



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas

Associação entre propensão ao alto consumo de etanol, comportamentos relacionados à dependência e alterações neurais: uma comparação entre camundongos C57BL/6J e Suíços

Mariane Ferreira dos Santos

Uberlândia – MG

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas

Associação entre propensão ao alto consumo de etanol, comportamentos relacionados à dependência e alterações neurais: uma comparação entre camundongos C57BL/6J e Suíços

Projeto de Pesquisa submetido ao Colegiado do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre.

Aluno: _____

Mariane Ferreira dos Santos – Matrícula 11312BCE016

Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas

Orientador: _____

Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin

Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara-SP

Uberlândia – MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- S237a
2015 Santos, Mariane Ferreira dos, 1991-
Associação entre propensão ao alto consumo de etanol, comportamentos relacionados à dependência e alterações neurais: uma comparação entre camundongos C57BL/6J e Suíços / Mariane Ferreira dos Santos. - 2015.
86 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. Citologia - Teses. 2. Álcool no organismo - Teses. 3. Proteínas - Teses. I. Marin, Marcelo Tadeu. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Biomédicas e Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas pelo espaço físico e equipamentos cedidos para realização do trabalho.

Ao Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia (PANT) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) pelo espaço físico e material cedidos para realização dos experimentos de quantificação neuroquímica, em especial à Elisabete Zocal Paro Lepera (Laboratório de Farmacologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas) pela paciência e auxílio nessa parte dos experimentos.

À Professora Dra. Sandra R. Mota Ortiz e Wagner Fernandes de Oliveira, do Laboratório Bases Neurais do Comportamento (NUPEN) da Universidade Cidade de São Paulo (UNICID), pelo auxílio na realização do experimento de quantificação de Fos, disponibilizando seu tempo e materiais necessários.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do projeto que originou este trabalho.

À CAPES pelo fornecimento da bolsa de auxílio durante grande parte desse projeto, o que me proporcionou algumas realizações pessoais importantes.

Ao meu amigo Gessynger que ajudou muito com a parte prática desse projeto, sem o qual não teria conseguido fazer grande parte dos experimentos. Também agradeço pela sua hospitalidade em Araraquara, no fim foi divertida a semana de aperto.

Aos amigos que estiveram presentes nesses dois anos de mestrado: Tafarel, Tarso, Nicolas, Jack, Panda, Clarissa, Ingrid, e todos os outros que fazem parte da minha trajetória. Vocês foram essenciais para eu conseguir manter o foco.

À minha família por todo o apoio, principalmente minha mãe Eliane que sabe o quão difícil foram esses dois anos, e por ter me proporcionado realizar outros projetos paralelos. Juntamente a ela, minha madrinha Livia que faz parte da realização desses projetos.

Ao Luke por não deixar eu estudar quando ele queria brincar, e ao Ringo por pular na janela requisitando minha atenção o tempo todo.

Por último, mas não menos importante, ao meu orientador Marcelo. Agradeço a você por ter aceitado me orientar nesse projeto e ter confiado que eu conseguiria, mesmo sem experiência alguma. Entrei nesse mestrado vindo de uma área bem diferente, tive que começar do zero a aprender tudo novo, e ainda assim você continuou comigo. Obrigada pelo

ensinamento, pelas conversas pelo Skype, por estar presente mesmo estando longe, por ter compreendido meus projetos paralelos.

“[...] E começou Noé a ser lavrador da terra, e plantou uma vinha. E bebeu do vinho, e embebedou-se; e descobriu-se no meio de sua tenda [...]” (Gênesis 9.20-21)

“A *Embriaguez de Noé*”, um dos primeiros relatos de que se tem conhecimento sobre um caso de embriaguez.

RESUMO

O etanol é a droga que causa dependência mais consumida no mundo e seu uso indevido é um dos principais fatores que contribui para a diminuição da saúde mundial. A gravidade da dependência ao etanol como problema de saúde pública, e suas inúmeras consequências na convivência social e saúde do indivíduo, impulsionam a importância de investigações sobre os mecanismos neurais que contribuem para essa patologia. Informações sobre o envolvimento de determinados neurotransmissores e quais regiões encefálicas são ativadas pelo etanol são importantes na compreensão dos mecanismos envolvidos na dependência. O objetivo do trabalho foi avaliar a associação entre propensão ao alto consumo de etanol e o desenvolvimento de comportamentos relacionados à dependência, também a relação das monoaminas encefálicas e a ativação de áreas neurais com esses comportamentos. Foram utilizados camundongos machos das linhagens Suíço e C57BL/6J (C57), submetidos aos testes de (1) consumo por livre escolha de etanol, (2) inflexibilidade do consumo de etanol com adição de quinino, (3) preferência condicionada ao lugar (PCL) tendo etanol como agente condicionante, (4) quantificação da atividade locomotora, (5) avaliação da ativação neuronal pela expressão da proteína Fos e (6) quantificação do conteúdo de Noradrenalina (Nor), Dopamina (DA) e serotonina (5-HT). Os testes 3 a 6 foram realizados com injeções intraperitoneais de etanol. Camundongos C57 consumiram mais etanol que os Suíços, e também preferiram mais a solução de etanol em relação à água pura. Um dos critérios para diagnóstico de dependência é o uso da droga apesar do conhecimento das consequências adversas. O consumo e a preferência pela solução de etanol da linhagem Suíço não foram reduzidos pela adição de quinino, enquanto nos animais C57 a redução foi significativa. O teste de PCL revelou que apenas os animais Suíços apresentam condicionamento pelo etanol, permanecendo mais tempo em um ambiente que foi pareado à droga. Nossos resultados para os testes de locomoção mostraram que tanto os camundongos Suíços quanto os C57 se locomoveram mais após as injeções de etanol do que após as injeções de salina, indicando que ambas as linhagens são responsivas aos efeitos estimulantes psicomotores da droga. O teste de ativação neuronal mostrou que, de maneira geral, os Suíços são mais responsivos ao etanol, mostrando maior número de regiões ativadas após administração da droga, enquanto os C57 mostraram tendência à diminuição da ativação em algumas regiões relacionadas com consumo de etanol. Os resultados da neuroquímica não indicaram aumento nas concentrações de DA, 5-HT ou Nor após administração de etanol, mas de maneira geral os Suíços possuem concentrações basais desses neurotransmissores maiores do que os C57. Dessa forma o alto consumo de etanol não está necessariamente relacionado a expressão de comportamentos

relacionados à dependência. A expressão de comportamentos relacionados à dependência nos animais Suíços pode estar relacionada a maior ativação neural pelo etanol de áreas relacionadas ao reforço nesses animais, e a concentração tecidual de DA e 5-HT pode participar desse processo.

Palavras-chave: Etanol. Dependência. Proteína Fos.

ABSTRACT

Ethanol is the addictive drug most consumed worldwide and its misuse is a major factor contributing to the decline in global health. The severity of ethanol addiction as a public health problem, and its many consequences in an individual's social life and health, boost the importance of research on the neural mechanisms that contribute to this pathology. Information about the involvement of certain neurotransmitters and brain regions that are activated by ethanol are important in understanding the mechanisms involved in addiction. The aim of this work was to evaluate the association between propensity to high ethanol consumption and the development of addiction-related behaviors, also the relationship of brain monoamines and activation of neural areas with these behaviors. Male mice of Swiss and C57BL/6J (C57) strains were used, undergoing the following tests: (1) two bottle choice ethanol preference test, (2) inflexibility of ethanol consumption with the addition of quinine, (3) conditioned place preference (CPP) with ethanol as a conditioning agent, (4) quantification of locomotor activity, (5) evaluation of neuronal activation by expression of Fos protein and (6) quantification of the contents of noradrenaline (Nor), dopamine (DA) and serotonin (5-HT). Tests 3 to 6 were carried out after intraperitoneal injections of ethanol. C57 mice drank more ethanol than the Swiss ones, and also preferred the ethanol solution over tap water. One of the criteria for addiction diagnosis is drug use despite knowledge of its adverse consequences. The consumption and preference for ethanol solution of the Swiss strain was not reduced by the addition of quinine, while in the C57 strain this was a significant reduction. The CPP test revealed that only the Swiss animals were conditioned by ethanol, staying longer in an environment that was paired to the drug. Our results for the locomotion assays showed that both Swiss and C57 mice exhibited increased locomotor activity after ethanol injections than after saline injections, indicating that both strains are responsive to the psychomotor stimulant effects of the drug. The neuronal activation test showed that, overall, the Swiss are more responsive to ethanol, showing a greater number of activated regions after drug administration, while C57 showed a tendency to decrease activation in some regions related to ethanol consumption. The neurochemical results do not show an increase in DA, 5-HT or Nor concentrations after ethanol administration, but in general the Swiss have higher basal concentrations of these neurotransmitters than C57. In this way, the high consumption of ethanol is not necessarily associated to the expression of dependence-related behaviors. The expression of addiction-related behaviors in the Swiss animals may be associated to increased neural activation by ethanol of areas related to reinforcement in these animals, and the tissue concentration of DA and 5-HT may be involved.

Keywords: Ethanol. Addiction. Fos protein.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Consumo de etanol em solução pelos camundongos das linhagens Suíço e C57BL/6J.....	36
Figura 2: Preferência pelo etanol em solução pelos camundongos das linhagens Suíço e C57BL/6J.....	37
Figura 3: Consumo de etanol em solução com adição da substância quinino pelos camundongos das linhagens Suíço e C57BL/6J	38
Figura 4: Preferência pelo etanol em solução com adição da substância quinino pelos camundongos das linhagens Suíço e C57BL/6J	39
Figura 5: Preferência condicionada por lugar (PCL) entre camundongos das linhagens Suíço e C57BL/6J.....	40
Figura 6: Comparação da atividade locomotora das linhagens Suíço e C57BL/6J, avaliada por meio do Campo Aberto	41
Figura 7: Comparação da ativação neuronal induzida pelo etanol entre camundongos Suíço e C57BL/6J, avaliada por meio da expressão da proteína Fos	42
Figura 8: Comparação da ativação neuronal induzida pelo etanol entre camundongos Suíço e C57BL/6J, avaliada por meio da expressão da proteína Fos	43
Figura 9: Região do Núcleo Acumbens (NAc) após marcação para Fos	44
Figura 10: Região do Córtex Pré-Frontal (CPF) após marcação para Fos	45
Figura 11: Comparação da ativação neuronal induzida pelo etanol entre camundongos Suíço e C57BL/6J, avaliada por meio da expressão da proteína Fos	47
Figura 12: Comparação da ativação neuronal induzida pelo etanol entre camundongos Suíço e C57BL/6J, avaliada por meio da expressão da proteína Fos	48
Figura 13: Comparação da ativação neuronal induzida pelo etanol entre camundongos Suíço e C57BL/6J, avaliada por meio da expressão da proteína Fos	49
Tabela 1: Efeito da injeção de etanol na concentração de DA, DOPAC e HVA (ng/mg de tecido) e <i>turnover</i> dopaminérgico em camundongos Suíços e C57BL/6J.....	50
Tabela 2: Efeitos da injeção de etanol (2 g/kg) nas concentrações de 5-HT, 5-HIAA e Nor (ng/mg de tecido) e <i>turnover</i> serotoninérgico em camundongos Suíço e C57BL/6J	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ácido 5-Hidroxiindolacético (5-HIAA)
Ácido Dihidroxifenilacético (DOPAC)
Ácido Homovanílico (HVA)
Álcool Desidrogenase 1B classe 1 (ADH1B)
Aldeído Desidrogenase 2 (ALDH2)
Amígdala (AMI)
Amígdala Central (CeA)
Área Tegmental Ventral (ATV)
Campo Aberto (CA)
Caudado Putamen (CPu)
Centro do Núcleo Accumbens (ACu-Core)
Classificação Internacional das Doenças (CID)
Córtex Pré-Frontal (CPF)
Cromatografia Líquida De Alta Eficiência (HPLC)
Descarboxilase de Aminoácidos Aromáticos (L-DOPA Descarboxilase)
Dopamina (DA)
Enzima Catecol-O-Metiltransferase (COMT)
Hipotálamo Lateral (LH)
Intraperitoneal (i.p.)
L-Dihidroxi-Fenilalanina (L-DOPA)
Locus Coeruleus (LC)
Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM)
Matéria Cinzenta Periaquedutal (MCP)
Monoamino Oxidase (MAO)
Noradrenalina (Nor)
Núcleo Accumbens (NAc)
Organização Mundial de Saúde (OMS)
Preferência Condicionada Por Lugar (PCL)
Receptor Colinérgico Muscarínico 2 (CHRM2)
Receptor de GABA Subtipo A2 (GABRA2)
Serotonina (5-HT)
Sistema Nervoso Central (SNC)
Substância Negra (SN)

Tetrahidrocloreto de 3-3'diaminobenzidina (DAB)

Tirosina Hidroxilase (TH)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Breve Histórico	14
1.2. Dependência ao etanol	15
1.3. Dependência ao etanol e modelos animais	17
1.4. Alterações neurais relacionadas ao etanol	20
<i>Serotonina</i>	21
<i>Dopamina</i>	22
<i>Noradrenalina</i>	23
<i>Fos</i>	24
2. JUSTIFICATIVA.....	26
3. OBJETIVOS	27
3.1. Objetivos gerais.....	27
3.2. Objetivos específicos.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1. Animais	28
4.2. Consumo por livre escolha de etanol	28
4.3. Inflexibilidade do consumo de etanol	29
4.4. Preferência condicionada por lugar (PCL).....	29
4.5. Quantificação da atividade locomotora.....	30
4.6. Avaliação imunohistoquímica da ativação neuronal pela expressão da proteína Fos	30
4.6.1. Detecção imunohistoquímica da proteína Fos.....	31
4.6.2. Quantificação das células imunorreativas a proteína Fos.....	31
4.7. Quantificação do conteúdo de Noradrenalina (Nor), Dopamina (DA), serotonina (5-HT) e seus metabólitos	32
4.8. Procedimento experimental.....	32
Experimento 1: Comparação do consumo e inflexibilidade do consumo de etanol entre camundongos Suíço e C57BL/6J.....	32
Experimento 2: Comparação da preferência condicionada por lugar (PCL) ao etanol entre camundongos Suíço e C57BL/6J.....	33
Experimento 3: Comparação da atividade locomotora induzida pelo etanol entre camundongos Suíço e C57BL/6J	33
Experimento 4: Comparação da ativação neuronal induzida pelo etanol entre camundongos Suíço e C57BL/6J	33
Experimento 5: Comparação do efeito do etanol no conteúdo dos neurotransmissores Nor, DA, 5-HT e seus metabólitos entre camundongos Suíço e C57BL/6J	34

4.9. Análise Estatística	34
5. RESULTADOS	36
Experimento 1: Comparação do consumo e inflexibilidade do consumo de etanol entre camundongos Suíço e C57BL/6J.	36
Experimento 2: Comparação da preferência condicionada por lugar (PCL) ao etanol entre camundongos Suíço e C57BL/6J	39
Experimento 3: Comparação da atividade locomotora induzida pelo ambiente novo e pelo etanol entre camundongos Suíço e C57BL/6J	40
Experimento 4: Comparação da ativação neuronal induzida pelo etanol entre camundongos Suíço e C57BL/6J	41
Experimento 5: Comparação do efeito do etanol no conteúdo dos neurotransmissores Nor, DA, 5-HT e seus metabólitos entre camundongos Suíço e C57BL/6J.....	49
6. DISCUSSÃO.....	53
7. CONCLUSÃO	72
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXO A.....	85

1. INTRODUÇÃO

1.1. Breve Histórico

Durante grande parte dos últimos 10 milênios as bebidas alcoólicas podem ter sido a bebida diária mais popular e comum, uma fonte indispensável de fluidos e calorias. Em épocas nas quais as fontes de abastecimento de água estavam no geral contaminadas - sendo, portanto, perigosas para o consumo -, o etanol mereceu o título de *aqua vitae* (água da vida), sendo a alternativa que essas populações tinham para consumo de líquidos (VALLEE, 1998).

Registros arqueológicos revelam que os primeiros indícios sobre o consumo de etanol pelo ser humano datam de aproximadamente 6000 a.C., sendo, portanto, um costume extremamente antigo e que tem persistido por milhares de anos. Acredita-se que a bebida alcoólica teve origem na Pré-História, quando houve a aparição da agricultura e a invenção da cerâmica. A partir de um processo de fermentação natural ocorrido há aproximadamente 10.000 anos o ser humano passou a consumir e a atribuir diferentes significados ao uso do etanol - a noção do etanol como uma substância divina, por exemplo, pode ser encontrada em inúmeros exemplos na mitologia - (CEBRID, 2013).

Inicialmente as bebidas tinham conteúdo alcoólico relativamente baixo (p. ex. o vinho e a cerveja), uma vez que dependiam exclusivamente do processo de fermentação. Com o aparecimento do processo de destilação, introduzido na Europa pelos árabes na Idade Média, surgiram novos tipos de bebidas alcoólicas, que continham teor alcóólico mais alto que as bebidas fermentadas. Nessa época, as bebidas destiladas passaram a ser consideradas um “remédio” para todas as doenças, pois “dissipavam as preocupações mais rapidamente que o vinho e a cerveja, além de produzirem alívio mais eficiente da dor”. No século XVI, o etanol (denominado como “espirituoso”), foi amplamente utilizado para propósitos médicos (BELTRAN, 1996; CEBRID, 2013; VALLEE, 1998).

A partir da Revolução Industrial registrou-se grande aumento na oferta desse tipo de bebida, contribuindo para um maior consumo e, conseqüentemente, gerando aumento no número de pessoas que passaram a apresentar algum tipo de problema decorrente do uso excessivo de etanol (CEBRID, 2013). O século XIX trouxe uma mudança de atitude e o movimento antialcoolismo começou a promover o uso moderado do etanol, que acabou por se converter numa campanha de proibição total, mas que não perdurou muito tempo.

Apesar do abuso de etanol ter sido sempre criticado durante a história humana, o conceito de dependência alcoólica só foi surgir no final do século XVIII e início do século

XIX. Foi somente no ano de 1952 com a primeira edição do DSM-I (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais) que o alcoolismo passou a ser tratado como doença. No ano de 1967 o conceito de doença do alcoolismo foi incorporado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) à Classificação Internacional das Doenças (CID-8), a partir da 8ª Conferência Mundial de Saúde (TABAKOFF E HOFFMAN, 2000).

1.2. Dependência ao etanol

O etanol é a droga mais consumida no mundo, aproximadamente dois bilhões de pessoas consomem bebidas alcoólicas. O uso indevido é um dos principais fatores que contribui para a diminuição da saúde mundial, sendo responsável por aproximadamente 4% de todas as mortes (2,5 milhões de mortes por ano; por causas variadas, incluindo: cirrose, câncer hepático, acidentes, entre outras) e por 4% de todos os anos perdidos de vida útil. Nos países em desenvolvimento, entre eles o Brasil, o etanol é um dos principais fatores causadores de doença e mortalidade, com impacto deletério considerado entre 8% e 14,9% do total de problemas de saúde (MELONI E LARANJEIRA, 2004; WHO, 2011).

No Brasil, nos anos de 2000 e 2001, cada adulto consumiu em média 5,32 litros de bebida alcoólica, uma das maiores taxas da América Latina (desconsiderando-se os dados não registrados que contam com em média 3,0 litros). Em contrapartida, a taxa de abstinentes na população também foi uma das maiores, com 51,5% da população abstinente nesses anos (40% dos homens e 60% das mulheres). Em 2003, 9,9% da população experimentou algum episódio de beber intenso, sendo 15,3% desse percentual de adultos jovens (entre 18 e 24 anos). Ainda nesse período foi constatado que 11,2% da população brasileira apresentava dependência, um número que é mais significativo entre os homens (17,1 contra apenas 5,7 das mulheres) (WHO, 2004).

Consumir um volume excessivo de etanol em um curto espaço de tempo é uma prática conhecida na literatura como “*binge drinking*”, ou “beber em binge”. Esse termo é empregado para definir o consumo compulsivo periódico de bebida, em um padrão de ingestão intensa durante um período prolongado (mais que um dia), escolhido de maneira propositada. É um tipo de consumo mais perigoso e frequentemente associado a uma série de problemas físicos, sociais e mentais. O indivíduo durante os episódios de “*binge drinking*” perde sua capacidade plena de percepção e julgamento, podendo provocar acidentes lesando não só ele mesmo, mas também pessoas próximas. Isso se dá pelo fato de ocorrerem, durante os episódios de consumo, importantes modificações neurofisiológicas (desinibição comportamental,

comprometimento cognitivo, diminuição da atenção e da capacidade de julgamento, menor coordenação motora, etc.) (BERTOLOTE, 2010; I LENAD, 2007).

O etanol é uma substância que conhecidamente deprime o funcionamento do Sistema Nervoso Central (SNC), alterando o equilíbrio entre as influências inibitórias e excitatórias no encéfalo (aumento da neurotransmissão inibitória ou antagonismo da neurotransmissão excitatória, respectivamente). O seu consumo promove desinibição, ação ansiolítica, ataxia (falta de coordenação nos movimentos corporais) e sedação. São necessárias quantidades grandes de etanol para obtenção de efeitos fisiológicos (da ordem de gramas, comparado com outras drogas que agem com micro ou miligramas), e os níveis séricos são determinados por fatores variados, tais como: velocidade de ingestão, sexo, peso e percentual de água corporal, índices de metabolismo e esvaziamento gástrico (FLEMING, MIHIC E HARRIS, 2012).

Sinais de intoxicação aguda pelo etanol variam em humanos, indo desde manifestações expansivas e vivazes do afeto até alterações descontroladas do humor e crises emocionais, podendo apresentar componentes de violência. Também podem estar presentes: aumento do tempo de reação, diminuição do controle motor fino, impulsividade e comprometimento do discernimento. Nos casos de intoxicação mais grave ocorre um comprometimento geral da função do SNC, prevalecendo por fim um estado de anestesia geral. O uso crônico de etanol pode levar a dano encefálico, o que contribui para os déficits de função cognitiva e discernimento observados nos alcoolistas. O abuso de etanol pode ocasionar perda de tecido encefálico e também reduzir o metabolismo encefálico (FLEMING, MIHIC E HARRIS, 2012).

O consumo agudo de etanol induz várias alterações fisiológicas sistêmicas das quais pode-se citar: (1) elevação da pressão arterial sistólica e diastólica; (2) efeitos na condução cardíaca, podendo levar a arritmias; (3) depressão do mecanismo de regulação da temperatura corporal, podendo levar a queda acentuada da temperatura; (4) inibição da liberação de vasopressina (hormônio antidiurético) da hipófise posterior, levando ao aumento da diurese; (5) vários efeitos deletérios no fígado, sendo os principais: infiltração gordurosa do fígado, hepatite e cirrose; e várias outras manifestações deletérias. No entanto, o consumo *moderado* de etanol pode trazer alguns efeitos benéficos, como: efeitos nos lipídios séricos, alterando os níveis plasmáticos de lipoproteínas, particularmente aumentando lipoproteínas de alta densidade (HDL) (FLEMING, MIHIC E HARRIS, 2012).

O etanol é uma das drogas de escolha - se não a principal - entre jovens e adolescentes, e o consumo exagerado têm se tornado cada vez mais frequente nesse grupo. Uma importante consequência do uso de etanol na adolescência é o maior risco a desenvolver abuso e

dependência na vida adulta. Estudos com humanos sugerem que o consumo de etanol cedo na vida pode ser um indicador de problemas posteriores com seu uso e dependência, bem como a outras drogas (Pascual *et al*, 2012). A exposição pré-natal ao etanol também é um problema de proporções mundiais; estudos clínicos demonstraram que déficits no crescimento cerebral e distúrbios neurológicos são algumas das consequências patológicas dessa exposição, como por exemplo a Síndrome Alcoólica Fetal (SARI *et al*, 2011).

Alguns comportamentos que caracterizam o alcoolismo em humanos, de acordo com os critérios para o diagnóstico de alcoolismo definidos no DSM, Quarta Edição (APA, 2000), incluem os seguintes:

- I. Tolerância, ou a necessidade de quantidades cada vez maiores de etanol para obtenção dos efeitos desejados;
- II. Sintomas de abstinência após a descontinuação do uso¹;
- III. Consumo de etanol em grandes quantidades, por períodos superiores ao inicialmente previsto;
- IV. Desejo persistente, ou esforços malsucedidos, para diminuição do consumo;
- V. Gasto de grande parte do tempo adquirindo etanol;
- VI. Redução de atividades sociais e ocupacionais importantes devido ao uso de etanol;
- VII. Uso continuado, apesar de algum problema físico ou psicológico recorrente associado ao uso do etanol.

¹: Um grupo de sintomas de configuração e gravidade variáveis que ocorrem após a cessação ou redução do uso de uma substância psicoativa que vinha sendo usada repetidamente e geralmente após um longo período e/ou em altas doses. A síndrome pode ser acompanhada por sinais de alterações fisiológicas. A síndrome de abstinência do álcool é caracterizada por tremores, sudorese, ansiedade, agitação, depressão, náusea e mal-estar. Ocorre entre 6-48 horas após a interrupção do consumo de álcool e, quando não complicada, termina em 2-5 dias. Pode complicar-se por convulsões e progredir para um delírium (conhecido como *delirium tremens*) (BERTOLOTE, 2010).

1.3. Dependência ao etanol e modelos animais

Devido a preocupações éticas e dificuldades experimentais no estudo do alcoolismo em humanos (como o risco envolvido na administração de uma droga que causa dependência a humanos, e os riscos relacionados com acidentes e consequências médicas e psicológicas), pesquisas sobre o tema intoxicação pelo etanol e dependência têm utilizado animais não humanos como modelos experimentais, os quais constituem ferramentas importantes no

estudo do consumo, abuso e dependência ao etanol - uma vez que permitem aos investigadores utilizarem métodos que não podem ser utilizados em humanos -. Os modelos foram desenvolvidos para estudar vários aspectos do uso e dependência ao etanol, incluindo o comportamento de busca pela droga, danos a órgãos a ela relacionados, tolerância e síndrome de abstinência ao etanol (TABAKOFF E HOFFMAN, 2000).

