

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR**  
**E ESTRUTURAL APLICADAS**

**DANIEL MOREIRA SILVA**

**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS**  
**RELACIONADAS À ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE**  
**ETANOL E EXPOSIÇÃO AO ESTRESSE EM**  
**CAMUNDONGOS**

**UBERLÂNDIA**

**2013**

**DANIEL MOREIRA SILVA**

**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS  
RELACIONADAS À ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE  
ETANOL E EXPOSIÇÃO AO ESTRESSE EM  
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin

**UBERLÂNDIA**

**2013**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

S586a  
2013      Silva, Daniel Moreira, 1989-  
            Alterações comportamentais e neuroquímicas relacionadas à  
            administração crônica de etanol e exposição ao estresse em camundongos /  
            Daniel Moreira Silva. -- 2013.  
            82 f : il.

Orientador: Marcelo Tadeu Marin.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular  
e Estrutural Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Etanol. 2. Estresse. 3. Dopamina - I. Marin, Marcelo Tadeu. II.  
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU: 576.3

---



Aos mestres na academia e na vida, por terem ensinado de forma tão altruísta, me feito mais digno do título de mestre, mesmo detendo uma parte tão ínfima do conhecimento, os quais sempre serão sinônimos de inspiração e gratidão.  
A Deus, minha mãe Cida e Prof. Marcelo...

Dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pelo amor incondicional, palavras de sabedoria, força e determinação para a finalização deste trabalho e, principalmente, por ter colocado em meu caminho, tantas pessoas especiais, tornando mais possíveis os desafios, as derrotas superáveis e as glórias ainda maiores.

À minha mãe, meus irmãos Matheus e Isabela e demais familiares pelo amor incircunstancial e por terem me proporcionado o necessário para buscar cada sonho. Por terem sido amigos, conselheiros e companheiros para todos os momentos. Por terem aberto mão de muitos de seus sonhos e objetivos para que eu tenha chegado até aqui, sido sempre meu porto seguro me oferecido muito mais do que eu possa merecer.

Aos irmãos que Deus me permitiu escolher, meus amigos Camila Martinelli, Carla Cassimiro, Cássio Potter, Clenio Oliveira, Daniel Flávio, Daniella Melo, Fernanda Chaves, Ilmar Júnior, Jéssica Barbosa, Joyce Valadão, Katharinne Carvalho, Lucimar de Oliveira, Mariele Diks, Marcella Finotti, Paulo Phellipe, Ulisses Marques e Tiago Nunes (e todos os demais os quais eu tenha me esquecido de mencionar mas que sabem sua importância para minha jornada ter chegado até aqui).

Às companheiras da 1ª Turma de graduação e de mestrado, o eterno quarteto biomédico, Débora, Moline e Taís pela amizade incondicional e apoio recíproco, por terem feito que a nossa união em superar todos os obstáculos até aqui tornasse mais forte a luz de cada uma das nossas estrelas. Pela certeza de que independentemente dos caminhos futuros de cada um, sempre estaremos de mãos dadas.

Aos brilhantes mestres e cientistas com os quais tive o privilégio de conviver, que transmitiram por seus exemplos os valores da ciência, Benvinda Rosalina, Dennys Xavier, Estela de Oliveira, Fábio de Oliveira, José Roberto Mineo, Marcelo Beletti e Marco Aurélio Martins.

Aos meus companheiros de laboratório Gessynger e Juliana. Personificação do temo parceiros para toda hora... nos domingos chuvosos e solitários; nos vídeos intermináveis e impiedosamente entediante dos experimentos; nas planilhas do excel que mais pareciam labirintos; no trato de centenas (ou milhares?) de camundongos, sendo ora babás, ora cozinheiros, ora enfermeiros....Obrigado pela sempre disposição em ajudar e contribuir para o desenvolvimento dos experimentos e o meu crescimento, por terem tornado as horas no laboratório incrivelmente prazerosas. Mais recompensador do que fazer ciência, apenas é fazê-la ao lado de amigos.

À Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Biomédicas e Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas por promoverem grande parte do suporte financeiro e técnico para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais pelo financiamento do projeto que originou este trabalho assim como pelo fornecimento da bolsa de auxílio à pesquisa por todo esse período.

À Universidade Estadual de São Paulo, sobretudo à Prof. Dra. Cleópatra da Silva Planeta, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, que se dispôs prontamente a colaborar para a realização do trabalho, tendo sido de extrema importância os procedimentos técnicos realizados no laboratório sob sua coordenação. Obrigado pela grande hospitalidade e em tão curto período ter me possibilitado tamanho aprendizado.

Aos técnicos de laboratório Simone e Débora, secretárias Giselda e Beth, colegas de turma e/ou laboratório (Izabela, Lígia, Puebla, Nathácia, Amanda, Túlio, Pedro, Rafaella, Mariana, Danielle, entre outros), professores (Káren, Eloisa, Tatiana, Renata, Luiz, Alberto, Paula, Paulo, Ana Paula, Celina, Érika, entre outros), colegas de laboratório e demais pessoas com as quais convivi durante todo esse período e que contribuíram pra tornar essa experiência tão agradável.

Agradeço finalmente à pessoa mais importante para a conclusão desse trabalho, meu orientador Marcelo Tadeu Marin. Responsável desde a concepção inicial do projeto às últimas correções ortográficas das referências bibliográficas. Obrigado por ter sido sempre tão compreensivo, solícito e disposto a ajudar para que tudo se desenvolvesse da melhor forma possível. Por ter sido mais que um simples orientador, ora carpinteiro ora eletricitista, ora engenheiro civil, consertando equipamentos, improvisando técnicas novas, sempre providenciando todo o necessário para a realização dos experimentos. Ora parceiro de experimentos, dividindo idas agradáveis ao laboratório durante as noites e finais de semana. Ora professor sempre me transmitindo com paciência ilimitada todo o conhecimento necessário para a minha formação como pesquisador. Ora revisor de periódicos corrigindo por quantas vezes fossem necessárias painéis, resumos, relatórios, trabalho de conclusão de curso, agora dissertação de mestrado e em breve artigo científico. Ora amigo, compreendendo sempre meus atrasos e minhas limitações motoras. Independente dos próximos passos da minha jornada na carreira acadêmica, você sempre será lembrado como o principal responsável para a minha formação como cientista, tendo sido fundamental para a conclusão da minha graduação, o mentor de todo o meu mestrado e ainda o introdutor do doutorado, tendo me encaminhado para o melhor caminho possível, onde eu possivelmente possa, por meio dos meus sonhos como cientista, me realizar como ser humano. Obrigado por ter sido um orientador muito melhor ainda do que qualquer um pudesse esperar, não poderia ser coincidência você pertencer à torcida do maior time do futebol brasileiro, São Paulo Futebol Clube.

Só porque estou perdendo  
Não significa que eu esteja perdido  
Não significa que irei parar  
Não significa que deva me render...

Só porque estou sofrendo  
Não significa que estou ferido  
Não significa que eu não tenho o que eu mereço.  
Nem o melhor e nem o pior.

Eu apenas me perdi  
Todo rio que tentei atravessar  
Toda porta que testei, estava trancada  
Ohhh estou... apenas esperando o brilho se apagar...

Você pode ser um peixe grande  
Em um pequeno lago  
Não significa que você venceu  
Porque logo pode chegar  
Um maior...

E você vai se perder  
Todo rio que tentou atravessar  
Toda arma que experimentou estava estragada...  
Ohhh e eu estou... apenas esperando até que o tiroteio acabe...  
Ohhh e eu estou... esperando até que o brilho se apague...  
(Coldplay – Lost/tradução)

Obrigado a todos os que estiveram presentes junto a mim durante toda essa jornada,  
que me puseram de volta ao caminho certo quando parecia estar perdido, que me  
empurraram, impedindo minha parada ou rendição.

Ajudaram a atenuar a dor das feridas e minimizaram os sofrimentos, fazendo valer cada  
conquista, que pode não ser o que sempre almejo, mas é o que mereço. Me içaram  
pelos rios que não conseguia atravessar, me mostraram uma porta ainda maior quando  
alguma parecia trancada e quando eu hesitava em entrar, me atiravam pela janela.

Me mostraram que por mais objetivos que conquistemos, sempre seremos menores  
sozinhos. Um peixe sozinho no meio do mar, por mais autossuficiente que possa  
parecer, nada se torna no surgimento de um predador, contudo um cardume unido  
consegue sempre confundir seu adversário, e sobreviver, todos juntos.

Me mantiveram firme mesmo diante dos peixes grandes, desafios, do tiroteio de  
obstáculos que percorremos a cada nascer do sol. Não só impediram com que minha luz  
se apagasse, mas fizeram com que ela brilhasse cada vez mais forte, somada a luz de  
cada um. Queridos companheiros, aos quais devo perdão pelos clichês, mas a amizade  
ou o amor nada mais são que uma redundância de sentimentos, para os quais as palavras  
sempre serão frágeis ou insuficientes.

“A descoberta consiste em ver o que todo mundo viu e pensar o que ninguém pensou”

*A. Szent-Gyorgyi*

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

5-HIAA – Ácido 5-hidroxi-indolacético

5-HT- 5-hidroxitriptamina

AMPc – Adenosina monofosfato cíclico

ANOVA – Análise de variância

ATV – Área tegmental ventral

CA – Campo Aberto

CID-10 – Classificação Internacional de Doenças – edição 10

CRF – Fator de liberação de corticotrofina

CPF – Córtex pré-frontal

DOPAC – Ácido. 3,4-di-hidroxifenilacético

GABA – Ácido gama aminobutirico

HVA - Ácido homovanílico

LCE – Labirinto em cruz elevada

NAc – Núcleo acúmbens

NMDA - N-metil D-Aspartato

PCL – Preferência condicionada por lugar

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Dependência ao etanol.....	16
1.2 Modelos de Avaliação de dependência ao etanol.....	17
1.2.1 Administração crônica.....	17
1.2.2 Síndrome de abstinência.....	18
1.2.3 Busca ao etanol.....	19
1.3 Estresse e dependência.....	21
1.4 Alterações neuroquímicas relacionadas ao etanol.....	22
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo Geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Animais.....	27
3.2 Estresse.....	27
3.3 Administração crônica de etanol.....	27
3.4 Avaliação da síndrome de abstinência ao etanol.....	29
3.5 Avaliação da preferência condicionada por lugar, extinção do condicionamento e recaída ao etanol.....	30
3.6 Quantificações das concentrações de dopamina, serotonina e seus metabólitos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a detector eletroquímico.....	31
3.7 <u>Experimento 1</u> - Avaliação dos efeitos do estresse na síndrome de abstinência ao etanol.....	33
3.8. <u>Experimento 2</u> - Avaliação dos efeitos do estresse e da exposição crônica ao etanol no conteúdo de dopamina, serotonina e seus metabólitos.....	34
3.9. <u>Experimento 3</u> - Padronização do modelo de administração de etanol para indução da preferência condicionada por lugar ao etanol.....	35
3.10. <u>Experimento 4</u> - Avaliação dos efeitos do estresse na expressão da preferência condicionada por lugar, extinção e recaída ao etanol .....	36
3.11 Análise estatística.....	37
4. RESULTADOS.....	38

4.1. Consumo de solução veículo e etanol.....	38
4.2. Síndrome de abstinência .....	40
4.3. Efeitos do estresse e da exposição crônica ao etanol sobre a atividade dopaminérgica e serotoninérgica no núcleo acúmbens, córtex pré-frontal e amígdala.....	41
4.4 Padronização do modelo de preferência condicionada por lugar ao etanol	51
4.5. Efeito do estresse sobre a preferência condicionada por lugar, extinção e recaída ao etanol.....	52
5. DISCUSSÃO.....	55
5.1 Síndrome de abstinência ao etanol.....	55
5.2 Adaptações neuroquímicas.....	60
5.3 Preferência condicionada por lugar associada ao etanol.....	63
6. CONCLUSÃO.....	70
7. REFERÊNCIAS .....	71
8. ANEXOS.....	80

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Localização encefálica das regiões extraídas para quantificação dos neurotransmissores e seus metabólitos.....	32
Figura 2 - Procedimento experimental do teste para avaliação dos efeitos da exposição ao etanol e ao estresse sobre a síndrome de abstinência.....	34
Figura 3: Procedimento experimental utilizado para a avaliação dos efeitos da exposição ao etanol e ao estresse sobre a concentração de dopamina, serotonina e seus metabólitos no CPF, NAc e amígdala.....	35
Figura 4: Procedimento experimental utilizado para a avaliação dos efeitos da exposição ao etanol e ao estresse sobre a PCL.....	36
Figura 5 – Consumo de solução a base do composto alimentar Sustagen <sup>®</sup> , contendo ou não etanol, durante os 15 dias de administração da dieta líquida. ....	39
Figura 6 – Consumo de etanol presente na solução a base no composto alimentar Sustagen <sup>®</sup> , durante os 15 dias de administração da dieta líquida. ....	40
Figura 7 - Efeito do estresse de nado forçado e exposição crônica ao etanol sobre comportamentos relacionados à ansiedade no LCE .....	41
Figura 8 - Efeito do estresse de nado forçado e exposição crônica ao etanol sobre comportamentos relacionados à ansiedade e locomoção no Campo Aberto .....	43
Figura 9 - Efeito da exposição crônica ao estresse e etanol sobre a concentração de serotonina (5-HT), seu metabólito e o turnover serotoninérgico no córtex pré-frontal .....	45
Figura 10 - Efeito da exposição crônica ao estresse e etanol sobre a concentração de serotonina (5-HT), seu metabólito e o turnover serotoninérgico no núcleo acúmbens .....	46
Figura 11 - Efeito da exposição crônica ao estresse e etanol sobre a concentração de serotonina (5-HT), seu metabólito e o turnover serotoninérgico na amígdala .....	47
Figura 12 - Efeito da exposição crônica ao estresse e etanol sobre a concentração de dopamina e seus metabólitos no córtex pré-frontal .....	48
Figura 13 - Efeito da exposição crônica ao estresse e etanol sobre a concentração de dopamina e seus metabólitos núcleo acúmbens .....	49
Figura 14 – Efeito da exposição crônica ao estresse e etanol sobre a concentração de dopamina e seus metabólitos na amígdala .....	50
Figura 15 - Efeito de diferentes concentrações de etanol sobre a preferência condicionada por lugar .....	52

Figura 16 - Efeito da exposição crônica ao estresse e etanol sobre a preferência condicionada por lugar .....	54
--	----

## RESUMO

O consumo de etanol é um dos maiores fatores de risco de morbidade e mortalidade mundial, sendo sua dependência um grave problema de saúde pública. Em animais de laboratório, podem ser investigados alguns comportamentos relacionados à dependência ao etanol, como a preferência condicionada por lugar (PCL) e sinais da síndrome de abstinência na retirada do etanol. O estresse é um fator de grande importância na iniciação, manutenção e recaída ao consumo de substâncias psicoativas de abuso e pode modular alterações neuroquímicas induzidas pela administração crônica dessas substâncias. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos do estresse de nado forçado, concomitante à administração crônica de etanol (em dieta líquida), na PCL e síndrome de abstinência ao etanol, e sua relação com alterações da neurotransmissão dopaminérgica e serotoninérgica em camundongos. Quando avaliamos os parâmetros de ansiedade, não foram encontradas alterações tanto no labirinto em cruz elevada (LCE) quanto no campo aberto (CA). Contudo, a exposição apenas ao etanol induziu a redução da atividade locomotora no CA, se correlacionando com o aumento do *turnover* dopaminérgico (razão entre os metabólitos dopaminérgicos pela dopamina) observada no córtex pré-frontal (CPF), decorrente do mesmo tratamento. A alteração no CPF pode ainda ser responsável pelo aumento da procura pelo etanol, analisada no modelo de PCL. No núcleo acúmbens (NAc), foi verificada redução do *turnover* dopaminérgico nos animais expostos apenas ao estresse, que pode ter predisposto ao aumento da PCL ao etanol nesse grupo experimental. Nos animais expostos concomitantemente ao etanol e ao estresse não houve alteração tanto na PCL quanto no *turnover* dopaminérgico no CPF e NAc. A ausência de alterações nesse grupo pode estar relacionada ao aumento do estoque de dopamina na amígdala. Portanto, nosso estudo indica que tanto o estresse quanto o etanol induzem alterações dopaminérgicas em diferentes regiões encefálicas e isso pode ser responsável pelos comportamentos característicos da síndrome de abstinência e pela procura pelo etanol. Tendo, assim, o estresse importante papel para o desenvolvimento da dependência ao etanol e sendo necessários mais estudos para compreender as vias moleculares pelas quais se dá essa interação.

**Palavras chave:** etanol, estresse, dopamina.

## ABSTRACT

Ethanol consumption is one of the biggest risk factors for world morbidity and mortality, once its dependence is a serious public health problem. In laboratory animals, some behaviors related to ethanol dependence can be investigated, like conditioned place preference (CPP) and the symptoms of withdrawal syndrome. Stress is a factor of major importance for beginning, maintenance and reinstatement of abuse psychoactive drugs and can regulate neurochemical alterations induced by chronic administration of these substances. The objective of this study was investigate the effects of forced swimming stress, concomitant to ethanol chronic administration (in liquid diet), on CPP and ethanol withdrawal syndrome, and its relation to alterations of dopaminergic and serotonergic neurotransmission in mice. When we evaluate anxiety parameters during ethanol withdrawal, it was not found alterations in both elevated plus maze and open field (OF). However, exposure to ethanol alone induced reduction of exploratory activity in OF, correlating to increase of dopaminergic turnover (ratio between dopaminergic metabolites by dopamine) observed in prefrontal cortex (PFC), due to the same treatment. PFC alteration can still be responsible by increase of ethanol seeking, analyzed in the CPP procedure. Nevertheless, in nucleus accumbens (NAc), it was found reduction of dopaminergic turnover in animals exposed to stress alone, which may be predisposed to increase of ethanol CPP in this experimental group. In animals exposed concomitantly to ethanol and stress, it was not found alterations in both CPP as in dopaminergic turnover in PFC or NAc. Absence of alterations in this group may be related with increase of dopaminergic storage in amygdala. Thus, our study indicates that stress as well as ethanol induces dopaminergic alterations in different encephalic regions and this can be responsible by characteristic behaviors of withdrawal syndrome and ethanol seeking. Therefore, stress has an important role for ethanol addiction development and it is necessary more studies to understand the neurochemical pathways responsible by this interaction.

**Key words:** ethanol, stress, dopamine.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Dependência ao etanol**

O uso de bebidas alcoólicas pelo homem se perde no tempo. O fato de o etanol ser obtido a partir da fermentação de vários açúcares faz com que ele possa ser facilmente produzido em qualquer região, praticamente universalizando sua utilização. Até o desenvolvimento da técnica de destilação, no século VIII, pelos árabes, as bebidas alcoólicas consumidas eram a cerveja e o vinho. A partir da sua descoberta, foi iniciada a produção de bebidas mais concentradas em etanol como o uísque e a vodca. Contudo, foi a partir do século XVIII (quando já havia sendo ingrediente de tônicos e elixires) que as bebidas destiladas passaram a ser as mais consumidas entre os mais diferentes tipos de sociedade. A partir de 1951 a Organização Mundial de Saúde passou a classificar o alcoolismo como problema de saúde (CAMARINI; PREGNOLATTO, 2007). A dependência de substâncias psicoativas é conceituada pela Classificação Internacional de Doenças (CID-10) como um conjunto de sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos que indicam que o indivíduo perdeu o controle do uso da substância e continua a usá-la apesar de reconhecer as consequências adversas deste uso (DACKIS; O'BRIEN, 2001; KARILA et al., 2008). Esta é uma desordem crônica recorrente caracterizada por: a) compulsão para a busca e consumo da substância, b) perda do controle para limitar o consumo e c) aparecimento de estados emocionais negativos, como por exemplo, disforia e ansiedade quando o acesso à substância psicoativa é impedido (KOOB; LE MOAL, 2008). Este último fator característico da dependência é chamado de síndrome de abstinência (KOOB, 2009).

Nos países em desenvolvimento com baixa taxa de mortalidade, como o Brasil, o consumo de etanol é o maior fator de risco de morbidade e mortalidade. Nos países desenvolvidos, a ingestão de etanol é o terceiro fator de risco, superado somente pelo tabagismo e hipertensão arterial (EZZATI et al., 2002). O uso de etanol está relacionado com mais de 60 tipos de doenças, contribuindo para 4% dos casos de doenças no mundo. O abuso de álcool é responsável por 3,2% de todas as mortes por ano (aproximadamente 2,5 milhões) e por 4% de todos os anos perdidos de vida útil (LARANJEIRA, 2007). A prevalência anual do uso mundial de álcool é de 42% (sendo a droga considerada lícita na maioria dos países), o que é oito vezes maior que a

prevalência anual do abuso de drogas ilícitas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

Assim, pesquisas sobre os mecanismos de desenvolvimento da dependência ao etanol são de grande importância para a saúde pública. Modelos animais têm sido desenvolvidos para estudar aspectos comportamentais e alterações neuroquímicas relacionadas à dependência ao etanol. No entanto, o alcoolismo é uma desordem complexa que não pode ser “modelada” como um todo em um único modelo animal (SPANAGEL, 2000).

## **1.2. Modelos de avaliação da dependência ao etanol**

### *1.2.1. Administração crônica*

A administração crônica de etanol, para indução de dependência química pode ser realizada por meio da apresentação de soluções da referida substância em bebedouros na gaiola moradia de ratos ou camundongos. Esse procedimento é normalmente realizado pela oferta de dois bebedouros (um com água e outro com solução etanólica) e permite a avaliação do consumo livre dessas soluções por períodos longos de tempo (GREEN; GRAHAME, 2008; LYNCH et al., 1999). Roedores submetidos a testes de consumo por livre escolha de etanol em bebedouros raramente consomem mais de 2 g/kg/dia dessa substância. Essa pequena ingestão não atinge concentrações etanólicas sanguíneas necessárias para desencadear sinais da síndrome de abstinência na retirada da substância (HEILIG; EGLI, 2006) que é um dos parâmetros relevantes para análise da dependência (HEILIG; KOOB, 2007).

Em roedores, um dos sinais característicos da síndrome de abstinência é o aumento de comportamentos relacionados à ansiedade na retirada da administração crônica de etanol (GETACHEW et al., 2008; PANDEY et al., 1999). Grande parte das pesquisas recentes sobre a neurobiologia da dependência ao álcool abordam as alterações comportamentais e neurais desencadeadas pela exposição intensa e prolongada a essa substância para indução da dependência (GILPIN et al., 2008; KOOB; LE MOAL, 2008; KOOB, 2009).

