

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

RÍVIA REIS BORGES

**ANÁLISE DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE DA
AMÍDALA NA INTERAÇÃO ENTRE A EXPOSIÇÃO DE ESTRESSE E O
CONSUMO DE ETANOL EM CAMUNDONGOS**

Uberlândia, MG

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

RÍVIA REIS BORGES

**ANÁLISE DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE DA
AMÍDALA NA INTERAÇÃO ENTRE A EXPOSIÇÃO DE ESTRESSE E O
CONSUMO DE ETANOL EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Nutrição da Universidade Federal de Uberlândia
como requisito à obtenção do título de Graduação em Nutrição
Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Molini Leão

Aprovado em 06 de dezembro de 2024

Uberlândia, MG

2024

Resumo

O consumo excessivo de álcool representa um grave problema de saúde pública, com consequências deletérias para a saúde individual e social. A busca por alívio em situações de estresse é frequentemente associada ao aumento do consumo de álcool, estabelecendo um ciclo vicioso que pode levar à dependência. Nesse contexto, o sistema endocanabinóide (SEC), um sistema de sinalização endógena, emerge como um importante modulador do comportamento de recompensa, atuando como um sistema homeostático e regulando diversas funções fisiológicas, incluindo humor, apetite, sono e memória. A interação do SEC com o sistema dopaminérgico é fundamental para o processamento de recompensa, pois participa da modulação do comportamento relacionado à busca por efeitos euforizantes. A amígdala e o núcleo leito da estria terminal (BNST), no inglês "bed nucleus of the stria terminalis", formam um circuito neural crucial para a regulação emocional e motivacional. Enquanto a amígdala atribui valor emocional aos estímulos, o BNST integra informações com o sistema imune, influenciando na motivação e a busca por reforço. Fatores estressores culminam na ativação do eixo hipotalâmico-hipófise-adrenal (HHA), sendo que, a desregulação deste, contribui para a exacerbação das emoções, intensificando a busca por alívio através do consumo de álcool. Além disso, a ativação dos receptores CB1, localizados principalmente no cérebro e no sistema nervoso central, atenuam a resposta ao estresse na amígdala e modula a atividade neuronal relacionada à recompensa no BNST, enquanto os receptores CB2 podem modular a resposta inflamatória e a neurotoxicidade induzidas pelo estresse e pelo consumo de álcool. Estudos mostram que o SEC desempenha um papel fundamental na regulação de processos relacionados ao estresse e ao consumo de substâncias, incluindo o etanol, e as enzimas como a FAAH (hidrólise de amida de ácidos graxos) e a MAGL (lipase de monoacilglicerol) estão envolvidas no metabolismo dos endocanabinóides, modulando os níveis de anandamida e 2-AG, respectivamente. Essas moléculas são associadas à regulação da resposta ao estresse e ao comportamento de consumo de drogas. Neste estudo, foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6J. Após o protocolo experimental, os encéfalos foram coletados para análise molecular. As amostras da amígdala foram dissecadas e seccionadas em criostato para posterior extração de RNA, seguida da síntese de cDNA e pré-amplificação com primers específicos. A expressão relativa dos genes CB1, CB2, FAAH e MAGL foi avaliada por RT-PCR duplex, com

normalização utilizando o gene de referência Pde10a. Nesse contexto, observou-se que o grupo de animais submetidos ao protocolo de estresse intermitente imprevisível consumiu mais etanol em comparação ao grupo controle. Além disso, a análise molecular feita nos nossos animais revelou alterações significativas no nível de expressão gênica na amígdala e no BNST, sugerindo que o estresse não apenas influencia no comportamento de consumo, mas também promove mudanças moleculares nesses núcleos. Diante disso, é evidente que a inter-relação entre estresse, sistema endocanabinóide e consumo de álcool apresenta um complexo cenário que merece atenção.

Palavras-chave: Etanol, Estresse, Sistema Endocanabinóide, Amígdala, BNST, Dependência.

Abstract

Excessive alcohol consumption represents a serious public health issue with deleterious consequences for individual and social well-being. The search for relief in stressful situations is often associated with increased alcohol consumption, establishing a vicious cycle that can lead to dependence. In this context, the endocannabinoid system (ECS), an endogenous signaling system, emerges as an important modulator of reward behavior, acting as a homeostatic system and regulating various physiological functions, including mood, appetite, sleep, and memory. The interaction of the ECS with the dopaminergic system is fundamental for reward processing, as it modulates behavior related to the pursuit of euphoric effects. The amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) form a crucial neural circuit for emotional and motivational regulation. While the amygdala assigns emotional value to stimuli, the BNST integrates information with the immune system, influencing motivation and the pursuit of reinforcement. Stressful factors culminate in the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, and its dysregulation contributes to the exacerbation of emotions, intensifying the search for relief through alcohol consumption. Furthermore, the activation of CB1 receptors, mainly located in the brain and central nervous system, attenuates the stress response in the amygdala and modulates neuronal activity related to reward in the BNST, while CB2 receptors may modulate the inflammatory response and neurotoxicity induced by stress and alcohol consumption. Studies show that the ECS plays a fundamental role in

regulating processes related to stress and substance use, including ethanol, and enzymes such as FAAH (fatty acid amide hydrolase) and MAGL (monoacylglycerol lipase) are involved in the metabolism of endocannabinoids, modulating the levels of anandamide and 2-AG, respectively. These molecules are associated with regulating the stress response and drug-seeking behavior. In this study, C57BL/6J mice were used. After the experimental protocol, the brains were collected for molecular analysis. Amygdala samples were dissected and sectioned using a cryostat for subsequent RNA extraction, followed by cDNA synthesis and pre-amplification with specific primers. The relative expression of the CB1, CB2, FAAH, and MAGL genes was evaluated using duplex RT-PCR, normalized with the reference gene *Pde10a*. In this context, it was observed that the group of animals subjected to the unpredictable intermittent stress protocol consumed more ethanol compared to the control group. Moreover, the molecular analysis in our animals revealed significant alterations in gene expression levels in the amygdala and BNST, suggesting that stress not only influences consumption behavior but also promotes molecular changes in these nuclei. Thus, it is evident that the interplay between stress, the endocannabinoid system, and alcohol consumption presents a complex scenario that warrants attention.

Keywords: Ethanol, Stress, Endocannabinoid System, Amygdala, BNST, Consumption, Addiction.

Dedico este trabalho a meus pais,
minhas maiores referências,
por todo amor e incentivo incondicionais.

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste Trabalho de Conclusão de Curso não seria possível sem o apoio e incentivo de diversas pessoas, às quais expresso minha sincera gratidão.

Primeiramente, agradeço a Deus, por me guiar em cada passo desta jornada acadêmica, dando-me forças e perseverança para superar os desafios. Sem Ele, nada seria possível.

À minha família, em especial à minha mãe, Zélia, ao meu pai, Alaerdes, a minha irmã, Priscila, e ao meu cunhado, Gabriel, por serem a base da minha vida. Minhas conquistas somente se tornam completas pois sei que tenho uma família para comemorá-las comigo. Ao meu companheiro Gustavo e sua família, agradeço a compreensão e apoio em todos os momentos.

Agradeço aos amigos, da faculdade e os que sempre foram presentes em minha vida, que sempre acreditaram em meu potencial, sem o suporte de vocês não conseguiria concluir esta etapa com tanto êxito.

Ao meu orientador Rodrigo Molini Leão, pela paciência, dedicação e valiosas contribuições que enriqueceram este trabalho. Suas orientações foram essenciais para o desenvolvimento deste estudo, e serei eternamente grata por todo o aprendizado.

Gostaria de expressar meu profundo agradecimento aos meus colegas de laboratório, Ana Clara Caetano Silva, Caio Arend Nunes e Luis Felipe Nascimento Costa, pela valiosa colaboração na realização dos experimentos moleculares e na coleta de dados.

Expresso também minha gratidão ao Professor Dr. Fábio Cardoso Cruz (EPM/UNIFESP), cujo apoio foi indispensável para a realização dos experimentos moleculares deste estudo.

Agradeço ao grupo PET Nutrição pela oportunidade de desenvolver minha pesquisa e pelo aprendizado de ser petiana. Vivenciei momentos inesquecíveis, construí várias amizades e ganhei outra família dentro da universidade, obrigada por tanto.

Agradeço também aos professores do curso de Nutrição pela partilha de conhecimento, que foi fundamental na construção da minha formação acadêmica e profissional.

À Universidade Federal de Uberlândia por ter me proporcionado tantos aprendizados, além de amadurecimento pessoal e profissional. Foi um sonho realizado ter cursado nutrição nessa instituição.

Muito obrigada!

Sumário

1	Introdução.....	9
1.1	Apresentação histórica do etanol.....	9
1.2	Epidemiologia do etanol.....	9
1.3	Mecanismo de ação do etanol.....	11
1.4	Neurobiologia da dependência de etanol.....	14
1.5	Influência do estresse na dependência de etanol	16
2	Hipótese.....	18
3	Objetivos	18
3.1	Objetivo geral	18
3.2	Objetivos específicos.....	18
4	Materiais e Métodos	18
4.1	Animais.....	18
4.2	Substâncias	19
4.3	Grupos experimentais	19
4.4	Etapas experimentais	20
4.5	Protocolo de estresse moderado intermitente imprevisível	21
4.6	Cronograma de estresses aplicados	21
4.7	Estresses aplicados	22
4.7.1	<i>Imobilização por restrição de movimento</i>	<i>22</i>
4.7.2	<i>Caixa moradia inclinada</i>	<i>22</i>
4.7.3	<i>Luzes acesas durante a noite</i>	<i>23</i>
4.7.4	<i>Luzes apagadas durante o dia</i>	<i>23</i>
4.7.5	<i>Privação de comida durante a noite.....</i>	<i>23</i>
4.7.6	<i>Nado forçado</i>	<i>23</i>
4.7.7	<i>Maravalha molhada durante o dia.....</i>	<i>24</i>
4.8	Consumo intermitente de livre-escolha de etanol.....	24
4.9	Teste de reexposição a droga (TRD)	25
4.10	Dissecação das regiões encefálicas em criostato	25
4.11	Extração do RNA e síntese do c-DNA e reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR)	25
4.12	Análise estatística	26
5	Resultados	27
5.1	Experimento 1: Consumo livre-escolha e preferência de etanol	27

5.1.1	Consumo livre-escolha e preferência de etanol 5%.....	27
5.1.2	Consumo livre-escolha e preferência de etanol 10%.....	28
5.1.3	Consumo livre-escolha e preferência de etanol 15%.....	29
5.1.4	Consumo livre-escolha e preferência de etanol 20%.....	30
5.1.5	Teste de reexposição a droga (TRD)	31
5.2	Experimento 2: efeitos do estresse sobre a ativação neuronal nos níveis de expressão dos genes do sistema endocanabinoide em resposta ao consumo de livre-escolha de etanol nas regiões: amígdala e núcleo intersticial da estria terminal (BNST)	32
5.2.1	Níveis de expressão de receptores CB1 e CB2 na amígdala	33
	Figura 13 : Níveis de expressão de receptores CB1 e CB2 na amígdala	34
5.2.2	Níveis de expressão de receptores CB1 e CB2 no BNST	34
	Figura 14 : Níveis de expressão de receptores CB1 e CB2 no BNST	34
6	Discussão.....	35
7	Considerações Finais.....	41
8	Trabalhos Futuros.....	42
9	Referências Bibliográficas	42
10	ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética na Utilização de Animais.....	48

1 Introdução

1.1 Apresentação histórica do etanol

O etanol tem sido usado como uma substância psicoativa ao longo de milênios e é amplamente difundido em várias culturas. Segundo evidências arqueológicas, o consumo de substâncias alcoólicas remonta aproximadamente ao ano de 6000 a.C., com práticas de produção de vinho na região do Cáucaso (MCGOVERN et al., 2017). A compreensão do etanol como uma substância divina está presente em várias narrativas mitológicas, provavelmente desempenhando um papel essencial na continuidade do hábito de consumo ao longo dos tempos (CEBRID, 2018).

Inicialmente, o teor alcoólico de bebidas como vinho e cerveja era mais suave devido ao seu processo de produção baseado exclusivamente na fermentação. Todavia, com a inserção da destilação na Europa durante a Idade Média, trazida pelos árabes, surgiram novas opções de bebidas alcoólicas destiladas, como cachaça, uísque e vodka (STANDAGE, 2005). Durante essa época, essas bebidas destiladas passaram a ser consideradas medicamentos para uma variedade de enfermidades, pois proporcionavam alívio rápido das preocupações e da dor, em comparação com o vinho e a cerveja. Esse uso medicinal contribuiu para a disseminação e aceitação social dessas bebidas alcoólicas destiladas (ARTIGUES, 2003).

A Revolução Industrial marcou um período de grande disponibilidade e acesso as bebidas alcoólicas, o que resultou em um aumento significativo no consumo de etanol (HANSON, 1995). Segundo o Centro de Informações sobre Saúde e Álcool (CISA), esse aumento na disponibilidade de bebidas alcoólicas contribuiu diretamente para o crescimento dos problemas associados ao consumo excessivo de álcool na população. Como consequência, mais indivíduos passaram a enfrentar problemas decorrentes desse abuso de etanol, refletindo-se em questões de saúde pública e social (CEBRID, 2018).

1.2 Epidemiologia do etanol

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o crescimento no acesso e na utilização do etanol tem desencadeado riscos substanciais para a saúde global, emergindo como um fator preponderante nos desafios de saúde pública, enquanto também exerce

impactos sociais e econômicos significativos nas comunidades. O abuso de álcool é um contribuinte para cerca de 5% de todas as fatalidades no mundo, conforme relatado pela OMS em 2019 (WHO, 2019).

As informações fornecidas pelo Relatório Global sobre Álcool e Saúde da OMS de 2019 revelam um quadro alarmante: mais de 2 bilhões de pessoas com idade superior a 15 anos consumiram álcool no ano anterior, representando cerca de 43% da população mundial. Ademais, o relatório destaca que aproximadamente 40% dos jovens entre 15 e 19 anos já experimentaram álcool pelo menos uma vez (WHO, 2019).

De acordo com o III Levantamento Nacional sobre o Uso de Drogas pela População Brasileira (LNUD), realizado pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), em 2017, aproximadamente 101,6 milhões de pessoas, ou seja, 66,4% da população entre 12-65 anos, fizeram o uso de bebidas alcoólicas pelo menos uma vez na vida, sendo que 25,3 milhões fizeram o uso de etanol em grande quantidade por um curto período de tempo (BASTOS, 2017).

Além disso, o mesmo levantamento revelou que 2,3 milhões de pessoas atendiam aos critérios para dependência de álcool, evidenciando um número crescente de indivíduos com problemas relacionados ao uso de etanol, sendo um fator que agrava o desenvolvimento da dependência (BASTOS et al., 2017).

A dependência do álcool, comumente conhecida como alcoolismo, é uma condição complexa e crônica que afeta milhões de pessoas mundialmente, sendo definida como uma doença crônica e multifatorial. De acordo com a Classificação Internacional de Doenças (CID-11) da OMS, o distúrbio devido ao uso de álcool é denominado como um padrão de consumo prejudicial que leva a consequências comportamentais, cognitivas e fisiológicas significativas. Esse distúrbio reflete um conjunto multifacetado de sintomas, incluindo dificuldades em controlar o uso, priorização do consumo em detrimento de outras atividades e persistência no uso mesmo diante de efeitos adversos, com impacto substancial na saúde e na qualidade de vida dos indivíduos afetados (WHO, 2022).

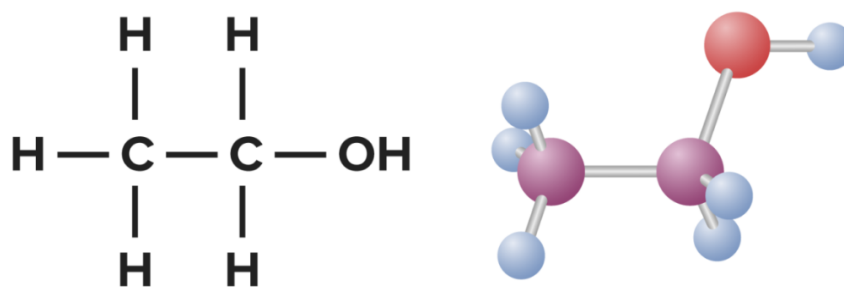
A dependência surge por condições de vulnerabilidade e suscetibilidade do indivíduo, ocasionadas por fatores internos ou externos, como forma de recompensa ou fuga da realidade (LOPES et al., 2015). Além disso, o uso de etanol representa um importante desafio para a saúde pública, tornando-se essencial compreender os mecanismos neurais ligados à dependência desse composto a fim de desenvolver

abordagens terapêuticas inovadoras para sanar os entraves relacionados ao uso da substância (LEME, 2022).

1.3 Mecanismo de ação do etanol

O álcool etílico encontrado em bebidas alcoólicas é quimicamente classificado como etanol, consiste em uma cadeia de dois carbonos e um grupo hidroxila (-OH) (figura 01). Estas características conferem um perfeito equilíbrio hidrofílico-hidrofóbico que, aliado ao baixo peso da molécula, garante uma imensa capacidade de difusão e distribuição em todos os fluidos e tecidos corporais, favorecendo a sua partição no Sistema Nervoso Central (SNC) (MUKHERJEE et. al., 2013; COSTARDI et al., 2015).

Figura 1: Fórmula molecular e arranjo molecular do álcool



Fonte : Plataforma Lecturio, site de cursos online.

No SNC, o etanol tem efeito depressor, exercendo sua ação em diversos sistemas de neurotransmissão, membranas celulares e proteínas, resultando em uma série de modificações biológicas e comportamentais (MUKHERJEE, 2013; COSTARDI et al., 2015), sua atividade parece estar relacionada, entre outros fatores, à sua capacidade de intensificar a neurotransmissão GABAérgica e diminuir a glutamatérgica (COSTARDI et al., 2015; KOOB, 2013). A ativação dessas vias desencadeia uma série de adaptações que envolvem a liberação de hormônios, estimulação do sistema simpático, mudanças na atividade renal e modificações no comportamento, restabelecendo dessa forma o equilíbrio dos fluidos corporais (GRISÓLIA, 2014).

A interação do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA) com os receptores ionotrópicos GABA-A leva ao influxo de íons cloreto, resultando em

hiperpolarização neuronal e consequentemente na inibição da atividade do neurônio (ROBERTO et. al., 2017; OLSEN et. al., 2017).

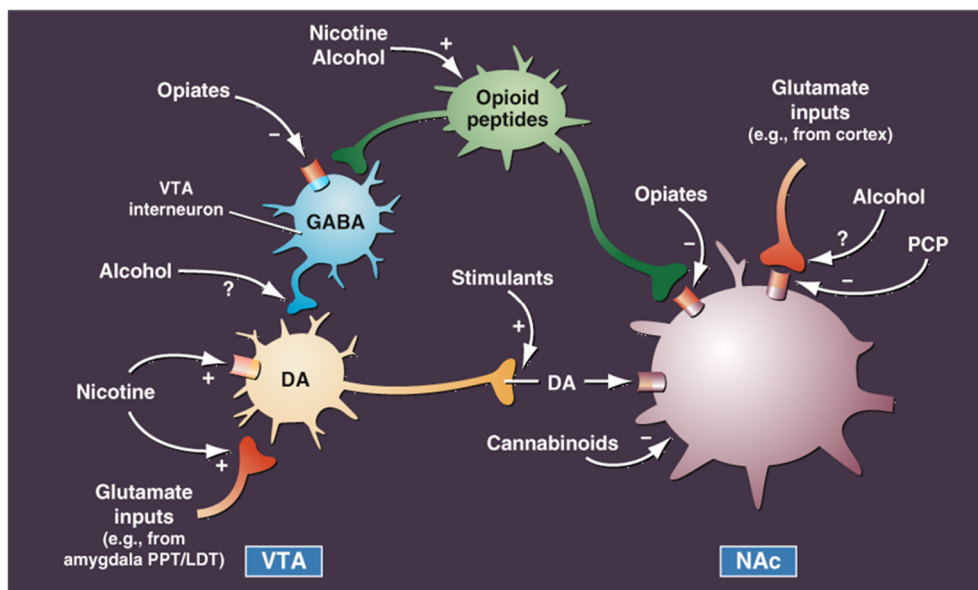
A exposição ao etanol pode atuar como um modulador alostérico positivo dos receptores GABA-A ou aumentar a liberação de GABA em determinadas áreas do cérebro, dependendo da dose (ABRAHAO et al., 2017; COSTARDI et al., 2015; OLSEN, 2017), como é o caso da amígdala basolateral (SILBERMAN, 2012).

No que diz respeito à supressão da neurotransmissão glutamatérgica, o etanol exerce sua principal influência através da redução da atividade dos receptores glutamatérgicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). Estes receptores facilitam a entrada de cátions para dentro da célula, resultando em despolarização neuronal e consequente ativação do neurônio. Portanto, ao inibir esses receptores, a exposição aguda ao etanol resulta na diminuição da transmissão excitatória (HOFFMAN et al., 1989; LIMA-LANDMAN; ALBUQUERQUE, 1989; MORRISETT; SWARTZWELDER, 1993).

O etanol não apenas influencia os sistemas de neurotransmissão GABAérgica e glutamatérgica, mas também pode interferir em outros sistemas essenciais, como o dopaminérgico, serotoninérgico e opioide, entre outros (ABRAHAO et al., 2017). Esta ampla gama de influências neuroquímicas destacam a complexidade dos efeitos do álcool etílico no encéfalo e no corpo humano, atuando nas vias neuronais. Essas interações complexas com diversos neurotransmissores podem contribuir significativamente para os efeitos neurocomportamentais observados durante o consumo de álcool etílico (ABRAHAO et al., 2017).

Assim como outras substâncias psicotrópicas, etanol provoca efeitos recompensadores que motivam o comportamento de busca e consumo da droga. Esses efeitos resultam da influência direta ou indireta do etanol no sistema mesocorticolímbico, também conhecido como sistema de recompensa (BATISTA et al., 2013).

Figura 2 – Ativação do Sistema de Recompensa



Fonte: NESTLER,2005

Esse sistema é composto por corpos celulares de neurônios dopaminérgicos localizados na área tegmental ventral (VTA), os quais projetam suas conexões para diversas regiões límbicas, como córtex pré-frontal (CPF) medial, núcleo accumbens (NAc), tálamo, hipotálamo, amígdala e hipocampo (NESTLER, 2001).

A ativação desse sistema pelo etanol resulta na liberação de dopamina no NAc. Um dos mecanismos pelos quais o etanol pode ativar esse sistema é através da inibição da atividade GABAérgica, como falado anteriormente, ocorrendo pela ligação do etanol aos receptores GABA-A (KOOB, 2013). Esses receptores estão presentes na área VTA, nos corpos celulares dos interneurônios GABAérgicos, os quais modulam a ativação dos neurônios dopaminérgicos. Dessa forma, a inibição GABAérgica nos neurônios dopaminérgicos na VTA é interrompida, resultando no aumento da liberação de dopamina no NAc e em outras regiões límbicas (GILPIN; KOOB, 2008).

De acordo com Robinson e Berridge (1993, 2001), a dopamina desempenha um papel na mediação da sensação de prazer, regulando também o impulso motivacional e a atenção a estímulos, incluindo aqueles com propriedades reforçadoras. A sensibilização é um fenômeno que torna os estímulos, como o uso da droga e comportamentos relacionados, atrativos e desejados. Esse processo resulta em um aumento patológico da importância que o SNC atribui ao ato de consumir a substância, contribuindo para o desenvolvimento do desejo intenso pela droga e, conseqüentemente, para o comportamento compulsivo associado ao seu consumo (ROBINSON; BERRIDGE, 2001).

Ao abordar os mecanismos subjacentes à sensibilização e ao desenvolvimento da dependência de drogas, torna-se evidente que tanto a dopamina quanto a sinalização endocanabinóide desempenham papéis significativos (RIBEIRO, 2002). Enquanto a dopamina regula o impulso motivacional e a atenção a estímulos reforçadores, a sinalização endocanabinóide, mediada pelos receptores canabinoides do tipo 1 (CB1R), desempenha um papel crucial no *feedback* negativo não genômico do HHA. No hipotálamo, os glicocorticoides se unem aos receptores glicocorticoides pós-sinápticos de membrana, desencadeando uma via de sinalização intracelular que resulta na produção de endocanabinóides (DI et al., 2003).

Esses endocanabinóides funcionam como mensageiros retrógrados e, ao serem liberados na fenda sináptica, retroativamente se conectam aos receptores CB1R, também acoplados às proteínas G inibitórias, presentes nos terminais de neurônios glutamatérgicos pré-sinápticos. Esse processo resulta na inibição da liberação de glutamato no hipotálamo, diminuindo, conseqüentemente, a atividade excitatória nessa região e, por conseguinte, a secreção de glicocorticoides pelo córtex das glândulas adrenais. Dessa forma, o bloqueio farmacológico dos receptores CB1R intensifica tanto a liberação de glicocorticoides provocada por um estressor quanto a atividade neuronal no hipotálamo (BEDSE et al., 2020).

Assim sendo, os receptores CB1R também têm um papel significativo nas respostas ao estresse, e exposições prolongadas a estressores parecem alterar os níveis de expressão desses receptores no cérebro (ROMANO-LÓPEZ et al., 2012). Esta influência neurobiológica, por sua vez, pode estar intrinsecamente ligada às alterações comportamentais induzidas pelo estresse.

1.4 Neurobiologia da dependência de etanol

A exposição crônica ao etanol ou a outras substâncias psicoativas de abuso pode desencadear neuroplasticidades (ZALESKI et al., 2004). Essas alterações podem resultar na sensibilização dos efeitos das drogas, o que pode contribuir para a progressão do uso ocasional das substâncias para o desenvolvimento da dependência (LOHESWARAN et al., 2017).

Segundo a Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas (SENAD), diversas áreas do SNC têm envolvimento direto no desenvolvimento da dependência das substâncias

psicoativas. A via mesocorticolímbica, também conhecida como a via de recompensa, é formada pela VTA que projeta neurônios dopaminérgicos para o NAc e CPF, e desempenha um papel crucial na regulação e modulação do comportamento motivado, tornando-a especialmente suscetível às adaptações induzidas pelo consumo repetido de drogas (FORMIGONI et al., 2016). Essa sensibilização neuroadaptativa pode contribuir para a compulsão pela busca e pelo consumo de substâncias, perpetuando assim o ciclo vicioso da dependência (DAY et al., 2007;).

A amígdala basolateral é outra região muito importante no desenvolvimento da dependência e parece ter interação direta com o sistema mesocorticolímbico (FORMIGONI et al., 2016). Ela desempenha um papel central no processamento das emoções e na regulação das respostas ao estresse e além do mais, está envolvida na avaliação e na resposta a estímulos emocionais, incluindo aqueles que são percebidos como ameaçadores ou estressantes (ROOZENDAAL et al., 2009).

Por outra via, o BNST também tem um papel importante na maneira em que o corpo responde ao estresse, além de influenciar nas emoções e na regulação da ansiedade, particularmente em interações com o hipotálamo e outras estruturas límbicas (DAGUE et al., 2018). Além disso, pesquisas indicam que a região também está relacionada a comportamentos associados ao uso de substâncias, como a busca por recompensas, desempenhando uma função crucial em como o organismo responde ao etanol, particularmente no circuito de recompensa mesocorticolímbico (KOOB; VOLKOW, 2010).

O estresse pode ser definido como uma reação do organismo a forças deletérias e que, geralmente, se manifestam por alterações neuroendócrinas ou adrenocorticais. Estudos indicam que a principal fonte de estresse para os seres humanos apresenta uma natureza social (MARTINEZ et al., 1998).

Uma pesquisa realizada com trabalhadores de uma universidade pública de São Paulo para relacionar o uso de substâncias ao estresse, mostrou que 15% dos trabalhadores apresentavam problemas como absenteísmo e licenças médicas atribuídas ao uso de álcool etílico e/ou outras drogas, e 18% por depressão e estresse. Observou-se, ainda, um risco aumentado para a ocorrência de acidentes no ambiente de trabalho entre esse grupo (CARMO et al., 2020).

Nesse contexto, mundialmente, entre 20 e 25% dos acidentes de trabalho foram associados diretamente às pessoas que estavam sob o efeito de algum tipo de substância. Além disso, 3% a 5% da população dos trabalhadores apresentavam critério de

diagnóstico da Síndrome de Dependência Alcoólica (SDA), atrelada às consequências nos ambientes de trabalho, como atrasos, conflitos interpessoais, baixa produtividade, pressão sobre os colegas de trabalho, ambiente de insegurança (violência, possíveis furtos e roubos) e custos com demissões e indenizações (CARMO et al., 2020).

Quando aplicamos esse contexto ao reino animal, podemos observar a influência do estresse na vida dos roedores, pois são expostos a diversas situações que podem desencadear essa condição, como separação materna precoce, disputas por território, isolamento social, entre outras (GIRARDI, 2011).

O estresse pode ser classificado de dois tipos: o estresse mental, o qual pode ser desencadeado pelo meio-ambiente hostil ou não familiar; e o estresse físico ou participatório, que pode ser causado por técnicas de contenção, anestésicos ou cirurgias (MESQUITA, 2009).

No presente experimento feito utilizou o estresse físico induzido, onde foram feitas sessões de estresse de nível moderado para obtermos os dados do estudo.

1.5 Influência do estresse na dependência de etanol

A dependência do álcool etílico é influenciada por uma interação complexa de fatores genéticos, neurobiológicos, psicológicos e ambientais. A exposição repetida ao álcool pode levar a adaptações no SNC, resultando em tolerância, sensibilização e mudanças na regulação dos neurotransmissores (LOHESWARAN et al., 2017). Além disso, fatores ambientais, como o acesso fácil ao álcool etílico e a influência cultural, desempenham um papel significativo no desenvolvimento e na manutenção da dependência (SOUSA, 2017).

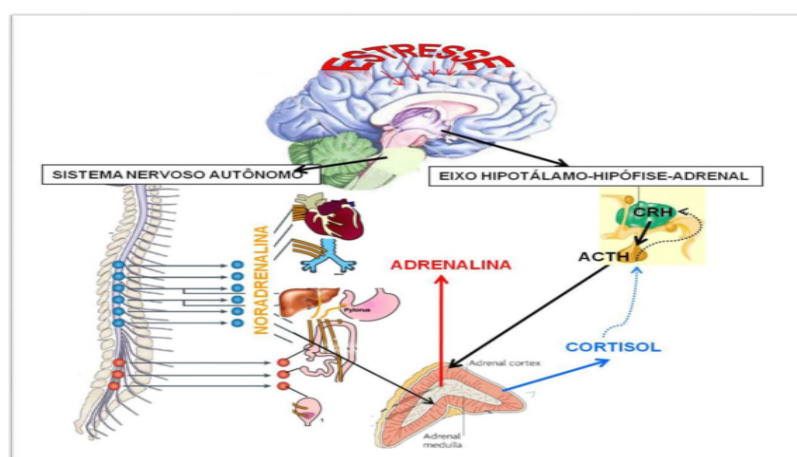
A transição do consumo ocasional de álcool etílico para a dependência é um processo intrincado que pode ser influenciado por diversos elementos, sendo os fatores ambientais um dos mais relevantes (GUIMARÃES et al, 2010).

Ambientes que facilitam o acesso e a disponibilidade do álcool etílico podem aumentar o risco de desenvolvimento da dependência (ROZIN et al., 2012). Isso abrange não apenas a presença física de bebidas alcoólicas, mas também as normas sociais que toleram ou até mesmo incentivam o consumo excessivo de álcool. Além disso, situações de estresse, influência social e eventos traumáticos podem desempenhar um papel crucial

nessa transição, afetando as escolhas e comportamentos relacionados ao álcool (SOUSA, 2017).

As respostas fisiológicas primárias a um estressor envolvem a ativação do sistema nervoso autônomo simpático e a ativação do eixo HHA (*Figura 2*). A resposta do eixo HHA ao estresse é iniciada pela secreção do fator liberador de corticotrofina (CRF) pelo núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN). O CRF age na glândula hipofisária, estimulando a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que atua no córtex das glândulas adrenais para induzir a liberação de glicocorticoides na corrente sanguínea: o cortisol, em humanos, e a corticosterona, em roedores (MATHEWS et al., 2008).

Figura 3 – Sistema Nervoso Autônomo e Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal



Fonte: ZUARDI, 2014

Os glicocorticoides, hormônios esteroides, exercem impacto em várias células do organismo e desempenham um papel fundamental na mobilização de recursos energéticos em reação a situações estressantes. Além disso, desempenham papéis vitais em diversos sistemas, como o cardiovascular, imunológico e neural. A maioria dos efeitos biológicos desses hormônios ocorrem por meio de interações genômicas, nas quais eles se ligam aos receptores intracelulares mineralocorticoides (MR) e glicocorticoides (GR) (GROENEWEG et al., 2012).

Esses dois tipos de receptores apresentam diferenças em relação à afinidade pelos ligantes e à distribuição no corpo. O receptor MR possui uma afinidade maior pelos glicocorticoides, o que significa que a maioria dos MRs estão ocupados mesmo em concentrações baixas de hormônio. Por outro lado, os receptores GRs, são ativados em resposta a níveis elevados de glicocorticoides, como aqueles observados após um evento estressor (JOËLS, 1994).

Em termos de localização no cérebro, o GR é mais amplamente distribuído, com níveis significativos no hipocampo, amígdala, núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN) e córtex pré-frontal, enquanto isso o MR é predominantemente encontrado em áreas límbicas, como o hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal (GJERSTAD et al., 2018).

2 Hipótese

Esta pesquisa propõe a hipótese de que a exposição aguda ao estresse em camundongos pode ativar conjuntos neuronais relacionados ao consumo de etanol, o que possivelmente leva à recaída no uso dessa substância. Além disso, investiga-se a possibilidade de que essa exposição ao estresse provoque alterações na expressão gênica na região da amígdala.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

O objetivo do estudo foi analisar a participação do sistema endocanabinóide da amígdala na interação entre a exposição de estresse intermitente variado e o consumo voluntário de etanol em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar se a exposição dos animais ao protocolo de estresse intermitente variado causa alteração no consumo voluntário de etanol;
- Analisar se a exposição dos animais ao protocolo de estresse intermitente variado e o consumo voluntário de etanol altera a expressão dos receptores CB1 e CB2, nas regiões da amígdala e do BNST.

4 Materiais e Métodos

4.1 Animais

Foram utilizados 28 camundongos machos da espécie C57BL/6J (Peso: 20-30g, 3 semanas), fornecidos pela Rede de Biotérios de Roedores (REBIR/UFU). O protocolo

experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA/UFU) número SEI 23117.081886/2022-96.

Os animais foram alojados em grupos de 4 a 5 animais, na sala de alojamento do biotério com ciclo de luz controlado (claro/escuro 12hs/12hs), temperatura controlada ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$), alimentação e ingestão hídrica *ad libitum*, e permanência em gaiolas-moradia (mini isoladoras) de 17cm de largura x 27 cm de comprimento x 12,5 cm de altura nos padrões ambientais estabelecidos acima, com fluxo de ar puro, ventiladas por exaustão, permitindo assim uma proteção aos animais contra agentes contaminantes. Os procedimentos experimentais seguiram as orientações dos "Princípios de Cuidados com Animais de Laboratório" segundo a Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório (SBCAL).

Figuras 4: Ilustração do modelo de estante, identificação e gaiola utilizada no alojamento dos animais.



Legenda: Autoria do autor (2024). Em (A) observa-se a rack ventilada na qual os animais são alojados; (B) a etiqueta com identificação e (C) o microisolador.

4.2 Substâncias

Durante as exposições foi utilizado Etanol (Sigma-Aldrich, 95% v/v, St. Louis, MO, EUA) diluído em água nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20% (v/v). No momento que antecedeu a eutanásia foi utilizado Isoflurano 4% via inalatória.

4.3 Grupos experimentais

Os camundongos foram criados e mantidos no biotério de experimentação animal REBIR/UFU e foram entregues com 3 semanas da vida, sendo assim, separados para o

experimento e alojados em grupos de 3 a 4 animais nas gaiolas-moradia, permanecendo assim durante todo o protocolo de estresse e em conjunto com a divisão, foi estabelecido:

- Grupo Controle;
- Grupo Estressado.

Após essa fase inicial, os camundongos foram habituados a duas semanas de manipulação apenas para a troca das caixas, realizada duas vezes por semana. Após esse período, deram-se início aos procedimentos experimentais específicos para cada grupo. Os animais foram divididos em dois grupos: grupo controle (7 animais) e grupo estresse (7 animais).

4.4 Etapas experimentais

O experimento foi dividido em 6 etapas:

Tempo (T) 0: Solicitação dos animais;

T01: Separação e identificação dos animais em grupos;

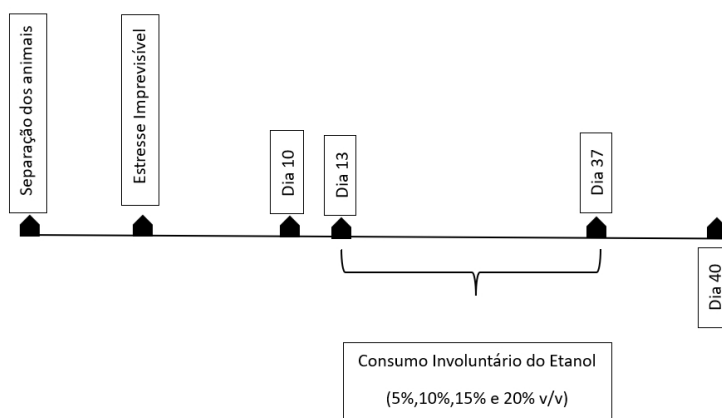
T02: Início do cronograma de estresse seguindo o Protocolo de Estresse Moderado Intermitente Imprevisível ;

T03: Consumo Voluntário de Etanol diluído em água nas concentrações de 5, 10, 15 e 20% (v/v)., sendo ofertado três vezes na semana;

T04: Teste de Reexposição após 3 dias da última oferta de Etanol na concentração de 20% (v/v);

T05: No final dos testes foi realizada a eutanásia dos animais e a coleta dos encéfalos para análise.

Figura 5: Ilustração do Cronograma Experimental



Fonte: Criado pelo autor (2024)

4.5 Protocolo de estresse moderado intermitente imprevisível

O protocolo de estresse moderado intermitente imprevisível consistiu na exposição a diferentes estressores duas vezes por dia, durante um período de 10 dias (Dia 1 ao Dia 10). O grupo controle não foi submetido a nenhum tipo de estresse, exceto pela troca/limpeza das gaiolas.

Os tipos de estressores utilizados, foram selecionados a partir da literatura de estudos relacionados com o presente projeto (Leão et al., 2012; Mullingan et al., 2019; Santos-Rocha et al., 2018; Sircar, 2020), são eles:

- Nadar em água temperatura ambiente (20°C - 25°C) durante o dia por 5 minutos;
- Privação de comida durante a noite por 12 horas;
- Caixa moradia inclinada durante o dia por 1 (uma) hora;
- Maravalha molhada durante o dia por 1 (uma) hora;
- Imobilização durante o dia por 1 (uma) hora;
- Luzes acesas durante a noite por 12 horas;
- Luzes apagadas durante o dia por 2 horas.

4.6 Cronograma de estresses aplicados

Tipos de estresse que os animais foram expostos diariamente por 10 dias:

Tabela 1: Tipos de Estresses

DIAS	TIPO 1	TIPO 2
1	Imobilização	Maravalha Molhada
2	Caixa Moradia Inclinada	Luzes Apagadas durante o Dia
3	Luzes Acesas durante a Noite	Nado Forçado
4	Privação de Comida	Imobilização
5	Nado Forçado	Caixa Moradia Inclinada
6	Luzes Acesas durante a Noite	Privação de Comida
7	Imobilização	Maravalha Molhada
8	Caixa Moradia Inclinada	Luzes Apagadas durante o Dia
9	Imobilização	Nado Forçado
10	Maravalha molhada	Privação de Comida

Fonte: Criada pela autora (2024).

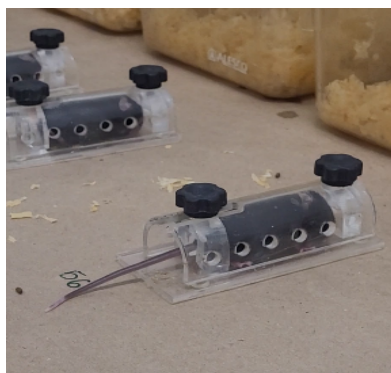
4.7 Estresses aplicados

4.7.1 *Imobilização por restrição de movimento*

Nesse procedimento, os animais foram colocados dentro de contêntores de acrílico (6-7 cm de diâmetro com 12 cm de largura) com respiradouro para sua contenção, tendo assim, seus movimentos impedidos, sendo permitido apenas avançar somente para frente e para trás dentro do tubo, sem conseguir virar a cabeça ou movimentar a cauda, experimentando assim uma situação de restrição de movimento.

O procedimento teve a duração de 1 (uma) hora e ocorreu durante o dia (fase clara do ciclo circadiano do animal).

Figura 6: Ilustração da Imobilização



Fonte: Autoria do autor (2024).

4.7.2 *Caixa moradia inclinada*

Nesse procedimento, a caixa moradia dos animais foi posicionada inclinada em 45° graus, mantendo assim os animais em plano inclinado. O procedimento teve a duração de 1 (uma) hora e ocorreu durante o dia (fase clara do ciclo circadiano do animal).

Figura 7: Ilustração do Procedimento



Fonte: Autoria do autor (2024)

4.7.3 *Luzes acesas durante a noite*

Nesse procedimento, os animais foram mantidos nas gaiolas moradias dentro de uma sala com as luzes acesas. O procedimento do ciclo claro teve a duração de 12 horas e ocorreu durante a noite (fase escura do ciclo circadiano do animal).

4.7.4 *Luzes apagadas durante o dia*

Nesse procedimento, os animais foram mantidos nas gaiolas moradias dentro de uma sala com as luzes apagadas. O procedimento do ciclo escuro teve a duração de 2 horas e ocorreu durante o dia (fase clara do ciclo circadiano do animal).

4.7.5 *Privação de comida durante a noite*

Nesse procedimento, toda a ração foi retirada da gaiola dos animais, restringindo assim, a sua alimentação. Após o procedimento, a ração foi recolocada nas gaiolas e os animais tiveram livre acesso ao alimento. O procedimento teve a duração de 12 horas e ocorreu durante a noite (fase escura do ciclo circadiano do animal).

4.7.6 *Nado forçado*

Os animais foram colocados separadamente em um aparato/recipiente com água fria (temperatura ambiente) proveniente das torneiras do REBIR /UFU.

No aparato, o nível da água não permitiu que a cauda ou patas do animal tocassem no fundo exigindo que ele nadasse forçadamente. Após o procedimento, os animais foram secos com uma flanela seca e colocados sob luz aquecedora por 30 minutos. O

procedimento teve a duração de 5 minutos e ocorreu durante o dia (fase clara do ciclo circadiano do animal).

Figura 8: Ilustração do Nado Forçado



Fonte: Autoria do autor (2024)

4.7.7 *Maravalha molhada durante o dia*

Nesse procedimento, a caixa moradia dos animais foi molhada com água fria (temperatura ambiente) proveniente das torneiras do REBIR/UFU, sendo adicionado 200 ml de água para cada 100 g de maravalha. Após o procedimento, os animais foram alocados em outra caixa moradia com maravalha seca. O procedimento teve a duração de 1 (uma) hora e ocorreu durante o dia (fase clara do ciclo circadiano do animal).

4.8 Consumo intermitente de livre-escolha de etanol

Os animais foram inseridos individualmente em gaiolas contendo duas garrafas, uma contendo água e outra contendo solução de etanol, durante 2h, três vezes por semana (às segundas, quartas e sextas-feiras), durante 4 semanas (Dia 13 ao Dia 37).

A concentração da solução de etanol foi alterada de forma progressiva, sendo aumentada a cada semana (3 dias) de exposição (5, 10, 15 e 20% v/v). Então, os animais passaram por 3 dias (Dias 37, 38 e 39) nos quais não foram expostos ao etanol (fase de retirada da droga). Após isso, foram novamente expostos a 1 (uma) sessão de consumo de livre-escolha entre água e etanol a 20% (Dia 40), durante 1h (teste de reexposição a droga - TRD).

Nos dias em que não foram expostos ao etanol, os animais permaneceram em suas gaiolas-moradia, com seus irmãos de ninhada. A posição das garrafas foi alternada para evitar viés de escolha devido à posição. As garrafas de água e solução de etanol foram pesadas antes e após a apresentação aos animais para cálculo da quantidade de substância ingerida (em g de etanol / kg de peso corporal) e da porcentagem de preferência pela solução de etanol. A quantidade de água ou etanol perdida devido a vazamento foi aferida através de uma garrafa inserida em gaiola vazia (branco). Esse protocolo foi baseado no descrito por Hwa et al., 2011.

4.9 Teste de reexposição a droga (TRD)

Após o fim dos dias de exposição à droga, os animais passaram por um período de 3 dias consecutivos de retirada do etanol, durante o qual não foram expostos à droga, sendo deixados em suas gaiolas-moradia. Após a retirada, os animais foram reexpostos à condição de livre-escolha entre água e etanol 20% por 1 hora. Foram calculadas as médias do consumo de etanol e da preferência pela solução de etanol, para cada etapa do protocolo, durante os 30 primeiros minutos e 1 hora. Esse protocolo foi baseado no descrito por Hawa et al., 2011.

4.10 Dissecção das regiões encefálicas em criostato

Imediatamente após o TRD os animais foram eutanasiados, sendo coletados seus encéfalos e colocados em nitrogênio líquido. Os encéfalos foram seccionados no criostato, sob temperatura de -19 a -23°C seguindo as coordenadas do atlas para camundongos de (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). As regiões da amígdala e BNST foram dissecadas por meio de agulhas de ponta chata de 14 -16 gauge e colocada em criotubos. Os tubos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C, para posterior análise da expressão gênica por RT-PCR.

4.11 Extração do RNA e síntese do c-DNA e reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR)

Após a preparação do homogenato da amígdala e BNST, utilizou-se a técnica de pré-amplificação multiplex, descrita previamente por Liu et al. (2014). Inicialmente, as

amostras foram transferidas para um tubo com 50 µL de tampão de extração do PicoPure RNA isolation kit (Arcturus Bioscience) e foram lisadas com auxílio de micropipetas de 10 µL. Em seguida, realizou-se uma incubação a 42°C por 30 minutos. A suspensão foi centrifugada a 1000xg a 4°C por 2 minutos, e o sobrenadante foi coletado para o isolamento do RNA. O RNA foi filtrado em colunas, lavado e eluído conforme as recomendações do kit (PicoPure RNA isolation).

Fitas simples de cDNA foram sintetizadas com o Kit Superscript III first strand cDNA synthesis (Invitrogen, Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. O Kit TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies) foi utilizado para a pré-amplificação do cDNA. Utilizou-se 80 nM de primers para alvos específicos, e então, 2 µL de cada cDNA foram misturados com 5,5 µL de primers e 7,5 µL da solução de TaqMan PreAmp Master Mix 2x concentrada.

Os cDNAs foram pré-amplificados em um termociclador utilizando a seguinte programação: 95°C por 10 minutos; 14 ciclos de desnaturação a 90°C por 15 segundos; ciclo de anelamento e extensão a 60°C por 4 minutos. Os produtos de PCR foram diluídos 5 vezes com água de padrão de biologia molecular e armazenados a -20°C. O ensaio de RT-PCR duplex foi realizado em duplicata utilizando uma sonda marcada com FAM para cada gene alvo (FAAH, MAGL, CB1 e CB2) e outra marcada com VIC para o gene controle (Pde10a). Para esse ensaio, foi utilizado o kit TaqMan Advanced Fast PCR Master Mix (Life Technologies). Pde10a foi utilizado, pois esse gene é relativamente abundante e não foi alterado em experimentos de reinstalação da autoadministração de drogas induzida pelo contexto (Rubio et al., 2015). O ensaio foi realizado utilizando a seguinte programação: 95°C por 20 segundos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 3 segundos, anelamento e extensão a 60°C por 30 segundos. A expressão relativa obtida dos valores de Ct foi calculada utilizando a seguinte fórmula: $\Delta Ct = Ct(\text{gene alvo}) - Ct(\text{Pde10a})$.

4.12 Análise estatística

As análises foram conduzidas utilizando o software GraphPad Prism versão 8.1, que permitiu a geração dos gráficos com os dados experimentais. Para a análise dos dados de ingestão intermitente voluntária de etanol, foi aplicado o teste T de Student para amostras independentes, considerando como fatores a exposição ao estresse (grupo

estresse vs. grupo controle) e o consumo de etanol como medida repetida ao longo do tempo. A análise dos valores de expressão gênica na região da amígdala foi realizada também utilizando o teste T de Student, com a comparação entre os grupos estresse e controle.

5 Resultados

5.1 Experimento 1: Consumo livre-escolha e preferência de etanol

Delineamento: Recebemos os animais com 3 semanas de vida e na semana 5, os mesmos foram expostos ao protocolo estresse moderado intermitente imprevisível (grupo estresse; n= 14) ou foram mantidos agrupados em suas gaiolas moradias sem manipulação, exceto para limpeza das gaiolas (grupo controle; n=14). Os animais do grupo estresse foram expostos a diferentes estressores, duas vezes por dia durante 10 dias consecutivos. Os tipos de estressores utilizados foram selecionados e escolhidos conforme descrito no item 4.5. Ao final dos 10 dias de estresses, os camundongos foram avaliados em sessões-teste de consumo intermitente de livre-escolha de etanol (item 4.8) e após o fim dessas sessões, foram reexpostos a droga por 1 hora (item 4.9). Foi avaliado o impacto do estresse sobre o comportamento de consumo de etanol em camundongos ao longo de um período total de 120 minutos por sessão. Além de analisar o consumo cumulativo ao final desse período, o consumo foi detalhadamente investigado em três intervalos de tempo: 0-30 minutos, 30-60 minutos e 60-120 minutos. As soluções de etanol foram fornecidas aos animais em concentrações crescentes: 5%, 10%, 15% e 20% (m/v) , sendo elevada a concentração a cada dois dias de consumo.

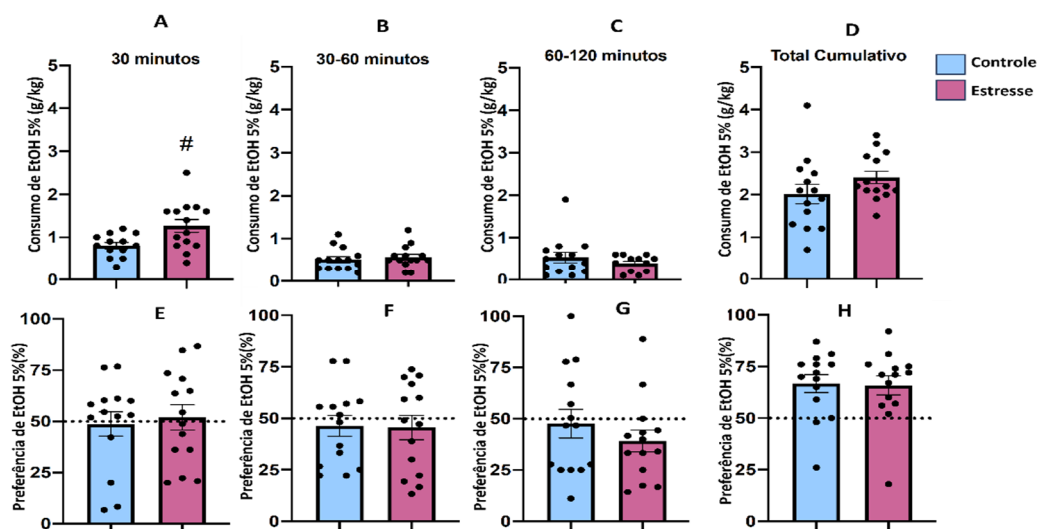
5.1.1 Consumo livre-escolha e preferência de etanol 5%

Consumo de Etanol 5%: Para avaliar o impacto do estresse sobre o consumo involuntário de etanol em camundongos, foram realizados Testes T de Student para amostras independentes. Nos primeiros 30 minutos de exposição à solução de etanol a 5%, o grupo estressado apresentou um aumento significativo no consumo da substância em comparação ao grupo controle [$T(25) = 2,6$; $p = 0,014$]. No entanto, essa diferença não se manteve nos intervalos subsequentes. Ao analisar o consumo nos períodos de 30-

60 minutos e 60-120 minutos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Figura 9A, 9B e 9C).

Preferência de Etanol 5%: Em relação à preferência pelo etanol, não houve diferenças significativas entre os grupos nas diferentes janelas de tempo (Figura 9E,9F,9G), coincidindo com a preferência total (9H) dos grupos que apresentaram valores de preferência próximos a 60.

Figura 9: Consumo e Preferência de EtOH 5%



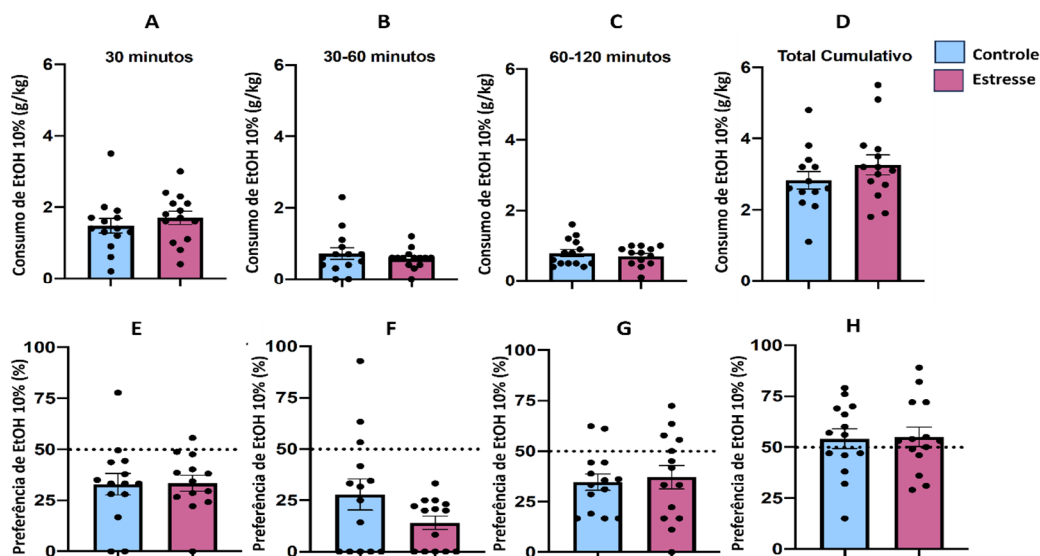
Legenda: Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) do consumo de etanol 5% (g/kg) durante as exposições à droga em 30 minutos (A), 30-60 minutos (B) e 60-120 minutos (C), e o total cumulativo consumido em 120 minutos (D); Preferência de etanol 5% a água, sendo a proporção entre a ingestão de álcool e a ingestão total de fluidos, em 30 minutos (E), 30-60 minutos (F) e 60-120 minutos (G), e o total da preferência cumulativa nos 120 minutos (H). # $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle (n = 12-14 animais/grupos).

5.1.2 Consumo livre-escolha e preferência de etanol 10%

Consumo de Etanol 10%: Na concentração de 10% de EtOH, embora a análise estatística pelo teste T de Student não tenha revelado uma diferença significativa, observou-se uma evidência sugestiva de maior consumo de álcool pelo grupo estressado nos primeiros 30 minutos e no total cumulativo (Figura 10A, 10D). Entretanto, nos gráficos 10B e 10C essa evidência não se manteve, e também não foram observadas diferenças estatísticas no consumo de álcool entre os grupos.

Preferência de Etanol 10%: Apesar do grupo estressado apresentar uma evidência sugestiva em preferir a droga nos momentos de 30 minutos, 30-60 minutos e 60-120 minutos (Figura 10E,10F e 10G) esta não foi significativa, sendo constatado no final do consumo cumulativo (Figura 10H) essa semelhança, próximo aos 50% de consumo.

Figura 10: Consumo e Preferência de EtOH 10%



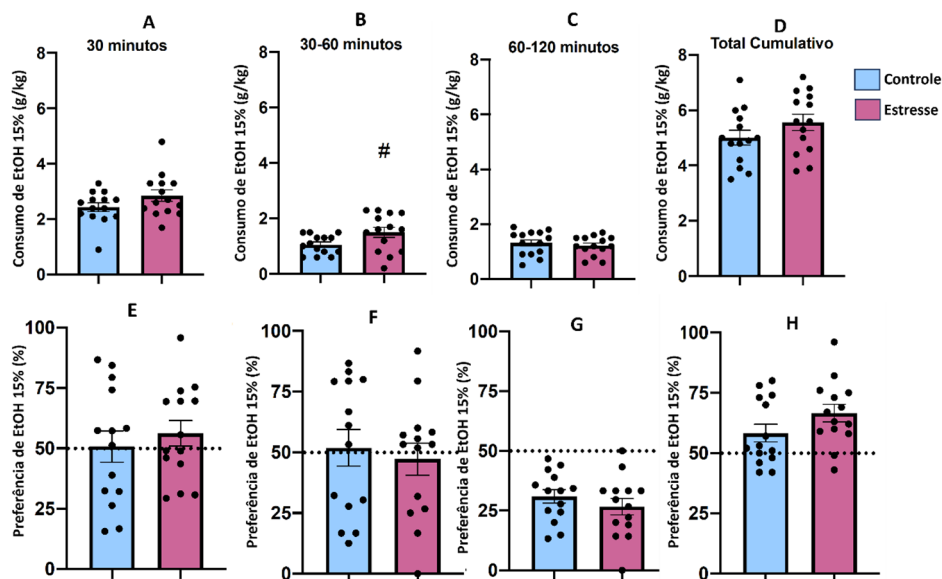
Legenda: Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) do consumo de etanol 10% (g/kg) durante as exposições à droga em 30 minutos (A), 30-60 minutos (B) e 60-120 minutos (C), e o total cumulativo consumido em 120 minutos (D). Preferência de etanol 10% a água, sendo a proporção entre a ingestão de álcool e a ingestão total de fluidos, em 30 minutos (E), 30-60 minutos (F) e 60-120 minutos (G), e o total da preferência cumulativa nos 120 minutos (H) (n = 13-14 animais/grupos).

5.1.3 Consumo livre-escolha e preferência de etanol 15%

Consumo de Etanol 15%: Avaliando o consumo de EtOH na concentração de 15%, nos 30 minutos iniciais (Figura 11A) foi apresentado consumo sugestivo maior de álcool pelo grupo estressado, mas que não foi estatisticamente significativa devido à $p < 0,05$ [$T(26) = 1,592$; $p = 0,1235$]. No momento de 30-60 minutos (Figura 11B) os animais do grupo estressado continuaram a consumir mais EtOH em comparação ao grupo controle, tendo resultado de significância [$T(26) = 2,15$; $p = 0,0407$] pelo Teste T de Student. No entanto, no gráfico 11C, vimos que o consumo da droga diminuiu em ambos os grupos, e a diferença entre eles parece ser menos pronunciada e não significativa [$T(26) = 0,66$; $p = 0,5149$].

Preferência de Etanol 15%: Em relação a preferência, por etanol à água, não foram observados valores significativos em 11E, 11F e 11G. No entanto, é relevante notar a identificação de uma evidência sugestiva de maior consumo pelo grupo estressado por álcool em comparação ao grupo controle durante o tempo total de exposição (Figura 11H), mesmo não sendo significativo pelo teste T de Student [$T(26) = 1,610$; $p = 0,1195$].

Figura 11 :Consumo e Preferência de EtOH 15%



Legenda: Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) do consumo de etanol 15% (g/kg) durante as exposições à droga em 30 minutos (A), 30-60 minutos (B) e 60-120 minutos (C), e o total cumulativo consumido em 120 minutos (D). Preferência de etanol 15% a água, sendo a proporção entre a ingestão de álcool e a ingestão total de fluidos, em 30 minutos (E), 30-60 minutos (F) e 60-120 minutos (G), e o total da preferência cumulativa em 120 minutos (H). ; # $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle ($n = 14$ animais/grupos).

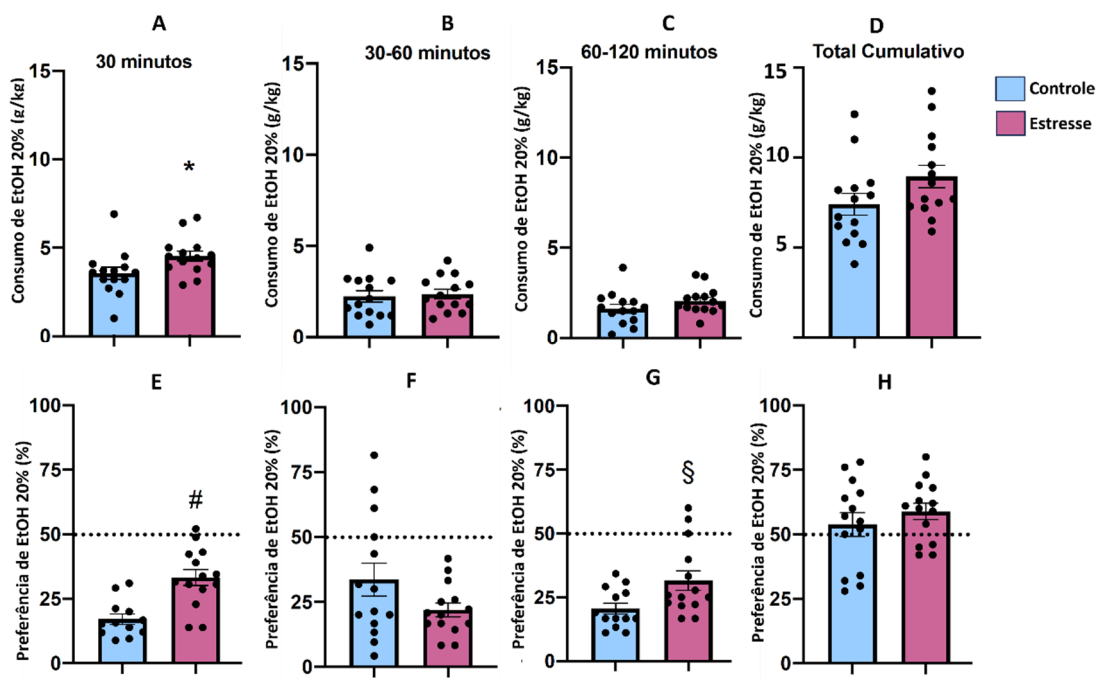
5.1.4 Consumo livre-escolha e preferência de etanol 20%

Consumo de Etanol 20%: Avaliando o consumo de EtOH na concentração de 20%, nos 30 minutos iniciais (Figura 12A) o teste T de Student identificou uma diferença significativa no consumo de etanol entre os grupos, apresentando um consumo significativamente maior de etanol por parte do grupo estressado [$T(26) = 2,180$; $p = 0,0385$]. Nos gráficos 12B e 12C não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, com ambos consumindo uma quantidade baixa de etanol. Quando analisamos o consumo cumulativo de etanol ao longo de todo o período (120 minutos) (figura 12D), observou-se um consumo maior no grupo de estressado, porém, valores não significativos [$T(26) = 1,766$; $p = 0,0891$].

Preferência de Etanol 20%: Ao analisar a preferência dos grupos nos diferentes momentos, segundo o teste T de Student, no gráfico 12E houve uma tendência significativa do grupo estressado em preferir a droga nos primeiros 30 minutos de exposição [$T(24) = 4,226$; $p = 0,0003$] e o mesmo evento se repetiu no momento de 60-120

minutos (Figura 12G), apresentando um valor significativo $p < 0,05$ [$T(25) = 2,475$; $p = 0,0205$]. No entanto, não houve valores significativos nos demais gráficos observados, tanto no momento 30-60 minutos (Figura 12F) [$T(26) = 1,707$; $p = 0,0998$], quanto no total cumulativo (Figura 12H) [$T(26) = 0,9134$; $p = 0,3694$].

Figura 12 : Consumo e Preferência de EtOH 20%



Legenda: Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) do consumo de etanol 20% (g/kg) durante as exposições à droga em 30 minutos (A), 30-60 minutos (B) e 60-120 minutos (C), e o total cumulativo consumido em 120 minutos (D); Preferência de etanol 20% a água, sendo a proporção entre a ingestão de álcool e a ingestão total de fluidos, em 30 minutos (E), 30-60 minutos (F) e 60-120 minutos (G), e da preferência cumulativa nos 120 minutos (H). *, # e § $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle ($n = 14$ animais/grupos).

5.1.5 Teste de reexposição a droga (TRD)

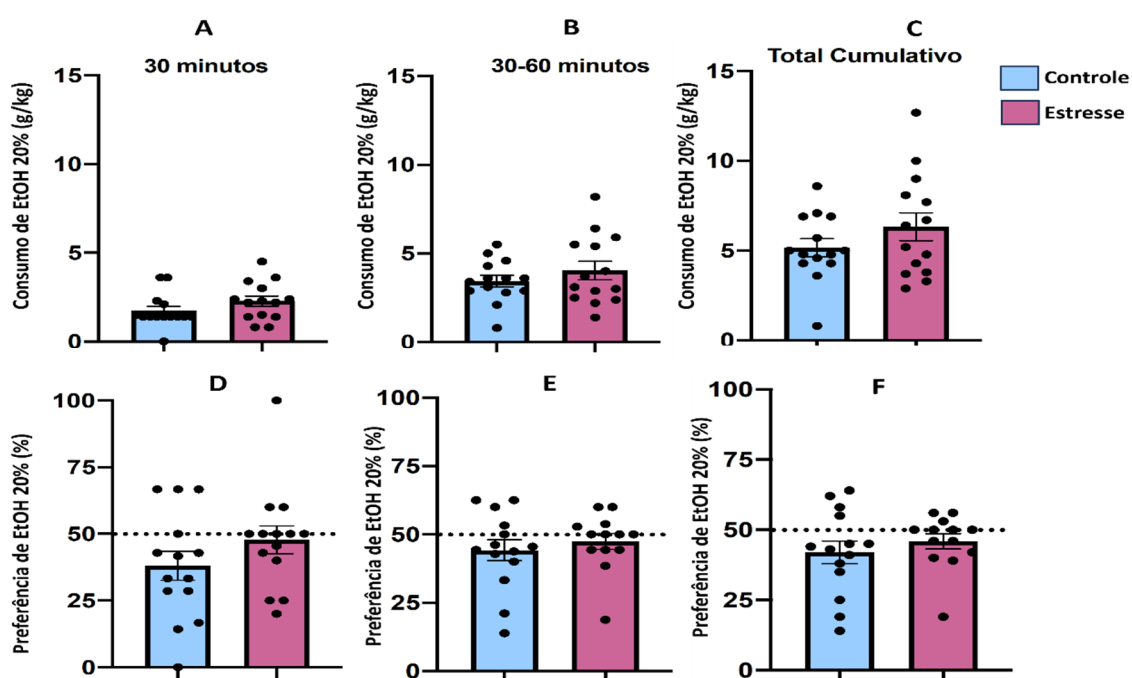
Como descrito no item 4.9, fizemos o TRD com os animais após 3 dias de abstinência da droga.

Consumo de Etanol 20% no TRD: Nos 30 minutos iniciais de reexposição (Figura 13A), o consumo foi relativamente baixo por parte do grupo estressado, não apresentando valor significativo pelo teste T de Student, sendo $p > 0,05$ [$T(26) = 1,425$; $p = 1,659$]. Seguindo para o próximo momento analisado de 30-60 minutos (Figura 13B), o consumo do grupo estressado apresentou uma evidência sugestiva de aumento, todavia, não significante [$T(26) = 0,9828$; $p = 0,3347$]. O padrão manteve-se no consumo total

cumulativo (Figura 13C), onde ambos os grupos apresentaram consumo próximo, sem variações estatísticas relevantes entre os mesmos [$T(26)=1,259;p=0,2193$].

Preferência de Etanol 20% no TRD: Apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas entre o consumo da droga pelos grupos no teste T de Student, foi observado que, com 30 minutos de reexposição, o grupo estressado apresentou uma preferência aparente pelo consumo da droga (Figura 13D) [$T(26)=1,291;p=0,2081$]. No entanto, no momento posterior a esse, entre 30-60 minutos e no total cumulativo (Figura 13E, 13F), a preferência do grupo estressado atingiu níveis semelhantes aos observados no grupo controle, em torno de 50% de consumo de EtOH.

Figura 13 : Consumo e Preferência de EtOH 20% no TRD



Legenda: Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) do consumo de etanol 20% (g/kg) durante as exposições à droga em 30 minutos (A), 30-60 minutos (B) e 60-120 minutos (C), e o total cumulativo consumido em 120 minutos (D); Preferência de etanol 20% a água, sendo a proporção entre a ingestão de álcool e a ingestão total de fluidos, em 30 minutos (E), 30-60 minutos (F) e o total da preferência cumulativa em 60 minutos (G) (n = 14 animais/grupos).

5.2 Experimento 2: efeitos do estresse sobre a ativação neuronal nos níveis de expressão dos genes do sistema endocanabinoide em resposta ao consumo de livre-escolha de etanol nas regiões: amígdala e núcleo intersticial da estria terminal (BNST)

Delineamento: Imediatamente após o término da sessão de reexposição, os camundongos (grupo estresse: n= 14, grupo controle: n= 14) foram submetidos a um processo de anestesia com Isoflurano, garantindo a rápida indução do estado anestésico para minimizar o desconforto e evitar a liberação de hormônios de estresse que poderiam interferir nos resultados moleculares. Após a indução da anestesia, foi realizado o deslocamento cervical e em seguida, os camundongos foram decapitados, e os encéfalos foram removidos. Cada encéfalo foi rapidamente congelado em nitrogênio líquido para preservar a integridade das moléculas e evitar degradação enzimática. Os tecidos foram então armazenados em freezers a temperaturas extremamente baixas (-80°C) até o momento das análises moleculares.

Para avaliar os efeitos do estresse sobre a expressão dos genes que codificam para os receptores CB1 e CB2, e as enzimas envolvidas no metabolismo de endocanabinoides (FAAH, MGLL), em resposta ao consumo de etanol de livre-escolha, após à reexposição à condição de livre-escolha entre água e etanol 20% por 1 hora (item 4.9), os encéfalos foram coletados e a amígdala e o BNST foram dissecados em criostato. Não foi possível avaliar expressão da proteína FAAH e MGLL, sendo assim, apenas a expressão de CB1 e CB2 em duas regiões foram estudadas, na amígdala e no BNST, localizados no encéfalo. A expressão dos genes CB1 e CB2 foi quantificada por meio da técnica Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real (RT-PCR), sendo o resultado expresso em unidades arbitrárias ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

O modelo matemático utilizado para a obtenção das unidades arbitrárias para essa análise foi: 1- Subtração do valor de CT do gene de interesse pelo CT do gene GAPDH (ΔCT); 2- Média do ΔCT das amostras; 3- ΔCT de cada amostra – a média do ΔCT do grupo controle-água ($\Delta\Delta CT$); 4- elevação negativa do $\Delta\Delta CT$ na base 2 = $2^{-\Delta\Delta CT}$. Em decorrência de pequeno volume de amostra, realizamos um *pool* de amostras, somando dois animais do mesmo grupo para compor uma amostra. Foi avaliado o efeito do estresse no consumo de etanol e na modulação dos níveis gênicos de CB1 e CB2, utilizando o Teste T de Student para amostras independentes nas comparações entre os grupos controle e estresse.

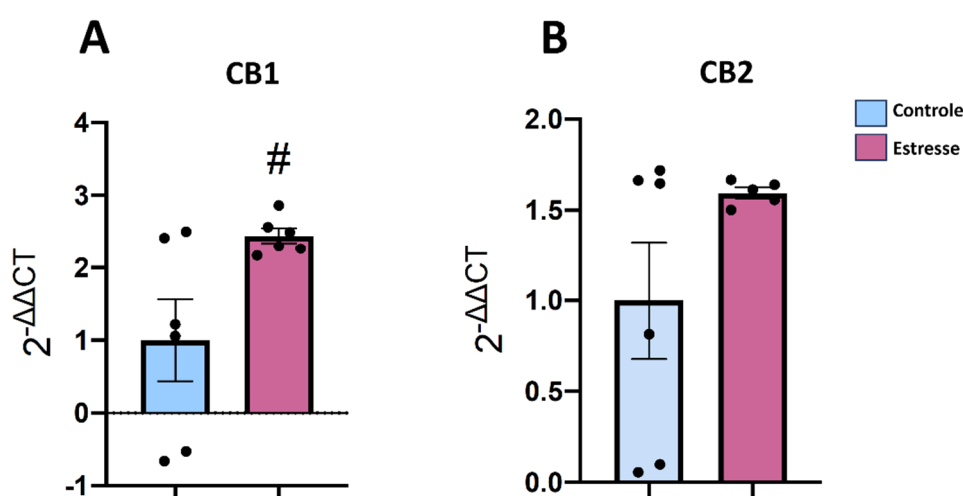
5.2.1 Níveis de expressão de receptores CB1 e CB2 na amígdala

Níveis de expressão de receptores CB1: Avaliando a expressão do receptor CB1(A) na amígdala (Figura 14), o teste T de Student identificou uma diferença

significativa entre os grupos, com o grupo estressado apresentando níveis significativamente maiores de expressão de CB1 em comparação ao controle sendo $p < 0,05$ [$T(10) = 2,534$; $p = 0,0297$].

Níveis de expressão de receptores CB2: Avaliando a expressão do receptor CB2 (B) na amígdala, o teste T de Student não identificou diferenças significativas entre os grupos, embora o grupo estressado tenha apresentado um indício sugestivo de aumento nos níveis de expressão de CB2 em comparação ao controle, esta não foi estatisticamente significativa [$T(9) = 1,668$; $p = 0,1296$].

Figura 14 : Níveis de expressão de receptores CB1 e CB2 na amígdala



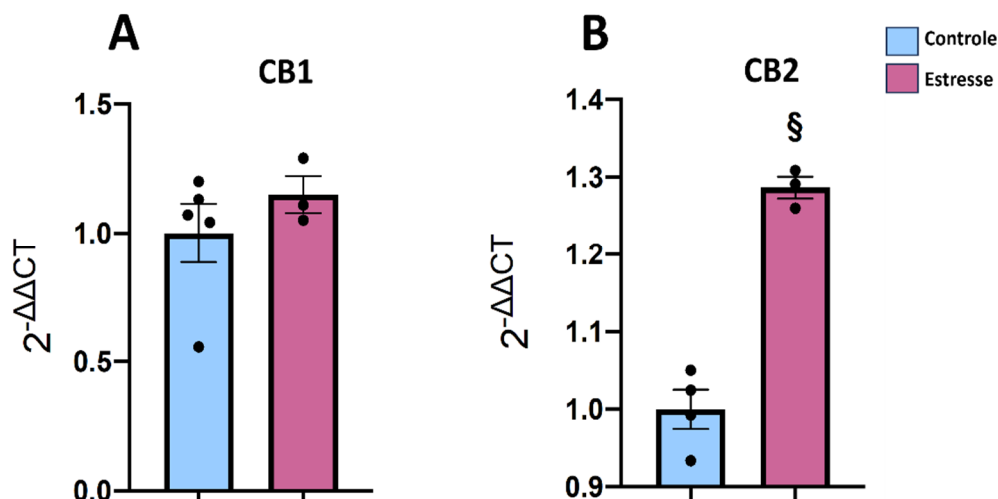
Legenda: Análise relativa da expressão ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dos genes CNR1 (A), CNR2 (B) na amígdala, após a última sessão de reexposição à droga; # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

5.2.2 Níveis de expressão de receptores CB1 e CB2 no BNST

Níveis de expressão de receptores CB1: Analisando a expressão do receptor CB1 (A) no BNST (Figura 15), o teste T de Student revelou que não houve diferença significativa entre os grupos estressado e controle [$T(6) = 0,9318$; $p = 0,3874$].

Níveis de expressão de receptores CB2: Considerando a expressão do receptor CB2 (B) no BNST, o teste T de Student revelou uma diferença significativa entre os grupos, com o grupo estressado apresentando níveis significativamente maiores de expressão de CB2 em comparação ao grupo controle [$T(5) = 8,957$; $p = 0,0003$].

Figura 15 : Níveis de expressão de receptores CB1 e CB2 no BNST



Legenda: Análise relativa da expressão ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dos genes CNR1 (A), CNR2 (B) no BNST, após a última sessão de reexposição à droga; § $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

6 Discussão

O presente estudo demonstrou que a exposição ao estresse, no modelo de estresse intermitente imprevisível, influenciou na preferência e no consumo de etanol, apresentando valores significativos em comparação ao grupo controle. Essa evidência sugestiva em preferir a busca pelo álcool etílico, mesmo que não significativa, também foi observada no período de reexposição à droga.

Durante o decorrer da oferta do EtOH aos animais, o grupo exposto ao estresse apresentou consumo e preferência significativos para as concentrações 5%, 15% e 20% (m/v), sendo notável estes dados quando observamos a evidência sugestiva pela busca da substância no total cumulativo. No entanto, essa busca ocorreu principalmente nos primeiros momentos da oferta e não foi constante ao longo da exposição. Estudos prévios, como o de Melendez et al. (2006), indicam que ciclos repetidos de abstinência podem amplificar a ingestão de etanol em determinados momentos, sugerindo que a variabilidade observada pode estar associada a uma interação dinâmica entre o estresse e os padrões de busca por etanol.

No experimento 1, avaliou-se o consumo de livre-escolha e a preferência pelo etanol, detectando um indício sugestivo de aumento no consumo de etanol pelo grupo exposto ao estresse, comparado ao grupo controle, sugerindo que os camundongos do grupo estressado exibiram um aumento no consumo voluntário de etanol.

Essa possível relação foi replicada e confirmada ao longo do experimento, tanto durante o tempo de exposição à droga, quanto ao total cumulativo de 2 horas de exposição, apresentando maior ingestão e preferência por etanol ao longo das sessões de livre-escolha. Assim como nos estudos epidemiológicos realizados por pesquisadores, foi demonstrado que indivíduos com maiores níveis de estresse apresentaram da mesma forma, maiores níveis de consumo de álcool (KEYES et. al., 2012).

Porém, nossos resultados mostraram que, mesmo ofertando diferentes concentrações, a busca não foi contínua e aumentativa, exceto nos 30 primeiros minutos de oferta, possivelmente devido a um “limite” de consumo durante o período de 2 horas de exposição. Dole et al. (1984) sugerem que roedores ajustam o consumo de etanol para evitar toxicidade quando a ingestão se aproxima do limite de sua capacidade de metabolização e eliminação.

A análise detalhada do consumo e preferência revelou diferenças notáveis entre as concentrações de etanol ofertadas. O grupo de animais expostos ao estresse apresentou consumo significativo para a concentração de 5% de EtOH durante os primeiros 30 minutos de oferta, influenciando no total cumulativo de 2 horas de oferta. No entanto, essa diferença não se manteve nos intervalos subsequentes.

Ao analisar a oferta de 10% de EtOH, não obtivemos valores significativos em relação aos animais controles, apesar do grupo estressado apresentar uma evidência sugestiva em preferir a droga nos intervalos, ainda assim, não foi significativa. A preferência pelo etanol nessa concentração sugere que os efeitos reforçadores começam a se intensificar, indicando uma transição progressiva no padrão de consumo dos animais e reforçando a hipótese de que o estresse pode amplificar a motivação para buscar o etanol em concentrações mais elevadas.

A concentração de 15% apresentou o maior consumo cumulativo entre os animais estressados, quando comparados ao grupo controle, sendo significativo no momento de 30-60 minutos. Esse padrão sugere que essa concentração pode representar um ponto ideal de equilíbrio entre os efeitos reforçadores do etanol e sua aversividade, como relatado em estudos anteriores (Melendez et al., 2006). A busca intensificada por essa concentração destaca o impacto do estresse no aumento do consumo de substâncias.

Para a concentração de 20%, observou-se um consumo e preferência significativos no início da oferta, por mais que nos demais momentos não se manteve, podemos concluir essa alta busca pela droga no total cumulativo. Esse comportamento pode ser explicado pela aversividade sensorial e pelos efeitos farmacológicos mais intensos associados a

concentrações mais altas de etanol conforme Green e Grahame (2008) sugerem que, em animais que ainda não desenvolveram tolerância, altas concentrações de etanol induzem efeitos sedativos e intoxicantes mais intensos, que, por sua vez, podem reduzir o consumo de etanol.

No entanto, mesmo com essa redução relativa, os animais estressados ainda apresentaram maior consumo acumulado para essa concentração em comparação ao grupo controle, sugerindo uma escalada no padrão de busca pela substância.

Durante o teste de reexposição, os animais do grupo estresse apresentaram uma maior busca pelo etanol a 20% em comparação ao grupo controle, evidenciando uma possível relação de preferência pela substância após o período de privação. Esse comportamento reflete uma possível sensibilização ao etanol induzida pelo estresse, corroborando estudos como o de Melendez et al. (2006), que sugerem que a privação e posterior reexposição ao etanol podem intensificar o padrão de consumo.

Segundo Marianno (2014), ao analisar a oferta de etanol e água para camundongos após sessões de estresse por contenção, foi possível comprovar o efeito metabólico do álcool, evidenciado pela diminuição no consumo de etanol nas duas horas seguintes ao estressor, acompanhada por um aumento na ingestão de água.

Curiosamente, o estudo também observou que os animais submetidos a enriquecimento ambiental consumiram menos etanol. Esse resultado está em concordância com os achados de Michajlovskij et al. (1988), que sugerem que o estresse por contenção causa uma perda considerável de água corporal nos animais, por isso a busca por água sugestivamente acontece.

O consumo de etanol é influenciado por diversos fatores individuais, culturais e ambientais. Elementos como genética e resposta fisiológica desempenham papéis importantes, resultando em variações na sensibilidade e na metabolização do etanol entre os indivíduos (SCHUCKIT, 1986).

No estudo de Fulenwider et al. (2019), observou-se que o etanol adulterado com quinina — substância adicionada para conferir um sabor amargo e aversivo — foi consumido em maior quantidade por fêmeas do que por machos da espécie C57BL6/J, reforçando a individualidade no consumo.

Acreditamos que diferenças nos resultados entre experimentos podem ser atribuídas à variações individuais dos animais e à sensibilidade dos métodos empregados para medir os efeitos do estresse sobre o comportamento e a neurobiologia associados ao consumo de etanol.

Cox et al. (2013) destacam uma tendência observada em animais expostos ao estresse, que passam a consumir mais etanol, mesmo sem histórico prévio de uso abusivo. Revelando que, durante o procedimento de "*drinking-in-the-dark*" (beber no escuro), esses animais demonstraram uma forte preferência por um padrão de consumo característico de *binge drinking*, sendo definido por um padrão de consumo de álcool caracterizado pela ingestão de grandes quantidades em um curto período de tempo. Indicando que a exposição a situações de estresse pode estimular o desenvolvimento de comportamentos de busca por álcool, aumentando o risco de abuso, mesmo em indivíduos sem predisposição anterior ao consumo excessivo de etanol, como também observamos em nosso estudo.

No experimento 2, foram investigados os efeitos do estresse sobre a ativação neuronal e os níveis de expressão dos genes do sistema endocanabinoide (CB1 e CB2) em resposta ao consumo de etanol nas regiões da amígdala e do BNST, revelando que o estresse promoveu alterações na expressão nos níveis desses genes nessas áreas. Ambas as regiões, ao expressarem esses receptores, participam na regulação da ansiedade e nas respostas ao estresse, influenciando diretamente no comportamento de busca por substâncias, como o álcool (WALKER et al., 2003).

Em termos neurobiológicos, observamos que a exposição ao estresse afetou o sistema endocanabinóide, especialmente a expressão dos receptores CB1 e CB2 na amígdala e no BNST, regiões cruciais para a regulação do estresse e comportamento emocional, sugerindo uma complexa interação entre os efeitos do estresse e o consumo de álcool sobre o sistema nervoso (DA COSTA et. al., 2023).

O aumento da atividade da amígdala em resposta a estímulos relacionados ao estresse ou ao consumo de etanol sugere uma participação significativa das redes neuronais nessa dinâmica. No entanto, ainda não está completamente elucidado o papel específico do sistema endocanabinóide nessa ativação neuronal. Sabe-se que a amígdala é composta por uma variedade de tipos neuronais, incluindo aqueles que utilizam noradrenalina, GABA, glutamato e endocanabinóides, indicando que o sistema endocanabinóide compartilha sua atuação com outras vias neurotransmissoras (KANO et al., 2009; CASTILLO et al., 2012).

A amígdala, localizada no lobo temporal, é amplamente reconhecida por seu papel na regulação das emoções, medo, ansiedade, e resposta à estímulos estressores. Sendo responsável pela atribuição emocional a experiências vivenciadas, modulação, e processamento de comportamentos de aversão e recompensa (LEDOUX, 2007).

No contexto do consumo de substâncias, a amígdala desempenha um papel crucial na modulação do comportamento de busca por drogas, como o álcool, ao associar emoções com experiências de consumo (KOOB, 2009). Em nosso estudo, notamos que a amígdala sofreu deleções advindas dos estímulos estressores, resultando na busca e consumo da droga pelos animais.

Estudos anteriores mostraram um aumento na ativação do núcleo amigdalóide em camundongos submetidos a protocolos de estresse por derrota social. Esse fenômeno foi observado, inclusive, na compulsão alimentar causada pelo estresse, que afetou curiosamente o ganho de peso corporal (NUMA et al., 2019; DULKA et al., 2020; DA COSTA et al., 2023).

Em concordância, a região do BNST, outra estrutura do prosencéfalo que integra o sistema da amígdala estendida, desempenha um papel importante na mediação de respostas prolongadas ao estresse. Ele regula o medo e a ansiedade crônica, atuando como um integrador de sinais emocionais. Estudos com roedores mostram que essa região está fortemente ligada ao medo contextual e a respostas prolongadas de ansiedade, destacando seu papel na manutenção de estados crônicos de ansiedade (DAVIS et al., 2010; WALKER et al., 2003).

No estudo já mencionado sobre a derrota social em camundongos, foi observado um aumento significativo da expressão de Δ FosB no BNST, um marcador de atividade neural particularmente associado a respostas a estímulos estressores (DA COSTA et al., 2023). Em concordância com nosso estudo, o BNST também sofreu alterações nos animais estressados.

No presente estudo obtivemos limitações relacionadas aos dados de coleta de FAAH e MAGL. Porém em estudos anteriores, há evidências crescentes do comprometimento da FAAH, podendo afetar a sensibilidade aos efeitos reforçadores do álcool e atenuar as consequências negativas do consumo excessivo de álcool (CRAVATT et al., 2001).

Essa dualidade é particularmente relevante em funções como a resposta ao estresse e a regulação emocional, que requerem tanto ajustes rápidos quanto adaptações de longo prazo, ressaltando o papel central dos endocanabinóides endógenos (eCBs) na homeostase fisiológica (SERRANO et al., 2022). A interação desses sistemas complexifica a interpretação da participação exclusiva dos endocanabinóides na regulação das respostas emocionais e no comportamento relacionado ao consumo de substâncias.

Os eCBs são moléculas que modulam a sinalização de diversos processos fisiológicos, incluindo dor, apetite, equilíbrio energético, estresse, ansiedade, sinalização imunológica, aprendizado e memória (SERRANO et. al.,2022). Os receptores CB1, são conhecidos por regular a liberação de neurotransmissores em sinapses gabaérgicas e glutamatérgicas, importantes no controle de circuitos de recompensa e estresse (KATONA et al., 2001).

Conforme observado em nosso estudo, os resultados mostraram uma expressão significativa do gene CB1 na região da amígdala. Essa interação entre o sistema endocanabinoide e os circuitos de estresse pode explicar o aumento do consumo de etanol em situações de estresse, sugerindo um papel potencial desses receptores na vulnerabilidade ao consumo de álcool induzido pelo estresse (KOOB et. al.,2010).

Embora existam mais estudos sobre os receptores CB1 e sua relação com o consumo de álcool, os receptores CB2 também desempenham um papel importante, sendo esses expressos nas células do sistema imunológico e em menor grau no sistema nervoso central, com ativação associada a efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores (BIETAR et al., 2013).

Ao observar o nível significativo de expressão gênica do CB2 no BNST, encontramos estudos que corroboram com esse achado, indicando que a ativação dos receptores CB2 pode modular a resposta ao estresse e o comportamento relacionado ao consumo de substâncias, incluindo o etanol (ONAIWI et. al., 2008).

De forma semelhante, outro estudo sobre o papel do CB2 nas ações de reforço do etanol em camundongos *knockout* (KO) e selvagens relatou um aumento significativo no consumo compulsivo em camundongos KO, sugerindo uma possível interferência genotípica após períodos de abstinência da droga (ORTEGA et. al.,2015).

A interação entre o sistema endocanabinoide e as redes neurais relacionadas ao estresse e ao consumo de etanol ressalta a complexidade desses processos. Estudos em mamíferos mostram que o estresse pode ser regulado por processos inibitórios, nos quais o córtex pré-frontal medial (mPFC) desempenha um papel fundamental ao modular estruturas subcorticais, como o BNST, a amígdala e o hipocampo. O mPFC exerce um papel crucial na regulação das respostas emocionais ao estresse, atuando como um modulador inibitório sobre o BNST e a amígdala (MAIER, 2015).

Durante situações de estresse, o mPFC controla as respostas comportamentais e fisiológicas por meio de suas conexões com essas áreas, promovendo a regulação e manutenção do comportamento adaptativo (ARNSTEN, 2009). No entanto, a exposição

a estressores crônicos pode comprometer essa função inibitória, resultando em uma hiperativação das respostas ao estresse e uma redução na capacidade de controlar o comportamento impulsivo, contribuindo para a vulnerabilidade ao abuso de substâncias, como o etanol (SINHA, 2008).

De acordo com a literatura e em concordância com os achados de nossa pesquisa, estudos realizados no laboratório do renomado neurocientista Larry Parsons demonstram que a autoadministração aguda de álcool provoca aumentos na liberação de eCB, que são progressivamente atenuados com a exposição repetida. (PARSONS et. al.,2015).

Além disso, o método de exposição ao álcool desempenha um papel importante na análise dos efeitos relacionados à abstinência. A exposição crônica ao álcool está geralmente associada à disfunção dos mecanismos de depuração de eCB, à plasticidade sináptica prejudicada mediada por eCBs, e à regulação negativa da função dos receptores canabinoides (PARSONS et. al.,2015).

Ciclos repetidos de intoxicação e abstinência de álcool induzem neuroadaptações que alteram os mecanismos motivacionais envolvidos na busca e no consumo compulsivos de álcool (KOOB et. al., 2013). Embora o uso inicial seja motivado pelos efeitos hedônicos do álcool, a exposição prolongada resulta na deleção das vias de recompensa do cérebro, que são superadas farmacologicamente pelo aumento da ingestão de álcool (SERRANO et. al.,2022).

7 Considerações Finais

O trabalho em questão oferece contribuição significativa ao campo da neurociência, uma visão mais abrangente e detalhada das vias neurais envolvidas, contribuindo para um avanço na compreensão dos mecanismos neurobiológicos que sustentam a interação entre o estresse e a dependência de etanol. Fortalecendo a base para investigações adicionais sobre a complexa relação entre fatores ambientais, sistemas neuroquímicos e comportamento de consumo de substâncias.

Em suma, os resultados do presente estudo destacam a complexa interação entre estresse, consumo de etanol e a modulação do sistema endocanabinoide, sugerindo que a ativação dos receptores CB1 e CB2 desempenha um papel fundamental na vulnerabilidade ao uso de substâncias, contribuindo para o entendimento da interação entre a ativação destes e o consumo de etanol em situações de estresse, com foco na região da amígdala e BNST.

A presença de alterações neurobiológicas, especialmente nas regiões da amígdala e do BNST, sublinha a importância de considerar fatores estressores na etiologia do consumo de álcool. Esses achados não apenas corroboram a literatura existente sobre a relação entre estresse e comportamento de busca por álcool, mas também destacam a importância de considerar fatores neurobiológicos na avaliação de intervenções e tratamentos para o consumo de substâncias.

Os resultados indicaram que a exposição ao estresse, induzida por um protocolo de estresse intermitente imprevisível, está associada a um aumento no consumo de etanol, sugerindo que o estresse pode amplificar a vulnerabilidade ao consumo abusivo.

A análise dos receptores CB1 e CB2 nesses núcleos neurais demonstrou que ambos influenciam na resposta ao estresse, modulando o comportamento de busca por substâncias e o consumo de etanol, ressaltando o papel do sistema endocanabinoide na resposta ao estresse e na regulação de comportamentos de consumo de substâncias.

8 Trabalhos Futuros

Em estudos futuros, buscaremos investigar de maneira aprofundada a relação entre o sistema endocanabinoide e o consumo de etanol, utilizando abordagens como a marcação específica de neurônios canabinoides na amígdala. Essa técnica possibilitará identificar e quantificar a porcentagem de ativação desses neurônios em condições experimentais variadas, contribuindo para uma análise mais precisa das respostas neurais ao estresse e ao consumo de substâncias.

Além disso, será investigada a interação do sistema endocanabinoide com outras populações neuronais que também são ativadas na amígdala, buscando compreender como esses circuitos se conectam e influenciam o comportamento. Apesar das contribuições do presente estudo, enfrentamos limitações relacionadas à coleta de dados das enzimas FAAH e MAGL, e ressaltamos a importância de utilizar métodos mais sensíveis e abrangentes para uma coleta assertiva em trabalhos futuros.

9 Referências Bibliográficas

ABRAHAO, K. P.; SALINAS, A. G.; LOVINGER, D. M. **Alcohol and the brain: neuronal molecular targets, synapses, and circuits.** Neuron, v. 96, n. 6, p. 1223-1238, 2017.

- ARNSTEN, A. F. T. **Stress signaling pathways that impair prefrontal cortex structure and function.** *Nature Reviews Neuroscience*, v. 10, n. 6, p. 410–422, 2009.
- BASTOS, F. I. P. M. et al. **III Levantamento Nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2017.
- BATISTA, I. et al. **Neurociência do uso de substâncias.** 2013.
- BEDSE, G.; HILL, M. N.; PATEL, S. **2-arachidonoylglycerol modulation of anxiety and stress adaptation: from grass roots to novel therapeutics.** *Biological Psychiatry*, v. 88, n. 7, p. 520-530, 2020.
- BIETAR, B.; TANNER, S.; LEHMANN, C. **Neuroprotection and beyond: The central role of CB1 and CB2 receptors in stroke recovery.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, p. 16728, 2023.
- CARMO, D. R. P. et al. **Relationships between substance use, anxiety, depression and stress by public university workers.** *Revista Brasileira de Enfermagem*, 2020.
- CASTILLO, PABLO E. et al. **Endocannabinoid signaling and synaptic function.** *Neuron*, v. 76, n. 1, p. 70–81, out. 2012.
- CEBRID - CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE PSICOTRÓPICAS. **Livreto informativo sobre drogas psicotrópicas.** São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Psicobiologia, 2018.
- COSTARDI, J. V. V. et al. **A review on alcohol: from the central action mechanism to chemical dependency.** *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 61, p. 381-387, 2015.
- COX, B. R. et al. **Repeated cycles of binge-like ethanol (EtOH)-drinking in male C57BL/6J mice augments subsequent voluntary EtOH intake but not other dependence-like phenotypes.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2013.
- CRAVATT, B. F. et al. **Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 16, p. 9371–9376, 2001.
- DA COSTA, V. F. et al. **Emotional and cognitive-like responses induced by social defeat stress in male mice are modulated by the BNST, amygdala, and hippocampus.** *Frontiers in Integrative Neuroscience*, v. 17, 2023.
- GOODE, T. D.; MAREN, S. **Role of the bed nucleus of the stria terminalis in aversive learning and memory.** *Learning & Memory*, v. 24, n. 9, p. 480–491, 2017.
- GREEN, A. S.; GRAHAME, N. J. **Ethanol drinking in rodents: is free-choice drinking related to the reinforcing effects of ethanol?** *Alcohol*, v. 42, n. 1, p. 1–11, 2008.

- DAVIS, M.; WALKER, D. L.; MILES, L. **Phasic vs sustained fear in rats and humans: Role of the extended amygdala in fear vs anxiety.** *Neuropsychopharmacology*, v. 35, n. 1, p. 105-135, 2010.
- DAY, J. J. et al. **Associative learning mediates dynamic shifts in dopamine signaling in the nucleus accumbens.** *Nature Neuroscience*, v. 10, n. 8, p. 1020-1028, 2007.
- DI, S. et al. **Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism.** *Journal of Neuroscience*, v. 23, n. 12, p. 4850-4857, 2003.
- DOLE, V. P.; GENTRY, R. T. **Toward an analogue of alcoholism in mice: scale factors in the model.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 81, n. 11, p. 3543-3546, 1984.
- DULKA, B. N. et al. **Chemogenetic activation of an infralimbic cortex to basolateral amygdala projection promotes resistance to acute social defeat stress.** *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020.
- FORMIGONI, M. L. et al. **Efeitos de substâncias psicoativas: módulo 2.** 7. ed. Brasília: Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas, 2014.
- FULENWIDER, H. D. et al. **Sex differences in aversion-resistant ethanol intake in mice.** *Alcohol and Alcoholism*, v. 54, n. 4, p. 345-352, 2019.
- GILPIN, N. W.; KOOB, G. F. **Neurobiology of alcohol dependence: focus on motivational mechanisms.** *Alcohol Research & Health*, v. 31, n. 3, p. 185-193, 2008.
- GIRARDI, C. E. N. **Consequências emocionais do estresse em ratos: um modelo experimental de transtorno de estresse pós-traumático.** São Paulo, 2011.
- GJERSTAD, J. K.; LIGHTMAN, S. L.; SPIGA, F. **Role of glucocorticoid negative feedback in the regulation of HPA axis pulsatility.** *Stress*, v. 21, n. 5, p. 403-416, 2018.
- GRISÓLIA, A. **Modulação dos sistemas GABAérgico e glutamatérgico na secreção hipotalâmica de ocitocina sob condições hiperosmóticas.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) — Universidade Federal do Pará, 2014.
- GROENEWEG, F. L. et al. **Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling.** *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 350, n. 2, p. 299-309, 2012.
- GUIMARÃES, V. V. et al. **Consumo abusivo e dependência de álcool em população adulta no Estado de São Paulo, Brasil.** *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 13, n. 2, p. 314-325, 2010.
- GULYÁS, A. I. et al. **Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala.** *European Journal of Neuroscience*, v. 20, n. 2, p. 441-458, 2004.

HANSON, D. J. **Preventing alcohol abuse: alcohol, culture, and control.** Choice Reviews Online, v. 33, n. 01, p. 33- 0610-33-0610, 1995.

HOFFMAN, P. L. et al. **N-methyl-D-aspartate receptors and ethanol: inhibition of calcium flux and cyclic GMP production.** Journal of Neurochemistry, v. 52, n. 6, p. 1937-1940, 1989.

HWA, L. S. et al. **Persistent escalation of alcohol drinking in C57BL/6J mice with intermittent access to 20% ethanol.** Alcoholism, Clinical and Experimental Research, v. 35, n. 11, p. 1938-1947, 2011.

JOËLS, M.; DE KLOET, E. R. **Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain: implications for ion permeability and transmitter systems.** Progress in Neurobiology, v. 43, n. 1, p. 1-36, 1994.

KANO, M. et al. **Endocannabinoid-Mediated Control of Synaptic Transmission.** Physiological Reviews, v. 89, n. 1, p. 309-380, 2009.

KATONA, I. et al. **Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons.** Journal of Neuroscience, v. 21, n. 23, p. 9587-9598, 2001.

KEYES, K. M.; HATZENBUEHLER, M. L.; GRANT, B. F.; HASIN, D. S. **Stress and alcohol: epidemiologic evidence.** Alcohol Research, v. 34, n. 4, p. 391-400, 2012.

KOOB, G. F. **Addiction is a reward deficit and stress surfeit disorder.** Frontiers in Psychiatry, v. 4, p. 72, 2013.

KOOB, G. F. **Dynamics of neuronal circuits in addiction: Reward, antireward, and emotional memory.** Pharmacopsychiatry, v. 42, suppl. 1, p. S32-S41, 2009.

KOOB, G. F. **Theoretical frameworks and mechanistic aspects of alcohol addiction: Alcohol addiction as a reward deficit disorder.** Current Topics in Behavioral Neuroscience, v. 13, p. 3-30, 2013.

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

LEDOUX, J. E. **The amygdala.** Current Biology, v. 17, n. 20, 2007.

LEME, M. V.; MAZLOUM, M. C. F. **A dependência do álcool e sua relação com o indivíduo.** Repositório Universitário da Ânima, 2022.

LIMA-LANDMAN, M. R.; ALBUQUERQUE, E. X. **Ethanol potentiates and blocks NMDA-activated single-channel currents in rat hippocampal pyramidal cells.** FEBS Letters, v. 247, n. 1, p. 61-67, 1989.

LOHESWARAN, G.; BARR, M. S.; ZOMORRODI, R. et al. **Impairment of neuroplasticity in the dorsolateral prefrontal cortex by alcohol.** Scientific Reports, v. 7, p. 5276, 2017.

LOPES, A. P. A. T.; MARCON, S. S.; DECESARO, M. DAS N. **Abuso de bebida alcoólica e sua relação no contexto familiar.** Estudos de Psicologia, v. 20, n. 1, p. 21-30, 2015.

MAIER, S. F. **Behavioral control blunts reactions to contemporaneous and future adverse events: Medial prefrontal cortex plasticity and a corticostriatal network.** Neurobiology of Stress, v. 1, p. 12–22, 2015.

MARIANNO, P. **Camundongos C57BL/6 alojados em ambiente enriquecido apresentam menor consumo de etanol após estresse.** 2014.

MARTINEZ, M.; CALVO-TORRENT, A.; PICO-ALFONSO, M. A. **Social defeat and subordination as models of social stress in laboratory rodents: a review.** Aggressive Behavior: Official Journal of the International Society for Research on -Aggression, v. 24, n. 4, p. 241-256, 1998.

MATHEWS, I. Z. et al. **Increased depressive behaviour in females and heightened corticosterone release in males to swim stress after adolescent social stress in rats.** Behavioural Brain Research, v. 190, n. 1, p. 33-40, 2008.

MCGOVERN, P. et al. **Early Neolithic wine of Georgia in the South Caucasus.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 114, n. 48, p. E10309–E10318, 2017.

MELLENDEZ, R. I.; MIDDAUGH, L. D.; KALIVAS, P. W. **Development of an alcohol deprivation and escalation effect in C57BL/6J mice.** Alcoholism: Clinical and Experimental Research, v. 30, n. 12, p. 2017–2025, 2006.

MESQUITA, S. et al. **Efeitos do estresse induzido por imobilização na prenhez da rata.** Revista Brasileira de Zootecias, v. 11, n. 3, 2019.

MICHAILOVSKI, N. et al. **Effect of acute and repeated immobilization stress on food and water intake, urine output and vasopressin changes in rats.** Endocrinologia Experimentalis, v. 22, n. 3, p. 143–157, 1988.

MORAES, E.; CAMPOS, G.; FIGLIE, N.; LARANJEIRA, R.; FERRAZ, M. **Conceitos introdutórios de economia da saúde e o impacto social do abuso do álcool.** Revista Brasileira de Psiquiatria, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 321-325, 2006.

MORRISETT, R. A.; SWARTZWELDER, H. S. **Attenuation of hippocampal long-term potentiation by ethanol: a patch-clamp analysis of glutamatergic and GABAergic mechanisms.** Journal of Neuroscience, v. 13, n. 5, p. 2264-2272, 1993.

MUKHERJEE, R. et al. **Estimation of alcohol content of wine, beer and spirits to evaluate exposure risk in pregnancy: pilot study using a questionnaire and pouring task in England.** The International Journal of Alcohol and Drug Research, v. 2, n. 3, p. 71-78, 2013.

NESTLER E. J. **Is there a common molecular pathway for addiction?.** Nature neuroscience 8(11), p. 1445 - 1449, 2005.

NESTLER, E. J. **Molecular basis of neural plasticity underlying addiction.** Nature Reviews Neuroscience, v. 2, n. February, p. 119-128, 2001.

NUMA, C. et al. **Social defeat stress-specific increase in c-Fos expression in the extended amygdala in mice: Involvement of dopamine D1 receptor in the medial prefrontal cortex.** Scientific Reports, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.

OLSEN, R. W.; LIANG, J. **Role of GABAA receptors in alcohol use disorders suggested by chronic intermittent ethanol (CIE) rodent model.** Molecular Brain, v. 10, n. 1, p. 1-20, 2017.

ONAIVI, E. S. et al. **Functional expression of brain neuronal CB2 cannabinoid receptors are involved in the effects of drugs of abuse and in depression.** Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1139, n. 1, p. 434–449, 2008.

ORTEGA-ÁLVARO, A. et al. **Role of cannabinoid CB2 receptor in the reinforcing actions of ethanol.** Addiction Biology, v. 20, n. 1, p. 43-55, 2015.

PARSONS, L. H.; HURD, Y. L. **Endocannabinoid signaling in reward and addiction.** Nature Reviews Neuroscience, v. 16, n. 10, p. 579–594, 2015.

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

RIBEIRO, M. **Neurobiologia da dependência química.** Unidade de Pesquisa em Álcool e Drogas (UNIAD – UNIFESP), 2002.

ROBERTO, M.; VARODAYAN, F. P. **Synaptic targets: Chronic alcohol actions.** Neuropharmacology, v. 122, p. 85-99, 2017.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. **Incentive-sensitization and addiction.** Addiction, v. 96, n. 1, p. 103-114, 2001.

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

ROMANO-LÓPEZ, A. et al. **Maternal separation and proclivity for ethanol intake: a potential role of the endocannabinoid system in rats.** Neuroscience, v. 223, p. 296-304, 2012.

ROOZENDAAL, B.; MCEWEN, B. S.; CHATTARJI, S. **Stress, memory and the amygdala.** Nature Reviews Neuroscience, v. 10, n. 6, p. 423-433, 2009.

ROZIN, L.; ZAGONEL, I. P. **Fatores de risco para dependência de álcool em adolescentes.** Acta Paulista de Enfermagem, v. 25, n. 2, p. 314-318, 2012.

SCHUCKIT, M. A. **A genetic and clinical perspective on alcoholism.** American Journal of Psychiatry, v. 175, n. 7, p. 635-647, 2018.

SERRANO, A. **Alcohol-endocannabinoid interactions.** 2022.

SILBERMAN, Y.; ARIWODOLA, O. J.; WEINER, J. L. **β 1-Adrenoceptor activation is required for ethanol enhancement of lateral paracapsular GABAergic synapses in the rat basolateral amygdala.** Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 343, n. 2, p. 451-459, 2012.

SINHA, R. **Chronic stress, drug use, and vulnerability to addiction.** Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1141, n. 1, p. 105-130, 2008.

SOUSA, K. **Alguns fatores que influenciam o consumo precoce de álcool.** Revista Espaço Acadêmico, v. 17, n. 193, p. 92-101, 2017.

STANDAGE, T. **História do mundo em 6 copos.** Rio de Janeiro: Zahar, 2005.

VIALA-ARTIGUES, J.; MECHETTI, C. **Histoire de l'alcool archéologie** partie 1. 2003.

WALKER, D. L.; TOUFEXIS, D. J.; DAVIS, M. **Role of the bed nucleus of the stria terminalis vs the amygdala in fear, stress, and anxiety.** European Journal of Pharmacology, v. 463, n. 1-3, p. 199-216, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on alcohol and health 2018.** Geneva: World Health Organization, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **International Classification of Diseases for Mortality and Morbidity Statistics (11th Revision).** Geneva: World Health Organization, 2022.

ZALESKI, M. et al. **Aspectos neurofarmacológicos do uso crônico e da síndrome de abstinência do álcool.** Brazilian Journal of Psychiatry, v. 26, p. 40-42, 2004.

ZUARDI, A. W. **Fisiologia do estresse e sua influência na saúde.** Unipac Faculdade De Ciências Da Saúde De Barbacena, [s. l.], v. ZUARDI, A., p. 1-13, 2014.

10 ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética na Utilização de Animais

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

Reitoria

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética na Utilização de Animais

Rua Ceará, s/n, Bloco 2D, Sala 02 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902

Telefone: (34) 3225-8658 - www.comissoes.propp.ufu.br/ceua - ceua@propp.ufu.br**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado **“Análise da Participação do Sistema Endocanabinóide da Amídala na Interação entre a Exposição de Estresse e o Consumo de Etanol em Camundongos”**, protocolo nº **23117.081886/2022-96**, sob a responsabilidade de **Rodrigo Molini Leão** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **17 de março de 2023**.

(We certify that the project entitled **“Análise da Participação do Sistema Endocanabinóide da Amídala na Interação entre a Exposição de Estresse e o Consumo de Etanol em Camundongos”** protocol **23117.081886/2022-96**, under the responsibility of **Rodrigo Molini Leão** - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was **approved** for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of **march 17th, 2023**).

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Início: 24/03/2023 Término: 25/03/2025
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongo Isogênico C57BL/6J
Número de animais	28 animais
Peso / Idade	20-30 gramas / 10 - 12 semanas
Sexo	Macho
Origem / Local	REBIR - UFU
Local onde serão mantidos os animais:	REBIR - UFU



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Fernando Moreira Izidoro, Coordenador(a)**, em 21/03/2023, às 14:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4357813** e o código CRC **6689FB0B**.