Uma característica marcante da dependência de substâncias psicoativas é a continuação do uso da substância apesar do reconhecimento das consequências aversivas deste uso (DACKIS; O'BRIEN, 2001; KARILA et al., 2008). Em animais de laboratório essa característica é difícil de demonstrar. Entretanto, especificamente para o consumo de etanol, isso pode ser evidenciado pela adição da substância amarga quinino na solução de etanol. Roedores que não demonstram comportamentos relacionados à dependência prontamente reduzem o consumo de solução de etanol quando ela está adulterada com quinino. No entanto, roedores caracterizados como dependentes demonstram consumo de etanol inflexível apesar da adição de quinino, demonstrando a continuação do consumo de etanol apesar das consequências desagradáveis disso (RIBEIRO et al., 2008; LESSCHER et al., 2010).

Outro modelo animal utilizado para avaliar aspectos relacionados à dependência é o de Preferência Condicionada por Lugar (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 procura pelo ambiente associado com a substância psicoativa (ROBINSON; BERRIDGE, 2003). A administração de etanol induz PCL (NOCJAR MIDDAUGH, TAVERNETTI, 1999) e recentemente demosramos no nosso grupo de pesquisa que fatores ambientais, como a exposição ao estresse altera a PCL ao etanol (MOREIRA-SILVA et al., 2013).

Nesses modelos o pesquisador geralmente controla a ingestão de etanol. A droga pode ser administrada aos animais por uma dieta líquida - como única fonte de nutrição -, administrada por um tubo implantado no estômago (administração intragástrica), por injeção, ou administrada através de inalação em câmaras especialmente projetadas. O objetivo em todas as vias de administração é gerar as alterações adaptativas no encéfalo que estão associadas com o etanol (TABAKOFF E HOFFMAN, 2000).

A utilização da via adequada de administração de cada droga de abuso proporciona uma fonte adicional de validade para os modelos animais. Métodos de autoadministração de

etanol por via oral em roedores apresentam validade de face e de constructo evidentes como modelos de consumo de etanol em humanos. Os indivíduos (animais) podem optar por beber etanol ou não, na quantidade e no momento que lhes convier (SPANAGEL; ZIEGLGÄNSBERGER, 1997; SANCHIS-SEGURA E SPANAGEL, 2006).

A concentração de etanol é uma questão crítica nesses procedimentos, pois concentrações baixas ou muito altas podem ser consumidas ou rejeitadas por causa de suas propriedades de sabor doce ou aversivo, respectivamente. Além disso, como a quantidade de fluido ingerido é limitada por restrições fisiológicas, uma concentração de etanol muito baixa pode resultar em níveis insignificantes de etanol no encéfalo. Assim, é geralmente considerado que concentrações inferiores a 4% de etanol (v/v) não são farmacologicamente relevantes e que uma concentração na faixa de 8-12% é um padrão adequado para consumo pelos roedores. Entretanto, quando inicialmente oferecido, a maioria das linhagens de roedores provavelmente não beberá de uma solução de etanol altamente concentrada. Assim, é necessário “treinar” os roedores a autoadministrar oralmente quantidades farmacologicamente relevantes de etanol, o que pode ser feito, por exemplo, apresentando concentrações crescentes da droga (SANCHIS-SEGURA E SPANAGEL, 2006).

Fatores neurobiológicos influenciam na vulnerabilidade ao abuso de substâncias, e diferenças entre as linhagens de roedores na autoadministração de etanol - e grande variedade de outras substâncias - têm sido bem documentadas, com vários trabalhos relatando diferenças no consumo de etanol entre diferentes linhagens de camundongos (LÊ *et al*, 1994; METTEN E CRABBE, 2005; YONEYAMA *et al.*, 2008; CRABBE *et al.*, 2012). Isso sugere que fatores genéticos podem modular as diferenças individuais na susceptibilidade aos efeitos do etanol e outras drogas (COLLINS; MARKS, 1991; DEFIEBRE; COLLINS, 1992; MELISKA *et al*, 1995).

Há muito se notou que o alcoolismo tem um histórico de ocorrência no ambiente familiar, e várias evidências apontam para contribuições genéticas como sendo a etiologia de tal fato. Estudos sobre alcoolismo em crianças adotadas mostram que o consumo de etanol tem mais correlação com os pais biológicos dessas crianças do que com os pais adotivos, e estudos com gêmeos sugerem que em torno de 45–65% da susceptibilidade ao alcoolismo pode ser atribuída a fatores genéticos. Estudos com animais também demonstram o envolvimento de fatores genéticos no alcoolismo: roedores podem ser cruzados a fim de seletivamente isolar alguns traços associados com o consumo e dependência de etanol, incluindo: preferência, sensibilidade, sintomas de abstinência. O fato de ser possível selecionar tais características indica que elas possuem algum determinante genético,

diferentes genes controlando diferentes aspectos fenotípicos (MCBRIDE et al., 1990; HEATH et al., 1997; EDENBERG e FOROUD, 2013).

Apesar de fatores genéticos estarem envolvidos com o consumo e dependência ao etanol, não existe um “gene do alcoolismo” específico, e fatores sociais e ambientais também contribuem para o risco de uma pessoa desenvolver qualquer problema relacionado ao etanol. Fatores genéticos afetam não somente o risco de desenvolver dependência, mas também o nível de consumo de etanol e o risco a desenvolver patologias associadas ao etanol (câncer, doenças cardiovasculares, hepatite, entre outras). Mesmo não existindo um gene específico, alguns claramente contribuem com o risco ao alto consumo de etanol e alcoolismo. Por exemplo, os genes da família álcool desidrogenase 1B classe 1 (ADH1B) e genes da família aldeído desidrogenase 2 (ALDH2), os quais controlam o metabolismo do etanol. Também o gene para o receptor de GABA subtipo A2 (GABRA2) e o gene para o receptor colinérgico muscarínico 2 (CHRM2) foram associados com dependência ao etanol (REICH et al., 1998; HURLEY; EDENBERG, 2012; EDENBERG e FOROUD, 2013).

As diferenças entre linhagens no consumo oral de etanol parecem refletir dois fatores: um “pré-ingestão”, que considera efeitos periféricos, sabor; e um “pós-ingestão”, que considera efeitos farmacológicos, centrais. Os fatores “pré-ingestão”, influenciam na ingestão, propriamente dita, de etanol e outras drogas, já os fatores “pós-ingestão” influenciam parte das diferenças entre as linhagens quanto ao consumo (motivação para consumir) de etanol. É demonstrado que o aumento da palatabilidade de soluções de etanol, pela adição de um edulcorante (“adoçante”), eleva o consumo de etanol em camundongos C57BL/6 com preferência pelo etanol. No entanto, camundongos DBA/2 que não têm preferência pelo etanol, e que preferem soluções adocicadas ao invés de água pura, evitam soluções de etanol mesmo adocicadas. Isso sugere que os efeitos “pós-ingestão” do etanol são diferentes em animais, dependendo de suas características hereditárias (MELISKA *et al*, 1995).

1.4. Alterações neurais relacionadas ao etanol

O etanol produz uma grande variedade de efeitos nos sistemas excitatórios e inibitórios no encéfalo, que se combinam para produzir os efeitos característicos da droga: ‘elevação’ do humor, ansiolíticos, sedativos e de ataxia. O etanol modula positivamente os receptores GABA_A, inibe os receptores de glutamato e NMDA, possui ambos os efeitos inibitórios e excitatórios em receptores nicotínicos de acetilcolina, aumenta a atividade de canais de potássio ativados pelo cálcio, inibe alguns tipos de canais de cálcio (PIERCE E KUMARESAN, 2006; FLEMING, MIHIC E HARRIS, 2012). Tem ainda ação sobre opióides

endógenos (endorfinas, encefalinas e dinorfinas) e monoaminas encefálicas, e até endocanabinóides também têm sido sugeridos como alvos para o etanol (MIHIC; HARRIS, 1997; JOHNSON, 2008; GILPIN; KOOB, 2008).

Serotonina

A Serotonina (5-HT) é uma amina biogênica, que consiste de um anel de indol e de uma cadeia lateral de carboxil-amida. É sintetizada - no sistema nervoso entérico e no SNC - em duas etapas a partir do aminoácido essencial triptofano: (1) o triptofano é primeiramente hidroxilado pela enzima triptofano hidroxilase, obtendo-se 5-hidroxitriptofano; (2) este produto é então descarboxilado pela enzima descarboxilase do ácido L-amino aromático, obtendo-se 5-hidroxitriptamina (5-HT). Ambos os passos de síntese da 5-HT ocorrem dentro do neurônio serotoninérgico (GRAHAME-SMITH, 1967; LAM *et al*, 2010). Uma vez sintetizada a 5-HT é empacotada em vesículas para então ser liberada na sinapse. A sinalização é terminada pela captação da 5-HT da sinapse pelo transportador de 5-HT (5-HTT ou SERT), o neurotransmissor é então metabolizado, em dois passos: (1) desaminação oxidativa pela monoamino oxidase (MAO), obtendo-se 5-hidroxi-indol-3-acetaldeído; (2) em seguida, oxidação pela enzima aldeído desidrogenase formando ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (LAM *et al*, 2010).

Neurônios serotoninérgicos projetam a partir dos núcleos da rafe - os quais contêm os corpos celulares dos neurônios - e se ramificam extensivamente no SNC (GINGRICH E HEN, 2001). No SNC a 5-HT é liberada em quase todo o neuroeixo, agindo como um neurotransmissor modulador. É mais comumente associada à regulação do humor e ansiedade, mas também coordena funções cognitivas e autônomas - entre outras - para manter a homeostase e garantir a sobrevivência e reprodução (AZMITIA, 2007; LAM *et al*, 2010). O sistema da 5-HT também desempenha um papel modulador chave nos processos do SNC que parecem estar desregulados em transtornos psiquiátricos, incluindo a influência sobre circuitos de recompensa que medeiam motivação, estados hedônicos e as propriedades apetitivas das drogas de abuso (GINGRICH e HEN, 2001).

Neurônios serotoninérgicos no hipotálamo medeiam a ingestão de alimentos, e compostos que aumentam a neurotransmissão de serotonina (5-HT) (inibidores da recaptação, 'liberadores', agonistas) têm sido mostrados diminuindo a ingestão de alimentos. Há evidências para o envolvimento do sistema serotoninérgico na regulação do consumo de etanol, e estudos sugerem o envolvimento do sistema serotoninérgico da Amígdala na mediação dos efeitos agudos de doses moderadas a altas de etanol e do consumo de bebidas alcoólicas

(MYERS & VEALE, 1968; MURPHY *et al.*, 1988; LEMARQUAND, PIHL & BENKELFAT, 1994; MCBRIDE, 2002; FLEMING, MIHIC E HARRIS, 2012). Assim, é possível que o mesmo sistema serotoninérgico que controla a ingestão de alimentos e água pode também regular o consumo de etanol.

Dopamina

A dopamina (DA) desempenha um papel importante no controle de muitas funções fisiológicas vitais, incluindo coordenação motora, locomoção, comportamento emocional, cognição e regulação neuroendócrina (VOLKOW *et al.*, 1996; GAINETDINOV *et al.*, 1998; SHEN, LIAO E TSENG, 2012). Diversas doenças e condições neuropsiquiátricas (doença de Parkinson, déficit de atenção e hiperatividade, esquizofrenia, etc.) são amplamente aceitas como tendo base em uma disfunção dos sistemas dopaminérgicos cerebrais, incluindo abuso de substâncias (GAINETDINOV *et al.*, 1998). Acredita-se que a DA está envolvida com o abuso de drogas e, a maioria das drogas de abuso, têm um efeito direto aumentando os ciclos dopaminérgicos de recompensa no encéfalo, aumentando a concentração extracelular de DA em regiões límbicas (FADDA *et al.*, 1980; MURPHY *et al.*, 1988; FADDA *et al.*, 1990; WEISS *et al.*, 1993; PIERCE e KUMARESAN, 2006; SHEN, LIAO e TSENG, 2012). O etanol, juntamente com outras drogas de abuso (cocaína, heroína, metanfetamina, etc.), reduz - ou bloqueia - os transportadores de DA, aumentando a disponibilidade de DA livre no encéfalo (VOLKOW *et al.*, 1996; SHEN, LIAO e TSENG, 2012). A busca e consumo de etanol é mediado principalmente pela ativação da via dopaminérgica mesocorticolímbica (DiCHIARA; BASSAREO, 2007; VANGELIENE, 2008). Estudos pela técnica de microdiálise demonstraram que a administração de etanol (LOF *et al.*, 2007), cocaína, anfetamina, morfina ou nicotina (DiCHIARA; IMPERATO, 1988) aumentam a liberação de DA em área encefálicas, como o Núcleo Acumbens (NAc). Entretanto, em outras áreas, como o Córtex Pré-Frontal (CPF), tem sido demonstrado que a concentração de DA pode estar reduzida em ratos de uma linhagem selecionada para o alto consumo de etanol (ENGLEMAN *et al.*, 2006).

A DA é o neurotransmissor catecolaminérgico mais importante do SNC. É sintetizada nos neurônios dopaminérgicos a partir do aminoácido L-tirosina. Catecolaminas são compostos formados por um núcleo de catecol (um anel de benzeno com duas hidroxilas) e uma cadeia de etilamina ou um dos seus derivados. As enzimas responsáveis pela sua síntese são a tirosina hidroxilase (TH) e a descarboxilase de aminoácidos aromáticos (L-DOPA descarboxilase). Nos neurônios dopaminérgicos a DA é sintetizada no citoplasma, ela pode

ser liberada diretamente para a sinapse ou pode ser transportada em vesículas sinápticas para ser então liberada por exocitose (VOLKOW *et al.*, 1996; BAHENA-TRUJILLO, FLORES E ARIAS-MONTAÑO, 2000).

A DA é liberada na sinapse em resposta a um potencial de ação e interage com os receptores de DA pós-sinápticos. A concentração de DA na sinapse é principalmente regulada pela sua recaptação pelos transportadores de DA, mantendo concentrações baixas (GARRIS *et al.*, 1994; VOLKOW *et al.*, 1996). Embora existam enzimas que metabolizam a DA, a supressão dos efeitos do neurotransmissor é primariamente devida à sua captura pelos terminais nervosos que o liberaram (via transportadores de DA). A DA recapturada é convertida pela enzima monoamina oxidase (MAO) - presente no interior do neurônio dopaminérgico - em ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), que é liberado para o exterior do neurônio para ser então convertido em ácido homovanílico (HVA) pela enzima catecol-O-metiltransferase (COMT). A DA não capturada por neurônios dopaminérgicos é metabolizada a HVA pela ação sequencial das enzimas COMT e MAO (BAHENA-TRUJILLO, FLORES E ARIAS-MONTAÑO, 2000; SHEN, LIAO E TSENG, 2012).

Noradrenalina

A Noradrenalina (Nor) faz parte do grupo das catecolaminas (juntamente com DA e adrenalina), sendo sintetizada a partir do aminoácido essencial tirosina em uma via biosintética comum às catecolaminas. A primeira enzima no processo, a tirosina hidroxilase, é uma oxidase que converte a tirosina em L-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA). L-DOPA é a seguir descarboxilada por uma descarboxilase, dando origem a DA. A terceira enzima na sequência, DA β -hidroxilase, converte DA em Nor (KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000; BRANDÃO, 2004).

No SNC a Nor é utilizada como um transmissor por neurônios cujos corpos celulares estão localizados no Locus Coeruleus (LC), e pode estar envolvida com atenção, despertar, comportamentos exploratórios e controle emocional (LAPIZ *et al.*, 2000; BRANDÃO, 2004). Embora esses neurônios adrenérgicos sejam relativamente poucos, em número, eles se projetam difusamente para todo o córtex, cerebelo e medula espinhal. A Nor é também o principal neurotransmissor na maioria das terminações nervosas pós-ganglionares simpáticas (KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000). As células do LC são ativadas por estímulos estressantes e ameaçadores, produzindo uma reação comportamental e cardiovascular característica de medo. Acredita-se que esta estrutura promoveria uma monitorização contínua

do ambiente quanto aos eventos importantes e prepararia o organismo para enfrentar situações de emergência (BRANDÃO, 2004).

A Nor modula a atividade de células dopaminérgicas na Substância Negra (SN) e ATV (GRENHOFF et al., 1993) modula também a liberação de DA no NAc (LATEGAN; MARIEN; COLPAERT, 1990). Essas são áreas encefálicas envolvidas com motivação e recompensa aos efeitos do etanol (FADDA et al., 1980; MURPHY et al., 1988; FADDA et al., 1990; YOSHIMOTO et al., 1991; WEISS et al., 1993; NESTLER, 2001; PIERCE e KUMARESAN, 2006; LIU et al., 2008; SHEN, LIAO e TSENG, 2012). Assim, a Nor pode influenciar o consumo de etanol via modulação da liberação de DA ou em paralelo com a DA. De fato, a Nor tem sido associada a modelos animais de consumo de etanol, mas a natureza exata da sua influência não é clara (WEINSHENKER et al., 2000).

Fos

O proto-oncogene *c-fos* tem recebido muita atenção como um marcador para atividade celular. O gene *c-fos* codifica o fator de transcrição Fos, que é expresso a baixos níveis basais no encéfalo de um animal *naive*. No entanto, exposição do animal a um estímulo ambiental ou farmacológico pode levar a indução desse gene em neurônios processando esses estímulos (RYABININ E WANG, 1998). A indução da expressão do gene *c-fos* é utilizada como um marcador histológico de estimulação trans-sináptica para identificar regiões e circuitos encefálicos que exibem ativação (HERRING et al., 2004; KOZELL, HITZEMANN E BUCK, 2005). Vários laboratórios utilizam a expressão do gene *c-fos* para mapear regiões do encéfalo sensíveis/responsivas ao etanol em ratos e camundongos (RYABININ E WANG, 1998).

Em camundongos, a administração de etanol leva a uma forte indução de *c-fos* em áreas associadas ao estresse, tais como núcleo central da amígdala, núcleo leito da estria terminal, e núcleo paraventricular do hipotálamo (RYABININ E WANG, 1998; HERRING et al., 2004); em contraste com a administração de drogas de abuso (tais como cocaína, anfetamina ou morfina), que levam a uma forte indução de *c-fos* no Núcleo Accumbens (NAc) (RYABININ E WANG, 1998).

Injeção intraperitoneal (i.p.) aguda de doses grandes de etanol (1,5-3,0 g/kg) aumenta a imunorreatividade de *c-fos* em algumas regiões encefálicas (núcleo do leito da estria terminal, CeA, LC) quando comparado com injeções de salina, sendo que a maioria das células que expressam esse aumento são neurônios GABAérgicos (MORALES et al, 1998). Embora um tanto diminuída, a imunorreatividade de Fos ainda pode ser observada na CeA 16 horas após a injeção de etanol. Ainda, injeções i.p. crônicas de uma dose sedativa (3 g/kg de

etanol) resultam em dessensibilização da imunorreatividade de Fos. Tais dados sugerem que doses agudas moderadas a elevadas de etanol podem ativar os neurônios no interior da CeA, mas que esse efeito é reduzido com repetidas injeções de dose elevada de etanol (dessensibilização) (CHANG; PATEL; ROMERO, 1995; HITZEMANN E HITZEMANN, 1997; MORALES *et al*, 1998).

2. JUSTIFICATIVA

A gravidade da dependência ao etanol como problema de saúde pública, e suas inúmeras consequências na convivência social e saúde do indivíduo, impulsionam a importância de investigações sobre os mecanismos neurais que contribuem para essa patologia. Métodos de autoadministração são vastamente utilizados na pesquisa básica de drogas de abuso por terem boa validade de face e de constructo para o consumo de drogas em seres humanos. A forma de obtenção da droga ou o porquê de ser consumida varia notavelmente entre um ser humano e o seu ambiente social e um sujeito experimental não-humano numa instalação laboratorial restrita. Contudo, presume-se que a composição química e os circuitos neurais envolvidos gerando, selecionando e desencadeando esses padrões de comportamento são semelhantes em ambas as situações. Logo, esses procedimentos parecem ser modelos adequados para investigar os mecanismos neurais comuns e, portanto, ajudar a identificar estratégias úteis na intervenção sobre o consumo de drogas em humanos (SANCHIS-SEGURA E SPANAGEL, 2006).

Informações sobre o envolvimento de determinados neurotransmissores e quais regiões encefálicas são ativadas pelo etanol são bastante importantes na compreensão dos mecanismos envolvidos na dependência a essa substância psicoativa. Algumas linhagens de camundongos, como os C57BL/6J, são mais propensas ao consumo oral de etanol. Entretanto, pouco se sabe sobre a associação entre a maior propensão ao consumo de etanol e o desenvolvimento da dependência. Dessa forma, a comparação entre camundongos C57BL/6J e outra linhagem de baixo consumo de etanol, como os camundongos Suíços, pode auxiliar na compreensão entre a associação do alto consumo de etanol e comportamentos relacionados à dependência, bem como os substratos neurais da predisposição ao consumo de etanol ou desenvolvimento da dependência.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivos gerais*

Avaliar se existe associação entre a propensão ao alto consumo de etanol e o desenvolvimento de comportamentos relacionados à dependência, bem como os mecanismos relacionados a esses comportamentos.

3.2. *Objetivos específicos*

Comparar camundongos C57BL/6J e Suíços quanto ao:

1. Consumo por livre escolha de etanol em bebedouros;
2. A inflexibilidade do consumo de etanol;
3. A preferência condicionada por lugar induzida pelo etanol;
4. Atividade locomotora induzida pelo etanol
5. A ativação neuronal causada pelo etanol, em áreas encefálicas relacionadas ao reforço de substâncias psicoativas;
6. A alteração do conteúdo e atividade dos neurotransmissores DA, 5-HT e Nor induzida pelo etanol em áreas encefálicas relacionadas ao reforço de substâncias psicoativas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. *Animais*

Foram utilizados camundongos machos das linhagens Suíço e C57BL/6J - heterogênicos e isogênicos, respectivamente, com idade de 5 a 6 semanas no início dos experimentos. Os animais foram produzidos e mantidos no biotério da Área de Ciências Fisiológicas/ Instituto de Ciências Biomédicas/ Universidade Federal de Uberlândia (Bloco 2A, andar superior, Campus Umuarama). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da referida universidade, sob número de protocolo 086/13 (ANEXO A).

A ração foi fornecida sempre à vontade para o consumo dos animais em suas gaiolas. Essa ração é fornecida pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (ICBIM - UFU), chamada de “BioBase BioTec Alimento Equilibrado” para ratos e camundongos (Base Química Produtos Químicos LTDA, Águas Frias-SC, Brasil). Água potável filtrada foi disponibilizada em bebedouros aos animais.

Os animais foram mantidos isolados ou em grupos de no máximo quatro indivíduos (dependendo do experimento realizado) em gaiolas pequenas (30 x 19 x 13) forradas com maravalha. As gaiolas com os animais foram mantidas em gabinetes (Insight Ltda., Ribeirão Preto-SP) com ciclo de iluminação de 12/12h e fluxo de ar constante. Esses gabinetes estavam alocados em salas refrigeradas (23 ± 2 °C). Os testes comportamentais e a retirada das amostras foram realizados sempre entre 9 e 17 horas.

4.2. *Consumo por livre escolha de etanol*

Durante esse procedimento os animais foram colocados em gaiolas individuais onde foram expostos, durante 24 horas, a dois bebedouros simultaneamente, um contendo apenas água filtrada e outro contendo solução de etanol (etanol absoluto, Synth, Diadema-SP). O teste foi realizado em 4 fases, sendo a concentração de etanol alterada de forma crescente entre as fases na sequência 4, 8, 12 e 16% (v/v). Cada fase teve 4 dias seguidos de exposição ao etanol (um bebedouro com solução de etanol e outro com água), seguidos por 3 dias sem etanol (somente um bebedouro com água).

A massa dos bebedouros foi mensurada antes e após a exposição aos animais por uma balança de precisão para quantificação da quantidade consumida diariamente. A massa corporal dos animais também foi mensurada diariamente para cálculo do consumo relativo das soluções pela massa corporal dos animais. A quantidade de líquido perdida nos

bebedouros por vazamento ou evaporação foi aferida por bebedouros colocados em gaiolas vazias no mesmo momento que as soluções teste foram expostas aos animais. A quantidade perdida nessas gaiolas vazias foi subtraída de sua respectiva solução exposta aos animais.

4.3. *Inflexibilidade do consumo de etanol*

Este procedimento consiste na adulteração da solução de etanol com cloridrato de quinino dihidratada (Sigma-Aldrich) para avaliação da redução do consumo de etanol devido ao sabor amargo do quinino. Esse teste teve duração de três dias, sendo que a concentração de quinino adicionada aos bebedouros contendo solução de etanol 16% foi aumentada gradualmente durante os 3 dias na seguinte ordem: 1, 5 e 10 mg/L. A mensuração da quantidade de solução consumida ocorreu da mesma forma que no item anterior.

4.4. *Preferência condicionada por lugar (PCL)*

As caixas de PCL (Insight Ltda., Ribeirão Preto-SP) consistem de aparatos retangulares de acrílico divididas em dois compartimentos grandes nas extremidades (20 x 20 cm) - com a cor das paredes e a textura do assoalho distintas - e um compartimento pequeno central neutro (7,5 x 20 cm), separados entre si por portas em guilhotina. O procedimento é baseado no descrito por Sperling *et al.* (2010) e padronizado anteriormente em nosso laboratório (MOREIRA-SILVA *et al.*, 2014).

No 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 um período de 20 minutos. Nos dias 2 a 9 foram administradas injeções i.p. de etanol ou salina diariamente (intercaladas) e os animais foram confinados nos compartimentos das extremidades com as portas fechadas. Foi administrada solução de etanol nas doses de 1,0 ou 2,0 g/kg e os animais foram confinados por 20 minutos no compartimento menos preferido, avaliado no dia 1. A injeção de salina precedeu o confinamento do animal no ambiente mais preferido. No dia 10 foi realizado o teste da PCL, sendo os animais colocados no compartimento central da caixa, com as portas entre os compartimentos abertas, e o animal percorreu livremente os compartimentos. Um grupo controle foi composto por animais que receberam injeções de salina em ambos os compartimentos da caixa de PCL. Os animais foram filmados durante suas exposições às caixas de PCL nos dias 1 e 10 e o tempo gasto em cada compartimento foi quantificado pelo programa de análise comportamental ANY-maze® (Stoelting Co, Wood Dale, IL-USA). A preferência dos animais pelo ambiente

pareado ao etanol foi quantificada pela comparação entre o tempo gasto entre os dias 1 e 10 no ambiente em que os animais receberam injeções de etanol.