Foram desenvolvidos modelos animais dessa exposição crônica e intensa ao etanol capazes de induzir alterações comportamentais significativas, que incluem exposição do roedor por dias a semanas a câmaras com vapor de etanol (FUNK; LI; LÊ, 2006; SANNA et al., 2002), consumo de solução de etanol como única fonte de água

(STROTHER et al., 2005), repetidas injeções intraperitoneais de etanol (KOTLINSKA; BOCHENSKI, 2008) e consumo de etanol em dieta alimentar líquida oferecida como única fonte de alimento (PANDEY et al., 1999).

Uma das formas de administrar etanol em dieta alimentar como única fonte de alimento é a realizada por Cabral e colaboradores (2006). Os roedores tiveram acesso somente a bebedouros com solução do composto Sustagen® (Mead Johnson, São Paulo, Brasil) contendo ou não etanol. Essa solução líquida pronta pra ingestão fornece proteínas, carboidratos, gorduras, vitaminas e minerais necessários para a dieta do roedor (CABRAL et al., 2006). Em trabalhos anteriores, esse método de administração já havia se apresentado eficiente na indução de comportamentos relacionados à dependência ao etanol (BALDWIN et al., 1991). O procedimento levou a concentrações sanguíneas de etanol de 80 a 132 mg/dL, suficientes para a indução da síndrome de abstinência. Com essa metodologia, também não foram observadas diferenças significativas de ganho de massa corporal em relação ao grupo tratado com ração (BERTOTTO et al., 2006).

### *1.2.2. Síndrome de abstinência*

A síndrome de abstinência é um processo diverso e temporalmente dinâmico. Historicamente, tem sido proposto que sintomas físicos como tremores e hiperatividade em geral do sistema nervoso autônomo são a chave para entender a manutenção do uso intenso de etanol. No entanto, mudanças fisiológicas, elevada ansiedade, queda do humor e habilidade atenuada em experimentar o prazer de reforçadores naturais, são também componentes chave para a síndrome de abstinência (HEILIG et al., 2010).

Têm sido desenvolvidos diversos modelos com roedores para avaliação da síndrome de abstinência ao etanol. Com procedimentos eficientes para explorar a neurobiologia da interrupção do consumo da droga, viabiliza-se o desenvolvimento de agentes terapêuticos que reduzam a severidade dessa síndrome (KLIETHERMES, 2005).

O campo aberto (CA) é o mais antigo e talvez mais simples dos ensaios para avaliação da atividade exploratória. O teste consiste em colocar um animal dentro de uma arena desconhecida, geralmente circular e dividida em quadrantes. Dessa forma, é possível por meio desse procedimento, a avaliação de sinais da síndrome de abstinência, que podem consistir de alterações da atividade locomotora e também de comportamentos relacionados à ansiedade (CRAWLEY, 1985).

Embora seja uma tarefa simples de se realizar, algumas variações metodológicas existem na literatura, desde o formato e material do qual é feito o CA, onde alguns são quadrados, outros circulares, opacos, claros ou outros totalmente escuros; até mesmo o tempo de duração do teste e comportamentos avaliados. Quando os animais apresentam baixa atividade motora e menor preferência pelo centro do CA, há uma indicação de que esses animais apresentam níveis elevados de ansiedade (PRUT; BELZUNG, 2003). Alguns estudos demonstram hiperatividade locomotora na síndrome de abstinência ao etanol em roedores (ERDEN et al., 1999; KAYIR; UZBAY, 2008) enquanto outros mostram hipoatividade locomotora nesses animais (BONASSOLI et al., 2011; DEVAUD; BARTOO; MALTHANKAR, 2002).

Outro teste capaz de avaliar comportamentos relacionados à ansiedade, característicos da síndrome de abstinência ao etanol, é o labirinto em cruz elevado (LCE). Administração de etanol na forma de injeções intraperitoneais (ZHANG et al., 2007), exposição a câmaras de vapor de etanol (VALDEZ et al., 2002) ou dieta líquida contendo a substância psicoativa de abuso (CABRAL et al., 2006) induzem aumento de comportamentos relacionados à ansiedade no LCE durante a abstinência.

### *1.2.3. Preferência condicionada por lugar (PCL)*

Durante a abstinência ao etanol, podem ser observados sintomas somáticos, comportamentos de ansiedade e desregulação do humor relacionados às neuroadaptações e distúrbios do equilíbrio neuroendócrino causados pelo álcool. O uso desses sintomas como causa para a compulsão pela busca e uso da droga é denominada de hipótese homeostática. O alívio do desconforto e estado emocional negativo seria a base para as recaídas. No entanto, tais alterações homeostáticas não conseguem explicar todos os comportamentos relacionados à dependência química. A hipótese do condicionamento complementa os mecanismos evidenciados pela teoria homeostática. Ela se baseia em observações de que a recaída ao consumo e demais comportamentos relacionados à busca pela droga estão frequentemente associados à exposição a estímulos ambientais relacionados à substância de abuso. Estímulos ambientais específicos teriam associação com as ações reforçadoras e induziriam o indivíduo a buscar novamente pela substância, no caso o etanol (WEISS et al., 2001).

O êxito na atenuação dos comportamentos de busca pelo etanol, assim como a prevenção da recaída a esses comportamentos, continua, portanto, sendo um

considerável desafio no processo de reabilitação de pacientes dependentes de álcool (GROBLEWSKI; LATTAL; CUNNINGHAM, 2009).

Respostas condicionadas aos estímulos ambientais decorrentes dos efeitos do etanol são críticas para instigar os comportamentos relacionados à busca pela droga e pela manutenção do mecanismo do consumo de etanol. E embora o abuso e dependência sejam amplamente estudados, não há muitos trabalhos que abordem de forma mais detalhada os mecanismos neurobiológicos que regulam os comportamentos relacionados à busca por etanol (GREMEL; CUNNINGHAM, 2009).

Um dos modelos animais mais utilizados para avaliar a associação entre o efeito do etanol o ambiente é o de PCL. Esse modelo é baseado no condicionamento clássico e consiste da associação repetida da administração da substância de abuso com um ambiente, enquanto outro ambiente, de características sensoriais diferentes, é associado à administração do veículo (SANCHIS-SEGURA; SPANAGEL, 2006). Todas as substâncias psicoativas que causam dependência em humanos também desenvolvem em roedores o comportamento de condicionamento ao ambiente associado com a administração dessa substância (BERKE; HYMAN, 2000; ROBINSON; BERRIDGE, 2003).

Alguns estudos observam ainda que a memória adquirida pelo mecanismo de preferência condicionada por lugar está sujeita à extinção. A perda do condicionamento pode se dar, por exemplo, por meio de exposições sucessivas ao ambiente previamente pareado com a droga, só que nesse momento sem a sua administração. Assim, o animal perde a associação do reforço positivo com o local pareado, reduzindo a PCL (MUELLER; STEWART, 2000; SCHROEDER; PACKARD, 2004).

O teste de PCL permite uma manipulação direta da aquisição e extinção do condicionamento a drogas de abuso (GROBLEWSKI; FRANKEN; CUNNINGHAM, 2011), assim como investigar os mecanismos neurais pelos quais determinados fatores interferem em alguns comportamentos relacionados à dependência. Uma vez que os parâmetros comportamentais avaliados no teste são controlados pela evocação da memória associativa entre a droga e o ambiente, é possível observar como a exposição a outros tipos de droga, exposição ao estresse, estado de ansiedade, entre outros fatores, vão influenciar na evocação dessa memória e na intensidade do seu efeito reforçador (GREMEL; CUNNINGHAM, 2011). Alguns fatores, como a adolescência, podem fazer com que a consolidação dessa memória associada à droga seja ainda mais consistente, dificultando a extinção do condicionamento (BRENHOUSE; ANDERSEN, 2008).

A partir desse teste, ainda é possível a avaliação da reinstalação do condicionamento à droga após um período de extinção do comportamento. Essa reinstalação da PCL pelo ambiente pareado com a substância pode ser induzida por uma nova injeção da substância ou breve exposição ao estresse, sendo interpretada como um comportamento relacionado à recaída da busca por substâncias que causam dependência (SANCHIS-SEGURA; SPANAGEL, 2006; CRUZ et al., 2008; SPERLING et al., 2010a). Foi observado que injeções de opióides, psicoestimulantes ou nicotina foram capazes de recuperar a já extinta PCL pela droga (LIU et al., 2008) e que a recaída à PCL ao etanol ocorre mesmo quando a administração da substância é associada a um contexto negativo (MARCHANT et al., 2012).

### **1.3. Estresse e dependência**

Estudos epidemiológicos mostram que muitos indivíduos experimentam substâncias de abuso por períodos variáveis de tempo, mas somente alguns desenvolvem dependência. Isso indica que fatores adicionais àqueles relacionados à interação substância-organismo influenciam na progressão para o uso compulsivo (ROBINSON; BERRIDGE, 2003).

Dados do Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas (CEBRID) revelam que a proporção de pessoas que consome álcool e se torna dependente não corresponde à maioria, uma vez que 74,6% da população brasileira entrevistada consumiu etanol pelo menos uma vez na vida, todavia apenas 12,3% são consideradas dependentes (GALDURÓZ et al., 2006).

A exposição ao estresse tem sido destacada como um fator importante no desenvolvimento da dependência. Indivíduos dependentes frequentemente citam a exposição a estímulos aversivos e estados negativos de humor como justificativa para o início, manutenção e recaída ao uso das substâncias psicoativas (GOEDERS, 2003; SINHA, 2001). Neste sentido, existem relatos de que o consumo precoce e o desenvolvimento de problemas relacionados ao abuso do etanol em humanos estão associados à exposição ao estresse (KAUFMAN et al., 2007; MULIA et al., 2008)

Em ratos, foi mostrado que a exposição repetida ao estresse de contenção aumenta o consumo de soluções de etanol no modelo de livre escolha em bebedouros (QUEBEC et al., 1997). O aumento do consumo persiste mesmo após 10 dias do final das exposições a esse tipo de estresse (LYNCH et al., 1999). Além disso, a exposição ao

estresse pode desencadear a recaída à autoadministração de etanol (FUNK; LI; LÊ, 2006). Quando os animais são submetidos cronicamente ao estresse de isolamento social durante sua fase de desenvolvimento, foi observada também elevação do consumo de etanol em camundongos C57BL/6J quando estes chegam à fase adulta (LOPEZ; DOREMUS-FITZWATER; BECKER, 2011).

Existem evidências de que a exposição aguda ao estresse possa desencadear sinais da síndrome de abstinência em roedores após interrupção da administração crônica de etanol (VALDEZ et al., 2003).

Ademais, o estresse crônico pode aumentar a PCL à cocaína (SPERLING et al., 2010), enquanto o estresse agudo pode aumentar a PCL à nicotina (BRIELMAIER; MCDONALD; SMITH, 2011). Assim, o estresse parece aumentar o consumo e o condicionamento a drogas de abuso.

#### **1.4. Alterações neuroquímicas relacionadas ao etanol**

O etanol, em concentrações sanguíneas habitualmente alcançadas em humanos, pode agir em diversos receptores e proteínas efetoras, enquanto em altas concentrações pode promover alteração na composição lipídica das membranas citoplasmáticas. Os seus alvos primários são receptores glutamatérgicos NMDA, gabaérgicos GABAA, glicinérgicos, serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub>, colinérgicos nicotínicos, canais de Ca<sup>+2</sup> do tipo L e canais de K<sup>+</sup> ativados por proteína G (FADDA; ROSSETTI, 1998; VENGELIENE et al., 2008). A ligação do etanol a esses sítios primários altera a atividade de diversos neurônios, levando finalmente a mudanças comportamentais como desinibição, sedação e hipnose.

Há muitas evidências de que o principal responsável pelas alterações comportamentais promovidas pelo etanol seja o sistema mesolímbico dopaminérgico. Estudos demonstram que o etanol estimula a ativação dos neurônios da área tegmental ventral (ATV) *in vivo* e *in vitro* e que o efeito reforçador promovido pela autoadministração de etanol diretamente na ATV é bloqueado pela co-administração de agonista de receptores dopaminérgicos D2. Mesmo com a administração sistêmica de etanol, de forma passiva ou por autoadministração, há aumento da concentração de dopamina no NAc, região diretamente conectada à ATV, que tem liberação dopaminérgica em seus terminais promovida por estímulos na ATV. Há relatos de lesões nos terminais dopaminérgicos do NAc terem suprimido a aquisição de

comportamentos relacionados à dependência ao etanol em testes de escolha entre dois bebedouros ou de autoadministração operante (MORIKAWA; MORRISETT, 2010).

A busca e também o consumo de etanol (tal como de outras substâncias psicoativas de abuso) são mediados principalmente pelo aumento da transmissão dopaminérgica no NAc (DI CHIARA; BASSAREO, 2007; VENGELIENE et al., 2008). Estudos utilizando a técnica de microdiálise demonstraram que a administração de etanol (KIIANMAA et al., 1995; LÖF et al., 2007), cocaína, anfetamina, morfina ou nicotina (DI CHIARA; IMPERATO, 1988) aumenta a liberação de dopamina no NAc. O sistema dopaminérgico pode ainda regular a ação de uma droga sobre os comportamentos relacionados à dependência química à outra substância. Foi relatado que a exposição prévia ao etanol pode aumentar o condicionamento à cocaína e que o receptor dopaminérgico D1 está envolvido nesse fenômeno (SIDIROPOULOU et al., 2009).

Estudos com linhagens de ratos selecionadas para alta ou baixa ingestão de etanol sugerem que diferenças nos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico podem estar relacionadas a esses distintos graus de consumo da substância (GATTO et al., 1987; MCBRIDE, 1992). Tem sido relatado o envolvimento do sistema dopaminérgico mesolímbico, incluindo suas inervações serotoninérgicas na regulação dos comportamentos de dependência ao etanol (JEANNE; KOOB, 1998; MCBRIDE et al., 1997). Há evidências de que uma liberação dopaminérgica reduzida na concha do NAc seja uma característica inata que predisponha à preferência ao etanol, busca e ao abuso da droga (BUSTAMANTE et al., 2008; QUINTANILLA et al., 2007).

Adicionalmente, há estudos que indicam que o consumo de etanol tal qual sua influência sobre a atividade dopaminérgica possa estar bastante relacionada com a linhagem do animal escolhido como modelo experimental. Nesse contexto, foi mostrado que ratos Wistar-Kyoto (WKY), modelo utilizado para testes envolvendo depressão, consomem mais etanol que ratos Wistar comuns (WIS). Em análises autorradiográficas, os animais WKY apresentaram alterações dos transportadores de dopamina (DAT) em diferentes regiões cerebrais, quando comparado à linhagem WIS (JIAO; PARÉ; TEJANI-BUTT, 2005).

Foram observadas ainda diferenças no conteúdo de dopamina, serotonina e seus metabólitos (em regiões cerebrais como núcleo acúmbens, amígdala e córtex) entre ratos de linhagens P (preferência ao álcool), NP (não preferência ao álcool) e HAD (alta preferência ao álcool), obtidas após sucessivos cruzamentos (STROTHER et al., 2005).

Esse comportamento relacionado à dependência química poderia ser uma reação compensatória aos baixos níveis de dopamina naturais dessas linhagens (GATTO et al., 1987; MCBRIDE, 1992), haja vista que já é conhecido que há aumento no conteúdo de dopamina extracelular no núcleo acúmbens após a administração de etanol em ratos Wistar (YOSHIMOTO et al., 1991).

A ativação dopaminérgica do NAc tem sido amplamente relacionada com os efeitos agudos do etanol no sistema de recompensa (HODGE; SAMSON; HARAGUCHI, 1992). Enquanto a autoadministração de etanol aumenta a liberação de dopamina do NAc em ratos não dependentes (WEISS et al., 1993), seu efeito mostra tolerância em animais dependentes. Por outro lado, durante a abstinência, há evidências significativas que a liberação dopaminérgica no NAc é deficiente. Quando é dada ao roedor a oportunidade de uma nova administração da droga durante a abstinência, há uma tentativa do sistema dopaminérgico de restabelecer os níveis extracelulares do neurotransmissor presentes no estado pré-abstinência. Assim, evidencia-se que a neurotransmissão dopaminérgica é um fator importante para a manutenção do prazer relacionado ao etanol e, por consequência, para continuação do abuso da substância (WEISS et al., 1996).

Apesar de poucos estudos abordarem o papel da neurotransmissão serotoninérgica nos efeitos do etanol há evidências de que ocorrem alterações neuroadaptativas similares àsquelas do sistema dopaminérgico. Enquanto a autoadministração de etanol aumenta agudamente a liberação de serotonina do NAc, a retirada da droga causa progressiva supressão da liberação de serotonina nessa região cerebral (YOSHIMOTO et al., 1991). Esses achados ratificam a relevância do sistema serotoninérgico na dependência ao etanol (LEMARQUAND; PIHL; BENKELFAT, 1994).

No córtex pré-frontal (CPF) medial, região que integra informações sensoriais, límbicas e autonômicas, também tem sido descrito estudos de dependência ao etanol (GROENEWEGEN; UYLINGS, 2000). Nenhuma mudança nas concentrações de dopamina extracelular do córtex pré-frontal foi observada nos ratos Wistar ou nos da linhagem P após a administração sistêmica de álcool ou salina. No entanto, as concentrações basais de dopamina são menores no CPF dos ratos P devido à atividade mais baixa dos neurônios dopaminérgicos que se projetam para essa região (ENGLEMAN et al., 2006). O CPF reflete os efeitos do conteúdo de dopamina no NAc,

sendo que circuitos neuronais entre essas duas áreas regulam o início e término de episódios de consumo de (SAMSON; CHAPPELL, 2003).

Estudos utilizando a técnica de microdiálise mostraram que também há um importante papel da amígdala na dependência ao etanol. A exposição à droga aumentou a liberação de dopamina no NAc, CPF e amígdala (WEISS et al., 1996). Foi observado com o procedimento de PCL, que lesões bilaterais na amígdala após a administração de etanol eliminaram completamente o condicionamento associado ao etanol (GREMEL; CUNNINGHAM, 2008). A amígdala parece mediar respostas às alterações ambientais, que influenciam na liberação não só de dopamina, como de serotonina, durante o uso do etanol. A exposição a fatores ambientais nas primeiras fases da vida seriam as responsáveis pelas diferentes respostas dopaminérgicas e serotoninérgicas de indivíduos expostos ao mesmo consumo da droga. A liberação de neurotransmissores alterada em indivíduos expostos a situações de estresse psicossocial - como a separação materna - que predispõem à dependência química, explicaria a variação de indivíduo para indivíduo dos efeitos reforçadores da mesma droga (ORELAND et al., 2011).

A exposição ao estresse tem sido destacada como um fator de grande importância na dependência de substâncias psicoativas. Entretanto, poucos estudos abordam o efeito do estresse sobre as alterações comportamentais relacionadas à dependência ao etanol, associando-as com alterações neuroquímicas. A investigação dessa interação entre estresse e as drogas que causam dependência é importante para o entendimento e formulação de estratégias de tratamento de dependentes de etanol que são expostos frequentemente a situações aversivas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Investigar os efeitos do estresse na dependência ao etanol e alterações neuroquímicas relacionadas a esses efeitos.

### **2.2. Objetivos específicos**

Padronizar um modelo animal de dependência ao etanol induzido pela administração repetida e intensa dessa substância e caracterizado pela indução da síndrome de abstinência, aumento do condicionamento e recaída ao etanol.

Avaliar a influência da exposição ao estresse nos comportamentos observados nesse modelo de dependência ao etanol padronizado.

Analisar o efeito da exposição ao estresse e etanol sobre as concentrações de dopamina, serotonina e seus metabólitos no núcleo acúmbens (NAc), amígdala e córtex pré-frontal (CPF) de camundongos.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados camundongos Swiss machos, com massa corporal inicial entre 25 e 35 gramas, proveniente de doação do Instituto Vallée (Uberlândia-MG). Os animais foram transferidos para nosso depósito de animais no mínimo 5 dias antes do início dos experimentos e mantidos em caixas moradia de polipropileno (4-5 animais por caixa) em condições controladas de temperatura ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo de luz (ciclo 12/12 horas, luzes apagadas às 18h) com livre acesso a alimento e água (exceto durante os procedimentos experimentais que envolviam alteração da dieta). As caixas moradia e bebedouros foram lavados, bem como a maravalha trocada, a cada 2-3 dias, para evitar crescimento de microrganismos e não ameaçar a saúde dos animais e mesmo alterar os resultados dos experimentos. Os testes comportamentais e os cuidados com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética para a Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (004/11 e 120/11 – documento em anexo).

#### **3.2. Estresse**

Foi utilizado o modelo de estresse por nado forçado descrito por McLaughlin , Marton-popovici; Chavkin, (2003) e Sperling (SPERLING et al., 2010), o qual tem demonstrado ser capaz de alterar o efeito do etanol e outras substâncias psicoativas de abuso. Durante 5 dias consecutivos, os camundongos foram colocados em um recipiente cilíndrico de 5 L preenchidos com 3,5 L de água, não sendo possível a fuga do animal. Nos dias 1, 3 e 5 os camundongos permaneceram na água por um único intervalo de 15 minutos e nos dias 2 e 4 por 3 intervalos de 6 minutos intercalados por 5 minutos em suas gaiolas moradia. Após cada exposição à água os camundongos tiveram o excesso de água dos pelos retirada por toalhas secas e retornaram para suas gaiolas moradia.

O grupo controle consistiu de animais mantidos nas mesmas condições laboratoriais, mas não expostos ao estresse.

#### **3.3. Administração crônica de etanol**

Com base em experimentos realizados previamente, a administração de etanol, foi realizada por via oral. Esse procedimento foi adaptado daquele descrito por

Bonassoli (BONASSOLI et al., 2011) para ratos. Foram disponibilizados aos animais bebedouros contendo uma dieta líquida a base do complemento alimentar Sustagen<sup>®</sup> (Mead Johnson, São Paulo-SP), sabor chocolate, para consumo a vontade, como única fonte de alimento por 3 períodos de 5 dias intercalados por 2 dias cada sem essa dieta líquida. No total foram 15 dias de exposição a essa dieta líquida com Sustagen<sup>®</sup> na concentração de 28,52g/100 mL de solução aquosa. Os grupos que não receberam etanol tiveram em suas dietas somente Sustagen<sup>®</sup> enquanto os grupos tratados com etanol tiveram acrescidos à solução etanol 6% (volume/volume) nos 2 primeiros dias e etanol 8% no restante da exposição à essa dieta. Entre os períodos de exposição à dieta a base de Sustagen os animais receberam a ração habitual para camundongos (Base Química Produtos Químicos LTDA, Águas Frias-SC). Durante todo o procedimento os animais também tiveram acesso a bebedouros com água filtrada para consumo à vontade.

