine. **Genes, brain, and behavior**, v. 13, n. 8, p. 758–68, 2014.

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

FADDA, F.; ROSSETTI, Z. L. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. **Progress in neurobiology**, v. 56, n. 4, p. 385–431, 1998.

FAROOK, J. M. *et al.* Effects of mecamylamine on alcohol consumption and preference in male C57BL/6J mice. **Pharmacology**, v. 83, n. 6, p. 379–84, 2009.

FORMAN, S. D. *et al.* Opiate addicts lack error-dependent activation of rostral anterior cingulate. **Biological Psychiatry**, v. 55, n. 5, p. 531–537, 2004.

GALLASSI, A. D. *et al.* Custos dos problemas causados pelo abuso do álcool. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 35, n. SUPPL. 1, p. 25–30, 2008.

GARAVAN, H. *et al.* Cue-Induced Cocaine Craving: Neuroanatomical Specificity for Drug Users and Drug Stimuli. **American Journal of Psychiatry**, v. 157, n. 11, p. 1789–1798, 2000.

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

GIGLIOTTI, A.; BESSA, M. A. Síndrome de Dependência do Álcool: critérios diagnósticos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, n. Supl I, p. S11–3, 2004.

GILMAN, J. M. *et al.* Cannabis Use Is Quantitatively Associated with Nucleus Accumbens and Amygdala Abnormalities in Young Adult Recreational Users.

Journal of Neuroscience, v. 34, n. 16, p. 5529–5538, 2014.

HERMANN, D. *et al.* Translational Magnetic Resonance Spectroscopy Reveals Excessive Central Glutamate Levels During Alcohol Withdrawal in Humans and Rats. **Biological Psychiatry**, v. 71, n. 11, p. 1015–1021, 2012.

HILL, D. B. *et al.* Antioxidants attenuate nuclear factor-kappa B activation and tumor necrosis factor-alpha production in alcoholic hepatitis patient monocytes and rat Kupffer cells, in vitro. **Clinical biochemistry**, v. 32, n. 7, p. 563–70, 1999.

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

HURLEY, S. W. *et al.* Sensitization of sodium appetite: evidence for sustained molecular changes in the lamina terminalis. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 307, n. 12, p. R1405–R1412, 2014.

JACCOB, A. Protective effect of N-Acetylcysteine against ethanol-induced gastric ulcer: a pharmacological assessment in mice. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 4, n. 2, p. 1, 2015.

KALIVAS, P. W. The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 8, p. 561–572, 2009.

KALIVAS, P. W.; VOLKOW, N. D. The Neural Basis of Addiction: A Pathology of Motivation and Choice. **American Journal of Psychiatry**, v. 162, n. 8, p. 1403–1413, 2005.

KAPHALIA, L.; CALHOUN, W. J. Alcoholic lung injury: Metabolic, biochemical and immunological aspects. **Toxicology Letters**, v. 222, n. 2, p. 171–179, 2013.

KAPLAN, G. B. *et al.* Opiate sensitization induces FosB/ Δ FosB expression in prefrontal cortical, striatal and amygdala brain regions. **PLoS one**, v. 6, n. 8, p. e23574, 2011.

KARASOV, A. O.; OSTACHER, M. J. Alcohol and the law. In: SULLIVAN, E. V.; PFEFFERBAUM, A. (Org.). . *Alcohol and the Nervous System*. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2014. v. 125. p. 649–657.

KARILA, L. *et al.* New treatments for cocaine dependence: a focused review. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 11, n. 03, p. 425–38,

2008.

KAUFMAN, J. N. *et al.* Cingulate hypoactivity in cocaine users during a GO-NOGO task as revealed by event-related functional magnetic resonance imaging. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 21, p. 7839–43, 2003.

KELLER, M. A historical overview of alcohol and alcoholism. **Cancer research**, v. 39, n. 7 Pt 2, p. 2822–9, 1979.

KELZ, M. B. *et al.* Expression of the transcription factor [Delta]FosB in the brain controls sensitivity to cocaine. **Nature**, v. 401, n. 6750, p. 272–276, 1999.

KERKSICK, C.; WILLOUGHBY, D. The Antioxidant Role of Glutathione and N-Acetyl-Cysteine Supplements and Exercise-Induced Oxidative Stress. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 38, 2005.

KNACKSTEDT, L. A. *et al.* The role of cystine-glutamate exchange in nicotine dependence in rats and humans. **Biological psychiatry**, v. 65, n. 10, p. 841–5, 2009.

