

**SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL CRUZADA ENTRE A
EXPOSIÇÃO AO ESTRESSE E ANFETAMINA: DIFERENÇAS
ENTRE RATOS ADULTOS E ADOLESCENTES**

Bruna Ramos Casimiro

Araraquara, 2011.

Bruna Ramos Casimiro

**SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL CRUZADA ENTRE A EXPOSIÇÃO
AO ESTRESSE E ANFETAMINA: DIFERENÇAS ENTRE RATOS ADULTOS
E ADOLESCENTES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico.

Orientadora: Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta

Co-Orientador: Prof. Dr. Fábio Cardoso Cruz

Araraquara, 2011.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu amado e querido tio e padrinho Roberto Augusto Ramos Junior (*in memorian*) que sempre me ensinou que nada é impossível quando nos dedicamos e batalhamos e que todos temos um lugar ao sol. Por mais que o tempo passe sua memória, amor e exemplo estarão sempre presentes em minha vida, sendo parte indissociável de mim. Saudade e amor eternos, padrinho!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder a vida e por sempre me abençoar colocando em meu caminho muita felicidade e oportunidade de crescimento.

Aos meus pais Carlos e Suzeli, que ao longo de toda minha vida me apoiaram e zelaram pela minha felicidade e realização, sempre me cobrindo com muito amor e carinho. Amo vocês mais que a mim mesma!

Aos meus irmãos Caio e Guilherme e minha cunhada Camila por todo amor e paciência dedicados a mim.

A toda minha linda família Ramos, meus avós Roberto e Firmina, meus tios Rosana, Márcia e José Luís, meus primos Rodrigo, Diego, Roberta, Fernanda e Renata por todo amor, carinho e alegria compartilhados. Estaremos SEMPRE juntos!

À profa. Cleopatra, por ter confiado em minha capacidade e ter me dado a oportunidade de fazer parte do Laboratório de Farmacologia, uma verdadeira família, e também por ter grande papel no meu crescimento acadêmico.

Ao Fábio, pela grande amizade, paciência e grande orientação, sempre disposto a conversar e ajudar no que preciso fosse, pela presença constante em minha vida acadêmica independente da distância e pelo papel fundamental durante minha jornada acadêmica.

Ao Tarciso, pela enorme amizade e paciência, por estar presente desde o meu primeiro dia dentro da universidade, sempre colaborando para o meu crescimento.

Aos meus grandes amigos Naira e Luís Otávio, por estarem sempre presentes em todos os momentos da minha vida desde o primeiro dia na universidade e por

terem compartilhado comigo uma parte de suas vidas. Levarei vocês eternamente em meu coração.

Às amigas da Raparigaz – Anna Maria, Cyntia, Lígia, Lígia Maria e Maíra – que me permitiram fazer parte dessa família, sempre me apoiando e proporcionando grandes momentos de muita felicidade.

À República Várzea, pelo carinho, amizade e inúmeros momentos de felicidade compartilhados.

Ao grupo “Batidão”, por me permitir fazer parte dessa família e por compartilhar momentos inesquecíveis.

Aos amigos da faculdade, alguns mais próximos, outros nem tanto, mas que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento e felicidade, em especial - Milena, Naiana, Carolina, Natália V., Natália C., Júlia, Jamile, Thaísa, Amanda, Fernanda F., Letícia, Mariana L., Taís A., Mariane C., Thays L., Vanessa, Ilka, Mariana N., Luciano, Rodrigo V., Leonardo, Renato, Luiz H., Matheus.

Aos amigos de Suzano que me mostraram que as grandes amizades superam grandes distâncias e por todo carinho, em especial Fabíola Santos, Juliana Candelária e Yuri Hiasa.

Aos amigos do laboratório – Paulo, Sheila, Paula, Tatiane, Diego, Ana Cláudia, Karina, Bete, Rosangela, Ricardo, Kelciane, Carlos, Chico – sempre dispostos a ajudar.

Ao Victor Pádua, pelo grande carinho, afeto e amizade a mim dedicados, por compartilhar inúmeros momentos de alegria e por cultivar um lugar tão especial em meu coração.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	8
1 INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1. Parecer Ético.....	14
3.2 Animais.....	14
3.3. Fármaco.....	14
3.4. Estresse.....	15
3.5. Avaliação da atividade locomotora.....	15
3.6. Análise Estatística.....	15
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	16
4.1. Estresse agudo.....	16
4.2. Estresse crônico.....	16
5. RESULTADOS.....	17
5.1. Avaliação da Sensibilização Cruzada entre o Estresse Agudo e Anfetamina em Ratos Adultos e Adolescentes.....	17
5.1.1. Ratos adultos.....	17
5.1.2. Ratos adolescentes.....	18
5.2. Avaliação da Sensibilização Cruzada entre o Estresse Crônico e Anfetamina em Ratos Adultos e Adolescentes.....	19
5.2.1. Ratos adultos.....	19
5.2.2. Ratos adolescentes.....	20

6. DISCUSSÃO.....	22
7. CONCLUSÃO.....	26
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

RESUMO

No mundo, anualmente 200 milhões de pessoas fazem uso de substâncias psicoativas de abuso. Estudos clínicos demonstram que a exposição a estresse pode aumentar o risco ao abuso de drogas e a vulnerabilidade para o desenvolvimento de dependência. O uso repetido de substâncias de abuso pode promover sensibilização comportamental. A sensibilização comportamental reflete neuroadaptações que estão envolvidas no desenvolvimento da farmacodependência. Assim como a administração repetida à substância de abuso, a exposição repetida a episódios de estresse também pode promover sensibilização comportamental à administração subsequente de substâncias de abuso. Esse fenômeno é chamado de sensibilização cruzada entre estresse e drogas. Em modelos animais a sensibilização comportamental caracteriza-se pelo aumento progressivo da resposta locomotora a uma dose fixa da substância psicoativa após a exposição repetida a drogas ou ao estresse. Altos índices de uso de substância psicoativa de abuso têm sido observados entre adolescentes no Brasil e no mundo. Adultos e adolescentes apresentam diferenças em relação à resposta às drogas e ao estresse. Embora a relevância, poucos estudos são realizados para avaliar o efeito do estresse em modelos animais de adolescência.

Desta forma, o objetivo desse projeto foi estudar se a exposição ao estresse agudo ou crônico de imobilização promoveria sensibilização comportamental cruzada com a anfetamina em ratos adolescentes e adultos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ratos adolescentes (acima) e adultos (abaixo) submetidos ao estresse de imobilização em tubos de PVC.....	15
Figura 2: Caixa de determinação da atividade locomotora.....	15
Figura 3: Os histogramas representam a atividade locomotora induzida pela administração de anfetamina ou salina a ratos adultos expostos ao estresse agudo de imobilização. * $p < 0,05$; comparado ao grupo CONT-SAL e EST-SAL.....	18
Figura 4: Os histogramas representam a atividade locomotora induzida pela administração de anfetamina ou salina a ratos adolescentes expostos ao estresse agudo de imobilização. * $p < 0,05$; comparado ao grupo CONT-SAL e EST-SAL.....	19
Figura 5: Os histogramas representam a atividade locomotora induzida pela administração de anfetamina ou salina a ratos adultos 3 dias após a última exposição ao estresse repetido de imobilização. Os dados representam a média $\pm$ EPM de 9-11 animais por grupo. * $p < 0,05$; comparado ao grupo CONT-SAL e EST-SAL; # $p < 0,05$; comparado ao grupo CONT-ANF.....	20
Figura 6: Os histogramas representam a atividade locomotora induzida pela administração de anfetamina ou salina a ratos adolescentes 3 dias após a última exposição ao estresse repetido de imobilização. Os dados representam a média $\pm$ EPM de 9-10 animais por grupo. * $p < 0,05$; comparado ao grupo CONT-SAL e EST-SAL; # $p < 0,05$; comparado ao grupo CONT-ANF.....	21

1. INTRODUÇÃO

Desde a pré-história as substâncias psicoativas têm sido utilizadas por diferentes culturas. Ao longo da história, o seu uso não foi apenas associado à medicina e à ciência, mas também à magia, religião, cultura e festas (ROYCE, 1981; TOSCANO JR, 2001).

A anfetamina (β -fenilisopropilamina) surgiu no início do século XX juntamente com outras substâncias sintéticas com potencial de abuso. Nessa época foram descritas as propriedades estimulantes dessa substância por Gordon Alles, que pesquisava um substituto mais potente para o descongestionante nasal efedrina. Gordon Alles notou que quando inalada ou administrada por via oral, a anfetamina reduzia drasticamente a fadiga, aumentava o estado de alerta e causava sensação de euforia. A anfetamina tornou-se disponível nos Estados Unidos em 1932, como medicamento, sem necessidade de prescrição médica. Embora sua indicação terapêutica inicialmente fosse como descongestionante nasal logo foram descritos relatos de seu uso abusivo, devido às suas propriedades estimulantes. Devido à ausência de restrições, os derivados anfetamínicos eram utilizados para o tratamento de várias patologias como obesidade, alcoolismo, depressão e esquizofrenia. O uso epidêmico de prescrições de produtos anorexígenos no final dos anos 60 revelou o potencial de dependência da anfetamina (HANSON *et al.*, 2004). A partir de então, iniciou-se nos Estados Unidos, o controle da fabricação e distribuição dessas substâncias (LUNA, 2001).

Atualmente a estatística do uso de substâncias psicoativas de abuso no mundo é preocupante. Cerca de 200 milhões de pessoas fazem uso destas substâncias (Escritório Contra Drogas e Crimes da Organização Mundial de Saúde – UNODC,

2010). Segundo esse mesmo relatório 0,6% da população mundial entre 15 e 64 de idade (25 milhões de pessoas), são consideradas dependentes (UNODC, 2010). No Brasil, 850 mil pessoas foram tratadas por problemas relacionados ao uso de substâncias de abuso no ano de 2005. Considerando a prevalência anual do uso de substâncias ilícitas a anfetamina e seus derivados são a segunda classe de substâncias psicoativas de abuso mais utilizada no mundo (0,8%) (UNODC, 2010).

A dependência a substâncias psicoativas é um fenômeno comportamental complexo com causas e conseqüências decorrentes de vários fatores que incluem desde mecanismos moleculares até aspectos sociais. Ela é conceituada atualmente como a perda do controle do uso da droga e seu uso a despeito das conseqüências adversas (O'BRIEN, 2006). Sendo um processo que geralmente inicia-se com o uso ocasional da substância de abuso e evolui para o uso compulsivo (ROBINSON & BERRIDGE, 2001).

Robinson e Berridge (1993) propuseram que o desenvolvimento do desejo obsessivo pela droga resulta da sensibilização de vias dopaminérgicas mesocorticolímbicas envolvidas com o incentivo motivacional e recompensa. Essas vias são compostas pela área tegumental ventral, córtex, núcleo acúmbens e sistema límbico. Além de mediar a sensação subjetiva de prazer, o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico regularia o impulso motivacional e a atenção a estímulos salientes. Dessa maneira, com o uso repetido, a droga e os estímulos associados a ela tornam-se progressivamente mais atrativos fazendo com que o indivíduo desenvolva um desejo obsessivo ("fissura") pela droga que é capaz de controlar o comportamento (ROBINSON & BERRIDGE, 1993). A sensibilização das vias dopaminérgicas em modelos animais se expressa como sensibilização comportamental.

Em modelos animais a sensibilização comportamental caracteriza-se pelo aumento gradual e progressivo da atividade locomotora após a administração repetida da substância psicoativa de abuso (ROBINSON & BECKER, 1986). O aumento da atividade locomotora observado na sensibilização comportamental decorre de adaptações neuroquímicas e moleculares do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico homólogas àquelas responsáveis pela transição do uso controlado para o uso compulsivo das substâncias psicoativas (CONVIGTON & MICZEK, 2001; NESTLER *et al.*, 2001; ROBINSON & BERRIDGE, 2001).

A sensibilização comportamental foi descrita para a cocaína, anfetamina, etanol, morfina, nicotina, delta-9-THC e heroína (ROBINSON & BECKER, 1986; KALIVAS & DUFFY, 1987; MISERENDINO & NESTLER, 1995; CADONI *et al.*, 2000; MARIN & PLANETA, 2004; CRUZ *et al.*, 2005; LENOIR & AHMED, 2007). Estudos também demonstram que a anfetamina induz sensibilização comportamental em ratos adultos e adolescentes (TIRELLI *et al.*, 2003; MENDEZ *et al.*, 2009, SANTOS *et al.*, 2009).

A progressão do uso experimental de uma substância de abuso para a dependência depende de vários fatores de proteção e risco, que envolvem aspectos neurobiológicos, comportamentais e sociais (O'BRIEN, 2006). Neste contexto os fatores determinantes interagem de forma complexa no sentido de aumentar ou diminuir vulnerabilidade do indivíduo para o desenvolvimento da dependência (LARANJEIRAS & RIBEIRO, 2006).

Observações clínicas indicam que o estresse é um fator de risco importante relacionado com a iniciação, manutenção e recaída ao uso de drogas de abuso (PIAZZA & LEMOAL, 1998; SINHA *et al.*, 1999). Estudos demonstram uma correlação positiva entre exposição ao estresse e uso de substância de abuso

(DEMBO *et al.*, 1988; JACOBSEN *et al.*, 2001). Por exemplo, foi demonstrado que indivíduos dependentes frequentemente citam a exposição a estímulos aversivos ou estados negativos de humor como justificativa para o início, manutenção e recaída ao uso das substâncias psicoativas (BRADLEY *et al.*, 1989; WALLACE, 1989).

Estudos têm demonstrado que, assim como a administração repetida a uma substância psicoativa, a exposição repetida a episódios de estresse também pode promover sensibilização comportamental a uma posterior administração de uma substância de abuso. Esse fenômeno é chamado de sensibilização cruzada entre estresse e drogas. (ARAÚJO *et al.*, 2003; BILANG-BLEUEL *et al.*, 2002; COVINGTON *et al.*, 2005).

Sensibilização cruzada entre estresse e substâncias psicoativas de abuso tem sido amplamente demonstrada na literatura. Por exemplo, foi demonstrada sensibilização comportamental cruzada entre estresse e cocaína, nicotina, etanol, opióides e anfetamina (KALIVAS *et al.*, 1989; COVINGTON & MICZEK, 2001; ARAÚJO *et al.*, 2003; KAWAKAMI *et al.*, 2007; MCCORMICK & IBRAHIM, 2007; YAP & MICZEK, 2007).

Estudos epidemiológicos demonstram que o início do uso de drogas é observado em idades cada vez mais precoces. Neste sentido, estudos têm demonstrado que o abuso de drogas geralmente começa durante a adolescência um período da ontogenia em que os indivíduos apresentam características comportamentais específicas da idade, como a busca de novidades e comportamentos de risco (SPEAR, 2000; IZENWASSER & FRENCH, 2002). Por exemplo, em humanos o uso experimental de drogas é um comportamento de risco característico dessa etapa do desenvolvimento (SPEAR, 2000).

Trabalhos demonstram que adolescentes são mais sensíveis aos efeitos reforçadores das substâncias psicoativas de abuso (IZENWASSER & FRENCH, 2002). Entretanto devido à dificuldade metodológica e aspectos éticos a maioria dessas observações advém de estudos em modelos animais (ADRIANI & LAVIOLA, 2000; ELLIOTT *et al.*, 2004, MARIN *et al.*, 2008, CRUZ *et al.*, 2008). Por exemplo, foi demonstrado que ratos adolescentes podem auto-administrar quantidades maiores de anfetaminas quando comparados a animais adultos (SHAHBAZI *et al.* 2008; MATHEWS *et al.*, 2009). Estudos que utilizam o modelo de preferência condicionada por lugar, também demonstram que ratos adolescentes são mais sensíveis às propriedades reforçadoras dos psicoestimulantes que animais adultos (ZAKHAROVAA *et al.*, 2005). As diferenças nas respostas reforçadoras às drogas podem promover maior suscetibilidade ao desenvolvimento da dependência em adolescentes (SPEAR, 2000).

Embora a relevância do estudo dos mecanismos relacionados à dependência na adolescência, a grande maioria dessas pesquisas é realizada somente em animais adultos.

2. OBJETIVOS

Estudar se a exposição ao estresse, agudo ou crônico, de imobilização promove sensibilização comportamental cruzada com a anfetamina em ratos adolescentes e adultos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Parecer ético

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para uso de Humanos ou Animais em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP (CEP-13/2004) e os experimentos foram conduzidos seguindo os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - (COBEA).

3.2. Animais.

Foram utilizados ratos Wistar machos adolescentes e adultos provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista - UNESP. O período da adolescência foi definido entre o dia pós-natal (DPN) 28 ao DPN 42, e os animais foram considerados adultos após o DPN 60, como previamente descrito por Spear (2000). Os animais foram transferidos para o biotério do laboratório de Farmacologia do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia do Campus de Araraquara – UNESP, no mínimo sete dias antes do início dos experimentos. Eles foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ \text{C}$) e luz (ciclo 12/12 horas, luz acesa às 07:00h) e tiveram livre acesso a alimento e água. Os experimentos foram realizados na fase clara do ciclo de luz.

3.3. Fármaco

- d,l-anfetamina (Sigma®), dose 1,0 mg/kg solubilizada em solução salina (0,9%)

3.4. Estresse

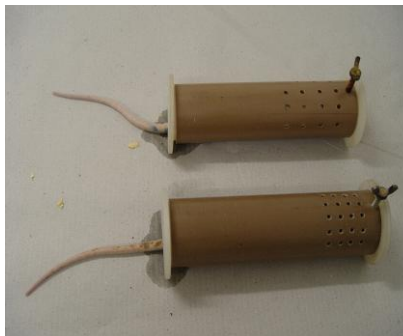


Figura 1 - Ratos adolescentes (acima) e adultos (abaixo) submetidos ao estresse de imobilização em tubos de PVC

Foi utilizado o protocolo de estresse de imobilização.

Para tanto os animais foram imobilizados em tubos de PVC (29,5 cm de comprimento X 7,0 cm de diâmetro- adultos ou 20,0 cm comprimento X 5,0 diâmetro adolescentes) durante 2 horas diárias por 10 dias (estresse repetido) ou durante 2 hora (estresse agudo). O grupo controle consistiu de

animais de mesma idade, mantidos nas mesmas condições laboratoriais, mas não expostos ao estresse.

3.5. Avaliação da atividade locomotora

Foi utilizada a caixa de medida automática da atividade locomotora, medindo 51,1 x 9,5 x 69,2 cm (largura x altura x comprimento). Esta caixa possuía 10 emissores de luz infravermelha, distantes 2,5 cm entre si e a 3,0 cm do piso da caixa. Cada unidade de locomoção correspondeu à interrupção de dois feixes de luz.



Figura 2 – Caixa de determinação da atividade locomotora

3.6. Análise Estatística

Os dados foram analisados por ANOVA bifatorial, (estresse x tratamento). Nos casos nos quais ANOVA mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) a comparação foi seguida pelo teste de Newman-Keuls.

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.1. Estresse agudo

Os animais foram imobilizados por duas horas. Cinco minutos após terem sido removidos dos tubos de imobilização eles foram colocados individualmente na caixa de atividade para habituação por 20 minutos. Imediatamente após o término da habituação os animais receberam injeção intraperitoneal de salina (0.9%) ou anfetamina (1 mg/Kg), e a atividade locomotora foi registrada por 40 minutos. Os animais controle foram diretamente colocados na caixa de atividade para habituação por 20 minutos e em seguida foram submetidos aos mesmos tratamentos, para a avaliação da atividade locomotora como descrito acima.

Dessa forma tivemos 4 grupos adolescentes e 4 adultos (n=6-8 animais em cada grupo): Estresse-salina (EST-SAL), Estresse-anfetamina (EST-ANF), Controle-salina (CONT-SAL) e Controle-anfetamina (CONT-ANF).

4.2. Estresse crônico

Os experimentos iniciaram no DPN 28 e 60, ratos adolescentes e adultos, respectivamente. Os animais foram submetidos ao protocolo de estresse conforme descrito no item 3.4. Três dias após a última sessão de estresse DPN 40 (adolescentes) ou DPN 72 (adultos) os animais foram colocados individualmente na caixa de atividade para habituação por 20 minutos. Imediatamente após o término da habituação os animais receberam injeção intraperitoneal de salina (0.9% i.p.) ou anfetamina (1 mg/Kg), e a atividade locomotora foi registrada por 45 minutos. Os animais controle foram mantidos em suas gaiolas moradias e manipulados duas

vezes por semana. No DPN 40 ou DPN 72 eles foram submetidos aos mesmos tratamentos, e tiveram a atividade locomotora registrada como descrito acima.

Dessa forma tivemos 4 grupos adolescentes e 4 adultos (n=8-11 animais em cada grupo): Estresse-salina (EST-SAL), Estresse-anfetamina (EST-ANF), Controle-salina (CONT-SAL) e Controle-anfetamina (CONT-ANF).

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da Sensibilização Cruzada entre o Estresse Agudo e Anfetamina em Ratos Adultos e Adolescentes.

5.1.1 Ratos adultos

A Figura 3 mostra os resultados da avaliação da atividade locomotora de ratos adultos controles ou que foram submetidos ao estresse agudo de imobilização por 2 horas e em seguida receberam injeções de salina ou anfetamina.

ANOVA demonstrou diferenças significativas para o fator tratamento [$F(1,17) = 38,21$; $p < 0,05$]. Porém não foi encontrada diferença para o fator estresse [$F(1,17) = 0,38$; $p = 0,54$]. Não foi demonstrada também interação significativa entre os fatores [$F(1,17) = 0,07$; $p = 0,79$].

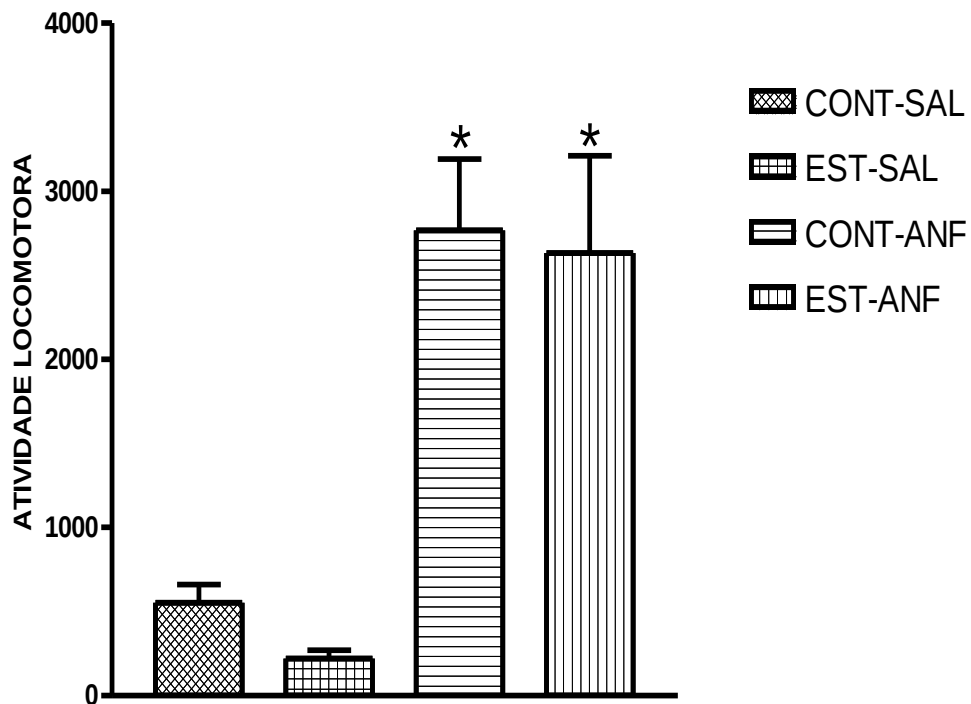


Figura 3 - Os histogramas representam a atividade locomotora induzida pela administração de anfetamina ou salina a ratos adultos expostos a estresse agudo de imobilização. * $p < 0,05$; comparado ao grupo CONT-SAL e EST-SAL.

5.1.2 Ratos adolescentes

A Figura 4 mostra os resultados da avaliação da atividade locomotora de ratos adolescentes controles ou que foram submetidos ao estresse agudo de imobilização por 2 horas e em seguida receberam injeções de salina ou anfetamina.

ANOVA demonstrou diferenças significativas para o fator tratamento [$F(1,18) = 14,65$; $p < 0,05$]. Porém não foi encontrada diferença para o fator estresse [$F(1,18) = 0,42$; $p = 0,52$]. Não foi demonstrada também interação significativa entre os fatores [$F(1,18) = 0,07$; $p = 0,79$].

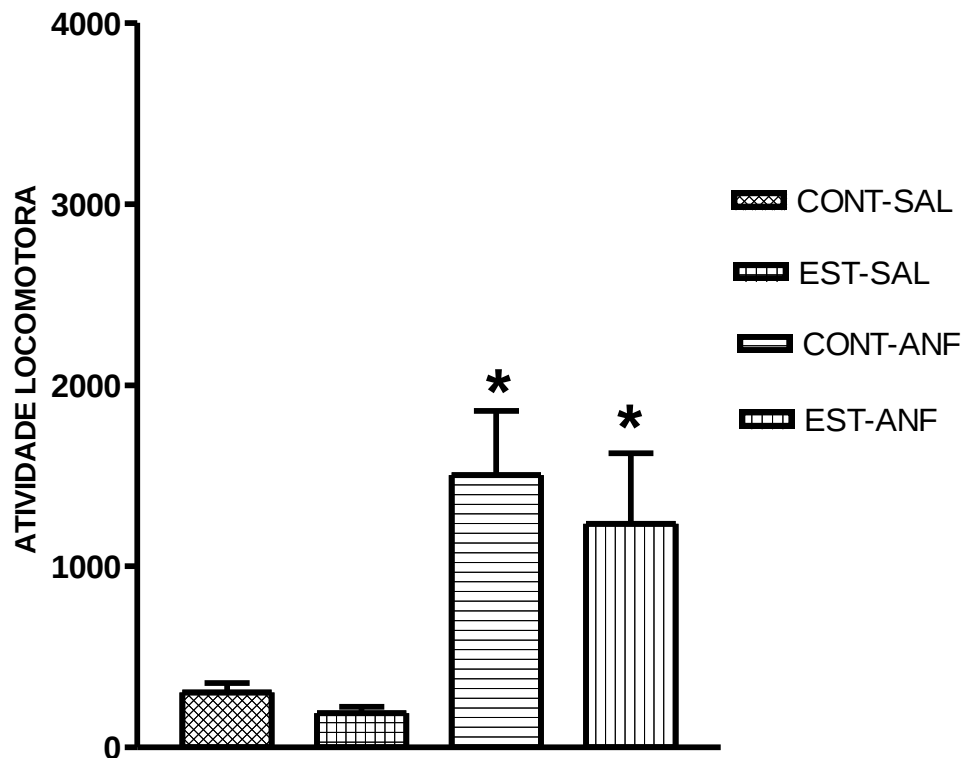


Figura 4 - Os histogramas representam a atividade locomotora induzida pela administração de anfetamina ou salina a ratos adolescentes expostos a estresse agudo de imobilização. * $p < 0,05$; comparado ao grupo CONT-SAL e EST-SAL.

5.2. Avaliação da Sensibilização Cruzada entre o Estresse Crônico e Anfetamina em Ratos Adultos e Adolescentes.

5.2.1 Ratos adultos

A Figura 5 mostra os resultados da avaliação da atividade locomotora de ratos adultos controles ou que foram submetidos ao estresse crônico de imobilização por 10 dias e três dias depois receberam injeções de salina ou anfetamina.

ANOVA demonstrou diferenças significativas para os fatores estresse [$F(1,35) = 4,9$; $p < 0,01$] e tratamento [$F(1,35) = 20,6$; $p < 0,001$]. Entretanto não foi demonstrada interação significativa entre os fatores [$F(1,35) = 1,0$; $p = 0,32$].

O teste de Newman-Keuls mostrou que a administração de anfetamina aumentou significamente a atividade locomotora tanto no grupo estresse quanto no grupo controle ($p < 0,05$). Entretanto este aumento foi maior nos animais do grupo estresse quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$), evidenciando a sensibilização cruzada entre anfetamina e estresse de imobilização.

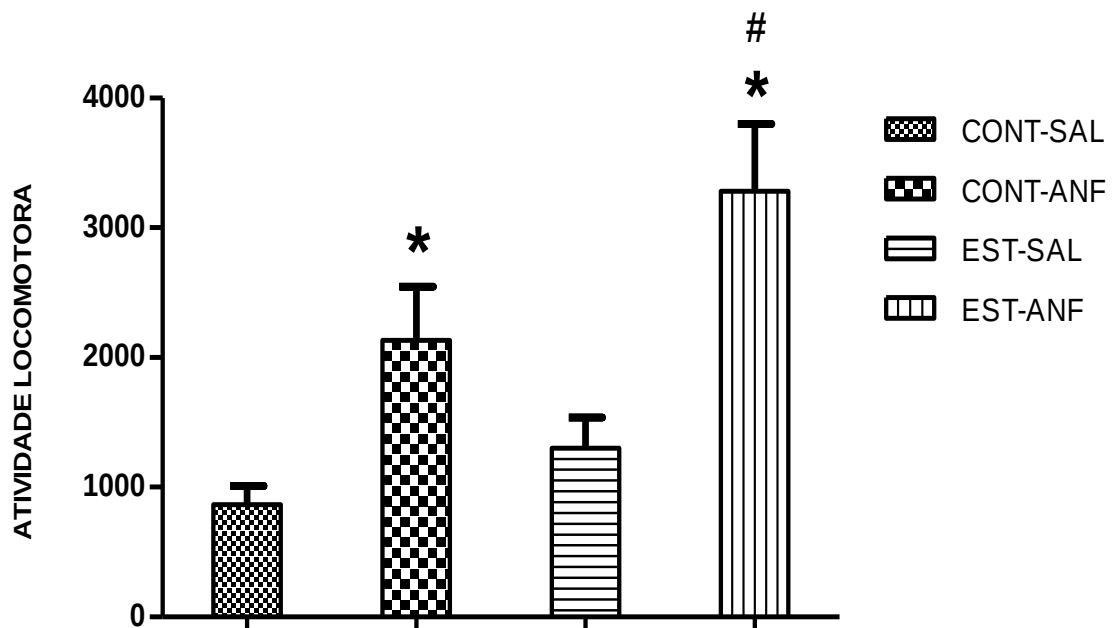


Figura 5 - Os histogramas representam a atividade locomotora induzida pela administração de anfetamina ou salina a ratos adultos 3 dias após a última exposição ao estresse repetido de imobilização. Os dados representam a média $\pm$ EPM de 9-11 animais por grupo. * $p < 0,05$; comparado ao grupo CONT-SAL e EST-SAL; # $p < 0,05$; comparado ao grupo CONT-ANF.

5.2.2 Ratos adolescentes

A Figura 6 mostra os resultados da avaliação da atividade locomotora de ratos adolescentes controles ou que foram submetidos ao estresse crônico de imobilização por 10 dias e três dias após receberam injeções de salina ou anfetamina.

ANOVA demonstrou diferenças significativas para os fatores estresse [$F(1,35) = 5,59$; $p < 0,01$] e tratamento [$F(1,35) = 15,36$; $p < 0,001$]. Entretanto não foi demonstrada interação significativa entre os fatores [$F(1,35) = 2,0$; $p = 0,16$] (Figura 6).

O teste de Newman-Keuls mostrou que a administração de anfetamina aumentou significativamente a atividade locomotora apenas no grupo estresse ($p < 0,05$), evidenciando a sensibilização cruzada entre anfetamina e estresse de imobilização. No grupo controle a anfetamina não foi capaz de estimular a locomoção (CONT-SAL *versus* EST-SAL; $p > 0,05$), mostrando que animais adolescentes são hiporesponsivos a esse psicoestimulante.

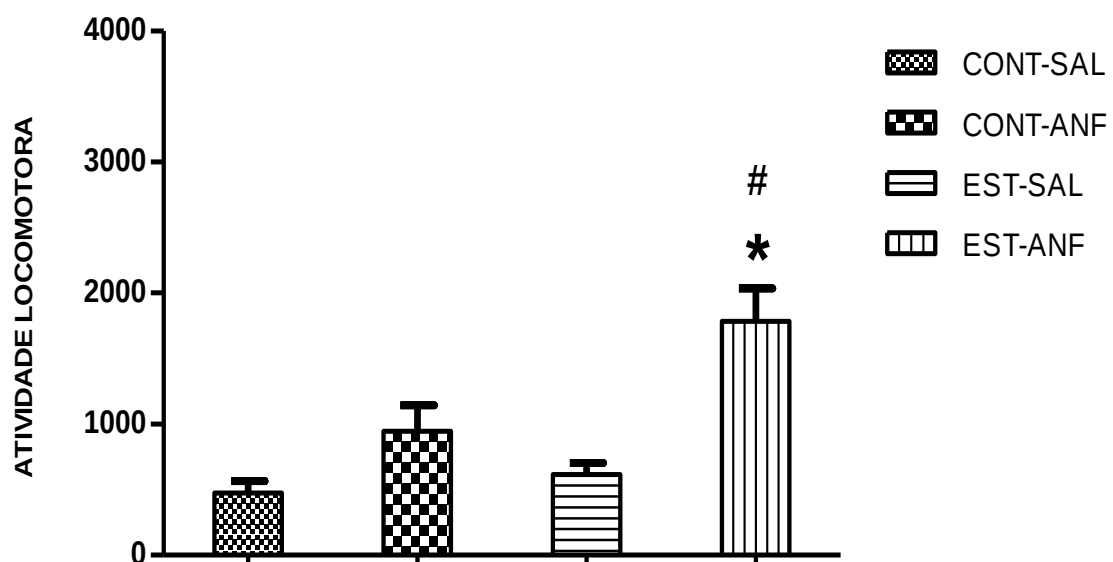


Figura 6 - Os histogramas representam a atividade locomotora induzida pela administração de anfetamina ou salina a ratos adolescentes 3 dias após a última exposição ao estresse repetido de imobilização. Os dados representam a média $\pm$ EPM de 9-10 animais por grupo. * $p < 0,05$; comparado ao grupo CONT-SAL e EST-SAL; # $p < 0,05$; comparado ao grupo CONT-ANF.

6. DISCUSSÃO

A sensibilização comportamental é um fenômeno bastante complexo, inúmeros fatores interferem no seu desenvolvimento, como por exemplo, genéticos, ambientais, condições experimentais e idade (ANTELMAN, 1980; ROBINSON *et al.*, 1988; CRUZ *et al.*, 2005).

Nossos resultados demonstraram que a exposição repetida ao estresse de imobilização promoveu sensibilização locomotora cruzada com anfetamina em ratos adultos e adolescentes. Entretanto, a exposição aguda ao estresse de imobilização não foi capaz de promover sensibilização cruzada em ratos adultos e adolescentes.

Nossos resultados estão de acordo com outros estudos que demonstram que ratos adultos e adolescentes expostos a diferentes tipos de estresse repetido, como choque nas patas, imobilização ou natação forçada apresentam aumento da resposta locomotora à administração subsequente de anfetamina ou cocaína (ANTELMAN, 1980; HERMAN, 1984; DÍAZ-OTÁÑEZ, 1997; ARAÚJO *et al.*, 2003; YAP & MICZEK, 2007; MICZEK *et al.*, 2008; DEROCHÉ, 1994). Por exemplo, foi demonstrado que ratos adultos submetidos a sessões repetidas de estresse de derrota social ou de imobilização apresentaram aumento na atividade locomotora em resposta à administração de anfetamina quando comparados aos animais controles (PACCHIONI *et al.*, 2002; DE JONG *et al.*, 2005). No mesmo sentido, também foi demonstrado que a exposição de ratos adolescentes ao estresse repetido de imobilização aumenta a resposta locomotora à cocaína (LEPSCH *et al.*, 2005).

Nossos resultados demonstraram também que a exposição aguda ao estresse de imobilização não foi capaz de promover sensibilização cruzada com anfetamina em ratos adultos e adolescentes. Estes resultados sugerem a

necessidade da exposição repetida ao um estímulo estressor para o desenvolvimento da sensibilização.

Os resultados do presente trabalho estão de acordo com os apresentados na literatura para ratos adultos que também demonstram a necessidade da exposição repetida para que ocorra a expressão da sensibilização cruzada entre estresse e psicoestimulantes (ARAUJO *et al.*, 2003; HAHN *et al.*, 1986). Por exemplo, Herman e colaboradores (1984), demonstraram que somente a exposição repetida ao estresse (neste caso, choque nas patas) e não a aguda, foi capaz de promover sensibilização locomotora à anfetamina. Entretanto nossos resultados diferem daqueles apresentados por Pacchioni e colaboradores (2002), estes autores demonstraram que a exposição aguda ao estresse de imobilização foi capaz de promover sensibilização locomotora cruzada com a anfetamina. Este fato pode ser devido a diferenças observadas entre os protocolos. No caso, Pacchioni *et al.* (2002) utilizaram a dose de anfetamina de 1,5 mg/kg, enquanto nós utilizamos a dose de 1,0 mg/kg. Outra diferença refere-se à operação para microdiálise que os animais utilizados por esses autores foram submetidos antes do teste, esse procedimento pode ser considerado uma situação de estresse, o que poderia colaborar para a sensibilização aguda observada por Pacchioni *et al.* (2002). Em nosso protocolo para exposição aguda ao estresse os animais foram imobilizados durante 2 horas e 25 minutos após o término do estresse (5 minutos de recuperação e 20 minutos de habituação à caixa de registro da atividade locomotora) os animais tiveram a atividade lomotora em resposta a anfetamina avaliada. Não observamos sensibilização cruzada entre estresse e imobilização aguda, poderíamos supor que duas horas de imobilização causa prejuízo à atividade locomotora dos animais, assim, testamos um grupo distinto que foi exposto a 1 hora de imobilização e

obtivemos resultados semelhantes aos dos animais que foram expostos a 2 horas de imobilização (dados não apresentados).

A sensibilização comportamental é considerada um comportamento neuroadaptativo induzido pela exposição repetida a uma substância psicoativa e caracterizada por alterações neuroquímicas e moleculares do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (ROBINSON & BERRIDGE, 1993; NESTLER, 2005). Essas alterações são homólogas àquelas que medeiam a compulsão e a fissura em humanos (ROBINSON & BERRIDGE, 1993).

Assim como as drogas, o estresse também é capaz de ativar o sistema mesocorticolímbico e sua persistência também pode promover plasticidades semelhantes às promovidas pelo uso contínuo de uma determinada substância de abuso (KALIVAS & DUFFY, 1989; MARINELLI & PIAZZA, 2002). Essas plasticidades podem envolver mecanismos pré e pós-sinápticos que favorecem a sensibilização do sistema mesocorticolímbico em especial do núcleo acumbens (NESTLER & AGHAJANIAN, 1997; NESTLER *et al.*, 2001).

Por exemplo, foi demonstrado que exposição repetida ao estresse ou drogas pode aumentar a quantidade basal de dopamina liberada no núcleo acúmbens (IMPERATO *et al.* 1993; PIERCE & KALIVAS, 1997; PONTIERE *et al.*, 1995). Após ser liberada na fenda sináptica a dopamina pode interagir com os receptores do subtipo D1, o que induz uma seqüência de eventos intracelulares que incluem a estimulação da proteína G estimulatória (Gs), ativação da adenilil ciclase, aumento de AMPc com conseqüente ativação da proteína quinase dependente de AMPc - PKA (LU *et al.*, 2006). Ortiz *et al.* (1996) demonstraram que a exposição repetida ao estresse de imobilização aumentou a quantidade da PKA no núcleo acúmbens de ratos. Outros estudos demonstram também aumento na expressão de delta Fos- B

no núcleo acúmbens após exposição repetida a diferentes tipos de estresse incluindo estresse de imobilização e de derrota social (PERROTTI *et al.*, 2004; VIALOU *et al.*, 2007). A importância de delta-FosB no desenvolvimento do uso compulsivo das drogas pode ser devido sua capacidade de aumentar ou diminuir a expressão de proteínas que sabidamente estão envolvidas na ativação do sistema de recompensa e motivação. Por exemplo, este fator de transcrição controla a expressão da proteína CDk5 (ciclina cinase dependente-5). Essa proteína tem um papel importante na manutenção do estado de fosforilação intracelular, pois ela pode fosforilar fosfatases inibindo sua ação e consequentemente aumentando, por exemplo, a ação da PKA (BIBB *et al.*, 2003).

Assim poderíamos supor que a sensibilização cruzada entre estresse e a anfetamina evidenciada em nosso estudo, poderia ser decorrente de adaptações no sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, induzidas pela exposição repetida ao estresse. Neste sentido, dados prévios do laboratório ainda não publicados obtidos utilizando o mesmo protocolo de exposição repetida ao estresse, observaram em ratos adultos e adolescentes, que este promoveu no núcleo acúmbens aumento da expressão dos RNA mensageiros das proteínas BDNF e receptores dopaminérgicos D1. Esses mesmos autores demonstraram ainda que a exposição repetida ao estresse aumentou a atividade de PKA e a quantidade Delta fosB no núcleo acúmbens. Podemos supor que essas alterações estariam relacionadas com a sensibilização cruzada entre estresse e anfetamina observada no presente trabalho. Pois as alterações encontradas por esses autores poderiam favorecer a sensibilização do sistema mesocorticolímbico aumentando assim, a resposta locomotora à administração de anfetamina.

7. CONCLUSÃO

A exposição crônica ao estresse de imobilização aumentou a locomoção em resposta à administração aguda de anfetamina, evidenciando a sensibilização cruzada entre estresse e anfetamina. Com base na literatura podemos sugerir que esse efeito do estresse resulta de adaptações neuroquímicas e moleculares do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico.

Já a exposição aguda de duas horas ao estresse de imobilização não foi suficiente para promover neuroadaptações que resultassem em sensibilização comportamental cruzada entre estresse e anfetamina, tanto em animais adultos quanto em animais adolescentes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIANI W.; LAVIOLA G. A unique hormonal and behavioral hyporesponsivity to both forced novelty and d-amphetamine in periadolescent mice. **Neuropharmacology**. v.39, p.334-34, 2000.

ANTELMAN S.M. Interchangeability of stress and amphetamine in sensitization. **Science**. v. 207, p. 329–330, 1980.

ARAUJO A.P.N.; DELUCIA R.; SCAVONE C.; PLANETA C.S. Repeated predictable or unpredictable stress: effects on cocaine-induced locomotion and cyclic AMP-dependent protein kinase activity. **Behav Brain Res**. v. 139, p. 75-81, 2003.

BIBB, J.A. Role of Cdk5 in neuronal signaling, plasticity, and drug abuse. **Neurosignals**. v.12, p.191-199, 2003.

BILANG-BLEUEL, A.; RECH, J.; DE CARLI, S.; HOLLSBOER, F.; REUL, J.M. Forced swimming evokes a biphasic response in CREB phosphorylation in extrahypothalamic limbic and neocortical brain structures in the rat. **Eur J Neurosci.** v.15, p.1048-1060, 2002.

BRADLEY B.P., PHILLIPS G., GREEN L., GOSSOP M. Circumstances surrounding the initial lapse to opiate use following detoxification. **Br J Psychiatry.** v. 154, p. 354-9, 1989.

CADONI C., DI CHIARA G. Differential changes in accumbens shell and core dopamine in behavioral sensitization to nicotine. **Eur J Pharmacol.** p. 23-5; 2000.

COVINGTON H.E. 3rd AND MICZEK K.A. Intense cocaine self-administration after episodic social defeat stress, but not after aggressive behavior: dissociation from corticosterone activation. **Psychopharmacology (Berl).** v. 183, p. 331-340, 2005.

COVINGTON III, H.E.; MICZEK, K.A. Repeated social-defeat stress, cocaine or morphine: Effects on behavioral sensitization and intravenous cocaine self-administration "binges". **Psychopharmacology (Berl).** v. 158, p. 388-399, 2001.

CRUZ F.C.; MARIN M.T.; PLANETA C.S. The reinstatement of amphetamine-induced place preference is long-lasting and related to decreased expression of AMPA receptors in the nucleus accumbens. **Neuroscience.** v. 151, p. 313-319, 2008.

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

DE JONG J.G.; WASILEWSKI M.; VAN DER VEGT B.J.; BUWALDA B.; KOOLHAAS J.M. A single social defeat induces short-lasting behavioral sensitization to amphetamine. **Physiol Behav.** v. 83, p. 805-811, 2005.

DEMBO, R.; DERTKE, M.; BORDERS, S.; WASHBURN, M.; SCHMEIDLER, J. The relationship between physical and sexual abuse and tobacco, alcohol, and illicit drug use among youths in a juvenile detention center. **Int J Addict.** v. 23, p. 351-378, 1988.

DEROCHE V. Social isolation-induced enhancement of the psychomotor effects of morphine depends on corticosterone secretion. **Brain Res.** v. 640, p. 136–139, 1994.

DÍAZ-OTÁÑEZ C.S. D1 and D2 dopamine and opiate receptors are involved in the restraint stress-induced sensitization to the psychostimulant effects of amphetamine. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 58, p. 9-14, 1997.

ELLIOTT B.M.; FARADAY M.M.; PHILLIPS J.M.; GRUNBERG N.E. Effects of nicotine on elevated plus maze and locomotor activity in male and female adolescent and adult rats. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 71, p. 21-28, 2004.

HAHN, B., R.M. ZACHARKO & H. ANISMAN. Alterations of amphetamine elicited preservation and locomotor excitation following acute and repeated stressor application. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 25: 29–33, 1986.

HANSON G.R., RAU K.S., FLECKENSTEIN A.E. The methamphetamine experience: a NIDA partnership. **Neuropharmacology.** 47 Suppl 1:92-100. Review. 2004.

HERMAN, J.P., L. STINUS & M. LE MOAL. Repeated stress increases locomotor response to amphetamine. **Psychopharmacology** 84: 431–435, 1984.

IMPERATO, A.; S. CABIB & S. PUGLISI-ALLEGRA. Repeated stressful experiences differently affect the time-dependent responses of mesolimbic dopamine system to the stressor. **Brain Res.** v. 601; p. 333–336, 1993.

IZENWASSER S. AND FRENCH D. Tolerance and sensitization to the locomotor-activating effects of cocaine are mediated via independent mechanisms. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 73, p. 877-882, 2002.

JACOBSEN, L.K.; SOUTHWICK, S.M.; KOSTEN, T.R. Substance use disorders in patients with posttraumatic stress disorder: a review of the literature. **Am J Psychiatry.** v.158, p.1184-90, 2001.

KALIVAS P.W.; DUFFY P.; BARROW J. Regulation of the mesocorticolimbic dopamine system by glutamic acid receptor subtypes. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 251, p. 378-387, 1989.

KALIVAS P.W., DUFFY P. Sensitization to repeated morphine injection in the rat: possible involvement of A10 dopamine neurons. **J Pharmacol Exp Ther.** p. 204-12; 1987.

KAWAKAMI, S.E.; QUADROS, I.M.; TAKAHASHI, S.; SUCHECKI, D. Long maternal separation accelerates behavioural sensitization to ethanol in female, but not in male mice. **Behav Brain Res.** 2007. (doi:10.1016/j.bbr.2007.06.023).

LARANJEIRAS, R., RIBEIRO, M. A evolução do conceito de dependência química. In: Gigliotti, A. Guimarães, A. **Dependência, Compulsão e Impulsividade**. Rio de Janeiro: Rubio, 2006. Cap.6

LENOIR M, AHMED SH. Heroin-induced reinstatement is specific to compulsive heroin use and dissociable from heroin reward and sensitization. **Neuropsychopharmacology**. p. 616-24; 2007.

LEPSCH L.B.; GONZALO L.A.; MAGRO F.J.; DELUCIA R.; SCAVONE C.; PLANETA C.S. Exposure to chronic stress increases the locomotor response to cocaine and the basal levels of corticosterone in adolescent rats. **Addict Biol**. v. 10, p. 251-256, 2005.

LU L., KOYA E., ZHAI H., HOPE B.T., SHAHAM Y. Role of ERK in cocaine addiction. **Trends Neurosci**. v.29, p.695-703, 2006.

LUNA, G.C. Use and abuse of methamphetamine-type stimulants in the United States of America. **Rev Panam Salud Publica**. v.9, p.114-122, 2001.

MARIN M.T.; PLANETA C.S. Maternal separation affects cocaine-induced locomotion and response to novelty in adolescent, but not in adult rats. **Brain Res**. v. 1013, p. 83-90, 2004.

MARIN M.T.; CRUZ F.C.; PLANETA C.S. Cocaine-induced behavioral sensitization in adolescent rats endures until adulthood: lack of association with GluR1 and NR1 glutamate receptor subunits and tyrosine hydroxylase. **Pharmacol Biochem Behav**. p. 109-14, 2008.

MARINELLI, M.; PIAZZA, P.V. Interaction between glucocorticoid hormones, stress and psychostimulant drugs. **Eur J Neurosci**. v.16, p.387-394, 2002.

MATHEWS I.Z.; WATERS P.; MCCORMICK C.M. Changes in hyporesponsiveness to acute amphetamine and age differences in tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the brain over adolescence in male and female rats. **Dev Psychobiol.** v. 51, p. 417-28, 2009.

MCCORMICK C.M., IBRAHIM F.N. Locomotor activity to nicotine and Fos immunoreactivity in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in adolescent socially-stressed rats. **Pharmacol Biochem Behav.** p. 92-102; 2007.

MENDEZ I.A.; WILLIAMS M.T.; BHAVSAR A.; LU A.P.; BIZON J.L.; SETLOW B. Long-lasting sensitization of reward-directed behavior by amphetamine. **Behav Brain Res.** v. 201, p. 74-79, 2009.

MICZEK K.A.; YAP J.J.; COVINGTON H.E. 3rd Social stress, therapeutics and drug abuse: preclinical models of escalated and depressed intake. **Pharmacol Ther.** v. 120, p. 102-128, 2008.

MISERENDINO, M.J.; NESTLER, E.J. Behavioral sensitization to cocaine: modulation by the cyclic AMP system in the nucleus accumbens. **Brain Res.** v.674, p.299-306, 1995.

NESTLER E.J., AGHAJANIAN G.K. Molecular and cellular basis of addiction. **Science.** v.278, p.58-63, 1997.

NESTLER E.J. Is there a common molecular pathway for addiction? **Nat. Neurosci.** v. 11, p. 1445-1449, 2005.

NESTLER, E.J.; HYMAN S.E.; ROBERT, C.M. **Molecular neuropharmacology: a foundation for clinical neuroscience.** New York: McGraw-Hill, 2001. 539p.

O'BRIEN, C. P. Drug Addiction and abuse. In: HARDMAN, J. D.; LIMBIRD, L. E. (Eds). **Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11th Ed., Pregamon, New York, p. 621-642, 2006.

PACCHIONI A.M.; GIOINO G.; ASSIS A.; CANCELA L.M. A single exposure to restraint stress induces behavioral and neurochemical sensitization to stimulating effects of amphetamine: involvement of NMDA receptors. **Ann N Y Acad Sci**. v. 965, p. 233-246, 2002.

PERROTTI, L.I.; HADEISHI, Y.; ULERY, P.G.; BARROT, M.; MONTEGGIA, L.; DUMAN, R.S.; NESTLER, E.J. Induction of delta-FosB in reward-related brain structures after chronic stress. **J Neurosci**. v. 24, p. 10594-10602, 2004.

PIAZZA, P. V.; LEMOAL, M. The role of stress in drug self-administration. **Trends Pharmacol Sci**. v. 19, p. 67-74, 1998.

PIERCE R.C. AND KALIVAS P.W. A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. **Brain Res Brain Res Rev**. v. 25, p. 192-216, 1997.

PONTIERE, F.E.; TANDA, G.; ORZI, F.; DI CHIARA, G. Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. **Nature**, v.382, p.255-257, 1995.

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

ROBINSON TE, BERRIDGE KC. Incentive-sensitization and addiction. **Addiction**. p.103-114; 2001. Review.

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

ROBINSON, T.E.; JURSON, P.A.; BENNETT, J.A.; BENTGEN, K.M. Persistent sensitization of dopamine neurotransmission in ventral striatum (nucleus accumbens) produced by prior experience with (+)-amphetamine: a microdialysis study in freely moving rats. **Brain Res.** v.462, p.211-222, 1988.

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

SANTOS G.C.; MARIN M.T.; CRUZ F.C.; DELUCIA R.; PLANETA C.S. Amphetamine- and nicotine-induced cross-sensitization in adolescent rats persists until adulthood. **Addict Biol.** v. 14, p. 270-275, 2009.

SHAHBAZI M.; MOFFETT A. M.; WILLIAMS B. F.; FRANTZ K. J. Age- and sex-dependent amphetamine self-administration in rats. **Psychopharmacology.** v. 196, p. 71-81, 2008.

SINHA, R.; CATAPANO, D.; O'MALLEY, S. Stress-induced craving and stress response in cocaine dependent individuals. **Psychopharmacology.** v. 142, p. 343 - 351, 1999.

SPEAR L.P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neuroscience Biobehavior.** v. 24, p. 417-63, 2000.

TIRELLI E.; LAVIOLA G.; ADRIANI W. Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews.** v. 27, p. 163-178, 2003.

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

UNODC. World Drug Report: United Nations Publication, v.E.10.XI.13. 2010.

VIALOU, V.; BALASSE, L.; DUMAS, S.; GIROS, B.; GAUTRON, S. Neurochemical characterization of pathways expressing plasma membrane monoamine transporter in the rat brain. **Neuroscience**. v.144, p.616-622, 2007.

WALLACE B.C. Psychological and environmental determinants of relapse in crack cocaine smokers. **J Subst Abuse Treat**. v. 6, p. 95-106, 1989.

YAP J.J.; MICZEK K.A. Social defeat stress, sensitization, and intravenous cocaine self-administration in mice. **Psychopharmacology** (Berl). v. 192, p. 261-273, 2007.

ZAKHAROVAA E.; LEONIA G.; KICHKOA I.; IZENWASSER S. Differential effects of methamphetamine and cocaine on conditioned place preference and locomotor activity in adult and adolescent male rats. **Neuroscience**. v. 135, p. 987-998, 2005.