As soluções foram trocadas diariamente para evitar a proliferação de microrganismos e reduzir a perda de etanol por evaporação, sendo disponibilizadas aos animais no mesmo horário (13:00). O consumo diário das dietas foi determinado pela mensuração das massas dos bebedouros antes e após sua exposição aos animais. Os animais também tiveram suas massas mensuradas para cálculo do consumo diário médio de etanol em g/kg do animal.

### **3.4. Avaliação da síndrome de abstinência ao etanol**

A síndrome de abstinência foi avaliada pela quantificação dos comportamentos relacionados à ansiedade no Labirinto em Cruz Elevada (LCE) e Campo Aberto (CA) 12 e 14 horas, respectivamente, após a interrupção da administração de etanol.

O aparato do LCE é formado por 4 braços elevados e opostos. Dois braços possuem paredes, sendo chamados de braços fechados. Os outros dois não possuem paredes, sendo chamados de braços abertos. O uso do labirinto se baseia no conflito gerado pela tendência natural dos roedores de explorar ambientes novos, na aversão por espaços abertos e situações potencialmente perigosas. A medida mais comum para evidenciar a ansiedade é a frequência de entradas e o tempo de permanência no braço aberto. Havendo uma diminuição no número de entradas e permanência nesses braços

abertos nos animais que apresentam altos níveis de comportamentos relacionados à ansiedade (RAMOS, 2008). São também avaliadas neste modelo medidas etológicas como a frequência de mergulhos para fora dos braços abertos, farejadas, auto-limpeza (*grooming*) e esticadas (CAROLA et al., 2002). O LCE utilizado nos experimentos consiste de 4 braços de dimensões iguais ( $31 \times 8 \times 47$  cm) elevados a 47 cm do solo, dois dos quais são fechados por paredes de 15 cm. Os camundongos foram colocados individualmente no centro do labirinto e tiveram seu comportamento filmado por 5 minutos para posterior análise da frequência e tempo gasto (em porcentagem) nos braços abertos ou fechados. Foram avaliadas além dos parâmetros convencionais de ansiedade, as seguintes medidas etológicas: a frequência de mergulhos (*head dips*, movimento exploratório com a cabeça e ombros para fora das laterais do labirinto) e esticadas (postura exploratória esticando o corpo para frente e retornando a posição original sem nenhuma locomoção para frente).

Duas horas após o teste no LCE, os animais foram avaliados no CA. O campo aberto utilizado (Insight Ltda, Ribeirão Preto-SP) consiste de um aparato circular de acrílico, com paredes transparentes base de 30 cm de diâmetro, dividida em 8 quadrantes centrais e 16 periféricos. Eles foram colocados no centro do aparato e foram filmados por 5 minutos para análise posterior do número de quadrantes centrais e periféricos percorridos pelos animais.

As exposições ao LCE e ao CA foram filmadas por câmeras colocadas acima dos aparatos e conectadas a um microcomputador para gravação dos vídeos. As gravações foram posteriormente analisadas para quantificação dos parâmetros avaliados em cada modelo. No CA, os parâmetros foram analisados por contagem manual e cronômetros. Para o LCE, foi utilizado o programa X-PloRat (FFCLRP-USP, Ribeirão Preto-SP).

### **3.5. Avaliação da preferência condicionada por lugar, extinção do condicionamento e recaída ao etanol**

As caixas de PCL (Insight Ltda, Ribeirão Preto-SP) consistem de aparatos retangulares de acrílico (45 cm de comprimento, 14 cm de largura e 15 cm de altura) divididas em 2 compartimentos grandes nas extremidades, com cor das paredes e

textura do assoalho distintas e 1 compartimento pequeno central separados entre si por portas em guilhotina.

O procedimento foi baseado no descrito por Brenhouse e Andersen (BREHOUSE; ANDERSEN, 2008) e Sperling (SPERLING et al., 2010). No vigésimo primeiro dia os camundongos foram colocados no compartimento central, com as portas entre os compartimentos abertas para estabelecer a preferência inicial do animal por cada compartimento durante o período de 20 minutos. Nos dias 22 a 29 foram administradas injeções intraperitoneais de etanol ou salina diariamente (intercaladas) e os animais foram confinados nos compartimentos das extremidades. Foi administrada nos dias 22, 24, 26 e 28 solução de etanol na dose de 0,8 g/kg e os animais foram confinados por 20 minutos no compartimento menos preferido, avaliado no dia 21. A injeção de salina precedeu, nos dias 23, 25, 27 e 29, o confinamento do animal no ambiente mais preferido. No dia 30 foi realizado o teste da PCL, sendo os animais colocados no compartimento intermediário da caixa, com as portas abertas, e o animal percorreu livremente por 20 minutos os compartimentos. O tempo gasto em cada compartimento foi comparado com a preferência inicial (dia 21) para análise da mudança na busca do animal pelo ambiente pareado ao etanol.

Após o teste da PCL, realizado no dia 30, os animais iniciaram a fase de extinção do seu condicionamento, tendo para isso sido expostos diariamente à caixa de PCL sem receber injeção e percorrido livremente os diferentes compartimentos. Nos dias 33, 36 e 39 foi avaliado o tempo de permanência em cada ambientes para verificar se houve extinção do condicionamento e se os animais podiam assim ser submetidos ao teste de recaída.

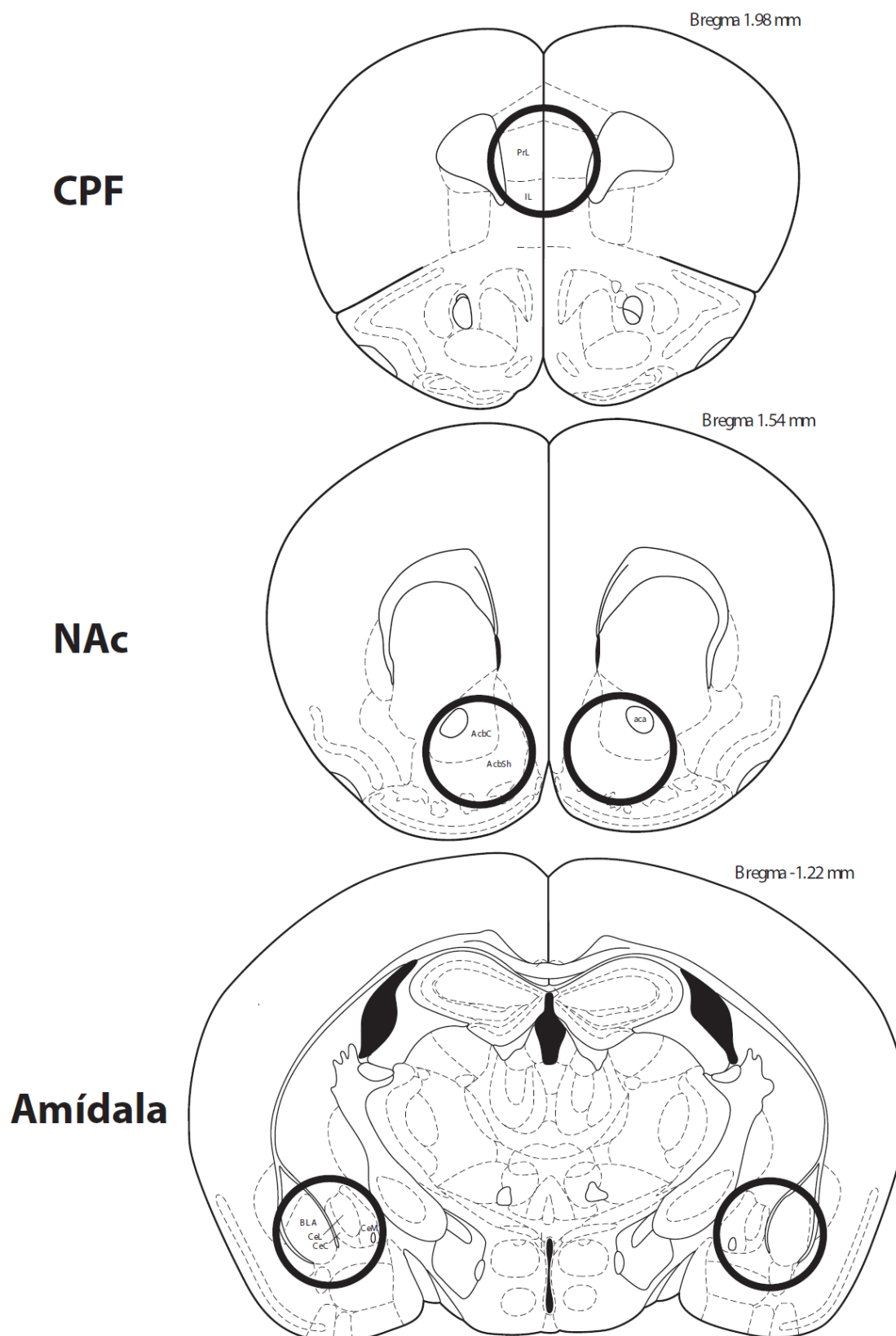
No dia 40, foi realizado o teste de recaída. Nesse teste, o animal foi submetido ao estresse de nado forçado antes de ser exposto à caixa de PCL para avaliação do tempo de permanência em cada compartimento dessa caixa de PCL. O estresse do nado forçado para recaída foi realizado por 15 minutos para cada animal, havendo um intervalo de 10 minutos entre o final do estresse e a exposição à caixa de PCL.

Todas as exposições à caixa de PCL foram filmadas por câmeras colocadas acima dos aparatos e conectadas a um microcomputador para gravação dos filmes. Os filmes foram analisados posteriormente e foi quantificado por cronômetros o tempo que cada animal permaneceu em cada um dos compartimentos da caixa.

Com o procedimento descrito acima foi possível avaliar 3 fatores importantes desse teste: a aquisição da PCL, o tempo necessário para extinção da PCL e a recaída induzida por uma nova exposição ao estresse.

### **3.6. Quantificações das concentrações de dopamina, serotonina e seus metabólitos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a detector eletroquímico**

Os encéfalos foram dissecados em criostato sob temperatura de -15 a -20°, seguindo-se as coordenadas estereotáticas do Atlas de Paxinos e Franklin (2001) (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). Após sucessivos cortes coronais, amostras de 1mm de espessura foram retiradas do encéfalo respeitando as seguintes coordenadas anteroposteriores: CPF, Bregma 1,98 mm, NAc, Bregma 1,54 mm e amígdala, Bregma 1,22 mm. Essas amostras foram retiradas por meio de agulha de ponta chata de 15 Gauge, como representado na Figura 1.



**Figura 1: Localização encefálica das regiões extraídas para quantificação dos neurotransmissores e seus metabólitos. Os círculos representam as regiões dissecadas.**

A técnica para determinação destas substâncias baseou-se naquelas descritas por Cannazza e Patel (CANNAZZA et al., 2005; PATEL et al., 2005). Em síntese, as estruturas cerebrais foram dissecadas e congeladas (-80°C) para a determinação das concentrações de dopamina, serotonina, HVA, DOPAC e 5-HIAA. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em ácido perclórico 0,1M, centrifugadas a 13.150 g, por 20 min e 4°C. Os volumes de homogeneização foram os seguintes: 80 µL para o CPF medial e amígdala e 100 µL para o NAc.

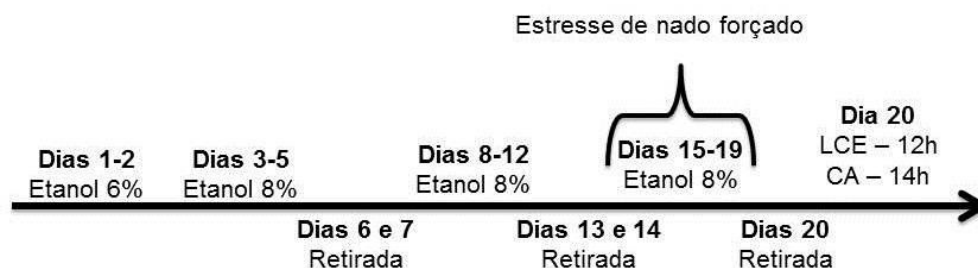
Trinta microlitros do sobrenadante foram injetados automaticamente no sistema de cromatografia. O sistema de CLAE consiste do cromatógrafo 2465 Waters® Alliance (Waters, Milford, MA-USA) com um detector eletroquímico 2465 de carbono vítreo e coluna de fase-reversa (Symmetry C18, 150 mm x 4,6 mm, 5 µm e 100-Å de diâmetro de poro da partícula; Waters). A diferença de potencial foi ajustada para 800 mV versus um eletrodo de referência de Ag/AgCl. A fase móvel, em fluxo de 0,8 mL/minuto consistiu de ácido cítrico (50 mM), KCl (2 mM), EDTA (0,1 mM), 9,86% de metanol e 2,11% de acetonitrila, ajustada para pH 3,2. A fase móvel foi filtrada a vácuo e degaseificada por ultra-som antes da aplicação.

A curva de calibração foi construída com soluções padrões de 1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400 e 600 ng/mL de dopamina, DOPAC, HVA, serotonina e 5-HIAA injetados no cromatógrafo em triplicata. O limite de detecção e quantificação, já padronizado nesse aparelho, foi respectivamente, para a dopamina: 0,5 e 1,66, para o DOPAC: 0,7 e 2,4, para o HVA: 1,9 e 6,4, para a serotonina: 1,0 e 3,5 e para o 5-HIAA: 1,3 e 4,26 ng/mL. Por fim, as concentrações das substâncias foram corrigidas pela massa das amostras de tecido dissecadas, tendo sido expressas em ng da substância por mg de tecido. Com base na concentração dessas substâncias, foi calculado o turnover dopaminérgico por meio da razão DOPAC+HVA/dopamina e o turnover serotoninérgico

### **3.7. Experimento 1- Avaliação dos efeitos do estresse na síndrome de abstinência ao etanol.**

Os animais foram expostos ao procedimento de administração crônica de etanol, sendo que no último período de exposição à dieta líquida, contendo ou não

etanol, parte dos animais foi exposta ao estresse de nado forçado por 5 dias ([item 3.2](#)) nos mesmos dias da dieta líquida. Após o último dia desse procedimento, todos os grupos experimentais receberam ração para que no dia seguinte os animais fossem expostos ao LCE e CA ([item 3.4](#)), 12 e 14 horas, respectivamente, após a retirada do etanol, tal como mostra a figura 1 abaixo:



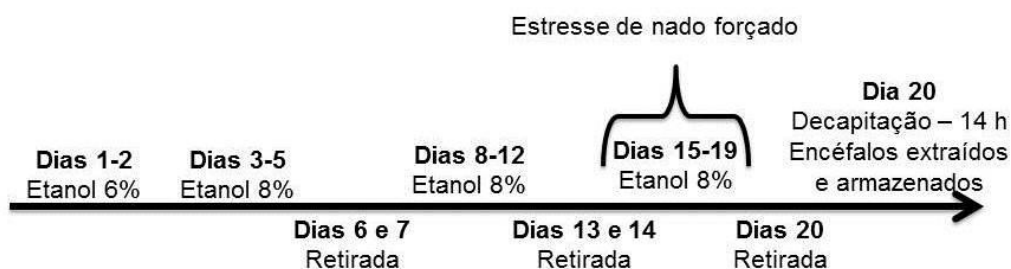
**Figura 2: Procedimento experimental utilizado para a avaliação dos efeitos da exposição ao etanol e ao estresse sobre a síndrome de abstinência.**

Os grupos experimentais (N = 8-10/grupo) foram:

• Veículo - Sem estresse	• Etanol crônico - Sem estresse
• Veículo - Estresse	• Etanol crônico - Estresse

### **3.8. Experimento 2- Avaliação dos efeitos do estresse e da exposição crônica ao etanol no conteúdo de dopamina, serotonina e seus metabólitos.**

Os animais foram submetidos ao procedimento de administração crônica de etanol, sendo que no último período de exposição à dieta líquida, contendo ou não etanol, parte dos animais foram exposta ao estresse de nado forçado por 5 dias ([item 3.2](#)) nos mesmos dias da dieta líquida. Após o último dia desse procedimento, todos os grupos experimentais receberam solução contendo somente Sustagen<sup>®</sup> por 14 horas. Depois disso, os animais foram decapitados em guilhotina e tiveram seus encéfalos extraídos (em 60 a 90 segundos) e congelados em nitrogênio líquido (-196 °C) para em seguida serem armazenados a -20 °C até a dissecação das áreas encefálicas de interesse e quantificações das concentrações de dopamina, serotonina e seus metabólitos ([item 3.6](#)) tal como mostra a Figura 3 abaixo:



**Figura 3: Procedimento experimental utilizado para a avaliação dos efeitos da exposição ao etanol e ao estresse sobre a concentração de dopamina, serotonina e seus metabólitos no CPF, NAc e amígdala.**

Essa técnica de neuroquímica foi realizada no Laboratório de Neuropsicofarmacologia, sob a coordenação da Profa. Dra. Cleopatra S. Planeta, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara-SP. Os grupos experimentais (N = 9/grupo) foram:

• Veículo - Sem estresse	• Etanol crônico - Sem estresse
• Veículo - Estresse	• Etanol crônico - Estresse

### **3. 9. Experimento 3- Padronização do modelo de administração de etanol para indução da preferência condicionada por lugar ao etanol.**

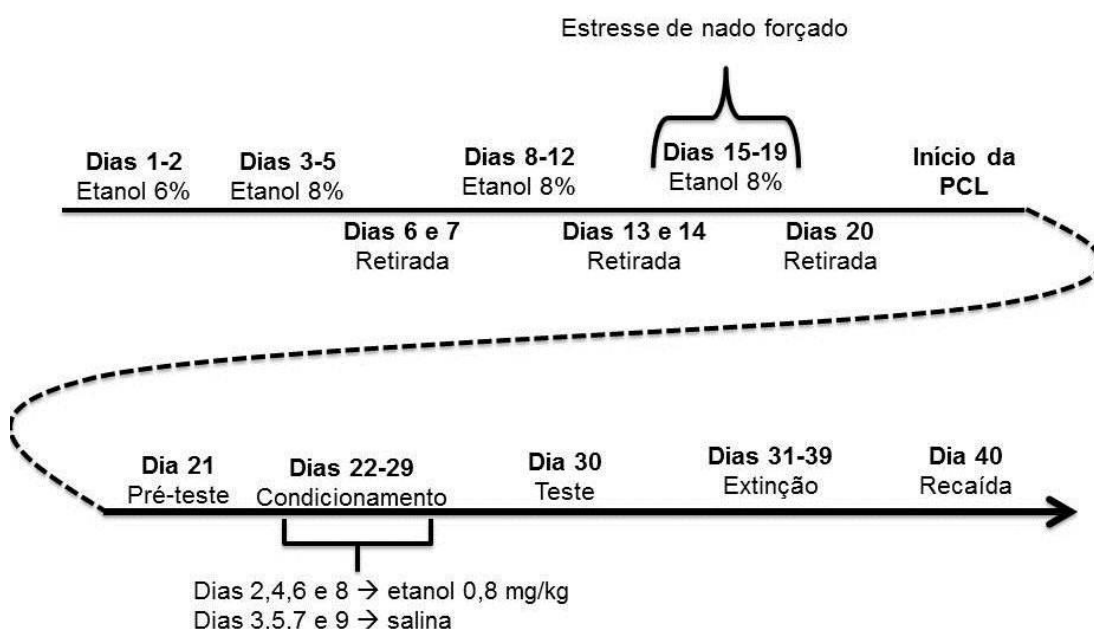
A fim de identificar a concentração ideal de etanol a ser injetada intraperitonealmente durante o período de condicionamento, isto é, a que induzisse melhor o condicionamento droga, foi realizado um ensaio de padronização utilizando as doses de 0,8 e 1,6 mg/kg. Assim, os animais foram submetidos ao procedimento de avaliação da PCL (item 3.5.) para avaliação do condicionamento ao etanol em resposta às diferentes concentrações.

Os grupos experimentais (N = 7/grupo) foram:

• Salina
• Etanol 0,8 mg/kg
• Etanol 1,6 mg/kg

### 3. 10. Experimento 4 - Avaliação dos efeitos do estresse na expressão da preferência condicionada por lugar, extinção e recaída ao etanol.

Os animais foram expostos ao procedimento de administração crônica de etanol (item 3.3), sendo que no último período de exposição à dieta líquida, contendo ou não etanol, parte dos animais foram expostos ao estresse de nado forçado por 5 dias (item 3.2) nos mesmos dias da dieta líquida. No dia seguinte ao final dos procedimentos acima teve início o procedimento de avaliação da PCL (item 5.5) para quantificação dos comportamentos de expressão, extinção e reinstalação do condicionamento ao etanol. A Figura 4 mostra a sequência temporal do procedimento da PCL.



**Figura 4: Procedimento experimental utilizado para a avaliação dos efeitos da exposição ao etanol e ao estresse sobre a PCL.**

Os grupos experimentais (N = 9-10/grupo) foram:

• Veículo - Sem estresse	• Etanol crônico - Sem estresse
• Veículo - Estresse	• Etanol crônico - Estresse

### 3.11. Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo programa Statistica (99 ed., StatSoft Inc.). Os resultados dos experimentos 1 e 2 foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA) de duas vias considerando os fatores etanol crônico (etanol e veículo) e estresse (estresse e sem estresse). Nos casos em que ANOVA mostrou diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) foi realizado o teste *post hoc* de Duncan.

Os resultados dos experimentos 3 foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA) de duas vias considerando os fatores etanol (salina, etanol 0,8 e etanol 1,6 mg/kg) e fases (pré-condicionamento e pós-condicionamento). Nos casos em que ANOVA mostrou diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) foi realizado o teste de comparação planejada entre os grupos de interesse.

Os resultados dos experimentos 4 foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA) de três vias considerando os fatores etanol crônico (etanol e veículo) e estresse (estresse e sem estresse) e fases (pré-condicionamento, pós-condicionamento, extinção e recaída). Nos casos em que ANOVA mostrou diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) foi realizado o teste de comparação planejada entre os grupos de interesse.

## 4. RESULTADOS

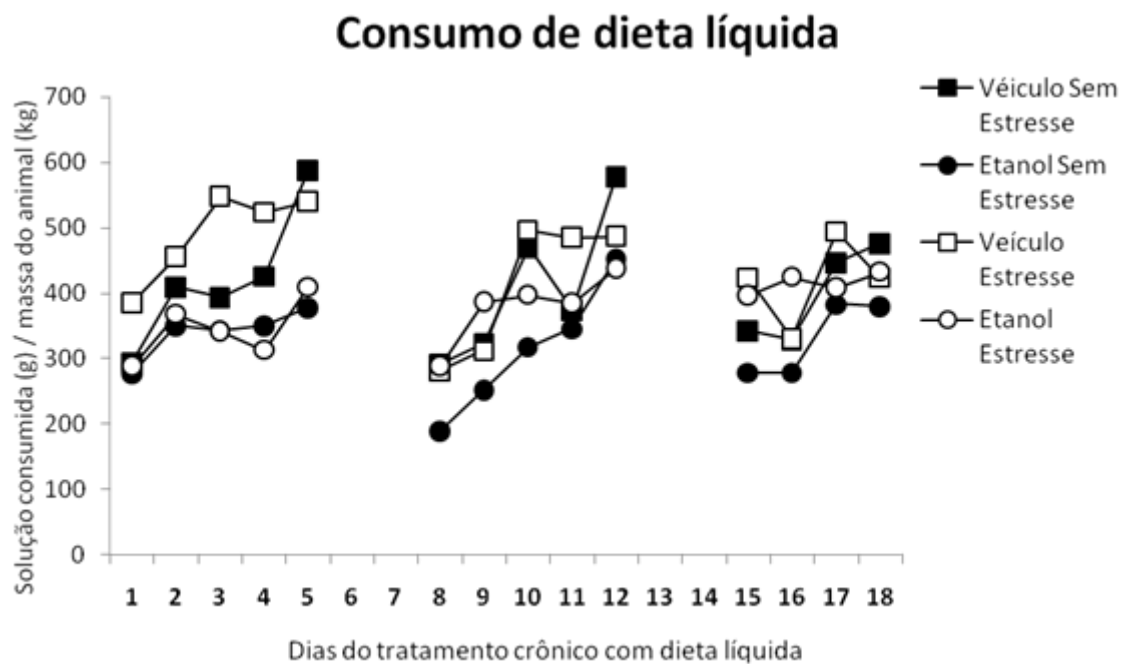
### 4.1. Consumo de solução veículo e etanol

Como mencionado no item 3.3., os animais receberam uma solução veículo à base do composto Sustagen<sup>®</sup>, contendo etanol ou não. Na Figura 1 pode ser observado o gráfico que representa o consumo diário total de solução para cada um dos grupos experimentais.

Como pode ser notado, nos dias 6, 7, 13 e 14 não há valor correspondente no eixo y por se tratar dos dias em que os animais ficaram livres da dieta e receberam a ração convencional para camundongos. No último dia do terceiro ciclo da dieta, que corresponderia ao dia 19, não há representação dos valores, pois nesse dia os bebedouros com a solução foram retirados durante a noite, antes de completar 24 horas de consumo, para que os testes comportamentais fossem realizados no dia seguinte com o animal sob os efeitos da síndrome de abstinência.

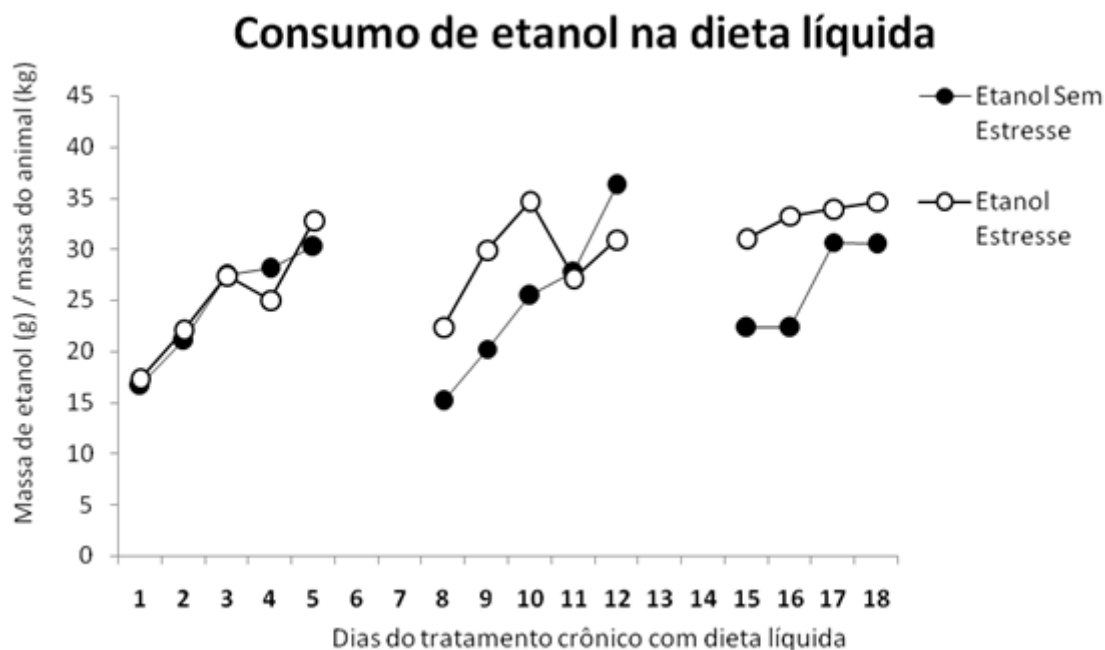
Não pode ser realizada análise estatística dos dados representados nessa figura, mas pode ser vista uma clara semelhança do consumo de solução entre os grupos experimentais. O fato de alguns grupos terem acrescidos etanol à solução desde o início, não fez com que eles a consumissem de maneira diferente. Assim como os animais que foram submetidos ao estresse nos cinco últimos dias da dieta não mostraram alteração evidente no consumo da solução durante esse período.

Na Figura 5, pode ser observada ainda uma tendência de aumento linear do consumo com o decorrer do tempo dentro de cada ciclo de cinco dias. É possível notar que entre os três períodos nos quais a dieta foi administrada, também não houve diferença, isto é, os animais aumentavam o consumo de solução proporcionalmente ao aumento de sua massa corpórea. Em dados não mostrados, também não foi revelada diferença no ganho de massa entre os grupos, assim como em experimentos prévios, não foram observadas diferenças substanciais na massa corporal dos animais que consumiam a dieta líquida com ou sem etanol.



**Figura 5:** Consumo de solução a base do composto alimentar Sustagen<sup>®</sup>, contendo ou não etanol, durante os 15 dias de administração da dieta líquida. Os valores estão representados pela relação entre a quantidade média de solução consumida e a massa média de cada grupo experimental. Os dias que não possuem valores correspondentes representam aqueles em que os animais receberam ração convencional em vez da dieta líquida.

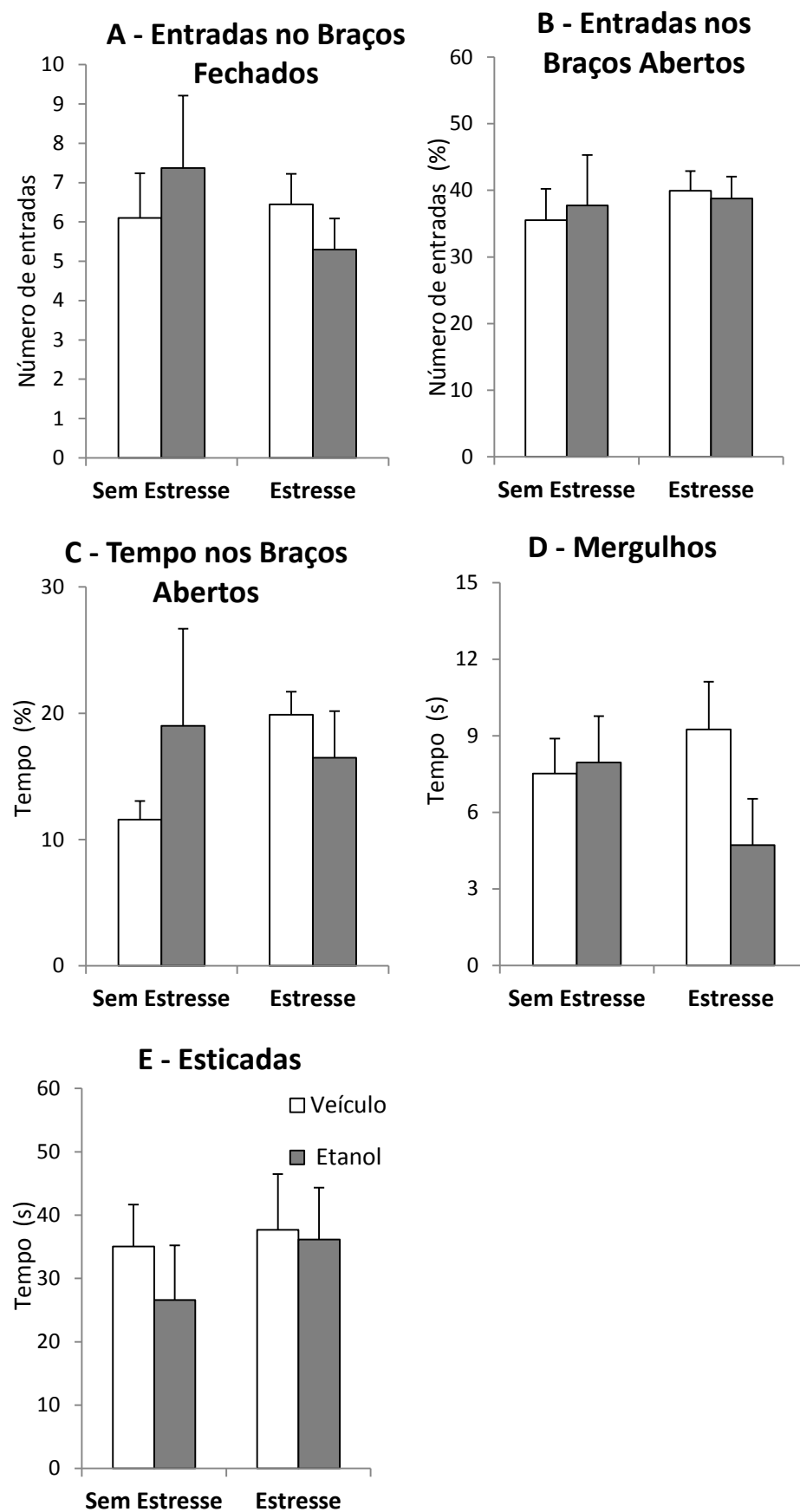
Na Figura 6, está representado graficamente o consumo de etanol diário pelos grupos que receberam a droga em sua dieta líquida durante 15 dias. Pode ser observado nesse gráfico que, mesmo não havendo análise estatística, há uma similaridade no consumo de etanol entre o grupo que foi submetido ao estresse nos últimos dias da dieta e o que não foi submetido, não houve interferência do procedimento de estresse sobre o consumo. Com o passar dos dias dentro de cada ciclo, houve ainda um aumento da quantidade consumida de etanol, assim como houve, na figura anterior, um aumento do consumo da solução total.



**Figura 6:** Consumo de etanol presente na solução a base no composto alimentar Sustagen®, durante os 15 dias de administração da dieta líquida. Os valores estão representados pela relação entre a quantidade média de etanol consumida e a massa média de cada grupo experimental. Os dias que não possuem valores correspondentes representam aqueles em que os animais receberam ração convencional em vez da dieta líquida.

#### 4.2. Síndrome de Abstinência

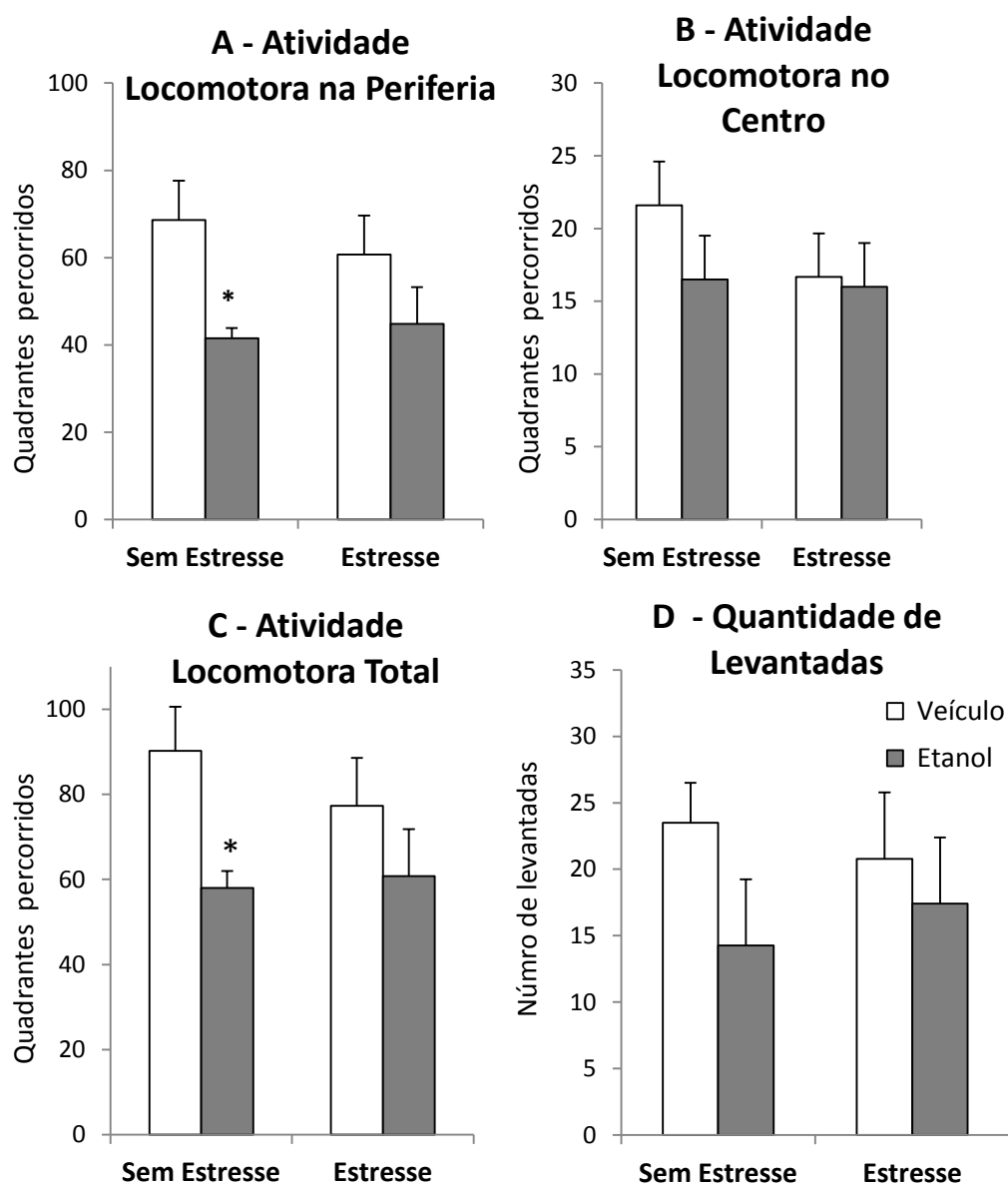
Como descrito no item 3.7, foram realizados os testes de LCE e CA para análise dos efeitos do tratamento com etanol e estresse sobre a síndrome de abstinência. Como observado na Figura 7, a ANOVA não revelou diferenças significativas para os fatores etanol crônico ou estresse quando analisado o número de entradas no braço fechado (Fig. 7A); entradas no braço aberto (Fig. 7B), tempo no braço aberto (Fig. 7C) mergulhos (Fig. 7D) e esticadas e (Fig. 7E) ( $p > 0,05$ ).



**Figura 7: Efeito do estresse de nado forçado e exposição crônica ao etanol sobre comportamentos relacionados à ansiedade no LCE. A- número de entradas dos**

animais de cada grupo em algum dos braços fechados. **B**- porcentagem de entradas nos braços abertos em relação ao total de entradas. **C** – Porcentagem do tempo gasto nos braços abertos em relação ao tempo total. **D** – Número de mergulhos realizados. **E** – Número de esticada realizadas. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. N = 8-10 animais por grupo.

Na análise dos resultados do CA, mostrados na Figura 8, ANOVA não evidenciou diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) em relação à atividade locomotora central, e número de levantadas. Quanto à atividade locomotora periférica e total foram observadas diferenças apenas para o fator etanol ( $F_{1,33} = 6,8$  e  $F_{1,33} = 5,6$ , respectivamente;  $p \leq 0,05$ ). Com o teste *post hoc* de Duncan, foi percebida diferença do grupo veículo sem estresse em relação ao etanol sem estresse na atividade locomotora periférica e total ( $p \leq 0,05$  em ambos os parâmetros). O tratamento crônico com etanol reduziu a locomoção nos animais não estressados, o que não foi observado no grupo exposto ao estresse.



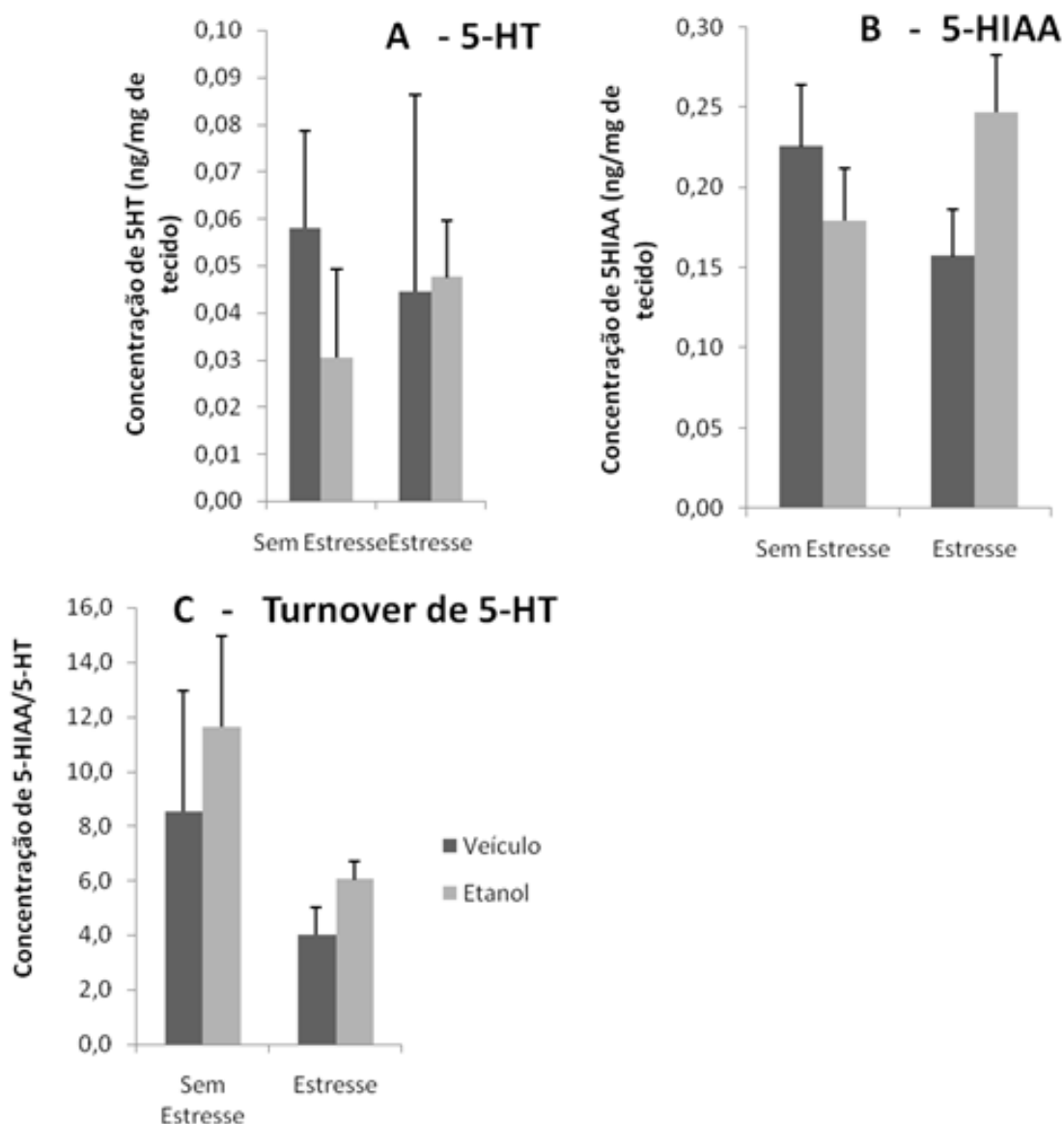
**Figura 8: Efeito do estresse de nado forçado e exposição crônica ao etanol sobre comportamentos relacionados à ansiedade e locomoção no Campo Aberto. A-** Número de quadrantes periféricos percorridos. **B-** Número de quadrantes centrais percorridos. **C** – Número de quadrantes totais percorridos. **D** – Número de levantadas realizadas. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. \* $p \leq 0,05$  quando a diferença em relação ao grupo veículo sem estresse for significativa.(MANOVA, teste de Duncan). N = 8-10 animais por grupo

### **4.3 Efeitos do estresse e da exposição crônica ao etanol sobre a atividade dopaminérgica e serotoninérgica no núcleo acúmbens, córtex pré-frontal e amígdala**

Para compreender melhor o substrato neuronal que promove as alterações observadas nos testes comportamentais realizados durante a síndrome de abstinência, foi realizada a quantificação da dopamina, serotonina e seus metabólitos nas amostras dos encéfalos dos animais após exposição crônica ao etanol e estresse (Figuras 9, 10, 11, 12, 13 e 14), tal como descrito no item 3.8.

