

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DIEGO CORREIA

**INFLUÊNCIA DO FATOR DE LIBERAÇÃO DE CORTICOTROFINAS (CRF) EM
ROEDORES: ESTUDOS COMPORTAMENTAIS, MOLECULARES E
ELETROFISIOLÓGICOS RELACIONADOS AO ETANOL**

CURITIBA

2013

DIEGO CORREIA

**INFLUÊNCIA DO FATOR DE LIBERAÇÃO DE CORTICOTROFINAS (CRF) EM
ROEDORES: ESTUDOS COMPORTAMENTAIS, MOLECULARES E
ELETROFISIOLÓGICOS RELACIONADOS AO ETANOL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Profa. Dra. Roseli Boerngen de Lacerda
Co-orientador: Profa. Dra Rosana Camarini

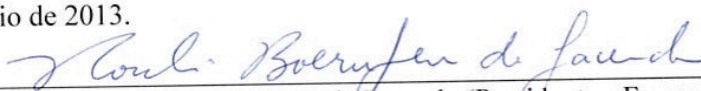
CURITIBA

2013



1 **ATA DO JULGAMENTO DA 19ª DEFESA DE TESE DE DOUTORADO**

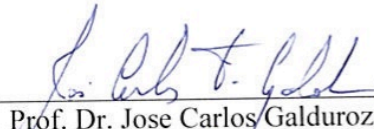
2 Ao nono dia do mês de maio do ano de dois mil e treze, às treze horas, no Anfiteatro nº10
3 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão
4 Examinadora da **Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em**
5 **Farmacologia**, de autoria do pós-graduando **DIEGO CORREIA**, intitulada:
6 “INFLUÊNCIA DO FATOR DE LIBERAÇÃO DE CORTICOTROFINAS (CRF) EM
7 ROEDORES: ESTUDOS COMPORTAMENTAIS, MOLECULARES E
8 ELETROFISIOLÓGICOS RELACIONADOS AO ETANOL”, sob orientação da Prof.^a
9 Dr.^a Roseli Boerngen de Lacerda e banca composta pelos professores: Prof.^a Dr.^a Roseli
10 Boerngen de Lacerda (Presidente - Farmacologia - UFPR), Prof.^a Dr.^a Isabel Maria
11 Hartmann de Quadros (Psicobiologia – UNIFESP), Prof. Dr. Jose Carlos Galduroz
12 (Psicobiologia – UNIFESP), Prof. Dr Marcelo Machado Ferro (Fisiologia - UEPG) e Prof.
13 Dr. Roberto Andreatini (Farmacologia – UFPR). A Banca Examinadora iniciou os
14 trabalhos. O candidato teve quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho,
15 sendo em seguida arguido durante trinta minutos por cada um dos membros da Banca, e
16 tendo trinta minutos para responder a cada uma das arguições. No final a Comissão
17 Examinadora emitiu o seguinte parecer: APROVADO. De acordo com o
18 Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, o pós-graduando
19 foi APROVADO. Para a publicação da versão final o trabalho deverá sofrer as
20 modificações sugeridas, que serão conferidas por sua Orientadora. Nada mais havendo a
21 tratar, a Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a presente ata, que será
22 assinada pela Presidente e pelos demais membros da banca examinadora, em Curitiba, 09
23 de maio de 2013.



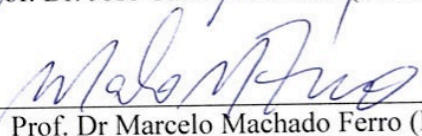
Prof.ª Dr.ª Roseli Boerngen de Lacerda (Presidente - Farmacologia - UFPR)



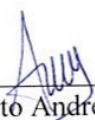
Prof.ª Dr.ª Isabel Maria Hartmann de Quadros (Psicobiologia – UNIFESP)



Prof. Dr. Jose Carlos Galduroz (Psicobiologia – UNIFESP)



Prof. Dr Marcelo Machado Ferro (Fisiologia - UEPG)



Prof. Dr. Roberto Andreatini (Farmacologia – UFPR)



PARECER

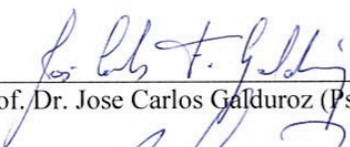
A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado “INFLUÊNCIA DO FATOR DE LIBERAÇÃO DE CORTICOTROFINAS (CRF) EM ROEDORES: ESTUDOS COMPORTAMENTAIS, MOLECULARES E ELETROFISIOLÓGICOS RELACIONADOS AO ETANOL”, de autoria do pós-graduando **DIEGO CORREIA**, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Roseli Boerngen de Lacerda e banca composta pelos professores: Prof.^a Dr.^a Roseli Boerngen de Lacerda (Presidente - Farmacologia - UFPR), Prof.^a Dr.^a Isabel Maria Hartmann de Quadros (Psicobiologia – UNIFESP), Prof. Dr. Jose Carlos Galduroz (Psicobiologia – UNIFESP), Prof. Dr Marcelo Machado Ferro (Fisiologia - UEPG) e Prof. Dr. Roberto Andreatini (Farmacologia – UFPR), reuniu-se e de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, o pós-graduando foi APROVADO. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas por sua Orientadora. Em Curitiba, 09 de maio de 2013.



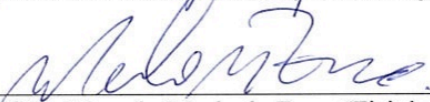
Prof.^a Dr.^a Roseli Boerngen de Lacerda (Presidente - Farmacologia - UFPR)




Prof.^a Dr.^a Isabel Maria Hartmann de Quadros (Psicobiologia – UNIFESP)



Prof. Dr. Jose Carlos Galduroz (Psicobiologia – UNIFESP)



Prof. Dr Marcelo Machado Ferro (Fisiologia - UEPG)



Prof. Dr. Roberto Andreatini (Farmacologia – UFPR)

AGRADECIMENTOS

A meus pais pela força, amor e compreensão.

A prof. Roseli Boerngen de Lacerda pela orientação, apoio e exemplo nesses quase 9 anos de farmacologia.

As minhas co-chefes Rosana Camarini e Marisa Roberto pela orientação e amizade.

A todos os professores, funcionários e amigos da farmacologia, biologia celular...fisiologia....

Aos funcionários e amigos do Scripps.

Aos meus guias.

Ao Bruno, a Andrea e aos estagiários da medicina sem os quais esse trabalho não seria possível.

A CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro.

As mesmas pessoas que marcharam pelos direitos civis nos Estados Unidos são as mesmas pessoas que protestaram contra o apartheid na África do Sul, que são as mesmas pessoas que trabalharam para a paz na Irlanda, e são as mesmas pessoas que lutaram contra a escravidão. Nós somos aquelas pessoas. NÓS somos a mesma pessoa. Porque nossas vozes foram ouvidas milhões de nossos irmãos e irmãs que estão vivos graças ao milagre dos remédios da AIDS e remédios contra a malária. Ahhhh! Eles serão os médicos, eles serão os enfermeiros, eles serão os cientistas que vão viver para resolver grandes problemas. Sim, há muitos obstáculos. Claro, sempre há barreiras no caminho da justiça. Mas Deus vai colocar um vento nas nossas costas e uma estrada a nossa frente, se trabalharmos com os outros como UM ... UM! '

Desmond Tutu

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIações.....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Epidemiologia do uso abusivo e da dependência do uso de drogas.....	17
2.0 REVISAO DA LITERATURA.....	20
2.1 Neurobiologia da Adição.....	20
2.1.1 Fases da Adição.....	20
2.1.1.1 Fase do binge/intoxicação.....	21
2.1.1.2 Fase de abstinência/afeto negativo.....	22
2.1.1.3 Fase da preocupação/antecipação (craving).....	22
2.1.2 Modelos Animais Para o Estudo da Dependência.....	23
2.1.3 Neuroadaptações a Repetição desse Ciclo (Intoxicação/Afeto Negativo/Craving).....	27
2.1.4 Mudança do Estado Motivacional na Dependência - Processo Contra-Adaptativo Oponente – Visão Psicológica.....	28
2.1.5 Processo Contra-Adaptativo Oponente – Visão Neurobiológica.....	29
2.1.6 Fator De Liberação de Corticotropina – CRF.....	31
2.1.6.1 Eixo Hipotalamo - Hipofise (pituitária) - Adrenais (HPA)	31
2.1.6.2 Sistemas do CRF extra hipotalâmicos.....	33
2.2 ESTRESSE.....	35
2.2.1. Estresse e Consumo de Etanol.....	37
2.2.2 CRF e Consumo de Etanol.....	40
2.2.3 Manipulação Farmacológica do CRF e Consumo De Etanol.....	42
2.2.3.1 Modelos de binge.....	42
2.2.3.2 Modelos de vaporização de etanol.....	44
2.2.3.3 Animais não dependentes.....	45

2.2.4	Outras Drogas de Abuso e CRF.....	45
2.2.5	Relação Entre Consumo de Etanol e CRF em Humanos.....	47
2.3	ESTUDOS ELETROFISIOLÓGICOS ENVOLVENDO ÁLCOOL, CRF E NÚCLEO CENTRAL DA AMÍGDALA.....	48
3.0	OBJETIVOS DO ESTUDO 1. INFLUÊNCIA DE UM ANTAGONISTA DO RECEPTOR CRF1 NO CONSUMO DE ETANOL POR CAMUNDONGOS COM DIFERENTES PADRÕES DE CONSUMO.....	52
4.0	MATERIAL E METODOS DO ESTUDO 1.....	53
4.1	Animais.....	53
4.2	Equipamento - Caixa de Movimentação Espontânea.....	53
4.3	Drogas.....	53
4.4	Ação aguda do CP-154,526 sozinho ou associado ao etanol.....	54
4.5	Modelo de Adição.....	55
4.6	Avaliação do efeito do CP-154,526 sobre o consumo de etanol dos animais classificados anteriormente pelo seu padrão de consumo.....	57
4.7	Análise Estatística.....	58
5.0	RESULTADOS DO ESTUDO 1.....	59
5.1	Ação aguda do CP-154,526 sozinho ou associado ao etanol.....	59
5.2	Modelo de adição – classificação dos animais nos diferentes padrões consumo.....	59
5.3	Modelo de adição – consumo de etanol antes do tratamento com o antagonista de CRF ₁	64
5.4	Modelo de adição – consumo de etanol após do tratamento com o antagonista de CRF ₁	65
6.0	DISCUSSÃO DO ESTUDO 1.....	66
7.0	OBJETIVOS DO ESTUDO 2 EXPRESSÃO DO RECEPTOR 1 DO CRF NA AMÍGDALA DE CAMUNDONGOS COM DIFERENTES PADRÕES DE CONSUMO.....	70
8.0	MATERIAL E METODOS DO ESTUDO 2.....	71
8.1	Animais e análise comportamental.....	71
8.2	Análise molecular transcricional por PCR em Tempo Real.....	71

8.2.1	Extração do RNA.....	71
8.2.2	Confecção do cDNA.....	72
8.2.3	Parâmetros da reação de PCR em tempo real.....	72
8.2.4	Desenho dos iniciadores (primers).....	73
8.2.5	Análise Quantitativa Relativa.....	73
9.0	RESULTADOS DO ESTUDO 2.....	74
9.1	Análise comportamental.....	74
9.2	Análise do transcrito.....	75
10	DISCUSSÃO DO ESTUDO 2.....	76
11	OBJETIVOS DO ESTUDO 3 : ESTUDOS ELETROFISIOLÓGICOS NO NÚCLEO CENTRAL DA AMIGDALA EM RATOS NAIVE E EXPOSTOS CRONICAMENTE AO ETANOL.....	78
12	MATERIAL E MÉTODOS DO ESTUDO 3.....	79
12.1	Animais e obtenção dos cortes cerebrais.....	79
12.2	Câmara de vaporização intermitente de etanol.....	79
12.3	Obtenção do neurônio e registros eletrofisiológicos.....	79
12.4	Análise estatística.....	83
13	RESULTADOS DO ESTUDO 3.....	83
14	DISCUSSÃO DO ESTUDO 3.....	89
15	CONCLUSÃO GERAL.....	91
16	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	92
	ANEXO 1.....	114

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diferentes fases da dependência e seus substratos neurais.	24
Figura 2 - Comparação de padrões afetivos dinâmicos relativos a um reforçador que foi apresentado uma ou repetidas vezes.	29
Figura 3 - Conceptualização das respostas hedônica associadas ao consume de drogas por não dependentes (A) e dependentes (B).	30
Figura 4 – Eixo hipotálamo – hipófise – adrenal (HPA).	32
Figura 5 – Diferentes agonistas e antagonistas para os receptores de CRF.	33
Figura 6 – Resumo as conexões aferentes dos núcleos lateral e central da amígdala.	35
Figura 7 – Resumo as conexões eferentes dos núcleos lateral, basal, medial e central da amígdala.	36
Figura 8 – Caixa de movimentação espontânea.	54
Figura 9 – Estrutura química do antagonista de CRF 1, CP154,526.	55
Figura 10 - Fases do modelo de adição	57
Figura 11 - Locomoção de animais tratados agudamente com veiculo, etanol ou CP 154,426 associado a veiculo ou etanol.	59
Figura 12 - Consumo de etanol nas diferentes fases do modelo de adição e apos a administração do antagonista de CRF ₁ .	66
Figura 13 - Consumo de etanol nas diferentes fases do modelo de adição.	74
Figura 14 - Quantidade normalizada de mRNA para o receptor de CRF ₁ em animais com diferentes padrões de consumo e controle, sem exposição ao etanol.	76
Figura 15 - Local onde eram colocados os eletrodos estimulador e de registro no núcleo central da amígdala.	81
Figura 16 - Exemplo de curva i/v (corrente/voltagem).	82
Figura 17 - Exemplo de curva i/o (input/output).	82
Figura 18 - Amplitude dos EPSPs apos a aplicação de etanol (44mM)	83

Figura 19 - Amplitude relativa ao basal durante o i/o longo dos EPSP apos a aplicação de etanol (44mM) em animais naïve e submetidos ao procedimento de CIET.	85
Figura 20 – PPF apos perfusão de etanol em animais naïve e expostos a CEIT.	85
Figura 21 - Amplitude relativa ao basal durante o i/o longo dos EPSP apos a aplicação de CRF em diferentes concentrações.	86
Figura 22 - PPF apos infusão de CRF em animais naïve.	87
Figura 23 – Interação do antagonista de CRF ₁ e do etanol sobres os EPSPs.	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos 7.939 entrevistados, segundo uso na vida, uso no ano e uso no mês das drogas mais comuns em 108 cidades brasileiras com mais de 200 mil habitantes.	18
Tabela 2 - Distribuição dos 7.939 entrevistados, segundo dependência de drogas, em 108 cidades brasileiras com mais de 200 mil habitantes.	18
Tabela 3 - Uso de diferentes drogas psicotrópicas entre 50.890 estudantes de ensino fundamental(1) e médio das redes pública e privada das 27 capitais brasileiras, de acordo com os tipos de uso, com análise comparativa entre as duas redes de ensino.	19
Tabela 4 - Diferentes tipos de modelos animais usados no estudo da adição.	26
Tabela 5 - Diferentes grupos de tratamento usados no teste agudo do CP-154,426.	55
Tabela 6 - Padrão individual de consumo de etanol do grupo adicto	60
Tabela 7 - Padrão individual de consumo de etanol do grupo pesado.	61
Tabela 8 - Padrão individual de consumo de etanol do grupo leve	61
Tabela 9 - Padrão individual de consumo de etanol do grupo indefinido.	63
Tabela 10 – Sequência dos iniciadores para os genes de referência cyclopeptidilprolilisomerase A ou Ppia) e de interesse (Crhr1).	73
Tabela 11 – Parâmetros obtidos nas reações de PCR em tempo real.	75
Tabela 12 – Componente não NMDA da resposta ao etanol.	84
Tabela 13 - Componente não NMDA da resposta ao CRF.	88
Tabela 14 – PPF antes e durante a aplicação de R121919, etanol e durante washout.	89

LISTA DE ABREVIATURAS

A - adicto
aCSF – líquido cérebro espinhal artificial
ACTH – hormônio adrenocorticotropico
AD – fase de adulteração
AQ – fase de aquisição
BNST- núcleo do leito da estria terminal
CeA – núcleo central da amígdala
CEIT – câmara de vaporização intermitente de etanol
CRF – fator de liberação de corticotrofina
CRF₁– receptor de CRF tipo 1
CRF₂– receptor de CRF tipo 2
DA – dopamina
DP – desvio padrão
EPSP – potencial excitatório pós sináptico
GABA – ácido gama aminobutírico
H – bebedor pesado
HPA – eixo hipotálamo – hipófise – adrenal
i.p. – intraperitoneal
i/v – curva corrente/voltagem
i/o – curva input/output
L – bebedor leve
NA - noradrenalina
NMDA – n-metil d-aspartato, receptor do glutamato
PPF – potencialização pulso pareada
RE – fase de reapresentação

INFLUÊNCIA DO FATOR DE LIBERAÇÃO DE CORTICOTROFINAS (CRF) NO CONSUMO DE ETANOL EM CAMUNDONGOS

Autores:

Diego Correia. Aluno de Doutorado em Farmacologia. ¹

Roseli Boerngen de Lacerda. Professora Dra. em Ciências (Psicobiologia).

1. Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmacologia.

Endereço: Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba – PR

Caixa Postal: 190-31 CEP: 81531-980

E-mail do responsável: diegocorreia@ufpr.br

RESUMO

O fator de liberação de corticotropina (CRF) tem sido ligado ao consumo e a dependência de álcool. Sabe-se que o etanol age no sistema gabaérgico no núcleo central da amígdala (CeA) via receptores CRF₁ e esse efeito é importante para a redução no consumo de etanol observada em ratos sujeitos ao modelo de vaporização de etanol. O presente estudo usou camundongos Swiss *outbred* sujeitos a um modelo de adição onde eles têm a livre escolha para consumir água e etanol 5 e 10% v/v. O modelo se divide em quatro fases: 1) aquisição, (AQ) com duração de 10 semanas e livre escolha entre as três soluções; 2) abstinência, (W) com duração de duas semanas e oferta apenas da água aos animais; 3) reexposição, (RE) com duração de duas semanas e novamente livre escolha entre as três soluções; 4) adulteração, (AD) com duração de duas semanas e livre escolha entre água e as soluções de etanol adulteradas com quinino. Com base no consumo individual os animais são classificados em três grupos: 1) adicto, (A), preferência pelas soluções de etanol e consumo persistente em todas as fases; 2) bebedor pesado, (H), preferência por etanol e redução no consumo de etanol na fase AD comparada a fase AQ; 3) bebedores leves, (L) preferência por água em todas as fases. O grupo controle teve acesso apenas a água. Foi estudado os níveis de transcrito para o receptor de CRF tipo 1 na amígdala de animais com diferentes padrões de consumo, bem como o efeito de um antagonista CRF₁ (CP-154,526) no consumo de etanol desses grupos. Apenas o grupo H teve níveis superiores de transcrito quando comparados com o controle. A dose mais alta do antagonista reduziu o consumo de etanol nos grupos A e H, comparando com o veículo. O grupo L não respondeu ao tratamento. Os receptores CRF₁ parecem estar envolvidos no consumo de etanol apenas nos animais com alto consumo, A e H, e as neuroadaptações relativas ao sistema do CRF são diferentes entre animais com diferentes padrões e consumo. Para se estudar os efeitos do etanol sobre o glutamato em neurônios da CeA foi usada uma abordagem eletrofisiológica *in vitro* em *slices* de cérebro. Ambos etanol e CRF diminuem a amplitude dos potenciais pós sinápticos excitatórios (EPSP) evocados e um antagonista do receptor CRF₁ não bloqueia esse efeito. Esses dados sugerem que os efeitos do etanol sobre o sistema glutamatérgico na CeA não dependem do receptor CRF₁.

Palavras chave: dependência; etanol; CRF; paradigma de livre escolha; glutamato; núcleo central da amígdala.

ABSTRACT

Corticotropin-releasing factor (CRF) has been linked to ethanol consumption and addiction. It is known that ethanol acts on the gabaergic system in central nucleus of amygdala (CeA) via CRF₁ receptors, and that this action is important to ethanol intake reducing effects observed in animals subject to ethanol vapor exposure and than administered a CRF₁ antagonist. The present study used outbred, Swiss mice subjected to a long-term three-bottle free-choice model (5% water and 10% v/v ethanol) that consisted of four phases: acquisition (AC, 10 weeks), withdrawal (W, 2 weeks), reexposure (RE, 2 weeks), and quinine-adulteration (AD, 2 weeks). Based on individual ethanol intake, the mice were classified into three groups: “addicted” (A group; preference for ethanol and persistent consumption during all phases), “heavy” (H group; preference for ethanol and a reduction of ethanol intake in the AD phase compared with the AC phase), and “light” (L group; preference for water during all phases). The control group had only access to water. We studied CRF₁ receptor mRNA levels in the amygdala in the mice with different intake profiles and the effect of administration of the CRF₁ receptor antagonist CP-154,526 on ethanol intake. We found higher CRF₁ transcript levels only in the H group compared with control mice. The highest dose of CP-154,426 reduced ethanol intake in the H and A groups compared with vehicle. The L group did not respond to the antagonist. CRF₁ receptors appear to be involved in ethanol consumption only in high-drinking mice, and CRF system-related neuroadaptations are different among different ethanol intake profiles under these experimental conditions. At last, using an in vitro electrophysiological approach in brain slices in brain slices, we investigated the effects of ethanol on glutamate in CeA neurons. Both CRF and ethanol decreased evoked excitatory postsynaptic potentials. The previous perfusion of a CRF₁ antagonist (R121919) did not block ethanol’s effect. This results indicate that ethanol’s effects on glutamate in CeA neurons do not depend on CRF₁ receptors.

Keywords: addiction; ethanol; CRF; free-choice paradigm; glutamate; central nucleus of amygdala.

1. INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DO USO ABUSIVO E DA DEPENDÊNCIA DE DROGAS DE ABUSO

O uso de drogas psicoativas (com ação sobre o sistema nervoso central) remonta aos ancestrais dos homens. Seja pelo seu uso em rituais religiosos, como medicamento ou simplesmente pelo prazer que podem propiciar ao usuário. Durante a história, esse uso passou por períodos de aceitação e de total proibição, sendo por isso que algumas drogas são aceitas em determinadas culturas e em outras são utilizadas somente na clandestinidade (SILVEIRA; MOREIRA, 2006).

No Brasil e no mundo o uso de drogas psicoativas é muito alto. Nas tabelas 1 e 2 abaixo podem ser vistos os percentuais de uso e dependência das principais drogas de abuso no Brasil detectados no ano de 2005 em 108 cidades brasileiras com população superior a 200 mil. A prevalência de uso na vida de qualquer droga, exceto tabaco e álcool, foi maior na região Nordeste, onde alcançou 27,6%. A região com menos uso na vida foi a Norte com 14,4%. Considerando-se o país como um todo, a taxa foi de 22,8% da população. Quanto ao álcool, o menor uso na vida ocorreu na Região Norte (53,9%) e o maior na Sudeste (80,4%). Ainda, são observados mais dependentes de álcool para o sexo masculino (19,5%) comparado com sexo feminino (6,9%) (CARLINI *et al.*, 2007).

O abuso/uso nocivo de álcool e a sua dependência são problemas que afetam mais de 25 milhões de brasileiros e representam um dos maiores problemas de saúde pública tanto no Brasil como no resto do mundo (CARLINI *et al.*, 2007). Além disso, os problemas decorrentes direta e indiretamente do consumo de álcool, como acidentes, violência e perda de produtividade, geram grandes prejuízos econômicos (WHO, 2002).

DROGAS	TIPOS DE USO %		
	Na vida	No ano	No mês
MACONHA	8,8	2,6	1,9
SOLVENTES	6,1	1,2	0,4
BENZODIAZEPÍNICOS	5,6	2,1	1,3
OREXÍGENOS	4,1	3,8	0,1
ESTIMULANTES	3,2	0,7	0,3
COCAÍNA	2,9	0,7	0,4
XAROPES (codeína)	1,9	0,4	0,2
OPIÁCEOS	1,3	0,5	0,3
ALUCINÓGENOS	1,1	0,32	0,2
ESTERÓIDES	0,9	0,2	0,1
CRACK	0,7	0,1	0,1
BARBITÚRICOS	0,7	0,2	0,1
ANTICOLINÉRGICOS	0,5	0	0
MERLA	0,2	0	0
HEROÍNA	0,1	0	0
ÁLCOOL	74,6	49,8	38,3
TABACO	44,0	19,2	18,4

Tabela 1- Distribuição dos 7.939 entrevistados, segundo uso na vida, uso no ano e uso no mês das drogas mais comuns em 108 cidades brasileiras com mais de 200 mil habitantes. FONTE: CARLINI *et al.*, 2007.

DEPENDÊNCIA	
% de dependentes:	
DROGAS	2005
ÁLCOOL	12,3
TABACO	10,1
MACONHA	1,2
BENZODIAZEPÍNICOS	0,5
SOLVENTES	0,2
ESTIMULANTES	0,2

Tabela 2- Distribuição dos 7.939 entrevistados, segundo dependência de drogas, em 108 cidades brasileiras com mais de 200 mil habitantes. FONTE: CARLINI *et al.*, 2007.

O VI Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio das Redes Pública e Privada de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras realizado em 2010 mostrou que o início ao uso das drogas é bastante precoce. Álcool e tabaco são as drogas de maior prevalência de uso na vida, seguidas pelos inalantes. O crack não é uma droga de destaque entre estudantes deste nível de escolaridade, sempre lembrando que muitas vezes os jovens que apresentam problemas maiores com drogas já se encontram afastados

da vida escolar. Alunos de escolas particulares apresentam maior prevalência de uso de drogas para os padrões de uso na vida e ano, porém os de escola pública apresentam maiores índices de uso pesado, quando comparados aos de escolas particulares. Na tabela 3, pode-se ver as prevalências de uso das droga distribuídas por escola publica ou privada e por tipo de uso (CARLINI *et al.*, 2010).

Tipo de Droga	Tipos de Uso % ⁽⁵⁾									
	Vida ⁽³⁾		Ano ⁽⁴⁾		Mês ⁽⁴⁾		Frequente ⁽⁴⁾		Pesado ⁽⁴⁾	
	Pública	Privada	Pública	Privada	Pública	Privada	Pública	Privada	Pública	Privada
Maconha	5,8	5,1	3,7	3,9	2,0	1,9	0,3	0,4	0,5	0,3*
Cocaína	2,8	1,5*	1,9	1,0*	1,2	0,4*	0,2	0,0*	0,2	0,1*
Crack	0,7	0,2*	0,4	0,2*	0,3	0,2*	0,1	0,0*	0,1	0,0
Anfetamínicos	2,1	2,7*	1,6	2,2*	0,9	1,1*	0,1	0,2	0,3	0,2
Solventes/Inalantes	8,1	10,9*	4,9	6,3*	2,2	2,2	0,2	0,1	0,3	0,2*
Ansiolíticos	4,6	7,9*	2,1	4,6*	1,2	1,9*	0,1	0,1	0,1	0,2
Anticolinérgicos	0,5	0,6	0,4	0,4	0,2	0,3	0,0	0,1	0,0	0,0
Analgésicos Opiáceos	0,5	0,9*	-	-	-	-	-	-	-	-
Esteróides/Anabolizantes	1,3	1,7*	-	-	-	-	-	-	-	-
Ópio/Heroína	0,3	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-
LSD	0,8	1,6*	-	-	-	-	-	-	-	-
Êxtase	1,2	1,5*	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanfetamina	0,3	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-
Ketamina	0,2	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
Benflogin®	0,4	0,6*	-	-	-	-	-	-	-	-
Energético com Álcool	14,8	17,7*	-	-	-	-	-	-	-	-
Qualquer Droga ⁽²⁾	24,2	30,2*	9,9	13,6*	5,3	6,2*	0,9	0,8	1,2	0,8*
Tabaco	17,9	13,1*	9,8	8,7	5,8	4,3*	0,7	0,7	1,7	0,7*
Álcool	59,3	65,0*	41,1	47,5*	20,6	23,0*	2,5	3,6*	1,7	1,1*

Tabela 3 - Uso de diferentes drogas psicotrópicas entre 50.890 estudantes de ensino fundamental(1) e médio das redes pública e privada das 27 capitais brasileiras, de acordo com os tipos de uso, com análise comparativa entre as duas redes de ensino. FONTE: CARLINI *et al.*, 2010.

Nota: Rede pública engloba as escolas municipais, estaduais e federais.

(1) A partir do 6º ano.

(2) Excluindo álcool e tabaco.

(3) Maconha, cocaína, crack, anfetaminas, solventes, ansiolíticos, anticolinérgicos, analgésicos opiáceos, esteroides/anabolizantes, ópio/heroina, LSD, êxtase, metanfetamina, ketamina, benflogin®, energético com álcool.

(4) Maconha, cocaína, crack, anfetaminas, solventes, ansiolíticos, anticolinérgicos.

(5) Dados ponderados e expressos em porcentagem.

* indica significância estatística com $p \leq 0,05$; Teste de Qui-quadrado.

O álcool é a substância psicoativa de maior uso no Brasil. Vários fatores influenciam para isso, principalmente: o fato de ser uma droga lícita, socialmente aceita e muitas vezes ter seu uso incentivado pela sociedade no que se pode chamar de “ritos de passagem” (por exemplo, a primeira intoxicação do adolescente), além de ter fácil acesso, baixo preço e deficiência na fiscalização (venda para menores de idade, por exemplo), entre outros.

O uso nocivo do álcool é um dos principais riscos a saúde mundial. É um fator causal em mais de sessenta tipos de doenças e resulta em aproximadamente 2.5 milhões de mortes por ano. Ou seja, o álcool mata mais que o vírus HIV ou a

tuberculose. Assim, 4% das mortes no mundo podem ser atribuídas ao álcool. O uso nocivo do álcool é especialmente fatal para jovens sendo o principal fator de risco para morte em homens com idade entre quinze e cinquenta e nove anos. (WHO, 2011)

A maioria dos usuários de drogas de abuso, incluindo o álcool, não se torna dependente. Muitos fatores como disponibilidade da droga, via de administração, genética, e eventos cotidianos contribuem na transição do uso da droga para a dependência da droga. Um dos principais desafios atualmente é descobrir os mecanismos neurobiológicos que conferem essa vulnerabilidade. Somando-se isso à alta prevalência de uso assim como às suas consequências, as quais não se limitam somente à saúde pública, mas também aos problemas legais (infrações de trânsito, agressões, furtos), justificam a busca pelo entendimento da neurobiologia desse comportamento que pode ser a base do desenvolvimento de novas terapêuticas da dependência.

2.0 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 NEUROBIOLOGIA DA ADIÇÃO

2.1.1 Fases da Adição

A dependência de drogas é um transtorno crônico com recaídas caracterizado pelo uso compulsivo e perda de controle sobre o consumo (APA, 1994). Nesse trabalho as palavras “adição” e “dependência” irão se referir a esse transtorno.

Foi proposto por KOOB e LE MOAL (2001) o modelo de alostase hedônica no qual a dependência tem sido estudada através da sua divisão em três estágios que fecham um ciclo repetitivo: *binge/intoxicação* (motivado pelo reforço positivo), *abstinência/afeto negativo* (motivado pelo reforço negativo) e *preocupação/antecipação* (motivado pelos reforços positivos e negativos condicionados). Esses estágios normalmente interagem entre si, potencializando-se, tornando-se assim mais intensos e levando ao estado patológico conhecido como dependência. Essas fases e respectivos substratos neurais estão representados na figura 1.

2.1.1.1 Fase do *binge*/intoxicação

O principal componente motivacional dessa fase é o reforço positivo, que pode ser definido como qualquer evento que aumenta a probabilidade de uma resposta. Esse reforço depende de várias regiões encefálicas, mas a mais clássica e enfatizada é a via do feixe prosencefálico medial que conecta a área tegmentar ventral ao prosencéfalo basal. De fato hoje se sabe a importância dos padrões de disparo dos neurônios dopaminérgicos na regulação de processos como reforço, erro na predição de reforço (processo no qual já existe a expectativa do reforço) e resposta a eventos aversivos (revisado em SCHULTZ, 2007). Apesar da ênfase dada a esse feixe ascendente monoaminérgico (noradrenalina, NA e dopamina, DA) outros sistemas não dopaminérgicos tem seu papel na regulação do reforço positivo. Todas as drogas de abuso ativam o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (revisado em NESTLER, 2005), mas existem fortes evidências de que existe reforço independente de dopamina no núcleo accumbens. Já se sabe que essa via não é crítica para os efeitos reforçadores agudos de todas as drogas de abuso. Como exemplo, lesões do sistema mesocorticolímbico bloqueiam os efeitos reforçadores da cocaína e da d-anfetamina (MCGREGOR e ROBERTS, 1993), mas lesões do núcleo accumbens não bloquearam a autoadministração de heroína ou etanol (KOOB e LE MOAL, 2006).

A amígdala estendida, constituída pelo núcleo central da amígdala (CeA), núcleo do leito da estria terminal (BNST) e a zona de transição da porção medial (*shell*) do núcleo accumbens também estão envolvidos no processo do reforço. O CeA tem um papel chave nos efeitos reforçadores agudos das drogas de abuso, assim, MOLLER et al. (1997) demonstraram que lesões desse núcleo bloquearam a autoadministração oral de etanol e, DYR e KOSTOWSKI (1995) mostraram que a injeção de um antagonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT₃ na CeA reduziu a autoadministração de etanol em ratos não dependentes.

Alguns medicamentos interferem nessa fase, a citar:

- Dissulfiram: aprovado pelo FDA para tratamento do alcoolismo em 1954, é um inibidor da acetaldéido dehidrogenase;
- Naltrexona: aprovado pelo FDA 1994 para tratamento do alcoolismo, é um antagonista competitivo dos receptores opioides tendo maior afinidade pelo subtipo μ ;

- Metadona: aprovado pelo FDA em 1972 para tratamento da dependência de opióides, é um opióide com alta biodisponibilidade por via oral e com alto tempo de meia vida. Usado como terapia de substituição;
- Buprenorfina: aprovado pelo FDA em 2002 para tratamento da dependência a opióides, é agonista parcial dos receptores de opióides μ e κ e dos receptores da nociceptina, e também é antagonista dos receptores opióides δ .

2.1.1.2 Fase de abstinência/afeto negativo

A amígdala estendida tem papel chave nessa fase cujo principal componente motivacional é o reforço negativo, definido como um processo no qual a retirada de um estímulo aversivo (estado emocional negativo gerado pela abstinência, por exemplo) aumenta a probabilidade de uma resposta. A amígdala estendida parece representar o substrato neural comum que integra sistemas de atenção/estresse com sistemas de processamento hedônico. Desbalanços nesses sistemas podem promover mecanismos reforçadores negativos. A amígdala estendida recebe muitos aferentes de estruturas límbicas como a amígdala basolateral e o hipocampo e projeta eferentes para a porção medial do pálido ventral e hipotálamo lateral, interligando assim estruturas límbicas com o sistema motor extrapiramidal.

Os medicamentos atuais que interferem nessa fase são:

- Os já citados metadona e buprenorfina para dependência de opioides e para tabaco;
- *patches* de nicotina;
- vareniclina, a qual foi aprovada em 2006, no uso para tabagismo, sendo um agonista parcial $\alpha 4\beta 2$ nicotínico.

2.1.1.3 Fase da preocupação/antecipação (*craving*)

Os modelos animais de “*craving*” baseiam-se na recaída ao uso da droga após terem aprendido a se auto-administrar e passarem por período de abstinência. A recaída ao comportamento de autoadministração pode ser induzida por pequenas quantidades da droga (*priming*), pista ambiental ou estresse. A recaída induzida por droga parece envolver o circuito córtex pré-frontal medial – núcleo accumbens – pálido ventral, sendo o glutamato o principal neurotransmissor entre córtex e accumbens. Entretanto, na recaída induzida por pista ambiental existe também a

participação da amígdala basolateral, possivelmente através de suas conexões com o córtex pré-frontal. A recaída induzida por estresse parece ser induzida via participação de noradrenalina e CRF em regiões da amígdala estendida. O hipocampo também participa na recaída induzida por pistas ambientais, e a perda de células progenitoras, particularmente no hipocampo e córtex, tem um papel na vulnerabilidade à recaída. A normalização da neurogênese ou gliogênese pode ajudar a reverter a neuroplasticidade durante a abstinência e assim reduzir a vulnerabilidade a recaídas. (revisado em MANDYAM e KOOB, 2012).

Os medicamentos atuais que interferem nessa fase são:

- Acamprosato para tratamento do alcoolismo, aprovado em 2004, é um agonista NMDA e antagonista dos receptores glutamatergicos metabotrópicos.
- Bupropiona para tratamento de tabagismo, aprovada em 1997, é um inibidor da recaptação de dopamina e menos intensamente de noradrenalina.

2.1.2 Modelos Animais Para o Estudo da Dependência

Sabe-se que modelos animais que mimetizem uma síndrome completa são muito difíceis, senão impossíveis, de serem alcançados. Nos modelos animais para drogas de abuso, dois objetivos principais são almejados. O primeiro deles visa estudar as consequências do uso crônico das drogas, incluindo o desenvolvimento de tolerância/sensibilização e a dependência física/síndrome de abstinência. Nesses modelos, a droga é administrada pelo pesquisador de maneira forçada através da dieta, de intubação gástrica, por injeção ou até mesmo por vaporização. O segundo objetivo é estudar no animal o comportamento voluntário de procura à droga. Os modelos de comportamento de procura à droga tentam demonstrar as propriedades reforçadoras das drogas, as quais desempenham um papel central no desenvolvimento da dependência (SPANAGEL, 2000; MEISCH, 2001).

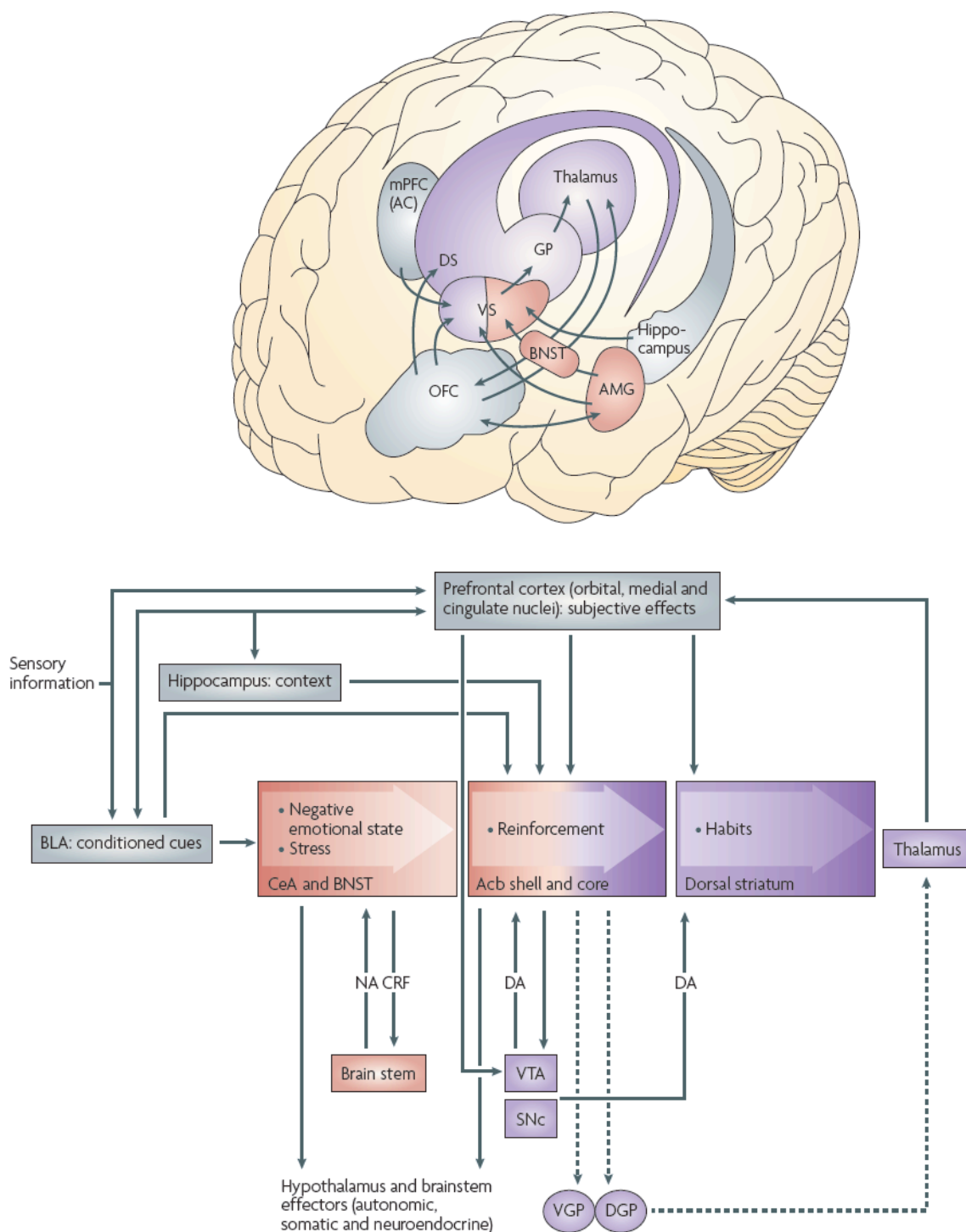


Figura 1 - Diferentes fases da dependência e seus substratos neurais. Em vermelho destaque para as regiões encefálicas envolvidas com a fase de afeto negativo. Em Roxo as regiões ligadas a intoxicação e em cinza as regiões ligadas ao *craving*. VGP globo pálido ventral; DGP globo pálido dorsal; SNc substância negra parte compacta; VTA área tegmentar ventral; DA dopamina; NA noradrenalina; CRF fator de liberação de corticotropina; CeA núcleo central da amígdala; BNST núcleo do leito da estria terminal; Acb accumbens; BLA núcleo basolateral da amígdala; OFC córtex orbitofrontal; VS estriado ventral; mPFC córtex pré frontal medial; DS estriado dorsal; GP globo pálido. Fonte: KOOB, KENNETH LLOYD e MASON, 2009.

Os modelos animais desenvolvidos até o momento para estudar dependência de drogas podem ser classificados em três grupos: modelos que estudam as propriedades reforçadoras positivas, ou seja, relacionados à fase da intoxicação aguda/binge, modelos que estudam as propriedades reforçadoras negativas, ou seja, relacionados à fase da abstinência/afeto negativo e modelos que tentam avaliar aspectos característicos da adição, como o uso compulsivo (*craving*), a recaída e a perda do controle sobre o uso. (SHIPPENBERG; KOOB, 2002; SPANAGEL, 2000). Esses modelos estão resumidos na tabela 4.

Foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa da prof. Roseli Boerngen-Lacerda um modelo de ingestão por livre-escolha, no qual os animais podem escolher entre água e soluções de etanol 5 e 10% v/v em suas gaiolas. O modelo é uma adaptação do que foi proposto por WOLFFGRAMM e HEYNE (1995) e WOLFFGRAMM e colaboradores (2000) no qual expuseram ratos a um paradigma de ingestão oral por livre escolha, no qual os animais tinham livre acesso à água e a diferentes soluções de etanol com concentrações de 5, 10 e 20% em suas gaiolas individuais. Esta múltipla escolha é necessária, pois cada rato tende a preferir certa concentração e assim, oferecer uma escolha binária entre água e uma única concentração de álcool, poderia levar a resultados errôneos. Inicialmente, o comportamento de ingestão de álcool é exploratório e durante esse período, denominado fase de aquisição, observam-se dias de alto consumo intercalados com dias de quase abstinência. Nessa fase, os ratos experimentam os efeitos psicotrópicos do álcool e ajustam seu comportamento de ingestão.

Na sequência, cada rato desenvolve seu padrão individual de consumo que permanece estável durante vários meses. Esta fase é chamada de fase de consumo constante. Após seis meses de acesso contínuo ao álcool, os ratos gradualmente modificam seu padrão sendo que alguns apresentam aumento do consumo nos meses subsequentes (fase de aumento da demanda). Os animais, então, são submetidos a um longo período de abstinência de nove meses. Após esse período, eles novamente têm acesso às soluções de álcool. Alguns ratos exibem alto consumo e preferência pelo álcool nesse período de reapresentação (WOLFFGRAMM, 1990).

Estágio	Tipo de reforço	Modelo \ teste animal
Intoxicação/binge	Positivo	Preferencia condicionada de lugar
		Auto administração da droga
		Diminuição nos limiares de reforço (estimulação elétrica intracraniana)
Abstinência	Negativo	Aversão condicionada de lugar
		Aumento na auto administração na dependência
		Aumento nos limiares de reforço (estimulação elétrica intracraniana)
Preocupação/antecipação	Positivo e negativo condicionados	Recaída induzida pela droga
		Recaída induzida por estresse
		Recaída induzida por contexto (pista ambiental)

Tabela 4 - Diferentes tipos de modelos animais usados no estudo da adição. Adaptado de KOOB, KENNETH LLOYD e MASON 2009.

Além disso, o comportamento aditivo, definido por uma perda de controle sobre a ingestão de álcool, pode ser testado através da continuação do consumo de álcool quando da adulteração do sabor com quinino que produz um sabor amargo, supostamente aversivo. Esta adulteração das soluções de álcool reduz substancialmente o consumo nos animais não-adictos, enquanto que, animais adictos reduzem pouco, ou nada, a ingestão de álcool, de modo que seu consumo e preferência pelo etanol continuam significativamente maiores do que os dos animais controles (WOLFFGRAMM, 1990).

Esse modelo utilizado por Wolffgramm (1990) foi então validado para camundongos em nosso laboratório (FACHIN-SCHEIT *et al.*, 2006), sendo utilizada a droga naltrexona, um antagonista opióide, para a validação preditiva do modelo, uma vez que esta droga é considerada como medicamento anti-*craving* em alcoolistas humanos. Os resultados obtidos com a naltrexona mostraram diminuição do consumo de etanol nos camundongos com padrão de consumo pesado e leve, considerados como não adictos no modelo, enquanto que os camundongos adictos continuaram com seu padrão de consumo. Estes dados foram interpretados como a naltrexona sendo antagonista das propriedades reforçadoras positivas do álcool, porém sem efeito anti-*craving* neste modelo proposto (FACHIN-SCHEIT *et al.*, 2006).

O modelo foi replicado varias vezes. A primeira replicação foi feita por Ribeiro *et al.* (2008) onde mostrou-se que os animais com diferentes perfis de consumo não apresentam diferentes níveis de sensibilização comportamental ao etanol quando desafiados ao final do modelo com uma dose de 2g/Kg ip de etanol. Da mesma maneira animais previamente selecionados como sensibilizados e não sensibilizados ao efeito estimulante do etanol apresentam igual distribuição entre os grupos de consumo. Correia *et al.*, (2009) analisaram se padrões de ansiedade basais influenciavam o consumo e/ou desenvolvimento de padrões de consumo no modelo. Porém, não foram encontradas associações entre consumo e níveis de ansiedade. Ribeiro *et al.*, (2012) mostraram que apenas em animais caracterizados como adictos apareceram alterações nos níveis de transcrito para o receptor GABA (B) em regiões encefálicas como córtex pré frontal, hipocampo, estriado e hipotálamo. Villas-boas *et al.*, (2012) mostraram que o baclofeno, um agonista do receptor GABA B, foi eficaz em reduzir o consumo de etanol apenas em animais caracterizados como bebedores leves.

2.1.3 Neuroadaptações a Repetição desse Ciclo (Intoxicação/Afeto Negativo/Craving)

Com a repetição desse ciclo acontece uma mudança que vai do uso impulsivo ao uso compulsivo. Impulsividade pode ser definida como a falha em resistir a um impulso, tentação, que é potencialmente danoso a si próprio ou aos outros. O individuo impulsivo não tem a capacidade de esperar por uma gratificação retardada. Prefere gratificações menores e imediatas a gratificações maiores e mais tardias. O

indivíduo é distraído, tem dificuldade de manter a atenção em uma tarefa particular e é desinibido porque não consegue controlar o comportamento de forma a se comportar como seria esperado segundo as normas sociais. O que difere a impulsividade da compulsividade é a motivação que leva ao comportamento. Enquanto a compulsão envolve uma tentativa de reduzir a ansiedade (reforço negativo) e é ego-distônica, a impulsividade envolve a busca por uma gratificação (reforço positivo) e é ego-sintônica, no entanto, em ambas situações a dificuldade é a mesma para o indivíduo: não consegue impedir o comportamento repetitivo.

2.1.4 Mudança do Estado Motivacional na Dependência - Processo Contra-Adaptativo Oponente – Visão Psicológica

Solomon e Corbit (1974) propuseram um modelo para explicar a dinâmica temporal dos estados emocionais no desenvolvimento da dependência. A teoria do processo oponente da motivação adquirida foi sugerida pela existência de três fenômenos relacionados encontrados em muitos comportamentos motivados: (a) efeitos hedônicos contrastantes; (b) habituação hedônica, tolerância; (c) abstinência hedônica, síndrome de abstinência. Efeitos hedônicos contrastantes se referem ao fato que as propriedades reforçadoras da apresentação do reforço contrastam com as propriedades reforçadoras de sua retirada, ou seja, durante o período após a apresentação do reforço existe um estado hedônico ou afetivo qualitativamente diferente daquele presente na primeira apresentação do reforço. A habilidade do estímulo ou substância em produzir o reforço diminui com a repetição. A teoria assume que o encéfalo se organiza para se opor ou suprimir muitos processos emocionais, sejam eles prazerosos ou aversivos, sejam eles reforços positivos ou negativos. O primeiro processo, o processo a, leva ao processo b que se opõe e suprime o estado afetivo gerado inicialmente pelo processo a. Sendo assim se o processo a é agradável, desejável, o processo b é aversivo, não desejado.

As magnitudes e qualidades dos processos a e b são somadas resultando no estado emocional do indivíduo para determinado momento. No início do estímulo o processo a é mais pronunciado, sendo assim sobressai ao processo b. Como passar o tempo o processo b, que demora mais para se iniciar, leva a uma diminuição gradual no processo a. Quando já não houver mais estímulo o processo b passa a ser mais pronunciado, porque este tem uma duração mais prolongada que o

processo a. No entanto com a repetição da apresentação do estímulo o processo b se torna cada vez mais pronunciado, como mostrado na figura 2. Sendo assim a soma a-b durante a apresentação do estímulo fica diminuída, mas a soma a-b logo após a apresentação do estímulo fica aumentada. Exemplificando um indivíduo que faz uso de opioides têm, nas primeiras administrações, mudanças motivacionais, euforia, o que seria o processo a. Após o término da ação da droga surge um processo oposto, aversivo, o processo b.

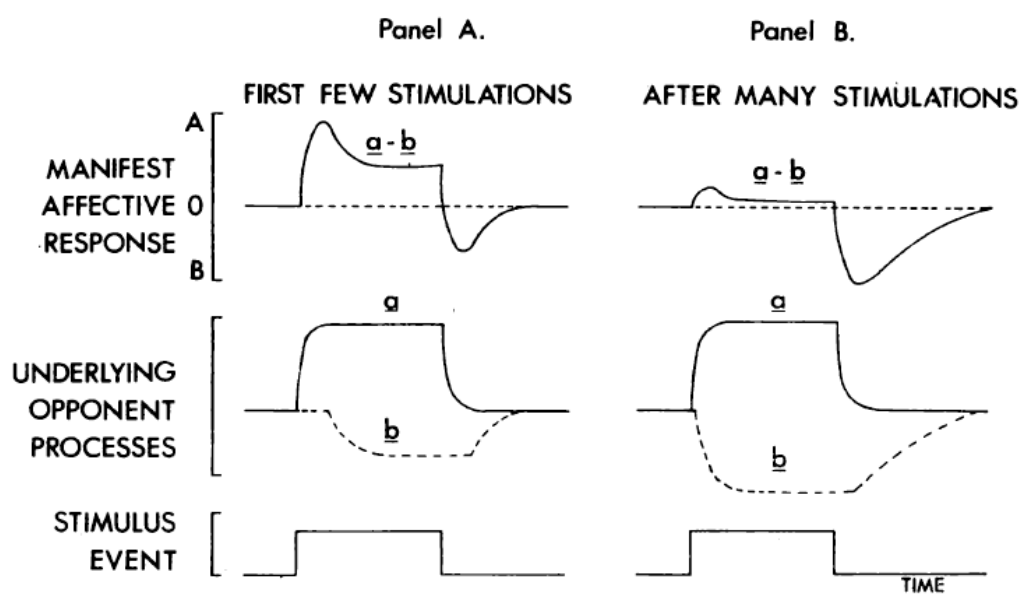


Figura 2- Comparação de padrões afetivos dinâmicos relativos a um reforçador que foi apresentado uma ou repetidas vezes. A repetição fortalece o processo b, o que fortalece o surgimento de tolerância e da síndrome de abstinência FONTE: SOLOMON, 1980.

2.1.5 Processo Contra-Adaptativo Oponente – Visão Neurobiológica

Voltando a teoria proposta por KOOB e LE MOAL (2001) o processo oponente é parte da função homeostática normal que tem como objetivo limitar o reforço. Segundo eles no uso crônico de drogas de abuso esse sistema falha em voltar ao seu estado homeostático e entra em um estado alostático. Isso se dá via dois processos: neuroadaptações dentro de sistemas e neuroadaptações entre sistemas. Na figura 3 pode-se ver como a proposta de KOOB e LE MOAL expandiu a proposta de Solomon.

A neuroadaptação dentro do sistema seria a mudança no sistema de reforço para acomodar a ativação hedônica excessiva, resultando numa redução de reforço.

Como exemplo são observadas alterações em sistemas ligados ao uso agudo da droga como a via mesocorticolímbica. Segundo a teoria do estado hipodopaminérgico (MELIS et al, 2005) existe uma diminuição na função da dopamina com a exposição crônica à droga levando a uma diminuição na motivação pela busca de estímulos não ligados à droga e ao aumento da sensibilidade à droga abusada.

Adaptação entre sistemas seria uma mudança na qual outro sistema, o sistema do estresse, é ativado pelo excesso de ativação do sistema de reforço. Os principais neurotransmissores e neuromoduladores envolvidos são: fator de liberação de corticotrofina (CRF), que será detalhado a seguir; noradrenalina; dinorfina; orexina; vasopressina; neuropeptídeo y e nociceptina. As alterações nesse sistema são fundamentais para as manifestações de ansiedade, e de afeto negativo, comuns na abstinência (KOOB, 2008).

Sendo assim a dependência foi hipotetizada como envolvendo plasticidade de longa duração na atividade dos circuitos neurais que medeiam sistemas motivacionais. A ativação do “sistema anti-reforço” (combinação do déficit de reforço e ativação dos sistemas de estresse) leva a estados negativos como irritabilidade, dor emocional, disforia, perda de motivação pela busca de reforços naturais.

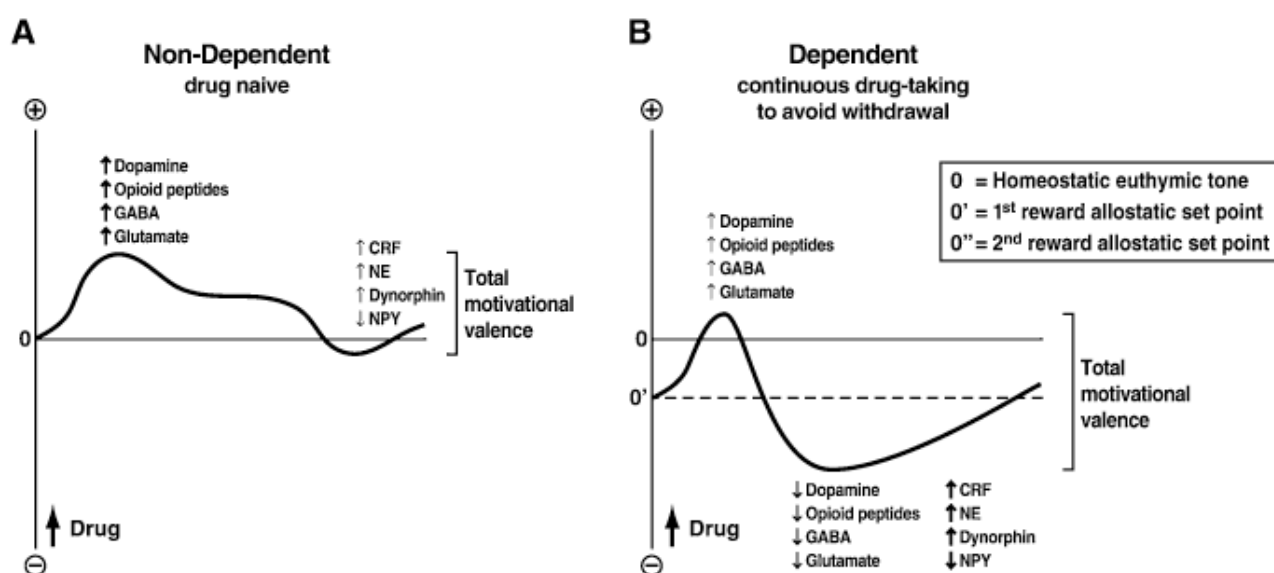


Figura 3 -Conceptualização das respostas hedônica associadas ao consumo de drogas por não dependentes (A) e dependentes (B). Essa mudanças são correlacionadas com mudanças em sistemas de neurotransmissores na circuitaria da amígdala estendida. CRF: fator de liberação de corticotrofina; NE: noradrenalina; NPY: neuropeptídeo Y. FONTE: KOOB e LE MOAL, 2008.

2.1.6 Fator de Liberação de Corticotrofina – CRF

O CRF é um peptídeo de 41 aminoácidos com um papel importante na coordenação da resposta de estresse do organismo, mediando as respostas hormonal, autonômica e comportamental ao estressor. Sua estrutura completa e caracterização biológica foi feita por Vale *et al.*, (1981). Ele está presente no neocortex, amígdala estendida, septo medial, hipotálamo, tálamo, cerebelo, mesencéfalo e núcleos do rombencéfalo. Esse peptídeo é agonista de dois receptores acoplados à proteína G: CRF₁ e CRF₂. O receptor 1 do CRF existe em várias isoformas (EX. CRF_{1a} a CRF_{1h}) e o tipo 2 tem três subtipos CRF_{2a}, CRF_{2b}, e CRF_{2c}. Outros três ligantes endógenos foram encontrados para esses receptores, a urocortina 1 (URC 1), URC 2 e URC 3. CRF e URC 1 tem maior afinidade pelo CRF₁, e as URC 2 e 3 tem maior afinidade pelo CRF₂ (KOOB, 2008).

2.1.6.1 Eixo Hipotálamo-Hipófise (pituitária)-Adrenais (HPA)

As glândulas adrenais estão localizadas no polo superior dos rins. Cada glândula é composta de duas partes distintas, a medula e o córtex. A medula é a porção central que ocupa cerca de 20% da glândula e sua função é a liberação dos hormônios adrenalina e noradrenalina em resposta à estimulação simpática. Por sua vez o córtex da adrenal secreta um grupo totalmente diferente de hormônios, chamados de esteróides. Esses hormônios são todos sintetizados a partir do colesterol, e tem semelhanças químicas entre si. Porém, as pequenas diferenças nas suas estruturas moleculares conferem a eles funções bem distintas (GUYTON e HALL, 2006).

Os hormônios esteróides são classificados em mineralocorticóides, glicocorticóides e sexuais. O cortisol, nos humanos, e a corticosterona, em roedores, são um exemplo dos glicocorticóides e são o alvo desta revisão. O cortisol agindo através de receptores nucleares tem importantes funções metabólicas, entre elas: aumento da glicemia, estímulo da gliconeogênese, redução do uso de glicose pelas células, aumento da concentração plasmática de glicose, redução de proteínas celulares, aumento de proteínas hepáticas e plasmáticas e mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo (GUYTON e HALL, 2006).

O estímulo que leva à liberação do cortisol é a presença do peptídeo hipofisário, o hormônio de liberação de corticotrofinas (ACTH). Esse, por sua vez, é

liberado pelo estímulo recebido na presença do CRF, o qual é sintetizado no núcleo paraventricular do hipotálamo e levado à hipófise pelo sistema porta hipofisário. O cortisol, por sua vez, exerce retroalimentação negativa sobre ambos, o hipotálamo e a hipófise. A secreção de cortisol apresenta um ritmo circadiano, mas o estresse leva ao aumento da sua liberação. A figura 4 ilustra esse processo (GUYTON e HALL, 2006).

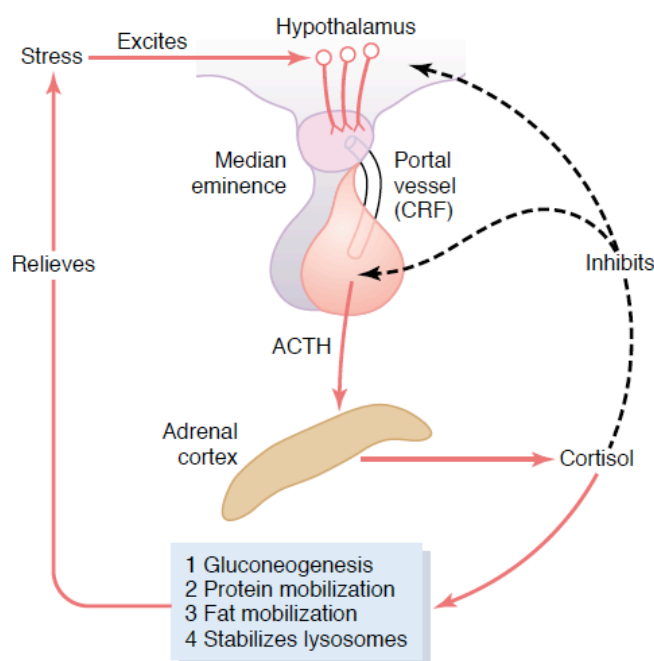


Figura 4 – Eixo Hipotálamo – Hipófise – Adrenal (HPA). CRF: fator de liberação de corticotropina. ACTH: hormônio adrenocorticotrófico. FONTE: GUYTON e HALL, 2006.

O álcool estimula o eixo HPA. Parte dessa influência é direta, via estimulação da produção de CRF, mas também é indireta, via liberação de outros intermediários, como, por exemplo, a noradrenalina. Lesões dos núcleos noradrenérgicos encefálicos ou a administração de antagonistas α_1 noradrenérgicos bloqueiam o aumento de ACTH plasmático induzido pelo etanol. Os efeitos do álcool sobre o eixo HPA se mantêm mesmo após a sua retirada, uma vez que, animais que passam pela vaporização de etanol durante a adolescência tem atividade do eixo diminuída quando adultos (revisado em ALLEN *et al.*, 2011).

2.1.6.2 Sistemas do CRF Extra Hipotalâmicos

O CRF também está fora do sistema HPA agindo no controle das respostas autonômicas e comportamentais ao estresse. Existe imunoreatividade ao CRF no neo córtex, amígdala estendida, septo medial, hipotálamo, tálamo, cerebelo e núcleos autonômicos do mesencéfalo e rombencéfalo. A distribuição da URC1 se sobrepõe a do CRF mas além disso também esta presente em núcleos visual, somatosensorial, auditório, vestibular, motor, parabraquial, medianos da rafe e núcleos cerebelares (KOOB, 2010).

Os agonistas CRF₂ endógenos, as urocortinas 2 e 3, tem distribuição diferente do CRF e da urocortina 1. A presença delas é importante no núcleo supraoptico, núcleo paraventricular, hipotálamo ventromedial, septo lateral, núcleo do leito da estria terminal e amígdala medial e cortical (KOOB, 2010). Na figura 5 pode-se ver exemplos de agonistas e antagonistas para os receptores de CRF.

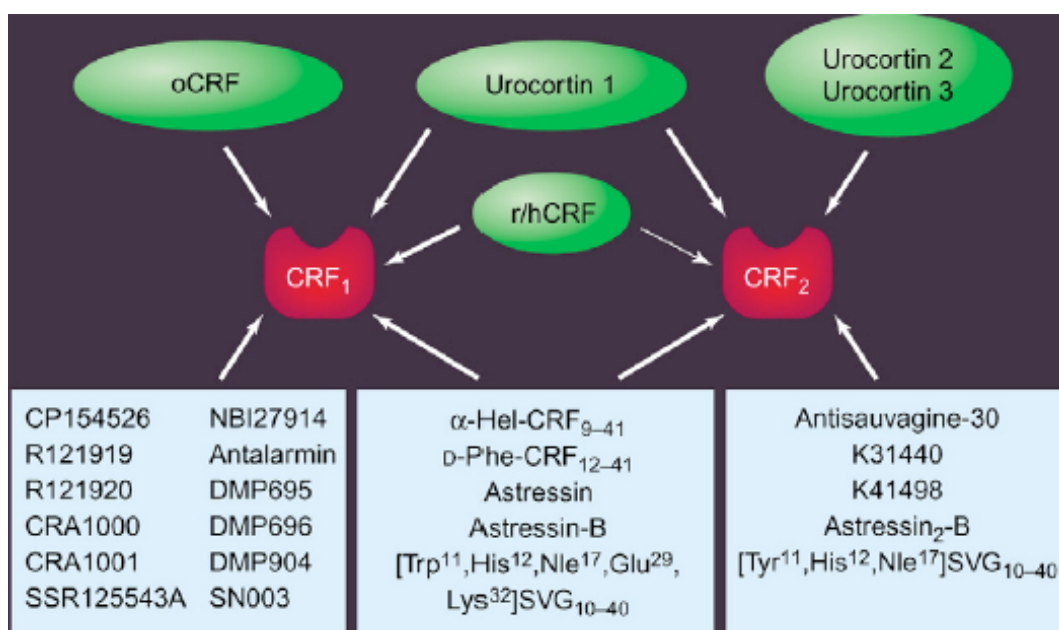


Figura 5 – Diferentes agonistas e antagonistas para os receptores de CRF. Os receptores 1 e 2 estão em vermelho, seus ligantes endógenos em verde, e antagonistas sintéticos estão nos quadrados azuis. FONTE: ZORRILLA *et al.*, 2003.

No presente estudo será dada ênfase ao CRF presente em núcleos do complexo amigdalóide / amígdala. A amígdala é uma estrutura em forma de amêndoa localizada internamente no lobo temporal e foi identificada por BURDACH no início do século XIX. Originalmente foi descrito um grupo de células hoje conhecido como complexo basolateral. Mais tarde vários outros complexos ao redor

do basolateral foram identificados e constituem hoje o que é conhecido como complexo amigdalóide. Essa estrutura atrai grande atenção pelo seu papel central no processamento emocional.

O complexo amigdalóide é constituído por treze núcleos. Esses podem ainda ser subdivididos (PRICE *et al.*, 1987). Os núcleos da amígdala podem ser agrupados em: 1) grupo basolateral, constituído pelos núcleos lateral, basal e basal acessório - esses núcleos são uma extensão ventromedial do claustrum; 2) grupo cortical ou superficial, constituído pelos núcleos corticais e pelo núcleo lateral do trato olfatório - esses núcleos fazem parte do córtex olfatório caudal; 3) grupo centromedial composto pelos núcleos medial e central - esses núcleos são uma expansão do estriado. Existem ainda outros núcleos fora destes grupos, como a massa de células intercalada e a área amígdala-hipocámpal.

Reforçando a diferente origem embrionária desses núcleos, os núcleos central e medial possuem predominantemente neurônios GABAérgicos, assim como o núcleo do estriado, enquanto, os outros núcleos do complexo amigdalóide têm predominante transmissão glutamatérgica, como os neurônios corticais (revisado em SAH *et al.*, 2003).

Alheid e Heimer (1988) propuseram que a amígdala deve ser estendida a outras regiões. A amígdala inerva o núcleo do leito da estria terminal e a substância inonimata (pálido ventral). Além disso, essas regiões têm conexões eferentes com as projeções descendentes da amígdala e por isso, alguns autores propõem esses núcleos como parte do complexo amigdalóide. Essas regiões, quando incluídas ao complexo centro medial, dão origem à chamada amígdala estendida.

As conexões aferentes da amígdala podem ser divididas nas que vêm do córtex e de estruturas talâmicas, e as que vêm do hipotálamo ou do tronco encefálico. As conexões corticais e talâmicas trazem informações de áreas sensoriais e estruturas relacionadas aos sistemas de memória. As conexões hipotalâmicas e do tronco encefálico vem de regiões ligadas ao sistema autonômico.. As principais conexões dos núcleos lateral e central podem ser vistos na figura 6. As conexões aferentes chegam em todos os núcleos desde os núcleos considerados como “entrada” (complexo basolateral e núcleos corticais) até aos considerados como “saída” como os núcleos centro mediais (revisado em SAH *et al.*, 2003).

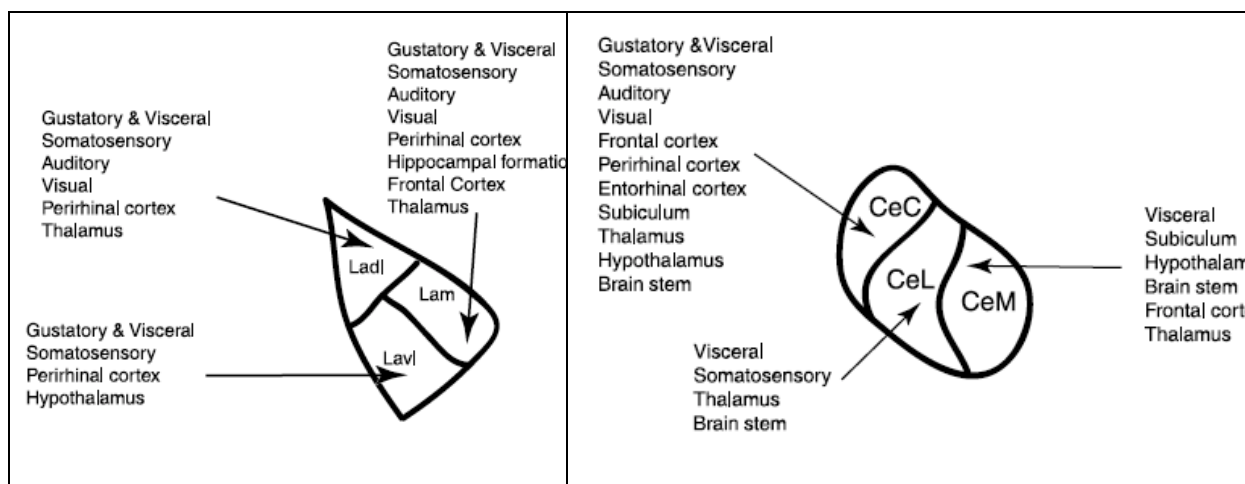


Figura 6 – Resumo as conexões aferentes dos núcleos lateral e central da amígdala. Ladl: amígdala lateral subdivisão dorso lateral; Lam: amígdala lateral subdivisão medial; Lavl: amígdala lateral subdivisão ventrolateral. CeC: amígdala central subdivisão capsular; CeL: amígdala central subdivisão lateral; CeM: amígdala central subdivisão medial. FONTE: SAH *et al.*, 2003.

As conexões eferentes têm muitas projeções para regiões corticais, hipotalâmicas e do tronco encefálico. A ativação do núcleo central induz respostas autonômicas pela estimulação de grupos de neurônios no tronco encefálico que controlam o sistema autônomo, ou pela estimulação de núcleos hipotalâmicos que modulam esses centros. O núcleo central da amígdala também tem muitas projeções para o núcleo do leito da estria terminal, que por sua vez, também projeta para núcleos hipotalâmicos. O núcleo central e o núcleo do leito da estria terminal também projetam para grupos monoaminérgicos como *locus coeruleus*, substância negra e área tegmentar ventral, núcleos da rafe serotoninérgicos e núcleos basais colinérgicos. Exemplos dessas conexões estão mostrados na figura 7 (revisado em SAH *et al.*, 2003).

2.2 ESTRESSE

A definição de estresse pode ser difícil, pois a ênfase pode ser dada para eventos externos, ditos “estressantes” ou para a resposta dos indivíduos a esses eventos. Por isso é importante lembrar que o estresse tem duas dimensões: o (1) evento estressante e a (2) resposta, a qual, por sua vez, pode levar a um estado de estafa, cansaço físico e emocional, respostas imunes inapropriadas, entre outros. Mas isso não faz do estresse algo essencialmente prejudicial. O estresse ajuda o indivíduo a reagir a uma emergência e a se adaptar para as mudanças. Porém,

apesar de proteger o indivíduo em condições agudas, se ativado cronicamente pode ser danoso e acelerar o aparecimento de doenças (McEVEN e LASLEY, 2002).

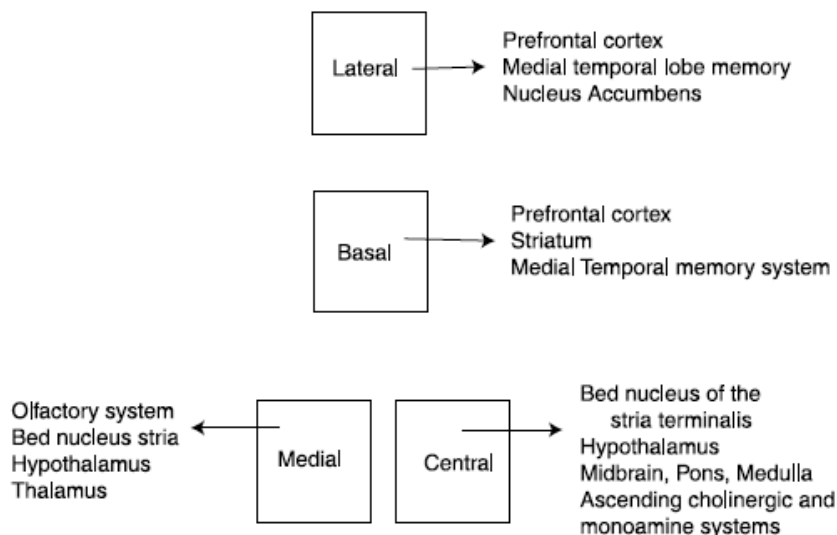


Figura 7– Resumo as conexões eferentes dos núcleos lateral, basal, medial e central da amígdala. FONTE: SAH *et al.*, 2003.

Tem sido proposto um novo termo para a resposta adaptativa ao estresse, o termo alostase. Alostase, ao contrário de homeostase, é a estabilidade através da mudança. Esse termo dá ênfase ao fato que o organismo se mantém estável por ter a capacidade de mudar, sendo assim é um processo crítico à homeostase, à estabilidade. Porém, quando essas respostas são necessárias pelo caráter repetitivo ou intenso, surge o conceito de carga alostática. Carga alostática é o dano causado pela resposta adaptativa funcionando de forma inapropriada. Uma destas formas inadequadas é quando a resposta não cessa após o fim da ameaça, ou quando alguém é confrontado com o mesmo desafio várias vezes e mesmo assim mantém os níveis altos de ansiedade. Essa é a chamada ação bifásica da resposta do estresse: apesar de com ela ser possível realizar tarefas importantes, ela também pode causar danos e até a morte. Existem quatro principais casos nos quais a resposta alostática se torna nociva, ou seja, carga alostática: (a) a resposta alostática é requerida com uma frequência muito grande; (b) a resposta falha em gerar tolerância; (c) a resposta não cessa após o término da ameaça; (d) a resposta é insuficiente. Hoje se sabe que o etanol ativa a resposta de estresse e que essa resposta com o tempo passa a ser um caso de carga alostática (McEVEN e LASLEY, 2002).

O início da resposta do/ao estresse no hipotálamo é caracterizado pela ativação tanto das glândulas suprarrenais, levando à liberação de noradrenalina, quanto do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, que leva à liberação do hormônio cortisol. A primeira onda de resposta é a liberação de monoaminas que ocorre imediatamente após o evento estressante. Essas substâncias promovem um aumento na vigília, no estado de alerta, uma melhor avaliação da situação e melhor julgamento da resposta que deve ser emitida. Esses mediadores tem curta meia vida e uma resposta muito intensa, sendo assim não são ideais para uma resposta prolongada, adaptativa ao estresse, como por exemplo a memória do estressor e de eventos associados a ele. Isso é conseguido pela segunda onda de resposta (pico em 15-30 minutos após o evento estressante) na qual existe a alteração na expressão gênica e na função celular mediada pelos corticosteroides via receptores glicocorticoides. Mais recentemente se descobriu que as monoaminas, apesar de sua ação sináptica rápida, também podem regular fatores de transcrição dentro de segundos a minutos após sua liberação. Essa alteração em fatores de transcrição pode levar a modificações na estrutura genômica. Por sua vez, os corticoides, agindo via receptores mineralocorticóides de membrana, podem também ter efeitos rápidos, dentro de minutos (JOËLS e BARAM, 2009).

2.2.1 Estresse e Consumo de Etanol

Estudar o efeito do estresse sobre qualquer comportamento pode ser difícil porque o estresse pode se apresentar de diferentes formas e a sua manifestação vai depender de experiências prévias do indivíduo. Os tipos de estresse aos quais os seres humanos estão expostos podem ser divididos em: 1) estresses da vida cotidiana (desemprego, divórcio); 2) estresse de eventos catastróficos; 3) estresse de maus tratos na infância e 4) estresse de pertencer a minorias/discriminação. Existem hoje estudos que examinaram a interação entre essas diferentes classificações do estresse e o consumo de álcool. Como exemplo um estudo americano (GRANT *et al.*, 2004) levantou a presença no último ano de vários tipos de eventos considerados como estressantes (mudança de trabalho ou de casa, morte na família, ser vítima de um crime, desemprego, divórcio, entre outros) e a sua relação com o consumo de etanol. Foi encontrada uma correlação positiva entre o número de eventos estressantes, o beber pesado e a presença de problemas

relacionados ao álcool. Após o ataque às torres gêmeas de Nova York em 2001, uma série de estudos foi feita com sobreviventes e com pessoas que viviam em regiões próximas. Foi encontrado aumento no consumo de álcool pelos sobreviventes (GRIEGER *et al.*, 2003) e por residentes de Manhattan, região do ataque, (HO *et al.*, 2002). Mais estudos podem ser encontrados na revisão feita por Keyes *et al.*, (2013).

Diversos estudos pré-clínicos mostram uma relação entre estresse, em suas mais diferentes formas, e alterações no consumo de etanol. No entanto, variações na forma de exposição ao estresse e ao etanol bem como o uso de diferentes linhagens de animais têm gerado resultados em diversos sentidos, aumento, diminuição ou sem alteração no consumo. A importância do tipo de estresse aplicado foi demonstrado por Funk *et al.*, (2006) que usando hibridização *in situ* para o mRNA de c-Fos e CRF em diversas regiões encefálicas mostrou que a ativação dessas áreas varia de acordo com o estresse usado (choque nas patas, contenção, *social defeat*, yoimbina e FG-7142 (agonista inverso do sitio benzodiazepínico). Além disso, as formas de estresse capazes de induzir recaída ao uso de álcool, choque e yoimbina, foram as únicas a induzir o mRNA de c-fos no *shell* do núcleo accumbens e núcleos basolateral e central da amígdala e ainda, foram os únicos tipos de estresse capazes de induzir mRNA de CRF na porção dorsal do núcleo do leito da estria terminal.

Em 1985, demonstraram que ratos com acesso contínuo ao etanol 10% + sacarina 0,1% e água + sacarina 0,1%, após passarem por estresse de isolamento e imobilização de forma imprevisível por 14 dias passaram a ter preferência pela solução de etanol, sendo que antes e durante a aplicação do estresse a preferência era pela solução que continha apenas sacarina.

Chester *et al.*, (2006) usaram camundongos HAP2 (*high alcohol-preferring*) que foram imobilizados por duas horas por dia durante dez dias. Em seguida, tiveram acesso limitado ao etanol 10% por duas horas diárias durante vinte e um dias. Depois, nos vinte dias subsequentes, os animais novamente foram expostos ao estresse de imobilização por duas horas em dias alternados tendo acesso ao etanol logo em seguida. Finalmente, os animais tiveram acesso ao etanol, sem passar pela imobilização, por oito dias. Os animais machos tiveram aumento no consumo de etanol, enquanto as fêmeas apresentaram redução, ambos em relação ao controle sem imobilização em nenhuma fase. Essa variação aconteceu em ambas as formas

de aplicação do estresse. Na última fase, sem estresse, os machos continuaram com o seu consumo aumentado, mas as fêmeas foram para os níveis de consumo dos controles.

Usando também estresse por imobilização, porém com outro protocolo (uma hora, duas vezes ao dia por quatro dias), seguido por um período de exposição ao álcool (etanol 3% por dois dias, 6% por dois dias e 12% por sete dias), sendo a imobilização aplicada nos últimos quatro dias da concentração de 12%, Yang *et al.*, (2008) mostraram aumento no consumo de camundongos 129SVEV (escolhidos por terem consumo baixo, ~5g/Kg/dia, mas sem apresentar aversão ao etanol). No entanto, nenhuma variação foi notada para a linhagem C57BL/6J (que naturalmente consome grandes quantidades de etanol, ~14g/Kg/dia). A administração de R121919 ou antalarmin (antagonistas CRF₁) antes da imobilização não foi capaz de interferir no resultado.

Usando um protocolo semelhante onde os camundongos C57BL/6J tiveram acesso ao etanol 3% por dois dias, 6% por dois dias e 12% por dois dias. Ao fim desse período, foram sujeitos à imobilização por uma hora diária, ainda com acesso ao etanol 12%. Farrok *et al.*, (2009), mostraram que os animais do grupo estressado apresentaram aumento no consumo de etanol no quinto dia e a administração de topiramato fez com que o consumo retornasse ao seu valor anterior.

Lowery *et al.*, (2008) apresentaram concentrações crescentes de etanol (2,4,6 e 8%, quatro dias por concentração) a camundongos BALB/cJ e C57BL/6N. Após 18 dias da maior concentração, os animais foram expostos à natação forçada em sessões de cinco minutos por cinco dias. A exposição à natação aumentou o consumo nos BALB, mas não alterou o consumo dos camundongos C57. No entanto, esse aumento ficou evidente apenas após três semanas da primeira sessão de estresse. Quando foi administrado CP-154,526 trinta minutos antes da sessão de natação, esse aumento no consumo foi bloqueado, e a droga não teve efeito no consumo de animais que não passaram pelo estresse. Não houve alteração no consumo de água ou de sacarose.

Ratos treinados para a autoadministração operante (FR1-FR3) de etanol 12% e que tiveram esse comportamento extinto, reestabeleceram o comportamento após a injeção de uma baixa dose de etanol ou choque nas patas. Quando administrada a naltrexona (antagonista opióide) houve o bloqueio da recaída induzida por etanol, porém sem efeito sobre a recaída induzida pelo choque nas patas. No entanto,

quando administrada fluoxetina (inibidor seletivo da recaptação de serotonina), ela bloqueou a recaída induzida pelo estresse do choque e não pelo etanol. Mostrando que existe uma dissociação entre as vias que podem levar à recaída (LÊ *et al.*, 1999).

Ratos Wistar-Kyoto (WKY, conhecidos pelo seu fenótipo depressivo, alta responsividade ao estresse e consumo alto de etanol) e ratos Wistar foram expostos por 24 dias a variadas formas de estresse (choque nas patas, natação, imobilização, privação de comida, calor, inversão de ciclo claro-escuro) sendo concomitantemente oferecidas soluções de etanol em concentrações crescentes (3, 5 e 7%, sete dias para cada uma). Os WKY consumiram mais etanol que os Wistar e a aplicação do estresse fez com que ambas as linhagens consumissem mais que o controle não exposto ao estresse. Mas o dado mais interessante é que ensaios de ligação (*binding*) mostraram alterações na capacidade de ligação do receptor dopaminérgico D2 em diversas regiões encefálicas induzidas pelo estresse e essas alterações foram abolidas pela exposição simultânea ao etanol. Mostrando que o etanol parece ter um papel “anti-estresse” (YAROSLAVSKY e TEJANI-BUTT, 2010).

O estresse não influencia o consumo de etanol apenas durante ou logo após sua aplicação. Usando um modelo de estresse por choque nas patas (três dias, meia hora por dia, sessenta choques por sessão) seguido (36-42 horas após) pelo treinamento operante para consumo de etanol em sessões de uma hora (FR 1-3), Logrip e Zorrilla (2012) não encontraram diferença no consumo desses animais, apenas um aumento na preferência pela barra ativa. Porém, quando esses animais foram expostos à extinção do comportamento, abstinência, e então o comportamento foi reestabelecido, apenas animais com baixo consumo e que passaram pelas sessões de choque apresentaram aumento no consumo de etanol. Isso não se repetiu para ratos que foram treinados para consumir sacarose. Mostrando que mesmo após períodos mais longos, o estresse ainda influencia o consumo dos animais e que essa influência depende do padrão inicial de consumo.

2.2.2 CRF e Consumo de Etanol

Diversos trabalhos vêm demonstrando alterações no sistema do CRF relacionadas à exposição e/ou ao consumo de etanol.

Em 1990, George *et al.*, mostraram que ratos Wistar com alta preferência por etanol quando expostos à livre escolha entre etanol 6% e água tiveram aumento do CRF hipotalâmico, enquanto houve diminuição do CRF na hipófise e ponte. Córtex frontal, mesencéfalo, tálamo e cerebelo não tiveram alterações. Esses resultados indicaram que o CRF era preferencialmente afetado em determinadas regiões encefálicas pelo alto consumo de etanol.

Lack *et al.*, (2005), usando ratos Sprague-Dawley expostos à dieta líquida contendo de 4-6% de etanol por 10-12 dias, demonstraram aumento do mRNA (PCR em tempo real) de CRF, sem alterações no nível de proteína ligante do CRF, no núcleo central da amígdala. Usando um protocolo de vaporização de etanol, Criado *et al.*, (2011) mostraram que após 8 semanas de vaporização, mas não após 2 semanas, houve aumento na imunorreatividade ao CRF no hipocampo e córtex parietal em animais sacrificados 24 horas ou 2 semanas após a última exposição ao vapor de etanol. Para o neuropeptídeo Y, foram observadas alterações na imunorreatividade no córtex frontal: uma redução com 24 horas de abstinência e um aumento com 2 semanas de abstinência e, na amígdala, um aumento com 2 semanas de abstinência. Nesse modelo de aumento de consumo induzido pela vaporização de etanol, o período de 2 semanas não é suficiente para promover aumento de consumo, sendo necessário o período de 8 semanas, mesmo período que causou as variações na imunorreatividade.

Gilpin *et al.*, (2012) mostraram diminuição na contagem de neurônios positivos para CRF na porção lateral do núcleo central da amígdala em animais adultos que tiveram acesso ao consumo do tipo *binge* durante a adolescência. Esses animais apresentaram maior exploração dos braços abertos no labirinto em cruz elevado (menor ansiedade / maior impulsividade), sendo esse efeito revertido pelo subsequente desenvolvimento da dependência ao etanol induzida por vaporização. Isso evidencia que as modificações induzidas pelo consumo de etanol são persistentes e refletem no comportamento do animal mesmo após longos períodos (~ 3 meses).

Estudos de microdialise também demonstram a interação entre CRF e etanol. O etanol i.p. agudamente aumenta o dialisado de CRF no núcleo central da amígdala. O CRF injetado nesse núcleo ou etanol i.p. aumentou o dialisado de β -endorfina, sendo esse efeito atenuado pela administração de antagonistas de CRF₁ ou CRF₂ também no núcleo central da amígdala (LAM e GIANOULAKIS, 2011).

Animais expostos à dieta líquida contendo etanol 6,7% v/v por duas semanas e tendo as soluções de etanol retiradas 90min antes da microdialise, tiveram aumento de 50-75% de CRF no dialisado no núcleo do leito da estria terminal. Esse aumento foi revertido com o acesso à dieta líquida contendo etanol (OLIVE *et al.*, 2002).

Animais nocaute, *Crhr1*^{-/-}, para o receptor CRF₁ expostos à livre escolha entre etanol e água por oito semanas tiveram consumo de etanol semelhante aos animais normais, independente da concentração de etanol (2,4 ou 8% v/v). Entretanto, após exposição ao estresse de derrota social (*social defeat*) e após natação forçada, ambos por três dias, observou-se aumento no consumo de etanol apenas nos animais nocaute. Esse aumento foi retardado, visto que aconteceu três semanas após a exposição ao estresse (SILLABER *et al.*, 2002). Entretanto, utilizando-se concentrações maiores de etanol, 3-6-12 e 20% apresentadas em intervalos de quatro dias, Pastor *et al.*, (2011), encontraram consumo menor de etanol por animais nocaute (apenas na concentração de 20%). Estresse de natação agudamente não modificou o consumo, porém a repetição desse estresse aumentou o consumo apenas em animais sem nocaute. Usando o mesmo protocolo de consumo, porém com animais nocaute para o receptor CRF₂, não foram observadas alterações de consumo basal dos animais (SHARPE *et al.*, 2005).

2.2.3 Manipulação Farmacológica do CRF e Consumo De Etanol

2.2.3.1 Modelos de binge

Um *binge* é definido pelo National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) como um padrão de consumo que leva a intoxicação com níveis sanguíneos de etanol maiores que 80mg/dL. O padrão de consumo necessário para atingir esses valores em humanos é de 4 a 5 doses em um período de duas horas (NIAAA, 2004). Alguns modelos animais vem sendo desenvolvidos para estudar esse comportamento.

Em 2005, Rhodes *et al.*, validaram um método, conhecido como *drinking in the dark*, que facilita o consumo de quantidades farmacologicamente significantes de etanol por camundongos predispostos geneticamente ao alto consumo de etanol (C57BL/6J). Nos dias 1 a 3, iniciando 3 horas após o início da fase escura, as garrafas de água são retiradas e substituídas por garrafas contendo etanol 20% (v/v). Os camundongos tem acesso ao etanol por 2 horas. No dia 4, os animais tem

acesso por 4 horas. Após as 4 horas, o consumo de etanol é medido volumetricamente e uma amostra de sangue é retirada para a quantificação de etanol. Usando esse protocolo, Sparta *et al.*, (2008) demonstraram que o antagonista de CRF₁, CP-154,526, na dose de 10mg/Kg administrados por via intraperitoneal trinta minutos antes da sessão do quarto dia, reduziu os níveis plasmáticos de etanol de 80mg/dL para 27mg/dL. Na mesma dose não houve redução no consumo de sacarose. Seguindo o mesmo procedimento Lowery *et al.*, (2010) mostraram que o antagonista não seletivo de receptor CRF, alpha-helical CRF(9-41), bem como o agonista CRF₂, urocortina 3, quando injetados i.c.v. também levaram a uma diminuição no consumo de etanol. O CP-154,526 manteve o seu efeito em animais adrenalectomizados, demonstrando que seu efeito não depende do eixo HPA. Ainda Lowery-Gionta *et al.*, (2012) demonstraram que a imunoreatividade do CRF está aumentada no núcleo central da amígdala tanto imediatamente após a retirada do etanol quanto 18-24H após. A injeção de antalarmin, antagonista de CRF₁, intra núcleo central da amígdala também foi capaz de reduzir o consumo nesses animais, tendo os níveis plasmáticos de etanol reduzido de 100mg/dL para 50mg/dL.

Esses resultados indicam que além da participação no consumo de animais dependentes de etanol, o CRF também participa modulando o consumo de etanol no modelo de intoxicação aguda, *drinking in the dark*. Porém, em outros modelos de *binge* os resultados não são consistentes.

Usando ratos Wistar em um modelo de duas garrafas (água e etanol 10% + supersac (3% glucose + 0.125% sacarina)) no qual os animais tinham acesso ao etanol+supersac ou somente ao supersac durante meia hora por dia, 4 horas após o início da fase escura, bem como em um modelo de administração operante por via oral por trinta minutos após início da fase escura, razão fixa de 1, Ji *et al.*, (2008) encontraram redução no consumo nesses animais causado pela duloxetina (inibidor da recaptação de serotonina e da noradrenalina), pela naltrexona (antagonista opioide) mas não pelo MPZP (antagonista CRF₁).

Sabino *et al.*, (2013) usando ratos sP, selecionados pela preferência por etanol, apresentaram aos animais etanol 20% por 24 horas em dias alternados até que os animais tivessem um consumo estável. Em seguida, administraram i.p., naltrexona, antagonista opioide, SCH 39166, antagonista do receptor dopaminérgico D1 ou R121919, antagonista CRF₁. Apenas os agentes opioidérgico e

dopaminérgico foram capazes de reduzir o consumo de etanol, levantando a hipótese de que o CRF não esteja envolvido nesse modelo de consumo.

2.2.3.2 Modelos de vaporização de etanol

Usando o modelo de indução de dependência por vaporização de etanol uma série de artigos foi publicada, referente aos efeitos de drogas que agem no sistema CRF sobre a auto administração de etanol. O primeiro deles, Valdez *et al.*, (2002), demonstraram que a injeção central em ratos Wistar do antagonista peptídico do CRF₁, D-Phe-CRF(12-41) imediatamente antes da sessão de autoadministração, diminuiu o consumo operante de etanol 10% tanto em animais com duas horas de abstinência como em animais com 2 a 5 semanas de abstinência. Trabalhos usando a mesma metodologia mostraram a eficácia do MTIP, antagonista de CRF₁, em reduzir o consumo operante em animais Wistar e MsP, selecionados pelo seu alto consumo de etanol, e não foi observado efeito em animais não dependentes (expostos apenas ao ar nas câmaras de vaporização) (GEHLERT *et al.*, 2007). Gilpin *et al.*, (2008) demonstraram em ratos que preferem etanol (P) que a injeção i.p. de MPZP, outro antagonista de CRF, reduz o consumo apenas em animais dependentes, enquanto que a naltrexona reduziu o consumo em animais dependentes e não dependentes. Outros antagonistas não peptídicos administrados por via intraperitoneal, antalarmin, MJL-1-109-2 e R121919, também diminuíram o consumo de etanol em animais com abstinência aguda do etanol (duas horas após o cessar do vapor de etanol). Nenhuma dessas drogas alterou o consumo em animais não dependentes (FUNK *et al.*, 2007a). Para localizar a região encefálica responsável por essa redução de consumo, Funk *et al.*, (2006b) injetaram o antagonista D-Phe-CRF(12-41) no núcleo central da amígdala, no núcleo do leito da estria terminal lateral e no *shell* do núcleo accumbens imediatamente antes da sessão de auto administração e com duas horas de abstinência. Apenas os animais que receberam a droga no núcleo central da amígdala e com histórico de dependência reduziram seu consumo. Ainda dentro da mesma linha Funk e Koob (2007b) injetaram um agonista de CRF₂, a urocortina 3, no núcleo central da amígdala e notaram que ratos dependentes reduziram seu consumo, enquanto animais não dependentes tiveram um aumento no consumo na dose mais alta do agonista. Esses resultados demonstram a participação do CRF no aumento do consumo de etanol induzido por exposição à vaporização.

2.2.3.3 Animais não dependentes

Sharpe e Phillips (2009) usaram camundongos C57BL/6J treinados para autoadministração de etanol 10% em sessões diárias com duração de duas horas. Sendo oito sessões apenas com etanol e as sessões seguintes com etanol e água. Nessas sessões os animais consumiam cerca de 3g/Kg de etanol em 2 horas. Nesses animais a injeção de urocortina 3, agonista CRF₂, no ventrículo lateral imediatamente antes da sessão levou à diminuição do consumo de etanol sem afetar o consumo de água. Em outro modelo de animais não dependentes, Cippitelli *et al.*, (2012), usaram ratos Wistar com acesso intermitente (24h - dias alternados) ou contínuo a soluções de etanol 20 ou 10%, num total de vinte sessões. Animais com acesso a etanol 20%, independente do regime de administração, reduziram seu consumo após administração i.p. de antalarmin. Enquanto que entre os grupos que receberam etanol 10%, apenas aqueles com acesso intermitente reduziram após administração da droga. Importante notar que o consumo desses animais era baixo, sendo o mais alto atingido pelos animais com acesso intermitente à solução de 20% (5g/Kg/24h) e tão baixo quanto 1g/Kg/24h nos animais com acesso contínuo ao etanol 10%.

Em modelos de aumento de consumo e/ou de recaída induzidos por yoimbina (antagonista dos receptores adrenérgicos alfa-2), ratos que foram treinados para se auto administrar etanol 12%, uma hora por dia por várias semanas (FR1 até FR3), tiveram o aumento do consumo e a recaída bloqueados pela administração i.p. de antalarmin em doses, que na ausência da yoimbina, não alteraram o consumo (MARINELLI *et al.*, 2007). No mesmo modelo, a injeção do antagonista de CRF₁ d-Phe CRF no núcleo medial da rafe atenuou o consumo durante o restabelecimento induzido pela yoimbina, mas não teve efeito no aumento induzido durante a autoadministração (LÊ *et al.*, 2013).

2.2.4 Outras Drogas de Abuso e CRF

O envolvimento do CRF na dependência de outras drogas de abuso também foi evidenciado por diversos estudos.

A administração de CP 154,526 i.p. ou intra área tegmentar ventral em ratos Long Evans submetidos a quatro sessões de derrota social intermitentes (separadas por 72h) bloqueou tanto o desenvolvimento de sensibilização comportamental

induzida por estresse, quando a escalada no consumo operante de cocaína (BOYSON *et al.*, 2011).

Ratos Wistar foram treinados para autoadministração operante de cocaína e em seguida foram distribuídos em dois grupos, um que recebia cocaína por curtos períodos durante o dia, uma hora, e outro que recebia por longos períodos, seis horas. Depois de escalar e estabilizar o comportamento, eles receberam antagonistas de CRF₁, antalarmin ou MPZP. O antalarmin diminuiu o consumo apenas nos animais com acesso longo à droga enquanto o MPZP diminuiu em ambos, porém com uma dose mais baixa para os de longo acesso à droga. Mostrando que ocorre uma hipersensibilidade no sistema do CRF em animais com acesso longo à cocaína. (SPECIO *et al.*, 2008). Com um protocolo semelhante de autoadministração, porém seguido por um período de extinção do comportamento afim de se estudar a recaída ao comportamento de consumo, Blacktop *et al.*, (2011) mostraram que a injeção bilateral de CRF na área tegumentar ventral levou à recaída apenas nos animais que tinham longo acesso à cocaína. Essa recaída induzida por CRF foi bloqueada pelos antagonistas de CRF₁, antalarmin e CP-376395, mas não pelo antagonista de CRF₂, astressin-2B ou antisauvagina-30. Da mesma forma o antalarmin, mas não a astressin-2B, bloqueou a recaída induzida por choque nas patas. A injeção do agonista CRF₁, cortagina, mas não do agonista CRF₂, urocortina 2, também induziu a recaída. Mostrando que o acesso longo à cocaína pode levar a uma maior susceptibilidade à recaída induzida por estresse e que isso se dá, pelo menos em parte, pela modulação diferenciada do receptor CRF₁.

Usando um protocolo semelhante de autoadministração operante com acessos curtos ou longos à droga, Greenwell *et al.*, (2009), mostraram que os antagonistas de CRF₁ MJL-1-109-2 (uma hora de acesso comparado a oito horas de acesso) e R121919 (uma hora de acesso comparado a doze horas de acesso) reduziram o consumo de heroína apenas nos animais com acesso longo à droga.

O antagonista peptídico não seletivo de CRF, alpha-helical CRF(9-41) também bloqueia a recaída induzida por choque nas patas ao comportamento operante de autoadministração de metanfetamina e, após dez dias de abstinência, os níveis de CRF plasmáticos e na amígdala desses animais se encontram aumentados (NAWATA *et al.*, 2012)

Usando um protocolo conhecido por levar ao comportamento de escalada no consumo de nicotina por ratos, ciclos de 23h por dia de acesso operante durante quatro dias seguidos por três dias de abstinência, George *et al.*, (2007) também mostraram a participação do CRF na dependência de nicotina. O MPZP, antagonista CRF₁, bloqueou o aumento no consumo induzido por abstinência. A injeção i.p. de mecamilamina, um antagonista do receptor nicotínico da acetilcolina, provoca, em animais dependentes, aumento de CRF na amígdala bem como ansiedade, medida no modelo de *Defensive Burying*. O antagonista de CRF₁ bloqueia essa ansiedade apresentada na abstinência da nicotina. Corroborando com esses resultados, Buijnzeel, Prado e Isaac (2009), mostraram que a injeção de mecamilamina elevou os limiares encefálicos de reforço, indicando um déficit na função do reforço, apenas em animais dependentes de nicotina. Essa elevação foi revertida em animais que foram tratados com o antagonista de CRF₁, R278995/CRA0450, mas o antagonista de CRF₂, astressin 2B não teve efeito. Da mesma forma, apenas o antagonista de CRF₁ conseguiu inibir a recaída induzida pelo estresse de choque nas patas. Nenhuma dessas drogas teve ação sobre a autoadministração de pellets de chocolate. Com o mesmo modelo de limiar de reforço, Marcinkiewicz *et al.*, (2009) mostraram que a injeção do antagonista não seletivo dos receptores de CRF, D-Phe CRF (12-41), foi eficaz em reverter o aumento nos limiares de reforço induzido pela administração de mecamilamina, quando administrada no núcleo central da amígdala ou no *shell* do núcleo accumbens, mas não no leito do núcleo da estria terminal.

2.2.5 Relação Entre Consumo de Etanol e CRF Em Humanos

Treutlein *et al.*, 2006 determinaram a frequência alélica de 14 polimorfismos para o gene CRF-R1 em adolescentes com pouca exposição prévia ao álcool e em adultos dependentes. Foi demonstrada uma associação entre determinados SNPs (*single nucleotide polymorphism*) e ocorrência de intoxicação por álcool e prevalência de uso na vida entre os adolescentes. Nos adultos, foi demonstrada associação entre os SNPs e o consumo de grandes quantidades de álcool. Ainda, Blomeyer *et al.*, (2008) analisaram o genótipo de adolescentes para dois SNPs do CRF₁. Adolescentes homozigotos para um desses alelos (rs187683) tiveram os valores mais altos de consumo em uma única ocasião bem como o maior consumo

de álcool em consequência a eventos estressantes. Também foi encontrada relação entre polimorfismos do gene da proteína ligante de CRF e o desejo de beber após a exposição a imagens estressantes (TARTTER e RAY, 2012). Esses estudos demonstram que em humanos o CRF também está envolvido na integração entre gene-ambiente modulando o consumo de etanol.

2.3 ESTUDOS ELETROFISIOLÓGICOS ENVOLVENDO ÁLCOOL, CRF E NÚCLEO CENTRAL DA AMÍGDALA

Apenas como uma breve introdução, existem três tipos principais de registros eletrofisiológicos considerando-se a posição do eletrodo: 1) extracelular; 2) intracelular e 3) *patch clamp*. No modo extracelular são feitas leituras de potencial de campo locais, e como o eletrodo não está em contato estreito com nenhum neurônio, não é possível se obter leituras mais finas/precisas como a de potenciais pós sinápticos excitatórios ou inibitórios, por exemplo. É possível apenas medir a resultante dos potenciais dos neurônios que circundam o eletrodo. Enquanto registros extracelulares detectam potenciais de ação, os eletrodos intracelulares podem detectar pequenas variações de potencial da membrana de um único neurônio. O eletrodo deve ter um diâmetro muito inferior ao usado na leitura extracelular, uma vez que ele entra no neurônio e não deve danificar a membrana da célula, por isso a técnica também é chamada de *sharp pipette* (pipeta afiada). A técnica de *patch clamp* é mais nova (começo dos anos 80) e vem substituindo a maioria das técnicas intracelulares. No *patch clamp* se usa um microscópio para se guiar na procura do neurônio. Após a aproximação da pipeta no neurônio, aplica-se uma pressão que produz um “selo” entre a pipeta e a membrana, configuração chamada de *cell-attached*, onde não existe espaço entre a membrana e a pipeta, sendo assim qualquer íon que passe pela membrana passará também pela solução que preenche a pipeta. Quando se aplica uma segunda pressão negativa na pipeta, a membrana da célula se rompe e forma-se um contínuo entre o citoplasma da célula e o líquido que preenche a pipeta, configuração essa chamada de *whole-cell* (CARTER e SHIEH, 2010).

Os eletrodos podem ser mantidos em *voltage* ou *current clamp*. No modo *voltage clamp*, um determinado potencial de membrana é fixado sendo aplicada corrente positiva ou negativa pelo eletrodo de registro para se manter esse

potencial. Nesse caso então, estudam-se variações na corrente necessária para se manter determinado potencial fixo. No modo *current clamp*, a corrente que é aplicada pelo eletrodo de registro é fixa e o potencial da membrana da célula pode variar. Nesse caso então, o que se estuda são variações no potencial da membrana da célula.

Existem ainda diferenças entre respostas espontâneas, ou seja, sem estímulos, como frequência de disparo do neurônio e correntes pós sinápticas em miniatura e respostas evocadas, nas quais é medido o potencial da membrana do neurônio durante a estimulação do tecido com um eletrodo de estimulação.

Usando algumas dessas técnicas os neurônios do núcleo central da amígdala foram caracterizados eletrofisiologicamente e morfológicamente por Schiess *et al.*, (1999). Resumidamente, os neurônios foram classificados em dois grupos chamados de tipo A e Tipo B. Neurônios tipo A apresentam um potencial de membrana de repouso hiperpolarizado (-74mV), curta hiperpolarização posterior à estimulação e resposta não acomodativa (disparos não cessam enquanto o estímulo está presente). Neurônios tipo B tem potencial de membrana em repouso despolarizado (-66mV), hiperpolarização posterior à estimulação longa e resposta acomodativa. Mais tarde foi descrito um terceiro tipo de neurônio com baixo limiar para despolarização, apresentam dois ou três disparos no início da estimulação (DUMONT *et al.*, 2002). Não foi encontrada relação entre esses neurônios e a expressão ou não receptores de CRF₁, mas foi encontrada uma relação entre a expressão do receptor CRF₁ e a presença de diferentes subunidades do receptor GABA A (HERMAN *et al.*, 2013).

O etanol agudo aumenta os correntes inibitórias pós sinápticas evocadas (IPSC) mediadas pelo receptor GABA A. Além disso o etanol diminui a razão do *paired pulse facilitation* bem como aumenta a frequência de correntes pós sinápticas inibitórias em miniatura (mIPSC) demonstrando que esse efeito do etanol acontece através do aumento da liberação do GABA. Porém o etanol também aumenta a amplitude dos mIPSCs sugerindo uma ação pós sináptica que foi confirmada pela potencialização do efeito do GABA aplicado na presença de tetrodotoxina (para minimizar efeitos pré sinápticos) diretamente sobre o tecido (ROBERTO *et al.*, 2003; BAJO *et al.*, 2008). Não foi observada tolerância para esse efeito em animais expostos ao vapor de etanol por duas semanas e foi notado o aumento de GABA,

quantificado por microdiálise no núcleo central da amígdala, tanto no basal quanto no aumento induzido pelo etanol (ROBERTO *et al.*, 2004a).

O receptor CRF1 media esse efeito através da via da PKC ϵ (NIE *et al.*, 2004; BAJO *et al.*, 2008) e da adenilato ciclase tipo 7 (CRUZ *et al.*, 2011). Tanto o etanol quando o CRF aumentam as IPSCs evocadas e antagonistas do CRF₁, mas não do CRF₂, bloqueiam esse efeito. Animais nocaute para CRF₁ não apresentam esse efeito, enquanto que nos nocautes para CRF₂ o efeito se mantém (NIE *et al.*, 2004, 2009).

Animais dependentes, no modelo de vaporização de etanol, tem aumento de RNAm do CRF na amígdala central e o efeito do CRF sobre as IPSC evocadas nesse núcleo esta aumentado. Antagonistas de CRF₁ anulam os efeitos do etanol sobre as IPSC bem como sobre a liberação de GABA quantificada por microdiálise. Isso mostra que a interação entre o CRF e o sistema gabaérgico no núcleo central da amígdala pode ter um papel importante na dependência de etanol.

Também foi estudado o efeito do etanol sobre a transmissão glutamatérgica na amígdala central. O etanol agudamente reduz os EPSPs/EPSCs tanto mediados por receptores NMDA quanto por receptores não-NMDA. Esse efeito mediado pelo receptor NMDA foi aumentado em animais expostos ao vapor de etanol por duas semanas (*slices* em abstinência de 2-8 horas). O etanol reduziu o PPF apenas em animais passaram pelas câmaras de vaporização de etanol, sugerindo um aumento na liberação de glutamato induzida pelo etanol. Esse efeito é reforçado pela evidência obtida por microdiálise que mostra aumentos na liberação de glutamato induzida por etanol apenas em animais que passaram pela vaporização e etanol (ROBERTO *et al.*, 2004b). Na abstinência prolongada, uma semana, a corrente mediada pelo receptor NMDA voltava aos seus valores basais, porém a redução no PPF se mantinha, mostrando que o efeito liberador de glutamato ainda estava presente. A vaporização também aumentou os níveis, tanto de RNA mensageiro quanto da proteína, das subunidades NR1, NR2A e NR2B do receptor NMDA, porém com uma ou duas semanas de abstinência essa variação não foi mais observada (ROBERTO *et al.*, 2006)

Sendo assim, o etanol altera tanto a transmissão glutamatérgica quanto a gabaérgica no núcleo central da amígdala, sendo que as alterações na transmissão gabaérgica ocorrem via receptor de CRF₁. Antagonistas desse receptor injetados no

núcleo central da amígdala reduzem o consumo de etanol, mostrando a importância desse núcleo e do CRF na modulação do consumo de etanol.

ESTUDO 1 - INFLUÊNCIA DE UM ANTAGONISTA DO RECEPTOR CRF1 NO CONSUMO DE ETANOL POR CAMUNDONGOS COM DIFERENTES PADRÕES DE CONSUMO

3.0 OBJETIVOS DO ESTUDO 1

- Caracterizar os diferentes padrões de consumo de etanol apresentados pelos camundongos expostos ao modelo de adição.
- Avaliação do efeito do bloqueio dos receptores de CRF₁, pela administração do antagonista CP-154,526, sobre o consumo de etanol em animais com diferentes padrão de consumo em um modelo de adição.

4.0. MATERIAL E METODOS DO ESTUDO 1

4.1. Animais

Foram utilizados 70 e 30 camundongos machos Swiss adultos provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, respectivamente para o modelo de adição e para a curva dose resposta do antagonista sobre a movimentação espontânea. Durante a exposição ao modelo de adição, os animais foram isolados em gaiolas de plástico medindo 20x30x20 cm e para a execução da curva dose resposta, os animais foram mantidos em gaiolas medindo 30x50x15 cm em grupos de 20 animais. Todos foram mantidos em sala com temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, sob ciclo claro-escuro de 12 horas e alimentação *ad libitum*. Os protocolos foram autorizados pelo comitê de ética em experimentação animal do setor de ciência biológicas da Universidade Federal do Paraná sob protocolo numero 391 (anexo 1).

4.2. Equipamento- Caixa de Movimentação Espontânea

Consiste em uma caixa medindo 60x20x30 cm, com paredes de madeira. O assoalho é formado por barras de aço de 0,5 cm de diâmetro separadas entre si por 1 cm, e o teto de acrílico (tampa removível). O animal foi colocado no centro da caixa e permaneceu na caixa por 3 minutos. Três células fotoelétricas registraram o número de interrupções do feixe luminoso, quando o animal se movimenta no interior da caixa, registrando o número de ambulações (Figura 8).

4.3. Drogas

Na curva dose-resposta do antagonista CP-154,426 foi utilizado etanol absoluto P.A. (Laboratório Merck) diluído em solução salina 0,9% na concentração de 10% (p/v) e administrado intraperitonealmente (i.p.) na dose de 2g/kg. Solução salina 0,9% i.p. foi administrada em volume correspondente à dose de etanol No modelo de adição foi utilizado etanol 95% P.A. (Laboratório Vetec) diluído em água nas concentrações de 5 e 10% (v/v) e administrado por via oral (v.o.) *ad libitum*. Durante a fase de adulteração, as soluções de etanol foram misturadas com 0,005 g/L de cloreto de quinino, dose escolhida de uma curva dose resposta na qual se avaliou a aversividade ao sabor amargo pelas doses de 0,001, 0,005, 0,01 e 0,05 g/L de quinino (FACHIN-SCHEITel *al.*, 2006). O antagonista do receptor de CRF₁,

butylethyl[2,5-dimethyl-7-(2,4,6-trimethylphenyl)-7H -pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl]amine (CP-154,526, doado pela Pfizer) foi suspenso em carboximetilcelulose 0.5%. O CP-154,526 é um potente e seletivo antagonista não peptídico ($K_i=2.7\text{nM}$), sua estrutura química pode ser vista na figura 9. (SCHULZ *et al.*, 1996).



Figura 8 – Caixa de movimentação espontânea.

4.4. Ação aguda do CP-154,526 sozinho ou associado ao etanol

O objetivo da determinação da curva dose resposta do antagonista sozinho e na presença de etanol foi a de verificar se as doses que seriam usadas no modelo de adição não seriam por demais sedativas, alterando o consumo, ou até mesmo tóxicas. Para isso foram criados seis grupos ($n=5$ por grupo) que receberam duas injeções, a primeira trinta minutos antes do teste comportamental e a segunda dez minutos antes. Os animais foram testados na caixa de movimentação espontânea por três minutos. Os grupos estão mostrados na tabela 5 Os intervalos e dose de etanol foram baseados em Boerngen-Lacerda e Souza-Formigoni,2000.

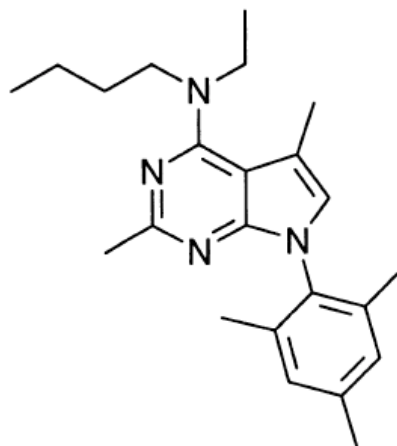


Figura 9 - Estrutura química do antagonista de CRF₁, CP-154,526. Fonte: SCHULZ *et al.*, 1996.

Grupo	Primeira injeção	Segunda injeção
SS	Salina	Salina
SE	Salina	Etanol 2g/Kg
C15S	CP 15mg/Kg	Salina
C30S	CP 30mg/Kg	Salina
C15E	CP 15mg/Kg	Etanol 2g/Kg
C30E	CP 30mg/Kg	Etanol 2g/Kg

Tabela 5 - Diferentes grupos de tratamento usados no teste agudo do CP-154,426.

4.5. Modelo de Adição

Um grupo com 60 camundongos foram isolados em gaiolas individuais e submetidos a um período de 70 dias (**10 semanas- Fase de Aquisição-AC**), com livre acesso às soluções de etanol 10% e 5% e água. Um grupo controle com 10 camundongos tiveram acesso somente à água (Figura 10).

Em seguida, as soluções de etanol foram retiradas por **2 semanas** deixando somente água disponível - **Fase de Abstinência**

A próxima fase durou mais **2 semanas (Fase de Reapresentação – RE)** na qual as soluções de etanol foram novamente oferecidas.

Por último, na **Fase de Adulteração (AD)** que durou mais **2 semanas**, as soluções de etanol foram adulteradas com 0,005 g/L de quinino para propiciar um sabor amargo. Nada foi adicionado à água.

Durante todo o experimento, as posições das garrafas foram mudadas a cada dois dias e o consumo dos líquidos medidos volumetricamente, sendo que as soluções eram descartadas e repostas nestas ocasiões.

Após todo o procedimento do modelo de adição, os animais foram classificados em grupos: adicto, pesado e leve de acordo com seu padrão individual de consumo nas diferentes fases, que está sumarizado a seguir:

Consumidor adicto

- Preferência pelas soluções de etanol ou sem preferência.
- Sem redução significativa do consumo de etanol (g/kg) na fase de adulteração comparado com a livre escolha.

Consumidor pesado

- Preferência pelas soluções de etanol ou sem preferência.
- Consumo de etanol (g/kg) com redução significativa durante a adulteração quando comparado com a livre escolha.

Consumidor leve

- Preferência pela água em todas as fases.

O volume de álcool diário consumido no decorrer do tratamento foi convertido em gramas de álcool por kg de peso do animal, aplicando-se a fórmula abaixo. Os coeficientes utilizados foram calculados a partir da densidade do álcool.

$$Q \text{ (g/kg/dia)} = (V10\% \times 0,075 + V5\% \times 0,0375) / P \times 1000$$

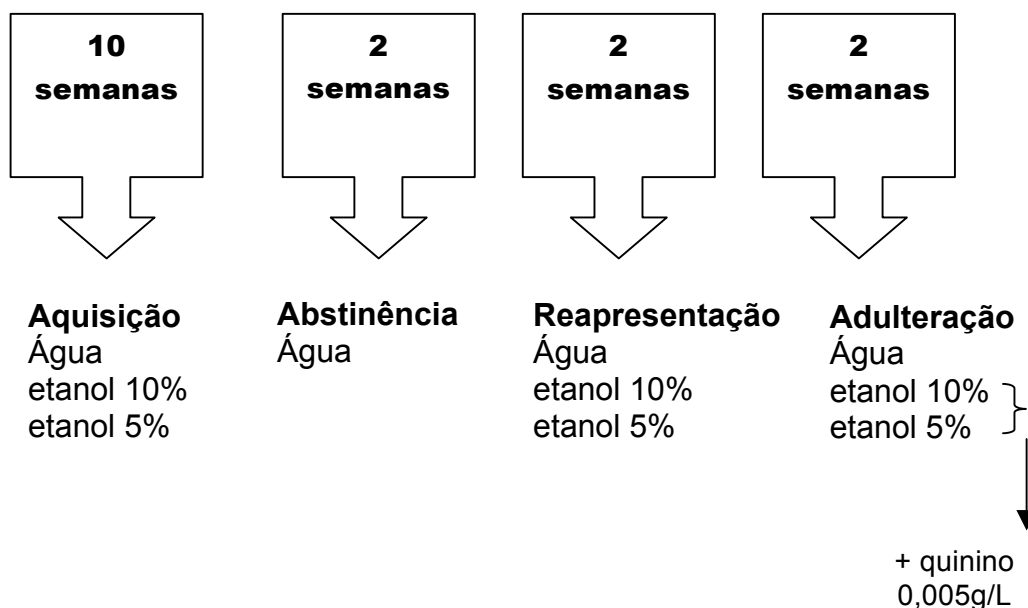
Q = quantidade de álcool consumida diariamente em g/kg de peso do animal

V10% = volume consumido diariamente da solução de etanol a 10% (V/V)

V5% = volume consumido diariamente da solução de etanol a 5% (V/V)

P = peso do animal, em gramas, avaliado semanalmente.

GRUPO ETANOL



GRUPO CONTROLE DO ISOLAMENTO

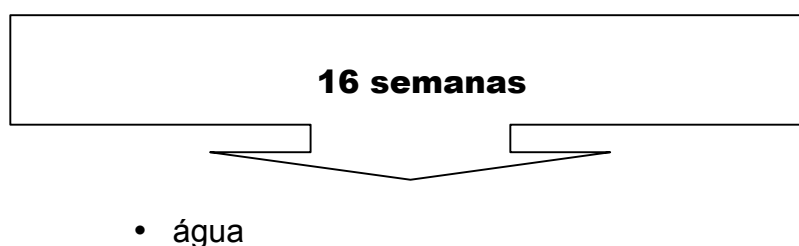


Figura 10 - Fases do modelo de adição. No diagrama estão representadas as diferentes fases do modelo de adição, sua duração bem como as soluções ofertadas aos animais.

4.6 - Avaliação do efeito do CP-154,526 sobre o consumo de etanol dos animais classificados anteriormente pelo seu padrão de consumo

Após todas as fases do modelo de adição os animais classificados em adicto, pesado e leve, receberam o tratamento com CP-154,526, um antagonista dos receptores CRF₁.

Após o último dia da fase de adulteração, os animais tiveram acesso por uma semana as soluções de etanol, sem adulteração, e água. No dia seguinte foi realizada a primeira das três sessões de injeção i.p. Em cada sessão os animais recebiam a mesma dose em dois dias consecutivos. Entre as doses administradas

houve um intervalo de 5 dias, durante esse intervalo os animais tinha acesso as três soluções. Cada animal recebeu todas as doses de CP-154,526(0,0, 15,0; e 30,0 mg/kg i. p.), utilizando o método de distribuição por quadrado latino. As doses estão baseadas em relatos da literatura e se apresentaram seguras no teste agudo (LOWERY *et al.*, (2010); PASTOR *et al.*, (2008)).

Os 10 animais do grupo controle também receberam todas as doses de CP-154,526, sendo que passaram a ter acesso à água e às soluções de álcool (controle do efeito da CP-154,526 sobre o consumo agudo de álcool).

O acesso às soluções de etanol e água (livre escolha) foi permitido 30min após a injeção da droga ou salina. O consumo foi quantificado 24h do acesso às soluções. Durante essa fase de tratamento o consumo foi medido diariamente. O esquema de tratamento com o antagonista foi uma variação do trabalho de validação do modelo de adição com naltrexona (FACHIN-SCHEIT *et al.*, 2006).

4.7 Análise Estatística

A distribuição normal dos dados foi analisada pelo teste de Kolmogorov–Smirnov e quanto à homocedasticidade pelo teste de Levene. Para se computar o consumo de etanol em gramas por quilograma (g/Kg) foi usado o peso dos animais em gramas e o consumo de etanol em mililitros. O consumo de etanol e de água foram expressos como media \pm desvio padrão. Para se classificar cada animal de acordo com seu padrão de consumo foram calculados: (1) a preferência entre o etanol total consumido (5% + 10%) – em mL) e a água e (2) o consumo individual em g/kg/dia em cada fase. A preferência (1) entre água e etanol em cada fase foi detectada pelo teste t de Student, e para comparar os níveis de consumo de cada animal (2) entre as fases do modelo foi realizada ANOVA de uma via seguida do teste post-hoc de Newman–Keuls considerando-se para o cálculo da média do consumo diário em cada fase (14 medidas diárias na fase AC, ou seja, o consumo diário das últimas 2 semanas da fase AC; 14 na RE, ou seja o consumo diário das duas semanas da fase RE; e 14 na AD, ou seja o consumo diário das duas semanas da fase AD). Após a classificação individual em cada um dos três grupos (A,H e L), diferentes ANOVAs de duas e de uma via seguida do teste de Newman–Keuls foram usadas para comparar o consumo de etanol em g/kg/dia entre os grupos e entre as fases, incluindo as fases de tratamento com o antagonista. Todas as análises foram

feitas com o software Statistica 6.1(StatSoft, São Caetano do Sul, Brasil). Diferenças foram consideradas significantes quando $p \leq 0,05$.

5.0 RESULTADOS DO ESTUDO 1

5.1 Ação aguda do CP-154,526 sozinho ou associado ao etanol

Não foi observada diferença na ambulação em nenhum dos grupos tratados. ANOVA de uma via ($F_{5,24} = 0.47$; $p=0.79$) as médias dos grupos estão apresentadas na figura 11.

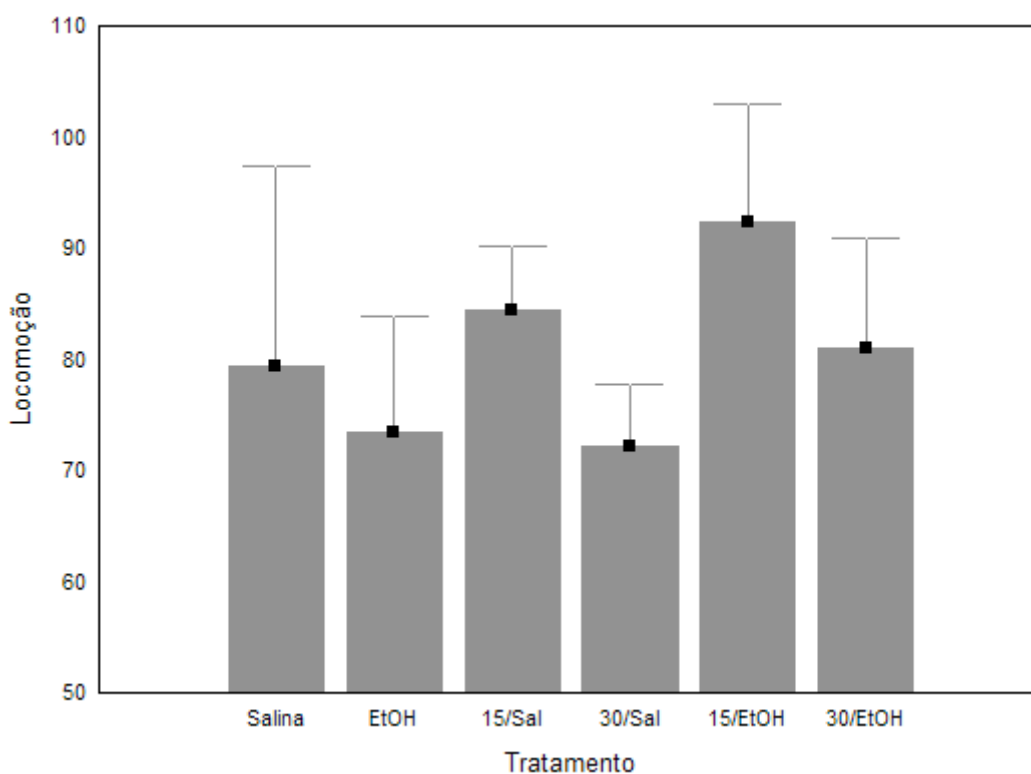


Figura 11 - Locomoção de animais tratados agudamente com veículo, etanol ou CP-154,526 associado a veículo ou etanol. Não foi observada diferença entre os grupos.

5.2 Modelo de adição – classificação dos animais nos diferentes padrões de consumo

O consumo dos animais foi analisado individualmente (tabelas 5 a 8) e então os animais foram agrupados nos diferentes grupo (A, H e L) segundo os critérios já citados na metodologia.

ANIMAL	GRUPO ADICTO						
	CONSUMO DE ETANOL AO LONGO DAS FASES (g/kg/dia) – Média (dp)			F (2,33) (p)	PREFERÊNCIA		
	AC	RE	AD		AC	RE	AD
1	8.1 (2.7)	11.0 (2.7) *	9.9 (1.3)	4.77 (0.02)	S	S .06	E
4	11.3 (4.5)	12.7 (2.9)	9.8 (2.8)	1.45 (0.25)	E	E	E
6	11.4 (1.7)	10.4 (3.4)	11.1 (1.6)	0.62 (0.54)	E	E	E
12	8.5 (2.4)	11.1 (2.5) *	9.6 (2.9)	3.48 (0.04)	E	E	S
21	12.3 (2.5)	15.2 (1.4) * &	12.6 (3.1)	3.91 (0.03)	E	E	E
22	8.2 (1.6)	14.2 (1.4) * &	10.0 (2.1) *	30.22 (0.00)	E	E	E
32	12.6 (1.6)	15.3 (1.1) * &	12.5 (4.3)	3.49 (0.04)	E	E	E
39	9.8 (2.4)	13.0 (1.1) * &	9.6 (2.2)	7.94 (0.00)	E	E	S
40	9.8 (2.4)	9.5 (0.9)	9.2 (2.8)	0.24 (0.79)	E	E	E
47	11.0 (2.8)	13.0 (5.2) &	8.9 (2.0)	3.75 (0.03)	E	N	E
53	12.3 (2.1)	15.1 (2.9) *	14.8 (2.9) *	4.75 (0.02)	E	E	E
68	8.2 (2.2) *	11.2 (1.9)	11.6 (2.1) *	8.95 (0.00)	E	E	E
70	18.0 (2.8)	16.2 (5.0)	14.5 (5.8)	1.48 (0.25)	E	E	E

Tabela 6 - Padrão individual de consumo de etanol do grupo adicto.

*Diferente da fase de AC; # Diferente da fase RE; & Diferente da fase AD (Post hoc de Newman Keuls, p<.05)

S = Sem preferência entre etanol e água; E = Preferência por etanol; A = preferência por água.

ANIMAL	GRUPO PESADO						
	CONSUMO DE ETANOL AO LONGO DAS FASES (g/kg/dia) - Média (dp)			F (2, 37) (p)	PREFERÊNCIA		
	AC	RE	AD		AC	RE	AD
5	6.8 (1.5)	6.3 (1.8)	4.9 (0.7) * #	6.42 (0.00)	S	A	S
10	7.8 (2.9)	7.1 (2.5)	5.4 (1.6)	3.06 (0.06)	S	A	A
24	12.0 (3.7)	14.3 (3.0)	9.2 (2.2) * #	6.01 (0.01)	E	E	E
29	24.5 (10.5)	11.6 (1.7) *	10.9 (0.4) *	9.02 (0.00)	E	E	E
45	9.7 (1.9)	11.2 (1.8)	7.0 (2.1) *#	11.86 (0.00)	E	E	S
46	11.4 (1.9)	11.7 (1.7)	6.5 (1.8) *#	23.22 (0.00)	S	S	A
48	14.2 (3.6)	13.4 (2.8)	10.4 (0.9) *#	6.07 (0.01)	E	E	E
49	13.4 (1.4)	10.4 (3.6) *	6.3 (1.5) *#	34.21 (0.00)	E	S	A
67	12.3 (3.2)	9.8 (2.4) *	8.0 (2.0) *	8.77 (0.00)	E	E	S

Tabela 7 - Padrão individual de consumo de etanol do grupo pesado.

*Diferente da fase de AC; # Diferente da fase RE; & Diferente da fase AD (Post hoc de Newman Keuls, p<.05)

S = Sem preferência entre etanol e água; E = Preferência por etanol; A = preferência por água.

ANIMAL	GRUPO LEVE						
	CONSUMO DE ETANOL AO LONGO DAS FASES (g/kg/dia) - Média (dp)			F 2,35 (p)	PREFERÊNCIA		
	AC	RE	AD		AC	RE	AD
3	4.7 (1.4)	6.9 (1.7) * &	5.6 (1.3)	7.05 (0.00)	A	A	A

8	5.8 (1.5)	11.0 (3.5) * &	6.0 (1.3)	16.99 (0.00)	A	A	A
9	7.5 (2.5)	8.3 (2.3)	5.1 (1.4) * #	6.61 (0.00)	A	A	A
11	5.9 (2.3)	5.2 (1.8)	5.8 (1.1)	0.54 (0.59)	A	A	A
16	5.3 (1.1)	6.7 (0.9) *	6.2 (1.6)	4.55 (0.02)	A	A	A
18	6.5 (1.3)	9.1 (1.2) * &	7.1 (2.2)	6.90 (0.00)	A	A	A
20	7.4 (2.3)	7.9 (0.5)	7.6 (2.8)	0.17 (0.84)	A	A	A
25	4.5 (0.9)	5.5 (1.0)	4.1 (2.2)	2.26 (0.12)	A	A	A
26	6.0 (1.2)	7.5 (1.6) *	3.6 (1.6) * #	11.58 (0.00)	A	A	A
28	5.4 (1.2)	6.7 (1.8) * &	5.1 (1.5)	3.18 (0.05)	A	A	A
31	8.8 (1.6)	6.8 (2.3) *	5.5 (0.6) *	13.39 (0.00)	A	A	A
35	6.3 (1.1)	7.7 (1.2)	7.4 (2.5)	2.54 (0.09)	A	A	A
36	8.4 (1.2)	7.4 (0.4)	7.3 (2.2)	1.83 (0.18)	A	A	A
37	9.9 (2.1)	10.1 (2.8)	9.1 (2.6)	0.48 (0.62)	A	S	A
41	7.0 (1.5)	8.3 (1.7)	7.4 (3.0)	0.93 (0.41)	A	A	S
44	6.5 (1.6)	11.1 (3.2) * &	7.1 (2.3)	12.87 (0.00)	A	S	A
52	7.0 (1.7)	6.5 (1.2)	7.9 (2.4)	1.46 (0.25)	A	A	A
56	6.9 (1.7)	8.0 (2.3)	5.5 (0.8) #	4.89 (0.02)	A	S	A

57	8.1 (2.1)	8.4 (1.3)	9.2 (4.3)	0.43 (0.66)	A	A	S
59	6.3 (1.1)	5.3 (1.1) *	5.2 (1.1) *	4.24 (0.02)	A	A	A
63	8.0 (3.0)	8.8 (3.6)	5.9 (1.1)	3.11 (0.06)	A	A	A
64	9.8 (2.6)	9.1 (1.8)	9.3 (2.1)	0.32 (0.72)	A	A	A
65	6.7 (2.8)	8.1 (2.5)	7.5 (1.2)	1.24 (0.30)	A	A	A
66	7.3 (1.8)	8.7 (2.5)	8.1 (1.9)	1.50 (0.24)	A	A	A

Tabela 8 - Padrão individual de consumo de etanol do grupo leve*Diferente da fase de AC; # Diferente da fase RE; & Diferente da fase AD (Post hoc de Newman Keuls , p<.05)
S = Sem preferência entre etanol e água; E = Preferência por etanol; A = preferência por água.

GRUPO INDEFINIDO								
		CONSUMO DE ETANOL AO LONGO DAS FASES (g/kg/dia) Média (dp)			F 2,26 (p)	PREFERÊNCIA		
GRUPO	ANIMAL	AC	RE	AD		AC	RE	AD
ADICTO?	13	7.7 (2.5)	11.1 (3.6)	11.2 (5.9)	2.11 (0.14)	A	S	S
	15	7.8 (1.9)	8.6 (5.6)	10.3 (5.7)	0.77 (0.47)	S E (.06)	S	S
	30	8.4 (2.9)	11.0 (1.5) *	9.8 (2.9)	3.43 (0.04)	A	E	S
	58	9.6 (3.1)	11.7 (2.1)	9.1 (2.6)	1.88 (0.17)	S	S	S
HEAVY?	17	9.9 (3.1)	8.9 (1.1)	8.8 (3.6)	0.57 (0.57)	E	S	S

	34	9.0 (1.4)	10.2 (1.0)	8.0 (1.0) * 0.07	6.67 (0.00)	E	E	S
	61	9.9 (3.7)	10.2 (5.1)	7.8 (1.8)	1.46 (0.25)	S	S	A
	62	10.0 (3.1)	10.6 (3.2)	8.1 (3.1)	1.55 (0.23)	S	S	S
LIGHT?	38	7.9 (1.2)	10.2 (2.1)	9.8 (3.6)	3.40 (0.05)	S	A	A
	43	7.6 (2.6)	13.9 (3.2) * &	9.6 (2.6)	14.64 (0.00)	A	S	A
	50	6.6 (1.7)	14.3 (0.9) *	10.2 (3.9) * #	18.78 (0.00)	A	S	A
	54	8.2 (2.5)	10.4 (0.2)	9.8 (3.2)	2.87 (0.07)	A	A	S

Tabela 9 - Padrão individual de consumo de etanol do grupo indefinido.

*Diferente da fase de AC; # Diferente da fase RE; & Diferente da fase AD (Post hoc de Newman Keuls, $p < 0.05$)

S = Sem preferência entre etanol e água; E = Preferência por etanol; A = preferência por água.

5.3 - Modelo de adição – consumo de etanol antes do tratamento com o antagonista de CRF₁.

Após a classificação individual os animais foram agrupados também em grupos A (n=13), H (n=9) e L (n=24), doze animais não se enquadraram em nenhuma classificação e foram excluídos. O consumo apresentado como média \pm desvio padrão (g/kg/dia) para os diferentes grupos na fase AC foi: A: 10.8 ± 1.0 ; H: 11.7 ± 1.5 ; L: 6.8 ± 0.6 ; na fase RE A: 12.8 ± 0.8 ; H: 10.5 ± 0.9 ; L: 7.8 ± 0.4 e na fase AD: A: 11.0 ± 0.9 ; H: 7.6 ± 0.8 ; L: 6.7 ± 0.3 .

A ANOVA de duas vias tendo consumo (g/kg/dia) como variável dependente e os diferentes grupos e as diferentes fases como fatores independentes revelou um efeito para Grupo ($F(2,83)=288.05$, $p<0.001$), Fase ($F(2,83)=37.57$, $p<0.001$) e para a interação entre esses fatores ($F(4,83)=18.93$, $p<0.001$) e as diferenças entre grupos/fases podem ser vistas na figura 12. O grupo L consumiu menos etanol que o grupo A em todas as fases e menos que o grupo H nas fases AC e RE ($p<0.001$). O grupo H teve redução no consumo de etanol na fase AD em relação às fases AC e RE e na fase AD o consumo foi menor que o do grupo A na mesma fase ($p<0.01$).

5.4 - Modelo de adição – consumo de etanol após do tratamento com o antagonista de CRF₁.

A ANOVA de duas vias tendo consumo (g/kg/dia) como variável dependente e os diferentes grupos e as diferentes fases, incluindo as do tratamento com CP-154,526, como fatores independentes revelou um efeito para Grupo ($F(2,83)=43.34$, $p<0.001$), Fase ($F(5,83)=67.58$, $p<0.001$) e para a interação entre esses fatores ($F(10,83)=12.21$, $p<0.001$) e as diferenças entre grupos/fases podem ser vistas na figura 12. A dose mais alta do antagonista reduziu o consumo nos grupos A e H comparado com o veículo ($p<0.05$ e $p<0.001$, respectivamente). Os grupos A e L aumentaram o consumo de etanol durante o tratamento com o antagonista em relação às fases AC, RE e AD ($p<0.01$), enquanto que o grupo H aumentou seu consumo em relação as fases AC, RE e AD quando sob efeito do veículo e quando durante efeito do antagonista apenas em relação a fase AD. É importante notar que o grupo A teve consumo mais alto de etanol que o grupo H em todas as fases do tratamento e mais alto que o grupo L quando sob veículo.

A ANOVA de uma via feita para o grupo controle sob o efeito do tratamento com antagonista revelou ausência de significância. ($F(2,21)=0.94$, $p=0.41$).

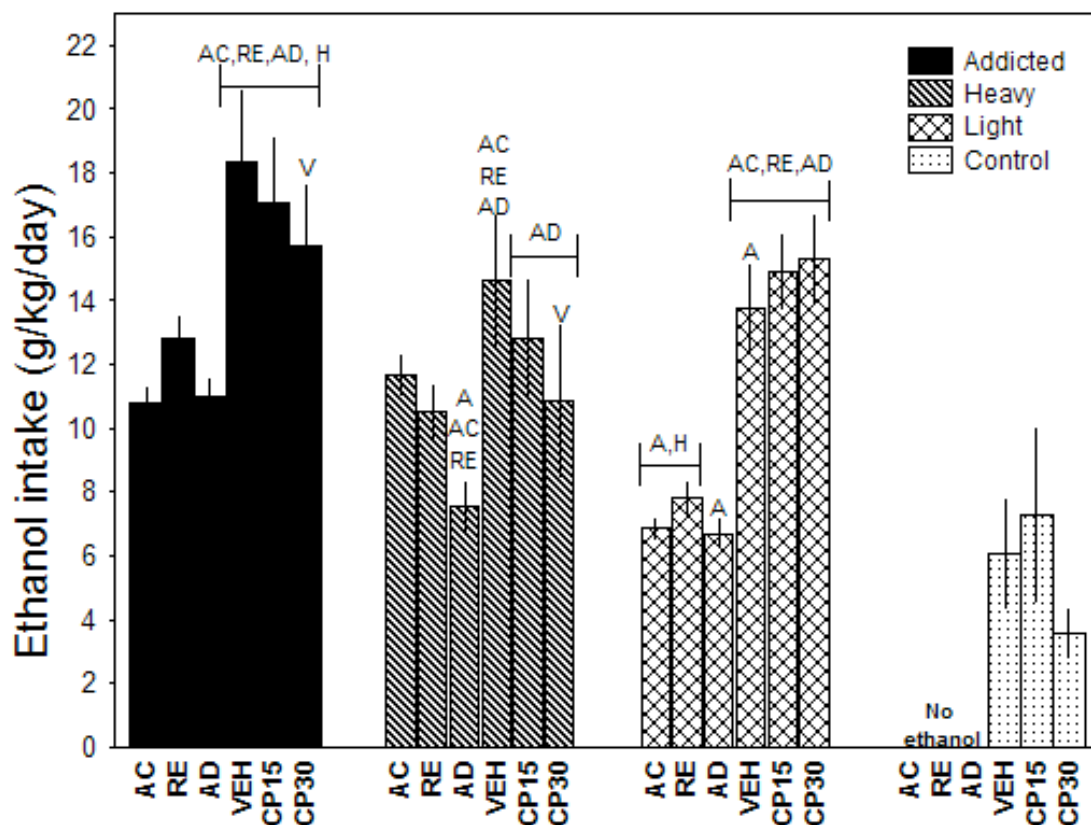


Figura 12 - Consumo de etanol nas diferentes fases do modelo de adição e após a administração do antagonista de CRF₁. Dados expressos como média ± erro padrão do consumo de etanol em g/kg/dia. Consumo de etanol nos grupos A, H e L durante as fases experimentais do modelo (AC: fase de aquisição RE: fase de reapresentação AD: fase de adulteração VEH administração do veículo CP15: administração do CP-154,426 na dose de 15mg/Kg CP30: administração do CP-154,426 na dose de 30mg/Kg. Diferenças estatísticas: AC diferente da aquisição para o mesmo grupo RE diferente da reapresentação para o mesmo grupo AD diferente da adulteração para o mesmo grupo V diferente do tratamento com o veículo A diferente do grupo adicto para a mesma fase H diferente do grupo pesado para a mesma fase. ANOVA de duas vias seguida do teste de post hoc de Newman-Keuls, $p < 0.05$.

6.0 – DISCUSSÃO DO ESTUDO 1

O principal achado desse estudo foi a confirmação da hipótese que apenas animais com consumo alto reduziram seu consumo de etanol após a administração do antagonista de CRF₁, sugerindo que nesses animais o sistema do CRF está envolvido no seu comportamento de consumo. No grupo L, como esperado, o antagonista não teve efeito.

Como já mencionado na introdução, muitos autores tem demonstrado a relação entre dependência e CRF. A principal diferença desse estudo e das

evidências da literatura é que esse modelo de dependência tem sido proposto para mimetizar o que é visto em humanos. Tem sido sugerido que para se aumentar a validade de modelos de adição o modelo deve permitir que os animais tenham um número estendido de dias/semanas em que lhes é permitido consumir a droga, (WOLFFGRAMM e HEYNE, 1995; DEROUCHE-GAMONET *et al.*, 2004) e também um período estendido de tempo durante a sessão de administração disponível em cada dia (AHMED e KOOB, 1998). O nível mínimo de etanol considerado intoxicante é de 80mg% (NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL ABUSE AND ALCOHOLISM, 2004) Nosso grupo reportou que as concentrações plasmáticas (expressas em mg% e desvio padrão) determinadas no fim do modelo, no último dia da adulteração, foram 113 ± 32.2 para o grupo A, 79 ± 56 para o grupo H e 48 ± 42 para o grupo L. Os valores da concentração plasmática e etanol foram correlacionados positivamente com o consumo de etanol no final do modelo (consumo de etanol durante a fase AD: 12.1 ± 2.6 g/kg/dia para o grupo A, 6.6 ± 0.9 g/kg/dia para o grupo H e 4.9 ± 0.4 g/kg/dia no grupo L. sugerindo que nos dois primeiros grupos os níveis de álcool foram intoxicantes. (RIBEIRO *et al.*, 2012).

Outra diferença importante entre o presente estudo e as evidências da literatura é que os animais tiveram livre acesso às soluções de etanol constantemente durante o tratamento com CP-154,526 enquanto que os estudos anteriores usavam múltiplas abstinências, o que poderia estar induzindo um afeto negativo proeminente. Nesse estudo, os animais tiveram apenas um período de duas semanas de abstinência, nos outros estudos já mencionados os animais estavam sujeitos à abstinência durante o tratamento com o antagonista de CRF₁.

A dose mais alta do antagonista de CRF₁ reduziu o consumo do grupo H para níveis equivalentes aos níveis da fase de aquisição, por outro lado no grupo A, apesar de também ter sido observada uma redução no consumo de etanol com a dose mais alta quando comparado ao consumo dos animais nos dias sob injeção de veículo, o nível do consumo persistiu mais alto que nas fases anteriores. Duas hipóteses podem ser propostas para explicar essas observações. Para o grupo A, pode ter havido um desvio à direita na curva dose resposta de forma que esse grupo precisaria de uma dose mais alta para atingir o efeito máximo. A segunda hipótese seria que nos camundongos do grupo A, que perderam o controle sobre o consumo, outros sistemas estariam envolvidos, sendo assim apenas o antagonista do CRF₁ não seria suficiente para reduzir totalmente o seu consumo. Como esses animais

supostamente perderam o controle sobre o consumo, pode-se inferir que sistemas encefálicos envolvidos no *craving* (estágio de preocupação/antecipação), em especial o glutamatérgico, seriam os mais relevantes. A ativação do receptor CRF₁ induz uma condutância dependente de potássio GIRK (Kir3) – via ativação de receptores GABA_B. (BECKSTEAD *et al.*, 2009). Nosso trabalho anterior demonstrou que animais A tinham níveis alterados de mRNA para os genes do receptor GABA_B no estriado, hipocampo e córtex pré frontal (RIBEIRO *et al.*, 2012). Essas alterações podem estar influenciando a resposta do antagonista de CRF₁ sobre o consumo de etanol, apesar de que o mecanismo permanece desconhecido.

Os dados podem sugerir que o afeto negativo relacionado à síndrome de abstinência, influencia principalmente o grupo H enquanto no grupo A essa influência foi apenas parcial. A evidência de síndrome de abstinência nesses dois grupos foi demonstrada através do aumento da ansiedade no labirinto em cruz elevado e no campo aberto quando os animais foram testados 5 horas após a retirada das soluções de etanol num estudo anterior do nosso laboratório (FACHIN-SCHEIT *et al.*, 2006). No mesmo estudo foi mostrado que o grupo L, com consumo e níveis sanguíneos baixos de etanol ao longo de todas as fases do modelo e sem comportamento de perda de controle durante a fase de adulteração, tinha índices de ansiedade menores que dos outros grupos, sendo assim, esses animais não teriam experimentando o afeto negativo da retirada do álcool.

Vale a pena salientar que durante o tratamento com o antagonista, nos dias que os grupos estavam sob injeção de veículo, o consumo de etanol aumentou em todos os grupos em relação às outras fases do modelo, porém, o grupo L manteve o seu padrão de consumo menor que o grupo A. O aumento no consumo de etanol pode ter sido consequência do estresse induzido pela manipulação, ou seja, das várias injeções administradas (GOUVEIA e HURST, 2013). Podemos considerar que todos os grupos foram submetidos aos mesmos procedimentos, durante o período de tratamento. É importante salientar que o protocolo experimental usado foi o quadrado latino com o objetivo de se evitar a influência de um tratamento sobre o outro, bem como minimizar o efeito da habituação à manipulação. No quadrado latino todos os animais receberam todas as doses em ordem aleatória evitando a influência de uma dose sobre a outra (FACHIN-SCHEIT *et al.*, 2006; JI *et al.*, 2008), sendo assim sugere-se que o efeito do antagonista sobre o consumo de etanol nos grupos A e H não aconteceu pela habituação ao estresse de manipulação.

Diferentes tipos de estresse alteram de forma diferente o consumo. Sillaber *et al.*, (2002) mostraram que camundongos nocaute para o receptor CRF₁ não tem diferença nos animais selvagens no consumo basal de etanol. Após o estresse repetido (natação forçada, *social defeat*), apenas os animais nocaute tiveram aumento retardado e persistente no consumo de etanol, sugerindo que o gene CRF₁ modifica o consumo de etanol apenas quando associado ao estresse.

Molander *et al.*, (2012) usou dois tipos de nocaute, um onde os receptores CRF₁ estavam ausentes em todo o sistema nervoso central mas ainda eram expressos na hipófise e nas glândulas adrenais e outro que não tinha o receptor CRF₁ em nenhum tecido. A comparação do consumo entre esses animais e seus controles selvagens durante o basal (livre escolha entre água e etanol 8%) e após o estresse (nado forçado e *social defeat*) levaram a conclusão que os receptores CRF₁ neuronais mediam o consumo de etanol induzido pelo estresse e estão envolvidos no aumento do consumo de etanol no estado pós dependente (induzido por vaporização de etanol). Não foram encontradas diferenças no consumo basal, indicando que os receptores CRF₁ não estão envolvidos no reforço primário. Os animais que mantiveram a expressão do CRF₁ no eixo HPA apresentaram aumento no consumo de etanol após o estresse, mostrando efeitos opostos dos receptores expressos no eixo HPA. Ainda, em ratos Wistar no modelo de recaída, *alcohol deprivation effect*, os antagonistas do receptor CRF₁ não tiveram efeito. Assim, o CRF₁ parece ser importante na transição para o beber excessivo e nos aumentos no consumo induzidos por estresse, mas parece ser de menor importância para alguns comportamentos de consumo, como o consumo basal e a recaída com baixa carga de estresse.

Nossos dados sugerem que no nosso modelo o estresse de manipulação aumentou o consumo de etanol em todos os grupos, porém apenas os grupos A e H reduziram seu consumo após a administração do antagonista de CRF₁. O antagonista não teve efeito no grupo L provavelmente porque de acordo com a teoria da alostase hedônica apenas animais com alto consumo de etanol teriam o sistema do CRF desregulado. Nossos dados confirmaram o papel do CRF na teoria da alostase e assim sendo confirmaram que drogas que agem sobre o sistema do CRF podem ser eficazes como coadjuvantes no tratamento do alcoolismo.

ESTUDO 2 – EXPRESSÃO DO RECEPTOR 1 DO CRF NA AMIGDALA DE CAMUNDONGOS COM DIFERENTES PADRÕES DE CONSUMO

7.0 OBJETIVOS DO ESTUDO 2

- Caracterizar os diferentes padrões de consumo de etanol apresentados pelos camundongos expostos ao modelo de adição.
- Avaliação da quantidade de transcrito para o receptor de CRF₁ através de PCR (*polimerase chain reaction*, reação em cadeia da polimerase) em tempo real na amígdala de animais com diferentes padrões de consumo de etanol.

8.0 - MATERIAL E METODOS DO ESTUDO 2

8.1 –Animais e análise comportamental

Outros animais (70 camundongos Swiss machos) foram mantidos sob as mesmas condições e o seus consumos foram registrados e analisados da mesma forma que a descrita no estudo 1. Os protocolos foram autorizados pelo comitê de ética em experimentação animal do setor de ciência biológicas da Universidade Federal do Paraná sob protocolo numero 391 (anexo 1).

8.2 - Análise molecular transcricional por PCR em Tempo Real

Após o término do modelo, os animais foram eutanaziados, seus encéfalos retirados e a amígdala dos animais foi dissecada, armazenada em TRizol[®] (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e armazenada a -80°C até o momento da extração do RNA.

8.2.1 - Extração do RNA

As amostras imersas em 500µL TRizol[®] e armazenadas a -80°C foram descongeladas e mantidas em gelo (4°C) até o início das extrações. Foram maceradas e a mistura ficou em temperatura ambiente (20-25°C) por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 0,2mL de clorofórmio PA, agitado por inversão por 15 segundos e incubado por mais 2-3 minutos em temperatura ambiente. Depois, foi centrifugado a 12000xrcf (g) por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação 0,3mL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado 0,5mL de isopropanol PA 100%, misturado por inversão durante 15 segundos e incubado por mais 10 minutos em temperatura ambiente. Nova centrifugação foi feita a 12000xrcf por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado cuidadosamente, ao precipitado foi adicionado 0,8mL de etanol PA absoluto gelado, misturado por inversão e centrifugado a 7500xrcf durante 5 minutos a 4°C. Ao término da centrifugação o sobrenadante foi desprezado cuidadosamente e o precipitado ficou secando por aproximadamente 20 a 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 20µL de água ultra pura[®] (Qiagen, São Paulo, Brasil) e misturado por cerca de 30 minutos antes de ser quantificado no espectrofotômetro. O RNA total foi quantificado utilizando espectrofotômetro de microplaca (Eon, Biotek, USA) e as amostras utilizadas apresentaram razão 260/280nm maior que 1.7. A integridade foi

averiguada visualmente em gel de agarose 1% corado com 25µL brometo de etídio 0,1% utilizando tampão TAE 1x (Ácido acético glacial 20mM, Tris 40mM, EDTA 1mM) onde foi possível observar a presença das bandas ribossomais 28S e 18S. As condições da corrida foram 300mA, 90V por aproximadamente 20 minutos.

8.2.2 - Confeção do cDNA

A reação foi feita a partir de 1µg de RNA total, oligo(dT)₂₀ 50µM, 10mM (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,1M de DTT (250mM Tris-HCl pH 8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 40U RNase OUT (20mM Tris-HCl pH 8,0, 50mM KCl, 0,5mM EDTA, 8mM DTT, 50% (v/v) glicerol) e 200U da enzima SuperScriptIII[®] (Invitrogen, São Paulo, Brasil) em um volume final de 20µL (10µL de RNA + 10µL MIX). Foi utilizado oligo(dT)₂₀ como iniciador ou *primer* (Exxtend, Paulinia, Brasil). Para a reação de transcrição reversa o RNA foi aquecido a 65°C durante 5 minutos e em seguida mantido a 4°C até que o Mix fosse adicionado. Em seguida, a mistura foi aquecida a 50°C durante 60 minutos. Ao término desse prazo a mistura foi aquecida a 70 °C por mais 15 minutos.

8.2.3 - Parâmetros da reação de PCR em tempo real

Todas as reações foram feitas no StepOne (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil) utilizando SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil). Foi adotado protocolo sem etapa de extensão (95°C por 10 minutos, 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos por 40ciclos) sendo a captação da fluorescência feita na temperatura de 60°C. Foi feita uma curva de diluição em 5 concentrações (50ng, 25ng, 12,5ng, 6,25ng e 3,125ng) para cada gene analisado sendo as amostras pipetadas em triplicata. A eficiência da reação foi analisada pelo programa StepOne v. 2.3 (Applied Biosystems) e foi aceito um coeficiente de correlação mínimo de 0,97 e eficiência de reação entre 94% e 98%. Em todas as reações foi feito um controle negativo sem amostra (NTC) e o volume da reação era de 20µL (1µL de amostra + 19 µL SYBR[®], iniciadores específicos 10µM e H₂O). Para as reações de PCR em tempo real exploratórias, as amostras foram pipetadas em duplicata e a concentração escolhida foi de 12,5ng de acordo com a melhor eficiência relativa e menor variabilidade entre as replicas.

8.2.4 - Desenho dos iniciadores (*primers*)

Os iniciadores dos genes constitutivos foram desenhados previamente (BIBANCOS *et al.*, 2007).

Os iniciadores para o gene do *crhr1* foi obtido da base de dados PrimerBank (SPANDIDOS *et al.*, 2010; <http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html>; acessado em 15 de abril de 2013; PrimerBank ID 6681013a1)

As sequencias dos genes estão mostradas na tabela 10.

8.2.5 - Análise Quantitativa Relativa

Foram utilizados 2 genes constitutivos ou de referência (*Cyclo* – peptidilprolil isomerase A ou *Ppia* e *Hprt* – hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) para normalizar os níveis de mRNA ou transcritos do gene de interesse (*Crhr1* – corticotropin releasing hormone receptor variant). Os ciclos limite ou *cycling quantification* (Cq) foram colocados em uma planilha e a quantidade relativa dos transcritos foi calculada conforme VANDESOMPELE *et al.*, (2002). Segundo esse cálculo, a média aritmética das réplicas é transformada em quantidade relativa da amostra considerando a eficiência da curva de diluição para cada gene. A amostra com o menor Cq é considerada como o valor máximo (igual a 1) e é tida como referência para o cálculo das quantidades relativas das demais amostras. Após, essas quantidades relativas foram normalizadas dividindo-as pela média geométrica dos 3 genes de referência (fator de normalização).

Gene	5'– Sequência – 3'	NM
<i>Crhr1</i>		008084.2
Senso	5'– GGAACCTCATCTCGGCTTTCA – 3'	
Antisenso	5'– GTTACGTGGAAGTAGTTGTAGGC – 3'	
<i>Cyclo</i>		008907.1
Senso	5'– AATGCTGGACCAAACACAAA – 3'	
Antisenso	5'– CCTTCTTTCACCTTCCCAA – 3'	
<i>Htr2c</i>		008312.3
Senso	5'– TGGAAGCCACAGGAATGAC – 3'	
Antisenso	5'– GGGTGCTGGTCTCATAGGTC – 3'	

Tabela 10 – Sequência dos iniciadores para os genes de referência, *cyclo peptidilprolil isomerase A* ou *Ppia* e) e de interesse (*Crhr1*).

9 – RESULTADOS DO ESTUDO 2

9.1 - Análise comportamental

Após a classificação individual os animais foram agrupados também em grupos A (n=10), H (n=10) e L (n=23) 17 animais não se enquadraram em nenhuma classificação e foram excluídos. A ANOVA de duas vias tendo consumo (g/kg/dia) como variável dependente e os diferentes grupos e as diferentes fases como fatores independentes revelou um efeito para Grupo ($F_{2,80} = 60.11$ $p < 0.01$), Fase ($F_{2,80} = 14.37$ $p < 0.01$) e para a interação entre esses fatores ($F_{4,80} = 12.87$, $p < 0.01$) e as diferenças entre grupos/fases podem ser vistas na figura 13.

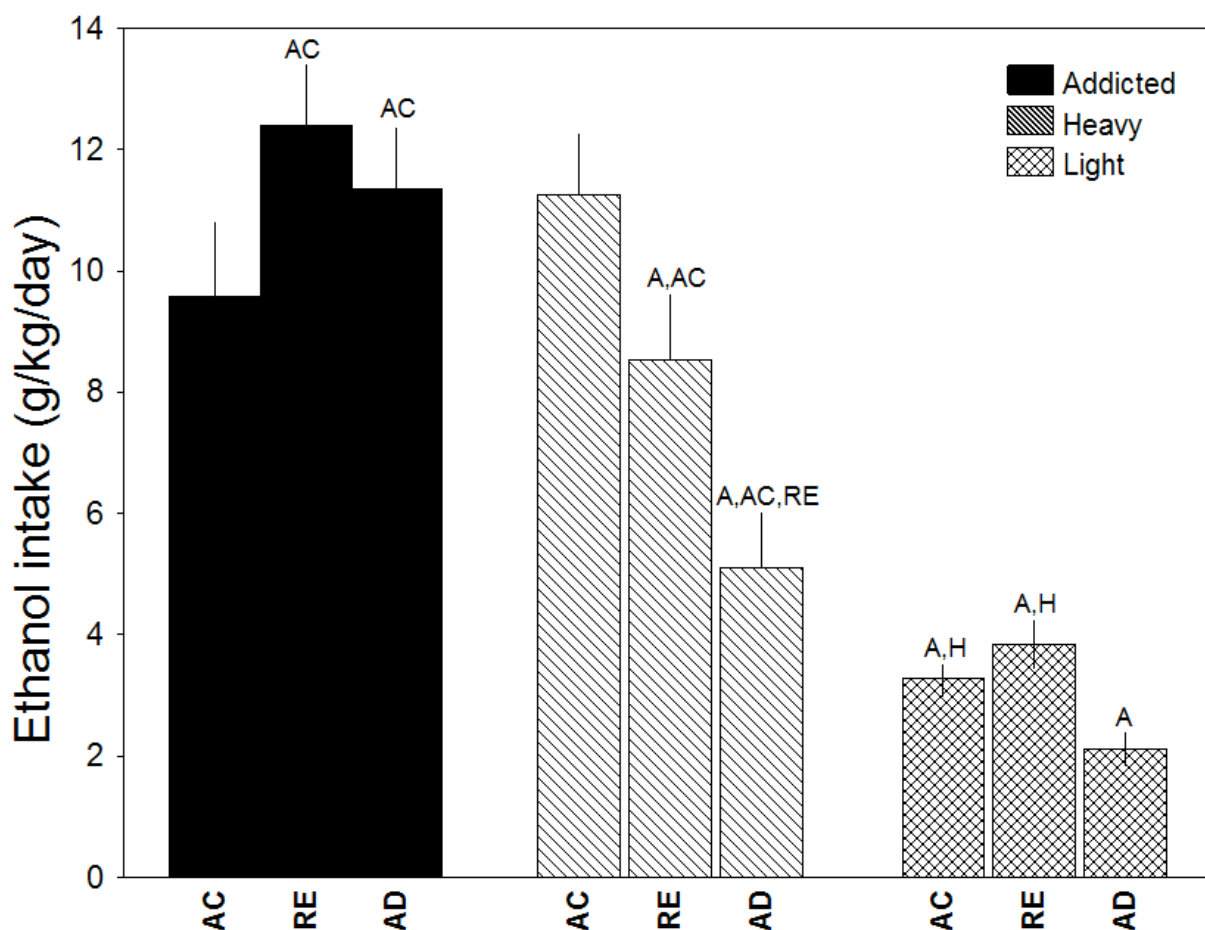


Figura 13 - Consumo de etanol nas diferentes fases do modelo de adição. Dados expressos como média \pm erro padrão do consumo de etanol em g/kg/dia. Consumo de etanol nos grupo A, H e L durante as fases experimentais do modelo (AC: fase de aquisição RE: fase de reapresentação AD: fase de adulteração). Diferenças estatísticas: AC diferente da aquisição para o mesmo grupo RE diferente da reapresentação para o mesmo grupo AD diferente da adulteração para o mesmo grupo A diferente do grupo adicto para a mesma fase H diferente do grupo pesado para a mesma fase. ANOVA de duas vias seguida do teste de post hoc de Newman-Keuls, $p < 0.05$.

O consumo em média \pm desvio padrão (g/kg/dia) para os diferentes grupos nas diferentes fases foi: grupo A teve em o consumo de 9.6 ± 3.8 na fase AC, 12.4 ± 3.2 na fase RE e 11.3 ± 3.4 na fase AD. O grupo H teve o consumo de 11.2 ± 3.3 na fase AC, 8.5 ± 3.7 na fase RE e 5.1 ± 3.0 na fase AD. O grupo L teve o consumo de 3.30 ± 3.0 na fase AQ, 3.84 ± 1.9 na fase RE e 2.13 ± 1.23 na fase AD.

9.2 - Análise do transcrito

Para a análise foram usadas 5 amostras para o grupo C, 8 para o grupo A, 6 para o grupo H e 7 para o grupo L. Essas amostras foram escolhidas com base na qualidade dos transcritos.

As curvas de dissociação (*melting*) foram analisadas e houve a presença apenas de um pico, indicando que não houve, por exemplo, dimerização de iniciadores.

As curvas de eficiência foram analisadas e os parâmetros considerados para cada gene estão na tabela 11. O limiar para todas as reações, incluindo as curvas, foi mantido em 1.124893.

Gene	Slope	R ²	Eficiência
Hprt	-3,38	0,99	97%
Cyclo	-3,46	0,99	94%
Crhr1	-3,36	0,99	98%

Tabela 11 – Parâmetros obtidos nas reações de PCR em tempo real.

Como os dados não apresentaram distribuição normal foi usada ANOVA não paramétrica de Kruskal-Wallis que mostrou um efeito para o grupo na quantidade de transcrito para o receptor CRF₁ ($H_{3,26} = 7.54$, $p < 0.05$). A comparação múltipla entre os grupos revelou uma maior quantidade do transcrito para o grupo H em relação ao grupo C (Figura 14).

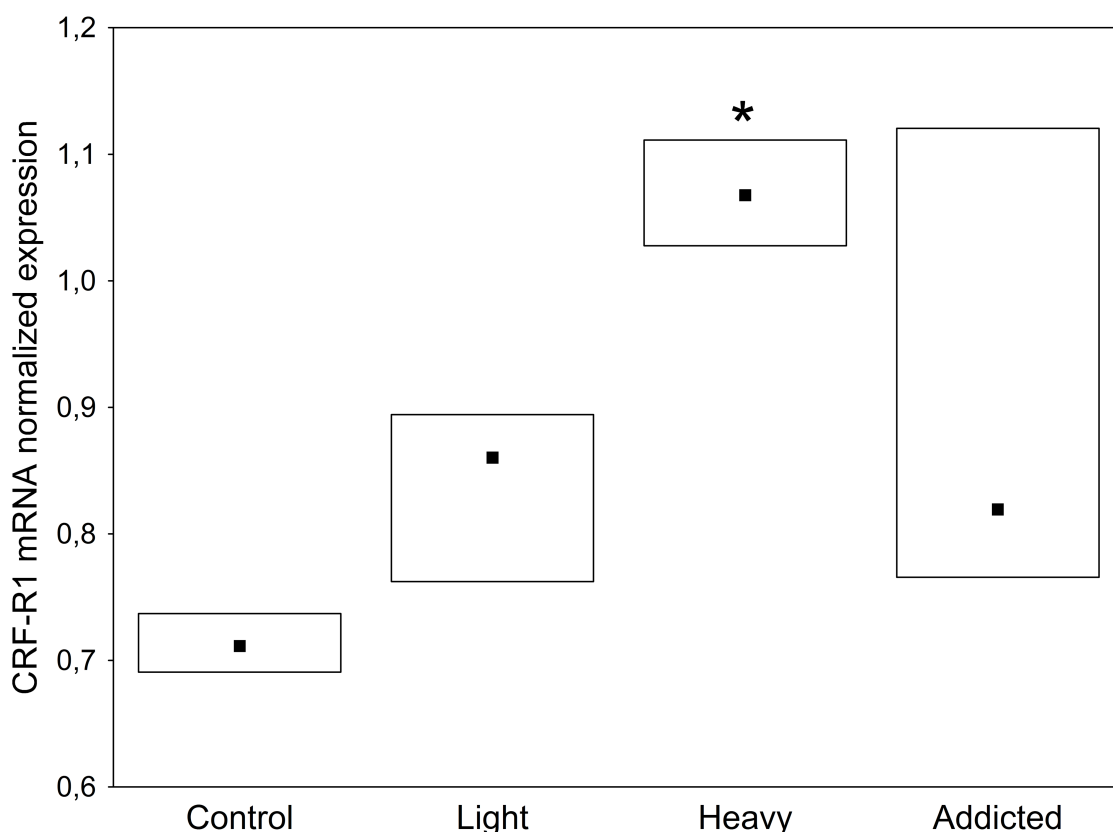


Figura 14- Quantidade normalizada de mRNA para o receptor de CRF₁ em animais com diferentes padrões de consumo e controle, sem exposição ao etanol. Dados expressos como mediana (intervalo interquartil) dos transcritos normalizados para cada grupo * p<0.05 em relação ao controle (ANOVA de Kruskal-Wallis seguida do teste de múltiplas comparações) C, controles; L, bebedores leves; H, bebedores pesados; A, bebedores adictos.

10 – DISCUSSÃO DO ESTUDO 2

Apenas animais com o perfil H tiveram um aumento no transcrito do receptor de CRF₁ na amígdala. É importante salientar que, ao contrário da maioria das evidências presentes na literatura, esses animais não estavam em abstinência de etanol no momento do sacrifício, visto que as soluções de etanol estavam disponíveis para seu consumo até o momento da eutanásia. Esse aumento no receptor do CRF pode indicar um aumento no sistema CRF e conseqüentemente um aumento no sistema descrito como anti-estresse, como previsto pela teoria da alostase hedônica.

Sommer *et al.*, (2008) mostraram que ratos expostos ao vapor de etanol por sete semanas e depois deixados em abstinência por três semanas tinham níveis

aumentados de mRNA de CRF no núcleo central da amígdala e níveis aumentados de mRNA do receptor CRF₁ nos núcleos basolateral e medial da amígdala.

Roberto *et al.*, (2010a) mostraram a importância da transmissão gabaérgica e sua modulação via CRF no núcleo central da amígdala. Em animais *naive* tanto o CRF quanto o etanol aumentam a transmissão gabaérgica via aumento na liberação do GABA. O antagonista de CRF₁ aboliu os efeitos do etanol. Os animais dependentes (vaporização de etanol) tiveram sensibilidade aumentada ao CRF e ao antagonista de CRF₁. A injeção intra núcleo central da amígdala de um antagonista do CRF₁ reverteu os aumentos de GABA no dialisado causados pela dependência. Ainda foi demonstrado aumento de CRF e do receptor CRF₁ no núcleo central da amígdala de ratos dependentes. A injeção sistêmica do antagonista de CRF₁ bloqueou o aumento induzido pela dependência na autoadministração de etanol. Esses resultados mostram a importância do CRF no núcleo central da amígdala no desenvolvimento de dependência.

Mas por que em animais com perda de controle essa diferença não aparece de forma tão significativa, sendo que eles também consomem grande quantidade de etanol? Uma hipótese seria considerar o “beber pesadamente” como uma fase anterior ao “beber dependente” e as neuroadaptações relacionadas ocorreriam sucessiva e progressivamente. Assim, quando a dependência (adição), caracterizada pela perda do controle, fosse instalada, diferentes neuroadaptações estariam presentes. Outra hipótese seria considerar que os animais adictos (grupo A) são diferentes dos bebedores pesados (grupo H) previamente à exposição ao modelo e sofreriam neuroadaptações diferentes e conseqüentemente apresentariam comportamento diferente. Essa questão é difícil de ser respondida com base nos nossos dados, e também porque existem pouquíssimos trabalhos na literatura que exploram o comportamento de perda de controle, aqui acessado pela manutenção do consumo quando há adulteração do etanol com quinino.

ESTUDO 3 –ESTUDOS ELETROFISIOLÓGICOS NO NÚCLEO CENTRAL DA AMIGDALA EM RATOS NAIVE E EXPOSTOS CRONICAMENTE AO ETANOL

Estudo realizado durante “doutorado sanduiche” (CAPES) com duração de nove meses (dezembro 2011 – agosto 2012) no laboratório da Dra Marisa Roberto e do Dr George Siggins no *Committee on the Neurobiology of Addictive Disorders* do *Scripps Research Institute*, La Jolla, Califórnia, EUA.

11 – OBJETIVOS DO ESTUDO 3

- Avaliação dos efeitos do etanol em animais *naive* e expostos cronicamente a vaporização intermitente (14 horas/dia) de etanol por cinco semanas sobre potenciais excitatórios pós sinápticos em neurônios da amígdala central.
- Avaliação dos efeitos do antagonista do receptor de CRF₁ (R121919) em animais *naive* sobre potenciais excitatórios pós sinápticos em neurônios da amígdala central e sua interação com o etanol.

12 - MATERIAL E MÉTODOS DO ESTUDO 3

12.1 - Animais e obtenção dos cortes encefálicos

Foram utilizados ratos Sprague-Dawley *naive* (machos, 150–200g). Os animais foram anestesiados com Isoflurano e decapitados. Cortes coronais com 400 micrometros de espessura foram obtidos com um Vibrátomo (Leica). Os cortes foram continuamente perfundidos (2 – 4 mL/min) com líquido cérebro espinal artificial gaseificado e morno (aCSF -32°C), com a seguinte composição em mmol/L: NaCl, 130; KCl, 3.5; NaH₂PO₄, 1.25; MgSO₄·7H₂O, 1.5; CaCl₂, 2.0; NaHCO₃, 24; glucose, 10.

12.2 - Câmara de vaporização intermitente de etanol

Ratos machos Sprague-Dawley foram mantidos em caixas com 2-4 animais com ciclo claro-escuro de 12 horas e água e comida à vontade. Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos e colocados nas câmaras de vaporização intermitente de etanol (CIET) ou câmaras apenas com ar. No grupo tratado com etanol os animais foram mantidos nas câmaras por pelo menos 5 semanas e recebiam vapor de etanol por 14 horas por dia. Os animais chamados *sham* foram mantidos nas câmaras apenas com ar, e os chamados *naive* eram mantidos em condições normais de biotério. Os animais *naive* eram usados nos estudos agudos, enquanto os animais *sham* eram o controle dos animais expostos a CIET. No dia dos experimentos os animais CIET eram mantidos na câmara de vaporização até a hora da eutanásia. O registro era feito de 2-8 horas após a eutanásia. A concentração plasmática de etanol (BEC) dos animais CIET era determinada três vezes por semana a partir de amostra de sangue retiradas da cauda dos animais. Os animais *sham* também eram sangrados. Quando necessário, a concentração de etanol era ajustada para manter o BEC entre 150–200 mg/dL.

12.3 - Obtenção do neurônio e registros eletrofisiológicos

Após uma hora de incubação, se iniciava a procura por um neurônio. O eletrodo de registro (resistência de 60 a 100 M Ω – preenchidos com KCl 3M) era baixado em passos de 2 micrometros sobre a região da amígdala central. Para facilitar a identificação do neurônio era feita a injeção de um pulso de 10 a 20pA. Quando se atingia o neurônio e o mesmo se encontrava estável, era acrescentado

ao aCSF os bloqueadores de receptores gabaérgicos GABA-B (CGP 55845A; 1 μ M, Novartis) e GABAA (bicuculina - 30 μ M, Sigma, Baltimore USA), para o estudo do componente não NMDA era também adicionado o antagonista de NMDA DL-2-amino-5-fosfonovalerato (APV; 30 μ M, Tocris, Holloway Road USA). Para se confirmar a origem AMPA da corrente era adicionado o antagonista AMPA 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX; 10 μ M, Tocris, Holloway Road USA) ao final do experimento, esse antagonista deveria bloquear completamente a resposta.

Após dez minutos eram iniciados os registros basais do neurônio. As drogas eram adicionadas ao aCSF a fim de se obter concentrações conhecidas no aCSF e os cortes eram expostos por pelo menos 12 minutos às diferentes drogas. O *washout* era de 30 minutos. Foram utilizados etanol (44 mM, Remet, La Mirada USA), CRF (50, 100 e 200 nM, sintetizados e doados pelo *Salk Institute*), R121919 (antagonista do receptor CRF₁, 1 μ M, 3-[6-(dimethylamino)-4-methyl-pyrid-3-yl]-2,5-dimethyl-N,N-dipropyl-pyrazolo[2,3-a]pyrimidin-7-amine, Janssen Pharmaceuticals Beerse, Belgium).

Todos os neurônios foram registrados utilizando-se *current clamp* e mantidos próximos a seu potencial de membrana de repouso (aproximadamente -80mV). Os dados eram coletados com um pré-amplificador Axoclamp-2A (Axon Instruments) e armazenados para análise posterior com o software pClamp (Axon Instruments).

Os potenciais excitatórios pós sinápticos (EPSP) eram obtidos através da estimulação com um eletrodo bipolar, colocado sobre a amígdala central. A posição dos eletrodos pode ser vista na figura 15.

Eram realizadas curvas corrente/voltagem (*i/v*) cuja finalidade era analisar a integridade da membrana, através do cálculo da resistência da membrana, bem como caracterização da resposta do neurônio (potenciais de ação no início, no final ou durante toda a estimulação). Nessa configuração, correntes de diferentes intensidades e polaridades são aplicadas pelo eletrodo de registro e a resposta da célula é registrada. Um exemplo de resposta está representado na figura 16.

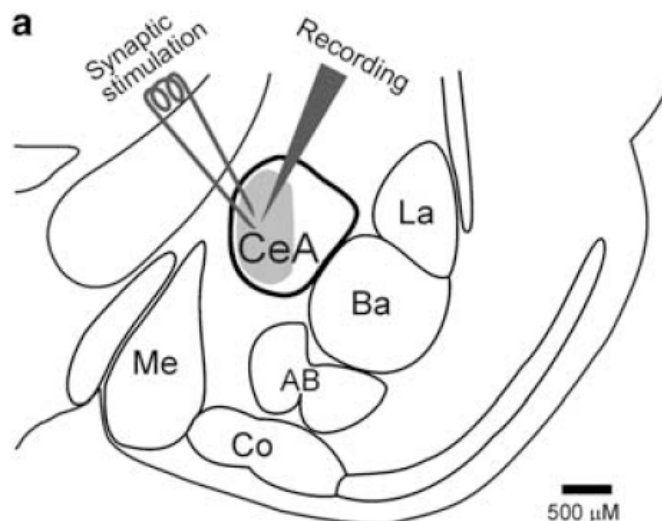


Figura 15 - Local onde eram colocados os eletrodos estimulador e de registro no núcleo central da amígdala. FONTE: ROBERTO *et al.*, 2010b.

Para se determinar os parâmetros de resposta para cada célula, era feito um protocolo de *input-output* (curva *i/o*) que consistia num espectro de correntes estimulatórias, num total de cinco intensidades, que iniciava na estimulação mínima limite para se obter uma resposta e ia até a estimulação que se obtinha a amplitude máxima antes do potencial de ação. Os valores utilizados para a análise do efeito das drogas sobre o EPSP eram os três intermediários. O estímulo que levava a uma resposta de 50% da célula era escolhido para realização do *i/o* longo e da facilitação pulso pareada. Esse valor era o escolhido por permitir a visualização de diminuição e ou aumento na resposta. A estabilidade dos EPSP era observada por 15 minutos antes do início dos experimentos. O *i/o* longo consistia na aplicação da corrente que levava a uma amplitude de 50%, sendo um pulso a cada 30 segundos. Um exemplo de curva esta representado na figura 17.

A facilitação pulso-pareada (PPF) é um fenômeno onde uma segunda resposta sináptica é aumentada pela presença de uma estimulação anterior de igual intensidade. Foram usados intervalos de 50 e 100 milissegundos. A razão era calculada pela divisão da amplitude do segundo EPSP pelo primeiro EPSP. Variações nessa razão podem ser usadas como indicativo de atuação pré ou pós sináptica. Mudanças no PPF são inversamente relacionadas a liberação de neurotransmissor, de modo que reduções no PPF são associadas com aumento na probabilidade de liberação do neurotransmissor (DEBANNE *et al.*, 1996)

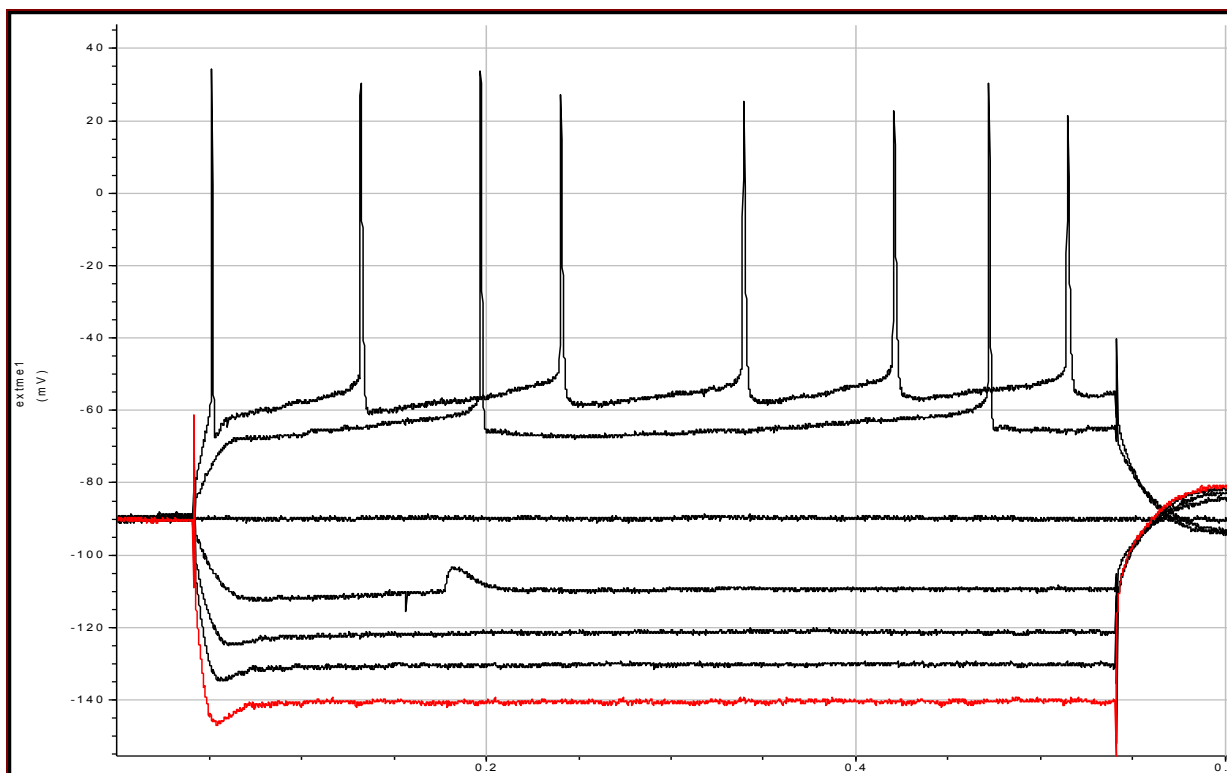


Figura 16 - Exemplo de curva i/v (corrente/voltagem). Podem ser observados os diferentes potenciais de membrana do neurônio (eixo Y, mV; eixo X, tempo, msec) em resposta a injeção de correntes tanto positivas quanto negativas pelo eletrodo de registro. Nas estimulações positivas existe a presença de potenciais de ação.

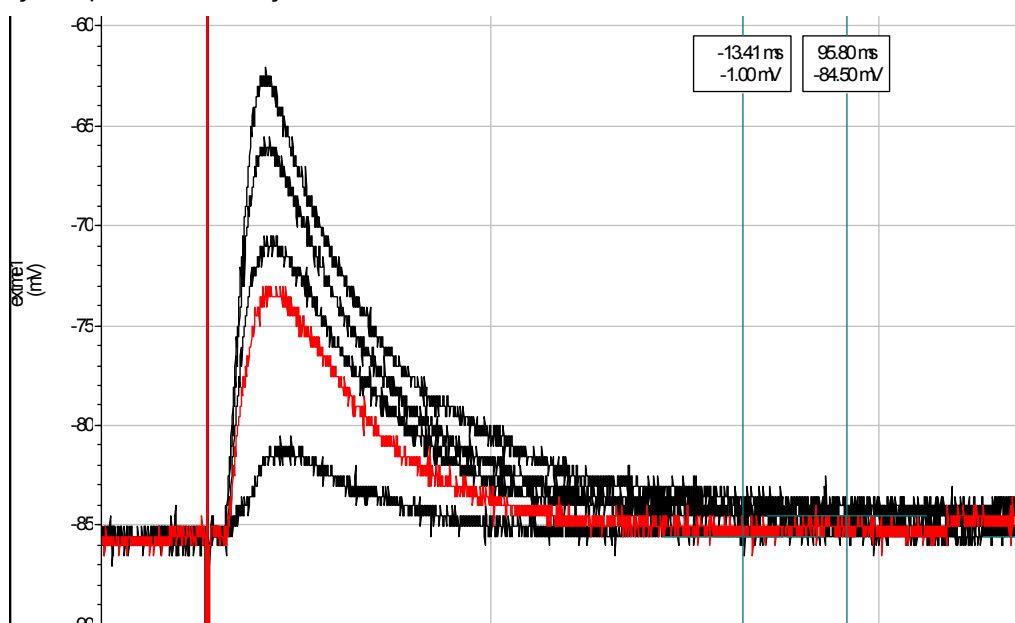


Figura 17 - Exemplo de curva i/o (input/output). Podem ser observados os diferentes potenciais de membrana do neurônio (eixo Y, mV; eixo X, tempo, msec) em resposta a injeção de cinco correntes de diferentes intensidades pelo eletrodo estimulador.

12.4 - Análise estatística

Os valores foram expresso em média \pm erro ou desvio padrão. Quando da presença de dois grupos foi usado o teste t de Student (pareado ou não pareado) e na existência de 3 ou mais grupos foi usada a ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguida do teste post hoc Newman-Keuls. Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0.05$.

13 – RESULTADOS DO ESTUDO 3

A estimulação local dentro da CeA evocou respostas pós-sinápticas constituídas de EPSP glutamatérgicas. O estímulo não produziu respostas com componentes adicionais como glicinérgico, nicotínico ou GABA-C. O Etanol (44 mM) infundido por 7-10 min diminuiu os EPSP evocados na CeA de ratos naive (figura 18). Não foi observada diferença no potencial de membrana basal, na resistência da membrana ou na amplitude do potencial de ação após a aplicação do etanol.

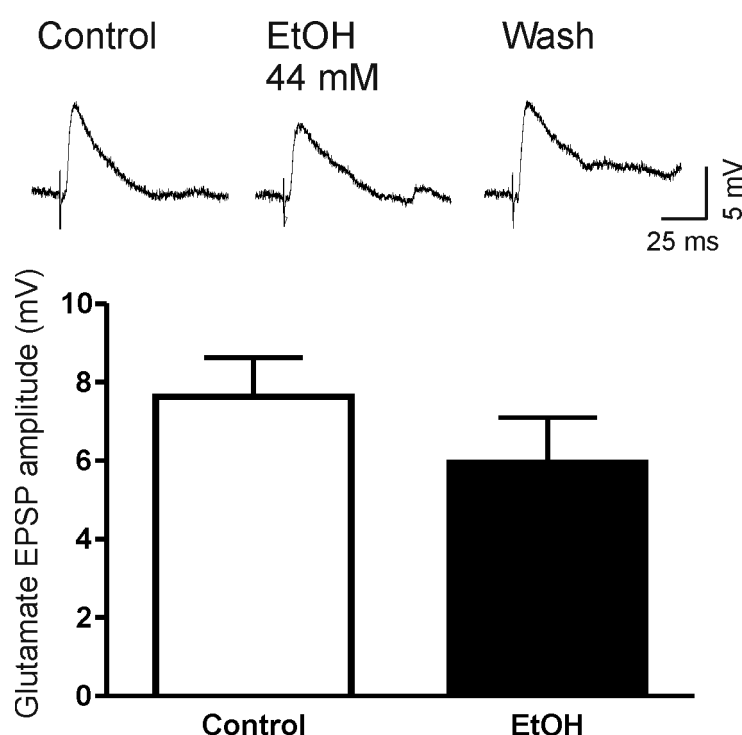


Figura 18- Amplitude dos EPSPs após a aplicação de etanol (44mM) Está representado média \pm erro padrão das amplitudes antes (controle) e durante a presença do etanol.

Esse efeito do etanol parece ser mediado principalmente pela ação em receptores não NMDA, pois o bloqueio do receptor NMDA com AP-5 não altera a

resposta, porém a adição do antagonista não-NMDA, DNQX, bloqueia totalmente a presença de EPSPs. Valores na tabela 12.

A n=5				
	Média (mV)	DP	% basal	DP
Basal	5.56	0.52		
Etanol	4.35	0.50	76.89	5.36
Washout	4.50	0.56	81.41	7.38

B Longo i/o		
n=5	% basal	DP
Etanol	84.83	5.64
Washout	84.57	3.11

Tabela 12 – Componente não NMDA da resposta ao etanol. Amplitude média dos EPSPs das 3 intensidades intermediárias da curva i/o antes, durante e após a aplicação do etanol em valores absolutos e relativos ao basal (A) e em valores relativos ao basal dos EPSPs obtidos no i/o longo (B). Após o bloqueio do componente não NMDA, sendo que o NMDA já estava bloqueado, o EPSP é reduzido a zero (valores não mostrados). DP: desvio padrão.

O efeito de redução sobre os EPSPs se manteve nos animais CEIT (Naive $t_{11}=10.10$ $p<0.01$; CEIT $t_6=7.4$ $p<0.05$; figura 19) e nos animais CIET foi acrescido de uma diferença na razão do PPF ($F(2,6)=9.4$ $P<0.05$; figura 20)

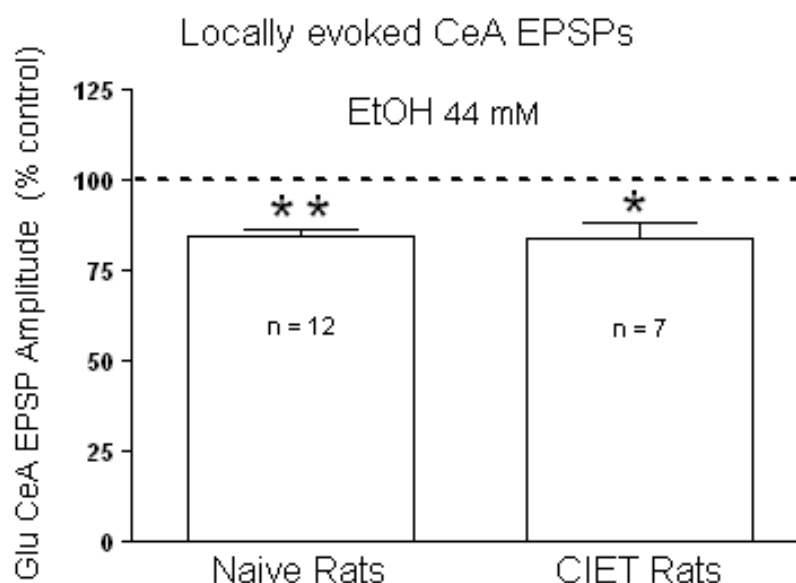


Figura 19 - Amplitude relativa ao basal durante o i/o longo dos EPSP após a aplicação de etanol (44mM) em animais *naive* e submetidos ao procedimento de CIET. Esta sendo representado por média \pm erro padrão dos EPSPs normalizados tendo o valor basal como 100%. Foi observada redução em ambos os grupos *naive* e CIET (exposição crônica e intermitente ao vapor de etanol) (* $p < 0.01$ e ** $p < 0.001$).

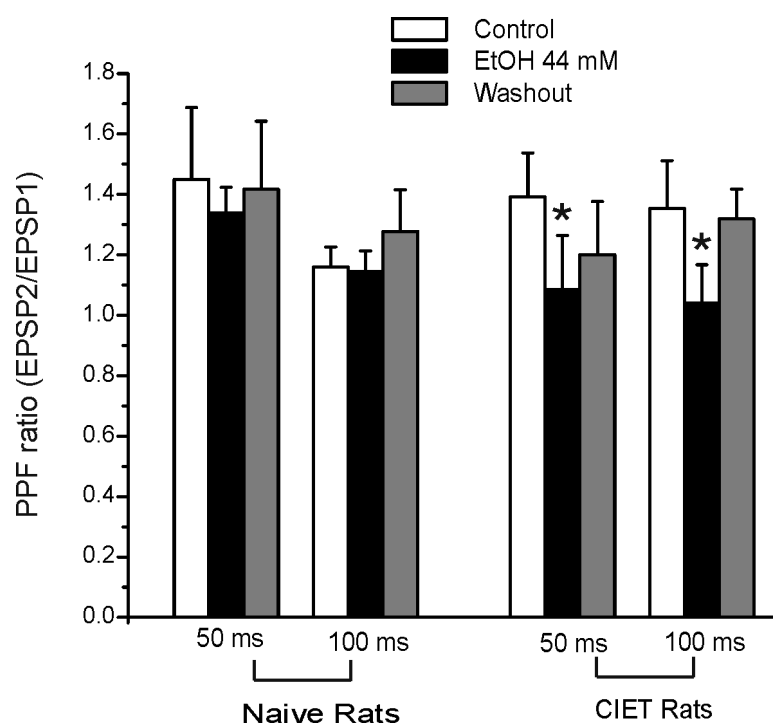


Figura 20 - PPF após perfusão de etanol em animais *naive* e expostos a CEIT. Esta representada a média \pm erro padrão da razão entre os EPSP antes, durante e após a perfusão de etanol 44 mM. A diminuição nos EPSPs evocados causada pelo etanol é acompanhada de redução no PPF apenas nos animais submetidos à CIET. (* $p < 0.01$).

O CRF infundido por 7-10 min diminuiu, nas duas maiores concentrações, os EPSP evocados na CeA de ratos naive ($F(3,19)=12.01$ $p<0.05$, figura 21). Não foi observada diferença no potencial de membrana basal, na resistência da membrana ou na amplitude do potencial de ação após a aplicação do CRF. Não foi observada diferença no PPF desses registros (figura 22).

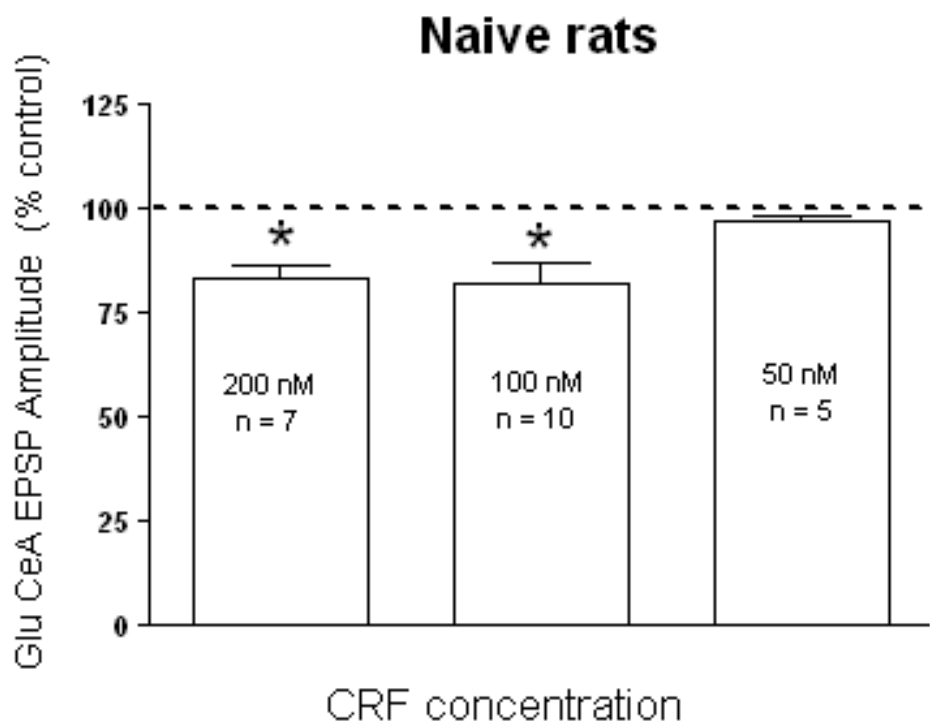


Figura 21 - Amplitude relativa ao basal durante o i/o longo dos EPSP após a aplicação de CRF em diferentes concentrações. Esta sendo representado por média \pm erro padrão dos EPSPs normalizados tendo o valor basal como 100%. Foi observada redução apenas nas concentrações de 100 e 200 nM (* $p<0.01$).

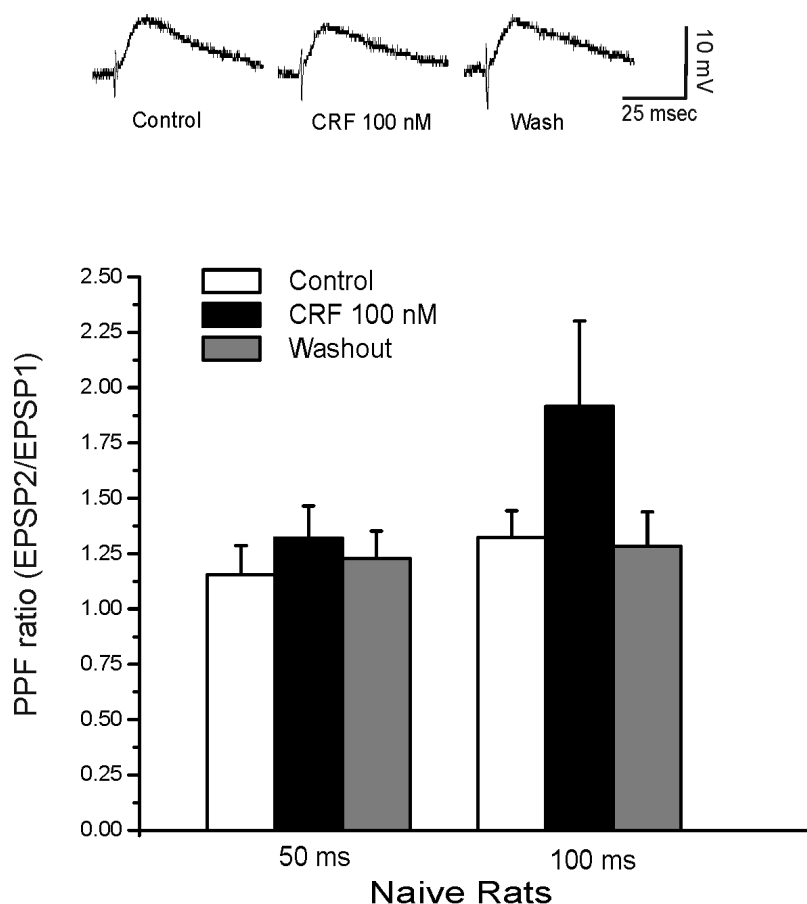


Figura 22-PPF após infusão de CRF em animais naive. Está representada a média \pm erro padrão da razão entre os EPSP antes, durante e após a perfusão de CRF 100nM. A diminuição nos EPSPs evocados causada pelo CRF não é acompanhado de variação no PPF em animais naive (para 50 milissegundos $F(2,8)=2,25$; para 100 milissegundos $F(2,8)=0,51$, $p>0.05$).

Da mesma forma como para o etanol esse efeito parece ser mediado principalmente por receptores não NMDA, pois o bloqueio do receptor NMDA com AP-5 não altera a resposta, como visto na tabela 13, porém a adição do antagonista não-NMDA, DNQX, bloqueia totalmente a presença de EPSPs (tabela 12).

A adição prévia do antagonista de CRF_1 (R121919, 1 μ M) reduz os EPSPs mas não bloqueia a redução nos EPSP induzidas pelo etanol ($F(2,12)=10.04$ $p<0.01$) Figura 23.

A n=6	Média (mV)	DP	% basal	DP
Basal	7.20	0.81		
CRF	6.24	0.85	90.99	8.01
Washout	6.03	0.88	85.46	7.98

B Longo i/o	% basal	DP
n=6	Média	
CRF	89.27	5.61
Washout	99.49	11.06

Tabela 13 -Componente não NMDA da resposta ao CRF. Amplitude média dos EPSPs das 3 intensidades intermediárias da curva i/o antes, durante e após a aplicação do CRF em valores absolutos e relativos ao basal (A) e em valores relativos ao basal dos EPSPs obtidos no i/o longo (B). DP: desvio padrão

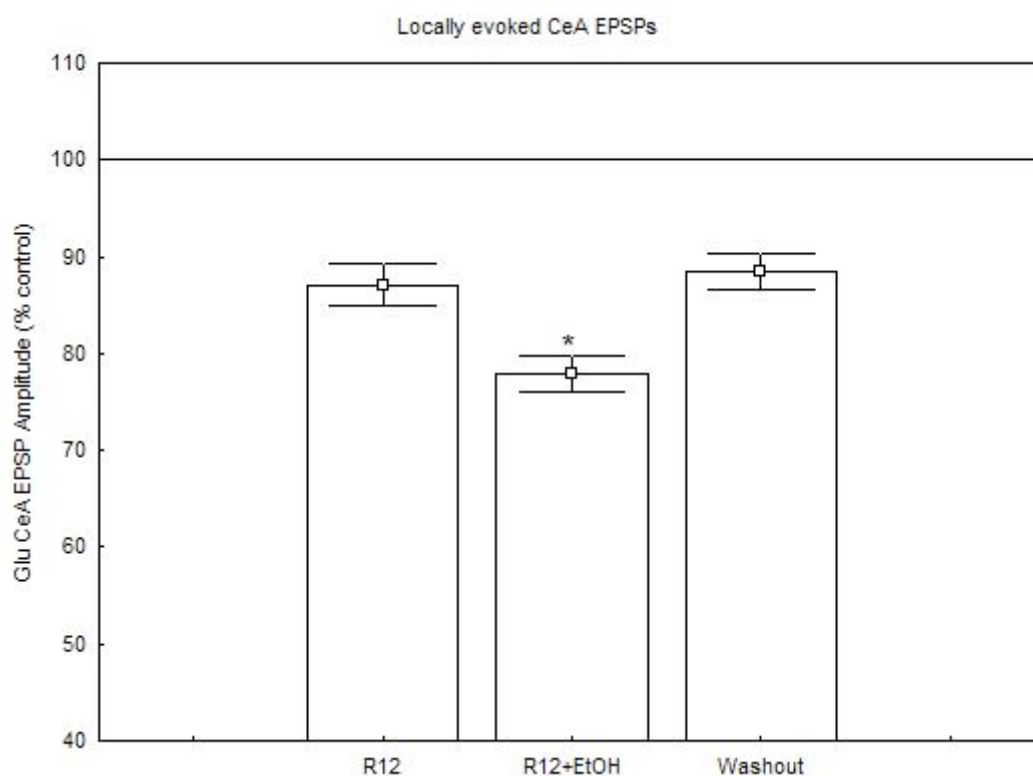


Figura 23 – Interação do antagonista de CRF₁ e do etanol sobre os EPSPs. Está sendo representado por média ± erro padrão dos EPSPs normalizados tendo o valor basal como 100%. A aplicação do antagonista de CRF₁ (R12) não bloqueia a redução causada pelo etanol no EPSPs.

Nem o R121919 nem o etanol alteraram os PPFs (intervalo de 50 milissegundos $F(3,18)=0,75$; intervalo de 100 milissegundos $F(3,18)=1,78$ $p<0.05$). Valores na tabela 14.

PPF	n=8 Razão - 50ms	DP	n=8 Razão - 100ms	DP
Basal	1.38	0.11	1.27	0.07
R12	1.85	0.21	1.53	0.22
R12+etanol	1.67	0.28	1.49	0.07
Washout	1.68	0.22	1.52	0.22

Tabela 14 – PPF antes e durante a aplicação de R121919, etanol e durante washout. Não foi observada diferença estatística nos valores.

14 – DISCUSSÃO DO ESTUDO 3

Os resultados anteriores encontrados por ROBERTO *et al.*, (2003,2004) foram reproduzidos parcialmente nesse estudo mostrando que mesmo após o procedimento de CIET, que difere do procedimento de vaporização anterior tanto pelo período de exposição mais longo (5 semanas) como pelo fato de ser intermitente, não altera as respostas eletrofisiológicas induzidas pelo etanol em neurônios da CeA. Apesar de relatos na literatura (SAH e ARMENTIA, 2003) dizendo que as conexões glutamatérgicas no núcleo central da amígdala tem dois componentes, AMPA e NMDA, no nosso estudo o principal componente da resposta é não-NMDA, já que o seu antagonismo bloqueia totalmente a resposta. Já foi demonstrado por Roberto *et al.*, (2003,2004) que o componente NMDA da resposta passa a ter importância após a exposição crônica ao etanol. O principal motivo dessa diferença é provavelmente a região de estimulação que no estudo de SAH e ARMENTIA foram os núcleos lateral e basolateral da amígdala (conexões intra amígdala) e no nosso estudo foi o próprio núcleo central da amígdala (principalmente conexões aferentes do tronco encefálico) o que levaria ao estímulo de diferentes fibras glutamatérgicas, com diferentes componentes na sua resposta.

As alterações no PPF apareceram somente após o procedimento de vaporização, sugerindo um aumento na liberação de glutamato (DEBANNE *et al.*, 1996) nos animais expostos cronicamente ao etanol.

O CRF agudamente nas concentrações de 100 e 200 nM mostrou que também reduz os EPSPs na CeA e isso está em concordância com relatos de Liu *et al.*, (2004).

Um dos principais objetivos do estudo era saber se o receptor de CRF era necessário para as ações do etanol sobre o glutamato na amígdala central. Isso porque um antagonista de CRF₁ aplicado anteriormente ao etanol anula totalmente as suas ações sobre o GABA (NIE *et al.*, 2004). Foi observado um efeito interessante após a aplicação do antagonista CRF₁. O antagonista também reduziu a amplitude dos EPSPs. Liu *et al.*, (2004) também relataram esse efeito para os antagonistas de CRF₁ e 2, a astressin e para o antagonista CRF_{2a} astressin_{2B}. Quando usamos a astressin_{2B} e a astressin₂(outro antagonista CRF_{1e2}) esse efeito também foi observado (dados não mostrados). Porém nesse estudo quando foi usado o antagonista específico CRF₁ (NBI 27914, 100nM) foi observado aumento dos EPSPs, o contrário do observado com o uso do antagonista CP-154,526. Os autores hipotetizaram que o receptor CRF₁ seria responsável por um tônus negativo (por isso quando antagonizado leva a um aumento nos EPSPs) e o receptor CRF₂ seria responsável por um tônus positivo (por isso quando antagonizado leva a uma redução nos EPSPs). Uma possibilidade do porque dessa diferença de resultados seria a diferença na concentração de antagonista usada. Os autores usaram 100nM enquanto nós usamos a droga a 1µM, o que poderia levar a uma menor especificidade e o também antagonismo de receptores tipo 2, portanto o resultado seria semelhante ao do antagonista misto testado (astressin₂). Apesar dessa redução vista com o antagonista, o etanol diminuiu ainda mais os EPSPs, mostrando que o antagonista de CRF₁ não foi capaz de bloquear seus efeitos sobre o glutamato na CeA.

15 - CONCLUSÃO GERAL

Segundo o modelo alostático a dependência é vista como uma crescente desregulação dos sistemas de reforço / anti-reforço encefálicos que resultam em estado motivacional negativo que contribui para o uso compulsivo das drogas. O CRF teria papel chave nesse processo, fazendo parte do sistema de anti-reforço (estresse).

O CRF no modelo de livre escolha usado nesse trabalho se mostrou importante no consumo apenas de animais com alto consumo de etanol. Animais bebedores leves não sofreram alteração no consumo após a administração do antagonista CRF₁, reforçando a ideia do papel do CRF apenas no beber pesado.

Os níveis de transcrito para o receptor CRF₁ estavam aumentados apenas nos animais bebedores pesados, indicando que, apesar do CRF estar atuando em ambos grupos A e H, as neuroadaptações referentes a ele são diferentes. Se as adaptações são sequenciais (o animal bebedor pesado passa a ser adicto em algum momento) ou paralelas (o animal bebedor pesado não evolui para o quadro adicto) é uma questão intrigante que ainda precisa ser elucidada. O principal problema metodológico é: como monitorar essas adaptações nos animais de forma não invasiva o suficiente para não alterar o comportamento?

Quanto ao mecanismo de ação do CRF, seus antagonistas e do etanol no núcleo central da amígdala (importante centro modulador do consumo de etanol onde aplicações diretas das drogas que reduzem o consumo de etanol mimetizam os efeitos de injeções sistêmicas) o etanol parece não precisar do receptor CRF₁ para exercer suas ações sobre o sistema glutamatérgico, porém esse receptor é imprescindível para suas ações sobre o GABA nesse mesmo núcleo.

Frente a literatura e aos resultados aqui apresentados o antagonismo do CRF parece ser uma boa alternativa terapêutica para pacientes dependentes, com a ressalva que, para esses pacientes o afeto negativo/estresse deve ser um importante fator que leva, facilita, a ocorrência de recaídas. Isso reafirma a necessidade de diagnósticos diferenciados, enfrentando a dependência como uma doença multifatorial que se mostra de forma diferente para cada paciente. E isso deve se expandir aos testes clínicos para que uma possível eficácia medicamentosa não se perca por estar diluída em pacientes com um mesmo diagnóstico mas com quadros completamente diferentes.

16 - REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AHMED S.H.; KOOB G.F. Transition from moderate to excessive drug intake: change in hedonic set point. **Science**, v. 282, n. 5387, p. 298-300, 1998.

ALHEID G.F.; HEIMER L. New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. **Neuroscience**, v. 27, p. 1–39, 1988.

ALLEN C.D.; LEE S.; KOOB G.F.; RIVIER C. Immediate and prolonged effects of alcohol exposure on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in adult and adolescent rats. **Brain Behav Immun**, v. 25, Suppl 1:S50-60, 2011.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition, text revision**. American Psychiatric Press, Washington, DC, 2000.

BAJO M.; CRUZ M.T.; SIGGINS G.R.; MESSING R.; ROBERTO M. Protein kinase C epsilon mediation of CRF- and ethanol-induced GABA release in central amygdala. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 24, p. 8410-5, 2008.

BECKSTEAD M.J.; GANTZ S.C.; FORD C.P.; STENZEL-POORE M.P.; PHILLIPS P.E.; MARK G.P.; WILLIAMS J.T. CRF enhancement of GIRK channel-mediated transmission in dopamine neurons. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 8, p. 1926-35, 2009.

BIBANCOS T.; JARDIM D.L.; ANEAS I.; CHIAVEGATTO S. Social isolation and expression of serotonergic neurotransmission-related genes in several brain areas of male mice. **Genes Brain Behav**, v. 6, p. 529-39,2007.

BLACKTOP J.M.; SEUBERT C.; BAKER D.A.; FERDA N.; LEE G.; GRAF E.N.; MANTSCH J.R. Augmented cocaine seeking in response to stress or CRF delivered into the ventral tegmental area following long-access self-administration is mediated by CRF receptor type 1 but not CRF receptor type 2. **J Neurosci**, v. 31, n. 31, p. 11396-403,2011.

BLOMEYER D.; TREUTLEIN J.; ESSER G.; SCHMIDT M.H.; SCHUMANN G.; LAUCHT M. Interaction between CRHR1 gene and stressful life events predicts adolescent heavy alcohol use. **Biol Psychiatry**, v. 63, n. 2, p. 146-51, 2008.

BOERNGEN-LACERDA R.; SOUZA-FORMIGONI M.L.O. Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties? **Pharmacol Biochem Behav**, v. 67, p. 225-32,2000.

BOYSON C.O.; MIGUEL T.T.; QUADROS I.M.; DEBOLD J.F.; MICZEK K.A. Prevention of social stress-escalated cocaine self-administration by CRF-R1 antagonist in the rat VTA. **Psychopharmacology (Berl)**, v.218, n.1, p.257-69, 2011.

BRUIJNZEEL A.W.; PRADO M.; ISAAC S. Corticotropin-releasing factor-1 receptor activation mediates nicotine withdrawal-induced deficit in brain reward function and stress-induced relapse. **Biol Psychiatry**, v.66, n. 2, p. 110-7, 2009.

CARLINI, E.A.; GALDUROZ, J.C.F.; NOTO, A.R.; FONSECA, A.M.; CARLINI, C.M.; OLIVEIRA, L.G.; NAPPO, S.A.; MOURA, Y.G.; SANCHEZ, Z.V.D.M. **II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país – 2005**. Supervisão E.A.Carlini; Coordenação J.C.F. Galduróz; Brasília: Secretaria Nacional Antidrogas, 2007.

CARLINI E.L.A.; NOTO A.R.; SANCHEZ Z.M.; CARLINI C.L.A.; LOCATELLI D.P.; ABEID L.R.; AMATO T.C.; OPALEYE E.S.; TONDOWSKI C.S.; DE MOURA Y.G. **VI Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio das Redes Pública e Privada de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras – 2010** /São Paulo: CEBRID - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas: UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo 2010. SENAD - Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas, Brasília – SENAD, 2010.

CARTER M.; SHIEH J.C. **Guide to Research Techniques in Neuroscience**. 1ed Elsevier Inc, 2010.

CHESTER J.A.; de PAULA BARRENHA G.; DeMARIA A.; FINEGAN A. Different effects of stress on alcohol drinking behaviour in male and female mice selectively bred for high alcohol preference. **Alcohol Alcohol**, v.41, n.1, p.44-53, 2006.

CIPPITELLI A.; DAMADZIC R.; SINGLEY E.; THORSELL A.; CICCOCIOPPO R.; ESKAY R.L.; HEILIG M. Pharmacological blockade of corticotropin-releasing hormone receptor 1 (CRH1R) reduces voluntary consumption of high alcohol concentrations in non-dependent Wistar rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 100, n. 3, p. 522-9, 2012.

CORREIA D.; RIBEIRO A.F.; BRUNIALTI GODARD A.L.; BOERNGEN-LACERDA R. Trait anxiety and ethanol: anxiolysis in high-anxiety mice and no relation to intake behavior in an addiction model. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 5, p. 880-8, 2009.

CRIADO J.R.; LIU T.; EHLERS C.L.; MATHÉ A.A. Prolonged chronic ethanol exposure alters neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor levels in the brain of adult Wistar rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v.99, n.1, p.104-11, 2011.

CRUZ M.T.; BAJO M.; MARAGNOLI M.E.; TABAKOFF B.; SIGGINS G.R.; ROBERTO M. Type 7 Adenylyl Cyclase is Involved in the Ethanol and CRF Sensitivity of GABAergic Synapses in Mouse Central Amygdala. **Front Neurosci**, v. 4, p. 207, 2011.

DEBANNE D.; GUÉRINEAU N.C.; GÄHWILER B.H.; THOMPSON S.M. Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release. **J Physiol**, v. 491, p. 163-76, 1996.

DEROCHE-GAMONET V.; BELIN D.; PIAZZA P.V. Evidence for addiction-like behavior in the rat. **Science**, v. 305, p. 1014-7, 2004.

DUMONT E.C.; MARTINA M.; SAMSON R.D.; DROLET G.; PARÉ D. Physiological properties of central amygdala neurons: species differences. **Eur J Neurosci**, v. 15, n. 3, p. 545-52, 2002.

DYR W.; KOSTOWSKI W. Evidence that the amygdala is involved in the inhibitory effects of 5-HT₃ receptor antagonists on alcohol drinking in rats. **Alcohol**, v.12, n.4, p.387-91,1995.

FACHIN-SCHEIT D.J.; FROZINO RIBEIRO A.; PIGATTO G.; OLIVEIRA GOELDNER F.; BOERNGEN DE LACERDA R. Development of a mouse model of ethanol addiction: naltrexone efficacy in reducing consumption but not craving. **J Neural Transm**, v. 113, p. 1305-21,2006.

FAROOK J.M.; LEWIS B.; LITTLETON J.M.; BARRON S. Topiramate attenuates the stress-induced increase in alcohol consumption and preference in male C57BL/6J mice. **Physiol Behav**, v.96, n. 1, p.189-93, 2009.

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

FUNK C.K.; O'DELL L.E.; CRAWFORD E.F.; KOOB G.F. Corticotropin-releasing factor within the central nucleus of the amygdala mediates enhanced ethanol self-administration in withdrawn, ethanol-dependent rats. **J Neurosci**, v. 26, n. 44, p. 11324-32, 2006b.

FUNK C.K.; ZORRILLA E.P.; LEE M.J.; RICE K.C.; KOOB G.F. Corticotropin-releasing factor 1 antagonists selectively reduce ethanol self-administration in ethanol-dependent rats. **Biol Psychiatry**, v. 61, n. 1, p. 78-86, 2007a.

FUNK C.K.; KOOB G.F. A CRF(2) agonist administered into the central nucleus of the amygdala decreases ethanol self-administration in ethanol-dependent rats. **Brain Res**, v. 25, n. 1155, p. 172-8, 2007b.

GEHLERT D.R.; CIPPITELLI A.; THORSELL A.; LÊ A.D.; HIPSKIND P.A.; HAMDouchi C.; LU J.; HEMBRE E.J.; CRAMER J.; SONG M.; MCKINZIE D.; MORIN M.; CICCOCIOPPO R.; HEILIG M. 3-(4-Chloro-2-morpholin-4-yl-thiazol-5-yl)-8-(1-ethylpropyl)-2,6-dimethyl-imidazo[1,2-b]pyridazine: a novel brain-penetrant, orally available corticotropin-releasing factor receptor 1 antagonist with efficacy in animal models of alcoholism. **J Neurosci**, v. 27, n. 10, p. 2718-26, 2007.

GEORGE O.; GHOZLAND S.; AZAR M.R.; COTTONE P.; ZORRILLA E.P.; PARSONS L.H.; O'DELL L.E.; RICHARDSON H.N.; KOOB G.F. CRF1 system activation mediates withdrawal-induced increases in nicotine self-administration in nicotine-dependent rats. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 43, p. 17198-203, 2007.

GEORGE S.R.; FAN T.; ROLDAN L.; NARANJO C.A. Corticotropin-releasing factor is altered in brains of animals with high preference for ethanol. **Alcohol Clin Exp Res**, v.14, n.3, p.425-9,1990.

GILPIN N.W.; RICHARDSON H.N.; KOOB G.F. Effects of CRF1-receptor and opioid-receptor antagonists on dependence-induced increases in alcohol drinking by alcohol-preferring (P) rats. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 32, n. 9, p.1535-42, 2008.

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

GOUVEIA K.; HURST J.L. Reducing mouse anxiety during handling: effect of experience with handling tunnels. **Plos One**, v.20, n.8(6).

GRANT B.J.; STINSON F. S.; DAWSON D.A.; CHOU S.P.; DUFOUR M.C.;COMPTON W.; PICKERING R.P.; KAPLAN K. Prevalence and Co-occurrence of Substance Use Disorders and IndependentMood and Anxiety Disorders Results

From the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. **Arch Gen Psychiatry**, v.61, n. 8, p. 807-816, 2004.

GREENWELL T.N.; FUNK C.K.; COTTONE P.; RICHARDSON H.N.; CHEN S.A.; RICE K.C.; ZORRILLA E.P.; KOOB G.F. Corticotropin-releasing factor-1 receptor antagonists decrease heroin self-administration in long- but not short-access rats. **Addict Biol**, v. 14, n. 2, p. 130-43, 2009.

GRIEGER T.A.; FULLERTON C.S.; URSANO R.J. Posttraumatic stress disorder, alcohol use, and perceived safety after the terrorist attack on the pentagon. **Psychiatr Serv**, v. 54, n. 10, p. 1380-2, 2003.

GUYTON A.C.; HALL J.E. **Textbook of Medical Physiology**. 11ed., Philadelphia, Elsevier, 2006.

HERMAN M.A.; CONTET C.; JUSTICE N.J.; VALE W.; ROBERTO M. Novel subunit-specific tonic GABA currents and differential effects of ethanol in the central amygdala of CRF receptor-1 reporter mice. **J Neurosci**, v. 33, n. 8, p. 3284-98, 2013.

HO J.E.; PAULTRE F.; MOSCA L. Lifestyle changes in New Yorkers after September 11, 2001 (data from the Post-Disaster Heart Attack Prevention Program). **Am J Cardiol**, v. 90, n. 6, p. 680-2, 2002.

JI D.; GILPIN N.W.; RICHARDSON H.N.; RIVIER C.L.; KOOB G.F. Effects of naltrexone, duloxetine, and a corticotropin-releasing factor type 1 receptor antagonist on binge-like alcohol drinking in rats. **Behav Pharmacol**, v. 19, n. 1, p. 1-12, 2008.

JOËLS M.; BARAM T.Z. The neuro-symphony of stress. **Nat Rev Neurosci**, v.10, n. 6, p. 459-66, 2009.

KEYESK.M.; HATZENBUEHLER M.L.; GRANT B.F.; HASIN D.S. Stress and alcohol Epidemiologic Evidence. **Alcohol Research: Current Reviews**, v. 34, n. 4, p. 391-400, 2012.

KOOB G.F.; LE MOAL M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, p. 97-129, 2001.

KOOB G.F.; LE MOAL M. **Neurobiology of Addiction**. Academic Press: London. 2006

KOOB GF. A role for brain stress systems in addiction. **Neuron**, v.59, n. 1, p.11-34, 2008.

KOOB G.F.; LE MOAL M. Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.363, n.1507, p.3113-23, 2008.

KOOB G.F.; KENNETH LLOYD G.; MASON B.J. Development of pharmacotherapies for drug addiction: a Rosetta stone approach. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, n.6, p.500-15, 2009.

KOOB G.F. The role of CRF and CRF-related peptides in the dark side of addiction. **Brain Res**, v. 1314, p. 3-14, 2010.

LÄCK A.K.; FLOYD D.W.; MCCOOL B.A. Chronic ethanol ingestion modulates proanxiety factors expressed in rat central amygdala. **Alcohol**, v.36, n.2, p.83-90, 2005.

LAM M.P.; GIANOULAKIS C. Effects of acute ethanol on corticotropin-releasing hormone and β -endorphin systems at the level of the rat central amygdala. **Psychopharmacology (Berl)**, v.218, n.1, p.229-39, 2011.

LÊ A.D.; FUNK D.; COEN K.; LI Z.; SHAHAM Y. Role of corticotropin-releasing factor in the median raphe nucleus in yohimbine-induced reinstatement of alcohol seeking in rats. **Addict Biol**, v. 18, n. 3, p. 448-51, 2013.

LÊ A.D.; POULOS C.X.; HARDING S.; WATCHUS J.; JUZYTSCH W.; SHAHAM Y. Effects of naltrexone and fluoxetine on alcohol self-administration and reinstatement of alcohol seeking induced by priming injections of alcohol and exposure to stress. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, n.3, p.435-44, 1999.

LIU J.; YU B.; NEUGEBAUER V.; GRIGORIADIS D.E.; RIVIER J.; VALE W.W.; SHINNICK-GALLAGHER P.; GALLAGHER J.P. Corticotropin-releasing factor and Urocortin I modulate excitatory glutamatergic synaptic transmission. **J Neurosci**, v. 24, n. 16, p. 4020-9, 2004.

LOGRIP M.L.; ZORRILLA E.P. Stress history increases alcohol intake in relapse: relation to phosphodiesterase 10A. **Addict Biol**, v.7, n.5, p.920-33, 2012.

LOWERY E.G.; SPARROW A.M.; BREESE G.R.; KNAPP D.J.; THIELE T.E. The CRF-1 receptor antagonist, CP-154,526, attenuates stress-induced increases in ethanol consumption by BALB/cJ mice. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 32, n. 2, p. 240-8, 2008.

LOWERY E.G.; SPANOS M.; NAVARRO M.; LYONS A.M.; HODGE C.W.; THIELE T.E. CRF-1 antagonist and CRF-2 agonist decrease binge-like ethanol drinking in C57BL/6J mice independent of the HPA axis. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 6, p. 1241-52, 2010.

LOWERY-GIONTA E.G.; NAVARRO M.; LI C.; PLEIL K.E.; RINKER J.A.; COX B.R.; SPROW G.M.; KASH T.L.; THIELE T.E. Corticotropin releasing factor signaling in the central amygdala is recruited during binge-like ethanol consumption in C57BL/6J mice. **J Neurosci**, v. 32, n. 10, p. 3405-13, 2012.

MANDYAM CD, KOOB GF. The addicted brain craves new neurons: putative role for adult-born progenitors in promoting recovery. **Trends Neurosci**, v.35, n.4, p.250-60, 2012.

MARCINKIEWCZ C.A.; PRADO M.M.; ISAAC S.K.; MARSHALL A.; RYLKOVA D.; BRUIJNZEEL A.W. Corticotropin-releasing factor within the central nucleus of the amygdala and the nucleus accumbens shell mediates the negative affective state of nicotine withdrawal in rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 7, p. 1743-52, 2009.

MARINELLI P.W.; FUNK D. JUZYTSCH W. HARDING S.; RICE K.C.; SHAHAM Y.; LÊ A.D.; The CRF1 receptor antagonist antalarmin attenuates yohimbine-induced increases in operant alcohol self-administration and reinstatement of alcohol seeking in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 195, n. 3, p. 345-55, 2007.

McEVEN B.; LASLEY E.N. **The end of stress as we know it**. 1ed, Washington National Academies Press, 2002.

MCGREGOR A.; ROBERTS D.C.S. Dopaminergic antagonism within the nucleus accumbens or the amygdala produces differential effects on intravenous cocaine self-administration under fixed and progressive ratio schedules of reinforcement. **Brain Res**, v. 624, p. 245–252. 1993.

MEISCH, R. A. Oral drug self-administration: an overview of laboratory animal studies. **Alcohol**, v.24, p.117-128, 2001.

MELIS M.; SPIGA S.; DIANA M. The dopamine hypothesis of drug addiction: hypodopaminergic state. **Int Rev Neurobiol**, v.63, p.101-54,2005.

MOLANDER A.; VENGELIENE V.; HEILIG M.; WURST W.; DEUSSING J.M.; SPANAGEL R. Brain-specific inactivation of the Crhr1 gene inhibits post-dependent and stress-induced alcohol intake, but does not affect relapse-like drinking. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, p. 1047-56,2012.

MÖLLER C.; WIKLUND L.; SOMMER W.; THORSELL A.; HEILIG M. Decreased experimental anxiety and voluntary ethanol consumption in rats following central but not basolateral amygdala lesions. **Brain Res**, v.760, n.1-2, p.94-101,1997.

NAWATA Y.; KITAICHI K.; YAMAMOTO T. Increases of CRF in the amygdala are responsible for reinstatement of methamphetamine-seeking behavior induced by footshock. **Pharmacol Biochem Behav**, v.101, n.2, p.297-302, 2012.

NASH J.F. Jr; MAICKEL R.P. Stress-induced consumption of ethanol by rats. **Life Sci**, v.37, n.8, p.757-65, 1985.

NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL ABUSE AND ALCOHOLISM (NIAAA) **Council approves definition of binge drinking**. NIAAA Newsletter, No 3 (NIH pub no 04-5346). Bethesda MD: National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism;

2004.

NESTLER E.J. Is there a common molecular pathway for addiction? **Nat Neurosci**, v.8, n.11, p.1445-9,2005.

NIE Z.; SCHWEITZER P.; ROBERTS A.J.; MADAMBA S.G.; MOORE S.D.; SIGGINS G.R. Ethanol augments GABAergic transmission in the central amygdala via CRF1 receptors. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1512-4,2004.

NIE Z.; ZORRILLA E.P.; MADAMBA S.G.; RICE K.C.; ROBERTO M.; SIGGINS G.R. Presynaptic CRF1 receptors mediate the ethanol enhancement of GABAergic transmission in the mouse central amygdala. **ScientificWorldJournal**, v. 9, p. 68-85, 2009.

OLIVE M.F.; KOENIG H.N.; NANNINI M.A.; HODGE C.W. Elevated extracellular CRF levels in the bed nucleus of the stria terminalis during ethanol withdrawal and reduction by subsequent ethanol intake. **Pharmacol Biochem Behav**, v.72, n.1-2, p.213-20,2002.

PASTOR R.; REED C.; BURKHART-KASCH S.; LI N.; SHARPE A.L.; COSTE S.C.; STENZEL-POORE M.P.; PHILLIPS T.J. Ethanol concentration-dependent effects and the role of stress on ethanol drinking in corticotropin-releasing factor type 1 and double type 1 and 2 receptor knockout mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v.218, n.1, p.169-77, 2011.

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

PRICE J.L.; RUSSCHEN F.T.; AMARAL D.G. **The Limbic Region. II: The Amygdaloid Complex**. New York: Elsevier Science, 1987.

RHODES J.S.; BEST K.; BELKNAP J.K.; FINN D.A.; CRABBE J.C. Evaluation of a simple model of ethanol drinking to intoxication in C57BL/6J mice. **Physiol Behav**, v.84, n. 1, p. 53-63,2005.

RIBEIRO A.F.; PIGATTO G.; GOELDNER F.O.; LOPES J.F.; DE LACERDA R.B. Lack of relation between drug-seeking behavior in an addiction model and the expression of behavioral sensitization in response to ethanol challenge in mice. **J Neural Transm**, v.115, n. 1, p. 43-54, 2008.

RIBEIRO A.F.; CORREIA D.; TORRES A.A.; BOAS G.R.; RUEDA A.V.; CAMARINI R.; CHIAVEGATTO S.; BOERNGEN-LACERDA R.; BRUNIALTI-GODARD A.L. A transcriptional study in mice with different ethanol-drinking profiles: possible involvement of the GABAB receptor. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 102, p. 224-32,2012.

ROBERTO M.; MADAMBA S.G.; MOORE S.D.; TALLENT M.K.; SIGGINS G.R. Ethanol increases GABAergic transmission at both pre- and postsynaptic sites in

rat central amygdala neurons. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 4, p. 2053-8, 2003.

ROBERTO M.; MADAMBA S.G.; STOUFFER D.G.; PARSONS L.H.; SIGGINS G.R. Increased GABA release in the central amygdala of ethanol-dependent rats. **J Neurosci**, v. 24, n. 45, p. 10159-66, 2004a.

ROBERTO M.; SCHWEITZER P.; MADAMBA S.G.; STOUFFER D.G.; PARSONS L.H.; SIGGINS G.R. Acute and chronic ethanol alter glutamatergic transmission in rat central amygdala: an in vitro and in vivo analysis. **J Neurosci**, v. 24, n. 7, p. 1594-603, 2004b.

ROBERTO M.; BAJO M.; CRAWFORD E.; MADAMBA S.G.; SIGGINS G.R. Chronic ethanol exposure and protracted abstinence alter NMDA receptors in central amygdala. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 5, p. 988-96, 2006.

ROBERTO M.; CRUZ M.T.; GILPIN N.W.; SABINO V.; SCHWEITZER P.; BAJO M.; COTTONE P.; MADAMBA S.G.; STOUFFER D.G.; ZORRILLA E.P.; KOOB G.F.; SIGGINS G.R.; PARSONS L.H. Corticotropin releasing factor-induced amygdala gamma-aminobutyric Acid release plays a key role in alcohol dependence. **Biol Psychiatry**, v. 67, n. 9, p. 831-9, 2010a.

ROBERTO M.; CRUZ M.; BAJO M.; SIGGINS G.R.; PARSONS L.H.; SCHWEITZER P. The endocannabinoid system tonically regulates inhibitory transmission and

depresses the effect of ethanol in central amygdala. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 9, p. 1962-72, 2010b.

SABINO V.; KWAK J.; RICE K.C.; COTTONE P. Pharmacological Characterization of the 20% Alcohol Intermittent Access Model in Sardinian Alcohol-Preferring Rats: A Model of Binge-Like Drinking. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 37, n. 4, p. 635-43, 2013.

SAH P.; FABER E.S.; LOPEZ DE ARMENTIA M.; POWER J. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. **Physiol Rev**, v. 83, n. 3, p. 803-34, 2003.

SAH P.; LOPEZ DE ARMENTIA M. Excitatory synaptic transmission in the lateral and central amygdala. **Ann N Y Acad Sci**, v. 985, p. 67-77, 2003.

SCHIESS M.C.; CALLAHAN P.M.; ZHENG H. Characterization of the electrophysiological and morphological properties of rat central amygdala neurons in vitro. **J Neurosci Res**, v. 58, n. 5, p. 663-73, 1999.

SCHULTZ W. Multiple dopamine functions at different time courses. **Annu Rev Neurosci**, v. 30, p. 259-88, 2007.

SCHULZ D.W.; MANSBACH R.S.; SPROUSE J.; BRASELTON J.P.; COLLINS J.; CORMAN M.; DUNAISKIS A.; FARACI S.; SCHMIDT A.W.; SEEGER T.; SEYMOUR P.; TINGLEY F.D. 3RD; WINSTON E.N.; CHEN Y.L.; HEYM J. CP-154,526: a potent and selective nonpeptide antagonist of corticotropin releasing factor receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 19, p. 10477-82, 1996.

SHARPE A.L.; COSTE S.C.; BURKHART-KASCH S.; LI N.; STENZEL-POORE M.P.; PHILLIPS T.J. Mice deficient in corticotropin-releasing factor receptor type 2 exhibit normal ethanol-associated behaviors. **Alcohol Clin Exp Res**, v.29, n.9, p.1601-9, 2005.

SHARPE A.L.; PHILLIPS T.J. Central urocortin 3 administration decreases limited-access ethanol intake in nondependent mice. **Behav Pharmacol**, v. 20, n. 4, p.346-51, 2009.

SHIPPENBERG, T. S.; KOOB, G. F. Recent advances in animal models of drug addiction. In: Kenneth, L.; Davis et al., (eds) **Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress: an official publication of the American College of Neuropsychopharmacol**, p.1381-1397, 2002.

SILLABER I.; RAMMES G.; ZIMMERMANN S.; MAHAL B.; ZIEGLGÄNSBERGER W.; WURST W.; HOLSBOER F.; SPANAGEL R. Enhanced and delayed stress-induced alcohol drinking in mice lacking functional CRH1 receptors. **Science**, v.296, n.5569, p.931-3, 2002.

SILVEIRA, D.X.; MOREIRA, F.G. **Panorama atual de drogas e dependências**. Atheneu, 2006.

SOLOMON R.L.; CORBIT J.D. The opponent-process theory of acquired motivation: the cost of pleasure and the benefits of pain. **Am psychol**, v. 35, p.691-712, 1974.

SOLOMON R.L. Recent experiments testing an opponent-process theory of acquired motivation. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, v. 40, n. 1, p. 271-89, 1980.

SOMMER W.H.; RIMONDINI R.; HANSSON A.C.; HIPSKIND P.A.; GEHLERT D.R.; BARR C.S.; HEILIG M.A. Upregulation of voluntary alcohol intake, behavioral sensitivity to stress, and amygdala crhr1 expression following a history of dependence. **Biol Psychiatry**, v. 63, p. 139-45, 2008.

SPANAGEL, R. Recent animal models of alcoholism. **Alcohol Research and Health**, v.24,n. 2, p. 124-131, 2000.

SPANDIDOS A.; WANG X.; WANG H.; SEED B. PrimerBank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification. **Nucleic Acids Res**, v. 38, p. D792-9, 2010.

SPARTA D.R.; SPARROW A.M.; LOWERY E.G.; FEE J.R.; KNAPP D.J.; THIELE T.E. Blockade of the corticotropin releasing factor type 1 receptor attenuates elevated ethanol drinking associated with drinking in the dark procedures. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 32, n. 2, p. 259-65, 2008.

SPECIO S.E.; WEE S.; O'DELL L.E.; BOUTREL B.; ZORRILLA E.P.; KOOB G.F. CRF(1) receptor antagonists attenuate escalated cocaine self-administration in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 196, n. 3, p. 473-82, 2008.

TARTTER M.A.; RAY L.A. A prospective study of stress and alcohol craving in heavy drinkers. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 101, n. 4, p. 625-31, 2012.

TREUTLEIN J.; KISSLING C.; FRANK J.; WIEMANN S.; DONG L.; DEPNER M.; SAAM C.; LASCORZ J.; SOYKA M.; PREUSS U.W.; RUJESCU D.; SKOWRONEK M.H.; RIETSCHEL M.; SPANAGEL R.; HEINZ A.; LAUCHT M.; MANN K.; SCHUMANN G. Genetic association of the human corticotropin releasing hormone receptor 1 (CRHR1) with binge drinking and alcohol intake patterns in two independent samples. **Mol Psychiatry**, v. 11, n. 6, p. 594-602, 2006.

VALDEZ G.R.; ROBERTS A.J.; CHAN K.; DAVIS H.; BRENNAN M.; ZORRILLA E.P.; KOOB G.F. Increased ethanol self-administration and anxiety-like behavior during acute ethanol withdrawal and protracted abstinence: regulation by corticotropin-releasing factor. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 26, n. 10, p. 1494-501, 2002.

VALEW.; SPIESS J.; RIVIER C.; RIVIER J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. **Science**, v. 213, n. 4514, p. 1394-7, 1981.

VANDESOMPELE J.; DE PRETER K.; PATTYN F.; POPPE B.; VAN ROY N.; DE PAEPE A.; SPELEMAN F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, 2002.

VILLAS BOAS G.R.; ZAMBONI C.G.; PERETTI M.C.; CORREIA D.; RUEDA A.V.; CAMARINI R.; BRUNIALTI-GODARD A.L.; BOERNGEN-LACERDA R. GABA(B) receptor agonist only reduces ethanol drinking in light-drinking mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v, 102, n. 2, p. 233-40, 2012.

WOLFFGRAMM, J. Free choice ethanol intake of laboratory rats under different social conditions. **Psychopharmacology**, v. 101, p. 233-239, 1990.

WOLFFGRAMM, J.; HEYNE, A. From controlled drug intake to loss of control: the irreversible development of drug addiction in the rat. **Review of Behavioural Brain Research**, v.70, p. 77-94, 1995.

WOLFFGRAMM, J. et al. Animal models of addiction: models for therapeutic strategies? **Journal of Neural Transmission**, v, 107, p. 649-668, 2000.

WORLD HEALTH ORGANISATION (WHO). **The World Health Report 2002**. Reducing Risks, promoting healthy life. WHO. Geneva, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on alcohol and health**. World Health Organization, Geneva, 2011.

YANG X.; WANG S.; RICE K.C.; MUNRO C.A.; WAND G.S. Restraint stress and ethanol consumption in two mouse strains. **Alcohol Clin Exp Res**, v.32, n.5 p.840-52, 2008

YAROSLAVSKY I.; TEJANI-BUTT S.M. Voluntary alcohol consumption alters stress-induced changes in dopamine-2 receptor binding in Wistar-Kyoto rat brain. **Pharmacol Biochem Behav**, v.94, n.3, p.471-6, 2010.

ZORRILLA E.P.; TACHE Y.; KOOB G.F. Nibbling at CRF receptor control of feeding and gastrocolonic motility. **Trends Pharmacol. Sci**, v. 24, p. 421–427,2003.

ANEXO 1



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEA)



Nº 391

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075/077618/2009-36

APROVADO: 05/08/2009 - R.O. 07/2009

TÍTULO:

Influência do fator de liberação de corticotrofinas (CRF) e das urocortinas no desenvolvimento de adição ao etanol em camundongos

AUTORES:

Roseli Boerngen de Lacerda, Diego Correia

DEPARTAMENTO: Farmacologia

Prof.ª Dr.ª Ana Maria C. Filadelfi
Coordenadora do CEEA