4.5. *Quantificação da atividade locomotora*

A atividade locomotora foi avaliada por meio do teste do campo aberto (CA). O CA utilizado consiste de um aparato cilíndrico de 26 cm de diâmetro na base circundada por uma parede opaca de 50 cm. Em cada dia de teste os animais permaneceram no aparato por 20 minutos sob iluminação indireta e a distância percorrida por eles foi medida pelo programa de análise comportamental ANY-maze (Stoelting Co, Wood Dale, IL-USA) através da captação de imagem por meio de câmera fixada acima do CA e ligada a microcomputador.

4.6. *Avaliação imunohistoquímica da ativação neuronal pela expressão da proteína Fos*

Após 90 minutos das injeções i.p. de etanol ou salina os animais foram anestesiados com tiopental (100 mg/kg) e perfundidos transcardiacamente por meio de bomba peristáltica (Insight Ltda.) com uma solução inicial de salina 0,9% (30 mL) seguida por uma solução fixadora de paraformaldeído a 4% diluído em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,4) (150 mL). Os encéfalos permaneceram na caixa craniana por 2 horas antes de serem removidos e transferidos para uma solução contendo sacarose 20% em tampão fosfato de sódio 0,1M onde permaneceram por aproximadamente 48 horas.

Cortes coronais seriados, com 40 µm de espessura foram obtidos utilizando-se um micrótomo de congelção. Os cortes foram colhidos sequencialmente em quatro compartimentos, de forma que a distância entre os cortes adjacentes em um mesmo compartimento seja sempre de 160 µm. Um dos compartimentos foi utilizado para detecção imunohistoquímica da proteína Fos, um segundo foi corado pelo método de Nissl, com tionina 0,25% como corante para servir como referência para citoarquitetura e os outros foram armazenados para futuras análises. Seguindo-se coordenadas estereotáticas do Atlas de Paxinos e Franklin (2001), foram dissecadas as seguintes áreas encefálicas: Córtex Pré-frontal (CPF - 1.98 a 1.42), Núcleo Accumbens (NAc; 1,94 a 0.98), Amígdala (Ami; -0,70 à -2,06), Área Tegmental Ventral (ATV; -2,92 à -3,80), Substância Negra (SN; -2,92 à -3,80), Matéria Cinzenta Periaquedutal (MCP; -3,52 à -4,36) e Hipotálamo Lateral (LH; -0,58 à -2.06).

4.6.1. Detecção imunohistoquímica da proteína Fos

Na reação imunohistoquímica para detecção da proteína Fos, os cortes foram incubados inicialmente em uma solução de tampão fosfato de potássio 0,02M contendo Triton X-100 a 0,3%, soro normal de cabra a 2% (Vector Laboratories) e anticorpo primário anti-Fos obtido em coelho (Calbiochem) numa diluição de 1:20.000, sob agitação constante, a 4°C, durante 72 horas. Para localização do complexo antígeno-anticorpo os cortes foram incubados por 90 minutos no anticorpo secundário biotinilado feito em cabra (Biotinylated anti-Rabbit IgG, Vector Laboratories) na diluição 1:200. O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado usando-se a técnica de imunoperoxidase com o complexo biotina-avidina (ABC Elite Kit, Vector Laboratories) para ligar a peroxidase ao complexo antígeno-anticorpo, após lavagens sucessivas, os cortes foram incubados em uma solução contendo 50 mg de tetrahidroclorato de 3-3'diaminobenzidina (DAB), 0,6mg de glicose oxidase, 40mg de cloreto de amônio e 2mL de solução aquosa de sulfato de níquel a 10% em 100mL de tampão fosfato de sódio 0,1M, por 5 minutos.

Em seguida, foi adicionada a β -D-glicose (Sigma), e a reação enzimática interrompida após 15 minutos. Por fim, os cortes foram montados em lâminas recobertas com gelatina, desidratados e recobertos com DPX (Aldrich Chemical Co.). Cortes adjacentes foram corados pelo método de Nissl, com tionina 0,25% como corante. O material usado para a contagem das células imunorreativas à proteína Fos foi analisado em microscopia de campo claro (microscópio óptico Nikon 80i), utilizando como referência citoarquitetônica os cortes corados pelo método de Nissl.

4.6.2. Quantificação das células imunorreativas a proteína Fos

Inicialmente, foi feita a seleção de imagens correspondentes às regiões de interesse utilizando-se a objetiva 10X de aumento, de um microscópio Nikon 80i (Nikon Corporation, Chiyoda-Ku, Tokyo-To, Japan) equipado com uma câmera digital Nikon DXM1200F (Nikon Corporation). Para a quantificação das células Fos positivas, fizemos o delineamento das bordas da região de interesse, definidas com o auxílio da série corada pelo método de Nissl. As células Fos positivas foram contadas dentro das bordas da região de interesse, sendo consideradas apenas aquelas com núcleos ovais corados em preto. A contagem do número total de células e a determinação da área foram feitas com o auxílio do programa computacional Image-Pro Plus (Image-Pro Plus, versão 4.5.1, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

4.7. *Quantificação do conteúdo de Noradrenalina (Nor), Dopamina (DA), serotonina (5-HT) e seus metabólitos*

Após injeções i.p. de etanol ou salina os encéfalos, extraídos após sacrifício por decapitação, foram dissecados em criostato sob temperatura entre -19 a -21°C. Seguindo-se coordenadas estereotáticas do Atlas de Paxinos e Franklin (2001), foram dissecadas as seguintes áreas encefálicas: Córtex Pré-frontal medial (CPF; 2,34), Núcleo Accumbens (NAc; 1,54), Caudado Putamen (CPu; 1,10), Amígdala (Ami; -1,22), Área Tegmental Ventral (ATV; -2,92) e Substância Negra (SN; -2,92). Os tecidos foram retirados do encéfalo por meio de agulha de ponta chata de 14 e 17 Gauge. A técnica para determinação das substâncias baseia-se naquela descrita por Cannazza *et al.* (2005) e Patel *et al.* (2005) [padronizada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Neuropsicofarmacologia - UNESP Araraquara]. Em resumo, as estruturas cerebrais foram dissecadas e congeladas (-80°C). As amostras foram homogeneizadas em ácido perclórico 0,1M e centrifugadas a 13.000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi aplicado no sistema de cromatografia para quantificação dos neurotransmissores e metabólitos por detecção eletroquímica em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O cromatógrafo utilizado foi Waters® com detecção eletroquímica modelo 2465. A coluna foi de fase reversa Symmetry® C18, 5µm (250 mm x 4,6 mm); a fase móvel, em fluxo de 1 mL/minuto, consistiu de um tampão [ácido cítrico (50 mM), heptano-sulfônico (1,2 mM), KCl (2 mM), EDTA (0,1 mM)], com adição de metanol (7,6%) e acetonitrila (1,8%), pH 3,2. A curva de calibração foi construída com soluções padrões de 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, e 200 ng/mL das substâncias quantificadas. Por fim, as concentrações das substâncias foram corrigidas pela massa das amostras de tecido dissecadas, sendo expressas em nanogramas (ng) da substância por mg de tecido. Pelo protocolo utilizado em nosso estudo os metabólitos da Nor não puderam ser detectados, e por isso não serão apresentados resultados dos metabólitos desse neurotransmissor.

4.8. *Procedimento experimental*

Experimento 1: Comparação do consumo e inflexibilidade do consumo de etanol entre camundongos Suíço e C57BL/6J

Camundongos machos de ambas as linhagens, com 5 a 6 semanas de idade foram individualizados em caixas-moradia pequenas (30 x 19 x 13 cm) e mantidos isolados para habituação por no mínimo 7 dias. Em seguida, teve início o procedimento para análise do consumo de etanol por livre escolha em dois bebedouros (item 4.2) com duração de quatro

semanas. No dia seguinte ao término desse procedimento, teve início a avaliação da inflexibilidade do consumo de etanol (item 4.3). Nessa etapa, a solução de etanol 16% foi adulterada com concentrações crescentes da substância amarga cloridrato de quinino para quantificação da resistência dos animais em reduzirem seu consumo de etanol. Essa etapa teve duração de três dias. O número de animais empregado foi 9 para o grupo Suíço e 12 para o grupo C57BL/6J.

Experimento 2: Comparação da preferência condicionada por lugar (PCL) ao etanol entre camundongos Suíço e C57BL/6J

Camundongos machos de ambas as linhagens, com 5 a 6 semanas de idade, iniciaram o procedimento de PCL (item 4.4) com duração de 10 dias. Os animais foram divididos, de acordo com as linhagens e injeções durante o condicionamento, nos seguintes grupos experimentais: Suíço salina (n = 12); Suíço etanol 1 g/kg (n = 12); Suíço etanol 2 g/kg (n = 10); C57BL/6J salina (n = 12); C57BL/6J etanol 1 g/kg (n = 11) e C57BL/6J etanol 2 g/kg (n = 13). A solução de etanol injetada foi preparada como etanol 20% (v/v) em salina e injetada no volume de 0,125 mL/10g do animal para atingir a dose de 2 g/kg e 0,062 mL/10g do animal para atingir a dose de 1 g/kg. Soluções de etanol com concentração superior a 20% produzem lesão no peritônio e por isso essa foi a maior concentração empregada.

Experimento 3: Comparação da atividade locomotora induzida pelo etanol entre camundongos Suíço e C57BL/6J

Camundongos machos de ambas as linhagens, com 5 a 6 semanas de idade, foram usados nesse experimento. O teste teve duração de três dias consecutivos. No primeiro dia os animais foram colocados no aparato de CA por 20 minutos, para quantificação da atividade locomotora normal induzida pelo ambiente novo e para se habituarem ao ambiente. No segundo dia os animais receberam injeção i.p. de salina e novamente foram colocados no CA por 20 minutos e a locomoção avaliada. No terceiro dia de teste os animais receberam injeção i.p. de etanol (2,0 g/kg), foram colocados no CA por 20 minutos e a locomoção avaliada (item 4.5). O número de animais empregado foi 9 para o grupo Suíço e 9 para o grupo C57BL/6J. A solução de etanol injetada foi preparada como etanol 20% (v/v) em salina e injetada no volume de 0,125 mL/10g do animal para atingir a dose de 2 g/kg.

Experimento 4: Comparação da ativação neuronal induzida pelo etanol entre camundongos Suíço e C57BL/6J

Camundongos machos de ambas as linhagens, com 5 a 6 semanas de idade, receberam injeção i.p. de solução salina ou etanol (2 g/kg) e 90 minutos após isso foram anestesiados com tiopental (100 mg/kg) e perfundidos transcardiacamente com uma solução inicial de salina 0,9% (30 mL) seguida por uma solução de paraformaldeído 4% (150 mL). Duas horas após a perfusão os encéfalos dos animais foram retirados do crânio e mantidos resfriados em solução de PBS com sacarose 20% durante 48 horas. Em seguida as amostras foram processadas para técnica de imunohistoquímica da proteína Fos (item 4.6). Durante os cinco dias prévios ao dia do teste os animais foram habituados ao procedimento de manuseio e injeção i.p., sendo transportados ao local do teste e recebendo injeção de salina pelo mesmo experimentador e seguindo-se a mesma sequência do dia do teste. Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais: Suíço salina (n = 4); Suíço etanol (n = 4); C57BL/6J salina (n = 3) e C57BL/6J etanol (n = 4).

Experimento 5: Comparação do efeito do etanol no conteúdo dos neurotransmissores DA e 5-HT e seus metabólitos e Nor entre camundongos Suíço e C57BL/6J

Camundongos machos de ambas as linhagens, com 5 a 6 semanas de idade, receberam injeção i.p. de solução salina ou etanol (2 g/kg) e 10 minutos após isso foram eutanasiados por decapitação em guilhotina. Seus encéfalos foram extraídos do crânio em menos de 2 minutos e congelados em nitrogênio líquido. Em seguida os encéfalos foram identificados e congelados em freezer até sua dissecação para retirada de amostras e quantificação dos neurotransmissores DA e 5-HT e seus metabólitos e Nor nos núcleos encefálicos de interesse (item 4.7). Durante os cinco dias prévios ao dia do teste os animais foram habituados ao procedimento de manuseio e injeção i.p., sendo transportados ao local do teste e recebendo injeção de salina pelo mesmo experimentador e seguindo-se a mesma sequência do dia do teste. Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais: Suíço salina (n = 7); Suíço etanol (n = 7); C57BL/6J salina (n = 8) e C57BL/6J etanol (n = 8).

4.9. *Análise Estatística*

Os resultados do consumo e inflexibilidade do consumo de etanol foram analisados por ANOVA (*Analysis of variance*) bifatorial considerando os fatores linhagem (Suíço vs C57BL/6J) e tempo (dias de tratamento). Os resultados da quantificação da atividade locomotora durante a habituação ao CA foram analisados por ANOVA bifatorial considerando os fatores linhagem (Suíço vs C57BL/6J) e tempo (5, 10, 15 e 20 minutos). Os resultados da quantificação da atividade locomotora em resposta ao etanol foram analisados

por ANOVA bifatorial considerando os fatores linhagem (Suíço *vs* C57BL/6J) e tratamento (salina *vs* etanol). Os resultados da PCL foram analisados por ANOVA trifatorial considerando os fatores linhagem (Suíço *vs* C57BL/6J), tratamento (salina-salina, etanol 1,0-salina e etanol 2,0-salina) e condicionamento (pré-condicionamento *vs* pós-condicionamento). Os dados da quantificação dos neurotransmissores e da expressão de Fos foram analisados por ANOVA bifatorial considerando os fatores linhagem (Suíço *vs* C57BL/6J) e tratamento (salina *vs* etanol). Alterações significativas foram consideradas com $p < 0,05$ e quando ANOVA indicou efeito significativo a análise foi seguida pelo teste de comparações planejadas (teste F) entre os grupos de interesse.

5. RESULTADOS

Experimento 1: Comparação do consumo e inflexibilidade do consumo de etanol entre camundongos Suíço e C57BL/6J.

A figura 1 mostra o consumo médio de soluções de etanol (g/kg) pelos animais. ANOVA mostrou efeito significativo dos fatores linhagem ($F_{1,19} = 93,15$; $p < 0,001$) e tempo ($F_{15,285} = 16,05$; $p < 0,001$) e interação entre os dois fatores ($F_{15,285} = 7,43$; $p < 0,001$). A comparação planejada entre as linhagens em cada dia de tratamento revelou que os animais C57BL/6J consumiram mais etanol do que os Suíços no terceiro e quarto dia de exposição ao etanol 4% e também em todos os dias de exposição a soluções de etanol 8, 12 e 16% ($p < 0,05$).

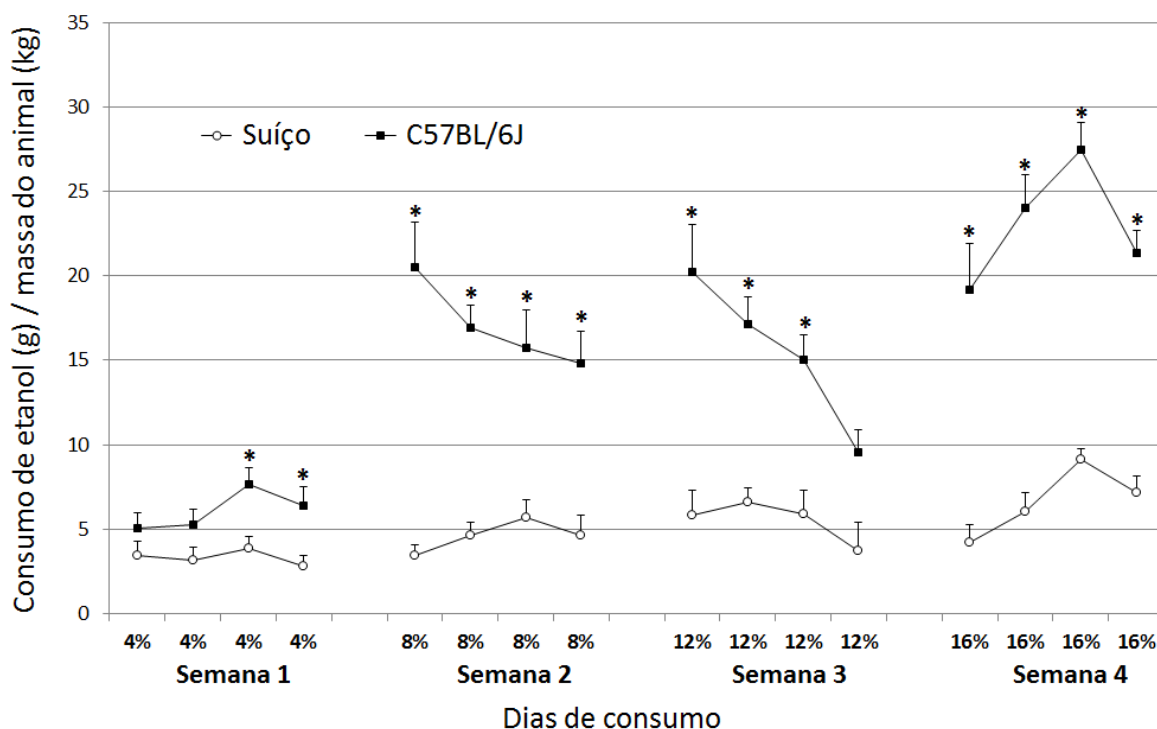


Figura 1: Consumo de etanol em solução pelos camundongos das linhagens Suíço e C57BL/6J. Os dados representam a média \pm E.P.M. de consumo durante as 4 semanas de quantificação (4 dias / semana). * = $p < 0,05$ em relação ao grupo Suíço.

A figura 2 mostra a porcentagem de preferência pela solução de etanol [razão: consumo de etanol (g) / consumo total de líquido (g)]. ANOVA mostrou efeito significativo dos fatores linhagem ($F_{1,19} = 110,64$; $p < 0,001$) e tempo ($F_{15,285} = 2,65$; $p < 0,001$) e interação entre os dois fatores ($F_{15,285} = 2,56$; $p < 0,001$). A comparação planejada entre as linhagens em cada dia de tratamento revelou que a preferência pela solução de etanol da linhagem C57BL/6J foi significativamente maior que a preferência da linhagem Suíço do segundo ao

quarto dia de exposição ao etanol 4% e também em todos os dias de exposição a soluções de etanol 8, 12 e 16% ($p < 0,05$).

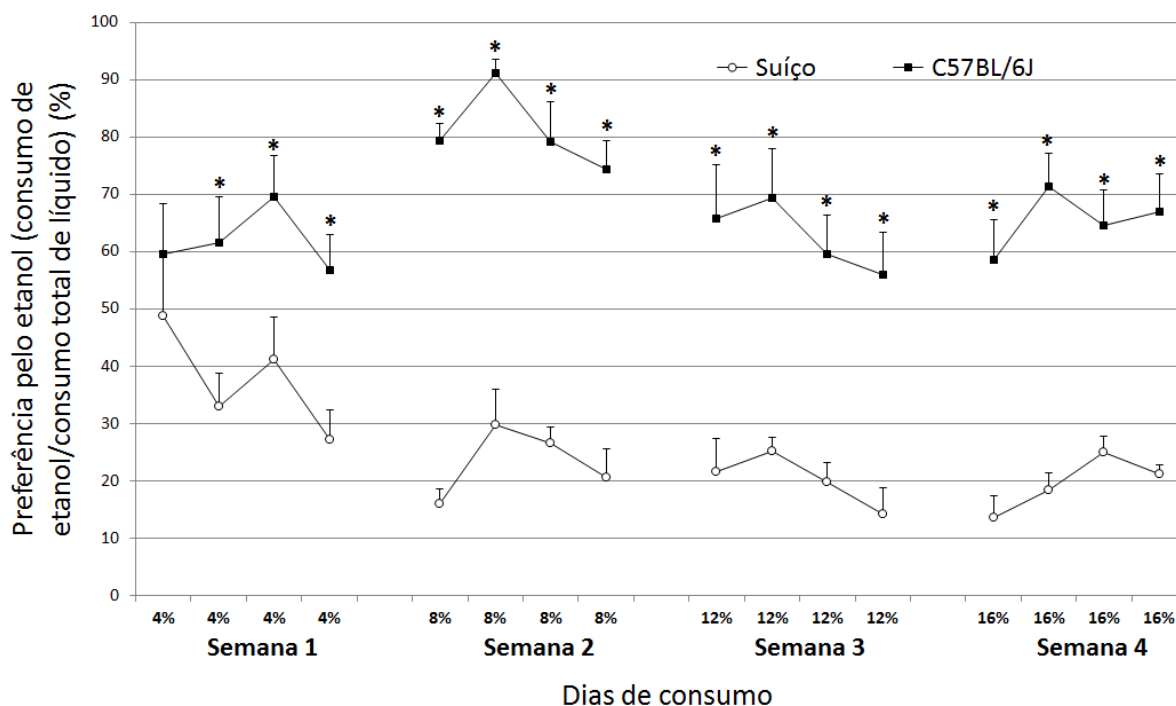


Figura 2: Preferência pelo etanol em solução pelos camundongos das linhagens Suíço e C57BL/6J. Os dados representam a média \pm E.P.M. de consumo durante as 4 semanas de quantificação (4 dias / semana). * = $p < 0,05$ em relação ao grupo Suíço.

A figura 3 mostra o consumo de etanol (g/kg) pelos animais após alteração da solução de etanol 16% com quinino, conferindo sabor amargo à mesma. ANOVA mostrou efeito significativo dos fatores linhagem ($F_{1,19} = 190,36$; $p < 0,001$) e tempo ($F_{3,57} = 8,60$; $p < 0,001$), mas sem interação significativa entre os dois fatores ($F_{3,57} = 2,10$; $p = 0,11$). Comparação planejada entre as linhagens em cada dia de tratamento revelou que o consumo da linhagem C57BL/6J foi significativamente reduzido ($p < 0,05$) quando comparado ao consumo da semana anterior (quando foi apresentada apenas solução de etanol 16%, sem quinino), para as concentrações de quinino de 5 e 10 mg/L. Já o consumo da linhagem Suíço não teve redução significativa em nenhuma das concentrações de quinino apresentadas.

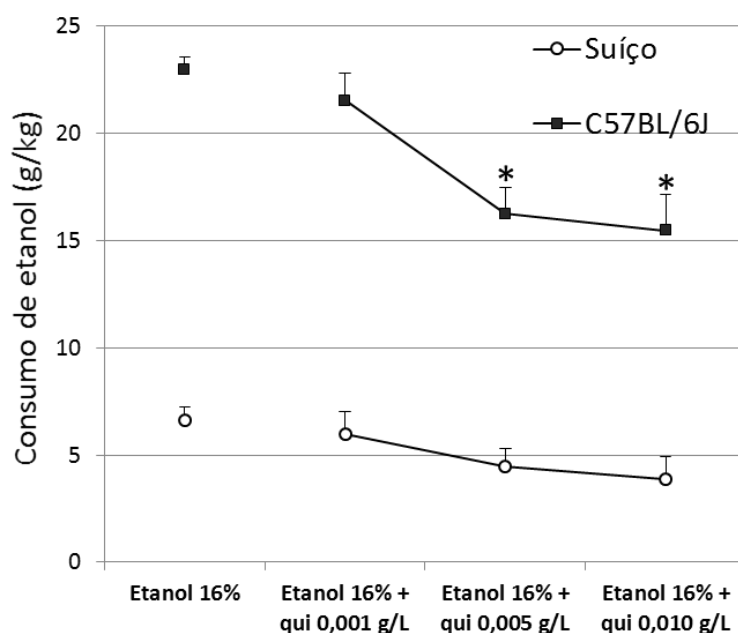


Figura 3: Consumo de etanol em solução com adição da substância quinino pelos camundongos das linhagens Suíço e C57BL/6J. Os dados representam a média \pm E.P.M. de consumo durante os 3 dias de quantificação. * = $p < 0,05$ em relação à semana anterior (somente etanol 16%) do mesmo grupo.

A figura 4 mostra a porcentagem de preferência pela solução de etanol [razão: consumo de etanol (g) / consumo total de líquido (g)] após alteração da solução com quinino. ANOVA mostrou efeito significativo dos fatores linhagem ($F_{1,19} = 75,97$; $p < 0,001$) e tempo ($F_{3,57} = 2,70$; $p < 0,05$), mas não houve interação significativa entre os dois fatores ($F_{3,57} = 0,40$; $p = 0,75$). Comparação planejada entre as linhagens em cada dia de tratamento revelou que a preferência da linhagem C57BL/6J foi significativamente reduzida ($p < 0,05$) quando comparada à preferência da semana anterior (quando foi apresentada apenas solução de etanol, sem quinino), para as concentrações de quinino de 5 e 10 mg/L. Já a preferência da linhagem Suíço não teve redução significativa em nenhuma das concentrações de quinino apresentadas.

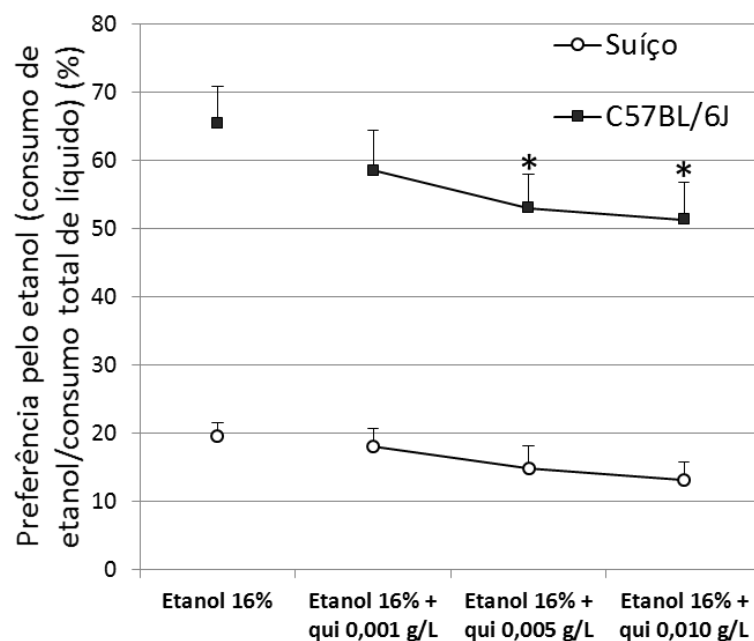


Figura 4: Preferência pelo etanol em solução com adição da substância quinino pelos camundongos das linhagens Suíço e C57BL/6J. Os dados representam a média \pm E.P.M. de consumo durante os 3 dias de quantificação. * = $p < 0,05$ em relação à semana anterior (somente etanol 16%) do mesmo grupo.

Experimento 2: Comparação da preferência condicionada por lugar (PCL) ao etanol entre camundongos Suíço e C57BL/6J

Na PCL foram testadas duas doses de etanol: 1,0 e 2,0 g/kg. Os resultados estão mostrados na figura 5. ANOVA mostrou efeito significativo dos fatores linhagem ($F_{1,64} = 4,32$; $p < 0,05$) e condicionamento ($F_{1,64} = 22,88$; $p < 0,001$). Comparação planejada entre pré e pós-condicionamento revelou que os animais Suíços passaram mais tempo no ambiente pareado ao etanol no pós-condicionamento, com as duas doses de etanol testadas ($p < 0,05$). A linhagem C57BL/6J não apresentou alteração significativa no tempo gasto no compartimento pareado ao etanol antes e após o condicionamento em nenhuma das doses de etanol. Os grupos de animais tratados com salina em ambos os compartimentos não apresentaram alteração significativa do tempo entre pré e pós-condicionamento.

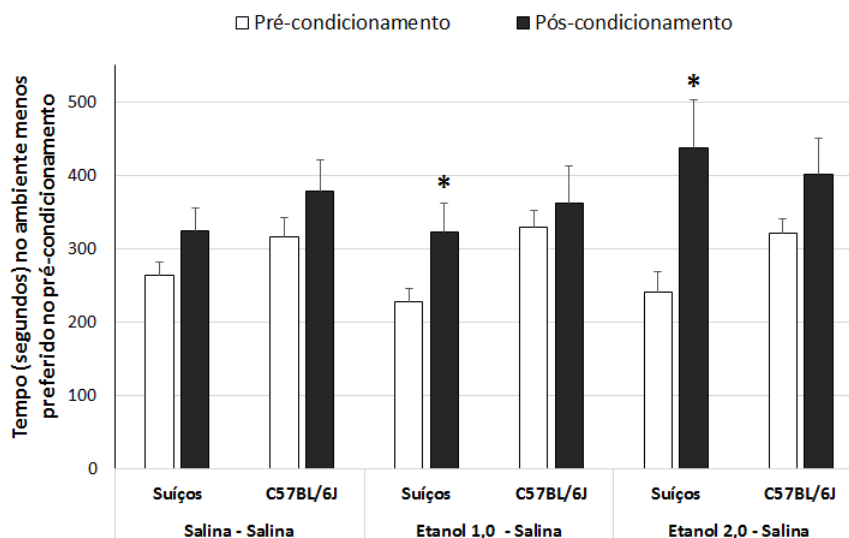


Figura 5: Preferência condicionada por lugar (PCL) entre camundongos das linhagens Suíço e C57BL/6J. Os dados representam a média \pm E.P.M. do tempo gasto no ambiente pareado ao etanol durante os 3 dias de quantificação. * = $p < 0,05$ em relação ao pré-condicionamento do mesmo grupo.

Experimento 3: Comparação da atividade locomotora induzida pelo ambiente novo e pelo etanol entre camundongos Suíço e C57BL/6J

No teste do CA foi avaliada a atividade locomotora dos animais, como mostra a figura 6. Para o dia 1 (habituação) ANOVA mostrou efeito significativo dos fatores tempo ($F_{3,48} = 65,12$; $p < 0,001$), efeito próximo de valores significativos para o fator linhagem ($F_{1,16} = 3,72$; $p = 0,07$) e efeito significativo da interação linhagem/tempo ($F_{3,48} = 15,81$; $p < 0,001$). Comparação planejada entre as linhagens revelou que os animais C57BL/6J percorrem uma distância significativamente menor que os animais Suíços somente nos 5 primeiros minutos do teste ($p < 0,05$), não houve diferenças no restante do tempo de teste. Para os dias 2 e 3 de teste (salina e etanol 2,0 g/kg; respectivamente) ANOVA mostrou efeito significativo dos fatores linhagem ($F_{1,16} = 20,73$; $p < 0,001$) e tratamento ($F_{1,16} = 9,48$; $p < 0,01$). Comparação planejada revelou que ambas as linhagens se locomoveram mais após as injeções de etanol do que após as injeções de salina ($p < 0,05$). Os animais C57BL/6J tiveram locomoção menor que os animais Suíços quando ambos foram testados com salina ($p < 0,05$). Houve um efeito próximo ao significativo ($p = 0,06$) de que os animais Suíços tratados com etanol tiveram uma maior locomoção que os C57BL/6J nas mesmas condições.

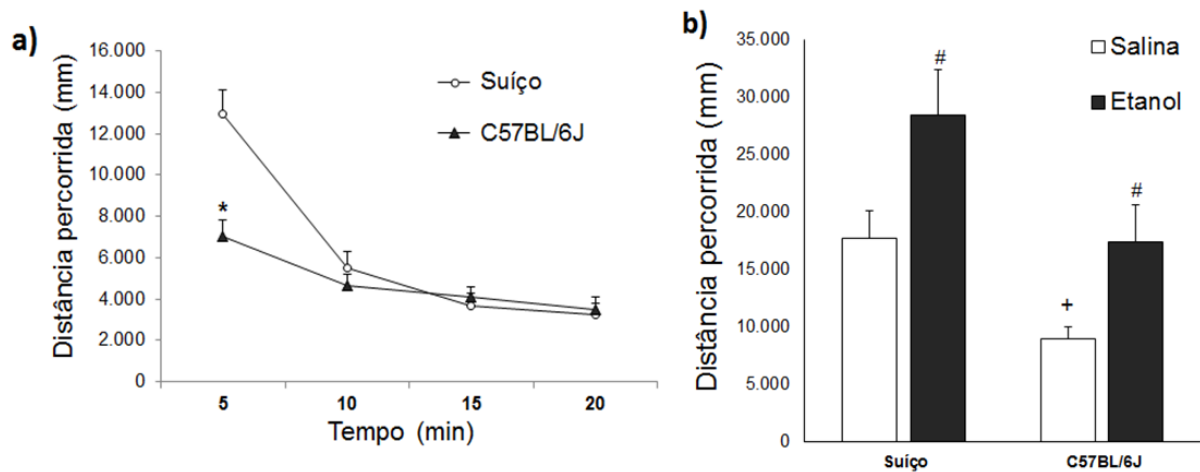


Figura 6: Comparação da atividade locomotora das linhagens Suíço e C57BL/6J, avaliada por meio do Campo Aberto. a) Locomoção no dia 1 (período de habituação). b) Locomoção nos dias 2 e 3 (salina e etanol 2,0 g/kg; respectivamente). * = comparado ao grupo suíço no mesmo intervalo de tempo. # = comparado aos animais Salina da mesma linhagem. + = comparado aos animais Suíço no mesmo tratamento.

Experimento 4: Comparação da ativação neuronal induzida pelo etanol entre camundongos Suíço e C57BL/6J

Para a região da ATV não houve efeito significativo de qualquer fator ou interação.

Para a região da SN, subdivisões Compacta e Retraída ANOVA mostrou efeito significativo para o fator tratamento ($F_{1,11} = 9,07$; $p < 0,01$ e $F_{1,11} = 6,67$; $p < 0,05$), respectivamente, sem efeito significativo do fator linhagem ou interação entre os fatores. Para essas duas sub-regiões a expressão de Fos foi menor nos animais que receberam injeção de etanol, sem distinção entre as linhagens. Os gráficos são mostrados na figura 7.

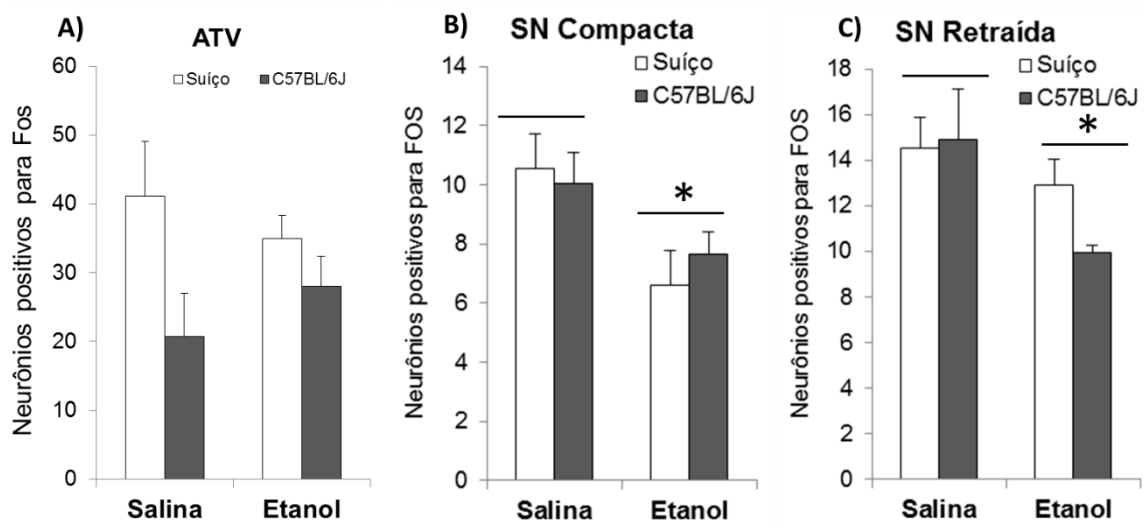


Figura 7: Comparação da ativação neuronal induzida pelo etanol entre camundongos Suíço e C57BL/6J, avaliada por meio da expressão da proteína Fos. A) Área Tegmental Ventral (ATV): não houve efeito significativo. B) Substância Negra (SN) Compacta e C) SN Retraída: * = expressão de Fos nos animais tratados com etanol (ambas as linhagens) foi menor do que nos animais tratados com salina.

Para o CPF ANOVA mostrou interação significativa entre os fatores linhagem e tratamento no CPF Cingulado ($F_{1,10} = 10,28$; $p < 0,01$), CPF Pré-Límbico ($F_{1,11} = 5,40$; $p < 0,05$) e CPF Infra Límbico ($F_{1,11} = 5,39$; $p < 0,05$). Testes de Comparação Planejada mostraram que: (1) no CPF Cingulado a administração de etanol significativamente aumenta a expressão de Fos nos animais Suíços ($p < 0,01$) comparados com os controles (salina). Além disso, a expressão de Fos induzida pelo etanol foi maior nos animais Suíços em relação aos C57BL/6J administrados com a mesma dose dessa substância ($p < 0,05$). Houve também uma tendência a diferença entre animais Suíços e C57BL/6J ($p = 0,06$) em condições basais; (2) no CPF Pré-Límbico a expressão de Fos do grupo Suíço Etanol é significativamente maior do que o grupo C57BL/6J Etanol ($p < 0,05$); e (3) no CPF Infra Límbico a expressão de Fos do grupo Suíço Etanol também é significativamente maior do que a expressão do grupo C57BL/6J Etanol ($p < 0,01$). Há efeito próximo ao significativo ($p = 0,052$) mostrando diferença na expressão de Fos entre os animais Suíços tratados com etanol comparados aos Suíços tratados com salina. Os gráficos são mostrados na figura 8.

Para a região de Centro do NAc ANOVA mostrou efeito significativo dos fatores linhagem ($F_{1,10} = 20,72$; $p < 0,01$) e da interação linhagem-tratamento ($F_{1,10} = 18,33$; $p < 0,01$). Para a região de Concha do NAc não houve efeito significativo de qualquer fator ou interação. Comparações Planejadas no Centro do NAc mostraram que a administração de etanol significativamente aumenta a expressão de Fos nos animais Suíços ($p < 0,01$)

comparados com seus os controles (salina). Além disso, a expressão de Fos induzida pelo etanol foi maior nos animais Suíços em relação aos C57BL/6J administrados com a mesma dose dessa substância ($p < 0,05$). Há uma tendência ($p = 0,056$) para redução na expressão de Fos nos animais C57BL/6J que receberam etanol, comparando com os da mesma linhagem que receberam salina. Os gráficos são mostrados na figura 8; imagens do NAc são mostradas na figura 9 e do CPF na figura 10.

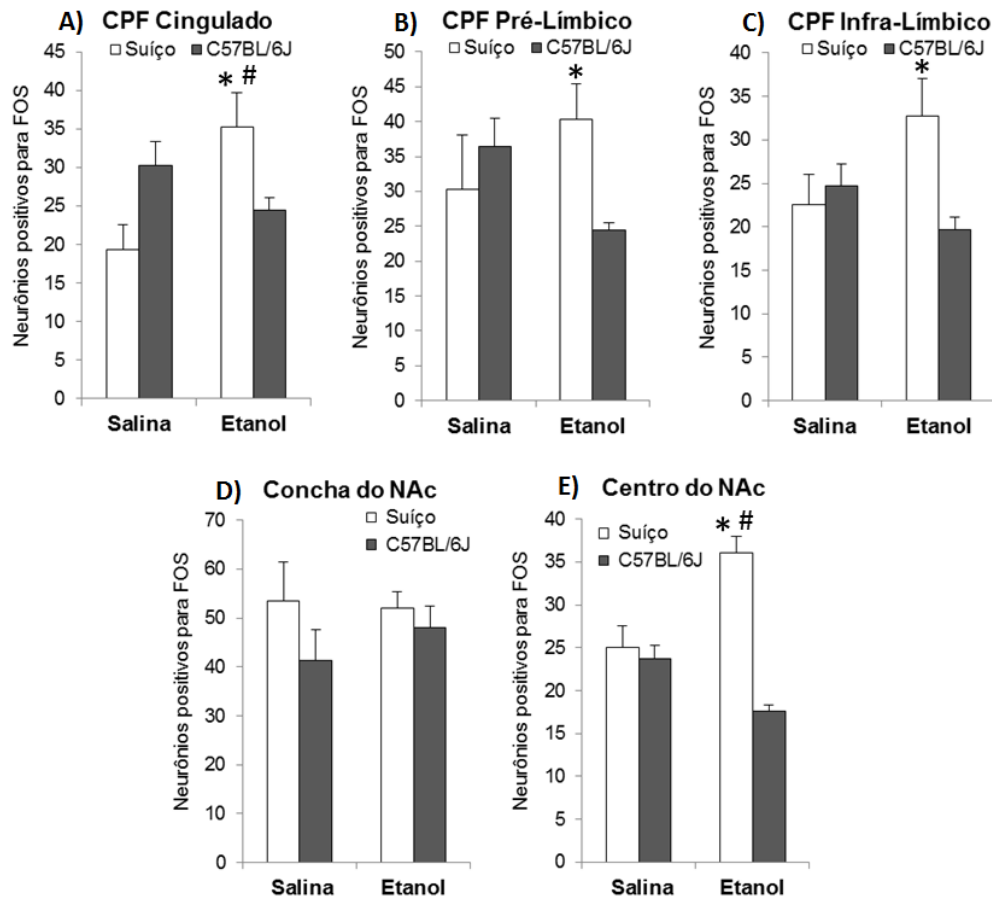


Figura 8: Comparação da ativação neuronal induzida pelo etanol entre camundongos Suíço e C57BL/6J, avaliada por meio da expressão da proteína Fos. A) Córtex Pré-Frontal (CPF) Cingulado: * = a expressão de Fos do grupo Suíço etanol é maior que a expressão do grupo Suíço salina. # = a expressão de Fos do grupo Suíço etanol é maior que a expressão do grupo C57BL/6J etanol. B) CPF Pré-límbico: * = a expressão de Fos do grupo Suíço etanol é maior que a expressão do grupo C57BL/6J etanol. C) CPF Infra límbico: * = a expressão de Fos do grupo Suíço etanol é maior que a expressão do grupo C57BL/6J etanol. D) Concha do Núcleo Acumbens (NAc): não houve efeito significativo. E) Centro do Núcleo Acumbens: * = a expressão de Fos do grupo Suíço etanol é maior que a expressão do grupo Suíço salina. # = a expressão de Fos do grupo Suíço etanol é maior que a expressão do grupo C57BL/6J etanol.

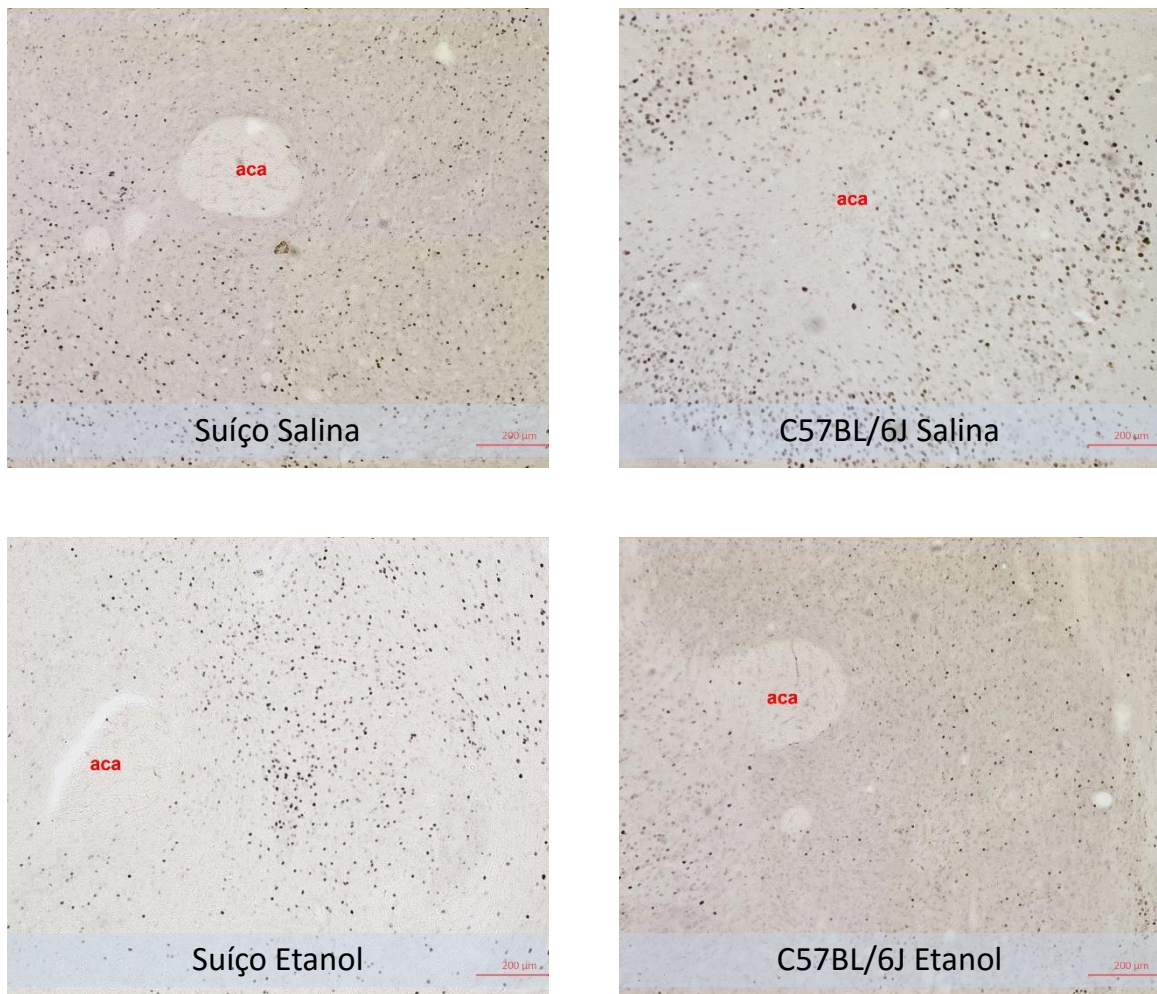


Figura 9: Região do Núcleo Acumbens (NAc) após marcação para Fos. aca = comissura anterior. Imagem obtida em aumento 10X.

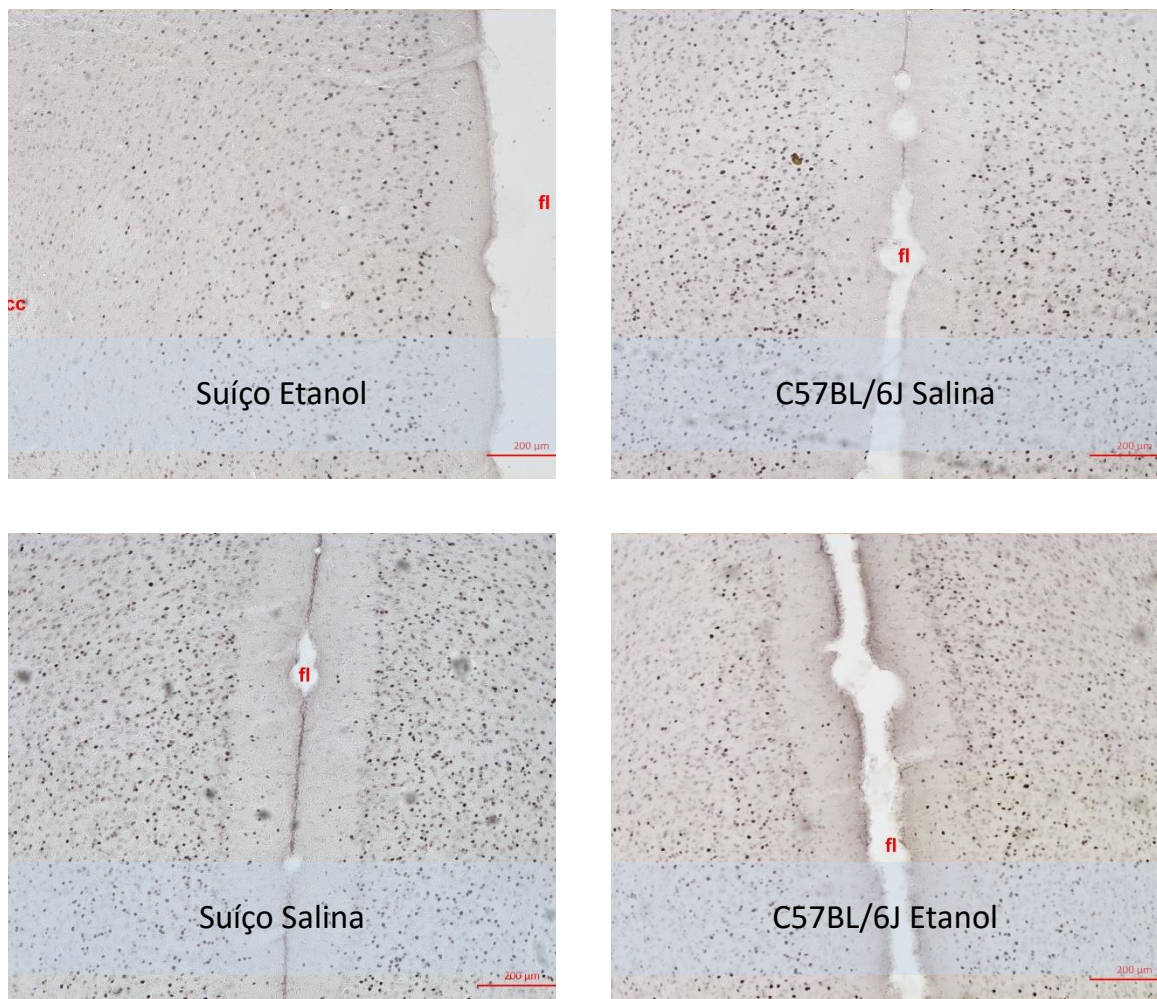


Figura 10: Região do Córtex Pré-Frontal (CPF) após marcação para Fos. fl = fissura longitudinal. cc = corpo caloso. Imagem obtida em aumento 10X.

Para as regiões da Amígdala Basolateral, Centrocentral, Basomedial Anterior e Pósterovernal, ANOVA não mostrou efeito significativo de qualquer fator ou interação. Para a região da Amígdala Basocentral ANOVA mostrou interação significativa entre linhagem e tratamento ($F_{1,11} = 13,55$; $p < 0,01$). A comparação planejada nessa área da amígdala revelou que os camundongos C57BL/6J apresentam maior expressão de Fos em condições basais (animais tratados com salina) do que os Suíços ($p < 0,01$). Ademais, em resposta ao etanol, os animais Suíços aumentam a expressão de Fos enquanto os C57BL/6J mostram redução ($p < 0,05$). Na região da Amígdala Medial Pósterodorsal houve efeito significativo dos fatores linhagem ($F_{1,11} = 16,68$; $p < 0,01$) e tratamento ($F_{1,11} = 17,14$; $p < 0,01$). Para essa área, animais C57BL/6J tratados com etanol mostram maior expressão de Fos do que os animais tratados com salina ($p < 0,05$); também os animais Suíços tratados com etanol mostram maior expressão de Fos do que os animais tratados com salina ($p < 0,01$). A expressão de Fos induzida pelo etanol foi maior nos animais C57BL/6J em relação aos Suíços administrados com a mesma dose dessa substância ($p < 0,01$). Os animais C57BL/6J também apresentam maior expressão de Fos em condições basais (tratamento com salina) do que os animais Suíços nas mesmas condições. Os gráficos são mostrados na figura 11.

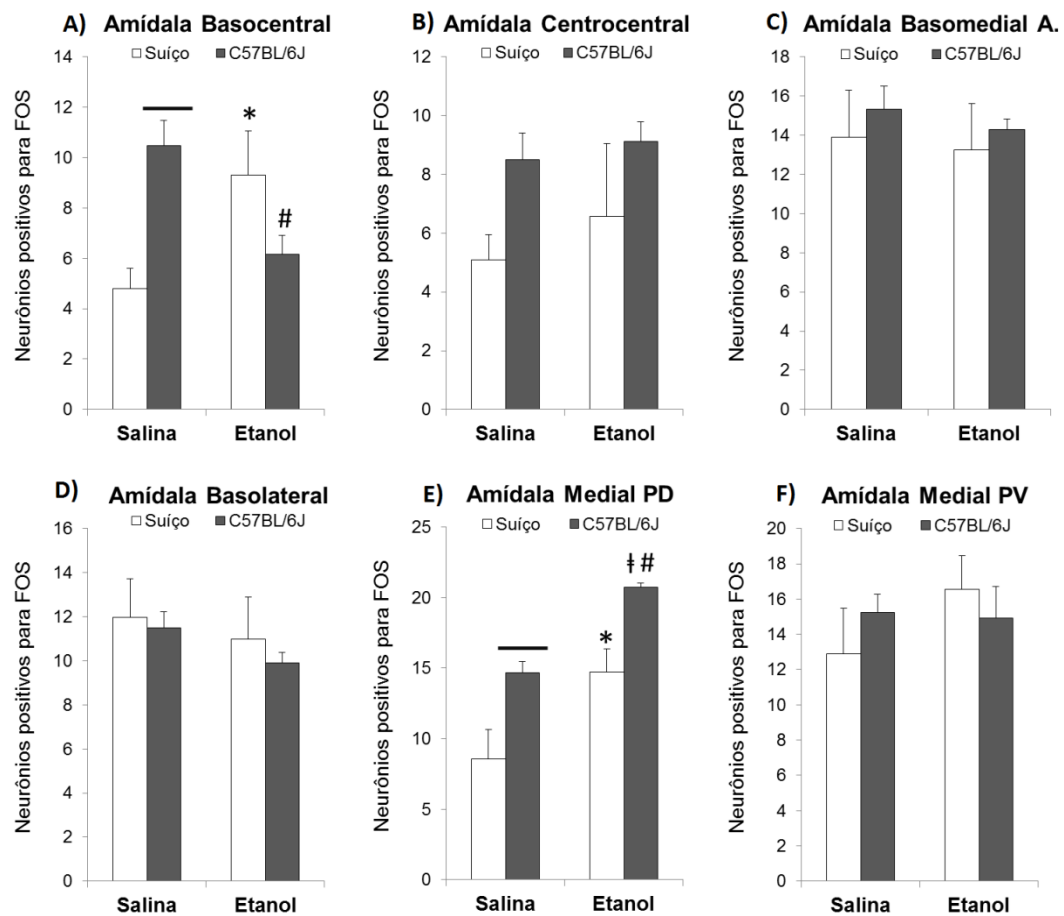


Figura 11: Comparação da ativação neuronal induzida pelo etanol entre camundongos Suíço e C57BL/6J, avaliada por meio da expressão da proteína Fos.

A) Amígdala Basocentral: * = a expressão de Fos do grupo Suíço etanol maior que a expressão do grupo Suíço salina. # = a expressão de Fos do grupo C57BL/6J etanol é menor que a expressão do grupo C57BL/6J salina. — = a expressão de Fos do grupo C57BL/6J salina é maior que a expressão do grupo Suíço salina. B) Amígdala Centrocentral: não houve efeito significativo. C) Amígdala Basomedial Anterior (A): não houve efeito significativo. D) Amígdala Basolateral: não houve efeito significativo. E) Amígdala Medial Pósterodorsal (PD): * = a expressão de Fos do grupo Suíço etanol é maior que a expressão do grupo Suíço salina. # = a expressão de Fos do grupo C57BL/6J etanol é maior que a expressão do grupo C57BL/6J salina. — = a expressão de Fos do grupo C57BL/6J salina é maior que a expressão do grupo Suíço salina. † = a expressão de Fos do grupo C57BL/6J etanol é maior que a expressão do grupo Suíço etanol. F) Amígdala Medial Pósteroventral (PV): não houve efeito significativo.

Para as regiões da Matéria MCP Dorsomedial e Ventrolateral ANOVA não mostrou qualquer alteração significativa. Para a região MCP Dorsolateral houve efeito significativo do fator linhagem ($F_{1,11} = 11,25$; $p < 0,01$) com maior expressão de Fos dos animais Suíços em ambos os tratamentos. Para a MCP Lateral houve interação significativa linhagem-tratamento ($F_{1,11} = 5,44$; $p < 0,05$). Comparações Planejadas para a MCP Lateral mostraram que a expressão de Fos do grupo C57BL/6J foi reduzida pelo etanol ($p < 0,05$) quando comparado com os animais tratados com salina. Os gráficos são mostrados na figura 12.

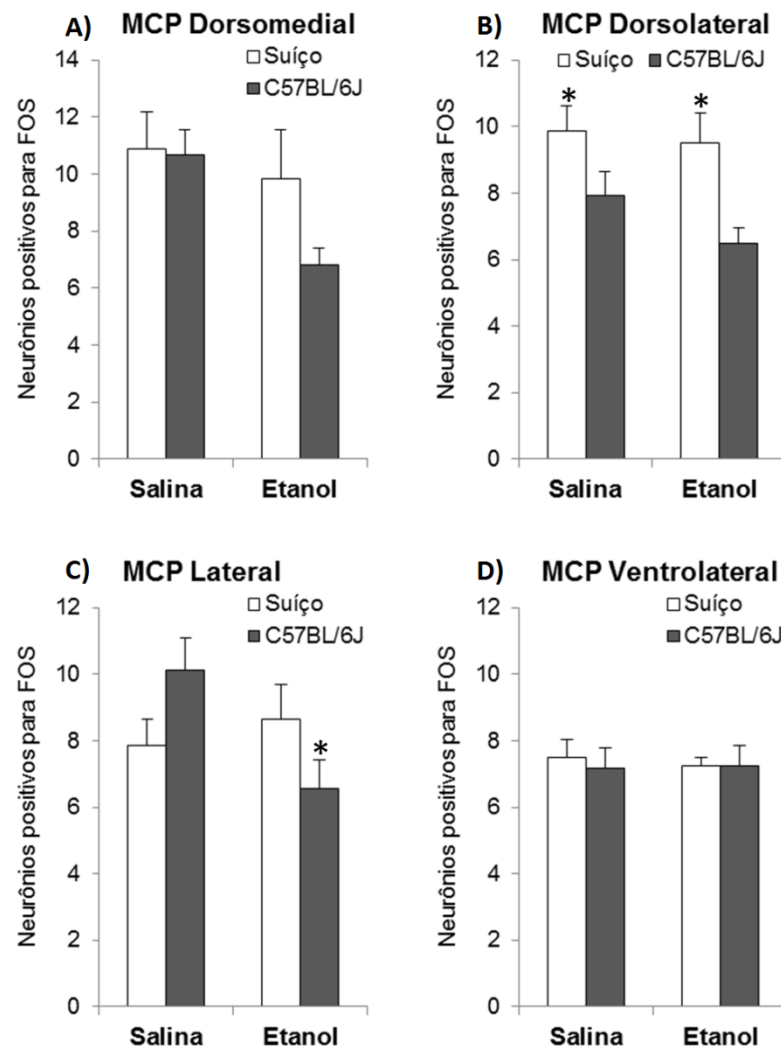


Figura 12: Comparação da ativação neuronal induzida pelo etanol entre camundongos Suíço e C57BL/6J, avaliada por meio da expressão da proteína Fos. A) Matéria Cinzenta Periaquedutal (MCP) Dorsomedial: não houve efeito significativo. B) MCP Dorsolateral: * = a expressão de Fos dos grupos Suíços (salina e etanol) é maior que a dos grupos C57BL/6J (salina e etanol). C) MCP Lateral: * = a expressão de Fos do grupo C57BL/6J etanol é menor que a do grupo C57BL/6J salina. D) MCP Ventrolateral: não houve efeito significativo.

Para a região do Hipotálamo Lateral (LH) Perifornical ANOVA mostrou efeito significativo do fator tratamento ($F_{1,11} = 5,72$; $p < 0,04$) com expressão de Fos menor nos animais do grupo etanol, sem distinção entre as linhagens. Para a região Lateral do LH não houve efeito significativo ou interação. Os gráficos são mostrados na figura 13.

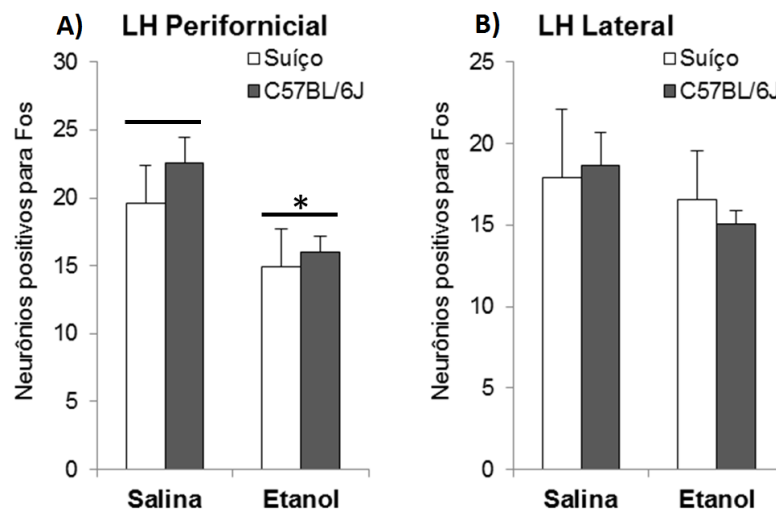


Figura 13: Comparação da ativação neuronal induzida pelo etanol entre camundongos Suíço e C57BL/6J, avaliada por meio da expressão da proteína Fos. A) Hipotálamo lateral (LH) Perifornical: * = a expressão de Fos do grupo tratado com etanol (ambas as linhagens) foi menor que a expressão do grupo tratado com salina (ambas as linhagens). B) LH Lateral: não houve efeito significativo.

Experimento 5: Comparação do efeito do etanol no conteúdo dos neurotransmissores Nor, DA, 5-HT e seus metabólitos entre camundongos Suíço e C57BL/6J.

No teste de neuroquímica foi avaliado o efeito do etanol na concentração de DA e seus metabólitos (DOPAC e HVA) em algumas regiões encefálicas específicas, como mostra a Tabela 1. ANOVA não indicou efeito significativo do fator tratamento, ou interação dos fatores linhagem-tratamento, em nenhuma das regiões analisadas. Entretanto, houve efeito significativo do fator linhagem nas seguintes regiões: (1) na ATV ($F_{1,26} = 6,11$; $p < 0,05$) sendo que os camundongos Suíços apresentam maior concentração de DA que os C57BL/6J em condições basais, (2) e na SN ($F_{1,25} = 7,72$; $p < 0,01$) os camundongos Suíços também apresentam maior concentração de DA que os C57BL/6J em condições basais, além do somatório DA + DOPAC + HVA ($F_{1,25} = 6,09$; $p < 0,05$) também ser maior nos Suíços em condições basais.

ATV					
	DA	DOPAC	HVA	DA + DOPAC + HVA	Turnover dopaminérgico
Suíço - Salina	3,19 ± 0,90	3,31 ± 0,48	4,30 ± 0,69	10,80 ± 0,97	4,32 ± 1,76
Suíço - Etanol	2,64 ± 0,74	3,33 ± 0,35	4,10 ± 0,90	10,07 ± 1,84	5,75 ± 2,85
C57BL/6J - Salina	1,63 ± 0,43	3,23 ± 0,56	4,66 ± 0,87	9,52 ± 1,38	6,44 ± 2,30
C57BL/6J - Etanol	1,29 ± 0,30	2,16 ± 0,17	3,49 ± 0,37	6,83 ± 0,68	5,98 ± 1,17
SN					
	DA	DOPAC	HVA	DA + DOPAC + HVA	Turnover dopaminérgico
Suíço - Salina	4,41 ± 1,22	5,60 ± 0,71	5,56 ± 0,55	15,57 ± 1,08	14,67 ± 8,40
Suíço - Etanol	4,08 ± 0,94	5,00 ± 0,60	5,09 ± 0,57	14,17 ± 1,70	8,01 ± 7,86
C57BL/6J - Salina	2,17 ± 0,71	4,63 ± 0,88	5,86 ± 0,89	12,65 ± 2,02	19,43 ± 1,32
C57BL/6J - Etanol	1,47 ± 0,45	3,46 ± 0,53	3,71 ± 0,97	8,64 ± 1,63	9,33 ± 2,87
CPF					
	DA	DOPAC	HVA	DA + DOPAC + HVA	Turnover dopaminérgico
Suíço - Salina	7,67 ± 1,82	5,74 ± 0,55	5,63 ± 0,93	19,04 ± 2,71	1,73 ± 0,28
Suíço - Etanol	5,83 ± 1,62	6,53 ± 1,04	7,62 ± 1,96	19,98 ± 3,30	4,28 ± 1,57
C57BL/6J - Salina	9,07 ± 3,02	6,90 ± 1,37	6,93 ± 0,87	22,90 ± 2,94	3,82 ± 1,56
C57BL/6J - Etanol	10,69 ± 3,64	6,66 ± 0,80	8,48 ± 1,07	25,83 ± 4,04	3,23 ± 0,97
NAc					
	DA	DOPAC	HVA	DA + DOPAC + HVA	Turnover dopaminérgico
Suíço - Salina	47,14 ± 12,40	39,69 ± 5,66	25,27 ± 2,70	112,10 ± 15,87	2,31 ± 0,72
Suíço - Etanol	55,21 ± 11,05	44,99 ± 4,80	29,11 ± 2,64	129,31 ± 12,12	2,11 ± 0,81
C57BL/6J - Salina	47,58 ± 12,59	42,48 ± 5,10	27,59 ± 3,18	117,64 ± 13,72	2,64 ± 0,79
C57BL/6J - Etanol	54,30 ± 16,11	36,70 ± 5,98	26,58 ± 3,24	117,58 ± 17,55	1,97 ± 0,66
CPu					
	DA	DOPAC	HVA	DA + DOPAC + HVA	Turnover dopaminérgico
Suíço - Salina	61,43 ± 10,91	26,00 ± 3,16	29,09 ± 2,88	116,51 ± 15,28	1,03 ± 0,15
Suíço - Etanol	63,23 ± 11,02	32,64 ± 2,94	37,40 ± 3,65	133,27 ± 14,37	1,63 ± 0,63
C57BL/6J - Salina	63,66 ± 10,74	34,09 ± 4,06	35,63 ± 2,70	133,38 ± 14,84	1,38 ± 0,33
C57BL/6J - Etanol	67,85 ± 9,66	28,21 ± 5,52	35,88 ± 4,54	131,94 ± 17,35	0,99 ± 0,12
Amidala					
	DA	DOPAC	HVA	DA + DOPAC + HVA	Turnover dopaminérgico
Suíço - Salina	58,01 ± 17,13	33,84 ± 4,36	40,49 ± 3,94	132,34 ± 15,27	2,38 ± 0,75
Suíço - Etanol	56,99 ± 16,18	35,64 ± 3,89	41,19 ± 3,87	133,81 ± 17,59	3,20 ± 1,80
C57BL/6J - Salina	53,95 ± 13,53	37,24 ± 5,95	45,40 ± 6,76	136,59 ± 19,62	2,55 ± 0,69
C57BL/6J - Etanol	17,64 ± 4,40	32,94 ± 4,0	37,59 ± 3,30	88,16 ± 7,97	7,23 ± 2,24

Tabela 1: Efeito da injeção de etanol na concentração de DA, DOPAC e HVA (ng/mg de tecido) e turnover dopaminérgico em camundongos Suíços e C57BL/6J. Os dados são expressos como Média ± E.P.M. (N = 7-8 por grupo). *Turnover* dopaminérgico = DOPAC + HVA / DA. ATV (Área Tegmental Ventral), SN (Substancia Negra), CPF (Córtex Pré-frontal), NAc (Núcleo Accumbens), CPu (Caudado Putamen). * = p < 0,05.

Também foi avaliado o efeito do etanol na concentração de 5-HT, seu metabólito (5-HIAA) e Nor em algumas regiões encefálicas específicas, como mostra a Tabela 2. ANOVA não indicou efeito significativo do fator tratamento, ou interação dos fatores linhagem-tratamento, em nenhuma das regiões analisadas [com exceção da amígdala – ver adiante]. Entretanto, houve efeito significativo do fator linhagem na SN para a concentração de 5-HT ($F_{1,25} = 4,84$; $p < 0,037$), para a concentração de 5-HIAA ($F_{1,25} = 4,72$; $p < 0,039$), para o somatório 5-HT + 5-HIAA ($F_{1,25} = 6,15$; $p < 0,020$) e para a concentração de Nor ($F_{1,25} = 5,71$; $p < 0,025$), sendo que para todos esses neurotransmissores os animais Suíços apresentam uma concentração maior que os animais C57BL/6J em condições basais. Na Amígdala, ANOVA mostrou efeito significativo do fator tratamento no *turnover* serotoninérgico ($F_{1,25} = 4,41$; $p < 0,046$), sem distinção entre as linhagens.

ATV					
	5-HT	5-HIAA	5-HT + 5-HIAA	Turnover serotonérgico	Nor
Suíço - Salina	2,80 ± 0,90	38,40 ± 3,72	41,20 ± 3,20	22,80 ± 6,21	6,11 ± 0,51
Suíço - Etanol	2,03 ± 0,39	34,97 ± 3,31	37,00 ± 3,53	21,51 ± 4,33	6,00 ± 1,10
C57BL/6J - Salina	1,66 ± 0,39	41,04 ± 4,55	42,70 ± 4,63	31,92 ± 6,26	5,52 ± 0,69
C57BL/6J - Etanol	1,30 ± 0,20	33,52 ± 3,45	34,76 ± 3,42	23,54 ± 4,26	4,26 ± 0,33

SN					
	5-HT	5-HIAA	5-HT + 5-HIAA	Turnover serotonérgico	Nor
Suíço - Salina	6,58 ± 2,08	59,17 ± 4,02	65,79 ± 4,01	17,62 ± 5,19	7,38 ± 1,07
Suíço - Etanol	4,01 ± 0,89	54,99 ± 5,18	59,00 ± 5,93	17,59 ± 3,47	7,13 ± 1,00
C57BL/6J - Salina	3,61 ± 0,90	50,82 ± 7,23	54,44 ± 7,65	18,48 ± 3,26	5,68 ± 1,04
C57BL/6J - Etanol	1,67 ± 0,25	38,99 ± 4,42	40,65 ± 4,61	25,38 ± 2,95	4,21 ± 0,65

CPF					
	5-HT	5-HIAA	5-HT + 5-HIAA	Turnover serotonérgico	Nor
Suíço - Salina	#	#	#	#	5,14 ± 0,43
Suíço - Etanol	#	#	#	#	5,35 ± 1,00
C57BL/6J - Salina	#	#	#	#	5,30 ± 0,67
C57BL/6J - Etanol	#	#	#	#	7,02 ± 0,97

NAc					
	5-HT	5-HIAA	5-HT + 5-HIAA	Turnover serotonérgico	Nor
Suíço - Salina	#	#	#	#	#
Suíço - Etanol	#	#	#	#	#
C57BL/6J - Salina	#	#	#	#	#
C57BL/6J - Etanol	#	#	#	#	#

CPu					
	5-HT	5-HIAA	5-HT + 5-HIAA	Turnover serotonérgico	Nor
Suíço - Salina	#	#	#	#	15,17 ± 1,90
Suíço - Etanol	#	#	#	#	19,17 ± 3,47
C57BL/6J - Salina	#	#	#	#	18,38 ± 1,52
C57BL/6J - Etanol	#	#	#	#	24,40 ± 2,83

Amidala					
	5-HT	5-HIAA	5-HT + 5-HIAA	Turnover serotonérgico	Nor
Suíço - Salina	32,54 ± 6,59	90,36 ± 5,64	122,90 ± 10,29	3,44 ± 0,62	21,66 ± 2,98
Suíço - Etanol	28,76 ± 6,37	88,20 ± 5,58	116,96 ± 9,46	3,83 ± 0,71	21,53 ± 3,19
C57BL/6J - Salina	30,50 ± 4,96	102,76 ± 16,26	129,45 ± 18,26	3,61 ± 0,61	25,39 ± 2,28
C57BL/6J - Etanol	20,49 ± 1,72	118,12 ± 13,95	138,61 ± 15,08	5,77 ± 0,49	21,97 ± 2,00

Tabela 2: Efeitos da injeção de etanol (2 g/kg) nas concentrações de 5-HT, 5-HIAA e Nor (ng/mg de tecido) e turnover serotonérgico em camundongos Suíço e C57BL/6J. Os dados são expressos como Média ± E.P.M. (N = 7-8 por grupo). *Turnover* serotonérgico = 5-HIAA / 5-HT. ATV (Área Tegmental Ventral), SN (Substância Negra), CPF (Córtex Pré-frontal), NAc (Núcleo Accumbens), CPu (Caudado Putamen). * = p < 0,05. # = dados não disponíveis.

6. DISCUSSÃO

O etanol é a droga mais consumida no mundo e seu uso indevido é um dos principais fatores que contribui para a diminuição da saúde mundial, sendo responsável por aproximadamente 2,5 milhões de mortes por ano. Nos países em desenvolvimento, entre eles o Brasil, o etanol é um dos principais fatores geradores de doença e mortalidade (MELONI E LARANJEIRA, 2004; WHO, 2011). O consumo agudo de etanol induz várias alterações fisiológicas sistêmicas, como: elevação da pressão arterial sistólica e diastólica; efeitos na condução cardíaca, podendo levar a arritmias; efeitos deletérios no fígado, sendo os principais: infiltração gordurosa do fígado, hepatite e cirrose (FLEMING, MIHIC e HARRIS, 2012). Utilizar animais não humanos como modelos experimentais constitui uma ferramenta importante no estudo do consumo, abuso e dependência ao etanol, permitindo que os investigadores utilizem métodos que não podem ser empregados em humanos devido aos riscos para saúde do indivíduo (TABAKOFF E HOFFMAN, 2000).

Utilizando um paradigma de consumo de etanol com acesso contínuo (24 horas por dia) pudemos comparar esse comportamento entre camundongos das linhagens C57BL/6J e Suíço. Camundongos C57BL/6J consumiram significativamente mais etanol que camundongos Suíços, por volta de três vezes mais. Os animais C57BL/6J consumiram em média 15,4 g/kg/dia de etanol, ao passo que os Suíços consumiram em média 5,0 g/kg/dia durante as quatro semanas de teste. O consumo dos animais C57BL/6J está de acordo com dados relatados na literatura (LÊ *et al.*, 1994; LESSOV *et al.*, 2001; YONEYAMA *et al.*, 2008; CRABBE *et al.*, 2012), sendo que essa linhagem é uma das que apresenta maior consumo de etanol (em g/kg). O consumo de etanol foi diretamente proporcional à concentração de etanol da solução apresentada, ou seja, quanto maior a concentração de etanol da solução, maior foi o consumo. Os animais C57BL/6J quase quadruplicaram seu consumo (intragrupo) da primeira para a quarta semana (passando de 6,1 g/kg para 23,0 g/kg; soluções de 4% e 16% de etanol, respectivamente). Já os animais Suíços duplicaram seu consumo (intragrupo) da primeira para a quarta semana (passando de 3,3 g/kg para 6,6 g/kg; soluções de 4% e 16% de etanol, respectivamente).

Os animais C57BL/6J além de consumirem mais etanol que os Suíços também preferem mais a solução de etanol em relação à água pura, isto é, quando são oferecidas ao mesmo tempo as duas opções os animais preferem beber a solução de etanol a beber água. Essa preferência é de 67,7% para o C57BL/6J contra 25,1% de preferência para o Suíço, considerando todas as concentrações oferecidas. Dessa forma, camundongos C57BL/6J não

consomem mais etanol por consumirem mais líquidos, mas sim por preferirem soluções etanólicas em relação à água pura. Essa maior preferência dos camundongos C57BL/6J pelo etanol é relatada na literatura (NOCJAR, MIDDAUGH, TAVERNETTI, 1999), inclusive quando comparada a outras linhagens de camundongos, como DBA/2J, BALB/c e outras (MELISKA et al., 1995; YONEYAMA et al., 2008). Portanto, nossos resultados demonstrando maior consumo e preferência pelo etanol nos animais C57BL/6J em comparação aos Suíços evidenciam nesses animais bons modelos de camundongos que tem maior e menor preferência, respectivamente, ao etanol. Assim, a comparação entre essas duas linhagens de camundongos pode mostrar fatores que acompanham, ou mesmo são responsáveis, pela preferência e alto consumo de etanol.

Um dos critérios para diagnóstico de dependência é o uso da droga apesar do conhecimento das consequências adversas (APA, 2000; RIBEIRO et al., 2008) e modelos animais podem ser úteis para esse propósito. Utilizando uma substância que confere gosto amargo à solução de etanol (quinino) pudemos avaliar a inflexibilidade dos animais ao consumo de etanol, ou seja, avaliamos se os animais deixaram de consumir a solução de etanol devido ao sabor aversivo, ou se esse sabor aversivo não foi suficiente para ‘inibir’ os efeitos (talvez prazerosos) que o etanol provocou. Encontramos que o consumo de etanol da linhagem C57BL/6J foi significativamente reduzido quando foi adicionado quinino à solução etanólica em relação ao seu consumo da semana anterior (solução de etanol 16% sem adição de quinino). O mesmo não aconteceu com os animais Suíços. Não só o consumo dos animais C57BL/6J foi significativamente reduzido, como também a sua preferência pela solução de etanol. A preferência caiu de 65,3% para 54,3% nos animais C57BL/6J, e de 19,5% para 15,3% nos animais Suíços (uma queda não significativa nos Suíços), considerando a solução de etanol 16% com todas as concentrações de quinino oferecidas. Tendo por base esses resultados podemos sugerir que a preferência e a quantidade de etanol consumida não pode ser um fator preditivo para dependência. Os animais C57BL/6J que consomem muito e preferem o etanol reduziram seu consumo e preferência quando a solução se tornou aversiva ao passo que os animais Suíços que têm baixo consumo e preferência pelo etanol foram inflexíveis em relação ao estímulo aversivo. Para os Suíços o sabor aversivo não foi suficiente para inibir os efeitos que o etanol provocou (mesmo sendo consumido em baixas quantidades – g/kg), mas para os animais C57BL/6J isso foi suficiente.

FACHIN-SCHEIT et al. (2006) submeteram animais Suíços a 16 semanas de consumo crônico e avaliaram o perfil de ingestão dos animais, classificando-os em ‘dependentes’,

‘bebedores pesados’ e ‘bebedores leves’. Eles encontraram que animais considerados “não dependentes” reduziram de maneira significativa seu consumo quando a solução de etanol foi adulterada com quinino, ao passo que os animais considerados dependentes (alta preferência pelo etanol) não tiveram redução significativa após adulteração. Os resultados mostram que camundongos Suíços dependentes consomem etanol mesmo em condições aversivas, o que pode ser interpretado como um desejo persistente pelo etanol. Legastelois e Botia (2013) também encontraram que camundongos Suíços apresentam inflexibilidade frente a adulteração da solução de etanol. Em seu estudo, animais resistentes ao etanol (e seus efeitos) reduzem significativamente o consumo de soluções de etanol adulteradas com quinino, enquanto animais sensíveis ao etanol (e seus efeitos) mantêm seus níveis de consumo. Outro grupo, trabalhando com camundongos C57BL/6J, encontrou comportamentos variando de acordo com a exposição prévia ao etanol. Os autores afirmam que soluções de quinino com concentração de 250 μ M não são capazes de reduzir o consumo de etanol (15% v/v) em animais habituados (por duas e oito semanas, protocolo de acesso limitado à solução de etanol). Entretanto, animais *naive* quando são oferecidos solução de etanol (15% v/v) adulterada com quinino (250 μ M) consomem menos (comparado aos animais habituados). Podemos pensar que os animais habituados se encontram em uma situação de dependência, visto que se mostraram inflexíveis perante a adulteração com quinino, e que os animais *naive* foram flexíveis por não terem desenvolvido nenhum padrão de consumo prévio (LESSCHER; VANKERKHOF; VANDERSCHUREN, 2010).

Seguindo os testes de consumo, realizamos o teste de PCL utilizando o etanol como agente condicionante. Apenas os animais da linhagem Suíço apresentaram condicionamento, permanecendo significativamente mais tempo no ambiente que foi pareado ao etanol (em ambas as doses, 1,0 e 2,0 g/kg) após as sessões de condicionamento. Esses resultados de PCL estão de acordo com os resultados de inflexibilidade, reforçando a ideia de que os animais Suíços são mais susceptíveis aos efeitos do etanol do que os animais C57BL/6J. Os Suíços são inflexíveis a diminuir o consumo de etanol frente a um estímulo aversivo e também são condicionados a procurarem por um ambiente específico que foi associado ao etanol, preferindo esse ambiente em relação a outro não associado à droga.

Existem registros na literatura de que o etanol é capaz de induzir condicionamento em camundongos Suíços, principalmente na dose de 2 g/kg de etanol (RISINGER & OAKES, 1996; RISINGER & BOYCE, 2002; MAURICE et al., 2003; PILDERVASSER; ABRAHAO; SOUZA-FORMIGONI, 2014). Risinger e Oakes (1996) utilizaram 8 sessões iniciais de

condicionamento (5 minutos cada), realizaram o teste de preferência (teste 1), e então realizaram mais 4 sessões de condicionamento (5 minutos cada) seguida de outro teste de preferência (teste 2). Os animais receberam por via i.p. etanol (20% v/v) nas doses de 1.0, 2.0, 3.0 ou 4.0 g/kg. Os camundongos que receberam as doses de 3.0 ou 4.0 g/kg apresentaram PCL já no teste 1, enquanto os animais recebendo as doses de 1.0 ou 2.0 g/kg mostraram condicionamento após o teste 2. Para os autores, o etanol é capaz de produzir PCL de maneira confiável, mas com variações dose-dependentes que podem ser mascaradas aumentando-se o número de sessões de condicionamento. Risinger e Boyce (2002) obtiveram resultados similares, mostrando que 2 g/kg de etanol aumentam a atividade locomotora de camundongos Suíços. Já para os animais C57BL/6J, os estudos que correlacionam etanol e PCL relatam tanto a presença quanto a ausência de condicionamento. Cunningham et al. (1992) utilizando injeções i.p. de etanol (20% v/v) nas doses de 1.0, 2.0 ou 4.0 g/kg, com sessões de condicionamento de 30 minutos (8 sessões ao todo), não encontraram evidência de PCL. Os autores citam que as doses de 1.0 e 2.0 g/kg não foram capazes de produzir condicionamento e que a dose de 4.0 g/kg teve ação depressora nos animais. Já os autores Kelley, Bandy e Middaugh (1997) tiveram sucesso em condicionar camundongos C57 utilizando injeção intravenosa (i.v.) de etanol. O protocolo contou com duas sessões de condicionamento de 25 minutos cada, durante os quais era injetada (i.v.) nos animais uma solução de etanol 30% (v/v) com dose aproximada de 0.82 g/kg (~3.4 µL/minuto). Nesse estudo, os animais recebendo etanol aumentaram seu tempo de permanência no ambiente pareado à droga por volta de 60% (comparado ao tempo gasto na fase de habituação). Nocjar, Middaugh e Tavernetti (1999) também conseguiram demonstrar condicionamento em camundongos C57, utilizando injeções i.p. de etanol, porém em animais previamente expostos à droga (5 dias). O protocolo de condicionamento contou com 16 dias (10 minutos cada sessão) utilizando uma dose de 1.75 g/kg de etanol, ao final do qual animais apresentaram condicionamento. Dessa forma, podemos discutir com base nos nossos resultados e outros estudos que os animais C57BL/6J são pouco suscetíveis ao condicionamento induzido pelo etanol. Entretanto, um protocolo de condicionamento mais longo, a utilização da via i.v. ou a pré-exposição a essa droga podem colaborar para indução do condicionamento nessa linhagem de camundongos.

No experimento da PCL detectamos que os camundongos C57BL/6J são bastante hiporresponsivos ao etanol quanto a esse efeito comportamental. Para analisar se essa linhagem de camundongos não responde a qualquer outro efeito comportamental induzido pelo etanol investigamos também a estimulação da atividade locomotora induzida por essa

droga. O etanol é uma substância psicoativa considerada depressora do SNC, mas sua administração em doses baixas a moderadas pode elevar a atividade motora do animal (CAMARINI; PREGNOLATTO, 2007; FARIA et al., 2008). Nossos resultados para os testes de locomoção mostram que tanto os camundongos Suíços quanto os C57BL/6J se locomoveram mais após as injeções de etanol do que após as injeções de salina, indicando que ambas as linhagens são sensíveis/responsivas aos efeitos da droga. Os animais C57BL/6J tiveram locomoção menor que os animais Suíços em condições basais (no primeiro dia quando colocados no ambiente novo sem qualquer tratamento e no segundo dia após injeção de salina), e houve uma tendência de que os animais Suíços tratados com etanol tivessem uma maior locomoção que os C57BL/6J nas mesmas condições. Em conjunto, os dados desse experimento indicam que os animais Suíços apresentam maior atividade locomotora quando comparados aos C57BL/6J, mas ambas as linhagens apresentam estimulação psicomotora induzida pelo etanol de forma significativa. Dados da literatura mostram que os animais Suíços apresentam maior locomoção em resposta a administração aguda de etanol (2 g/kg) se comparados aos controles tratados com salina (RISINGER; OAKES, 1996; FARIA et al., 2008; SOARES-SIMI et al., 2013). Para os C57BL/6J existem dados relatando que os animais tendem a não apresentar mudanças significativas no padrão de locomoção quando administrado etanol (0,125 - 2 g/kg) (MELÓN; BOEHM, 2011; ROSE et al., 2013), como também existem dados relatando que o etanol (2 g/kg) é capaz de aumentar atividade locomotora nessa linhagem (PHILLIPS; DICKINSON; BURKHART-KASCH, 1994; LESSOV et al., 2001). Como no nosso estudo tanto camundongos Suíços quanto C57BL/6J apresentam estimulação locomotora induzida pelo etanol, as diferenças observadas na PCL indicam que provavelmente os sistemas reguladores da recompensa ao etanol são diferentes entre as linhagens, mas sistemas neurais responsáveis por outros efeitos, como ativação motora, respondem igualmente.

A família Fos de genes de ativação imediata (genes que são ativados rapidamente com a estimulação das células) codifica proteínas nucleares que são componentes do complexo AP-1 de fatores de transcrição. Acredita-se que esses genes codifiquem fatores de transcrição que alteram a expressão de outros genes conhecidos como "genes alvo", modificando o fenótipo da célula em questão (DAVIDSON et al., 1996; HERRERA; ROBERTSON, 1996). O gene *c-fos*, um desses genes de ativação imediata, codifica uma fosfoproteína chamada Fos. Após sua síntese, a proteína Fos migra para o núcleo e dimeriza com a proteína Jun (produto

do proto-oncogene *c-jun*) e o complexo Fos-Jun atua como um fator transcricional (SAGAR; SHARP; CURRAN, 1988; CHANG; PATEL; ROMERO, 1995).

Na ausência de ativação neuronal, a atividade transcricional do gene *c-fos* é baixa. Devido a esse baixo valor em níveis basais, o aumento da expressão de *c-fos* após estimulação pode ser utilizado como um marcador sensível para a atividade neuronal (CHANG; PATEL; ROMERO, 1995; THIELE; ROITMAN; BERNSTEIN, 1996; DAVIDSON et al., 1996; THIELE et al., 2000; SHARPE; TSIVKOVSKAIA; RYABININ, 2005). Após exposição a um estímulo, tais como despolarização neuronal, estimulação com fatores de crescimento, aplicação de neurotransmissores ou administração de etanol, uma indução rápida e transiente de *c-fos* ocorre (SAGAR; SHARP; CURRAN, 1988; DAVE; TABAKOFF; HOFFMAN, 1989; SHARPE; TSIVKOVSKAIA; RYABININ, 2005). Alterações na expressão de *c-fos* entre os indivíduos expostos ao estímulo e os que estão em condições basais são indicativas de diferenças na atividade neuronal (SHARPE; TSIVKOVSKAIA; RYABININ, 2005). Identificação das estruturas neurais com expressão induzida de *c-fos* pode sugerir circuitos neuronais importantes para reações fisiológicas e comportamentais a estímulos (RYABININ; WANG, 1998; BACHTELL et al., 1999; THIELE et al., 2000; KOZELL; HITZEMANN; BUCK, 2005).

Nossos resultados mostram que para a região da SN, subdivisões Compacta e Retraída, o etanol reduziu a ativação nas duas linhagens de camundongos (comparando com os animais controle). Dragunow e Faull (1989) relatam não haver elevação dos níveis de Fos na SN, independente do estímulo utilizado. Entretanto Olive et al. (2001) obtiveram resultados positivos nessa região, mostrando que camundongos (híbridos 129SvJae x C57BL/6J) submetidos a uma dieta líquida com etanol por duas semanas (concentração máxima de etanol de 4,8%; única fonte de nutrientes) apresentaram elevação nos níveis de Fos quando comparados aos animais controle. Kozell, Hitzemann e Buck (2005) também obtiveram resultados positivos, mostrando que camundongos (DBA/2J e C57BL/6J) recebendo injeção i.p. de etanol (4 g/kg) também apresentam elevação nos níveis de Fos na SN. Talvez Kozell, Hitzemann e Buck (2005) obtiveram indução de *c-fos* na SN devido à metodologia utilizada. Os autores administraram uma dose de etanol 2 vezes maior que a utilizada no nosso trabalho (4 g/kg versus 2 g/kg) e também aguardaram um tempo maior do que o nosso grupo para retirada dos encéfalos (7 horas vs 90 minutos). Da mesma forma, Olive et al. (2001) aguardaram aproximadamente 8 horas após retirada da dieta líquida para remoção dos

encéfalos. Pode ser que o tempo tenha sido um fator chave para a ativação da SN, mais do que a concentração de etanol.

A SN, uma estrutura mesencefálica, está envolvida no controle da atividade motora. A maioria dos neurônios dopaminérgicos têm seus corpos celulares na SN, enquanto seus axônios projetam para o Corpo Estriado (consiste em três subdivisões importantes: o Núcleo Caudado, o Putâmen e o Estriado Ventral [que inclui o NAc]). Uma das principais vias dopaminérgicas encefálicas, a via nigroestriatal, que é importante para o controle dos movimentos, tem origem na SN. A SN Retraída contém principalmente fibras GABAérgicas, enquanto a SN Compacta contém principalmente fibras dopaminérgicas (DEPAULIS; VERGNES; MARESCAUX, 1994; KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000; BRANDÃO, 2004). Acredita-se que a ativação de receptores de GABA na SN Retraída estimule células dopaminérgicas (DEPAULIS; VERGNES; MARESCAUX, 1994), e tem sido bem documentado que receptores GABA estão envolvidos com os efeitos do etanol (MCBRIDE et al., 1990; HITZEMANN; HITZEMANN, 1997; BACHTELL et al., 1999). A excitação e inibição de neurônios dopaminérgicos na SN Compacta induz efeitos de recompensa e aversão, respectivamente (ROSSI et al., 2013; WISE, 2009; ILANGO et al., 2014). Outros estudos apontam ainda que a SN está envolvida com respostas de condicionamento (BORTOLANZA et al., 2010; ROSSI et al., 2013).

Nossos resultados mostram que no CPF Cingulado a ativação do grupo Suíço Etanol tende a ser maior que a ativação dos grupos Suíço Salina e C57BL/6J Etanol. Isso nos mostra que para os animais Suíços (uma comparação intragrupo) o etanol é capaz de induzir expressão do gene *c-fos* acima dos níveis basais, indicando que houve ativação dessa região encefálica com a administração de etanol. Nos mostra ainda que os animais Suíços respondem mais - ou são mais sensíveis - que os animais C57BL/6J diante da droga. A tendência a diferença entre ativação dos grupos Suíço Salina e C57BL/6J Salina nos leva a inferir que essas linhagens são naturalmente diferentes na ativação basal do CPF Cingulado, sendo que os animais C57BL/6J parecem ter uma ativação basal maior. Nas regiões do CPF Pré-Límbico e Infra Límbico a ativação do grupo Suíço Etanol tende a ser maior que a ativação do grupo C57BL/6J Etanol, mais uma vez nos levando a acreditar que os animais Suíços respondem mais - ou são mais sensíveis - que os animais C57BL/6J frente ao etanol. Faria et al. (2008) obtiveram resultados semelhantes aos nossos, com o etanol sendo capaz de induzir expressão de *c-fos* no CPF de camundongos Suíços 1 hora após injeção i.p. (2 g/kg).

As funções do CPF são diversas. De acordo com Brandão (2004) podemos considerar que, de maneira geral, o CPF sintetiza todas as informações sensoriais e experiências emocionais de forma a produzir percepções conscientes que resultam em comportamentos específicos e consonantes com os estímulos que chegam ao encéfalo; é uma área que está envolvida em funções cognitivas e no planejamento de funções motoras. O CPF é uma região terminal do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, que contém neurônios glutamatérgicos piramidais que são modulados por vários sistemas de neurotransmissores, incluindo interneurônios GABAérgicos (FARIA et al., 2008). Sua ativação parece estar associada com percepção subjetiva de intoxicação, com os efeitos reforçadores da droga, ou com melhoras no humor. O CPF está envolvido nos diversos aspectos da dependência à droga, incluindo respostas reforçadoras, o desejo de consumir e sintomas de abstinência (GOLDSTEIN; VOLKOW, 2002). Pfefferbaum et al. (1997) e DeBellis et al. (2005) evidenciaram que adolescentes e jovens adultos com transtornos relacionados ao uso de etanol apresentam modificações anatômicas no CPF. Gilman et al. (1990) identificaram que pacientes com histórico de uso crônico de etanol apresentam metabolismo reduzido na região medial frontal do córtex. Esses dados nos levam a acreditar que as diferenças na ativação neuronal no CPF observadas em nosso estudo podem mediar as diferenças comportamentais entre camundongos Suíços e C57BL/6J em resposta ao etanol. Podemos sugerir que a ausência de ativação do CPF em resposta ao etanol nos camundongos C57BL/6J pode fazer com que esses animais tenham maior dificuldade em sentir os efeitos reforçadores e perceberem a intoxicação causada pela droga. Isso pode fazer com que essa linhagem de camundongos seja menos propensa ao condicionamento ao etanol e consuma essa droga em grandes quantidades, pois seu CPF é menos ativado e assim eles não percebem a intoxicação causada pelo etanol.

Os neurônios da ATV formam a maioria das projeções mesolímbicas e mesocorticais envolvidas com recompensa. Estes neurônios enviam seus axônios ao NAc (dentre outras regiões), uma estrutura que acredita-se estar envolvida com motivação (KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000). O sistema dopaminérgico mesolímbico, que tem origem na ATV e projeta-se para o NAc, tem sido fortemente implicado nos efeitos reforçadores do etanol (GONZALES; WEISS, 1998; MELENDEZ et al., 2002; GONZALES; JOB; DOYON, 2004; SULZER, 2011; YORGASON et al., 2014). Drogas psicoestimulantes, tais como anfetaminas e cocaína, elevam a concentração extracelular de DA no NAc e acredita-se que esse seja um dos principais mecanismos envolvidos nas propriedades de recompensa e de

ativação motora destas drogas (SOLINAS et al., 2002). O NAc possui duas regiões funcionalmente distintas: NAc centro e NAc concha. A concha é altamente interconectada com o hipotálamo e ATV e é importante na regulação do comportamento ingestivo e na modulação da saliência motivacional. O centro do NAc parece ser um sítio primário mediando a expressão de comportamentos aprendidos em resposta a eventos motivacionalmente relevantes. Além disso, o NAc centro responde a estímulos que predizem um evento recompensador e parece modular a expressão de comportamentos adaptativos (KALIVAS; VOLKOW, 2005). Nossos resultados mostram que para a região de Concha do NAc não houve efeito significativo da administração de etanol, entretanto para o Centro do NAc houve efeito positivo. Encontramos que o tratamento com etanol aumenta a expressão basal de Fos nos animais Suíços, indicando um aumento na ativação dessa região após administração da droga. Também encontramos que os animais Suíços são mais responsivos/sensíveis que os animais C57BL/6J frente ao etanol, com os Suíços apresentando maior ativação do Centro do NAc. Nos animais C57BL/6J o etanol tendeu até a reduzir a ativação neuronal ($p = 0,056$, em comparação aos C57BL/6J Salina). Kozell, Hitzemann e Buck (2005) encontraram que camundongos (DBA/2J e C57BL/6J) recebendo injeção i.p. de etanol (4 g/kg) apresentam aumento nos níveis de *c-fos* no Centro do NAc, resultado esse oposto ao nosso. Isso pode ser explicado pela dose de etanol utilizada, duas vezes maior do que a que nós utilizamos no presente trabalho (4 g/kg vs 2 g/kg), e também os autores aguardaram um tempo maior do que o nosso grupo para retirada dos encéfalos (7 horas vs 90 minutos).

Olive et al. (2001) obtiveram resultados positivos para Concha e Centro do NAc, com aumento na expressão de *c-fos* após exposição a dieta líquida de etanol, em relação aos animais controle. Ryabinin et al. (1997) também encontraram aumento nos níveis de *c-fos* na Concha e Centro do NAc em ratos recebendo injeção i.p. de etanol (1,5 g/kg). Da mesma forma, animais expostos a vapor de etanol (administração via inalação; durante 4 horas) também apresentaram aumento nos níveis de *c-fos* em ambas as regiões do NAc. Entretanto, Ryabinin e Wang (1998) não encontraram expressão significativa de *c-fos* no NAc de camundongos DBA/2J após injeção i.p. de etanol (4 g/kg, encéfalos retirados 2 horas da última injeção). Podemos sugerir que a ausência de ativação do NAc, assim como do CPF, em resposta ao etanol nos camundongos C57BL/6J pode fazer com que esses animais tenham maior dificuldade em sentir os efeitos reforçadores e perceberem a intoxicação causada pela droga. Isso pode fazer com que essa linhagem de camundongos seja menos propensa ao

condicionamento ao etanol e consuma essa droga em grandes quantidades na busca pelo seu efeito reforçador.

Para a região do LH não houve nenhum efeito significativo ou interação, já para a região do LH Perifornical nossos resultados mostram que houve expressão menor de Fos nos animais que receberam etanol, de ambas as linhagens, sugerindo que o etanol reduziu a ativação neuronal nessa região. Apesar de nosso resultado ter indicado diminuição da ativação neuronal, outros autores obtiveram resultados que indicam aumento. Chang, Patel e Romero (1995) encontraram que 1 a 2 horas após injeção i.p. de etanol em ratos (nas doses de 0,75; 1,5 e 3,0 g/kg) é possível observar aumento na expressão de Fos no Núcleo Paraventricular Hipotalâmico. Olive et al. (2001) também obtiveram indução de Fos em camundongos tratados com etanol nas seguintes regiões hipotalâmicas: núcleo arqueado, área anterior, núcleo dorsomedial, núcleos pré-ópticos medial e lateral, núcleo paraventricular, área posterior, núcleo ventromedial. Ryabinin et al. (1997) também obtiveram indução de *c-fos* no Núcleo Paraventricular Hipotalâmico, tanto com injeção i.p. de etanol, quanto com inalação de vapor. A inalação de vapores de etanol também induziu expressão maior de *c-fos* no Hipotálamo anterior, lateral e posterior. Herring et al. (2004) encontraram que 2 horas após injeção i.p. de etanol (2 g/kg) é possível observar aumento da atividade neuronal no Núcleo Paraventricular Hipotalâmico de ratos. Uma ressalva sobre esses dados do hipotálamo merece atenção: no hipotálamo existem inúmeros núcleos que coordenam funções diversas. A grande maioria dos trabalhos referenciados aqui não analisou especificamente o hipotálamo lateral, com exceção do trabalho de Ryabinin et al. (1997), tampouco a divisão perifornical. Os dados apresentados servem como referencial de que o hipotálamo, em suas várias regiões, tem sido estudado no envolvimento com o consumo de etanol.

Vários estudos têm indicado que o LH está envolvido com comportamentos alimentares, indicando que essa área é responsiva a estímulos envolvendo comida (BURTON; ROLLS; MORA, 1976; ROLLS; SANGHERA; ROPER-HALL, 1979; SUDAKOV, 1992). Receptores de leptina foram encontrados no LH e na região perifornical (HAKANSSON et al., 1999), bem como orexina/hipocretina (TAHERI et al., 1999), ambas substâncias envolvidas com controle do apetite. Alguns autores relatam que injeções de muscimol (um agonista de receptores GABA_A) na concha do NAc é capaz de aumentar a expressão de Fos no LH, principalmente na região perifornical, sugerindo uma interação entre essas regiões (STRATFORD; KELLEY, 1999).

Para as regiões da Amígdala Basolateral, Centrocentral, Basomedial Anterior e Pósterovernal, não houve efeito significativo de qualquer fator ou interação. Para a região da Amígdala Basocentral encontramos que camundongos C57BL/6J apresentam maior expressão de Fos em condições basais do que os Suíços, indicando os C57BL/6J tem maior ativação dessa região naturalmente. Já em resposta ao etanol, os animais Suíços aumentam a expressão de Fos enquanto os C57BL/6J mostram redução, indicando aumento e diminuição da ativação neuronal, respectivamente. Para a região da Amígdala Medial Pósterodorsal encontramos que ambas as linhagens de camundongos apresentam aumento na expressão de Fos após tratamento com etanol, indicando que a droga induz ativação neural nessa região, sendo que os animais C57BL/6J tiveram um aumento maior em relação aos Suíços. Os animais C57BL/6J também apresentam maior expressão de Fos em condições basais do que os animais Suíços nas mesmas condições. Sharpe, Tsivkovskaia e Ryabinin (2005) encontraram que em camundongos C57BL/6J o etanol (9 dias de consumo oral, acesso limitado) reduz a expressão de *c-fos* na amígdala basolateral. Entretanto, a maior parte dos estudos mostra que a droga é capaz de induzir expressão de *c-fos*, indicando ativação, em algumas áreas de amígdala. Chang, Patel e Romero (1995) e Herring et al. (2004) encontraram que o etanol induz a expressão de Fos no núcleo central da amígdala de ratos. Olive et al. (2001) encontraram que o etanol induz a expressão de Fos na amígdala basolateral, basomedial, central e medial de camundongos. Ryabinin et al. (1997) encontraram que o etanol induz a expressão de *c-fos* nos núcleos central e basolateral da amígdala de ratos. Também encontram que inalação de vapores de etanol induzem expressão de *c-fos* na amígdala central e basolateral, e no núcleo central da amígdala. Kozell, Hitzemann e Buck (2005) encontraram que o etanol induz a expressão de *c-fos* na amígdala basomedial em camundongos.

A amígdala é um componente chave do sistema límbico, e está envolvida com emoção, motivação, aprendizagem e memória. Dados têm ligado a amígdala em associações de aprendizagem entre estímulos externos e os valores intrínsecos de recompensa, de tal forma que ela pode desempenhar um papel importante na dependência (QUERTEMONT; NEUVILLE; WITTE, 1998; MCBRIDE, 2002; BALLEINE; KILLCROSS, 2006). Evidências sugerem que o núcleo basolateral da amígdala tem projeções excitatórias para as regiões do centro e concha do NAc (KIROUAC; GANGULY, 1995), e o núcleo central da amígdala recebe extensas conexões da ATV e SN e influencia estas estruturas através de projeções recíprocas (HERRING et al., 2004). Alterações na atividade sináptica basal são produzidas na amígdala estendida e estruturas associadas após o consumo crônico de etanol (MCBRIDE,

2002). Há evidências de que administração de muscimol (agonista de receptores GABA_A) na amígdala reduz o consumo aumentado de etanol (ROBERTS; COLE; KOOB, 1996). Dessa forma, podemos supor que a ausência de ativação neuronal induzida pelo etanol na amígdala central pode ser colaborar com o grande consumo de etanol nos camundongos C57BL/6J. Corroborando essa suposição, estudo de Hitzemann e Hitzemann (1997) demonstrou que camundongos C57BL/6J apresentam menor expressão de Fos na amígdala central do que camundongos DBA/2J. Considerando que camundongos DBA/2J possuem baixa preferência para o consumo oral de etanol (LÊ et al., 1994) e maior expressão de Fos na Amígdala, nossos dados reforçam a ideia de que o alto consumo oral de etanol pode estar relacionado à baixa ativação neuronal na amígdala central em resposta a essa droga, como acontece com os animais C57BL/6J.

Nossos resultados mostram que para as regiões da Matéria Cinzenta Periaquedutal (MCP) Dorsomedial e Ventrolateral não houve qualquer alteração significativa. Para a região MCP Dorsolateral encontramos maior expressão de Fos nos animais Suíços em ambos os tratamentos, indicando que nessa região os Suíços possuem naturalmente um nível de ativação maior que os C57BL/6J. Para a MCP Lateral encontramos que a expressão de Fos do grupo C57BL/6J foi reduzida pelo etanol quando comparado com os animais tratados com salina, indicando redução da ativação neuronal nessa área em resposta ao etanol.

Existem trabalhos na literatura indicando que a MCP tem envolvimento com processos de modulação da dor, com funções de analgesia similares às da morfina (DEAKIN; DOSTROVSKY, 1978; JURNA, 1980; LOVICK, 1985; CARLSSON; HELMREICH; JURNA, 1986; KNIGHT; GOADSBY, 2001). Essa função é relevante para o contexto do nosso estudo se considerarmos que existem trabalhos que citam os efeitos analgésicos do etanol, comparando-os com os efeitos da morfina (JAMES et al., 1978; WOODROW; ELTHERINGTON, 1988). Outros trabalhos citam ainda que essa região faz parte do sistema cerebral de defesa, que coordena padrões de comportamento do tipo defensivo ou agressivo em resposta a situações de perigo. Sentimentos de ansiedade, agitação e perigo iminente são evocados por estimulação da MCP (BANDLER; CARRIVE, 1988; LOVICK, 1993; BITTENCOURT et al., 2004). Há ainda trabalhos que relatam a presença de neurônios GABAérgicos nessa região, alguns associados com receptores de 5-HT (GRIFFITHS; LOVICK, 2002; GRIFFITHS; LOVICK, 2005). Tendo em vista a participação da MCP em comportamentos de defesa e que na síndrome de abstinência ao etanol são desencadeados comportamentos, como os relacionados à ansiedade, podemos sugerir que as duas linhagens

de camundongos analisadas podem diferir na sensibilidade à síndrome de abstinência ao etanol. A investigação da síndrome de abstinência não foi um objetivo do presente trabalho, mas as diferenças na ativação neural na MCP e também na amígdala podem subsidiar novos estudos sobre o tema comparando essas linhagens murinas.

A DA é o neurotransmissor que tem sido associado aos efeitos reforçadores das drogas de abuso, e a maior parte delas (incluindo o etanol) aumentam a concentração de DA extracelular nas regiões límbicas (tais como Amígdala, Hipocampo, CPF, NAc) (WEISS et al., 1993; PIERCE e KUMARESAN, 2006; SHEN, LIAO e TSENG, 2012). O etanol não só aumenta os níveis de DA, mas também dos seus metabolitos, tais como DOPAC e HVA (FADDA et al., 1980; MURPHY et al., 1988; FADDA et al., 1990), sugerindo que o álcool está ativando as vias dopaminérgicas destas regiões do SNC. Apesar de existirem vários trabalhos apontando aumento nas concentrações de DA (e metabólitos), os dados do nosso trabalho mostram que não houve mudança significativa nessas concentrações em resposta ao etanol, seja aumentando ou diminuindo. Isso pode ser devido ao modelo de tratamento adotado pelo grupo (administração via i.p., tratamento agudo, dose de etanol administrada) ou mesmo devido ao procedimento de quantificação escolhido (no nosso estudo fizemos a quantificação dos neurotransmissores no homogenato dos tecidos, procedimento que resulta na quantificação dessas moléculas tanto no meio intracelular quanto no líquido extracelular, sendo esse último onde os neurotransmissores são ativos).

O que encontramos de significativo foi a variação entre as linhagens. Os animais Suíços possuem uma concentração de DA (e metabólitos) basal maior que os animais C57BL/6J na ATV e SN. No encéfalo, o maior grupo de neurônios dopaminérgicos está no mesencéfalo, incluindo a SN e a ATV. Esses neurônios fornecem um importante *input* ascendente para o córtex cerebral e os gânglios basais, o que é importante na iniciação de respostas comportamentais. Os neurônios da ATV formam as vias mesolímbicas e mesocorticais envolvidas com recompensa. Estes neurônios enviam os seus axônios para o NAc, Estriado e Córtex Frontal, três estruturas que se acredita estarem envolvidas com motivação (SHEN; CHIODO, 1993; KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000; GONZALES; JOB; DOYON, 2004). Os neurônios da SN originam os neurônios dopaminérgicos nigrostriatais, que projetam para o Estriado Dorsal, e desempenham um papel na expressão de atos motores (HORVITZ, 2000). Existem evidências que sugerem o sistema dopaminérgico mesolímbico como um ator importante no desenvolvimento de reforço ao etanol. O etanol aumenta a atividade desse sistema, e isto conduz a um aumento das

concentrações de DA extracelular em áreas-alvo (Horvitz, 2000; GONZALES; JOB; DOYON, 2004).

FADDA et al. (1980) avaliaram o efeito do etanol (3.2 g/kg, 40% v/v, administrado por gavagem) nas concentrações de DA e DOPAC na SN, Córtex Frontal e Núcleo Caudado (CN), utilizando um método radioenzimático e cromatografia. O autor encontrou que a administração aguda de etanol não foi capaz de provocar alterações em nenhuma das áreas encefálicas estudadas, e o tratamento crônico (60 dias) aumentou os níveis de DOPAC apenas no CN. FADDA et al. (1990) utilizando ratos Wistar das linhagens sP (preferência pelo etanol) e sNP (não-preferência pelo etanol) dosaram as concentrações de DA, DOPAC e HVA após consumo de etanol. Os animais receberam 2g/kg de etanol (20% v/v) por gavagem e os encéfalos foram removidos após uma hora, as dosagens foram feitas no homogenato de tecidos por HPLC. Os autores encontraram que nos animais sP o etanol aumentou os níveis de DOPAC e HVA, e diminuiu os níveis de DA, no CN, no Tubérculo Olfatório (OT) e no CPF Medial (MPFC). Nos animais sNP as alterações foram menos significativas, comparado com os animais sP. MURPHY et al. (1988) também utilizando ratos Wistar com preferência pelo etanol encontraram resultados semelhantes. Os autores utilizaram um protocolo de injeções i.p. de etanol (2.5 g/kg) e removeram os encéfalos após uma hora, as dosagens foram feitas no homogenato de tecidos por HPLC. O conteúdo de DOPAC e HVA foi significativamente aumentado no Córtex Frontal, Estriado Anterior e NAc dos animais tratados com etanol. Esse aumento de DOPAC e HVA concomitante a diminuição dos níveis de DA indica que nesses animais o etanol induziu um maior metabolismo da DA.

Também tem sido sugerido que a ingestão e preferência pelo etanol são diretamente afetadas pelo funcionamento da neurotransmissão serotoninérgica. A administração de pCPA (p-clorofenilalanina), a qual diminui a concentração de 5-HT no encéfalo, reduz acentuadamente a preferência pelo etanol (MYERS & VEALE, 1968). Murphy et al. (1988) também encontraram em seu estudo que uma dose i.p. de etanol (2.5 g/kg) aumenta o conteúdo de 5-HIAA no Córtex Frontal, Estriado Anterior e NAc. No entanto, segundo Lemarquand, Pihl e Benkelfat (1994), após a administração aguda de etanol em indivíduos saudáveis não é possível observar que o etanol aumenta os níveis de 5-HT. Uma dose de etanol aguda em indivíduos saudáveis diminui triptofano no sangue (TRP) e no líquido cefalorraquidiano, diminui 5-HT sanguínea e aumenta a absorção plaquetária de 5-HT, eventos periféricos que sugerem diminuição dos níveis centrais de 5-HT e diminuição da neurotransmissão serotoninérgica (LEMARQUAND, PIHL & BENKELFAT, 1994). Os dados

que obtivemos mostram que não houveram alterações significativas nas concentrações de 5-HT (e metabólito) com a administração de etanol em quase todas as regiões, com exceção da Amígdala, porém as variações entre linhagens foram significativas. Os animais Suíços possuem uma concentração basal de 5-HT (e metabólito) maior que os animais C57BL/6J na SN. Na região da Amígdala o etanol foi capaz de induzir o aumento no *turnover* serotoninérgico (5-HIAA/ 5-HT) em ambas as linhagens. Esse último dado indica que o etanol induziu um maior metabolismo da 5-HT, embora não tenhamos identificado alterações significativas nas concentrações das moléculas individuais (5-HT e 5-HIAA).

Também foi significativo que os camundongos Suíços possuem concentração basal de Nor maior que os C57BL/6J. No geral, Nor exerce efeitos excitatórios nos neurônios dopaminérgicos através de ativação de receptores $\alpha 1$ adrenérgicos ou de supressão de um tipo de receptor de glutamato (receptor de glutamato metabotrópico) presente nos neurônios dopaminérgicos. Há evidências ainda de que a Nor pode interagir com receptores D2 dopaminérgicos (MORIKAWA; MORRISETT, 2010), e aumentar a sensibilidade dos receptores de GABA ao etanol (MIHIC; HARRIS, 1997). Freund e Palmer (1997) em seu estudo mostram que o etanol aumentou a atividade do receptor GABAA somente na presença da Nor. Foi demonstrado que exposição ao estresse por isolamento aumenta a resposta de ratos a injeções agudas de etanol (2 g/kg – i.p.), com aumento dos níveis de Nor no NAc (KARKHANIS et al., 2014). Weinshenker et al. (2000) também demonstraram que depleção de Nor (via bloqueio das vias de síntese) reduz a autoadministração de etanol em camundongos. Um aumento na transmissão noradrenérgica (via inativação de receptores $\alpha 2$ adrenérgicos) é capaz de aumentar a autoadministração de etanol, ao passo que uma diminuição na transmissão noradrenérgica (via ativação dos mesmos receptores) atenua a autoadministração de etanol (LÊ et al., 2005). Os dados na literatura sugerem que de alguma forma a Nor está relacionada com o consumo de etanol, interagindo diretamente com outros neurotransmissores que já tem relação bem estabelecida com consumo da droga, sugerindo que redução nas concentrações de Nor podem diminuir o consumo de etanol.

Podemos tentar analisar os dados de consumo e comportamentais supracitados a partir dessa quantificação de DA e 5-HT. Os animais Suíços possuem naturalmente grande quantidade de DA e 5-HT, o que pode explicar porque eles consomem pouco etanol. Podemos sugerir que a concentração maior de neurotransmissores em algumas regiões encefálicas pode estar modulando o consumo menor de etanol, uma vez que os animais já estão em um estado basal de ‘bem-estar’, eles não necessitam de grandes quantidades de etanol para sentir algum

efeito prazeroso. De maneira contrária, os animais C57BL/6J possuem concentrações basais de DA e 5-HT mais baixas e talvez por isso precisem consumir uma quantidade de etanol maior para atingir um estado de ‘bem-estar’. Para os animais Suíços pode ser que, assim como níveis maiores de 5-HT tendem a reduzir o consumo de etanol, níveis maiores de DA também o façam. Para os animais C57BL/6J o raciocínio contrário é válido, níveis menores de 5-HT e DA podem estar aumentando o consumo de etanol. Estudos demonstram que a inibição da recaptação de 5-HT da fenda sináptica, prolongando, portanto, sua ação, reduz o consumo voluntário de etanol. Da mesma forma, depleção da 5-HT encefálica diminui a preferência pelo etanol em ratos (MYERS; VEALE, 1968; JOHNSON, 2008). Dois fenômenos opostos reforçando a mesma ideia: a 5-HT está envolvida com os efeitos do etanol no organismo e modula o consumo da droga. Quando os níveis desse neurotransmissor são elevados o animal não sente necessidade de consumir mais a droga por já se encontrar em um estado de bem-estar, e na situação em que a 5-HT encefálica é reduzida o animal não tem vontade de consumir a droga por ter dificuldade em detectar a sensação prazerosa que ela provoca.

Maiores concentrações basais dos neurotransmissores (DA e 5-HT) podem ser uma das explicações do porquê os Suíços consomem menos etanol (e o contrário para os C57BL/6J), como já foi exposto. Em relação aos dados comportamentais (inflexibilidade, condicionamento e locomoção), podemos tentar explica-los pela ativação de mais áreas encefálicas. A tendência geral dos Suíços a terem mais áreas encefálicas ativadas pelo etanol pode explicar porque eles apresentam mais comportamentos relacionados à dependência, e a falta de ativação dos C57BL/6J pode explicar porque essas alterações comportamentais estão ausentes nessa linhagem apesar do alto consumo de etanol.

Tratamento com baixas doses de etanol tem efeitos sobre a atividade locomotora, que é induzida por ativação do sistema mesolímbico (ATV e NAc), provavelmente interagindo com sistemas dopaminérgicos e GABAérgicos (MILTON; RANDALL; ERICKSON, 1995). No nosso trabalho os camundongos Suíços tiveram no geral maior atividade locomotora, apresentando também alguma ativação do sistema mesolímbico, com expressão de Fos induzida no centro do NAc. Embora o etanol não tenha induzido aumento de DA em nenhuma das regiões mesolímbicas, os animais Suíços apresentam naturalmente (condições basais) elevada concentração desse neurotransmissor na ATV, o que pode de alguma forma contribuir para esses resultados. Apesar de os camundongos C57BL/6J terem também aumento de locomoção em resposta ao etanol, nessa linhagem não houve ativação do sistema

mesolímbico, com tendência inclusive a redução da ativação da concha do NAc com administração de etanol e sem efeitos do etanol nas concentrações de DA.

Camundongos da linhagem C57BL consomem uma grande quantidade de álcool em condições de livre escolha com disponibilidade ilimitada de água e alimentos nutricionalmente adequados. O animal preenche, portanto, alguns critérios de alcoolismo. Assim, pode-se supor que os estudos com esses animais esclareceriam a etiologia da doença humana, mas isso pode ser um erro. O problema é que nem toda a motivação para beber álcool é patológica; o etanol é um alimento (possui valor calórico), bem como uma droga, e sabe-se que os seres humanos procuram apenas essa última propriedade. Dole, Ho e Gentry (1985) encontraram que o consumo de etanol em animais C57BL caiu drasticamente quando a dieta de ração básica foi suplementada com sacarose ou gordura (um aumento em suas propriedades calóricas), ao passo que a ingestão de etanol voltou de imediato a um nível alto quando o suplemento da ração foi descontinuado (uma diminuição nas suas propriedades calóricas). A conclusão é que os animais C57BL bebem o etanol não só por seus efeitos farmacológicos, mas também por seus efeitos como um alimento (propriedades calóricas). No nosso estudo os animais C57BL/6J consomem uma grande quantidade de etanol, porém não apresentam as modificações que sugerem o desenvolvimento da dependência. Os C57BL/6J descontinuam o uso quando adicionado uma propriedade aversiva (sabor amargo do quinino), não são condicionados a um ambiente pela presença do etanol, não apresentam ativação neuronal e nem alterações significativas de DA e 5-HT em regiões ligadas ao consumo de drogas. Podemos supor então que esses animais estão consumindo uma grande quantidade de etanol pelos seus efeitos calóricos, levando em consideração que a ração utilizada no nosso laboratório é básica (sem suplementações). Também favorece essa conclusão o fato de que existe uma relação inversa entre o nível de sinalização serotoninérgica no encéfalo e a ingestão de alimentos: quando essa sinalização é aumentada, a ingestão de alimentos é reduzida, e vice-versa (LAM et al., 2010). Nos animais C57BL/6J a concentração de 5-HT é naturalmente mais baixa (em várias regiões). Nos camundongos Suíços encontramos a situação oposta: níveis basais de 5-HT elevados e consumo por livre escolha de etanol baixo.

Estudos em neurobiologia têm se concentrado em três regiões encefálicas na ativação de comportamentos: (1) a Amígdala, envolvida em comportamentos motivados pelo medo; (2) o CPF, que regula a relevância motivacional global e determina a intensidade da resposta comportamental; (3) e NAc, relacionado a comportamentos motivados por recompensa (KALIVAS; VOLKOW, 2005). No nosso trabalho essas três regiões se mostraram

responsivas ao etanol. Nos camundongos Suíços houve ativação das três, e nos camundongos C57BL/6J a tendência foi de diminuição da ativação, sendo que os animais Suíços são os que apresentam comportamentos motivados pelo etanol e sinais preditivos de dependência.

Apesar de vários estudos mostrarem que o etanol induz aumento na liberação de DA em algumas regiões encefálicas envolvidas com motivação e recompensa (p. ex.: ATV, NAc, CPu, SN) (FADDA et al., 1980; MURPHY et al., 1988; FADDA et al., 1990; YOSHIMOTO et al., 1991; WEISS et al., 1993; NESTLER, 2001; PIERCE e KUMARESAN, 2006; LIU et al., 2008; SHEN, LIAO e TSENG, 2012), nosso trabalho não encontrou evidências que suportem essa ideia. O etanol não foi capaz de induzir alterações dopaminérgicas em nenhuma região encefálica estudada, apesar de algumas terem se mostrado ativadas após sua administração. No entanto ainda assim tivemos alguns testes preditivos de dependência positivos nos animais Suíços: inflexibilidade ao consumo de etanol com adição de quinino e preferência por um ambiente condicionado ao etanol.

Ainda que a DA seja citada como um importante neurotransmissor envolvido com o consumo de etanol, ela não é essencial, existem outros neurotransmissores envolvidos com as regiões que modulam o consumo da droga e seus efeitos (MIHIC; HARRIS, 1997; JOHNSON, 2008; GILPIN; KOOB, 2008). Podemos citar os (1) opióides endógenos (endorfinas, encefalinas e dinorfinas), cuja liberação no encéfalo modula em parte as propriedades de reforço positivo do etanol; (2) o GABA como sendo o principal neurotransmissor inibitório no encéfalo e que tem seu efeito aumentado com a administração de etanol; (3) o glutamato, como o principal neurotransmissor excitatório, que tem alguns de seus receptores inibidos pelo etanol; (4) a 5-HT quem tem uma relação direta com o consumo de etanol e seus efeitos (supracitado); (5) a Nor que modula a interação do etanol com os receptores de GABA; e (6) até endocanabinóides também têm sido sugeridos como tendo alguma relação com susceptibilidade aos efeitos do etanol, sendo que bloqueio do receptor canabinoide tipo 1 (CB1) reduz o consumo de etanol (para mais detalhes ver JOHNSON, 2008).

Mesmo que no nosso estudo não tenhamos obtido as alterações esperadas de acordo com a literatura nas concentrações de DA e 5-HT isso não indica que não esteja acontecendo nada com os animais que explique as diferenças de consumo e comportamentais. Nosso estudo não avaliou os outros neurotransmissores supracitados, que podem estar modulando esses comportamentos nos nossos camundongos. Uma crítica pode ser feita também quanto à

metodologia escolhida para o nosso trabalho. Como já foi mencionado, quantificamos as alterações na DA e 5-HT a partir do homogenato das regiões estudadas, o que acaba por misturar as moléculas de neurotransmissor intra e extracelulares. Essa mistura torna difícil detectar com precisão a quantidade de neurotransmissores que foi de fato liberada pela célula. Podemos pensar que a quantidade de moléculas de DA e 5-HT que fica armazenada na célula (as reservas intracelulares) não deve variar muito entre os animais, variando apenas o que foi liberado em resposta a um estímulo. Desse modo é bem difícil que a quantificação pelo homogenato detecte alguma alteração significativa, uma vez que estamos detectando ‘o todo’ de neurotransmissores, que é similar nos animais.

7. CONCLUSÃO

Em resumo, podemos concluir com esse trabalho que o alto consumo de etanol não está necessariamente relacionado ao desenvolvimento de dependência. Como vimos, mesmo animais que consomem naturalmente pouco etanol podem apresentar importantes alterações comportamentais e neurais, como ativação de áreas relacionadas ao reforço e desenvolvimento de comportamentos relacionados à dependência. DA e 5-HT podem participar desse processo, mas não necessariamente, sendo componentes de um complexo sistema que envolve vários neurotransmissores. Os camundongos Suíços apresentam ativação neuronal em resposta ao etanol maior do que os C57BL/6J, e em relação aos neurotransmissores estudados os Suíços apresentam concentrações basais de DA e 5-HT maiores. Maiores concentrações basais dos neurotransmissores podem ser uma das explicações do porquê os Suíços consomem menos etanol, ao passo que ativação de mais áreas encefálicas pode explicar porque eles apresentam alterações comportamentais relacionados à dependência.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APA - American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed., text rev., 2000.
- AZMITIA, E. C. Serotonin and Brain: Evolution, Neuroplasticity, and Homeostasis. **International Review of Neurobiology**, New York, v. 77, n., p. 31-56, 2007.
- BACHTELL, R. K. et al. Alcohol Drinking Produces Brain Region-Selective Changes in Expression of Inducible Transcription Factors. **Brain Research**, Portland, v. 847, n., p.157-165, 1999.
- BAHENA-TRUJILLO, R.; FLORES, G.; ARIAS-MONTAÑO, J. A. Dopamina: Síntesis, Liberación y Receptores en el Sistema Nervioso Central. **Revista Biomédica**, México, v. 11, n., p.39-60, 2000.
- BALLEINE, B. W.; KILLCROSS, S. Parallel Incentive Processing: an Integrated View of Amygdala Function. **Trends in Neurosciences**, Los Angeles, v. 29, n. 5, p.272-279, 2006.
- BANDLER, R.; CARRIVE, P.. Integrated Defense Reaction Elicited by Excitatory Amino Acid Microinjection in the Midbrain Periaqueductal Grey Region of the Unrestrained Cat. **Brain Research**, Sydney, v. 439, n., p.95-106, 1988.
- BELTRAN, M. H. R. Destilação: a Arte de "Extrair Virtudes". **Química Nova Na Escola**, São Paulo, v., n. 4, p., novembro 1996.
- BERTOLETE, J. M. (trad., 2010) Glossário de Álcool e Drogas. Brasília: Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas.
- BITTENCOURT, A. S. et al. Organization of Single Components of Defensive Behaviors within Distinct Columns of Periaqueductal Gray Matter of the Rat: Role of N-Methyl- D - Aspartic Acid Glutamate Receptors. **Neuroscience**, Vitória, v. 125, n., p.71-89, 2004.
- BORTOLANZA, M. et al. Functional Disconnection of the Substantia Nigra Pars Compacta from the Pedunculopontine Nucleus Impairs Learning of a Conditioned Avoidance Task. **Neurobiology of Learning and Memory**, Curitiba, v. 94, n., p.229-239, 2010.
- BRANDÃO, Marcus Lira. **As Bases Biológicas do Comportamento: Introdução à Neurociência**. Ribeirão Preto: Editora Pedagógica e Universitária, 2004. 252 p.
- BRASIL. Secretaria Nacional Antidrogas. **I Levantamento Nacional Sobre os Padrões de Consumo de Álcool na População Brasileira (LENAD)**. Brasília, DF, 2007.
- BRASIL. Secretaria Nacional De Políticas Sobre Drogas. **Livreto Informativo Sobre Drogas Psicotrópicas**. Brasília, DF, 2011.
- BURTON, M. J.; ROLLS, E. T.; MORA, F. Effects of Hunger on the Responses of Neurons in the Lateral Hypothalamus to the Sight and Taste of Food. **Experimental Neurology**, Oxford, v. 51, n., p.668-677, 1976.
- CAMARINI, R. .; PREGNOLATTO, C. A. Álcool Etílico. In: DELUCIA, R. (Ed.). **Farmacologia Integrada**. 3a. 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.

CARLSSON, K. H.; HELMREICH, J.; JURNA, I. Activation of Inhibition from the Periaqueductal Grey Matter Mediates Central Analgesic Effect of Metamizol (Dipyrone). **Pain**, Homburg, v. 27, n., p.373-390, 1986.

Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) [Internet]. São Paulo: UNIFESP; 2013. Acesso em: 03 set. 2013. Disponível em: http://www.unifesp.br/dpsicobio/cebrid/folhetos/alcool_.htm

CHANG, S. L.; PATEL, N. A.; ROMERO, A. A. Activation and Desensitization of Fos Immunoreactivity in the Rat Brain Following Ethanol Administration. **Brain Research**, South Orange, v. 679, n., p.89-98, 1995.

COLLINS, A. C.; MARKS, M. J. Progress towards the Development of Animal Models of Smoking-Related Behaviors. **Journal of Addictive Diseases**, [s. L.], v. 10, n., p.109-126, 1991.

CRABBE, J. C. et al. Intermittent Availability of Ethanol Does Not Always Lead to Elevated Drinking in Mice. **Alcohol and Alcoholism**, Portland, v. 47, n. 5, p.509-517, 2012.

CUNNINGHAM, C. L. et al. Genetic Differences in the Rewarding and Activating Effects of Morphine and Ethanol. **Psychopharmacology**, Portland, v. 107, n., p.385-393, 1992.

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., p.111-117, 2001.

DAVE, J. R.; TABAKOFF, B.; HOFFMAN, P. L. Ethanol Withdrawal Seizures Produce Increased c-fos mRNA in Mouse Brain. **Molecular Pharmacology**, Bethesda, v. 37, n., p.367-371, 1989.

DAVIDSON, M. et al. FOS and JUN as Markers for Ethanol-Sensitive Pathways in the Rat Brain. **Brain Research Bulletin**, Queensland, v. 39, n. 3, p.177-184, 1996.

DEAKIN, J. F. W.; DOSTROVSKY, J. O. Involvement of the Periaqueductal Grey Matter and Spinal 5-Hydroxytryptaminergic Pathways in Morphine Analgesia: Effects of Lesions and 5-Hydroxytryptamine Depletion. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 63, n., p.159-165, 1978.

DEBELLIS, M. D. et al. Prefrontal Cortex, Thalamus, and Cerebellar Volumes in Adolescents and Young Adults with Adolescent-Onset Alcohol Use Disorders and Comorbid Mental Disorders. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Durham, v. 29, n. 9, p.1590-1600, 2005.

DEFIEBRE, C. M.; COLLINS, A. C. Classical Genetic Analyses of Responses to Nicotine and Ethanol in Crosses Derived from Long- and Short-Sleep Mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Colorado, v. 261, n., p.173-180, 1992.

DEPAULIS, A.; VERGNES, M.; MARESCAUX, C. Endogenous Control of Epilepsy: The Nigral Inhibitory System. **Progress in Neurobiology**, Strasbourg, v. 42, n. 3333333, p.33-52, 1994.

DI CHIARA, G.; BASSAREO, V. Reward System and Addiction: What Dopamine Does and Doesn't Do. **Current Opinion in Pharmacology**. v.7, n., 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 USA**. v. 85, n., p. 5274-5278, 1988.

DOLE, V. P.; HO, A.; GENTRY, R. T. Toward an Analogue of Alcoholism in Mice: Criteria for Recognition of Pharmacologically Motivated Drinking. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New York, v. 82, n., p.3469-3471, 1985.

DRAGUNOW, M.; FAULL, R. The Use of C-Fos as a Metabolic Marker in Neuronal Pathway Tracing. **Journal of Neuroscience Methods**, Auckland, v. 29, n., p.261-265, 1989.

EDENBERG, H. J.; FOROUD, T. Genetics and Alcoholism. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, Indianapolis, v. 10, n., p.487-494, Aug. 2013.

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, n., p. 5-12, 2006.

FACHIN-SCHIEIT, D. J. et al. Development of a Mouse Model of Ethanol Addiction: Naltrexone Efficacy in Reducing Consumption but Not Craving. **Journal of Neural Transmission**, Curitiba, v. 113, n., p.1305-1321, 2006.

FADDA, F. et al. Alcohol-Preferring Rats: Genetic Sensitivity to Alcohol-Induced Stimulation of Dopamine Metabolism. **Physiology & Behavior**, Cagliari, v. 47, p.727-729, 1990.

FADDA, F. et al. Differential Effect of Acute and Chronic Ethanol on Dopamine Metabolism in Frontal Cortex, Caudate Nucleus and Substantia Nigra. **Life Sciences**, Cagliari, v. 27, n. 11, p.979-986, 1980.

FARIA, R. R. et al. Environmental Modulation of Ethanol-Induced Locomotor Activity: Correlation with Neuronal Activity in Distinct Brain Regions of Adolescent and Adult Swiss Mice. **Brain Research**, São Paulo, v. 1239, n., p.127-140, 2008.

FLEMING, M.; MIHIC, S. J.; HARRIS, R. A. Etanol. In: GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. McGraw Hill, 2012. cap. 18, p. 325-337.

FREUND, R. K.; PALMER, M. RBeta Adrenergic Sensitization of γ -Aminobutyric Acid Receptors to Ethanol Involves a Cyclic AMP/Protein Kinase A Second-Messenger Mechanism. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Denver, v. 280, n. 3, p.1192-1200, 1997.

GAINETDINOV, R. R. et al. Re-Evaluation of the Role of the Dopamine Transporter in Dopamine System Homeostasis. **Brain Research Reviews**, Durham, v. 26, n., p.148-153, 1998.

- GARRIS, P. A. et al. Efflux of Dopamine from the Synaptic Cleft in the Nucleus Accumbens of the Rat Brain. **The Journal of Neuroscience**, Chapel Hill, v. 14, n. 10, p.6084-6093, 1994.
- GILMAN, S. et al. Cerebellar and Frontal Hypometabolism in Alcoholic Cerebellar Degeneration Studied with Positron Emission Tomography. **Annals of Neurology**, Ann Arbor, v. 28, n. 6, p.775-785, 1990.
- GILPIN, N. W.; KOOB, G. F.. Neurobiology of Alcohol Dependence: Focus on Motivational Mechanisms. **Neurobiology of Alcohol Dependence**, La Jolla, v. 31, n. 3, p.185-195, 2008.
- GINGRICH, J. A.; HEN, R. Dissecting the Role of the Serotonin System in Neuropsychiatric Disorders Using Knockout Mice. **Psychopharmacology**, New York, v. 155, n., p. 1-10, 2001.
- GOLDSTEIN, R. Z.; VOLKOW, N. D. Drug Addiction and Its Underlying Neurobiological Basis: Neuroimaging Evidence for the Involvement of the Frontal Cortex. **The American Journal of Psychiatry**, [s. L.], v. 159, n. 10, p.1642-1652, 2002.
- GONZALES, R. A.; JOB, M. O.; DOYON, W. M. The Role of Mesolimbic Dopamine in the Development and Maintenance of Ethanol Reinforcement. **Pharmacology & Therapeutics**, Austin, v. 103, n., p.121-146, 2004.
- GONZALES, R. A.; WEISS, F. Suppression of Ethanol-Reinforced Behavior by Naltrexone Is Associated with Attenuation of the Ethanol-Induced Increase in Dialysate Dopamine Levels in the Nucleus Accumbens. **The Journal of Neuroscience**, Austin, v. 18, n. 24, p.10663-10671, 1998.
- GRAHAME-SMITH, D. G. The Biosynthesis of 5-hydroxytryptamine in Brain. **The Biochemical Journal**, London, v. 105, n. 1, p.351-360, 1967.
- GRENHOF, J. et al. Noradrenergic Modulation of Midbrain Dopamine Cell Firing Elicited by Stimulation of the Locus Coeruleus in the Rat. **Journal of Neural Transmission**, Stockholm, v. 93, n., p.11-25, 1993.
- GRIFFITHS, J. L.; LOVICK, T. A. Co-localization of 5-HT_{2A}-receptor- and GABA-Immunoreactivity in Neurones in the Periaqueductal Grey Matter of the Rat. **Neuroscience Letters**, Birmingham, v. 326, n., p.151-154, 2002.
- GRIFFITHS, J. L.; LOVICK, T. A. Gabaergic Neurones in the Rat Periaqueductal Grey Matter Express $\alpha 4$, $\beta 1$ and δ GabaA Receptor Subunits: Plasticity of Expression during the Estrous Cycle. **Neuroscience**, Birmingham, v. 136, n., p.457-466, 2005.
- HAKANSSON, M.I. et al. Leptin Receptor- and STAT3-Immunoreactivities in Hypocretin/Orexin Neurones of the Lateral Hypothalamus. **Journal of Neuroendocrinology**, Stockholm, v. 11, n., p.653-663, 1999.
- HEATH, A. C. et al. Genetic and Environmental Contributions to Alcohol Dependence Risk in a National Twin Sample: Consistency of Findings in Women and Men. **Psychological Medicine**, St Louis, v. 27, n. 6, p.1381-1396, 1997.
- HERRERA, D. G.; ROBERTSON, H. A. Activation of c-fos in the Brain. **Progress in Neurobiology**, New York, v. 50, n., p.83-107, 1996.

HERRING, B. E. et al. Ethanol-Induced Fos Immunoreactivity in the Extended Amygdala and Hypothalamus of the Rat Brain: Focus on Cholinergic Interneurons of the Nucleus Acumbens. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Austin, v. 28, n. 4, p.588-597, 2004.

HITZEMANN, B.; HITZEMANN, R. Genetics, Ethanol and the Fos Response: A Comparison of the C57BL/6J and DBA/2J Inbred Mouse Strains. **Alcoholism: Clinical And Experimental Research**, Northport, v. 21, n. 8, p.1497-1507, 1997.

HORVITZ, J. C. Mesolimbocortical and Nigrostriatal Dopamine Responses to Salient Non-Reward Events. **Neuroscience**, New York, v. 96, n. 4, p.651-656, 2000.

HURLEY, T. D.; EDENBERG, H. J. Genes Encoding Enzymes Involved in Ethanol Metabolism. **Alcohol Research**, Indianapolis, v. 34, n. 3, p.339-344, 2012.

ILANGO, A. et al. Similar Roles of Substantia Nigra and Ventral Tegmental Dopamine Neurons in Reward and Aversion. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 34, n. 3, p.817-822, 2014.

JAMES, M. F. M. et al. Analgesic Effect of Ethyl Alcohol. **British Journal of Anaesthesia**, Salisbury, v. 50, n., p.139-141, 1978.

JOHNSON, B. A. Update on Neuropharmacological Treatments for Alcoholism: Scientific Basis and Clinical Findings. **Biochemical Pharmacology**, Virginia, v. 75, n., p.34-56, 2008.

JURNA, I. Effect of Stimulation in the Periaqueductal Grey Matter on Activity in Ascending Axons of the Rat Spinal Cord: Selective Inhibition of Activity Evoked by Afferent A δ and C Fibre Stimulation and Failure of Naloxone to Reduce Inhibition. **Brain Research**, Homburg, v. 196, n., p.33-42, 1980.

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

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. **Principles of Neural Science**. 4. ed. New York: McGraw-Hill, 2000. 1230 p.

KARILA, L. et al. New Treatments for Cocaine Dependence: a Focused Review. **International Journal of Neuropsychopharmacology**. v.11, n., p.425-438, 2008.

KARKHANIS, A. N. et al. Social Isolation Rearing Increases Nucleus Acumbens Dopamine and Norepinephrine Responses to Acute Ethanol in Adulthood. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Winston-salem, v. 38, n. 11, p.2770-2779, 2014.

KELLEY, B. M.; BANDY, A. E.; MIDDAUGH, L. D. A Study Examining Intravenous Ethanol-Conditioned Place Preference in C57BL/6J Mice. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Charleston, v. 21, n. 9, p.1661-1666, 1997.

KIROUAC, G. J.; GANGULY, P. K. Topographical Organization in the Nucleus Acumbens of Afferents from the Basolateral Amygdala and Efferents to the Lateral Hypothalamus. **Neuroscience**, Manitoba, v. 67, n. 3, p.625-630, 1995.

KNIGHT, Y. E.; GOADSBY, P. J. The Periaqueductal Grey Matter Modulates Trigemino-vascular Input: A Role In Migraine? **Neuroscience**, London, v. 106, n. 4, p.793-800, 2001.

KOZELL, L. B.; HITZEMANN, R.; BUCK, K. J. Acute Alcohol Withdrawal is associated with c-Fos Expression in the Basal Ganglia and Associated Circuitry: C57BL/6J and DBA/2J Inbred Mouse Strain Analyses. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Portland, v. 29, n. 11, p.1939-1948, 2005.

LAM, D. D. *et al.* Brain Serotonin System in the Coordination of Food Intake and Body Weight. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Cambridge, v. 97, n., p. 84-91, 2010.

LAPIZ, M. D. S. *et al.* Effects of Noradrenaline Depletion in the Brain on Response to Novelty in Isolation-Reared Rats. **Psychopharmacology**, Nottingham, v. 152, n., p.312-320, 2000.

LATEGAN, A. J.; MARIEN, M. R.; COLPAERT, F. C. Effects of Locus Coeruleus Lesions on the Release of Endogenous Dopamine in the Rat Nucleus Accumbens and Caudate Nucleus as Determined by Intracerebral Microdialysis. **Brain Research**, Puteaux, v. 523, n., p.134-138, 1990.

LÊ, A. D. *et al.* Alcohol Consumption by C57BL/6, BALB/C, and DBA/2 Mice in a Limited Access Paradigm. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Toronto, v. 47, n., p.375-378, 1994.

LÊ, A. D. *et al.* Role of Alpha-2 Adrenoceptors in Stress-Induced Reinstatement of Alcohol Seeking and Alcohol Self-Administration in Rats. **Psychopharmacology**, Toronto, v. 179, n., p.366-373, 2005.

LEGASTELOIS, R.; BOTIA, B. Deciphering the Relationship between Vulnerability to Ethanol-Induced Behavioral Sensitization and Ethanol Consumption in Outbred Mice. **Addiction Biology**, Amiens, v. 19, n., p.210-224, 2013.

LEMARQUAND, D.; PIHL, R. O.; BENKELFAT, C. Serotonin and Alcohol Intake, Abuse, and Dependence: Clinical Evidence. **Biological Psychiatry**, Québec, v. 36, p.326-337, 1994.

LESSCHER, H. M. B.; VANKERKHOF, L. W. M.; VANDERSCHUREN, L. J. M. J. Inflexible and Indifferent Alcohol Drinking in Male Mice. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Utrecht, v. 34, n. 7, p.1219-1225, 2010.

LESSOV, C. N. *et al.* Voluntary Ethanol Drinking In C57BL/6J and DBA/2J Mice Before and After Sensitization to the Locomotor Stimulant Effects of Ethanol. **Psychopharmacology**, Portland, v. 155, n., p.91-99, 2001.

LIU, Y. *et al.* Conditioned Place Preference Induced by Licit Drugs: Establishment, Extinction, and Reinstatement. **The Scientific World Journal**, Beijing, v. 8, n., p.1228-1245, 2008.

LÖF, E.; CHAU, P. P.; STOMBERG, R.; SÖDERPALM, B. Ethanol-Induced Dopamine Elevation in the Rat-Modulatory Effects By Subchronic Treatment with Nicotinic Drugs. **European Journal of Pharmacology**, v. 555, n., p. 139-47, 2007.

LOVICK, T. A. Serotonergic Influence from Nucleus Raphe Obscurus on Neurones in the Periaqueductal Grey Matter in the Rat. **Brain Research**, Birmingham, v. 606, n., p.92-98, 1993.

LOVICK, T. A. Ventrolateral Medullary Lesions Block the Antinociceptive and Cardiovascular Responses Elicited by Stimulating the Dorsal Periaqueductal Grey Matter in Rats. **Pain**, Birmingham, v. 21, n., p.241-252, 1985.

MAURICE, T. et al. Involvement of the Sigma 1 Receptor in the Motivational Effects of Ethanol in Mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Montpellier, v. 74, p.869-876, 2003.

MCBRIDE, W. J. Central Nucleus of the Amygdala and the Effects of Alcohol and Alcohol-Drinking Behavior in Rodents. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Indianapolis, v. 71, n. 3, p.509-515, 2002.

MCBRIDE, W. J. et al. Serotonin, Dopamine and GABA Involvement in Alcohol Drinking of Selectively Bred Rats. **Alcohol**, Indianapolis, v. 7, p.199-205, 1990.

MELLENDEZ, R. I. et al. Microdialysis of Dopamine in the Nucleus Accumbens of Alcohol-Preferring (P) Rats during Anticipation and Operant Self-Administration of Ethanol. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Indianapolis, v. 26, n. 3, p.318-325, 2002.

MELISKA, C. J. *et al.* Ethanol, Nicotine, Amphetamine, and Aspartame Consumption and Preferences in C57BL/6 and DBA/2 Mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Carbondale, v. 50, n. 4, p.619-626, 1995.

MELÓN, L. C.; BOEHM, S. L. Role of Genotype in the Development of Locomotor Sensitization to Alcohol in Adult and Adolescent Mice: Comparison of the DBA/2J and C57BL/6J Inbred Mouse Strains. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Binghamton, v. 35, n. 7, p.1351-1360, 2011.

MELONI, J. N.; LARANJEIRA, R. Custo Social e de Saúde do Consumo do Alcool. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v. 24, n. 1, p.07-10, 2004.

METTEN, P.; CRABBE, J. C. Alcohol Withdrawal Severity in Inbred Mouse (*Mus musculus*) Strains. **Behavioral Neuroscience**, Portland, v. 119, n. 4, p.911-925, 2005.

MIHIC, S. J.; HARRIS, R. A. GABA and the GABAA Receptor. **Alcohol Health & Research World**, Winston-salem, v. 21, n. 2, p.127-132, 1997.

MILTON, G. V.; RANDALL, P. K.; ERICKSON, C. K. Low-Dose Effect of Ethanol on Locomotor Activity Induced by Activation of the Mesolimbic System. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Austin, v. 19, n. 3, p.768-776, 1995.

MORALES, M. *et al.* Acute Ethanol Induces c-Fos Immunoreactivity in GABAergic Neurons of the Central Nucleus of the Amygdala. **Brain Research**, [s.l.], v. 708, n., p.333-336, 1998.

MOREIRA-SILVA, D. et al. Stress Abolishes the Effect of Previous Chronic Ethanol Consumption on Drug Place Preference and on the Mesocorticolimbic Brain Pathway.

Alcoholism: Clinical and Experimental Research, Uberlândia, v. 38, n. 5, p.1227-1236, 2014.

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**, Austin, v. 91, n., p.235-288, 2010.

MURPHY, J. M. et al. Effects of Acute Ethanol Administration on Monoamine and Metabolite Content in Forebrain Regions of Ethanol-Tolerant and-Nontolerant Alcohol-Preferring (P) Rats. **Pharmacology, Biochemistry & Behavior**. Indianapolis, v. 29, n. 1, p.169-174, 1988.

MYERS, R. D.; VEALE, W. L. Alcohol Preference in the Rat: Reduction Following Depletion of Brain Serotonin. **Science**, Lafayette, v. 160, p.1469-1471, 1968.

NESTLER, E. J. Molecular Basis of Long-Term Plasticity Underlying Addiction. **Nature Reviews: Neuroscience**, Dallas, v. 2, n., p.119-128, 2001.

NOCJAR, C.; MIDDAUGH, L. D.; TAVERNETTI, M. Ethanol Consumption and Place-Preference Conditioning in the Alcohol-Preferring C57BL/6 Mouse: Relationship with Motor Activity Patterns. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Charleston, v. 23, n. 4, p.683-692, 1999.

OLIVE, M. F. et al. Reduced Ethanol Withdrawal Severity and Altered Withdrawal-Induced c-fos Expression in Various Brain Regions of Mice Lacking Protein Kinase C-Epsilon. **Neuroscience**, Emeryville, v. 103, n. 1, p.171-179, 2001.

PASCUAL, M. *et al.* Changes in Histone Acetylation in the Prefrontal Cortex of Ethanol-Exposed Adolescent Rats are Associated With Ethanol-Induced Place Conditioning. **Neuropharmacology**, Valencia, v. 62, n., p.2309-2319, Jan. 2012.

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**. Academic Press, v. Ed.2, 2001.

PFEFFERBAUM, A. et al. Frontal Lobe Volume Loss Observed With Magnetic Resonance Imaging in Older Chronic Alcoholics. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Palo Alto, v. 21, n. 3, p.521-529, 1997.

PHILLIPS, T. J.; DICKINSON, S.; BURKHART-KASCH, S. Behavioral Sensitization to Drug Stimulant Effects in C57BL/6J and DBA/2J Inbred Mice. **Behavioral Neuroscience**, Portland, v. 108, n. 4, p.789-803, 1994.

PIERCE, R. C.; KUMARESAN, V. The Mesolimbic Dopamine System: the Final Common Pathway for the Reinforcing Effect of Drugs of Abuse? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Boston, v. 30, n., p.215-238, 2006.

PILDERVASSER, J. V. N.; ABRAHAO, K. P.; SOUZA-FORMIGONI, M. L. O. Distinct Behavioral Phenotypes in Ethanol-Induced Place Preference are Associated with Different Extinction and Reinstatement but Not Behavioral Sensitization Responses. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, São Paulo, v. 8, n. 267, p.1-11, 2014.

QUERTEMONT, E.; NEUVILLE, J. de; WITTE, P. de. Changes in the Amygdala Amino Acid Microdialysate After Conditioning with a Cue Associated with Ethanol. **Psychopharmacology**, Louvain-la-neuve, v. 139, n., p.71-78, 1998.

REICH, T. et al. Genome-Wide Search for Genes Affecting the Risk for Alcohol Dependence. **American Journal of Medical Genetics**, St Louis, v. 81, n. 3, p.207-215, 1998.

RIBEIRO, A. F. et al. Lack of Relation between Drug-Seeking Behavior in an Addiction Model and the Expression of Behavioral Sensitization in Response to Ethanol Challenge in Mice. **Journal of Neural Transmission**, Curitiba, v. 115, p.43-54, 2008.

RISINGER, F. O.; BOYCE, J. M. 5-HT_{1A} Receptor Blockade and the Motivational Profile of Ethanol. **Life Sciences**, Portland, v. 71, p.707-715, 2002.

RISINGER, F. O.; OAKES, R. A. Dose- and Conditioning Trial-Dependent Ethanol-Induced Conditioned Place Preference in Swiss-Webster Mice. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, Portland, v. 55, n. 1, p.117-123, 1996.

ROBERTS, A. J.; COLE, M.; KOOB, G. F. Intra-amygdala Muscimol Decreases Operant Ethanol Self-administration in Dependent Rats. **Alcoholism: Clinical And Experimental Research**, La Jolla, v. 20, n. 7, p.1289-1298, 1996.

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

ROLLS, E. T.; SANGHERA, M. K.; ROPER-HALL, A.. The Latency of Activation of Neurones in the Lateral Hypothalamus and Substantia Innominata during Feeding in the Monkey. **Brain Research**, Oxford, v. 164, n., p.121-135, 1979.

ROSE, J. H. et al. Greater Ethanol-Induced Locomotor Activation in DBA/2J versus C57BL/6J Mice is Not Predicted by Presynaptic Striatal Dopamine Dynamics. **Plos One**, Winston-Salem, v. 8, n. 12, p.1-10, 2013.

ROSSI, M. A. et al. Operant Self-Stimulation of Dopamine Neurons in the Substantia Nigra. **Plos One**, Durham, v. 8, n. 6, p.1-7, 2013.

RYABININ, A. E. et al. Differential Sensitivity of c-Fos Expression in Hippocampus and Other Brain Regions to Moderate and Low Doses of Alcohol. **Molecular Psychiatry**, La Jolla, v. 2, n., p.32-43, 1997.

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

SAGAR, S. M.; SHARP, F. R.; CURRAN, T. Expression of c-Fos Protein in Brain: Metabolic Mapping at the Cellular Level. **Science**, San Francisco, v. 240, n., p.1328-1331, 1988.

SANCHIS-SEGURA, C.; SPANAGEL, R. Behavioral Assessment of Drug Reinforcement and Addictive Features in Rodents: an Overview. **Addiction Biology**, Mannheim, v. 11, n. 1, p.2-38, 2006.

SARI, Y. *et al.* Neuroprotective Peptide ADNF-9 in Fetal Brain of C57BL/6 Mice Exposed Prenatally to Alcohol. **Journal of Biomedical Science**, Toledo, v. 18, n. 77, p., 2011.

SHARPE, A. L.; TSIVKOVSKAIA, N. O.; RYABININ, Andrey E. Ataxia and c-Fos Expression in Mice Drinking Ethanol in a Limited Access Session. **Alcoholism: Clinical And experimental Research**, Portland, v. 29, n. 8, p.1419-1426, 2005.

SHEN, L.; LIAO, M.; TSENG, Y. Recent Advances in Imaging of Dopaminergic Neurons for Evaluation of Neuropsychiatric Disorders. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Taiwan, v., n., p., 2012.

SHEN, R.; CHIODO, L. A. Acute Withdrawal after Repeated Ethanol Treatment Reduces the Number of Spontaneously Active Dopaminergic Neurons in the Ventral Tegmental Area. **Brain Research**, Detroit, v. 622, n., p.289-293, 1993.

SOARES-SIMI, S. L. *et al.* Changes in CREB Activation in the Prefrontal Cortex and Hippocampus Blunt Ethanol-Induced Behavioral Sensitization in Adolescent Mice. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, São Paulo, v. 7, n. 94, p.1-12, 2013.

SOLINAS, M. *et al.* Caffeine Induces Dopamine and Glutamate Release in the Shell of the Nucleus Acumbens. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 22, n. 15, p.6321-6324, 2002.

SPANAGEL, R.; ZIEGLGÄNSBERGER, W. Anti-craving compounds for ethanol: new pharmacological tools to study addictive processes. **Trends in Pharmacological Sciences**, Munich, v. 18, n. 2, p.54-59, 1997.

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.

STRATFORD, T. R.; KELLEY, A. E. Evidence of a Functional Relationship between the Nucleus Acumbens Shell and Lateral Hypothalamus Subserving the Control of Feeding Behavior. **The Journal of Neuroscience**, Madison, v. 19, n. 24, p.11040-11048, 1999.

SUDAKOV, K. V. The Pacemaker of Dominant Motivation. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, Moscow, v. 43, n. 2, p.1-11, 1992.

SULZER, D. How Addictive Drugs Disrupt Presynaptic Dopamine Neurotransmission. **Neuron**, New York, v. 69, n. 4, p.628-649, 2011.

TABAKOFF, B.; HOFFMAN, P. L. Animal Models in Alcohol Research. **Alcohol Research & Health**, Denver, v. 24, n. 2, p.77-84, 2000.

TAHERI, S. *et al.* Distribution and Quantification of Immunoreactive Orexin A in Rat Tissues. **Febs Letters**, London, v. 457, n., p.157-161, 1999.

THIELE, T. E. et al. Ethanol-Induced c-Fos Expression in Catecholamine- and Neuropeptide Y-Producing Neurons in Rat Brainstem. **Alcoholism: Clinical And Experimental Research**, Seattle, v. 24, n. 6, p.802-809, 2000.

THIELE, T. E.; ROITMAN, M. F.; BERNSTEIN, I. L. C-Fos Induction in Rat Brainstem in Response to Ethanol- and Lithium Chloride-Induced Conditioned Taste Aversions. **Alcoholism: Clinical And Experimental Research**, Seattle, v. 20, n. 6, p.1023-1028, 1996.

VALLEE, B. L. Alcohol in the Western World: A History. **Scientific American**, Massachusetts, v. 278, n. 6, p.80-85, June 1998.

VANGELIENE, V. et al. Neuropharmacology of Alcohol Addiction. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, n., p. 299-315, 2008.

VOLKOW, N. D. *et al.* PET Evaluation of the Dopamine System of the Human Brain. **The Journal of Nuclear Medicine**, New York, v. 37, n., p.1242-1256, 1996.

WEINSHENKER, D. et al. Ethanol-Associated Behaviors of Mice Lacking Norepinephrine. **The Journal of Neuroscience**, Seattle, v. 20, n. 9, p.3157-3164, 2000.

WEISS, F. et al. Oral Alcohol Self-Administration Stimulates Dopamine Release in the Rat Nucleus Acumbens: Genetic and Motivational Determinants. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, California, v. 267, n. 1, p.250-258, 1993.

WISE, R. A. Roles for Nigrostriatal—Not Just Mesocorticolimbic—Dopamine in Reward and Addiction. **Trends In Neurosciences**, [S. L.], v. 32, n. 10, p.517-524, 2009.

WOODROW, K. M.; ELTHERINGTON, L. G. Feeling no pain: alcohol as an analgesic. **Pain**, Stanford, v. 32, n., p.159-163, 1988.

World Health Organization. Global Status Report on Alcohol 2004. WHO. 94 pp. 2004.

World Health Organization. Global Status Report on Alcohol and Health. WHO. 85 pp. 2011.

YONEYAMA, N. et al. Voluntary Ethanol Consumption in 22 Inbred Mouse Strains. **Alcohol**, Portland, v. 42, n., p.149-160, 2008.

YORGASON, J. T. et al. Greater Ethanol Inhibition of Presynaptic Dopamine Release in C57BL/6J than DBA/2J Mice: Role of Nicotinic Acetylcholine Receptors. **Neuroscience**, Winston Salem, v. 284, n., p.854-864, 2014.

YOSHIMOTO, K. et al. Alcohol Stimulates the Release of Dopamine and Serotonin in the Nucleus Acumbens. **Alcohol**, Indianapolis, v. 9, n., p.17-22, 1991.

ANEXO A

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

ANÁLISE FINAL Nº 156/13 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 086/13

Projeto Pesquisa: “Alterações neuronais e comportamentais relacionadas ao consumo e condicionamento ao etanol: comparação entre duas linhagens de camundongos com diferentes suscetibilidades ao consumo de etanol”.

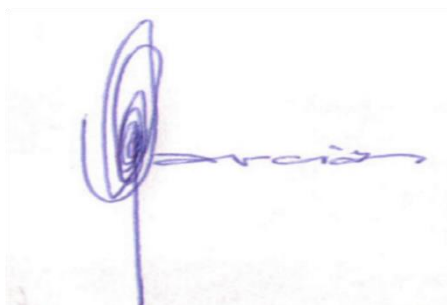
Pesquisador Responsável: Marcelo Tadeu Marin

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

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, 12 de agosto de 2013



Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU