

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – CAMPUS DE ARARAQUARA

GABRIELLE CUNHA ALVES

**SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL AO ETANOL E NEUROADAPTAÇÕES
ENVOLVENDO A PROTEÍNA (DELTA)FOSB: EFEITOS DO TRATAMENTO COM
N-ACETILCISTEÍNA EM CAMUNDONGOS**

Araraquara - SP

2015

GABRIELLE CUNHA ALVES

**SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL AO ETANOL E NEUROADAPTAÇÕES
ENVOLVENDO A PROTEÍNA (DELTA)FOSB: EFEITOS DO TRATAMENTO COM
N-ACETILCISTEÍNA EM CAMUNDONGOS**

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 Farmacêutica-Bioquímica. Orientador: Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin.
Co-orientador: Gessynger Morais Silva.

Araraquara - SP

2015

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, que me deram todo o apoio para concluir essa caminhada até aqui. Sem vocês nada teria sido possível. Obrigada por sempre estarem por perto e por se orgulharem de todos os passos que dou.

Ao meu melhor amigo e companheiro de todas as horas Rythy Ogasawara, muito obrigada pela paciência, ajuda, apoio e compreensão durante todos esses anos.

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração por todo o apoio, carinho e respeito pelo qual trata seus alunos.

Ao professor Marcelo Tadeu Marin, pela orientação, apoio, confiança, dedicação e principalmente paciência. Obrigada pela oportunidade.

Ao meu co-orientador Gessynger Morais Silva, por toda a ajuda, paciência em ensinar e dedicação. Esse trabalho não seria possível sem você.

As queridas Rosana Finoti Pupim Silva e Elisabete Zocal Paro Lepera por toda paciência, dedicação, ajuda e amizade. Vocês são maravilhosas.

A minha grande amiga Celina Ferrari Laverde. Muito obrigada por todo carinho, amizade e companheirismo. Os finais de semana de experimento eram infinitamente melhores na sua companhia.

As minhas amigas Gabriela Fávero Galvão, Gabriela Zago, Helena Sayuri Uchina e Mariana de Oliveira da Costa, por toda amizade e carinho durante todos esses anos. Viver em Araraquara foi muito especial por causa de vocês também.

Ao Projeto de Assistência Farmacêutica Estudantil e todas as pessoas que fizeram parte dele durante todos esses anos. Obrigada pelas amizades, conhecimento e lições que levarei para o resto da vida.

A Prof. Adelia Emilia de Almeida por todo o aprendizado, dedicação e amizade.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Receptores e transportadores de glutamato (proteínas) importantes na regulação da plasticidade sináptica excitatória e que podem ser alvos para o tratamento da dependência.....	12
Figura 2 - Desenho experimental “Avaliação dos efeitos da N-Ac na sensibilização comportamental induzida pelo etanol”.....	19
Figura 3 - Padronização da sensibilização comportamental ao etanol - primeira tentativa....	21
Figura 4 - Padronização da sensibilização comportamental ao etanol - segunda tentativa.....	22
Figura 5 - Comparação do peso dos animais nas duas tentativas de padronização da sensibilização, em seus respectivos grupos de tratamento.....	23
Figura 6 - Efeitos do tratamento com N-AC no desenvolvimento da sensibilização comportamental, grupos salina.....	25
Figura 7 - Efeitos do tratamento com N-AC no desenvolvimento da sensibilização comportamental, grupos etanol.....	25
Figura 8 - Efeitos do tratamento com N-Ac na expressão de Δ FosB no CPF.....	27
Figura 9 - Efeitos do tratamento com N-Ac na expressão de Δ FosB no Acb.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

N-Ac	N-Acetilcisteína
Acb	Núcleo Acumbens
CPF	Córtex Pré-Frontal
CEBRID	Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas
SNC	Sistema Nervoso Central
CEUA/FCFAR	Comitê de Ética para Utilização de Animais em pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CA	Campo Aberto
EPM	Erro Padrão da Média
GLT1	Transportador de Glutamato da Glia
GSH	Glutationa
mGluR2	Receptor Glutamatérgico Metabotrópico do tipo II
xCT	Trocador cistina/glutamato
ROS e RNS	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, respectivamente

Sumário

1. INTRODUÇÃO	10
1.1.Etanol: Histórico e atualidade	10
1.2.Dependência ao etanol e modelos animais	10
1.3.N-Acetilcisteína	14
2. OBJETIVO	15
2.1.Objetivos Gerais	15
2.2.Objetivos Específicos	15
2.2.1. Sensibilização comportamental	15
2.2.2. Quantificação de Δ FosB	15
3. MATERIAL e MÉTODOS	15
3.1.Animais	15
3.2.Sensibilização comportamental ao etanol	16
3.3.Dissecação das áreas encefálicas e quantificação de proteínas por Western Blotting	16
3.4.Experimento 1 – Padronização da sensibilização comportamental ao etanol: primeira tentativa.	18
3.5.Experimento 2 – Padronização da sensibilização comportamental ao etanol: segunda tentativa.	18
3.6.Experimento 3 - Avaliação dos efeitos da N-Ac no desenvolvimento da sensibilização comportamental ao etanol.	18
3.7.Análise Estatística.	19
4. RESULTADO	20
4.1.Experimento 1 – Padronização da sensibilização comportamental ao etanol – primeira tentativa	20
4.2.Experimento 2 – Padronização da sensibilização comportamental ao etanol – segunda tentativa.	21
4.2.1. <i>Comparação do peso dos animais nas tentativas de padronização.</i>	23
4.3.Efeitos da N-Ac no desenvolvimento da sensibilização comportamental ao etanol	23
4.4.Padronização da quantificação de Δ FosB por Western Blot	26
4.5.Efeitos da N-Ac na expressão de Δ FosB no PFC e Acb	26
6. DISCUSSÃO	28
7. CONCLUSÃO	34

REFERÊNCIAS35
--------------------	---------

RESUMO

Os tratamentos farmacológicos empregados atualmente na dependência de etanol são pouco eficazes, sendo necessários novos fármacos para esse fim. O pró-fármaco N-Acetilcisteína (N-Ac) tem demonstrado eficácia no tratamento da dependência à cocaína e nicotina em pesquisas pré-clínicas e estudos clínicos piloto. Quando administrada, a N-Ac é convertida em cisteína e posteriormente em cistina, a qual tem ação no sistema nervoso central. Entretanto, existem poucos dados sobre a possível aplicação da N-Ac na dependência de etanol. A sensibilização comportamental consiste do aumento gradual do efeito psicoestimulante induzido pela administração repetida de drogas que induzem dependência, incluindo o etanol, e seu desenvolvimento tem sido relacionado à neuroadaptações importantes na dependência. Essas neuroadaptações ocorrem em circuitos neurais que medeiam o efeito reforçador dessas drogas e podem envolver várias proteínas. A proteína Δ FosB se acumula em neurônios após sua ativação repetida e medeia mudanças na resposta às drogas de abuso de forma bastante duradoura. Essas alterações se manifestam principalmente em neurônios do Núcleo Acumbens (Acb) e Córtex pré-frontal (CPF). Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do tratamento com N-Ac no desenvolvimento da sensibilização comportamental ao etanol e nas alterações da proteína Δ FosB em camundongos. Camundongos Suíços machos foram expostos a um protocolo de sensibilização comportamental padronizado para as condições experimentais do laboratório e tratados com N-Ac. Ao fim do procedimento de sensibilização comportamental, os animais foram eutanasiados e seus encéfalos retirados para quantificação de Δ FosB por western blotting. Foram realizados dois experimentos de padronização do protocolo de sensibilização comportamental. O primeiro, apesar de efetivo em demonstrar o desenvolvimento da sensibilização, não foi eficaz em permitir a avaliação da expressão da sensibilização. Assim, a idade dos animais e as condições de luminosidade e cor do aparato de avaliação da locomoção foram alteradas e um novo protocolo foi proposto. No segundo protocolo foi possível observar o desenvolvimento e a expressão da sensibilização comportamental, e este protocolo passou a ser utilizado. O tratamento com N-Ac foi eficaz em inibir o desenvolvimento da sensibilização comportamental e das alterações na proteína Δ FosB, sugerindo que esse pró-fármaco tem potencial para inibição de alterações comportamentais e neurais relacionadas ao desenvolvimento da dependência ao etanol.

Palavras-chave: etanol; N-Acetilcisteína; Δ FosB; trocador xCT; núcleo acumbens; córtex pré-frontal.

ABSTRACT

Pharmacological treatments currently used in ethanol addiction are inefficient, requiring new drugs for this purpose. The pro-drug N-Acetylcysteine (N-Ac) has shown efficacy in the treatment of addiction to cocaine and nicotine in preclinical research and clinical pilot studies. When administered, N-Ac is subsequently converted to cysteine, and cystine, which has an action on the central nervous system. However, there are few data about the possible application of N-Ac in the ethanol addiction. Behavioral sensitization is the gradual increase of the psychostimulant effects induced by repeated administration of drugs of abuse, including ethanol, and its development has been linked to important neuroadaptations in addiction. These neuroadaptations occur in neural circuits that mediate the reinforcing properties of these drugs and may involve several proteins. The Δ FosB protein accumulates in neurons after repeated activation and mediates long lasting changes in response to drugs of abuse. These changes are manifested mainly in the nucleus accumbens (Acb) and prefrontal cortex (PFC) neurons. The aim of the study was to evaluate the effects of N-Ac treatment in the development of ethanol behavioral sensitization and in alterations in the Δ FosB protein in mice. Swiss male mice were exposed to a standardized behavioral sensitization protocol to the experimental conditions of the laboratory and treated with N-Ac. At the end of behavioral sensitization procedure, animals were euthanized and their brains removed for Δ FosB quantification by Western blotting. Two experiments of behavioral sensitization were performed to the standardization of the protocol. The first, although effective in demonstrating the development of behavioral sensitization, was not effective in allowing the evaluation of the expression of the behavioral sensitization. The age of the animals and the conditions of luminosity and color of locomotion apparatus were changed and a new protocol has been proposed. In the second protocol it observed the development and expression of behavioral sensitization, and this protocol was used for next studies. Treatment with N-Ac was effective in inhibit the development of behavioral sensitization and correlated molecular alterations in Δ FosB, suggesting that this pro-drug has potential to inhibit behavioral and neuronal alterations related to ethanol addiction.

Keywords: ethanol; N-acetylcysteine; Δ FosB; xCT antiporter; nucleus accumbens; prefrontal cortex.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Etanol: Histórico e atualidade

O uso de drogas psicotrópicas e o consumo de álcool pela humanidade ocorrem desde a antiguidade. Ao longo do tempo, esse consumo esteve associado a diversos aspectos e funções, entre eles o favorecimento da integração social (CIARLO; MASTROIANNI, 2010).

Entre as principais substâncias psicoativas consumidas em nosso país, o álcool apresenta uma das maiores prevalências; seu uso é lícito e o consumo é estimulado através da mídia, recebendo uma representação bastante diferenciada, quando comparado às outras drogas. Um estudo domiciliar realizado pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) verificou que o álcool foi uma das drogas com maior prevalência de uso na vida (74,6%), sendo as estimativas de dependentes de álcool em cerca de 12,3% (CARLINI *et al.*, 2006).

Embora o uso de álcool possa ter ampla aceitação por grande parte da sociedade, o seu consumo excessivo está associado a inúmeras consequências, como acidentes de trânsito, aumento da violência, desenvolvimento da dependência, além de ser responsável por 95% das internações hospitalares provocadas pelo uso de substâncias psicotrópicas (CARLINI; GALDURÓZ; NOTO *et al.*, 2002).

Nos países em desenvolvimento com baixa taxa de mortalidade, como o Brasil, o consumo de etanol é o maior fator de risco de morbidade e mortalidade. Nos países desenvolvidos, a ingestão de etanol é o terceiro fator de risco, superado somente pelo tabagismo e hipertensão arterial (EZZATI *et al.*, 2002).

Assim, considerando-se o impacto do alcoolismo para os programas de saúde pública, pesquisas sobre os mecanismos de desenvolvimento da dependência ao etanol e seu tratamento são de grande importância.

1.2. Dependência de etanol e sensibilização comportamental

A dependência de substâncias psicoativas é conceituada como um conjunto de sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos que indicam que o indivíduo perdeu o controle do uso da substância e continua a usá-la apesar de reconhecer as consequências adversas deste uso (DACKIS; O'BRIEN, 2001; KARILA *et al.*, 2008). Esta é uma desordem

crônica recorrente caracterizada por: a) compulsão da procura e consumo da substância, b) perda do controle para limitar o consumo, e c) aparecimento de estados emocionais negativos, como por exemplo, disforia e ansiedade quando o acesso à substância psicoativa é impedido (KOOB; LeMOAL, 2008).

A busca e consumo de etanol, e também de outras substâncias psicoativas de abuso, é mediado principalmente pela ativação da via dopaminérgica mesocorticolímbica (DI CHIARA; BASSAREO, 2007). Estudos pela técnica de microdiálise demonstraram que a administração de etanol (LOF *et al.*, 2007), cocaína, anfetamina, morfina ou nicotina (DI CHIARA; IMPERATO, 1988) aumentam a liberação de dopamina em área encefálicas, como o Acb.

O sistema mesocorticolímbico é o responsável pela identificação de estímulos relevantes. É composto por neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral (VTA) que se projetam para o Acb e CPF. É ativado, por exemplo, por estímulos reforçadores naturais de experiências individuais, como sexo e comida. Drogas de abuso também ativam o via mesocorticolímbica e causam neuroadaptações prejudiciais que estão relacionadas á dependência. A desregulação da homeostase do CPF e Acb são cruciais para a transição do “uso social” para o uso descontrolado de substâncias psicoativas (KOOB; VOLKOW, 2010).

A neurotransmissão glutamatérgica também é alterada pelo uso de drogas. A concentração sináptica desse neurotransmissor no Acb é aumentada quando a cocaína é administrada, mas sua concentração basal, na retirada da cocaína, apresenta-se reduzida após administração crônica da droga (BAKER *et al.*, 2003).

Tem sido demonstrado que a vulnerabilidade da recaída a droga de abuso envolve o recrutamento de projeções glutamatérgicas para o Acb e CPF, e está associada a mudanças duradoras na transmissão sináptica de glutamato. Modelos animais tem demonstrado que o desenvolvimento da dependência está associado com a desregulação da liberação de glutamato de projeções do CPF para o Acb. Quando grandes quantidades de glutamato são liberadas na fenda sináptica, pelo uso de drogas de abuso, por exemplo, eles acabam ativando receptores metabotrópicos de glutamato extrasinápticos, assim como os transportadores gliais GLT1 e xCT. Esses transportadores são responsáveis por diminuir essa quantidade excessiva de glutamato liberado na sinapse. Entretanto, o uso crônico de drogas de abuso ocasiona uma baixa regulação desses transportadores e receptores no Acb, impedindo o controle da homeostase desse neurotransmissor e proporcionando as neuroadaptações responsáveis pelo desenvolvimento da dependência. A Figura 1 mostra os receptores e transportadores de glutamato no Acb (BROWN; KUPCHIK; KALIVAS, 2013).

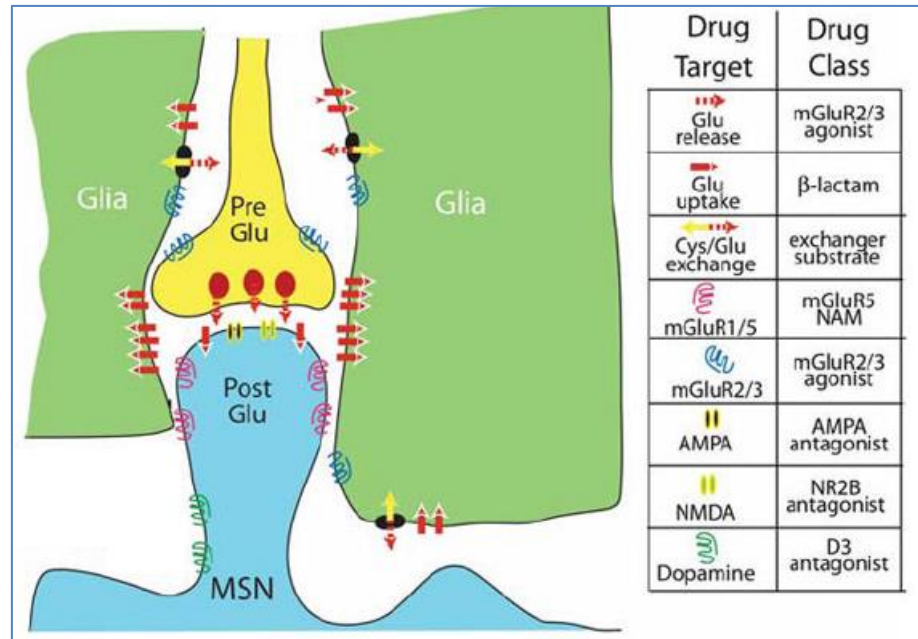


Figura 1. Receptores e transportadores de glutamato importantes na regulação da plasticidade sináptica excitatória e que podem ser alvos para o tratamento da dependência. A legenda de acompanhamento para as proteínas específicas também indica a categoria de drogas que hipoteticamente podem ser terapêuticamente úteis baseadas no tipo de neuropatologias glutamatérgicas produzidas no CPF e Acb. Abreviaturas: AMPA, α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoxazolpropiónico; Cys/ Glu exchange, trocador cistina/glutamato; mGluR., receptor metabotrópico de glutamato; MSN, neurônio espinhoso médio; NMDA, N-metil-D-aspartato; NR2B, N-metil-D-aspartato receptor de subtipo 2B; VTA, área tegmental ventral

Fonte: (KALIVAS; VOLKOW, 2012).

Modelos animais têm sido desenvolvidos para estudar aspectos comportamentais e alterações neuronais relacionadas à dependência do etanol. No entanto, o alcoolismo é uma desordem complexa que não pode ser “modelada” como um todo em um único modelo animal (SPANAGEL, 2000).

A sensibilização comportamental, também chamada de tolerância inversa, é um modelo animal de alterações relacionadas à dependência de substâncias psicoativas. A sensibilização comportamental consiste do aumento progressivo da atividade locomotora desencadeado pela droga após sua administração repetida (ROBINSON; BERRIDGE, 2003). Essa alteração comportamental surge em resposta à administração das drogas que produzem dependência (PLANETA; MARIN, 2002), incluindo o etanol (ABRAHAO *et al.*, 2008), e está associada a neuroadaptações na via dopaminérgica mesocorticolímbica e à perda do controle sobre o consumo da droga (ROBINSON; BERRIDGE, 2003). A sensibilização comportamental pode ser duradoura e persistir por meses após o tratamento repetido com substâncias que causam dependência (HOPE *et al.*, 2006).

O etanol, em concentrações sanguíneas habitualmente alcançadas em humanos, pode agir em diversos receptores e proteínas efetoras, enquanto em altas concentrações pode haver

alteração na composição lipídica das membranas citoplasmáticas. Os seus alvos primários são receptores glutamatérgicos NMDA, gabaérgicos GABA_A, serotoninérgicos 5-HT₃, colinérgicos nicotínicos, canais de Ca⁺² do tipo L e canais de K⁺ ativados por proteína G (FADDA; ROSSETTI, 1998; VANGELIENE *et al.*, 2008). Alguns estudos tem demonstrado que a manipulação do sistema opióide pode modificar os efeitos estimulantes e a sensibilização comportamental induzida pelo etanol (CAMARINI; PIRES; CALIL, 2000; ABRAHAO; QUADROS; SOUZA-FORMIGONI, 2008). A ligação do etanol com esses sítios primários altera a atividade de diversos neurônios, levando finalmente a mudanças comportamentais como desinibição, sedação e hipnose.

Devido a seu efeito depressor nos neurônios, o etanol possui efeitos bifásicos no organismo, os quais dependem da dose. Inicialmente é possível caracterizar efeitos estimulantes, decorrentes do bloqueio dos centros inibidores do sistema nervoso central (SNC), seguidos de profunda depressão do SNC (POHORECKY, 1977). Essa característica pode ser facilmente visualizada em modelos animais por meio da avaliação da atividade locomotora. Doses baixas a moderadas de etanol administradas intraperitonealmente causam inicialmente aumento da atividade locomotora seguida de supressão da locomoção (SMOOTHY; BERRY, 1985; TAMBOUR *et al.*, 2006). A análise de genes de expressão imediata ou a quantificação de seus produtos, como as proteínas Fos, FosB, FRA-1 e FRA-2, (reguladores transcricionais que modulam a síntese de certas enzimas sinalizadoras da célula) são comumente utilizadas para mapeamento da ativação neuronal. Quando as células são ativadas por sinais elétricos, fármacos ou outros estímulos ambientais, ocorre a produção dessas proteínas da família Fos especificamente nas células ativadas (HUGHES; DRAGUNOW, 1995; NESTLER 2001). Esses produtos de genes de expressão imediata são produzidos rapidamente, mas de forma transitória, sendo degradados em poucas horas. Contudo, a proteína ΔFosB, um derivado do gene *FosB* via *splice* alternativo, tem a degradação muito lenta e se acumula no interior das células no decorrer de dias de tratamentos repetidos, como a administração de drogas de abuso (NESTLER; KELZ; CHEN, 1999). Dessa forma, a detecção do fator de transcrição ΔFosB pode ser utilizada para identificação de neurônios repetidamente ativados por um dado estímulo. A administração crônica, mas não aguda de etanol, cocaína ou morfina eleva o número de neurônios positivos para ΔFosB em diversas regiões encefálicas, incluindo o Acb e CPF (PERROTTI *et al.*, 2008). Além disso, tratamentos capazes de reduzir o consumo voluntário de etanol em ratos e camundongos também reduzem a expressão de ΔFosB em áreas encefálicas relacionadas à dependência ao etanol (LI; SUN; YE, 2012; SAJA; RAHMAN, 2013).

1.3. N-Acetilcisteína

A N-Acetilcisteína (N-Ac) é um pró-fármaco usado clinicamente como agente mucolítico (para reduzir a viscosidade de secreções de muco em situações de resfriado) e no tratamento da overdose de paracetamol (BRUNTON; PARKER, 2008). Quando administrada, a N-Ac é convertida em cisteína e posteriormente dimerizada em cistina, que tem ação no SNC. Entretanto, estudos recentes tem demonstrado sua possível aplicação no tratamento de transtornos neuropsiquiátricos, incluindo a dependência (BERK *et al.*, 2013).

Estudos pré-clínicos mostraram que a N-Ac bloqueia a recaída à autoadministração de cocaína em ratos (BAKER *et al.*, 2003) e inibe o aumento do consumo de cocaína em ratos expostos de modo prolongado a essa droga (MADAYAG *et al.*, 2007). Além disso, a exposição prévia à N-Ac também bloqueia a expressão da sensibilização comportamental à cocaína (MADAYAG *et al.*, 2007).

Os resultados pré-clínicos levaram a testes clínicos em humanos, os quais mostraram que indivíduos dependentes de cocaína relataram menor desejo e interesse por dicas que lembravam administração de cocaína (LAROWE *et al.*, 2007). Outro estudo (MARDIKIAN *et al.*, 2007) revelou que a N-Ac foi bem tolerada por dependentes de cocaína e reduziu o consumo da droga na maioria dos indivíduos.

Os efeitos da nicotina também podem ser alterados pela N-Ac. Ratos treinados para se autoadministrarem de nicotina apresentaram menos sinais de síndrome de abstinência à nicotina e humanos reduziram o número de cigarros fumados após tratamento com N-Ac (KNACKSTEDT *et al.*, 2009).

Os efeitos da N-Ac em modelos pré-clínicos de dependência tem sido relacionados a alterações na neurotransmissão glutamatérgica. A cistina, derivada da N-Ac, restabelece as concentrações sinápticas basais de glutamato por ativar uma proteína, o trocador xCT, que transporta um glutamato para o meio extracelular enquanto move uma cistina para o meio intracelular (KARILA *et al.*, 2008). O restabelecimento das concentrações basais de glutamato após administração de N-Ac inibe a recaída à cocaína (KUPCHIK *et al.*, 2011). Com relação a possíveis efeitos da N-Ac sobre modelos animais de dependência ao etanol, pouco se encontra na literatura. Há dados que indicam que a N-Ac pode causar efeitos benéficos após o consumo de etanol, tais como redução da hepatotoxicidade, redução do estresse oxidativo no miocárdio e redução de alterações dos lipídios plasmáticos (SCHIMIDT

et al., 2007; SEIVA *et al.*, 2009). Além disso, no estudo de SCHNEIDER *et al.*, 2013, o tratamento com N-Ac bloqueou a síndrome de abstinência após a retirada do etanol. Entretanto, não há estudos sobre o efeito da N-Ac na sensibilização comportamental induzida pelo etanol.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Investigar os efeitos da N-Ac no desenvolvimento da sensibilização comportamental e das neuroadaptações induzidas pelo etanol no Acb e CPF de camundongos.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Sensibilização comportamental

Padronização do protocolo de sensibilização comportamental nas condições do laboratório;

Investigar os efeitos da N-Ac no desenvolvimento da sensibilização comportamental.

2.2.2. Quantificação de Δ FosB

Padronizar as técnicas de quantificação da proteína Δ FosB no Acb e CPF; investigar os efeitos da N-Ac nas neuroadaptações induzidas pelo etanol (quantidade de Δ FosB no Acb e CPF)

3. MATERIAL e MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos Suíços machos adultos (N = 8-10 animais/grupo) provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). Os animais foram transferidos para o depósito de animais do laboratório de farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara no mínimo 7 dias antes do início dos experimentos e mantidos em condições controladas de temperatura (23 +/- 2°C)

e ciclo de luz (ciclo 12/12 horas, luzes acesas às 07:00h) com livre acesso a alimento e água. O protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de ética local (CEUA/FCFar 33/2014) e conduzido de acordo com os princípios do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2. Sensibilização comportamental ao etanol

A sensibilização comportamental ao etanol foi avaliada por meio da medida da psicoestimulação induzida pelo etanol no aparato campo aberto (CA) em camundongos. O CA é um aparato circular de 26 cm de diâmetro circundado por uma parede opaca de 30 cm de altura. Esse protocolo foi baseado no descrito por BAHÍ; DREYER (2012) e padronizado para as condições experimentais do nosso laboratório.

O procedimento teve a duração de 23 dias e consistiu de 4 fases: habituação (H1-H2, 2 dias), sensibilização (S1-S13, 13 dias), intervalo (6 dias) e desafio (1 dia). Na habituação, todos os animais receberam uma injeção i.p. (intraperitoneal) de salina após a qual foram imediatamente colocados no CA e tiveram seu comportamento filmado para avaliação da distância percorrida durante 20 minutos. A partir do dia seguinte do fim da habituação, na fase de sensibilização, os animais receberam uma dose diária de etanol (2 g/kg) ou salina em volume equivalente (grupos controle) após a qual foram imediatamente colocados no CA. Nos dias 1, 5, 9 e 13 o comportamento dos animais foi filmado para avaliação da distância percorrida durante 20 minutos. Após o último dia da sensibilização se iniciou a fase de intervalo, onde os animais foram mantidos em suas gaiolas sem nenhuma manipulação por 6 dias. No sétimo dia após a fase de sensibilização, todos os animais receberam uma injeção i.p. de etanol (2 g/kg) e foram novamente testados e tiveram seu comportamento filmado no CA para avaliação da locomoção.

A distância percorrida (em metros) pelos animais no CA foi avaliada por meio de uma câmera fixada ao teto conectada a um microcomputador para análise do comportamento pelo programa ANY-Maze (Stoelting Co., Wood Dale, IL-EUA)

3.3. Dissecação das áreas encefálicas e quantificação de proteínas por Western Blotting

Sob as condições experimentais desejadas, os animais foram decapitados em guilhotina e tiveram seus encéfalos rapidamente retirados da caixa craniana, congelados em isopentano sobre gelo seco e armazenados em ultrafreezer (-80°C) até a dissecação das áreas

de interesse. Amostras de cerca de 1 mm de espessura das áreas encefálicas de interesse foram dissecadas em criostato a -20°C de acordo com o atlas de coordenadas estereotáxicas de Paxinos e Franklin, 2001, como segue: CPF, face rostral, 2,34 mm em relação ao bregma; Acb, face rostral, 1,54 mm em relação ao bregma. Amostras de 1 mm de espessura foram então removidas com auxílio de uma agulha de ponta chata com 1,4 mm de diâmetro interno.

As áreas encefálicas de interesse foram então homogeneizadas por meio de ondas de ultra-som em solução de SDS 1% e tiveram o conteúdo de proteínas determinado por meio do kit *Bio-Rad DC Protein Assay* (Bio-Rad, Hercules, CA-EUA) para posterior ajuste da quantidade de proteínas. Em seguida as amostras foram desnaturadas e submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 9%. Ao final da separação, as proteínas no gel foram transferidas para uma membrana LF-PVDF por meio do kit *Trans-Blot Turbo Transfer System Transfer Pack* (Bio-Rad, Hercules, CA-EUA). Após a transferência, as membranas foram bloqueadas das ligações inespecíficas com anticorpos por meio de solução TBS-T com 5% de leite desnatado.

Após a fase de bloqueio, as membranas foram lavadas e então incubadas “overnight” a 4°C com o anticorpo anti-FosB (Santa Cruz Biotechnology, Dalas, TX-USA) em uma diluição de 1:500 em T-TBS. As membranas foram novamente lavadas e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com fluoróforo anti-IgG de coelho Cy3 (GE Healthcare, Little Chanford, BU-ING) em uma diluição de 1:1000 em T-TBS por 1 hora a temperatura ambiente. A fluorescência das bandas foi detectada diretamente a partir da membrana seca utilizando-se o scanner TyphoonTrio® (GE Healthcare, Little Chanford, BU-ING). A quantidade de proteínas totais foi feita usando o Azul de Coomassie, para o controle do total de proteínas presentes nas amostras e aplicadas nos géis.

O anticorpo usado para detectar ΔFosB também detecta a proteína FosB. Entretanto o tempo escolhido para a remoção do cérebro (20 min depois da administração de etanol) é muito curto para induzir qualquer tradução significativa de proteínas, incluindo FosB. Outro ponto é que o splicing que ocorre no mRNA da FosB origina uma proteína mais leve, sendo a ΔFosB detectada em 35~37 kDa e a proteína FosB em 42 kDa (Kovács, 1998; Nestler *et al.*, 2001). Nos nossos experimentos somente a proteína detectada em 37 kDa foi quantificada. Assim, a quantificação foi específica para ΔFosB .

3.4. Experimento 1 – Padronização da sensibilização comportamental ao etanol: primeira tentativa

Os animais foram submetidos ao protocolo de sensibilização comportamental com algumas modificações. Após a exposição dos animais as fases de habituação, sensibilização e intervalo do protocolo de sensibilização comportamental descrito no item 2.1.2, todos os animais receberam uma injeção i.p. de salina (Desafio Salina), após a qual foram imediatamente testados no CA para avaliação da atividade locomotora. No dia seguinte, todos os animais receberam uma injeção i.p. de etanol (Desafio Etanol) na dose de 2 g/kg, após a qual foram imediatamente testados no CA para avaliação da atividade locomotora.

3.5. Experimento 2 – Padronização da sensibilização comportamental ao etanol: segunda tentativa.

Os animais foram expostos ao protocolo de sensibilização comportamental como descrito no item 2.1.2. Por motivos técnicos, a locomoção dos animais foi avaliada nos dias S1, S4, S8 e S12.

3.6. Experimento 3 - Avaliação dos efeitos da N-Ac no desenvolvimento da sensibilização comportamental ao etanol.

Os animais foram submetidos ao procedimento padronizado de sensibilização comportamental ao etanol, como descrito no item 2.1.2. Entretanto, nesse experimento, não foram realizadas as fases de intervalo e desafio, já que o objetivo foi a avaliação dos efeitos da N-Ac no desenvolvimento da sensibilização. Na fase da sensibilização (3^o ao 15^o dia), os animais foram tratados 2 horas antes de cada injeção de etanol com N-Ac i.p. nas doses de 60 mg/kg ou 120 mg/kg (doses baseadas em MADAYAG *et al.*,2007, e MOUSSAWI *et al.*,2011).

Imediatamente após os 20 minutos do teste da atividade locomotora no dia S13, os animais foram decapitados em guilhotina, e tiveram seus encéfalos retirados para quantificação da proteína Δ FosB.

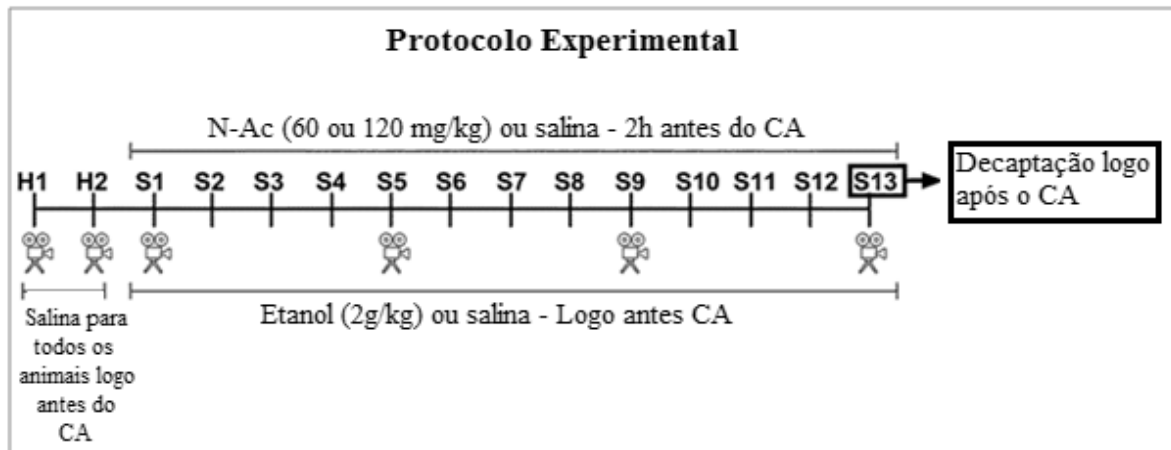


Figura 2. Desenho experimental “Avaliação dos efeitos da N-Ac na sensibilização comportamental induzida pelo etanol”. Os dias H1 e H2 correspondem aos dias de habituação. Dos dias S1 ao S13 temos a fase da sensibilização. Nos dias H1, H2, S1, S5, S9 e S13 a locomoção dos animais foi registrada, e no S13 eles foram decapitados para posterior quantificação de Δ FosB por western blotting. CA- Campo Aberto; N-Ac – N-Acetilcisteína; - dias de filmagem.

Fonte: próprio autor, 2015

3.7. Análise Estatística

Os dados obtidos foram representados como média \pm erro padrão da média (EPM) e a análise estatística foi realizada utilizando o software Statistica ‘99 edition (StatSoft Inc., Tulsa, OK - EUA).

Os dados de peso dos animais foram analisados pelo teste t-Student sendo considerado significativo $p \leq 0,05$.

Os resultados da padronização da sensibilização comportamental foram analisados por ANOVA de duas vias considerando os fatores etanol (etanol x salina) e dias (H1 X H2 ou S1 X S5 X S9 X S13 x DESAFIO), sendo uma análise realizada para a habituação e outra para a sensibilização e desafio. Nos casos em que a ANOVA mostrou diferenças significativas ($p \leq 0,05$), foram realizadas comparações planejadas entre os grupos de interesse.

Os resultados referentes ao efeito da N-Ac no desenvolvimento da sensibilização comportamental foram analisados por ANOVA de três vias considerando os fatores tratamento (N-AC x salina), etanol (etanol x salina) e dias (H1 X H2 ou S1 X S5 X S9 X S13), sendo uma análise realizada para a habituação e outra para a sensibilização. Nos casos em que a ANOVA mostrou diferenças significativas ($p \leq 0,05$) foram realizadas comparações planejadas entre os grupos de interesse.

4. RESULTADO

4.1. Experimento 1 – Padronização da sensibilização comportamental ao etanol – primeira tentativa

Para a padronização da sensibilização comportamental foram feitos dois experimentos. De acordo com os resultados da primeira tentativa, alterações foram feitas a fim de melhorar o protocolo.

O primeiro experimento de padronização da sensibilização comportamental não foi efetivo em demonstrar a expressão da sensibilização comportamental, caracterizada por uma maior atividade locomotora dos animais que foram sensibilizados, quando comparados com a locomoção dos animais que receberam o estímulo (droga) pela primeira vez. Entretanto foi possível demonstrar claramente o desenvolvimento da sensibilização comportamental, caracterizada pelo aumento progressivo da atividade locomotora do animal durante a fase de repetidas administrações da droga de abuso (figura 3).

Os dois dias de exposição ao aparato para habituação foram suficientes para habituar os animais à novidade do ambiente. A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do fator dias (habituação) ($F_{1,13} = 31,17$; $p < 0,001$), mostrando a diminuição da atividade locomotora de ambos os grupos quando comparados os dias H1 (Controle = $18,5 \pm 1,6$; Etanol = $21,6 \pm 2,4$) e H2 (Controle = $12,4 \pm 2,6$; Etanol = $15,2 \pm 2,1$).

Como esperado, o tratamento com etanol no Experimento 1 foi efetivo em, agudamente, causar um aumento da atividade locomotora dos animais e, cronicamente, causar um aumento progressivo da atividade locomotora. A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do fator dias (sensibilização) ($F_{12,156} = 3,78$; $p < 0,001$) e interação entre os fatores etanol e dias (sensibilização) ($F_{12,156} = 2,03$; $p < 0,05$). No dia S1, os animais do grupo etanol apresentaram um aumento da distância percorrida quando comparados aos animais do grupo controle (Etanol S1 = $19,8 \pm 2,9$; Controle S1 = $11,0 \pm 2,2$; $p < 0,05$). No dia S13, a locomoção dos animais do grupo etanol foi maior que a locomoção do mesmo grupo no dia S1 (Etanol S13 = $30,1 \pm 4,4$; Etanol S1 = $19,8 \pm 2,9$; $p < 0,05$), mostrando o aumento dos efeitos do etanol mediante administrações repetidas.

Os animais do grupo Etanol não apresentaram aumento da atividade locomotora frente ao desafio com etanol ao fim da fase de intervalo. A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do fator dias (desafio) ($F_{1,13} = 9,67$; $p < 0,01$), mostrando um aumento da atividade locomotora em ambos os grupos frente ao desafio com etanol [(Controle D. Salina

= $13,6 \pm 3,3$; Controle D. Etanol = $28,5 \pm 4,6$) (Etanol D. Salina = $18,6 \pm 2,3$; Etanol D. Etanol = $29,4 \pm 4,9$).

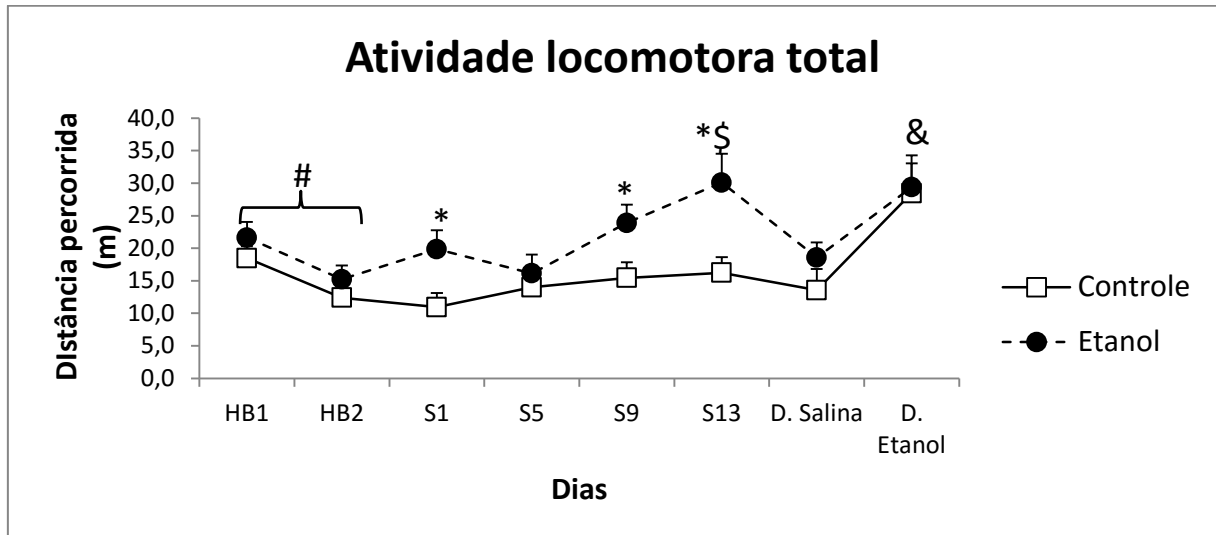


Figura 3. Padronização da sensibilização comportamental ao etanol - primeira tentativa. Os pontos representam a média \pm EPM da distância percorrida pelos animais em cada dia de cada grupo. #, $p \leq 0,05$ quando comparados os dias H1 X H2; *, $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle no dia correspondente; \$, $p \leq 0,05$ em relação ao grupo etanol no dia S1; &, $p \leq 0,05$ quando comparada a locomoção do grupo controle nos dias D. Salina X D. Etanol.

Fonte: próprio autor, 2015

4.2. Experimento 2 – Padronização da sensibilização comportamental ao etanol – segunda tentativa.

O segundo experimento de padronização da sensibilização comportamental foi efetivo em demonstrar o desenvolvimento da sensibilização comportamental e a expressão desse fenômeno (figura 4). Os dois dias de exposição ao aparato para habituação foram suficientes para habituar os animais à novidade do ambiente. A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do fator dias (habituação) ($F_{1,15} = 17,63$; $p < 0,001$), mostrando a diminuição da atividade locomotora de ambos os grupos quando comparados os dias H1 (Controle = $26,2 \pm 3,2$; Etanol = $24,9 \pm 1,9$) e HB2 (Controle = $16,8 \pm 2,0$; Etanol = $16,8 \pm 1,7$).

Como esperado, o tratamento com etanol no Experimento 2 foi efetivo em, agudamente, causar um aumento da atividade locomotora dos animais e, cronicamente, causar um aumento progressivo da atividade locomotora. A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo dos fatores etanol ($F_{1,11} = 5,79$; $p < 0,05$), dia (sensibilização+desafio) ($F_{13,143} =$

6,30; $p < 0,001$) e interação entre os fatores etanol e dia (sensibilização+desafio) ($F_{13,143} = 1,82$; $p < 0,05$). No dia S1, os animais do grupo etanol apresentaram um aumento da distância percorrida quando comparados aos animais do grupo controle (Etanol S1 = $33,3 \pm 6,2$; Controle S1 = $13,8 \pm 1,5$; $p < 0,05$). No dia S12, a locomoção dos animais do grupo etanol foi maior que a locomoção do mesmo grupo no dia S1 (Etanol S12 = $45,7 \pm 12,1$; Etanol S1 = $33,3 \pm 6,2$; $p < 0,05$), mostrando o aumento dos efeitos do etanol mediante administrações repetidas.

Devido a alterações no protocolo, o desafio realizado com salina logo após a fase de intervalo foi retirado. Assim, apenas o desafio com etanol foi realizado no experimento 2. O protocolo utilizado foi efetivo em demonstrar a expressão da sensibilização comportamental. A análise por comparações planejadas mostrou um maior aumento da locomoção dos animais do grupo etanol em relação aos animais do grupo controle (Controle D. Etanol = $28,3 \pm 3,4$; Etanol D. Etanol = $55,0 \pm 11,3$; $p < 0,05$). Além disso, a locomoção do grupo controle apresentou uma tendência de aumento quando comparada com o dia S1 (Controle S1 = $13,8 \pm 1,5$; Controle D. Etanol = $28,3 \pm 3,4$; $p = 0,08$)

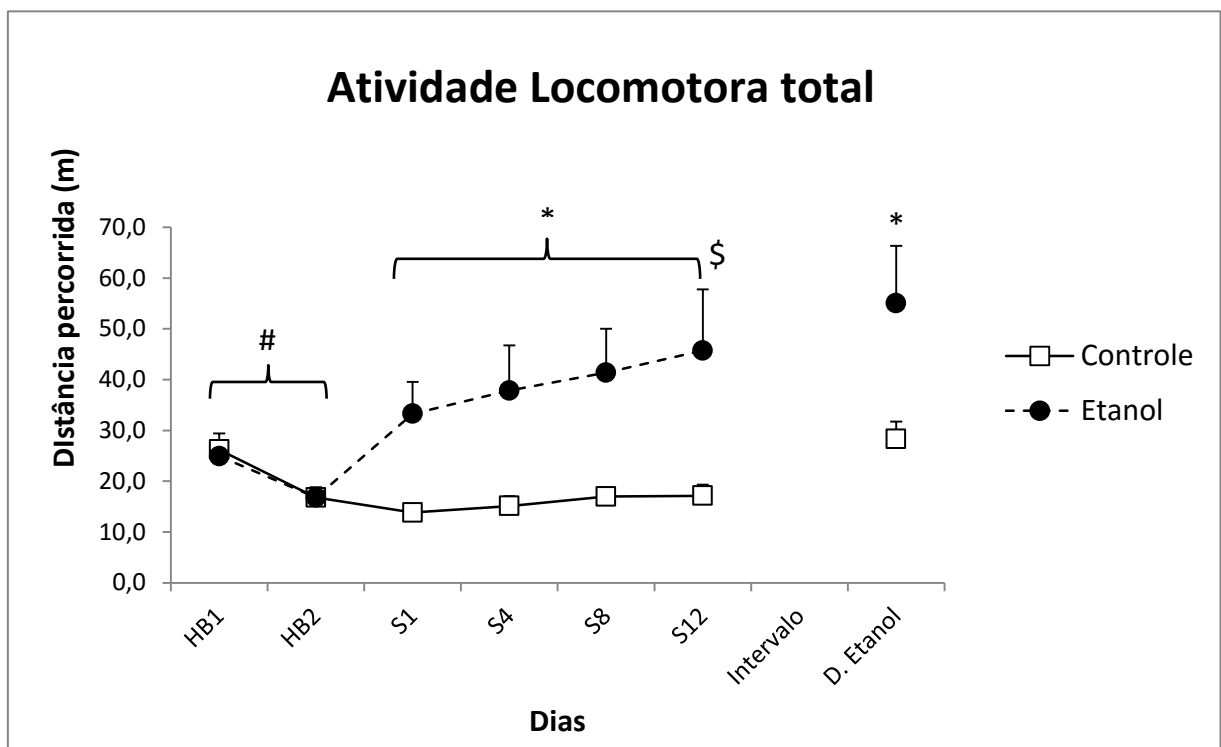


Figura 4. Padronização da sensibilização comportamental ao etanol – segunda tentativa. Os pontos representam a média \pm EPM da distância percorrida pelos animais em cada dia de cada grupo. #, $p \leq 0,05$ quando comparados os dias H1 X H2; *, $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle no dia correspondente; \$, $p \leq 0,05$ em relação ao grupo etanol no dia S1.

Fonte: próprio autor, 2015

4.2.1. Comparação do peso dos animais nas tentativas de padronização

Alguns estudos demonstraram que ratos adolescentes são menos sensíveis que os ratos adultos ao efeito sedativo, aos impactos motores do etanol, ao aparecimento da síndrome de abstinência e à analgesia (DOREMUS *et al.* 2003; HEFNER; HOLMES, 2007; SILVERI; SPEAR, 1998; VARLINSKAYA; SPEAR, 2001). No estudo de SOARES-SIMI *et al.*, 2013 animais adolescentes não desenvolvem sensibilização comportamental ao etanol. Assim, o controle da idade em que os animais são utilizados nos protocolos de sensibilização comportamental pode ser muito importante para que o protocolo funcione corretamente.

Devido aos resultados distintos obtidos nas duas tentativas de padronização, foi feita uma comparação entre os pesos dos animais (figura 5), como uma medida de controle da idade dos animais. Comparando os pesos dos animais nos dois grupos de tratamento, nos dois experimentos, notamos uma diferença estatisticamente significativa (P1 Controle = $27,1 \pm 0,9$; P2 Controle = $35,2 \pm 1,4$; $p < 0,05$), e (P1 Etanol = $26,3 \pm 1,5$; P2 Etanol = $34,9 \pm 1,9$; $p < 0,05$).

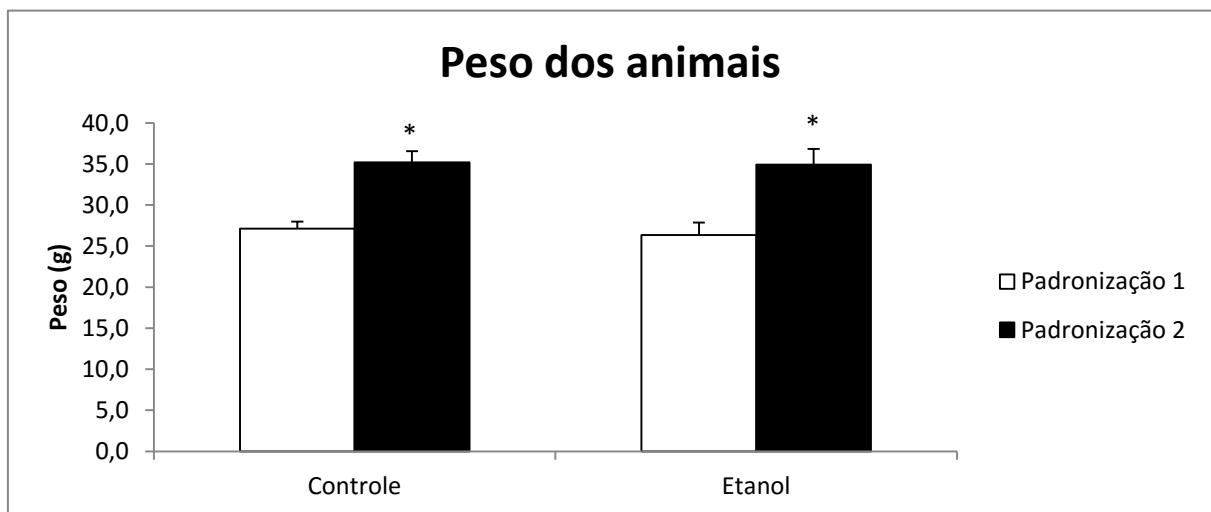


Figura 5. Comparação do peso dos animais nos dois experimentos, em seus respectivos grupos de tratamento. As barras representam a média \pm EPM. *, $p < 0,05$, quando comparados os pesos dos animais nos experimentos 1 e 2.

Fonte: próprio autor, 2015

4.3. Efeitos da N-Ac no desenvolvimento da sensibilização comportamental ao etanol

O protocolo de sensibilização demonstrou claramente o desenvolvimento da sensibilização comportamental. O tratamento com N-Ac na dose de 120 mg/kg foi efetivo em bloquear os efeitos psicoestimulantes agudos do etanol e o desenvolvimento da sensibilização comportamental ao etanol.

A ANOVA de três vias para a fase de habituação revelou efeito significativo do fator fase (habituação) ($F_{1,54} = 68,68$; $p < 0,001$), mostrando uma diminuição da locomoção em todos os grupos, independente do tratamento, quando comparados os dias H1 X H2.

A ANOVA de três vias para a fase de sensibilização mostrou efeito significativo dos fatores tratamento ($F_{2,54} = 5,41$; $p < 0,01$), etanol ($F_{1,54} = 25,90$; $p < 0,001$), dias (sensibilização) ($F_{3,162} = 8,10$; $p < 0,001$) e da interação entre os fatores tratamento e etanol ($F_{2,54} = 3,39$; $p < 0,05$) e tratamento, etanol e dias ($F_{6,162} = 2,38$; $p < 0,05$). As comparações planejadas mostraram um aumento significativo da locomoção dos animais dos grupos Salina/Etanol e N-Ac 60 mg/kg/Etanol em relação ao grupo Salina/Salina em todos os dias da fase de sensibilização [(S1 – Salina/Salina = $10,7 \pm 1,4$; Salina/Etanol = $26,6 \pm 4,1$; N-Ac 60 mg/kg/Etanol = $23,5 \pm 3,2$, $p \leq 0,05$) (S5 - Salina/Salina = $12,5 \pm 1,6$; Salina/Etanol = $35,5 \pm 6,1$; N-Ac 60 mg/kg/Etanol = $38,3 \pm 4,9$, $p \leq 0,05$) (S9 - Salina/Salina = $17,9 \pm 3,5$; Salina/Etanol = $35,4 \pm 7,5$; N-Ac 60 mg/kg/Etanol = $46,3 \pm 10,1$, $p \leq 0,05$) (S13 - Salina/Salina = $9,7 \pm 1,4$; Salina/Etanol = $42,2 \pm 7,0$; N-Ac 60 mg/kg/Etanol = $33,9 \pm 8,7$, $p \leq 0,05$)]. O grupo Salina/Etanol mostrou um aumento progressivo na locomoção, como visto pela diferença significativa na distância percorrida no aparato quando comparados os dias S1 X S5 (S1 = $26,6 \pm 4,1$; S5 = $35,5 \pm 6,1$, $p \leq 0,05$) e S1 X S13 (S1 = $26,6 \pm 4,1$; S13 = $42,2 \pm 7,0$, $p \leq 0,05$). O grupo N-Ac 60 mg/kg/Etanol também mostrou um aumento progressivo na locomoção quando comparados os dias S1 X S5 (S1 = $23,5 \pm 3,2$; S5 = $38,3 \pm 4,9$, $p \leq 0,05$) e S1 X S13 (S1 = $23,5 \pm 3,2$; S13 = $33,9 \pm 8,7$, $p \leq 0,05$). O tratamento com a N-Ac na dose de 120 mg/kg bloqueou o efeito psicoestimulante agudo do etanol (Salina/Salina S1 = $10,7 \pm 1,4$; N-Ac 120 mg/kg/Etanol S1 = $17,1 \pm 2,9$; $p > 0,1$) e o aparecimento da sensibilização comportamental (N-Ac 120 mg/kg/Etanol S1 = $17,1 \pm 2,9$; N-AC 120 mg/kg/Etanol S13 = $19,6 \pm 2,0$, $p > 0,1$) As injeções de salina não alteraram a locomoção dos animais ao longo do experimento (S1 Salina/Salina = $10,7 \pm 1,4$; S13 Salina/Salina = $9,4 \pm 1,4$, $p > 0,1$).

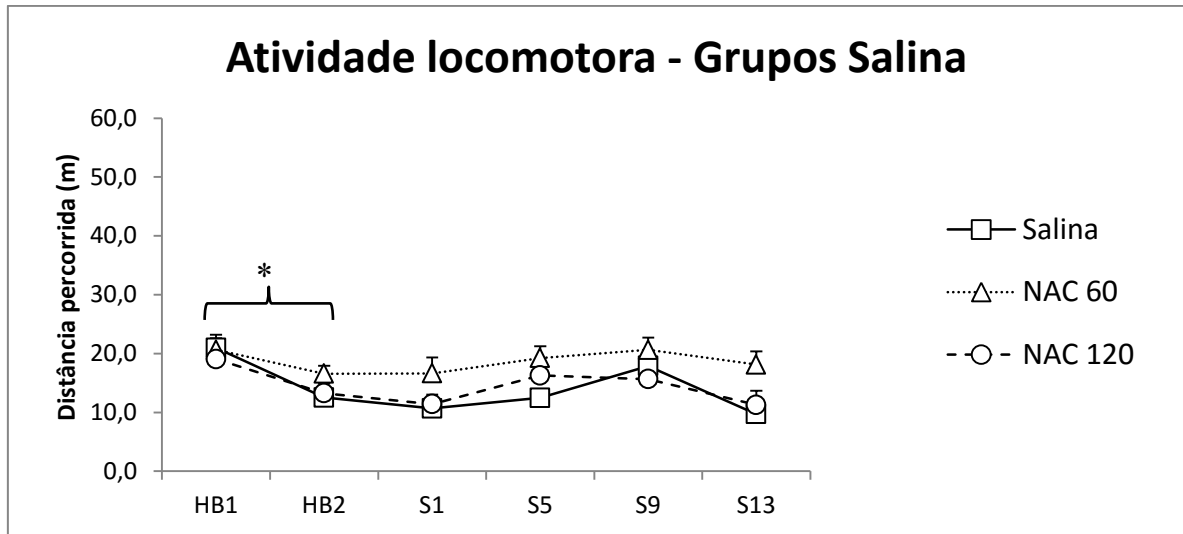


Figura 6. Efeitos do tratamento com N-Ac no desenvolvimento da sensibilização comportamental ao etanol. Resultados dos grupos que receberam salina antes da exposição ao campo aberto. Os pontos representam a média \pm EPM de cada grupo. *, $p < 0,05$ quando comparados os dias H1 x H2.

Fonte: próprio autor, 2015

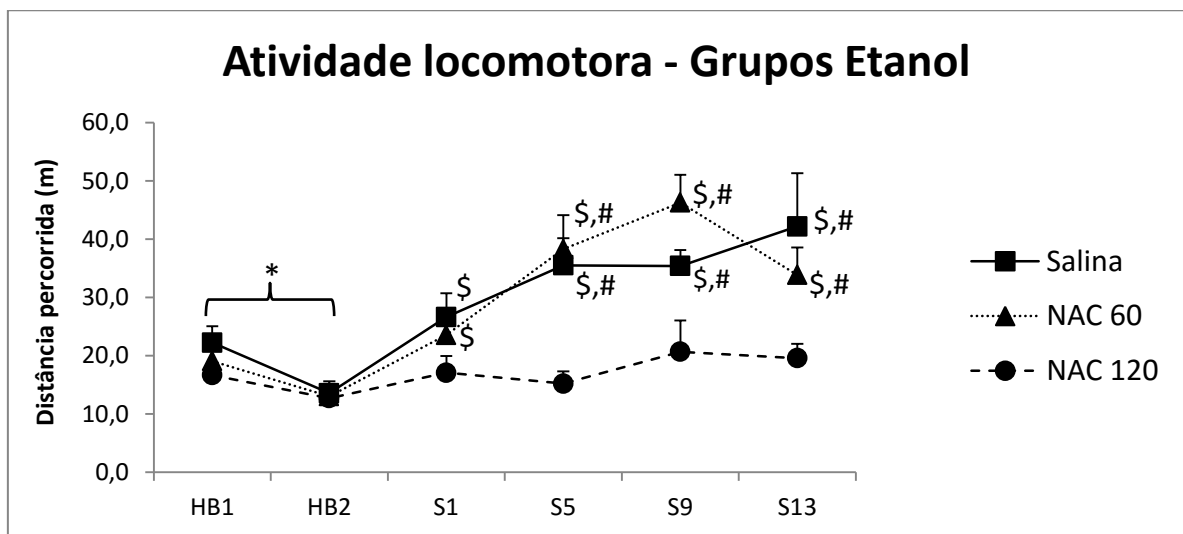


Figura 7. Efeitos do tratamento com N-Ac no desenvolvimento da sensibilização comportamental ao etanol. Resultados dos grupos que receberam etanol antes da exposição ao campo aberto. Os pontos representam a média \pm EPM de cada grupo. *, $p < 0,05$ quando comparados os dias H1 x H2; \$, $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina/Salina; #, $p < 0,05$ em relação ao mesmo grupo no dia S1.

Fonte: próprio autor, 2015

4.4. Padronização da quantificação de Δ FosB por Western Blot

Para a realização de análises moleculares por meio da técnica de Western Blotting, é necessária a adequação da metodologia da técnica às características do laboratório e da amostra que será analisada. Os métodos de dosagem de proteínas, corrida em gel de SDS-poliacrilamida e transferência das proteínas do gel para a membrana eram rotineiramente utilizados no laboratório para outras proteínas, e por isso foram mantidos.

Dois tipos de soluções bloqueadoras foram testadas: uma contendo BSA 5% e outra contendo Leite desnatado 5%, ambas diluídas em tampão T-TBS. Os melhores resultados foram obtidos com a utilização do Leite desnatado 5%, que passou a ser a solução bloqueadora escolhida para experimentos futuros.

Foram testadas três diluições do anticorpo primário anti-FosB produzido em coelhos (Santa Cruz Biotechnology, Dalas, TX-USA): 1:500, 1:1000 e 1:2000 juntamente com duas diluições do anticorpo secundário Cy3 anti-IgG de coelho (GE Healthcare, Little Chalford, BU-ENG): 1:1000 e 1:2000. Essas concentrações iniciais foram escolhidas de acordo com as especificações do fabricante. Os melhores resultados foram encontrados para a concentração de 1:500 do anticorpo primário juntamente com a concentração de 1:1000 do anticorpo secundário.

4.5. Efeitos da N-Ac na expressão de Δ FosB no PFC e Acb

A análise por Western Blotting mostrou alguns resultados interessantes. No CPF, o tratamento com a N-Ac bloqueou as mudanças induzidas pelo etanol na quantidade de Δ FosB. A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo para o fator etanol ($F_{1,25} = 5,92$, $p < 0,05$), e tratamento ($F_{1,25} = 5,28$, $p < 0,05$). A análise *post hoc* de Duncan mostrou que o grupo salina/etanol teve um aumento na quantidade de Δ FosB em comparação ao grupo salina/salina ($p < 0,05$), grupo N-Ac/salina ($p < 0,01$) e grupo N-Ac/etanol ($p < 0,05$). Nenhuma mudança foi notada nos grupos N-Ac/salina ($p = 0,46$) e N-Ac/etanol ($p = 0,92$) em relação ao grupo salina/salina.

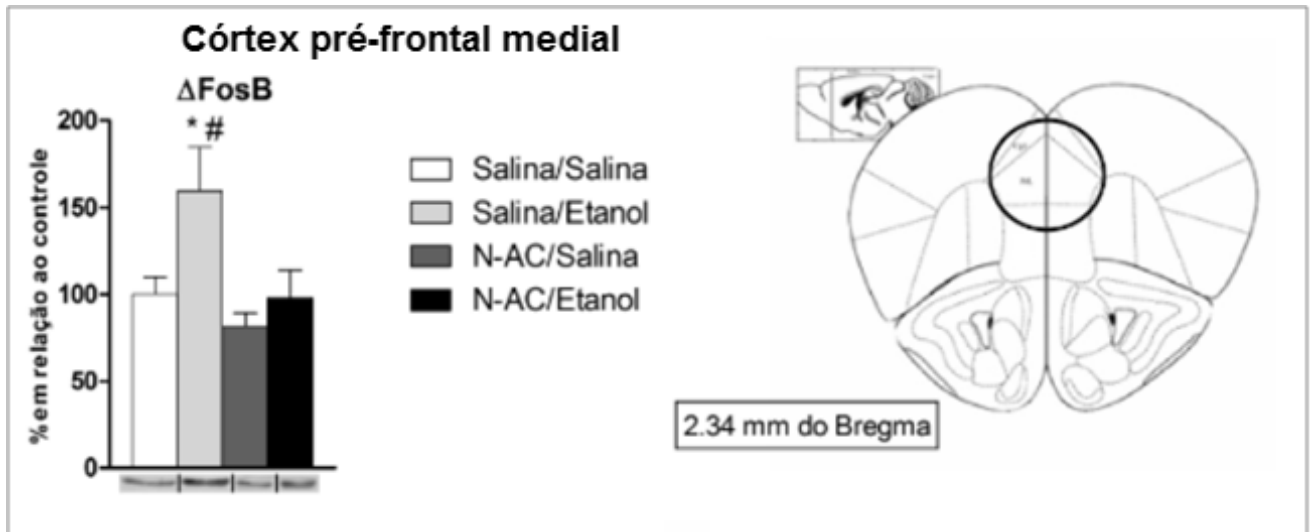


Figura 8. Efeitos do tratamento com N-Ac na expressão de Δ FosB no CPF. **A**, quantificação de Δ FosB. As barras representam \pm EPM da % de expressão da proteína em relação ao grupo salina/salina ($n = 7-9$ animais por grupo). *, $p < 0,005$ em relação ao grupo salina/salina; #, $p < 0,05$ em relação ao grupo N-Ac/etanol. **B** Seção coronal da região de extração do CPF de acordo com o atlas de coordenadas estereotáticas Paxions and Franklin (2001). O círculo preto representa o sítio de extração.

Fonte: próprio autor, 2015

No Acb, o tratamento com N-Ac também bloqueou as mudanças induzidas pelo etanol na quantidade Δ FosB. A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo da interação entre os fatores etanol e tratamento ($F_{1,29} = 5,36$, $p < 0,05$). O grupo salina/etanol mostrou uma queda de Δ FosB em relação ao grupo salina/salina ($p < 0,05$), com nenhuma mudança quando comparado ao grupo N-Ac/salina ($p = 0,77$), e ao grupo N-Ac/etanol ($p = 0,23$). Uma tendência de diminuição da quantidade de Δ FosB foi notada no grupo N-Ac/salina ($p = 0,07$ em relação ao grupo salina/salina). Nenhuma mudança foi notada no grupo N-Ac/etanol ($p = 0,36$) em relação ao grupo salina/salina.

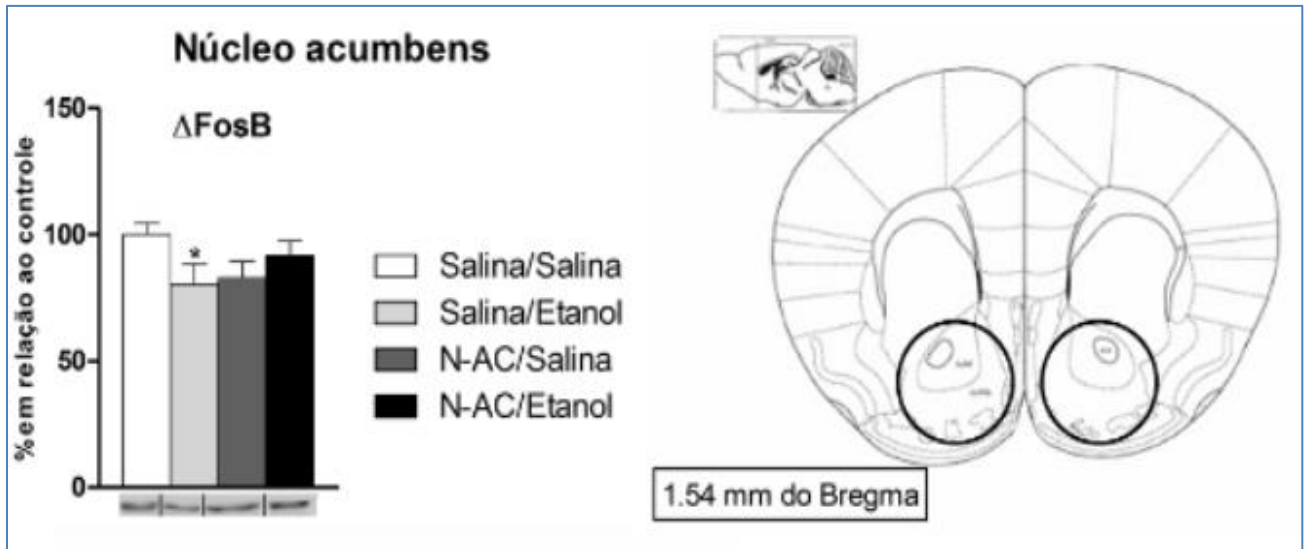


Figura 9. Efeitos do tratamento com N-Ac na expressão de Δ FosB no Acb. **A**, quantificação de Δ FosB. As barras representam \pm EPM da % da expressão da proteína em relação ao grupo salina/salina ($n = 7-9$ animais por grupo). *, $p < 0,05$ em relação ao grupo salina/salina. **B**, seção coronal da região de extração do Acb de acordo com o atlas de coordenadas estereotáxicas Paxinos and Franklin (2001). O círculo preto representa o sítio de extração. AcbSh, concha do núcleo acumbens; AcbC, centro do núcleo acumbens.

Fonte: próprio autor, 2015

5. DISCUSSÃO

Nossos resultados sugerem um possível uso da N-Ac nos distúrbios relacionados ao abuso de etanol. O tratamento com N-Ac bloqueou o desenvolvimento da sensibilização comportamental induzida pelo etanol e as alterações no CPF, região cerebral intrinsecamente relacionadas à dependência.

ROBINSON; BERRIDGE (1993; 2003) propuseram a “Teoria da sensibilização do incentivo” como “assim como a atividade locomotora pode ser sensibilizada, repetidas administrações da droga podem sensibilizar sistemas vias neurais que sinalizam o desejo de consumir as drogas, causando neuroadaptações nessas vias”.

Desde que se notou que as propriedades recompensadoras das drogas de abuso estavam relacionadas positivamente com a ativação locomotora (WISE; BOZARTH, 1987), estudar a sensibilização comportamental induzida pelas drogas que induzem dependência passou a ser uma valiosa metodologia para identificação das neuroadaptações que podem influenciar no desenvolvimento da dependência.

Essa sensibilização comportamental pode ser induzida por drogas estimulantes, opióides, álcool, e também por uma variedade de estressores. Diversos autores têm mostrado o aumento da atividade locomotora em animais de laboratório frente a administrações repetidas de drogas de abuso (MASUR; BOERNGEN, 1980; STEWART; BADIANI, 1993;

LESSOV; PHILLIPS, 1998; ITZHAK; MARTIN, 1999; BOERNGEN-LACERDA; SOUZA-FORMIGONI, 2000; VANDERSCHUREN; KALIVAS, 2000; COVINGTON; MICZEK, 2001; GOELDNER *et al.*, 2005).

A dose de etanol usada para induzir a sensibilização comportamental varia entre 1,5 g/kg e 3,5 g/kg, dadas entre 4 e 21 dias de tratamento (BROADBENT; HARLESS, 1999; FISH *et al.* 2002; MEYER; PHILLIPS, 2003). CAMARINI *et al.*, 2000 e MASUR; BOERNGEN, 1980 confirmaram o efeito estimulante do etanol na dose de 2 g/kg em camundongos suíços. No nosso laboratório a dose padronizada como descrito no item 2.1.2. também foi de 2 g/kg. Os 13 dias de injeções repetidas também foram suficientes em estabelecer a sensibilização comportamental e sua expressão.

A diferença de resultados obtidos nas duas tentativas de padronização pode ser explicada pela diferença de idade entre os animais. Alguns estudos demonstraram que ratos adolescentes são menos sensíveis que os ratos adultos ao efeito sedativo e aos impactos motores do etanol, ao aparecimento da síndrome de abstinência, e analgesia (DOREMUS *et al.* 2003; HEFNER; HOLMES, 2007; SILVERI; SPEAR, 1998; VARLINSKAYA; SPEAR, 2001). Animais adolescentes não desenvolvem sensibilização comportamental ao etanol (SOARES-SIMI *et al.*, 2013). Assim, o controle da idade em que os animais são utilizados nos protocolos de sensibilização comportamental é importante para que o protocolo funcione corretamente. No nosso estudo não foi controlada com exatidão a idade dos animais. Entretanto, o resultado demonstrando menor massa corporal nos animais do primeiro experimento indica que esses camundongos apresentavam menor idade e talvez ainda estivessem no período da adolescência. Isso pode ter corroborado a não observação da expressão da sensibilização comportamental no referido experimento.

O sistema glutamatérgico tem sido sugerido com um sistema de neurotransmissão importante no desenvolvimento da dependência. Entre as drogas de abuso, as propriedades de reforço/recompensa da cocaína (SARI *et al.*, 2009; MOUSSAWI *et al.*, 2011), heroína (BOSSERT *et al.*, 2012) e etanol (OBARA *et al.*, 2009; CANNADY *et al.*, 2011; SARI *et al.*, 2011) tem demonstrado interagir com o sistema glutamatérgico em áreas cerebrais da via de recompensa (mesocorticolímbica), elevando o número de sinapses excitatórias, interferindo em receptores pré e pós-sinápticos no Acb e amígdala. O consumo de etanol pode provocar mudanças na concentração extracelular de glutamato nessas áreas (RAO; SARI, 2012), e esse aumento é observado por seguidas administrações de etanol (KAPASOVA; SZUMLINSKI, 2008; DING *et al.*, 2012). Primeiramente, a exposição crônica ao etanol aumenta os níveis extracelulares de glutamato em muitas áreas cerebrais envolvidas na dependência (DING *et*

al., 2013; HERMANN *et al.*, 2012; MELENDEZ *et al.*, 2005). A expressão de dois transportadores de glutamato, o GLT-1 e xCT, importantes proteínas de manutenção na homeostase do glutamato, é diminuída em ratos que tem preferência pelo etanol (ratos P) após consumo crônico dessa droga. O tratamento com ceftriaxona, que age restaurando níveis extrasinápticos de glutamato, atenua o consumo de etanol e aumenta a quantidade de GLT-1 e xCT (ALHADDAD *et al.*, 2014). Nos estudos de BROADBENT *et al.*, 2003; BROADBENT; WEITEMIER, 1999; KOTLINSKA *et al.*, 2006; o antagonista do receptor glutamatérgico NMDA MK-801, o antagonista do receptor mGluR5 MTEP, e o antagonista do receptor AMPA GYKI 52466 inibiram a sensibilização comportamental ao etanol, indicando uma importante modulação da sinalização glutamatérgica no desenvolvimento da sensibilização pelo etanol. BROWN; KUPCHIK; KALIVAS, 2013, mostraram que a administração de drogas de abuso está associada à redução do receptor glutamatérgico mGluR2 e do transportador GLT1.

Na tentativa de descobrir novos agentes que possam agir na prevenção ou no tratamento da dependência, estudos pré-clínicos tem tido um foco de atenção no papel do trocador cistina-glutamato, também chamado de trocador xCT ou sistema Xc, (REISSNER; KALIVAS, 2010), e em compostos capazes de restaurar a função do glutamato comprometida com a exposição crônica a drogas de abuso (PEANA *et al.*, 2013)

Localizado na célula da glia, o xCT funciona transportando uma molécula de cistina (dímero oxidado da cisteína) para o meio intracelular e libera uma molécula de glutamato para o meio extracelular. A cistina é precursora da glutathiona (GSH), que exerce um papel protetor contra o estresse oxidativo endógeno por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS) e exógeno por radiação e quimioterápicos (MCBEAN, 2002). Além disso, a troca via sistema Xc aumenta o glutamato extracelular que estimula o receptor glutamatérgico mGluR2 principalmente no Acb (BAKER *et al.*, 2003). Essa estimulação do receptor mGluR2 inibe a liberação excessiva de glutamato na fenda sináptica (BAKYS; MALENKA, 1991; COCHILLA; ALFORD, 1998; SCHOEPP, 2001). Repetidas administrações de drogas de abuso reduzem a atividade do xCT (BAKER *et al.*, 2003; MADAYAG *et al.* 2007) o que resulta na redução dos níveis basais de glutamato extrasináptico no Acb (BAKER *et al.*, 2003), e uma conseqüente diminuição da autorregulação pelos receptores metabotrópicos glutamatérgicos do glutamato liberado na sinapse (XI *et al.*, 2002). A N-Ac como mencionado anteriormente, parece restabelecer as concentrações sinápticas basais de glutamato pela ativação do trocador xCT (KARILA *et al.*, 2008). Tem sido demonstrado que

o restabelecimento das concentrações basais de glutamato após administração de N-Ac inibe a recaída à cocaína (MOWSSAWI *et al.*, 2011).

O estudo de SCHNEIDER *et al.*, 2015, demonstrou que o tratamento a curto prazo com N-Ac foi efetivo em prevenir as mudanças comportamentais e bioquímicas observadas após cinco dias da interrupção do tratamento com etanol. É razoável sugerir que o mecanismo responsável por prevenir as mudanças induzidas no comportamento e hormônios descritos no estudo pela N-Ac estão relacionados com a habilidade de modulação do sistema glutamatérgico. Como um agente modulador, a N-Ac consegue rapidamente estabilizar a hiperatividade do sistema glutamatérgico em situações críticas da síndrome de retirada e da recaída.

Nos resultados obtidos no experimento de sensibilização comportamental, a N-Ac na dose de 120 mg conseguiu inibir o desenvolvimento da sensibilização comportamental ao etanol. Como já mencionado, quando administrada, a N-Ac é convertida em cisteína e posteriormente em cistina a qual age no xCT e restabelece as concentrações sinápticas basais de glutamato (KARILA *et al.*, 2008). Como descrito anteriormente, a manutenção das concentrações basais do glutamato ativa o receptor mGluR2 que inibe o aumento da sua liberação na fenda sináptica quando existe o efeito estimulante da droga. Sem esse aumento de glutamato extracelular nas regiões cerebrais relacionadas ao sistema de recompensa (Acb, VTA, CPF), causado pela droga durante o experimento, podemos supor que não houve as neuroadaptações que poderiam ser causadas, e que seriam responsáveis também por ocasionar a sensibilização comportamental.

Repetidas exposições ao etanol, assim como a outras drogas de abuso, induzem o aumento da regulação de vários fatores de transcrição que influenciam em mudanças na expressão dos genes em regiões relevantes na dependência (MCCLUNG *et al.*, 2004; VILPOUX *et al.* 2009). Um importante fator de transcrição que tem sido associado com a plasticidade relacionada à dependência é o isômero estável Δ FosB (MCCLUNG *et al.*, 2004, NESTLER; BARROT; SELF, 2001), mencionado anteriormente. O Acb é uma importante área do sistema de recompensa, e tem demonstrado ser um crítico mediador das ações induzidas pelas drogas de abuso nesse sistema (VANDERSCHUREN *et al.*, 2005). O aumento de Δ FosB nessa área durante o uso crônico de etanol pode demonstrar o seu importante envolvimento na dependência as drogas de abuso. Outras regiões também tem a expressão de Δ FosB aumentada, incluindo a amígdala e o CPF, e que também estão relacionadas a respostas individuais a estímulos aversivos (ansiedade), e a performance cognitiva, respectivamente, além de sua relação com a dependência (PERROTTI *et al.*, 2008).

Desafios agudos com etanol causam a indução da proteína FosB, enquanto a exposição crônica ao etanol leva a acumulação de Δ FosB (PERROTTI *et al.*, 2008; RYABININ; WANG, 1998). Essa molécula é um dos mecanismos pelo qual drogas que causam dependência produzem mudanças estáveis no cérebro. Essa acumulação aumenta as propriedades motivacionais e os efeitos produzidos pela maioria das drogas de abuso (NESTLER *et al.*, 2001).

A administração crônica de etanol no nosso estudo induziu a acumulação de Δ FosB no CPF. O CPF integra informações de outras regiões corticais e subcorticais, contribuindo funcionalmente com a memória de trabalho, regulação das emoções e controle comportamental (WILSON *et al.*, 2010; KESNER; CHURCHWELL, 2011). Déficits estruturais e fisiológicos, bem como consequentes alterações comportamentais têm sido observados no CPF em pacientes dependentes de etanol (FADDA; ROSSETTI, 1998; MOSELHY *et al.*, 2001; STEPHENS; DUKA, 2008). Repetidos estímulos elétricos no CPF medial induzem a sensibilização comportamental (SCHENK; SNOW, 1994), enquanto que lesões excitotóxicas no CPF medial interromperam o desenvolvimento da sensibilização comportamental (PIERCE *et al.*, 1998; TZSCHENTKE; SCHMIDT, 1998). Esses dados sugerem que o CPF apresenta um papel importante no desenvolvimento da dependência.

O estudo de BEYER e STEKETEE, 2002, mostrou que intra-microinjeções de quinpirole, um agonista de receptores dopaminérgicos D2, no CPF medial bloqueou a indução da atividade locomotora induzida pelo uso da cocaína, e o aumento da liberação de dopamina no Acb pelo CPF, em ratos. Além de mostrar que o CPF é importante no desenvolvimento da sensibilização comportamental, o estudo nos diz que existe uma relação importante entre essas duas áreas do sistema recompensa.

A sensibilização comportamental a opióides, metanfetamina (MCDAID *et al.*, 2006), e até pelo apetite ao sódio (HURLEY *et al.*, 2014) também induzem a acumulação de FosB/ Δ FosB em várias regiões cerebrais. Entretanto, alterações em FosB/ Δ FosB não estão universalmente correlacionados a alterações comportamentais. Diferentes linhagens/espécies de camundongos tem distintas respostas relacionadas à FosB/ Δ FosB com a mesma resposta comportamental a anfetamina (CONVERSI *et al.*, 2011).

As alterações na sinalização de Δ FosB achadas podem ser responsáveis pela alterações comportamentais induzida pelo etanol. De fato, o aumento no consumo voluntário de etanol está correlacionado com o acúmulo de Δ FosB. O tratamento por naltrexona bloqueou esse acúmulo e diminuiu o consumo voluntário de etanol (LI *et al.*, 2010). A citisina, um agonista parcial do receptor neuronal nicotínico modulou o consumo de etanol e também a expressão

de FosB/ Δ FosB. O aumento da expressão de Δ FosB em adultos aumentou a locomoção e os efeitos da recaída da cocaína (COLBY *et al.*, 2003; KELZ *et al.*, 1999). Portanto, as alterações de FosB/ Δ FosB tem um papel importante nas mudanças comportamentais induzidas pelas drogas de abuso, e o seu bloqueio previne mudanças comportamentais.

Ao contrário do esperado, somente o CPF demonstrou uma acúmulo de Δ FosB após o tratamento crônico com etanol. No Acb, foi notado uma diminuição da quantidade de Δ FosB nos animais do grupo de tratamento salina/etanol. Para entender essas alterações inesperadas temos que mergulhar na teoria dos engramas de memória (do inglês, neuronal ensembles) relacionados à dependência. Essa teoria relativamente nova diz que a associação de aprendizado entre as drogas e o ambiente ocorre em apenas uma minoria de neurônios nas áreas cerebrais relacionadas ao efeito da droga (CRUZ *et al.*, 2014). Assim, sendo a sensibilização comportamental um processo que depende das associações entre droga e ambiente (MARIN *et al.*, 2009; MATTSON *et al.*, 2007; ZANCHETA *et al.*, 2012), apenas um pequeno número de neurônios são repetidamente ativados pela administração crônica da droga. No nosso caso, o uso da técnica de western blotting, para avaliar o acúmulo de Δ FosB não nos permite diferenciar neurônios ativados de não ativados. A maioria dos estudos que acharam um acúmulo dessa molécula usaram a técnica de imunohistoquímica em vez de western blotting do tecido homogenizado, o que pode explicar nossos resultados contraditórios. De fato, quando usa-se western blotting, os níveis de p-CREB, um marcador de ativação neural no Acb é diminuído em animais sensibilizados pela cocaína, enquanto que usando a técnica de imunohistoquímica, o número de neurônios positivos para p-CREB aumenta (MARIN *et al.*, 2009). Então, nossa hipótese é que o efeito depressor do etanol na maioria dos neurônios do Acb mascara a acumulação de Δ FosB na minoria dos neurônios que estão relacionados com a sensibilização comportamental. No CPF, o número de neurônios ativados é provavelmente grande o suficiente para superar o efeito depressor do etanol na maioria dos neurônios (PFARR *et al.*, 2015; WHITAKER *et al.*, 2015).

O importante é ressaltar que o tratamento com N-Ac bloqueou as alterações comportamentais causadas pelo exposição crônica ao etanol e as neuroadaptações moleculares de Δ FosB no CPF.

6. CONCLUSÃO

O tratamento prévio com N-Ac foi efetivo em bloquear o desenvolvimento da sensibilização comportamental ao etanol e as alterações na quantidade de Δ FosB no CPF. Esse efeito provavelmente se deve à restauração do sistema glutamatérgico nos animais expostos ao protocolo de sensibilização comportamental, através do reestabelecimento da atividade do sistema Xc. Assim, os resultados positivos apresentados apontam para uma nova direção nas pesquisas que procuram um tratamento para a dependência pelo etanol, indicando uma grande possibilidade de tratamento para esse problema tão importante para a sociedade.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAO, K. P.; QUADROS, I. M.; SOUZA-FORMIGONI, M. L. Morphine attenuates the expression of sensitization to ethanol, but opioid antagonists do not. **Neuroscience**, v. 156, p. 857-864, 2008.
- ALHADDAD, H.; DAS, S. C.; SARI, Y. Effects of ceftriaxone on ethanol intake: a possible role for xCT and GLT-1 isoforms modulation of glutamate levels in P rats. **Psychopharmacology (Berl.)**, v. 231, p. 4049–4057, 2014.
- BAHI, A., DREYER, J. Involvement of nucleus accumbens dopamine D1 receptors in ethanol drinking, ethanol-induced conditioned place preference, and ethanol-induced psychomotor sensitization in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 222, p.141–153, 2012
- BAKER, D. A.; MCFARLAND, K.; LAKE, R. W.; SHEN, H.; TANG, X-C.; TODA, S.; KALIVAS, P. W. Neuroadaptations in cystine-glutamate exchange underlie cocaine relapse. **Nature Neuroscience**. v. 6, p. 743–749, 2003.
- BASKYS, A.; MALENKA, R. C. Agonists at metabotropic glutamate receptors presynaptically inhibit EPSCs in neonatal rat hippocampus. **The Journal of Physiology**, v. 444, p. 687-701, 1991.
- BEYER, E. C.; STEKETEE, D. J.. Cocaine Sensitization: Modulation by Dopamine D₂ Receptors. **Oxford Journals, Medicine & Health & Science & Mathematics**, v.12, p. 526-535, 2002.
- BERK, M.; MALHI, G. S.; GRAY, L. J.; DEAN, O. M. The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.34, p.167-177, 2013.
- BOERNGEN-LACERDA, R.; SOUZA-FORMIGONI, M. L. Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties? **Pharmacology Biochemistry Behavioral**, v. 67, p. 225-232, 2000.
- BOSSERT, J. M; STERN, A. L.; THEBERGE, F. R.; MARCHANT, N. J.; WANG, H. L.; MORALES, M.; SHAHAM, Y. Role of projections from ventral medial prefrontal cortex to nucleus accumbens shell in context-induced reinstatement of heroin seeking. **The Journal of Neuroscience.**, v. 32, p. 4982-4991, 2012.

BROADBENT J, HARLESS WE. Differential effects of GABA(A) and GABA(B) agonists on sensitization to the locomotor stimulant effects of ethanol in DBA/2 J mice. **Psychopharmacology (Berl)**. v.141, p.197-205, 1999.

BROADBENT, J.; KAMPMUELLER, K. M. ;KOONSE, S. A. Expression of behavioral sensitization to ethanol by DBA/2J mice: the role of NMDA and non-NMDA glutamate receptors. **Psychopharmacology (Berl)**, v.67, p. 225-234, 2003.

BROWN, M. R.; KUPCHIK, M. Y.; KALIVAS, W. P. The Story of Glutamate in Drug Addiction and *N*-Acetylcysteine as a Potential Pharmacotherapy. **JAMA Psychiatry**, v.70, p. 895-897, 2013.

BRUNTON, PARKER, In GOODMAN & GILMAN'S **Manual of Pharmacology and Therapeutics**. McGraw-Hill, 2008.

CAMARINI, R.; NOGUEIRA, P. M.; CALIL, H. M. Involvement of the opioid system in the development and expression of sensitization to the locomotoractivating effect of ethanol. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v.3, p.303-309, 2000.

CANNADY, R.; GRONDIN, J. J.; FISHER, K. R.; HODGE, C. W.; BESHEER J. Activation of group II metabotropic glutamate receptors inhibits the discriminative stimulus effects of alcohol via selective activity within the amygdala. **Neuropsychopharmacology**, v.36, p. 2328-2338, 2011.

CARLINI, E. A.; GALDURÓZ, J. C. F.; NOTO, A. R.; NAPPO, S. A. I Levantamento Domiciliar Nacional sobre o uso de Drogas Psicotrópicas. **CEBRID, UNIFESP**, p. 380, 2002.

CARLINI, E. A. (Sup.) II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país. São Paulo: **CEBRID**, 2006.

CARTMELL, J.; PERRY, K. W.; SALHOFF, C. R.; MONN, J. A.; SCHOEPP, D. D. Acute increases in monoamine release in the rat prefrontal cortex by the mGlu2/3 agonist LY379268 are similar in profile to risperidone, not locally mediated, and can be elicited in the presence of uptake blockade. **Neuropharmacology**, v.40, p.847-55, 2001

CIARLO, T. B.; MASTROIANNI, F. C. Considerações sobre a influência dos meios de comunicação no consumo de bebidas alcoólicas e sua relação com as políticas de saúde pública. **Revista UNIARA**, v.13, n.1, 2010.

COCHILLA, A. J.; ALFORD, S. Metabotropic glutamate receptor-mediated control of neurotransmitter release. **Neuron**, v.20, p.1007-1016, 1998.

COLBY, C. R.; WHISLER, K.; STEFFEN, C.; NESTLER, E. J.; SELF, D.W. Striatal cell type-specific overexpression of DeltaFosB enhances incentive for cocaine. **The Journal of Neuroscience**, v.23, p. 2488–2493, 2003.

CONVERSI, D.; ORSINI, C.; COLELLI, V.; CRUCIANI, F.; CABIB, S. Association between striatal accumulation of FosB/ Δ FosB and long-term psychomotor sensitization to amphetamine in mice depends on the genetic background. **Behavioral Brain Research**, v.217, p.155-164, 2011.

COVINGTON, 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.388-398, 2001.

CRUZ, F. C.; JAVIER RUBIO, F.; HOPE, B. T. Using c-fos to study neuronal ensembles in corticostriatal circuitry of addiction. **Brain Research**, v.1628, p.157-73, 2014.

DACKIS, C. A.; O'BRIEN, C. P. Cocaine dependence: a disease of the brain's reward centers. **Journal of Substance Abuse Treatment**, v.21, p.111-117, 2001.

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

DI CHIARA, G.; IMPERATO, A.; Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v85, p. 5274-5278, 1988.

DING, Z. M.; RODD, Z. A.; ENGLEMAN, E. A.; BAILEY, J. A.; LAHIRI, D. K.; MCBRIDE, W. J. Alcohol drinking and deprivation alter basal extracellular glutamate concentrations and clearance in the mesolimbic system of alcohol-preferring (P) rats. **Addiction Biology**, v.18, p.297–306, 2013.

DOREMUS, T. L.; BRUNELL, S. C.; VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P. Anxiogenic effects during withdrawal from acute ethanol in adolescent and adult rats. **Pharmacology Biochemistry Behavioral**, v.75, p.411-418, 2003.

EZZATI, M.; LOPEZ, A. D.; RODGERS, A.; VANDER HOORN, S.; MURRAY, C. J.; Selected major risk factors and global and regional burden of disease. **The Lancet**, v.360, p.1347-1360, 2002.

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

FISH, E. W.; DEBOLD, J. F.; MICZEK, K. A. Repeated alcohol: behavioral sensitization and alcohol-heightened aggression in mice. **Psychopharmacology (Berl)**,v.160, p.39-48, 2002.

GOELDNER, F. O.; PIGATTO, G.; RIBEIRO, A. F.; MACHADO, H. B.; BOERNGEN-LACERDA, R. Influence of fluoxetine and paroxetine in behavioral sensitization induced by ethanol in mice. **Pharmacology Biochemistry Behavioral**., v.82, p.388-396, 2005.

HEFNER, K.; HOLMES, A.; Ontogeny of fear-, anxiety- and depression-related behavior across adolescence in C57BL/6J mice. **Behavioural Brain Research**., v.176, p.210-215, 2007.

HERMANN, D.; WEBER-FAHR, W.; SARTORIUS, A.; HOERST, M.; FRISCHKNECHT, U.; TUNC-SKARKA, N.; PERREAU-LENZ, S.; HANSSON, A. C.; KRUMM, B.; KIEFER, F.; SPANAGEL, R.; MANN, K.; ENDE, G.; SOMMER, W. H. Translational Magnetic Resonance Spectroscopy Reveals Excessive Central Glutamate Levels During Alcohol Withdrawal in Humans and Rats. **Biological Psychiatry**, v.71, p.1015-1021, 2012.

HOPE, B. T.; SIMMONS, D. E.; MITCHELL, T. B.; KREUTER, J. D.; MATTSON, B. J. Cocaine-induced locomotor activity and Fos expression in nucleus accumbens are sensitized for 6 months after repeated cocaine administration outside the home cage. **European Journal of Neuroscience**, v.24, p.867-875, 2006.

HUGHES, P.; DRAGUNOW, M. Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. **Pharmacological Reviews**, v.7, p.133-178, 1995.

HURLEY, S.W.; ZHANG, Z.; BELTZ, T. G.; XUE, B.; JOHNSON, A. K. Sensitization of sodium appetite: evidence for sustained molecular changes in the lamina terminalis. **AJP Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v.307, p.1405–1412, 2014.

ITZHAK, Y.; MARTIN, J. L. Effects of cocaine, nicotine, dizocipiline and alcohol on mice locomotor activity: cocaine-alcohol cross-sensitization involves upregulation of striatal dopamine transporter binding sites. **Brain Research**, v.818, p.204-211, 1999.

KAPASOVA, Z.; SZUMLINSKI, K. K. Strain differences in alcohol-induced neurochemical plasticity: a role for accumbens glutamate in alcohol intake. **Alcoholism Clinical Experimental Research**, v.32, p.617-631, 2008.

KARILA, L.; GORELICK, D.; WEINSTEIN, A.; NOBLE, F.; BENYAMINA, A.; COSCAS, S.; BLECHA, L.; LOWENSTEIN, W.; MARTINOT, J. L.; REYNAUD, M.; LÉPINE, J. P. New treatments for cocaine dependence: a focused review. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v.11, p.425-435, 2008.

KNACKSTEDT, L. A. *et al.* The Role of Cystine-Glutamate Exchange in Nicotine Dependence in Rats and Humans. **Biological Psychiatry**, v.65, p.841-845, 2009.

KELZ, M. B.; CHEN, J.; CARLEZON, W. A.; WHISLER, K.; GILDEN, L.; BECKMANN, A. M.; STEFFEN, C.; ZHANG, Y. J.; MAROTTI, L.; SELF, D. W.; TKATCH, T.; BARANAUSKAS, G.; SURMEIER, D. J.; NEVE, R. L.; DUMAN, R. S.; PICCIOTTO, M. R.; NESTLER, E. J. Expression of the transcription factor deltaFosB in the brain controls sensitivity to cocaine. **Nature**, v. 401, p.272–276, 1999.

KESNER, R. P.; CHURCHWELL, J. C. An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.96, p.417–431, 2001.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Review. Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v.363, p.3113-3123, 2008.

- KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurocircuitry of addiction. **Neuropsychopharmacology**, v.35, p.217-238, 2010.
- KUPCHIK, Y. M.; MOUSSAWI, K.; TANG, X. C.; WANG, X.; KALIVAS, B. C.; KOLOKITHAS, R.; OGBURN, K. B.; KALIVAS, P. W. The effect of N-acetylcysteine in the nucleus accumbens on neurotransmission and relapse to cocaine. **Biological Psychiatry**, v.71, p.978-986, 2012.
- LAMBERT, G.; KARILA, L.; LOWENSTEIN, W. Neuroimaging and cocaine: mapping dependence. **La Presse Médicale**, v.37, p.679-688, 2008.
- LAROWE, S. D. *et al.* Is Cocaine Desire Reduced by N-Acetylcysteine? **The American Journal of Psychiatry**, v.164, p.1115-1117, 2007.
- LESSOV, C. N.; PHILLIPS, T. J. Duration of sensitization to the locomotor stimulant effects of ethanol in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v.135, p.374-382, 1998.
- LI, J.; CHENG, Y.; BIAN, W.; LIU, X.; ZHANG, C.; YE, J. H. Region-Specific Induction of FosB/ Δ FosB by Voluntary Alcohol Intake: Effects of Naltrexone. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**. v.34, p.1742–1750, 2010.
- LI, J.; SUN, Y.; YE, J. Electroacupuncture Decreases Excessive Alcohol Consumption Involving Reduction of FosB/DFosB Levels in Reward-Related Brain Regions. **PLoS One**. v.7, p.1-12, 2012.
- LÖF, E.; ERICSON, M.; STOMBERG, R.; SÖDERPALM, B. Characterization of ethanol-induced dopamine elevation in the rat nucleus accumbens. **European Journal of Pharmacology**, v.555, p.148-155, 2007.
- MADAYAG, A.; LOBNER, D.; KAU, K. S.; MANTSCH, J. R.; ABDULHAMEED, O.; HEARING, M.; GRIER, M. D.; BAKER, D. A. Repeated N-acetylcysteine administration alters plasticity-dependent effects of cocaine. **The Journal of Neuroscience**, v.27, p.13968-13976, 2007.
- MARDIKIAN, P. N. *et al.* An open-label trial of N-acetylcysteine for the treatment of cocaine dependence: a pilot study. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.31, p.389-394, 2007.

MARIN, M.T.; BERKOW, A.; GOLDEN, S. A.; KOYA, E.; PLANETA, C. S.; HOPE, B. T. Context-specific modulation of cocaine-induced locomotor sensitization and ERK and CREB phosphorylation in the rat nucleus accumbens. **European Journal of Neuroscience**, v.30, p.1931–1940, 2009.

MASUR, J.; BOERNGEN, R. The excitatory component of ethanol in mice: a chronic study. **Pharmacology Biochemistry Behavioral**, v.13, p.777-780, 1980.

MATTSON, B. J.; KOYA, E.; SIMMONS, D. E.; MITCHELL, T. B.; BERKOW, A.; CROMBAG, H. S.; HOPE, B. T. Context-specific sensitization of cocaine-induced locomotor activity and associated neuronal ensembles in rat nucleus accumbens. **European Journal of Neuroscience**, v.27, p.202-212, 2008.

MCBEAN, G. J. Cerebral cystine uptake: a tale of two transporters. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.23, p.299-302, 2002.

MCCLUNG, C. A.; ULERY, P. G.; PERROTTI, L. I.; ZACHARIOU, V.; BERTON, O.; NESTLER, E. J. DeltaFosB: a molecular switch for long-term adaptation in the brain. **Molecular Brain Research**, v.132, p.146-154, 2004.

MCD AID, J.; GRAHAM, M. P.; NAPIER, T. C. Methamphetamine-induced sensitization differentially alters pCREB and DeltaFosB throughout the limbic circuit of the mammalian brain. **Molecular Pharmacology**, v.70, p.2064–2074, 2006.

MELLENDEZ, R. I.; HICKS, M. P.; CAGLE, S. S.; KALIVAS, P. W. Ethanol Exposure Decreases Glutamate Uptake in the Nucleus Accumbens. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**, v.29, p.326–333, 2005.

MEYER, P. J.; PHILLIPS, T. J. Bivalent effects of MK-801 on ethanol-induced sensitization do not parallel its effects on ethanol-induced tolerance. **Behavioral Neuroscience**, v.117, p.641-649, 2003.

NESTLER, E. J. Molecular neurobiology of addiction. **The American Journal of Addictions**, v.10, p.201-217, 2001.

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

NESTLER, E. J.; KELZ, M. B.; CHEN, J. DeltaFosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity. **Brain Research**, v.835, p. 10-17, 1999.

OBARA, I.; GOULDING, S. P.; BELL, R. L.; GOULDING, S. P.; REYES, C. M.; LARSON, L. A.; ARY, A. W.; TRUITT, W. A.; SZUMLINSKI, K. K. Differential effects of chronic ethanol consumption and withdrawal on homer/glutamate receptor expression in subregions of the accumbens and amygdala of P rats. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**, v.33, p.1924-1934, 2009.

PEANA, A. T.; GIUGLIANO, V.; ROSAS, M.; SABARIEGO, M.; ACQUAS, E. Effects of L-cysteine on reinstatement of ethanol-seeking behavior and on reinstatement-elicited extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in the rat nucleus accumbens shell. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**, v.37, p.329-337, 2013.

PERROTTI, L. I.; WEAVER, R. R.; ROBISON, B.; RENTHAL, W.; MAZE, I.; YAZDANI, S.; ELMORE, R. G.; KNAPP, D. J.; SELLEY, D. E.; MARTIN, B. R.; SIMSELLEY, L.; BACHTTELL, R. K.; SELF, D. W.; NESTLER E. J. Distinct patterns of DeltaFosB induction in brain by drugs of abuse. **Synapse**, v.62, p.358-369, 2008.

PFARR, S.; MEINHARDT, M. W.; KLEE, M. L.; HANSSON, A. C.; VENGELIENE, V.; SCHONIG, K.; BARTSCH, D.; HOPE, B. T.; SPANAGEL, R.; SOMMER, W. H. Losing Control: Excessive Alcohol Seeking after Selective Inactivation of Cue-Responsive Neurons in the Infralimbic Cortex. **Journal of Neuroscience**, v.35, p.10750–10761, 2015.

PIERCE, R. C.; REEDER, D. C.; HICKS, J.; MORGAN, Z. R.; KALIVAS, P. W. Ibotenic acid lesions of the dorsal prefrontal cortex disrupt the expression of behavioral sensitization to cocaine. **Neuroscience**, v.82, p.1103–1114, 1998.

PLANETA, C. S.; MARIN, M. T, Effects of cocaine in periadolescent rats with or without early maternal separation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 1367-1371, 2002.

POHORECKY, L. A.; NEWMAN, B. Effect of ethanol on dopamine synthesis in rat striatal synaptosomes. **Drug and Alcohol Dependence**, v.2, p.329-334, 1977.

POST, R. M. Mechanisms of illness progression in the recurrent affective disorders. **Neurotoxicity Research**, v.18, p.256-271, 2010.

RAO, P. S.; SARI, Y. Glutamate transporter 1: target for the treatment of alcohol dependence. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, p.5148-5156, 2012.

REISSNER, K. J.; KALIVAS, P. W. Using glutamate homeostasis as a target for treating addictive disorders. **Behavioral Pharmacology**, v.21, p 514-522, 2010.

- ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. Addiction. **Annual Review Psychology**, v.54, p.25-53, 2003.
- ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. **Brain Research Reviews**, v18, p247-91, 1998.
- RYABININ, A. E.; WANG, Y. M. Repeated Alcohol Administration Differentially Affects c-Fos and FosB Protein Immunoreactivity in DBA/2J Mice. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**, v.22, p.1646–1654, 1998.
- SAJJA, R. K.; RAHMAN, S. Cytisine modulates chronic voluntary ethanol consumption and ethanol-induced striatal up-regulation of Δ FosB in mice. **Alcohol and Alcoholism**, v.47, p.299-307, 2013.
- SARI, Y.; SAKAI, M.; WEEDMAN, J. M.; REBEC, G. V.; BELL, R.L. Ceftriaxone, a beta-lactam antibiotic, reduces ethanol consumption in alcohol-preferring rats. **Alcohol Alcohol and Alcoholism**, v.46, p.239-46, 2011.
- SARI, Y.; SMITH, K. D.; ALI, P. K.; REBEC, G. V. Upregulation of GLT1 attenuates cue-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior in rats. **The Journal of Neuroscience**, v29, p9239-43, 2009.
- SCHMIDT, P.; PANG, D.; NYKAMP, D.; KNOWLTON, G.; JIA, H. N-acetylcysteine and sodium bicarbonate versus N-acetylcysteine and standard hydration for the prevention of radiocontrast-induced nephropathy following coronary angiography. **The Annals of Pharmacotherapy**, v.41, p.46-50, 2007.
- SCHNEIDER R. J. R.; SANTOS, C. F.; CLARIMUNDO, V.; DALMAZ, C.; ELISABETSKY, E.; GOMEZ, R. N-acetylcysteine prevents behavioral and biochemical changes induced by alcohol cessation in rats. **Alcohol and Alcoholism**, v.49, p.259-263, 2015.
- SEIVA, F.R.F. *et al.* Effects of N-acetylcysteine on alcohol abstinence and alcohol-induced adverse effects in rats. **Alcohol and Alcoholism**, v.43, p.127-135, 2009.
- SILVERI, M. M.; SPEAR, L. P. Decreased sensitivity to the hypnotic effects of ethanol early in ontogeny. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**, v.22, p.670-6, 1998.
- SCHENK, S.; SNOW, S. Sensitization to cocaine's motor activating properties produced by electrical kindling of the medial prefrontal cortex but not of the hippocampus. **Brain Research**, v.659, p.17–22, 1994.

- SMOOTHY, R.; BERRY, M. S. Time course of the locomotor stimulant and depressant effects of a single low dose of ethanol in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v.85, p.57-61, 1985.
- SOARES-SIMI, S. L.; PASTRELLO, D. M.; FERREIRA, Z. S.; YONAMINE, M.; MARCOURAKIS, T.; SCAVONE, C.; CAMARINI R. Changes in CREB activation in the prefrontal cortex and hippocampus blunt ethanol-induced behavioral sensitization in adolescent mice. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, v.7, p.94, 2013.
- SPANAGEL R. Recent animal models of alcoholism, **Alcohol Research & Health**, v.24, p.124-131, 2000.
- STEPHENS, D. N.; DUKA, T. Review: Cognitive and emotional consequences of binge drinking: role of amygdala and prefrontal cortex. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v.363, p.3169-79, 2008.
- STEWART, T. J.; BADIANI, A. Tolerance and sensitization to the behavioral effects of drugs. **Behavioral Pharmacology**, v.4, p.289-312, 1993.
- TAMBOUR, S.; DIDONE, V.; TIRELLI, E.; QUERTEMONT, E. Locomotor effects of ethanol and acetaldehyde after peripheral and intraventricular injections in Swiss and C57BL/6J mice. **Behavioral Brain Research**, v.172, p.145-154, 2006.
- TZSCHENTKE, T. M.; SCHMIDT, W. J. The development of cocaine-induced behavioral sensitization is affected by discrete quinolinic acid lesions of the prelimbic medial prefrontal cortex. **Brain Research**, v.795, p.71-76, 1998.
- WILSON, C. R. E.; GAFFAN, D.; BROWNING, P. G. F.; BAXTER, M. G. Functional localization within the prefrontal cortex: missing the forest for the trees. **Trends in Neuroscience**, v.33, p.533-540, 2010.
- VANDERSCHUREN, L. J.; KALIVAS, P. W. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. **Psychopharmacology (Berl)**, v.151, p. 99-120, 2000.
- VANDERSCHUREN, L. J.; DI CIANO, P.; EVERITT, B. J. Involvement of the dorsal striatum in cue-controlled cocaine seeking. **The Journal of Neuroscience**, v.25, p.8665-8670, 2005.
- VANGELIENE, V. *et al.* Neuropharmacology of alcohol addiction. **British Journal of Pharmacology**, v.154, p.299-315, 2008.

VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P.; SPEAR, N. E. Acute effects of ethanol on behavior of adolescent rats: role of social context. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**, v.25, p.377-385, 2001.

VILPOUX, C.; WARNAULT, V.; PIERREFICHE, O.; DAOUST, M.; NAASSILA, M. Ethanol-sensitive brain regions in rat and mouse: a cartographic review, using immediate early gene expression. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**, v.33, p.945-969, 2009.

WHITAKER, L.R.; CARNEIRO DE OLIVEIRA, P. E.; MCPHERSON, K. B.; FALLON, R. V.; PLANETA, C. S.; BONCI, A.; HOPE, B. T. Associative Learning Drives the Formation of Silent Synapses in Neuronal Ensembles of the Nucleus Accumbens. **Biological Psychiatry**, 2015.

WISE, R. A.; BOZARTH, M. A. A psychomotor stimulant theory of addiction. **Psychology Review**, v.94, p.469-92, 1987.

XI, Z. X.; BAKER, D. A.; SHEN, H.; CARSON, D. S.; KALIVAS, P. W. Group II metabotropic glutamate receptors modulate extracellular glutamate in the nucleus accumbens. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.300, p.162-171, 2002.

ZANCHETA, R.; POSSI, A. P.; PLANETA, C. S.; MARIN, M. T. Repeated administration of caffeine induces either sensitization or tolerance of locomotor stimulation depending on the environmental context. **Pharmacological Reports**, v.64, p.70-77, 2012.

Gabrielle Cunha Alves

De acordo:

Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Rod. Araraquara-Jaú Km 1 - CEP: 14801-902 - Araraquara-SP