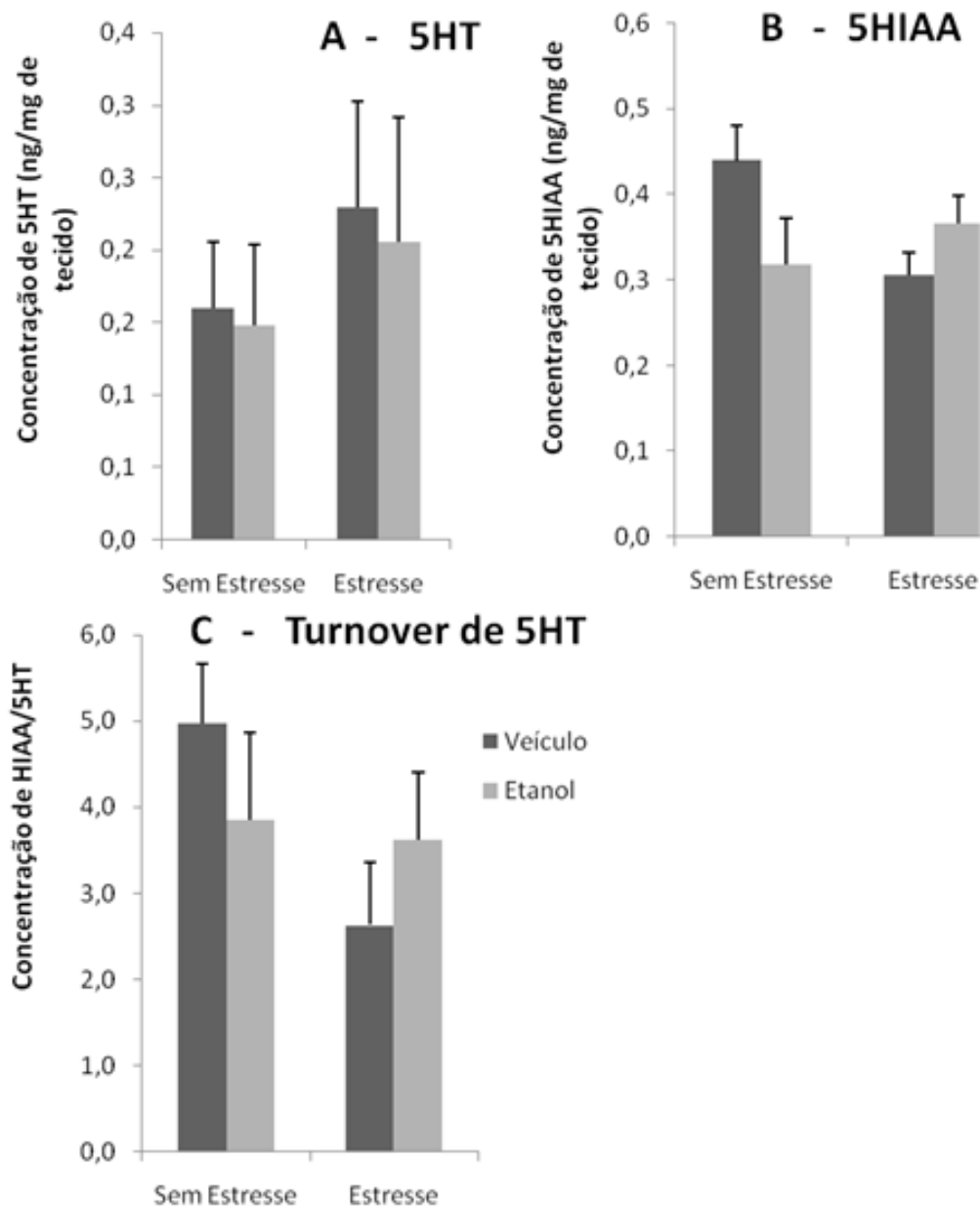
ANOVA mostrou que não houve diferenças entre os grupos quanto ao conteúdo de serotonina, de seu metabólito 5-HIAA e do *turnover* serotoninérgico em nenhuma das regiões ( $p>0,05$ ). Esses resultados são apresentados nas figuras 9, 10 e 11, respectivamente, para o CPF, NAc e amígdala ( $p>0,05$ ).

### CÓRTEX PRÉ-FRONTAL



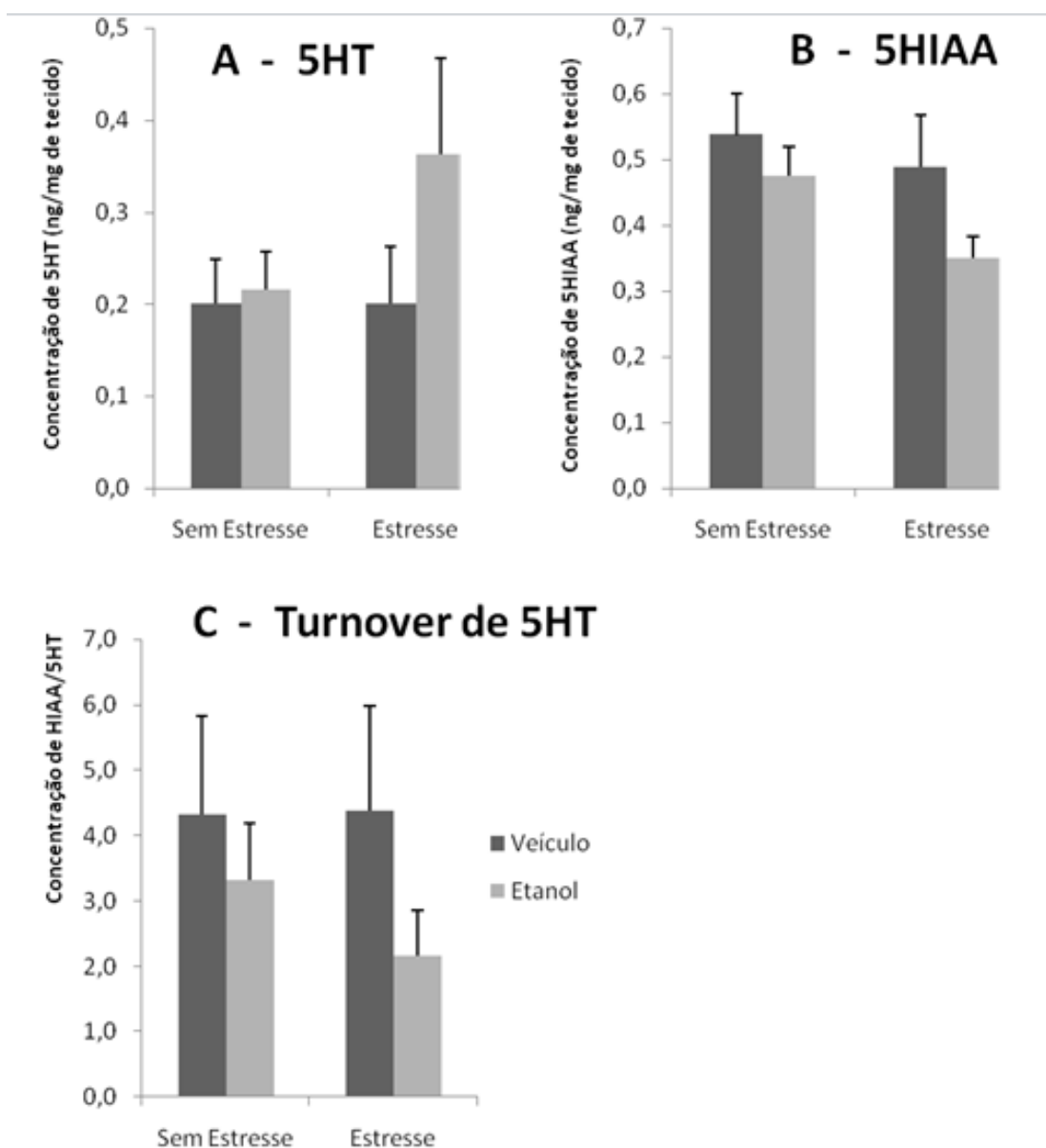
**Figura 9: Efeitos da exposição crônica ao estresse e etanol sobre a concentração de serotonina (5-HT), seu metabólito e o turnover serotoninérgico no córtex pré-frontal.** Os dados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da razão entre a concentração em nanogramas de **A** -serotonina ou **B** - 5-HIAA e a massa em miligramas da amostra de tecido do CPF retirada dos animais de cada grupo experimental. Em **C**, os dados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da razão entre a quantidade em nanogramas de 5-HIAA e a quantidade em nanogramas de serotonina presentes nas amostras de cada grupo experimental. N = 9 animais por grupo.

### NÚCLEO ACÚMBENS



**Figura 10: Efeitos da exposição crônica ao estresse e etanol sobre a concentração de serotonina (5-HT), seu metabólito e o turnover serotoninérgico no núcleo acúmbens.** Os dados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da razão entre a concentração em nanogramas de **A** -serotonina ou **B** -5-HIAA e a massa em miligramas da amostra de tecido do NAc retirada dos animais de cada grupo experimental. Em **C** os dados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da razão entre a quantidade em nanogramas de 5-HIAA e a quantidade em nanogramas de serotonina presentes nas amostras de cada grupo experimental. N = 9 animais por grupo.

### AMÍDALA

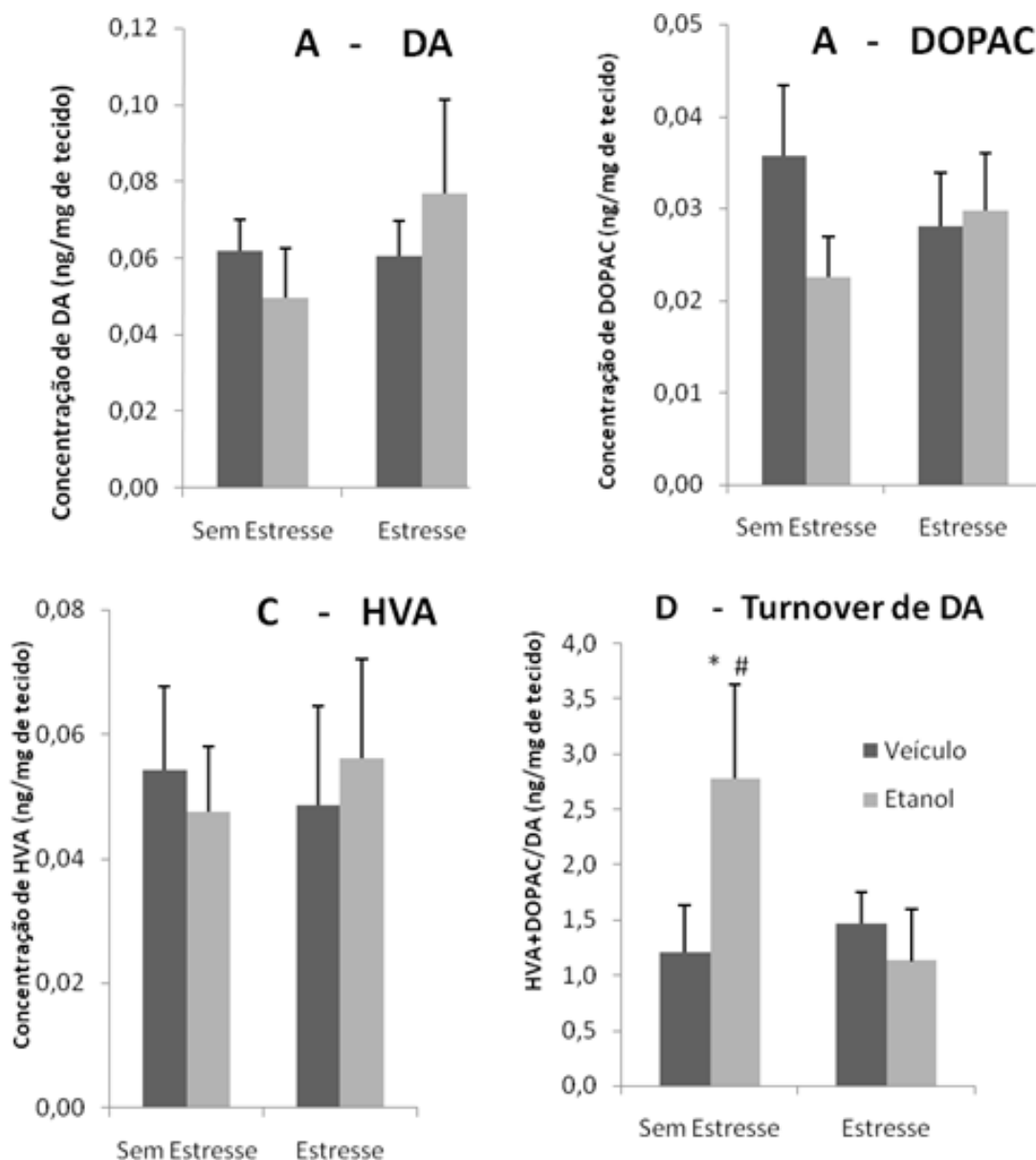


**Figura 11: Efeitos da exposição crônica ao estresse e etanol sobre a concentração de serotonina (5-HT), seu metabólito e o turnover serotoninérgico na amígdala.** Os dados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da razão entre a concentração em nanogramas de **A** -serotonina ou **B** -5-HIAA e a massa em miligramas da amostra de tecido da amígdala retirada dos animais de cada grupo experimental. Em **C** os dados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da razão entre a quantidade em nanogramas de 5-HIAA e a quantidade em nanogramas de serotonina presentes nas amostras de cada grupo experimental. N = 9 animais por grupo.

Quando analisado o conteúdo dopaminérgico no CPF, a ANOVA não mostrou diferenças na concentração de dopamina, DOPAC ou HVA para qualquer um dos fatores ( $p > 0,05$ ). Contudo, para o *turnover* dopaminérgico, a interação entre os fatores estresse e etanol crônico foi quase significativa ( $F_{1,28} = 3,59$ ;  $p = 0,068$ ), tendo o teste *post*

*hoc* de Duncan revelado que o *turnover* dopaminérgico foi maior no grupo etanol sem estresse em relação ao grupo veículo sem estresse e etanol estresse ( $p \leq 0,05$ ), indicando que apenas a exposição crônica ao etanol teve influência sobre esse parâmetro no CPF.

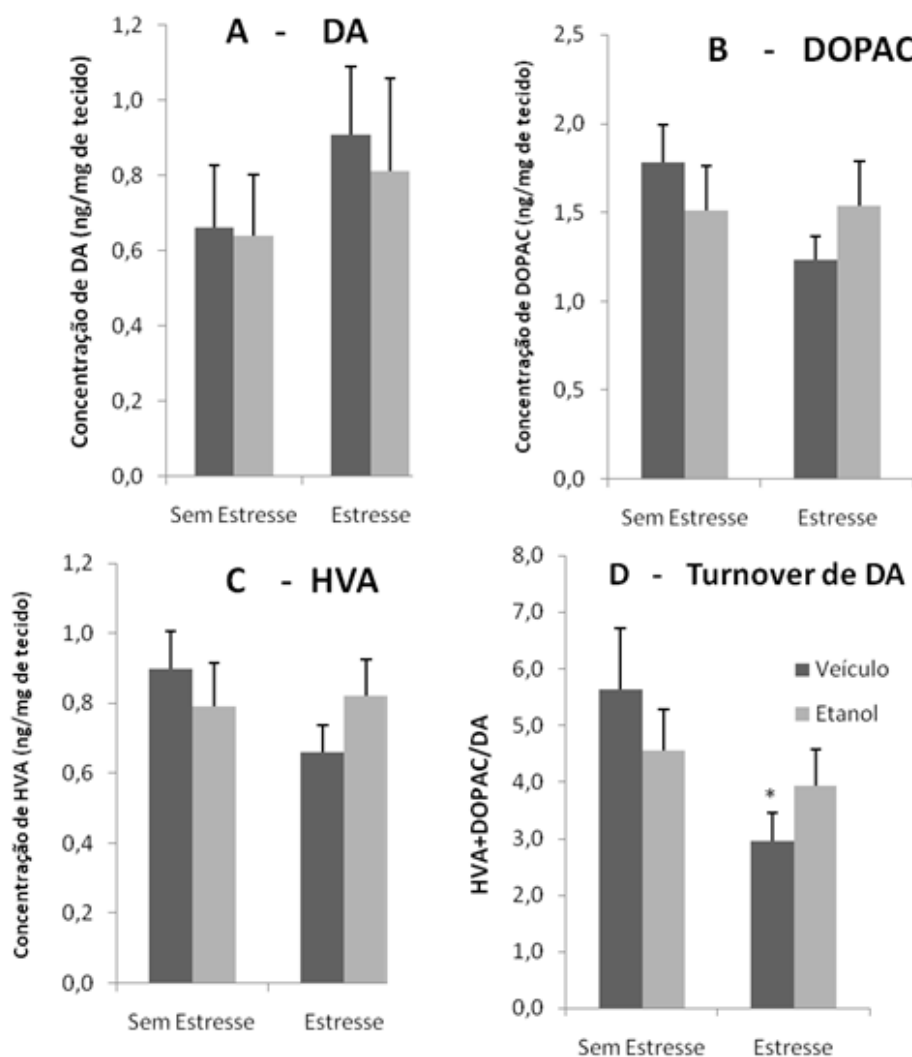
### CÓRTEX PRÉ-FRONTAL



**Figura 12: Efeito da exposição crônica ao estresse e etanol sobre a concentração de dopamina e seus metabólitos no córtex pré-frontal.** Os dados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da razão entre a concentração em nanogramas de **A**-dopamina, **B** - DOPAC ou **C** - HVA e a massa em miligramas da amostra de tecido do córtex pré-frontal retirada dos animais de cada grupo experimental. Em **D** os dados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da razão entre a quantidade em nanogramas de DOPAC+HVA e a quantidade em nanogramas de dopamina presentes nas amostras de cada grupo experimental\*  $p \leq 0,05$ : diferente do grupo veículo sem estresse. #  $p \leq 0,05$ : diferente do grupo etanol estresse (teste de Duncan). N = 9 animais por grupo.

No NAc, também não foram observadas diferenças significativas pela ANOVA na concentração de dopamina, DOPAC ou HVA ( $p > 0,05$ ) entre os fatores analisados. Todavia, o *turnover* dopaminérgico apresentou diferença quase significativa para o fator estresse ( $F_{1,29} = 3,83$ ;  $p = 0,059$ ), com o teste *post hoc* de Duncan evidenciando menor turnover dopaminérgico no grupo veículo estresse em relação ao veículo sem estresse ( $p \leq 0,05$ ), ou seja, apenas o estresse interferiu sobre a atividade dopaminérgica do NAc.

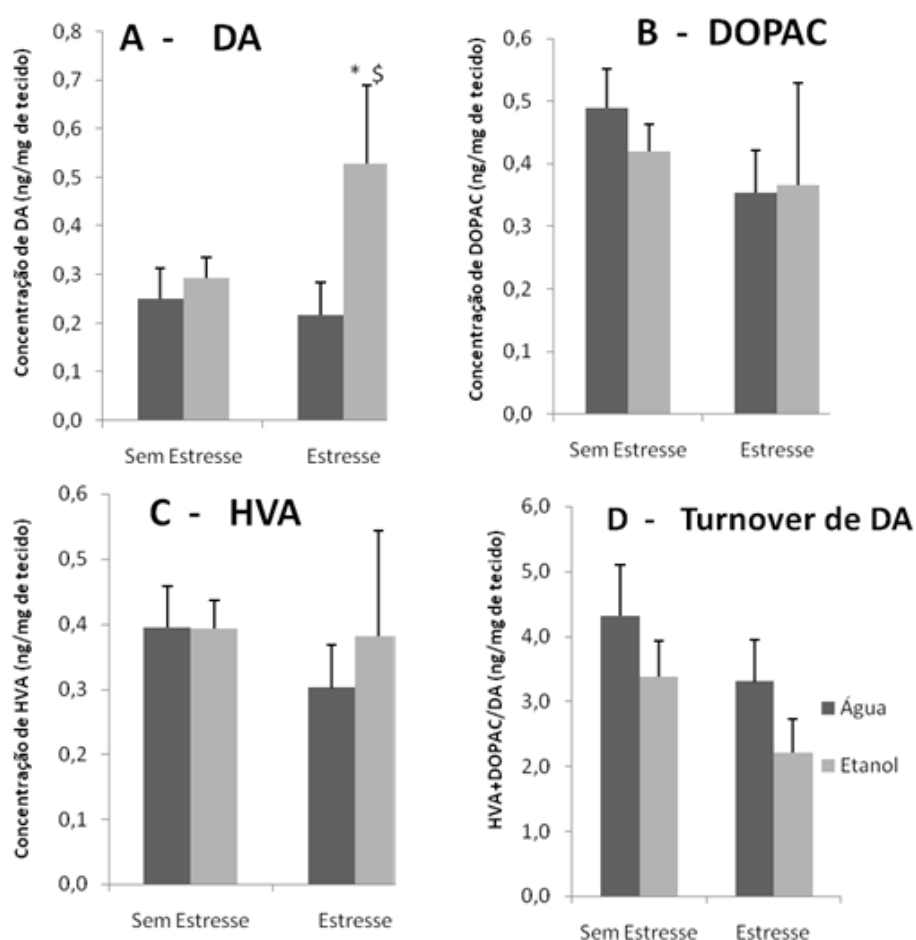
### NÚCLEO ACÚMBENS



**Figura 13: Efeito da exposição crônica ao estresse e etanol sobre a concentração de dopamina e seus metabólitos núcleo acúmbens.** Os dados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da razão entre a concentração em nanogramas de **A**- dopamina, **B** - DOPAC ou **C** - HVA e a massa em miligramas da amostra de tecido do NAc retirada dos animais de cada grupo experimental. Em **D** os dados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da razão entre a quantidade em nanogramas de DOPAC+HVA e a quantidade em nanogramas de dopamina presentes nas amostras de cada grupo experimental \*  $p \leq 0,05$ ; diferente do grupo veículo sem estresse. N = 9 animais por grupo.

Por outro lado, na amígdala, a ANOVA revelou diferença significativa para o fator etanol crônico ( $F_{2,29} = 4,19$ ;  $p \leq 0,05$ ). O teste *post hoc* de Duncan mostrou que o grupo etanol estresse apresentou maior quantidade de dopamina em relação ao veículo sem estresse e veículo estresse ( $p \leq 0,05$ ), a diferença em relação ao grupo etanol sem estresse foi quase significativa ( $p = 0,065$ ). Contudo, não houve alteração na concentração de DOPAC, HVA ou do *turnover* dopaminérgico ( $p > 0,05$ ). Isto é, a dopamina está com seu conteúdo elevado na amígdala devido ao tratamento simultâneo com etanol e estresse, no entanto, não houve alteração dos metabólitos ou turnover, sugerindo aumento da quantidade estocada.

### AMÍDALA



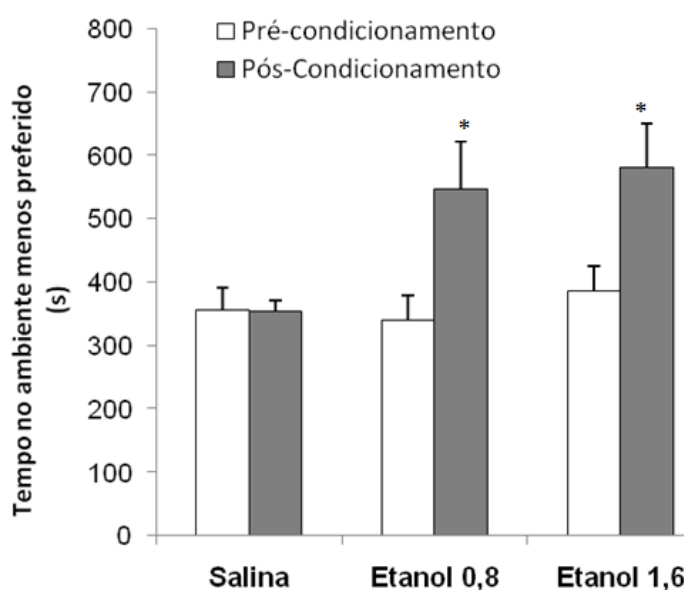
**Figura 14: Efeito da exposição crônica ao estresse e etanol sobre a concentração de dopamina e seus metabólitos na amígdala.** Os dados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da razão entre a concentração em nanogramas de **A-** dopamina, **B -** DOPAC ou **C -** HVA e a massa em miligramas da amostra de tecido da amígdala retirada dos animais de cada grupo experimental. Em **D** os dados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da razão entre a quantidade em nanogramas de DOPAC+HVA e a quantidade em nanogramas de dopamina presentes nas amostras de cada grupo experimental: \*  $p \leq 0,05$ : diferente do grupo veículo sem estresse. \$  $p \leq 0,05$ : diferente do grupo veículo estresse (teste de Duncan). N = 9 animais por grupo.

#### 4.4. Padronização do modelo de preferência condicionada por lugar ao etanol

Após conhecidas as alterações neuroquímicas promovidas pela exposição ao estresse e etanol, foram realizados testes para verificar se essas alterações poderiam predispor a mudanças no condicionamento ao pela substância. Como mencionado no item 3.5, o condicionamento ao etanol foi avaliada nas caixas de preferência condicionada por lugar. Entretanto, antes de observar os efeitos crônicos do etanol e estresse, houve um teste prévio, descrito no item 3.9, para padronizar qual a dose de etanol seria a mais adequada para ser injetada intraperitonealmente durante a fase de condicionamento, isto é, a mais eficiente para parear o animal ao ambiente.

A ANOVA mostrou diferença significativa para o fator etanol ( $F_{2,18} = 4,09$ ;  $p \leq 0,05$ ) e interação entre os fatores etanol e fases ( $F_{1,18} = 9,36$ ;  $p \leq 0,01$ ). A análise da comparação planejada, foi observado que em ambos os grupos tratados com etanol (0,8 e 1,6 mg/kg) a permanência no ambiente menos preferido durante o teste pós-condicionamento foi maior que no pré-condicionamento ( $p \leq 0,05$ ), o que não ocorreu no grupo salina ( $p > 0,05$ ). Em outras palavras, as injeções de etanol fizeram com o que os animais passassem a preferir mais o ambiente associado à droga (Fig. 15).

Embora ambas as concentrações de etanol tenham induzido à preferência condicionada por lugar, foi escolhida para os experimentos posteriores a dose de 0,8 mg/kg, uma vez que essa apresentou ligeira vantagem no nível de significância e está em maior consonância com os dados descritos na literatura.



**Figura 15: Efeito de diferentes concentrações de etanol sobre a preferência condicionada por lugar.** Os dados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da permanência em segundos dos animais de cada grupo no ambiente inicialmente menos preferido. \*  $p \leq 0,05$ : diferente do pré-condicionamento dentro do mesmo grupo. N = 7 animais por grupo.

#### 4.5. Efeitos do estresse sobre a preferência condicionada por lugar, extinção e recaída ao etanol.

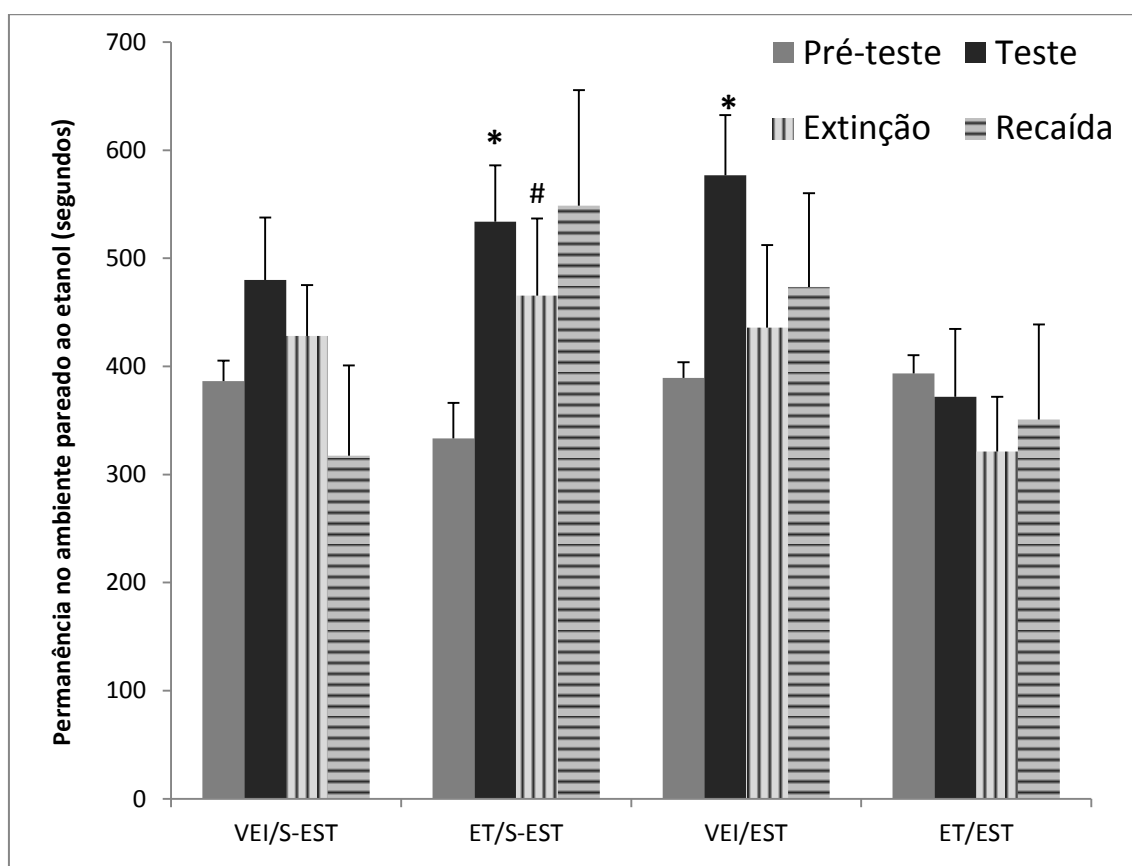
Depois de estabelecida a concentração ideal para a fase de condicionamento da PCL ao etanol, foi realizado então, um ensaio para verificar o efeito prévio da administração crônica de etanol e exposição ao estresse (item 3.10) sobre a expressão da PCL, extinção e recaída ao etanol (Fig.16).

A ANOVA mostrou que houve diferença significativa para o fator fases ( $F_{3,102} = 2,81$ ;  $p \leq 0,05$ ) e interação dos fatores estresse e etanol crônico ( $F_{1,34} = 4,7$ ;  $p \leq 0,05$ ). A interação entre os fatores fases, estresse e etanol crônico foi quase significativa ( $F_{3,102} = 2,38$ ;  $p = 0,073$ ).

A análise de comparação planejada mostrou que houve expressão da PCL nos grupos etanol sem estresse ( $p \leq 0,001$ ) e veículo estresse ( $p \leq 0,001$ ), nos quais houve diferença intragrupo significativa entre o dia do pré-teste e teste, indicando que os tratamentos prévios apenas com etanol ou apenas com estresse promoveram aumento da preferência desses animais pelo ambiente pareado ao etanol.

Nos grupos veículo sem estresse e etanol estresse não houve PCL, já que não houve diferença significativa intragrupo ( $p > 0,05$ ), isto é, sem exposição prévia tanto ao etanol quanto ao estresse, o pareamento de um ambiente às injeções do etanol por si só não foi capaz de mudar significativamente a preferência dos animais. Da mesma forma, a exposição crônica simultânea ao etanol e ao estresse também não promoveu mudança da preferência pelo ambiente pareado ao etanol. Assim, A exposição a um dos fatores anulou o outro.

A extinção havia sido mensurada dos dias 33, 36 e 39, após o dia do teste, no entanto, o resultado apresentado é referente apenas ao dia 39, pois nos períodos anteriores não foi observada extinção em nenhum grupo experimental. ANOVA mostrou diferença significativa entre a permanência no dia do pré-teste e no dia da extinção apenas no grupo etanol sem estresse ( $p \leq 0,05$ ). Dessa forma, não foi observada nesse grupo extinção da PCL. Nos outros grupos, embora tenha ocorrido extinção ( $p > 0,05$  comparando-se o teste da extinção com o pré-teste), não foi observada diferença entre a permanência durante a extinção e a recaída em nenhum grupo ( $p > 0,05$ ), ou seja, o procedimento de estresse agudo aplicado no dia da recaída, não obteve efeito.



**Figura 16: Efeito da exposição crônica ao estresse e etanol sobre a preferência condicionada por lugar.** Os dados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da permanência em segundos dos animais de cada grupo no ambiente inicialmente menos preferido. VEI/S-EST: veículo sem estresse; ET/S-EST: etanol sem estresse; VEI/EST: veículo estresse e ET/EST: etanol estresse. \*  $p \leq 0,05$ : quando a diferença entre pré e pós-condicionamento for significativa; #  $p > 0,05$  quando a diferença entre pré-condicionamento e extinção for significativa (Comparação Planejada). N = 9-10 animais por grupo.

## 5. DISCUSSÃO

De acordo com os dados mostrados, pode ser observado que o modelo de administração de etanol e exposição ao estresse utilizado foi parcialmente efetivo na indução de comportamentos relacionados à dependência à droga. Quando mensurados os parâmetros da síndrome de abstinência, não foi observado efeito do tratamento nos comportamentos relacionados à ansiedade e locomoção no LCE. O número de entradas, assim como a permanência nos braços abertos e os comportamentos de avaliação de risco, não foram diferente entre os grupos experimentais. Entretanto, no CA foi detectada redução da atividade locomotora em resposta ao tratamento crônico somente com etanol. Quando examinadas as alterações neuroquímicas responsáveis por esses comportamentos, foi evidenciado que o *turnover* dopaminérgico no CPF foi aumentado pelo tratamento crônico com etanol. Já no NAc, o *turnover* dopaminérgico foi reduzido pela exposição isolada ao estresse e na amígdala, a concentração de dopamina se apresentou maior no grupo exposto conjuntamente tanto ao estresse quanto ao etanol crônico. Os dados obtidos nos experimentos posteriores com PCL mostraram que essas neuroadaptações promovidas pela exposição crônica ao etanol e estresse podem ter influenciado também o condicionamento ao etanol. Os grupos tratados somente com etanol crônico ou somente expostos ao estresse tiveram sua preferência pelo ambiente pareado à droga aumentada. O maior condicionamento ao etanol nesses grupos parece se correlacionar às alterações do *turnover* dopaminérgico no CPF e NAc.

### 5.1. Síndrome de Abstinência ao etanol

A análise dos resultados obtidos com o teste de LCE após a retirada do etanol mostrou que a exposição ao estresse e etanol não alterou comportamentos relacionados à ansiedade, tanto nos parâmetros clássicos quanto nas medidas etológicas. Diferentemente, Wilson e colaboradores observaram alterações nas medidas etológicas, no tempo e número de entradas nos braços abertos em camundongos e ratos após administração de etanol em dieta líquida (WILSON; WATSON; LITTLE, 1998). Os testes com ratos foram realizados 8 horas após a retirada da administração de etanol enquanto os experimentos com camundongos foram realizados 16 horas após a retirada no estudo de Wilson e colaboradores, e 14 horas após a retirada em nossos ensaios. A

quantidade de etanol consumida durante a administração da dieta líquida foi também muito próxima em relação ao trabalho citado (em média 28,8 g/kg contra 27,0 g/kg). O fato de em nosso procedimento a administração da dieta ter sido conduzida por um período maior (15 dias) contra 7 de Wilson e colaboradores e as linhagens de camundongos serem diferentes pode ter influenciado a não observação das alterações da síndrome de abstinência no LCE, consequentemente não foi possível observar os efeitos do estresse sobre a exposição ao etanol.

Há muitos relatos na literatura de que períodos de exposição semi-crônicos ou agudos induzem comportamentos relacionados à síndrome de abstinência no LCE. Em testes de Ciccocioppo e colaboradores, com a utilização de gavagem em ratos, foi realizada administração de etanol por seis dias e mesmo com quantidade diária de apenas 11 gramas para cada quilo de animal, houve sinais da síndrome de abstinência visíveis no LCE, com significativa redução da permanência nos braços abertos do labirinto (CICCOCIOPPO et al., 2004). Contudo, há testes em que períodos prolongados de exposição ao etanol também apresentaram eficácia na indução de comportamentos relacionados à ansiedade no LCE. Pandey e colaboradores realizaram administração por 15 dias e conseguiram observar comportamentos relacionados à ansiedade apenas 24 horas após a retirada do etanol (PANDEY et al., 1999). Zhao e colaboradores em estudo com administração diária de etanol a 3 g/kg de animal por via intraperitoneal em ratos por 28 dias também observaram redução da porcentagem do tempo nos braços abertos apenas 72 horas após a interrupção da administração (ZHAO et al., 2011). Tais resultados sugerem que em tratamentos crônicos, os sinais da síndrome de abstinência ao etanol sejam melhor evidenciados no LCE após um período mais longo de abstinência. No entanto, é apenas uma hipótese haja vista que em testes prévios em nosso laboratório, também não foram observadas alterações nos comportamentos relacionados à ansiedade após 24 horas e na literatura há muitos trabalhos que observam aumento da ansiedade em menos de 24 horas (KLIETHERMES, 2005). O fato de no estudo de Zhao, a exposição crônica ter sido realizada por meio de administração intraperitoneal também faz com que a droga apresente farmacocinética diferente, podendo influenciar o aparecimento da síndrome de abstinência de forma diferente.

Nas diferentes formas de administração de etanol apresentadas como gavagem, injeções intraperitoneais ou (como nos nossos ensaios) dieta líquida como única fonte de alimento, o animal recebeu a droga de forma forçada. Todavia, dependendo do modo

com que os animais entram em contato com o álcool pode haver não apenas diferenças farmacocinéticas e farmacodinâmicas na interação da droga com o organismo, como também pode ser possível associar a administração da substância psicoativa a fatores ambientais e estados emocionais, como nos modelos de PCL e condicionamento operante. Dessa forma, há a influência das sensações vindas de diferentes conexões neurais, alterando o efeito da droga nas vias de recompensa e consequentemente os comportamentos relacionados à dependência. Em estudo de Gilpins, Karanikas e Richardson, ratos adolescentes foram submetidos à técnica de *binge* por 14 dias, sendo seis sessões de *binge* com duração de 30 minutos cada, distribuídas durante 12 horas diárias. Durante as sessões os animais recebiam solução açucarada com etanol cada vez que pressionassem a alavanca das caixas de condicionamento operante. Durante a fase adulta eles foram induzidos à dependência por meio da inalação de vapor de etanol. Os resultados mostraram que os animais que foram submetidos à técnica de *binge* durante a adolescência e não foram submetidos ao vapor de etanol (não-dependentes) apresentaram aumento da permanência e do número de entradas nos braços abertos do LCE quando comparados aos outros três grupos (controle dependentes, controle não-dependentes e *binge* dependentes) (GILPIN; KARANIKAS; RICHARDSON, 2012). Isso significa que os efeitos do etanol quando experimentados de forma ativa e associados ao sabor adocicado da solução etanólica por meio do condicionamento operante tiveram efeito ansiolítico na fase adulta, enquanto quando a droga foi administrada de forma passiva, através das câmaras de vapor de etanol, produziu o efeito ansiogênico, uma vez que inibiu o aumento do tempo e número de entradas nos braços abertos causados pelo *binge* na adolescência. Tais dados nos conduzem à hipótese de que se durante a administração da dieta líquida em nosso estudo, o etanol não tivesse sido disponibilizado como única fonte de alimento e os animais tivessem escolha, como nos trabalhos de autoadministração, a indução da dependência teria sido feita de forma menos passiva e pode ser que os sinais da síndrome de abstinência teriam sido observados no LCE. Essa hipótese pode ser fortalecida pelo fato de modelos prévios testados em nosso laboratório com administração intraperitoneal de etanol também não terem induzido comportamentos relacionados à síndrome de abstinência de forma satisfatória.

Embora o procedimento de administração de etanol via dieta líquida como única fonte de alimento não tenha alterado comportamentos relacionados à ansiedade no LCE, nos testes com o CA foi observada uma redução da atividade locomotora total e

periférica nos animais tratados com etanol que não foram submetidos ao estresse em relação ao grupo veículo sem estresse. Portanto, pode ser afirmado que com o protocolo adotado para administração crônica de etanol houve indução da síndrome de abstinência, pois mesmo não tendo sido observados os efeitos ansiogênicos esperados, tanto no LCE quanto no CA, houve alteração na atividade exploratória que é também um importante parâmetro de avaliação da síndrome de abstinência.

Existem vários estudos mostrando alterações da atividade locomotora no CA durante a retirada do etanol. Em estudo utilizando procedimento semelhante de dieta líquida adotado em nossos testes, Bonassoli e colaboradores mostraram hipolocomoção com 24 horas de abstinência após tratamento com etanol em dieta líquida por 21 dias (BONASSOLI et al., 2011). Outros estudos também evidenciaram redução da atividade locomotora na síndrome de abstinência decorrente de outros modelos crônicos de administração de etanol (DEVAUD; BARTOO; MALTHANKAR, 2002; KLIETHERMES, 2005). Por outro lado, Capaz e colaboradores observaram pronunciada hiperatividade por um período de até 6 dias em ratos e 25 horas em camundongos, após procedimento de administração de etanol por consumo oral ou inalação, respectivamente (CAPAZ et al., 1981). Barros e colaboradores observaram a hiperatividade locomotora persistente até 4 semanas após a retirada do etanol crônico (BARROS et al., 1991). Assim, o efeito de hipo ou hiperatividade locomotora na síndrome de abstinência não tem clara relação com método de administração crônica de etanol ou espécie animal avaliada.

Além da hipolocomoção promovida pela exposição crônica ao etanol, pode ser observado em nossos ensaios um efeito apenas indireto do estresse sobre a síndrome da abstinência. Pois, embora os animais veículo estresse não tenham apresentado diferenças significativas em relação a nenhum outro grupo, o grupo etanol estresse não apresentou redução na atividade exploratória enquanto no etanol sem estresse essa redução foi significativa. Assim, podemos afirmar que o procedimento de estresse na presença da administração crônica de etanol inibe a hipolocomoção causada pela retirada da droga, bloqueando os efeitos da síndrome de abstinência.

O fato de o estresse não ter promovido alterações comportamentais relacionadas a dependência por si só pode estar relacionado ainda com o período em que o animal foi submetido ao estresse ou ao tipo de procedimento estressor empregado. Em trabalho com estresse de isolamento social associado ou não ao de nado forçado, utilizando camundongos C57BL/6J foi observado que quando os animais são submetidos ao

estresse durante as primeiras fases do crescimento, os efeitos sobre o aumento do consumo de etanol são mais evidentes que quando são expostos ao estresse durante a fase adulta ou adolescência (LOPEZ; DOREMUS-FITZWATER; BECKER, 2011). Silberman e colaboradores em estudo com ratos Long-Evans também observaram efeitos tardios do estresse de isolamento social aplicado durante as primeiras fases do desenvolvimento animal. Os animais adultos submetidos ao estresse apresentaram não só maior consumo de etanol no procedimento de auto-administração como também redução do tempo nos braços abertos do LCE, indicando que a idade também é um fator determinante para os efeitos do estresse na dependência ao etanol (SILBERMAN et al., 2010).

Há na literatura grande ambivalência dos trabalhos relacionados a etanol utilizando LCE, com quantidade similar de trabalhos mostrando efeitos ansiogênicos ou nenhum efeito da abstinência dessa substância de abuso (KLIETHERMES, 2005). Contudo, há ainda contradições quando comparados os efeitos do etanol sobre os comportamentos apresentados no LCE e no CA. Até mesmo em estudos que tentam isolar uma só variável, há divergência de dados. Por exemplo, em trabalho no qual algumas linhagens de camundongos foram analisadas no LCE, BALB/C foi considerada a linhagem com indivíduos menos ansiosos (TRULLAS; SKOLNICK, 1993), enquanto outro estudo utilizando linhagens similares concluiu que os camundongos BALB/C apresentam nível intermediário de ansiedade no LCE (GRIEBEL et al., 2000). Há casos ainda em que a mesma linhagem é considerada como ansiosa no LCE e não-ansiosa no CA (CAROLA et al., 2002). Além das variáveis, como via de administração, concentração da droga, duração da administração, período de abstinência, espécie animal, idade, que podem interferir nos comportamentos da síndrome de abstinência ao etanol; o teste comportamental empregado é mais um fator a influenciar a observação ou não de tais efeitos.

Além de linhagens diferentes apresentarem naturalmente distintos graus de ansiedade e isso interferir no processo de dependência e na resposta aos procedimentos de estresse, as diferenças genéticas e de idade entre os modelos experimentais podem levar a concentrações diferentes de neurotransmissores relacionados com a dependência ao etanol como serotonina e dopamina. Estudos comprovam que linhagens com atividade dopaminérgica e serotoninérgica reduzida em algumas regiões encefálicas são naturalmente mais suscetíveis à dependência ao etanol (GATTO et al., 1987).

## 5.2 Adaptações neuroquímicas

Quando avaliada a atividade dopaminérgica e serotoninérgica no CPF, NAc e amígdala 14 horas após a retirada da administração de etanol, o *turnover* dopaminérgico se revelou maior no CPF dos animais do grupo etanol sem estresse em relação ao grupo veículo sem estresse e etanol estresse, sugerindo relação com a hipolocomoção observada nesse primeiro grupo no CA. De forma semelhante às alterações da atividade locomotora, animais expostos ao estresse também não apresentaram alterações do turnover dopaminérgico no CPF.

Nossos dados sobre alterações dopaminérgicas no CPF corroboram os resultados de Carlson e Stevens (2006) que evidenciaram também aumento do *turnover* dopaminérgico no CPF durante a síndrome de abstinência em ratos alimentados com dieta líquida contendo etanol (CARLSON; STEVENS, 2006).

Embora no NAc, assim como no CPF, não tenham sido observadas alterações significativas na concentração de dopamina e seus metabólitos, o *turnover* dopaminérgico foi menor no grupo veículo estresse em relação ao veículo sem estresse, não tendo sido observado efeito do etanol nessa região cerebral.

A maioria dos relatos na literatura indica redução da atividade dopaminérgica no NAc após interrupção do tratamento crônico com drogas de abuso, incluindo o etanol e, com a existência de poucos dados específicos de alterações da atividade dopaminérgica no CPF (GEORGE; LE MOAL; KOOB, 2012). É necessário considerar que há diferenças individuais na resposta celular à dopamina nas regiões cerebrais. Em outros estudos, utilizando o procedimento de autoadministração, foi observada interação entre o estresse e a exposição ao etanol, alterando os efeitos observados na atividade dopaminérgica e os resultados variaram de acordo com a área encefálica analisada (MELIS et al., 2009).

São poucos os relatos de experimentos envolvendo apenas estresse e NAc, no entanto, Yavich e Tiihonen investigando a influência do etanol sobre a concentração de dopamina extracelular no NAc em camundongos submetidos ao estresse de derrota social também observaram efeitos mistos. Com a administração de etanol pela via intraperitoneal (dose única), as concentrações de 0,1 e 2,0 mg/kg não tiveram efeito na dopamina extracelular em camundongos agressivos e nos “não derrotados”. Por outro lado, nos animais derrotados, o etanol aumentou a dopamina extracelular na concentração de 0,1 mg/kg e reduziu na de 2,0 mg/kg. Esses dados sugerem que o

estresse de derrota social pode ter sensibilizado os mecanismos envolvidos na liberação dopaminérgica em resposta ao etanol (YAVICH; TIIHONEN, 2000). Não pode ser afirmado que esse estudo vai na contramão dos nossos resultados, pois como pode ser observado, mesmo utilizando um tipo de estresse mais intenso, a alteração da atividade dopaminérgica ainda varia acentuadamente em resposta a alterações na concentração de etanol. Além disso, no presente estudo a concentração de dopamina quantificada é aquela presente tanto no meio intracelular quanto extracelular, enquanto no trabalho de Yavich e Tiihonen o neurotransmissor quantificado é somente o presente na fenda sináptica.

Em testes utilizando também única administração intraperitoneal de etanol em doses semelhantes (0,5 a 2,0 mg/kg) e avaliação da neurotransmissão dopaminérgica no NAc por microdiálise, foi revelado aumento da quantidade extracelular de dopamina, DOPAC e HVA, independente da linhagem genética dos animais utilizados (o trabalho avaliou duas linhagens diferentes de ratos, com preferências diferentes ao etanol) (KIIANMAA et al., 1995). Entretanto, diferentemente do referido estudo, no nosso trabalho avaliamos as concentrações de dopamina e metabólitos na retirada do etanol e não sob efeito da droga, além da técnica de medida ser diferente.

A última região investigada, a amígdala, foi a única na qual foi observado aumento da quantidade de dopamina, em vez de alguma alteração no *turnover* dopaminérgico. Pode ser que o maior estoque de dopamina na amígdala tenha contribuído para o grupo etanol estresse não apresentar a mesma hipolocomoção observada no grupo etanol sem estresse. O estresse pode ter estimulado a produção dopaminérgica na amígdala e isso de alguma maneira ter impedido a hipolocomoção nos animais expostos ao estresse.

Há muitos outros fatores que podem ter interferido nas alterações neuroquímicas promovidas pelo uso de etanol. Em um estudo de Carlson e Stevens, foi analisado o papel da assimetria cerebral no consumo de etanol e nas alterações neuroquímicas ocorridas em áreas encefálicas oriundas da ATV (córtex pré-frontal e amígdala) de ratos. Ratos com preferência para a esquerda, direita ou nenhuma preferência foram alimentados com dieta líquida contendo etanol a 6% por 14 dias e tiveram as concentrações de dopamina, serotonina, norepinefrina e metabólitos mensuradas em cada lado do CPF e amígdala durante a abstinência aguda (10-12 horas). Os animais tratados com etanol tiveram aumento do turnover dopaminérgico no CPF e depleção dopaminérgica e serotoninérgica no CPF e serotoninérgica na amígdala e esses efeitos

foram mais intensos nos animais com preferência pelo lado direito. Foi analisada ainda nesse estudo como a preferência por um dos lados interfere na autoadministração de etanol em bebedouros (escolha entre solução etanólica a 10% ou solução contendo apenas sacarose). A administração com dieta líquida ainda reduziu significativamente o consumo de etanol em todos os grupos além do grupo com preferência pelo lado direito ter consumido mais que os com preferência pelo lado esquerdo no segundo dia de autoadministração (CARLSON; STEVENS, 2006). Como em nossos dados, utilizando metodologia semelhante de retirada das amostras e quantificação, não foram detectadas diferenças nas concentrações de serotonina e 5-HIAA no CPF, NAc e amígdala dos grupos experimentais. Pode ser que o período de abstinência maior (14 horas) utilizado em nossos testes tenham sido responsável pela ausência de resultados significativos em relação a esse neurotransmissor. Além disso, o fato de o estudo desses autores ter sido realizado em ratos. Como em nossos ensaios foram utilizados camundongos, a massa da amostra encefálica analisada era reduzida e em algumas regiões (como o CPF) as baixas concentrações de serotonina sequer eram detectadas em algumas amostras, devido ao limite de detecção da metodologia. As concentrações reduzidas de serotonina podem ser também devido ao fato de o sistema serotoninérgico apenas interferir na relação entre dependência ao etanol e estresse quando há inibição dos efeitos causados por ambos nas vias dopaminérgicas, como se a liberação de serotonina a quantidades mais significativas fosse um *feedback* de compensação à redução da atividade dopaminérgica. Há relatos de antagonistas serotoninérgicos reverterem o efeito de um estabilizador dopaminérgico que por sua vez reverte os efeitos do etanol e estresse relacionados à ansiedade e à busca ao etanol (SHIBASAKI et al., 2012).

Além dos modelos animais propiciarem diferentes níveis de precisão na quantificação neuroquímica, sabe-se que entre não só espécies, como também entre linhagens de uma mesma espécie há diferenças naturais na neurotransmissão que interferem na forma com que os neurônios reagirão à exposição estresse ou ao etanol (GATTO et al., 1987). Em estudo com ratos, Ortiz e colaboradores observaram que os animais da linhagem Fischer 344 são mais responsivos ao estresse (apresentaram mais neuroadaptações). Além disso, ratos Lewis foram menos responsivos e os Sprague-Dawley demonstraram nível intermediário de neuroadaptações na via dopaminérgica mesolímbica causadas pelo estresse crônico (ORTIZ et al., 1996).

É também conhecido que, em um mesmo animal, há interferência de diversas outras vias de neurotransmissão sobre a via dopaminérgica (ou serotoninérgica), que é a

mais estudada. Portanto, diferentes tratamentos podem influenciar vias adjacentes de formas distintas e isso de alguma forma convergir a alterações no sistema dopaminérgico. O aumento da liberação decorrente do consumo de etanol pode, por exemplo, estimular vias que ativarão receptores serotoninérgicos, que por sua vez desencadearão a transmissão dopaminérgica da ATV (THEILE et al., 2011). A intersecção entre vias de neurotransmissão se deve principalmente ao fato de os mensageiros intracelulares serem comuns a mais de um tipo de neurotransmissores e várias etapas dessas vias serem passíveis de influência do estresse. Ortiz e colaboradores observaram que o estresse imprevisível elevou a atividade da proteína quinase dependente de AMPc e reduziu os níveis de imunorreatividade da subunidade Gi da proteína G (ORTIZ et al., 1996).

A retirada de áreas cerebrais específicas também pode ter influenciado na ausência de maior quantidade de alterações serotoninérgicas e dopaminérgicas. O CPF, NAc e amígdala são subdivididos em algumas regiões que contêm atividades neuronais específicas, com respostas diferentes dependendo do tipo de estímulo. Em trabalho utilizando camundongos, por exemplo, foi observado que infusões intra-amidalgas de um antagonista dopaminérgico bloqueou a PCL ao etanol. No entanto, o efeito foi dependente do antagonismo dopaminérgico apenas no núcleo basolateral da amígdala e ausente no núcleo central da amígdala. Em contrapartida, no NAc, não houve participação direta da ativação dopaminérgica na expressão da PCL, mas sim dos receptores glutamatérgicos NMDA, indicando que o sistema de neurotransmissão dopaminérgica reage à ação do etanol de forma ainda mais *locus*-específica, podendo ser influenciado por diversas outras vias (GREMEL; CUNNINGHAM, 2009).

### **5.3 Preferência condicionada por lugar associada ao etanol**

Com a dificuldade de correlação entre os dados relacionando as alterações neuroquímicas e os comportamentos da síndrome de abstinência ao etanol, foram realizados em nosso trabalho experimentos com PCL para verificar se nossos dados neuroquímicos refletiriam em mudanças na busca ao etanol. O procedimento da PCL foi conduzido após a interrupção do tratamento com etanol. Assim, as alterações dopaminérgicas que foram observadas em decorrência do consumo crônico de etanol ou exposição ao estresse, podem ajudar a explicar os mecanismos neurais que predispueram aos comportamentos observados no condicionamento ao etanol.

Foi observada no grupo etanol sem estresse e veículo estresse diferença significativa entre a permanência no compartimento pareado ao etanol durante o teste pós-condicionamento em relação ao teste pré-condicionamento realizado. Foram descartadas quaisquer hipóteses de que os diferentes tratamentos tenham feito com que os animais já no pré-teste apresentassem preferências diferenciadas por algum ambiente, pois não houve diferença entre os grupos quanto à permanência no pré-condicionamento. A diferença ocorreu realmente devido ao período de condicionamento, uma vez que a permanência no teste pós-condicionamento foi significativamente maior no grupo etanol sem estresse e veículo estresse em relação aos demais. Também pode ser desprezada a hipótese de que um dos ambientes tenha sido majoritariamente preferido e isso tenha interferido no resultado final, pois a preferência inicial dos animais foi de aproximadamente 50% para cada ambiente, independentemente do grupo experimental.

Em um estudo com ratos Sprague-Dawley, sem tratamento prévio, a administração de 1,5 mg/kg intraperitonealmente, promoveu PCL ao lado pareado ao etanol, inesperado mesmo com a elevada dose para ratos (MORALES; VARLINSKAYA; SPEAR, 2012). Em nossos dados, o período de condicionamento por si só não foi suficiente para alterar a PCL, uma vez que o grupo veículo sem estresse não mudou significativamente a preferência inicial.

Utilizando administração aguda de etanol, Morse e colaboradores observaram que os ratos que receberam as doses de 3 e 4 g/kg de etanol mostraram aversão condicionada ao lugar durante a abstinência (10h) à droga. No entanto, com 0 ou 2g/kg de etanol, não foi induzida aversão significativa, indo em consonância com nossos dados (MORSE et al., 2000). Como doses mais baixas não causaram aversão no experimento citado, isso não excluiria a possibilidade de doses ainda menores induzirem à preferência pelo lugar, em vez de aversão, fato ocorrido em nossos testes.

Carrara e colaboradores, por sua vez, utilizaram administração prévia de etanol por 15 dias em camundongos (similar a do nosso estudo) e observaram que essa exposição durante a fase adulta não alterou tão robustamente a PCL ao etanol (CARRARA-NASCIMENTO; OLIVE; CAMARINI, 2012) quando comparada com o grupo que recebeu o tratamento durante a adolescência. O consumo de etanol, no entanto, foi elevado pelo tratamento crônico prévio, independentemente da idade em que ele foi administrado. O trabalho mostra que a idade pode ser um fator importante

para a sensibilização prévia ao etanol e que o tratamento prévio pode ter efeitos distintos dependendo do modo com que é avaliada a busca à droga.

Expondo camundongos previamente ao estresse de derrota social de forma crônica, Bahi obteve resultados similares obtidos com nosso procedimento de nado forçado, mesmo tendo realizado o procedimento estressor por período maior (19 dias). Os animais expostos ao estresse tiveram maior ingestão de etanol quando comparados aos animais que ficaram em residências individuais. Também foi observada maior preferência dos animais estressados pelo lado pareado ao etanol em relação aos outros grupos, sugerindo que realmente o estresse crônico é um fator de risco para o desenvolvimento de consumo de álcool (BAHI, 2012).

Há ainda relatos na literatura de influência do intervalo de tempo entre a exposição ao estresse e administração de etanol. Sperling e colaboradores usando o procedimento de nado forçado observaram aumento da PCL nos animais expostos ao estresse e etanol em relação aos que receberam apenas tratamento com etanol. No entanto, o estresse era realizado 5 minutos antes de cada etapa da fase de condicionamento (SPERLING et al., 2010), enquanto em nosso trabalho o nado forçado não foi realizado durante a fase de condicionamento, apenas nos últimos dias da dieta líquida que precedeu o procedimento de PCL. Pode ser, portanto, que o estresse apenas tenha efeitos reforçadores sobre o etanol quando este é administrado por via intraperitoneal ou ainda apenas quando é administrado durante a fase de condicionamento. Talvez o estímulo estressor eleve os efeitos do etanol sobre o condicionamento apenas quando há um pequeno intervalo entre o estresse e o condicionamento.

De forma interessante, apesar de a exposição isolada ao estresse ou consumo crônico de etanol acentuar o condicionamento ao etanol, animais expostos previamente a ambos (estresse e etanol crônico) não demonstraram alteração do condicionamento. Como em nossos dados, a exposição ao estresse e ao etanol apenas promoveram PCL quando realizadas de forma separada, não havendo mudança na preferência inicial do grupo etanol estresse, foi realizado um ensaio com uma concentração menor de etanol (0,4 mg/kg de etanol) durante a fase de condicionamento. O intuito de tal teste adicional foi verificar se os efeitos das injeções de 0,8 mg/kg durante a fase de condicionamento foram tão intensos no grupo estresse etanol crônico a ponto de causar uma tendência a aversão e isso mascarar a observação da PCL. Tal hipótese foi descartada, uma vez que, embora o ensaio tenha sido conduzido com N reduzido (5 animais por grupo), não

houve sequer tendência de mudança da PLC com a concentração reduzida de etanol. Ou seja, se com 0,4 mg/kg não havia nem início de aumento do condicionamento, seria difícil que a concentração de 0,8 mg/kg promovesse efeitos que estivessem já tão próximos do limiar entre prazer e aversão.

Em um estudo avaliando efeito do estresse sobre a PCL à nicotina em ratos adolescentes, o estresse (ao contrário dos nossos resultados) promoveu aumento da PCL à nicotina em doses mais baixas (0,2 mg/kg e 0,4 mg/kg). A divergência em relação aos nossos dados pode estar relacionada ao fato de que o estresse utilizado foi o de choque elétrico na pata, além dele ter sido realizado durante o período de condicionamento e de a nicotina ter mecanismos farmacológicos diferentes do etanol. Contudo, ao utilizar a dose mais elevada, a PCL foi ainda maior no grupo tratado apenas com nicotina, mas curiosamente o grupo exposto ao estresse e nicotina, embora tenha ainda mostrado mudança significativa da PCL em relação ao grupo controle, não apresentou diferença em relação ao grupo exposto apenas à nicotina (BRIELMAIER; MCDONALD; SMITH, 2011). Ou seja, a partir de determinado estágio de neuroadaptações induzidas pela droga, o estresse não mais influencia os comportamentos relacionados à dependência, não alterando o patamar já atingido. Tal estudo, unido ao resultado obtido no experimento utilizando a dose de 0,4 mg/kg durante o condicionamento, suscita a hipótese de que os efeitos do estresse no aumento do condicionamento a droga dependem do estado de alteração do SNC já estabelecido pela droga.

Outra hipótese é de que o grupo exposto tanto ao etanol crônico quanto ao estresse desenvolveu uma associação aversiva entre efeito do etanol e estresse durante o pré-tratamento. Assim, durante o condicionamento essa associação prejudicou o desenvolvimento da preferência pelo ambiente pareado ao etanol, pois essa nova administração de etanol já possuía um componente reforçador negativo devido ao tratamento crônico anterior. Contudo, essa hipótese necessita de mais investigação.

O fator de maior influência para a responsividade aos efeitos do estresse parece ser o nível de ameaça que o procedimento estressor causa. Em estudos com humanos, Hefner e Curtin, verificaram o efeito do etanol no chamado SRD (Stress Response Dampening) – amortecimento de resposta ao estresse. Curtin em trabalho anterior já havia observado que o consumo de etanol não reduz a resposta ao estresse quando a ansiedade e medo causados pelo procedimento estressor eram previsíveis – no caso um choque elétrico precedido por uma dica visual (HEFNER; CURTIN, 2012). Com classificado como possível de ocorrer na probabilidade de 20, 60 ou 100% (de acordo

com o padrão em que os choques eram apresentados de acordo com os intervalos de tempo e dicas visuais). Foi demonstrado que o álcool não amortece os efeitos do estresse quando ele é causado por uma ameaça 100% previsível, já de 60% a 20% a atenuação dos efeitos do estresse é robusta e crescente proporcionalmente à incerteza do estímulo estressor. Seriam necessários mais estudos para afirmar se o tratamento com etanol em nosso experimento amorteceu os efeitos do estresse e por isso não houve PCL, se de alguma forma o etanol reduziu a sensibilidade dos animais ao estresse. Da mesma forma, como ainda não ficou claro como esse efeito amenizado do estresse ainda assim seria capaz de inibir os efeitos do etanol.

Quanto à extinção e recaída, o estresse também não causou o efeito esperado, como relatado no item 4.5. Embora o grupo etanol sem estresse não tenha extinto o condicionamento, o mesmo não foi observado no grupo veículo sem estresse, indicando que a exposição prévia ao etanol tenha promovido neuroadaptações mais intensas que a exposição prévia ao estresse. Em ensaios de auto-administração (álcool 12%, 1 hora por dia) com ratos, Funk e colaboradores observaram que exposições ao estresse de derrota social previamente às sessões diárias de autoadministração diminuíram a ingestão de etanol, assim como os índices de resposta durante a extinção e fez com que não houvesse recaída à busca à droga (FUNK et al., 2005). Como em nossos dados, mesmo utilizando exposição crônica ao estresse, também foi observada extinção em todos os grupos, exceto o exposto apenas ao etanol, o estresse parece facilitar a extinção independentemente se realizado de forma aguda ou crônica. O mecanismo pelo qual o estresse facilita a extinção tanto no trabalho de Funk quanto no nosso pode ser o mesmo responsável por não ter ocorrido também recaída em nenhum dos estudos. O fato de em nosso trabalho ter sido realizada uma nova exposição ao estresse após a extinção para estimular a recaída pode ter contribuído ainda mais para o não surgimento da mesma. Contudo, há de ser considerado Funk e colaboradores avaliaram a busca em teste diferente, assim como a metodologia empregada para administração de etanol e exposição ao estresse e, que tais diferenças podem promover neuroadaptações também distintas.

O que parece estar claro é que, de algum modo, a influência que a interação entre etanol e estresse exerce sobre a busca ao etanol passam por vias dopaminérgicas. Em estudo de Matsuzawa e colaboradores, foi observado que antagonistas de receptores tanto D1 quanto D2 atenuavam os efeitos do estresse sobre a PCL ao etanol (MATSUZAWA; SUZUKI; MISAWA, 2000). Em estudo com um estabilizador

dopaminérgico, o aripiprazole, foi observada inibição dos efeitos da exposição ao etanol (inalação de vapor de etanol em câmara por 6 dias). O decréscimo na permanência nos braços abertos do LCE e aumento da PCL promovidos pelo etanol foram ambos revertidos com a utilização do aripiprazole (SHIBASAKI et al., 2012).

Os dados neuroquímicos que obtivemos parecem de alguma forma ir ao encontro das mudanças ocorridas na busca ao etanol devido ao tratamento crônico prévio com estresse ou etanol crônico. O grupo etanol sem estresse, que teve aumento do condicionamento, teve também aumento do *turnover* dopaminérgico no CPF. Embora não haja relatos da redução ou elevação do *turnover* dopaminérgico no CPF influenciar diretamente a PCL ao etanol, há dados que mostram a redução de norepinefrina nessa região reduz a PCL ao etanol (LIU et al., 2008). Como o CPF não possui apenas atividade noradrenérgica, mas faz parte das vias dopaminérgicas originadas na ATV, é provável que alterações na atividade dopaminérgica influenciem os comportamentos relacionados ao condicionamento ao etanol, haja vista a grande participação dessa via nos processos de dependência ao álcool. Estudo de DeMontis fortaleceu tal hipótese. Realizando administrações repetidas de etanol em linhagens de ratos com diferentes graus de preferência à droga, foi verificado que ratos Wistar e uma linhagem com maior preferência tiveram aumento significativo da quantidade extracelular de dopamina no CPF após o tratamento crônico com etanol (DE MONTIS et al., 2004). Mesmo que o procedimento de quantificação dopaminérgica (microdiálise) tenha sido diferente, assim como o modelo animal e de exposição ao etanol, os resultados obtidos nesse estudo mostram que realmente há também no CPF resposta dopaminérgica induzida por etanol.

Embora o grupo veículo estresse tenha apresentado PCL semelhante a do grupo etanol sem estresse, tal fato não parece ocorrer devido às mesmas vias neuroquímicas. No grupo veículo estresse não foi observada mudança no *turnover* dopaminérgico no CPF, em vez disso, houve sua redução em outra região, o NAc. A atividade dopaminérgica do NAc reduzida nesse grupo devido à exposição ao estresse pode ter feito com que os animais buscassem mais o etanol como forma de compensar a redução do *turnover* dopaminérgico. No entanto, não há dados na literatura capazes de ratificar essa hipótese. A grande maioria dos estudos relacionados ao NAc tem foco no seu papel crítico nos efeitos reforçadores do etanol e outras drogas de abuso (LIU et al., 2008). Com os dados obtidos, pode ser afirmado que o estresse teve efeito reforçador sobre as administrações intraperitoneais de etanol e que provavelmente a redução do

turnover dopaminérgico no NAc deve predispor ao condicionamento etanol, evidenciado pelo maior condicionamento no grupo estresse sem etanol.

No grupo estresse etanol não foi encontrada alteração na concentração de dopamina e seus metabólitos, assim como no *turnover* dopaminérgico, tanto no CPF quanto no NAc, se correlacionando com a ausência de alteração da PCL ao etanol nesse grupo. Contudo, a maior quantidade de dopamina presente na amígdala pode talvez ter alguma relação com a inibição do efeito do etanol sobre o condicionamento causado pelo estresse ou vice-versa. Estudos mostram que lesões não só no NAc, mas também na amígdala antes do teste pré-condicionamento impedem a aquisição e expressão da PCL ao etanol. No entanto, quando as lesões são realizadas após o teste, apenas lesões na amígdala impediram a PCL (GREMEL; CUNNINGHAM, 2008). Em um estudo com flumazenil, um antagonista benzodiazepínico, foi verificado que sua administração intra-amidalar bloqueou o desenvolvimento de comportamentos relacionados à ansiedade durante a síndrome de abstinência ao etanol e ações similares do flumazenil foram encontradas quando o tratamento com etanol foi substituído por exposições ao estresse (OVERSTREET; KNAPP; BREESE, 2007). Bajo e colaboradores observaram inclusive que essa regulação dos comportamentos de ansiedade e consumo de etanol pela amígdala acontece sobretudo em seu núcleo central, realizada por uma via de sinalização dependente de fosfoquinase-C, ativada pela estimulação de receptores CRF1, mediada pela liberação de GABA pelos terminais nervosos (BAJO et al., 2008). Todavia, revisão de Koob e colaboradores aponta envolvimento de diversas outras vias, como opioidérgica, dopaminérgica e serotoninérgica assim como de outras regiões da amígdala estendidas (GEORGE; LE MOAL; KOOB, 2012). Tais experimentos indicam que a amígdala pode protagonizar alguns dos eventos comportamentais relacionados à dependência ao etanol e que são necessários estudos mais aprofundados para compreender em detalhes seu papel na busca ao etanol e, consequentemente, os resultados obtidos com o nosso estudo.

## 6. CONCLUSÃO

Em suma, o presente estudo revelou que tanto a exposição prévia ao estresse quanto o consumo crônico de etanol, mesmo não tendo alterado comportamentos relacionados à ansiedade durante à síndrome de abstinência, promovem alterações no sistema dopaminérgico, que podem estar relacionadas à hipolocomoção na síndrome de abstinência e ao aumento da preferência condicionada por lugar à droga. Ao ocorrer a exposição a ambos os fatores (etanol e estresse), parece ocorrer anulação das alterações observadas. São necessários mais estudos para compreender os mecanismos moleculares responsáveis pelas interações entre as alterações neuroquímicas e comportamentais observadas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAHI, A. Increased anxiety, voluntary alcohol consumption and ethanol-induced place preference in mice following chronic psychosocial stress. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, 30 nov. 2012.
- BAJO, M. et al. Protein kinase C epsilon mediation of CRF- and ethanol-induced GABA release in central amygdala. **PNAS**, v. vol. 105, n. no. 24, p. 8410–8415, 2008.
- BALDWIN, H. A. et al. CRF antagonist reverses the “anxiogenic” response to ethanol withdrawal in the rat. **Psychopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 227-32, 1991.
- BARROS, H. M. et al. Enhanced detection of hyperactivity after drug withdrawal with a simple modification of the open-field apparatus. **Journal of pharmacological methods**, v. 26, n. 4, p. 269-75, dez. 1991.
- BERKE, J. D.; HYMAN, S. E. Addiction , Dopamine , and the Molecular Mechanisms of Memory. **Neuron**, v. 25, p. 515-532, 2000.
- BERTOTTO, M. E. et al. Influence of ethanol withdrawal on fear memory: Effect of D-cycloserine. **Neuroscience**, v. 142, n. 4, p. 979-90, 2006.
- BONASSOLI, V. T. et al. Ethanol withdrawal activates nitric oxide-producing neurons in anxiety-related brain areas. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 45, n. 7, p. 641-52, 2011.
- BREHOUSE, H. C.; ANDERSEN, S. L. Delayed extinction and stronger reinstatement of cocaine conditioned place preference in adolescent rats, compared to adults. **Behavioral neuroscience**, v. 122, n. 2, p. 460-5, 2008.
- BRIELMAIER, J.; MCDONALD, C. G.; SMITH, R. F. Effects of acute stress on acquisition of nicotine conditioned place preference in adolescent rats : a role for corticotropin-releasing factor 1 receptors. **Psychopharmacology**, 2011.
- BUSTAMANTE, D. et al. Ethanol induces stronger dopamine release in nucleus accumbens (shell) of alcohol-preferring (bibulous) than in alcohol-avoiding (abstainer) rats. **European journal of pharmacology**, v. 591, n. 1-3, p. 153-8, 2008.
- CABRAL, A et al. Fear state induced by ethanol withdrawal may be due to the sensitization of the neural substrates of aversion in the dPAG. **Experimental neurology**, v. 200, n. 1, p. 200-8, 2006.
- CAMARINI, R. .; PREGNOLATTO, C. . A. Álcool Etílico. In: DELUCIA, R. (Ed.). **Farmacologia Integrada**. 3<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro: [s.n.]. p. 221-225, 2007.
- CANNAZZA, G. et al. Detection of levodopa, dopamine and its metabolites in rat striatum dialysates following peripheral administration of L-DOPA prodrugs by mean of HPLC-EC. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 36, n. 5, p. 1079-84, 2005.

CAPAZ, F. R. et al. The open field: a simple method to show ethanol withdrawal symptoms. **Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie**, v. 251, n. 2, p. 228-36, 1981.

CARLSON, J. N.; STEVENS, K. D. Individual Differences in Ethanol Self-Administration Following Withdrawal Are Associated With Asymmetric Changes in Dopamine and Serotonin in the Medial Prefrontal Cortex and Amygdala. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 30, n. 10, p. 1678-1692, 2006.

CAROLA, V. et al. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. **Behavioral Brain Research**, v. 134, p. 49-57, 2002.

CARRARA-NASCIMENTO, P. F.; OLIVE, M. F.; CAMARINI, R. Ethanol pre-exposure during adolescence or adulthood increases ethanol intake but ethanol-induced conditioned place preference is enhanced only when pre-exposure occurs in adolescence. **Developmental psychobiology**, 2012.

CICCOCIOPPO, R. et al. Attenuation of ethanol self-administration and of conditioned reinstatement of alcohol-seeking behaviour by the antiopioid peptide nociceptin/orphanin FQ in alcohol-preferring rats. **Psychopharmacology**, v. 172, n. 2, p. 170-8, 2004.

CRAWLEY, J. N. Exploratory behavior models of anxiety in mice. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 9, n. 1, p. 37-44, 1985.

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

DACKIS, C. A.; O'BRIEN, C. P. Cocaine dependence: a disease of the brain's reward centers. **Journal of substance abuse treatment**, v. 21, n. 3, p. 111-7, 2001.

DE MONTIS, M. G. et al. Sardinian alcohol-preferring rats show low 5-HT extraneuronal levels in the mPFC and no habituation in monoaminergic response to repeated ethanol consumption in the NAcS. **Brain research**, v. 1006, n. 1, p. 18-27, 23 2004.

DEVAUD, L. L.; BARTOO, G.; MALTHANKAR, G. Altered responses to dizocilpine maleate administration in ethanol-withdrawn male and female rats. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 28, n. 2, p. 83-93, 2002.

DI CHIARA, G.; BASSAREO, V. Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. **Current opinion in pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 69-76, 2007.

DI CHIARA, G.; IMPERATO, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 14, p. 5274-8, 1988.

ENGLEMAN, E. A. et al. Extracellular dopamine levels are lower in the medial prefrontal cortex of alcohol-preferring rats compared to Wistar rats. **Alcohol**, v. 38, p. 5-12, 2006.

ERDEN, B. F. et al. Dextromethorphan attenuates ethanol withdrawal syndrome in rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 62, n. 3, p. 537-41, 1999.

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

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

FUNK, D. et al. Effects of unconditioned and conditioned social defeat on alcohol self-administration and reinstatement of alcohol seeking in rats. **Psychopharmacology**, v. 183, n. 3, p. 341-9, 2005.

FUNK, D.; LI, Z.; LÊ, A. D. Effects of environmental and pharmacological stressors on c-fos and corticotropin-releasing factor mRNA in rat brain: Relationship to the reinstatement of alcohol seeking. **Neuroscience**, v. 138, n. 1, p. 235-43, 2006.

GALDURÓZ, J. C. F. et al. [Use of psychotropic drugs in Brazil: household survey in the 107 biggest Brazilian cities--2001]. **Revista latino-americana de enfermagem**, v. 13 Spec No, p. 888-95, 2006.

GATTO, G. J. et al. Chronic ethanol tolerance through free-choice drinking in the P line of alcohol-preferring rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 28, n. 1, p. 111-5, 1987.

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

GETACHEW, B. et al. Desipramine blocks alcohol-induced anxiety- and depressive-like behaviors in two rat strains. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 91, n. 1, p. 97-103, 2008.

GILPIN, N. W. et al. Dependence-induced alcohol drinking by alcohol-preferring (P) rats and outbred Wistar rats. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 32, n. 9, p. 1688-96, 2008.

GILPIN, N. W.; KARANIKAS, C. A.; RICHARDSON, H. N. Adolescent binge drinking leads to changes in alcohol drinking, anxiety, and amygdalar corticotropin releasing factor cells in adulthood in male rats. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e31466, 2012.

GOEDERS, N. E. The impact of stress on addiction. **European Neuropsychopharmacology**, v. 13, n. 6, p. 435-41, 2003.

GREEN, A. S.; GRAHAME, N. J. Ethanol drinking in rodents: is free-choice drinking related to the reinforcing effects of ethanol? **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 42, n. 1, p. 1-11, 2008.

GREMEL, C. M.; CUNNINGHAM, C. L. Roles of the nucleus accumbens and amygdala in the acquisition and expression of ethanol-conditioned behavior in mice. **The Journal of neuroscience**, v. 28, n. 5, p. 1076-84, 2008.

GREMEL, C. M.; CUNNINGHAM, C. L. Involvement of amygdala dopamine and nucleus accumbens NMDA receptors in ethanol-seeking behavior in mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 6, p. 1443-53, 2009.

GREMEL, C. M.; CUNNINGHAM, C. L. Effects of disconnection of amygdala dopamine- and nucleus accumbens NMDA- receptors on ethanol-seeking behavior in mice. **European Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 1, p. 148-155, 2011.

GRIEBEL, G. et al. Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. **Psychopharmacology**, v. 148, n. 2, p. 164-70, 2000.

GROBLEWSKI, P. A; LATTAL, K. M.; CUNNINGHAM, C. L. Effects of D-cycloserine on extinction and reconditioning of ethanol-seeking behavior in mice. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 33, n. 5, p. 772-82, 2009.

GROBLEWSKI, P. A.; FRANKEN, F. H.; CUNNINGHAM, C. L. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase ( ERK ) activity with SL327 does not prevent acquisition , expression , and extinction of ethanol-seeking behavior in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 217, n. 2, p. 399-407, 2011.

GROENEWEGEN, H. J.; UYLINGS, H. B. The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. **Progress in brain research**, v. 126, p. 3-2000.

HEFNER, K. R. & J. J. C.; CURTIN, J. J. Alcohol stress response dampening: selective reduction of anxiety in the face of uncertain threat. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 26, n. 2, p. 232-44, 2012.

HEILIG, M. et al. Acute withdrawal , protracted abstinence and negative affect in alcoholism : are they linked ? **Addiction Biology**, p. 169-184, 2010.

HEILIG, M.; EGLI, M. Pharmacological treatment of alcohol dependence: target symptoms and target mechanisms. **Pharmacology & therapeutics**, v. 111, n. 3, p. 855-76, 2006.

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

HODGE, C. W.; SAMSON, H. H.; HARAGUCHI, M. Microinjections of dopamine agonists in the nucleus accumbens increase ethanol-reinforced responding. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 43, n. 1, p. 249-54, 1992.

JEANNE, M.; KOOB, G. F. Drug dependence : stress and dysregulation of brain reward pathways. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 51, p. 23-47, 1998.

JIAO, X.; PARÉ, W. P.; TEJANI-BUTT, S. M. Alcohol consumption alters dopamine transporter sites in Wistar – Kyoto rat brain. **Brain research**, v. 4, p. 1-8, 2005.

KARILA, L. et al. New treatments for cocaine dependence: a focused review. **The international journal of neuropsychopharmacology**, v. 11, n. 3, p. 425-38, 2008.

KAUFMAN, J. et al. Genetic and environmental predictors of early alcohol use. **Biological psychiatry**, v. 61, n. 11, p. 1228-34, 2007.

KAYIR, H.; UZBAY, T. Effects of clozapine on ethanol withdrawal syndrome in rats. **Alcohol and alcoholism** (Oxford, Oxfordshire), v. 43, n. 6, p. 619-25, 2008.

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

KLIETHERMES, C. L. Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 28, p. 837-850, 2005.

KOOB, G. F. Dynamics of neuronal circuits in addiction: reward, antireward, and emotional memory. **Pharmacopsychiatry**, v. 42 Suppl 1, p. S32-41, 2009.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Addiction and the brain antireward system. **Annual review of psychology**, v. 59, p. 29-53, 2008.

KOTLINSKA, J.; BOCHENSKI, M. The influence of various glutamate receptors antagonists on anxiety-like effect of ethanol withdrawal in a plus-maze test in rats. **European journal of pharmacology**, v. 598, n. 1-3, p. 57-63, 2008.

LARANJEIRA, R. **I Levantamento Nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira**. Brasília: [s.n.].

LEMARQUAND, D.; PIHL, R. O.; BENKELFAT, C. Serotonin and alcohol intake, abuse, and dependence: findings of animal studies. **Biological psychiatry**, v. 36, n. 6, p. 395-421, 1994.

LIU, Y. Y. et al. Conditioned place preference induced by licit drugs: establishment, extinction, and reinstatement. **TheScientificWorldJournal**, v. 8, p. 1228-45, 2008.

LOPEZ, M. F.; DOREMUS-FITZWATER, T. L.; BECKER, H. C. Chronic social isolation and chronic variable stress during early development induce later elevated ethanol intake in adult C57BL / 6J mice. **Alcohol**, v. 45, n. 4, p. 355-364, 2011.

LYNCH, W. J. et al. The effects of restraint stress on voluntary ethanol consumption in rats. **Experimental and clinical psychopharmacology**, v. 7, n. 4, p. 318-23, 1999.

LÖF, E. et al. Nicotinic acetylcholine receptors in the ventral tegmental area mediate the dopamine activating and reinforcing properties of ethanol cues. **Psychopharmacology**, v. 195, n. 3, p. 333-43, 2007.

MARCHANT, N. J. et al. Context-Induced Relapse to Alcohol Seeking After Punishment in a Rat Model. **Biological psychiatry**, 2012.

MATSUZAWA, S.; SUZUKI, T.; MISAWA, M. Ethanol, but not the anxiolytic drugs buspirone and diazepam, produces a conditioned place preference in rats exposed to conditioned fear stress. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 65, n. 2, p. 281-8, 2000.

MCBRIDE, J. Regulation of Nucleus Accumbens Dopamine Release by the Dorsal Raphe Nucleus in the Rat \*. **Neurochemical Research**, v. 17, n. 5, p. 401-407, 1992.

MCBRIDE, W. J. et al. Regional CNS densities of serotonin and dopamine receptors in high alcohol-drinking (HAD) and low alcohol-drinking (LAD) rats. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 14, n. 6, p. 603-9, 1997.

MCLAUGHLIN, J. P.; MARTON-POPOVICI, M.; CHAVKIN, C. Kappa opioid receptor antagonism and prodynorphin gene disruption block stress-induced behavioral responses. **The Journal of neuroscience**, v. 23, n. 13, p. 5674-83, 2003.

MELIS, M. et al. Ethanol and acetaldehyde action on central dopamine systems: mechanisms, modulation, and relationship to stress. **Alcohol**, v. 43, n. 7, p. 531-539, 2009.

MORALES, M.; VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P. Evidence for conditioned place preference to a moderate dose of ethanol in adult male Sprague-Dawley rats. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 46, n. 7, p. 643-8, 2012.

MORIKAWA, H.; MORRISETT, R. A. Ethanol action on dopaminergic neurons in the ventral tegmental area: interaction with intrinsic ion channels and neurotransmitter inputs. **International review of neurobiology**, v. 91, n. 10, p. 235-88, 2010.

MORSE, A. C. et al. Conditioned place aversion to the “hangover” phase of acute ethanol administration in the rat. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 22, n. 1, p. 19-24, 2000.

MUELLER, D.; STEWART, J. Cocaine-induced conditioned place preference: reinstatement by priming injections of cocaine after extinction. **Behavioural brain research**, v. 115, n. 1, p. 39-47, 2000.

MULIA, N. et al. Social disadvantage, stress, and alcohol use among black, Hispanic, and white Americans: findings from the 2005 U.S. National Alcohol Survey. **Journal of studies on alcohol and drugs**, v. 69, n. 6, p. 824-33, 2008.

ORELAND, S. et al. Ethanol-induced effects on the dopamine and serotonin systems in adult Wistar rats are dependent on early-life experiences. **Brain Research**, v. 1405, p. 57-68, 2011.

ORTIZ, J. et al. Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to repeated stress. **Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 6, p. 443-52, 1996.

OVERSTREET, D. H.; KNAPP, D. J.; BREESE, G. R. Drug challenges reveal differences in mediation of stress facilitation of voluntary alcohol drinking and withdrawal-induced anxiety in alcohol-preferring P rats. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 31, n. 9, p. 1473-81, 2007.

PANDEY, S. C. et al. Potential role of the gene transcription factor cyclic AMP-responsive element binding protein in ethanol withdrawal-related anxiety. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 288, n. 2, p. 866-78, 1999.

PATEL, B. A. et al. Simple and rapid determination of serotonin and catecholamines in biological tissue using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 818, n. 2, p. 269-76, 2005.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. The mouse brain in stereotaxic coordinates. No Title. **Academic Press**, v. Ed.2, 2001.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

QUEBEC, M. et al. The role of ethanol availability on stress-induced increases in ethanol consumption. **Alcohol** (Fayetteville, N.Y.), v. 14, n. 6, p. 551-6, 1997.

QUINTANILLA, M. E. et al. Dopamine release in the nucleus accumbens (shell) of two lines of rats selectively bred to prefer or avoid ethanol. **European journal of pharmacology**, v. 573, n. 1-3, p. 84-92, 2007.

RAMOS, A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? **Trends in pharmacological sciences**, v. 29, n. 10, p. 493-8, 2008.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. Addiction. **Annual review of psychology**, v. 54, p. 25-53, 2003.

SAMSON, H. H.; CHAPPELL, A. Dopaminergic involvement in medial prefrontal cortex and core of the nucleus accumbens in the regulation of ethanol self-administration: a dual-site microinjection study in the rat. **Physiology & behavior**, v. 79, n. 4-5, p. 581-90, 2003.

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

SANNA, P. P. et al. ERK regulation in chronic ethanol exposure and withdrawal. **Brain research**, v. 948, n. 1-2, p. 186-91, 2002.

SCHROEDER, J. P.; PACKARD, M. G. Facilitation of memory for extinction of drug-induced conditioned reward: role of amygdala and acetylcholine. **Learning & memory** (Cold Spring Harbor, N.Y.), v. 11, n. 5, p. 641-7, 2004.

SHIBASAKI, M. et al. Effect of Aripiprazole on Anxiety Associated With Ethanol Physical Dependence and on Ethanol-Induced Place Preference. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 118, n. 2, p. 215-224, 2012.

SIDIROPOULOU, K. et al. Dopamine modulates an mGluR5-mediated depolarization underlying prefrontal persistent activity. **Nature neuroscience**, v. 12, n. 2, p. 190-9, 2009.

SILBERMAN, Y. et al. Neurobiological Mechanisms Contributing to Alcohol-Stress-Anxiety Interactions. **Alcohol**, v. 43, n. 7, p. 1-17, 2010.

SINHA, R. How does stress increase risk of drug abuse and relapse? **Psychopharmacology**, v. 158, n. 4, p. 343-59, 2001.

SPANAGEL, R. Recent animal models of alcoholism. **Alcohol research & health**, v. 24, n. 2, p. 124-31, 2000.

SPERLING, R. E. et al. Endogenous kappa-opioid mediation of stress-induced potentiation of ethanol-conditioned place preference and self-administration. **Psychopharmacology**, v. 210, n. 2, p. 199-209, 2010.

STROTHER, W. N. et al. Dopamine and serotonin content in select brain regions of weanling and adult alcohol drinking rat lines. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 80, n. 2, p. 229-237, 2005.

THEILE, J. W. et al. GABAergic transmission modulates ethanol excitation of ventral tegmental area dopamine neurons. **Neuroscience**, v. 172, p. 94-103, 2011.

TRULLAS, R.; SKOLNICK, P. Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. **Psychopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 323-31, 1993.

VALDEZ, G. R. et al. Increased ethanol self-administration and anxiety-like behavior during acute ethanol withdrawal and protracted abstinence: regulation by corticotropin-releasing factor. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 26, n. 10, p. 1494-501, 2002.

VALDEZ, G. R. et al. Antagonism of corticotropin-releasing factor attenuates the enhanced responsiveness to stress observed during protracted ethanol abstinence. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 29, n. 2, p. 55-60, 2003.

VENGELIENE, V. et al. Neuropharmacology of alcohol addiction. **British journal of pharmacology**, v. 154, n. 2, p. 299-315, 2008.

WEISS, F. et al. Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus accumbens: genetic and motivational determinants. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 267, n. 1, p. 250-8, 1993.

WEISS, F. et al. Ethanol self-administration restores withdrawal-associated deficiencies in accumbal dopamine and 5-hydroxytryptamine release in dependent rats. **The Journal of neuroscience**, v. 16, n. 10, p. 3474-85, 1996.

WEISS, F. et al. Compulsive drug-seeking behavior and relapse. Neuroadaptation, stress, and conditioning factors. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 937, p. 1-26, 2001.

WILSON, J.; WATSON, W. P.; LITTLE, H. J. CCK(B) antagonists protect against anxiety-related behaviour produced by ethanol withdrawal, measured using the elevated plus maze. **Psychopharmacology**, v. 137, n. 2, p. 120-31, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Status Report on Alcohol and Health**. Geneva: [s.n.].

YAVICH, L.; TIIHONEN, J. Ethanol modulates evoked dopamine release in mouse nucleus accumbens: dependence on social stress and dose. **European journal of pharmacology**, v. 401, n. 3, p. 365-73, 11 2000.

YOSHIMOTO, K. et al. Alcohol stimulates the release of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 9, n. 1, p. 17-22, 1991.

ZHANG, Z. et al. Dose- and time-dependent expression of anxiety-like behavior in the elevated plus-maze during withdrawal from acute and repeated intermittent ethanol intoxication in rats. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 31, n. 11, p. 1811-9, 2007.

ZHAO, X. et al. Stress impairs consolidation of recognition memory after blocking drug memory reconsolidation. **Neuroscience Letters**, v. 501, p. 50-54, 2011.

# ANEXOS



Universidade Federal de Uberlândia

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)

Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A - Campus Santa Mônica -  
Uberlândia-MG –

CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceua@propp.ufu.br;

[www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

ANÁLISE FINAL Nº 115/11 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE  
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 004/11

Projeto Pesquisa: “Exposição ao estresse e alterações comportamentais e neuroadaptações em um modelo animal de dependência ao etanol”.

Pesquisador Responsável: Marcelo Tadeu Marin

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

.

Uberlândia, 15 de julho de 2011

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes  
Presidente da CEUA/UFU



Universidade Federal de Uberlândia

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)

Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa  
Mônica - Uberlândia-MG –

CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceua@propp.ufu.br;

[www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

ANÁLISE FINAL Nº 204/11 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE  
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 120/11

Projeto Pesquisa: “Exposição ao estresse e alterações comportamentais e neuroadaptações em um modelo animal de dependência ao etanol”.

Pesquisador Responsável: Marcelo Tadeu Marin

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE À CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

AO FINAL DA PESQUISA DEVE SER ENTREGUE À CEUA UM RELATÓRIO. O MODELO DESTES ESTÁ NO SITE.

Uberlândia, 20 de dezembro de 2011

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes  
Presidente da CEUA/UFU