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

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurocircuitry of Addiction. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 217–238, 2010.

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

KOYA, E. *et al.* Targeted disruption of cocaine-activated nucleus accumbens neurons prevents context-specific sensitization. **Nature Neuroscience**, v. 12, n. 8, p. 1069–1073, 2009.

KRYSTAL, J. H. *et al.* Altered NMDA Glutamate Receptor Antagonist Response in Recovering Ethanol-Dependent Patients. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 11, p. 2020–2028, 2003.

KUMAR, A. *et al.* Chromatin Remodeling Is a Key Mechanism Underlying Cocaine-Induced Plasticity in Striatum. **Neuron**, v. 48, n. 2, p. 303–314, 2005.

LARANJEIRA, R. (SUP). **II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD) -**

2012. São Paulo: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD), UNIFESP, 2014.

LAROWE, S. D. *et al.* Is cocaine desire reduced by N-acetylcysteine? **The American journal of psychiatry**, v. 164, n. 7, p. 1115–7, 2007.

LEGASTELOIS, R.; BOTIA, B.; NAASSILA, M. Blockade of Ethanol-Induced Behavioral Sensitization by Sodium Butyrate: Descriptive Analysis of Gene Regulations in the Striatum. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 37, n. 7, p. 1143–1153, 2013.

LESSOV, C. N. *et al.* Voluntary ethanol drinking in C57BL/6J and DBA/2J mice before and after sensitization to the locomotor stimulant effects of ethanol. **Psychopharmacology**, v. 155, n. 1, p. 91–99, 2001.

LI, H. *et al.* Methamphetamine Induces Dynamic Changes of Histone Deacetylases in Different Phases of Behavioral Sensitization. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 20, n. 9, p. 874–876, 2014.

LI, J. *et al.* Region-Specific Induction of FosB/ Δ FosB by Voluntary Alcohol Intake: Effects of Naltrexone. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 34, n. 10, p. 1742–1750, 2010.

LI, J.; SUN, Y.; YE, J.-H. Electroacupuncture Decreases Excessive Alcohol Consumption Involving Reduction of FosB/ Δ FosB Levels in Reward-Related Brain Regions. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40347, 2012.

LI, Q. *et al.* Craving correlates with mesolimbic responses to heroin-related cues in short-term abstinence from heroin: An event-related fMRI study. **Brain Research**, v. 1469, n. 2, p. 63–72, 2012.

LIAPPAS, J. A. *et al.* Alexander the Great's relationship with alcohol. **Addiction**, v. 98, n. 5, p. 561–7, 2003.

LOVINGER, D.; WHITE, G.; WEIGHT, F. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. **Science**, v. 243, n. 4899, p. 1721–1724, 1989.

MADAYAG, A. *et al.* Repeated N-Acetylcysteine Administration Alters Plasticity-Dependent Effects of Cocaine. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 51, p. 13968–13976, 2007.

MARIN, M. T. *et al.* Context-specific modulation of cocaine-induced locomotor

sensitization and ERK and CREB phosphorylation in the rat nucleus accumbens. **European Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 10, p. 1931–1940, 2009.

MATSUMOTO, H.; FUKUI, Y. Pharmacokinetics of ethanol: a review of the methodology. **Addiction biology**, v. 7, n. 1, p. 5–14, 2002.

MATTEDI, L. E. DA V. A embriaguez alcoólica e as suas conseqüências jurídico-penais. **Jus Navigandi**, v. 10, n. 714, p. 1–8, 2005.

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

MAXWELL, C. R. *et al.* Acetate Causes Alcohol Hangover Headache in Rats. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. e15963, 2010.

MCCLERNON, F. J. *et al.* 24-h smoking abstinence potentiates fMRI-BOLD activation to smoking cues in cerebral cortex and dorsal striatum. **Psychopharmacology**, v. 204, n. 1, p. 25–35, 2009.

MCD AID, J.; GRAHAM, M. P.; NAPIER, T. C. Methamphetamine-Induced Sensitization Differentially Alters pCREB and FosB throughout the Limbic Circuit of the Mammalian Brain. **Molecular Pharmacology**, v. 70, n. 6, p. 2064–2074, 2006.

MCGOVERN, P. E. **Ancient Wine: The Search for the Origins of Viniculture**. Princeton: Princeton University Press, 2003.

MCGOVERN, P. E. *et al.* Fermented beverages of pre- and proto-historic China. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 51, p. 17593–17598, 2004.

MCGOVERN, P. E.; FLEMING, S. J.; KATZ, S. H. **The Origins and the Ancient History of Wine: Food and Nutrition in History and Anthropology**. Amsterdam: Taylor & Francis, 1996.

MELLENDEZ, R. I. *et al.* Ethanol Exposure Decreases Glutamate Uptake in the Nucleus Accumbens. **Alcoholism: Clinical & Experimental Research**, v. 29, n. 3, p. 326–333, 2005.

MELIS, M. *et al.* Acetaldehyde mediates alcohol activation of the mesolimbic dopamine system. **European Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 10, p. 2824–2833, 2007.

MELIS, M. *et al.* Ethanol and acetaldehyde action on central dopamine systems: mechanisms, modulation, and relationship to stress. **Alcohol**, v. 43, n. 7, p. 531–9, 2009.

MELONI, J. N.; LARANJEIRA, R. Custo social e de saúde do consumo do álcool. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, n. Supl I, p. 7–10, 2004.

MIGUEL-HIDALGO, J. J. Lower Packing Density of Glial Fibrillary Acidic Protein-Immunoreactive Astrocytes in the Prelimbic Cortex of Alcohol-Naive and Alcohol-Drinking Alcohol-Preferring Rats as Compared With Alcohol-Nonpreferring and Wistar Rats. **Alcoholism: Clinical & Experimental Research**, v. 29, n. 5, p. 766–772, 2005.

MILLER, J. W. *et al.* Binge drinking and associated health risk behaviors among high school students. **Pediatrics**, v. 119, n. 1, p. 76–85, 2007.

MORRIS, D. *Social and Cultural Aspects of Drinking*. . Oxford: [s.n.], 1998.

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

MOUSSAWI, K. *et al.* Reversing cocaine-induced synaptic potentiation provides enduring protection from relapse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 1, p. 385–390, 2011.

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

NUTT, D. Alcohol and the brain. Pharmacological insights for psychiatrists. **The British Journal of Psychiatry**, v. 175, n. 2, p. 114–119, 1999.

O'BRIEN, J. M. **Alexander the Great: The Invisible Enemy**. 1. ed. New York: Routledge, 1992.

OZARAS, R. *et al.* N-acetylcysteine attenuates alcohol-induced oxidative stress in the rat. **World journal of gastroenterology**, v. 9, n. 1, p. 125–8, 2003.

PARNELL, S. E. *et al.* Reduction of ethanol-induced ocular abnormalities in mice through dietary administration of N-acetylcysteine. **Alcohol**, v. 44, n. 7-8, p. 699–705, 2010.

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

PEANA, A. T. *et al.* Effects of L-Cysteine on Reinstatement of Ethanol-Seeking Behavior and on Reinstatement-Elicited Extracellular Signal-Regulated Kinase Phosphorylation in the Rat Nucleus Accumbens Shell. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 37, n. January, p. E329–E337, 2013.

PEANA, A. T. *et al.* L-Cysteine reduces oral ethanol self-administration and reinstatement of ethanol-drinking behavior in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 94, n. 3, p. 431–437, 2010.

PEANA, A. T. *et al.* Reduction of Ethanol-Derived Acetaldehyde Induced Motivational Properties by L-Cysteine. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 33, n. 1, p. 43–48, 2009.

PEANA, A. T.; MUGGIRONI, G.; BENNARDINI, F. Change of cystine/glutamate antiporter expression in ethanol-dependent rats. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, n. October, p. 1–9, 2014.

PEOPLES, L. L.; KRAVITZ, A V; GUILLEM, K. The Role of Accumbal Hypoactivity in Cocaine Addiction. **The Scientific World JOURNAL**, v. 7, p. 22–45, 2007.

PEOPLES, R. W.; STEWART, R. R. Alcohols inhibit N-methyl-d-aspartate receptors via a site exposed to the extracellular environment. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 10, p. 1681–1691, 2000.

PERROTTI, L. I. *et al.* Distinct patterns of DeltaFosB induction in brain by drugs of abuse. **Synapse**, v. 62, n. 5, p. 358–69, 2008.

PFARR, S. *et al.* Losing Control: Excessive Alcohol Seeking after Selective Inactivation of Cue-Responsive Neurons in the Infralimbic Cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 30, p. 10750–10761, 2015.

RAO, P. S. S.; GOODWANI, S.; *et al.* Effects of ampicillin, cefazolin and cefoperazone treatments on GLT-1 expressions in the mesocorticolimbic system and ethanol intake in alcohol-preferring rats. **Neuroscience**, v. 295, p. 164–174, 2015.

RAO, P. S. S.; BELL, R. L.; *et al.* Targeting glutamate uptake to treat alcohol use disorders. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. April, 2015.

RAO, P. S. S.; SARI, Y. Effects of Ceftriaxone on Chronic Ethanol Consumption: a

Potential Role for xCT and GLT1 Modulation of Glutamate Levels in Male P Rats. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 54, n. 1, p. 71–77, 2014.

RASMUSSEN, B.; UNTERWALD, E. M.; RAWLS, S. M. Glutamate transporter subtype 1 (GLT-1) activator ceftriaxone attenuates amphetamine-induced hyperactivity and behavioral sensitization in rats. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 118, n. 2-3, p. 484–488, 2011.

REHM, J.; GMEL, G. Patterns of alcohol consumption and social consequences. Results from an 8-year follow-up study in Switzerland. **Addiction**, v. 94, n. 6, p. 899–912, 1999.

REISSNER, K. J.; KALIVAS, P. W. Using glutamate homeostasis as a target for treating addictive disorders. **Behavioural pharmacology**, v. 21, n. 5-6, p. 514–22, 2010.

REYNOLDS, J. N.; PRASAD, A.; MACDONALD, J. F. Ethanol modulation of GABA receptor-activated Cl⁻ currents in neurons of the chick, rat and mouse central nervous system. **European Journal of Pharmacology**, v. 224, n. 2-3, p. 173–181, 1992.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, n. 1507, p. 3137–3146, 2008.

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

RUFFLE, J. K. Molecular neurobiology of addiction: what's all the (Δ)FosB about? **The American Journal of Drug and Alcohol Abuse**, v. 40, n. 6, p. 428–437, 2014.

RUSHWORTH, G. F.; MEGSON, I. L. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: The need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 141, n. 2, p. 150–159, 2014.

RUSSO, S. J. *et al.* Nuclear Factor B Signaling Regulates Neuronal Morphology and Cocaine Reward. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 11, p. 3529–3537, 2009.

RYABININ, A. E.; WANG, Y.-M. M. Repeated Alcohol Administration Differentially Affects c-Fos and FosB Protein Immunoreactivity in DBA/2J Mice. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 22, n. 8, p. 1646–1654, 1998.

SAJJA, R. K.; RAHMAN, S. Cytisine modulates chronic voluntary ethanol consumption and ethanol-induced striatal up-regulation of Δ FosB in mice. **Alcohol**, v. 47, p. 1–9, 2013.

SANTHAKUMAR, V.; WALLNER, M.; OTIS, T. S. Ethanol acts directly on extrasynaptic subtypes of GABAA receptors to increase tonic inhibition. **Alcohol**, v. 41, n. 3, p. 211–221, 2007.

SCHNEIDER, R. *et al.* N-acetylcysteine prevents behavioral and biochemical changes induced by alcohol cessation in rats. **Alcohol**, v. 49, n. 3, p. 259–263, 2015.

SEIFERT, C. L. *et al.* Reduced volume of the nucleus accumbens in heroin addiction. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 265, n. 8, p. 637–645, 2015.

SEIVA, F. R. F.; AMAUCHI, J. F.; ROCHA, K. K. R.; EBAID, G. X.; *et al.* Alcoholism and alcohol abstinence: N-acetylcysteine to improve energy expenditure, myocardial oxidative stress, and energy metabolism in alcoholic heart disease. **Alcohol**, v. 43, n. 8, p. 649–656, 2009.

SEIVA, F. R. F.; AMAUCHI, J. F.; ROCHA, K. K. R.; SOUZA, G. A.; *et al.* Effects of N-acetylcysteine on alcohol abstinence and alcohol-induced adverse effects in rats. **Alcohol**, v. 43, n. 2, p. 127–135, 2009.

SETSHEDI, M. *et al.* Limited Therapeutic Effect of N-Acetylcysteine on Hepatic Insulin Resistance in an Experimental Model of Alcohol-Induced Steatohepatitis. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 35, n. 12, p. 2139–2151, 2011.

SHIH, A. Y. *et al.* Cystine/Glutamate Exchange Modulates Glutathione Supply for Neuroprotection from Oxidative Stress and Cell Proliferation. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 41, p. 10514–10523, 2006.

SIRCA, D. *et al.* L-cysteine Prevents Ethanol-Induced Stimulation of Mesolimbic Dopamine Transmission. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 35, n. 5, p. 862–869, 2011.

SMITH, K. S. *et al.* Ventral pallidum roles in reward and motivation. **Behavioural Brain Research**, v. 196, n. 2, p. 155–167, 2009.

TALLARIDA, C. S. *et al.* Ceftriaxone attenuates locomotor activity induced by acute and repeated cocaine exposure in mice. **Neuroscience letters**, v. 556, p. 155–9,

2013.

TAMBOUR, S. *et al.* Locomotor effects of ethanol and acetaldehyde after peripheral and intraventricular injections in Swiss and C57BL/6J mice. **Behavioural Brain Research**, v. 172, n. 1, p. 145–154, 2006.

TANG, S. M. *et al.* N -Acetylcysteine Improves Group B Streptococcus Clearance in a Rat Model of Chronic Ethanol Ingestion. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 33, n. 7, p. 1197–1201, 2009.

VALLEE, B. L. Alcohol in human history. *Toward a Molecular Basis of Alcohol Use and Abuse*. Basel: Birkhäuser Basel, 1994. v. 71. p. 1–8.

VANDERSCHUREN, L. J. M. J.; KALIVAS, P. W. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. **Psychopharmacology**, v. 151, n. 2-3, p. 99–120, 2000.

VENGELIENE, V. *et al.* Neuropharmacology of alcohol addiction. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 2, p. 299–315, 2009.

VOLKOW, N. D. *et al.* Addiction: Beyond dopamine reward circuitry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 37, p. 15037–15042, 2011.

WALKER, R. K. *et al.* The Good, the Bad, and the Ugly with Alcohol Use and Abuse on the Heart. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 37, n. 8, p. 1253–1260, 2013.

WANG, J.-F.; CHOU, K.-C. Metallo-Beta-Lactamases: Structural Features, Antibiotic Recognition, Inhibition, and Inhibitor Design. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 1242–1253, 2013.

WARD, R. J. *et al.* Acetaldehyde-induced changes in monoamine and amino acid extracellular microdialysate content of the nucleus accumbens. **Neuropharmacology**, v. 36, n. 2, p. 225–32, 1997.

WHITAKER, L. R. *et al.* Associative Learning Drives the Formation of Silent Synapses in Neuronal Ensembles of the Nucleus Accumbens. **Biological Psychiatry**, p. 1–11, 2015.

WHO. **Global status report on alcohol and health**. Geneva: World Health Organization, 2014.

WINSTOCK, A. R. *The Global Drug Survey 2014 findings*. . Disponível em: <<http://www.globaldrugsurvey.com/the-global-drug-survey-2014-findings/>>. Acesso em: 5 jan. 2016.

WRASE, J.; MAKRIS, N.; BRAUS, D. Amygdala volume associated with alcohol abuse relapse and craving. **American Journal of Psychiatry**, v. 165, p. 1179–1184, 2008.

WRIGHT, J. M.; PEOPLES, R. W.; WEIGHT, F. F. Single-channel and whole-cell analysis of ethanol inhibition of NMDA-activated currents in cultured mouse cortical and hippocampal neurons. **Brain Research**, v. 738, n. 2, p. 249–256, 1996.

ZAKHARI, S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? **Alcohol Research & Health**, v. 29, n. 4, p. 245–54, 2006.

ZANCHETA, R. *et al.* Repeated administration of caffeine induces either sensitization or tolerance of locomotor stimulation depending on the environmental context. **Pharmacological Reports**, v. 64, n. 1, p. 70–77, 2012.

ZHAO, Y. *et al.* Different sites of alcohol action in the NMDA receptor GluN2A and GluN2B subunits. **Neuropharmacology**, v. 97, p. 240–250, 2015.

ANEXO A – Parecer CEUA/FCFAr 33/2014

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 33/2014

Interessado: GESSYNGER MORAIS SILVA

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin

Projeto: Sensibilização comportamental e neuroadaptações induzidas pelo etanol: Efeitos do tratamento com N-Acetilcisteína em camundongos

Parecer nº 34/2014 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 18 de junho de 2014, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Sensibilização comportamental e neuroadaptações induzidas pelo etanol: Efeitos do tratamento com N-Acetilcisteína em camundongos", apresentado pelo pós-graduando GESSYNGER MORAIS SILVA, sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin, do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia desta Faculdade, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em ABRIL de 2016 em formulário para este fim.

Araraquara, 25 de junho de 2014.



Profª Drª CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA