

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

YARA JAMAL

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MIANSERINA SOBRE O PADRÃO DE
CONSUMO DE ÁLCOOL EM CAMUNDONGOS**

CURITIBA

2008

YARA JAMAL

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MIANSERINA SOBRE O PADRÃO DE
CONSUMO DE ÁLCOOL EM CAMUNDONGOS**

Dissertação 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 Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dra. Roseli Boerngen de Lacerda

CURITIBA

2008

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua fidelidade.

A Professora Roseli, minha orientadora, a quem respeito e admiro não só pela competência do trabalho, mas pela pessoa maravilhosa que é. Obrigada pela paciência e carinho.

A minha mãe e meus irmãos, por confiarem em mim.

A minha amiga Camila, por me apoiar em todos os momentos.

Ao meu amigo Diego, por sua dedicação, ajuda e conhecimento.

As minha amigas Laryssa, Pamela, Amanda por toda amizade nessa jornada.

Aos meus queridos estagiários Evelin, Mari, Allan, Ramon e Schuatz, pela disposição e companheirismo durante todos os experimentos.

Aos professores do Departamento de Farmacologia, por todo aprendizado.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, especialmente Cris, Linda e Alessandra pela prestatividade.

Aos meus colegas do Departamento e todos que torceram por mim.

Nota Explicativa:

Dissertação apresentada em formato alternativo – artigos para publicação – conforme aceito pelas normas do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Paraná.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Mecanismos de Ação do Etanol.....	14
1.2. Neurobiologia da Adição.....	19
1.3. Neurobiologia da Adição do Etanol.....	20
1.4. Teorias da Dependência/ Adição.....	24
1.5. Modelos Animais de Dependência/ Adição.....	26
1.5.1. Modelos que Estudam as Propriedades Reforçadoras Positivas.....	28
1.5.2. Modelos que Estudam as Propriedades Reforçadoras Negativas.....	29
1.5.3. Modelos de Adição: Procura à Droga, Uso Compulsivo e Recaída..	30
1.6. Medicamentos Utilizados para Tratamento do Alcoolismo.....	34
1.7. Mianserina.....	36
2. JUSTIFICATIVA.....	42
3. OBJETIVOS.....	43
3.1. Objetivo Geral.....	43
3.2. Objetivos Específicos.....	43
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1. Equipamentos.....	44
4.2.1. Caixa de Movimentação Espontânea.....	44
4.2.2. Labirinto em Cruz Elevado.....	44
4.2.3. Campo Aberto.....	45
4.3. Drogas.....	45
4.4. Procedimento.....	46
4.4.1. Avaliação Comportamental Basal.....	46
4.4.2. Modelo de Adição por Auto-Administração por Livre Escolha.....	46
4.4.3. Tratamento com Mianserina.....	47
4.5. Análise Estatística.....	50
5. RESULTADOS.....	51
6. CONCLUSÕES.....	80

7. REFERÊNCIAS.....	81
APÊNDICE 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS ANIMAIS.....	100
APÊNDICE 2 – DADOS COMPORTAMENTAIS.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS

ADTs-Antidepressivos Tricíclicos

ATV- Área tegmental ventral

CEBRID- Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas

CID-10- Classificação Internacional de Doenças e Problemas relacionados a Saúde, 10 edição

5-HT- 5-Hidroxitriptamina

DAD2- Receptor dopaminérgico do tipo 2

DOI-[-(2,5-dimetoxi-4-iodofenil)-2-propanoamino]

DSM-IV- Diagnostic Statistical Manual

EUA- Estados Unidos da América

GABA- Ácido Gama Amino Butírico

ISRS- Inibidores seletivos da recaptção de serotonina

mCPP-m-clorofenilpiperazina

NA- Núcleo acumbens

NMDA- N-Metil-D-Aspartato

nP- Non- Preferring

8-OH-DPAT- [8-hidróxi 2-(di-N-propilamino) tetralina]

OMS- Organização Mundial da Saúde

P- Preferring

SNC- Sistema Nervoso Central

SD- Sprague-Dawley

SENAD- Secretaria Nacional Antidrogas

sNP- Non- Sardinian Preferring

sP- Sardinian Preferring

TFMPP- Cloridrato de 1-(3-trifluormetilfenil) piperazina HCL

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MIANSERINA SOBRE O PADRÃO DE CONSUMO DE ÁLCOOL EM CAMUNDONGOS

Autores:

Yara Jamal. Aluna de Mestrado em Farmacologia. ¹

Roseli Boerngen de Lacerda Professor 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: yarajamal@gmail.com

RESUMO

Os receptores serotoninérgicos estão envolvidos no consumo de etanol, porém ainda se desconhecem quais são os subtipos mais importantes nesse processo. Nós avaliamos o efeito da mianserina, um antagonista não seletivo dos receptores serotoninérgicos subtipo 5-hidroxi-triptamina-2C (5-HT_{2C}) na ingestão voluntária de etanol. Camundongos (n = 60) foram individualmente isolados com acesso livre a comida e expostos a livre escolha de etanol (5 e 10%) e água num paradigma de quatro fases: Livre escolha (10 semanas), Abstinência (2 semanas), Reapresentação (2 semanas) e Adulteração com quinino, proporcionando um sabor aversivo a solução, (2 semanas). Um grupo de animais controle (n = 10) teve acesso somente à água. Os camundongos foram caracterizados como: adicto (preferência por etanol sem redução do consumo na fase de adulteração, n = 13), pesado (preferência por etanol com redução do consumo na fase de adulteração, n = 15), leve (preferência por água com redução do consumo de etanol na fase de adulteração (n = 14), e leve adicto (preferência por água sem redução do consumo de etanol na fase de adulteração, n = 13). Os camundongos foram distribuídos randomicamente para administração de mianserina (0, 2.5, 5, e 10 mg/kg, i.p., Quadrado Latino) ou salina. Os 10 animais do grupo controle também receberam as mesmas doses de mianserina e foram divididos em dois grupos: metade continuou a ter acesso somente a água (controle do consumo de líquido - controle + água) e a outra metade teve acesso a água e as soluções de álcool (controle do efeito da mianserina sobre o consumo agudo de água - controle + livre escolha). Após trinta minutos os camundongos tiveram acesso as soluções de etanol e água, e o consumo foi mensurado 24 horas depois. Mianserina na dose de 5 mg/kg reduziu o consumo de etanol em todos os grupos, se comparado com outras doses ou salina, sem alterar o consumo de água. Muitos estudos tem demonstrado que o bloqueio dos receptores 5-HT₂, aumenta os níveis de dopamina na ATV, no núcleo accumbens e no córtex pré-frontal. Uma série de estudos também tem demonstrado que a 5-HT exerce um controle inibitório tônico e fásico do sistema dopaminérgico principalmente nas vias mesocorticolímbicas por estimular os receptores 5-HT_{2C}. Um possível mecanismo para mianserina seria o aumento da liberação de dopamina,

substituindo as propriedades reforçadoras do etanol em todos os animais (adictos e não – adictos) e também nos animais que nunca tinham sido expostos ao álcool.

Palavras-chaves: Etanol, Modelo de adição, Serotonina, Mianserina, Camundongos

ABSTRACT

Serotonergic receptors are involved in ethanol intake, but which subtypes are most important remains unknown. We aimed to evaluate the effect of the nonselective serotonin 5-hydroxytryptamine-2C (5-HT_{2C}) receptor antagonist mianserin on voluntary ethanol intake. Mice (n = 60) were individually housed with ad libitum access to food and were allowed access to free choice responding for ethanol (5 and 10%) and water in a four-phase paradigm: free choice (10 weeks), withdrawal (2 weeks), re-exposure (2 weeks), and quinine-adulteration, creating an aversive bitter-tasting solution, (2 weeks). A separate group of control animals (n = 10) only had access to water. Mice were characterized as: addicted (ethanol preference without reduced intake with adulterated ethanol, n = 13), heavy (ethanol preference with reduced intake with adulterated ethanol, n = 15) light (water preference with reduced intake with adulterated ethanol, n = 14), and light addicted (water preference without reduced intake with adulterated ethanol, n = 13). Mice then were distributed randomly to receive either mianserin (0, 2.5, 5, and 10 mg/kg, i.p., Latin square design) or saline. The 10 animals in the control group were designated to receive the same doses of mianserin and were divided into two groups: half continued to have access only to water (controlling for the consumption of liquid – Control + H₂O group) and half were given access to water and the alcohol solutions (controlling for the effect of mianserin on the acute consumption of alcohol – Control + FC group). Thirty minutes later, the mice were allowed access to ethanol solutions and water, and intakes were measured 24 h later. Mianserin at 5 mg/kg reduced ethanol intake in all groups compared with the other doses and to saline, with no effect on water intake. Several studies have shown that blockade of 5-HT₂ receptors increases dopamine levels in the VTA, nucleus accumbens, and prefrontal cortex. A series of studies has shown that 5-HT exerts tonic and phasic inhibitory control mainly in the mesolimbic and mesocortical dopamine system by stimulating 5-HT_{2C} receptors. One possible mechanism is that mianserin increases dopamine release such that it substitutes for the reinforcing properties of ethanol, thus reducing ethanol intake in all animals (addicted and non-addicted) and also in animals that had not been exposed to ethanol solutions previously.

Keywords: Ethanol. Addiction Model. Serotonin. Mianserin. Mice.

1. INTRODUÇÃO

O abuso no consumo de álcool e a sua dependência são problemas que afetam a população mundial e representam o maior problema de saúde pública tanto no Brasil como em outros países. Os problemas decorrentes direta e indiretamente do consumo de álcool como acidentes, violência e perda de produtividade geram grandes prejuízos econômicos e sociais.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define alcoolismo como o consumo de bebidas alcoólicas de forma continuada, causando prejuízo emocional, social e físico ao indivíduo. A Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID 10) classifica o alcoolismo como F10 - Transtornos Mentais e Comportamentais devido ao uso de álcool (LIMA, 2003).

Os transtornos causados pelo uso de álcool incluem dependência e abuso. A dependência é caracterizada pelo uso repetido da substância resultando em tolerância, síndrome de abstinência e comportamento compulsivo de procura pela droga (“craving”). O uso compulsivo de substâncias é uma característica da dependência (ou adição) e um dos critérios diagnósticos centrais apresentados pelo DSM IV (Diagnostic Statistical Manual, 4ª edição) (APA, 1994). O abuso do álcool está relacionado principalmente com um padrão de consumo que gera conseqüências adversas e recorrentes causada pelo uso repetitivo de substâncias, mas que excluem a tolerância, sintomas de abstinência e comportamento compulsivo (TERENINA-RIGALDIE *et al.*, 2004).

A dependência do álcool acomete de 10 a 12% da população mundial (WHO, 1999). O alcoolismo é a terceira doença que mais mata no mundo. Ele acomete aproximadamente 10% dos americanos em algum momento de suas vidas (GARBUIT *et al.*, 1999) e é a principal causa de demência nos Estados Unidos da América (EUA) (OSLIN *et al.*, 1998). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam que o seu uso abusivo é um dos maiores fatores de risco à saúde do brasileiro, sendo em média duas vezes maior que os riscos decorrentes do tabagismo (WHO, 2002).

No Brasil, de acordo com o segundo levantamento domiciliar realizado pelo CEBRID (Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas) em 2005, a prevalência da dependência de álcool é de 12,3%. A prevalência de dependentes é

mais alta nas regiões Nordeste, com porcentagens quase de 14%. Fato mais preocupante é a constatação de que, no Brasil, 5,2% dos adolescentes (12 a 17 anos de idade) são dependentes do álcool. No Norte e Nordeste, essa porcentagem está próxima dos 9%. (CARLINI *et al.*,2007).

Diversas características, tais como gênero, idade, etnia, ocupação, grau de instrução e estado civil podem influenciar o uso nocivo de álcool, bem como o desenvolvimento da dependência ao álcool (VAILLANT, 1996).

As complicações relacionadas ao consumo de álcool não estão apenas relacionadas ao uso crônico (FERGUSON; LYNSKEY; HORWOOD, 1994). Intoxicações agudas, além de trazer riscos diretos à saúde, deixam os indivíduos mais propensos a acidentes (CHERPITEL, 1993).

Além disso, estima-se que o consumo de álcool esteja relacionado com boa parte dos suicídios, homicídios, agressões a mulheres e crianças, estupros e acidentes de trânsito fatais (HIROEH *et al.*, 2001; VIZCARRA *et al.*, 2001; WHITE; CHEN, 2002). No Brasil o álcool é responsável por cerca de 60% dos acidentes de trânsito e aparece em 70% dos laudos cadavéricos das mortes violentas (PINSKY; LARANJEIRA, 1998).

O alcoolismo é uma doença primária crônica, sendo freqüentemente progressiva e fatal. No Brasil, segundo Odo *et al.* (2000), o alcoolismo é a terceira causa de absenteísmo e a oitava para concessão de auxílio-doença no sistema previdenciário.

O uso abusivo causa aproximadamente 350 tipos de doenças físicas e psíquicas. No Brasil, 90% das internações em hospitais psiquiátricos por dependência de drogas acontecem devido ao álcool (NOTO *et al.*; 2002)

1.1. Mecanismos de Ação do Etanol

O etanol é uma micro molécula apolar solúvel tanto em água como em lipídios e exerce boa parte dos seus efeitos no SNC (CHARNESS; SIMON; GREENBERG , 1989).

O álcool é uma droga que afeta vários sistemas de neurotransmissores dentre os quais se destacam os sistemas gabaérgico, glutamatérgico, dopaminérgico e serotoninérgico, entre outros envolvidos no desenvolvimento da dependência (HEINZ; GOLDMAN, 2000; RATSMA; VAN DER STELT; GUNNING, 2002; PIVAC *et al.*, 2004).

Dados bioquímicos, eletrofisiológicos e comportamentais responsabilizam o receptor GABA_A como um importante alvo para as ações *in vivo* do etanol. Quando o etanol se liga ao receptor GABAérgico, ele facilita a inibição GABAérgica. O resultado é um maior efeito inibitório no cérebro, ocasionando relaxamento e sedação do organismo (CARDOSO; SABBATTINI; MALAVAZZI, 1999; CAMPOS, 2003). Pode-se exemplificar essa importante ação pela evidência de um antagonista do receptor GABA_A reduzir o consumo de álcool em modelos animais (HARRIS; MIHIC; VALENZUELA, 1998), ou pela administração de um agonista deste receptor em ratos poder substituir o etanol em estudos sobre suas propriedades discriminativas (Mihic, 1999). Há evidências de que tanto a dependência quanto a síndrome de abstinência ao etanol causam alterações na expressão do gene da subunidade do receptor GABA_A (DEVAUD *et al.*, 1995). O etanol apresenta propriedades ansiolíticas quando administrado agudamente de forma semelhante aos benzodiazepínicos, os quais exercem seus efeitos interagindo com subunidades dos receptores GABA_A (MORROW, 1995). Quando o consumo de etanol se torna crônico, é produzida tanto a dependência quanto a tolerância a esses efeitos, as quais podem ser relacionadas a uma diminuição da atividade dos receptores GABA_A (SANNA *et al.*, 1993). Sugere-se que na síndrome de abstinência provocada pelo etanol, sintomas como ansiedade possa ser mediada em parte pela redução da função dos receptores GABA_A no cérebro, caracterizada pela hiperexcitabilidade do Sistema Nervoso Central que se manifesta na retirada abrupta da droga (DEVAUD *et al.*, 1997).

Baixas concentrações de etanol são capazes de inibir a ação estimulante mediada pelos receptores glutamatérgicos NMDA no SNC (BHAVE *et al.*, 1996) e

em culturas de neurônios, sendo que este efeito parece estar relacionado à inibição de influxo de Ca^{2+} por meio dos canais iônicos acoplados a esse tipo de receptor (LOVINGER, 1993). Com o uso crônico, o etanol causa superssensibilização destes receptores. Possivelmente esse receptor desempenha uma função importante na neurotoxicidade observada no abuso do álcool ou na síndrome de abstinência (LOVINGER, 1993).

Um dos efeitos mais importantes e característicos do álcool é aquele responsável pelas propriedades reforçadoras; por meio de sua atuação desinibindo os neurônios dopaminérgicos do sistema mesolímbico que participa do sistema de recompensa cerebral, o qual é importante na gratificação, prazer e instintos de alimentação e reprodução (LIMA, 2003). Os neurônios desse sistema possuem corpos celulares localizados na área tegmental ventral (ATV), com projeções no núcleo accumbens, no tubérculo olfatório, no córtex frontal, na amígdala e na área septal. As estruturas que se projetam no núcleo accumbens formam o núcleo central do sistema de recompensa dopaminérgico (MOREAU, 1996).

Uma das evidências de que o sistema dopaminérgico está envolvido com o sistema de recompensa cerebral baseia-se na hipótese de que as drogas de abuso aumentam a atividade locomotora. A participação desse sistema na adição ao álcool parece estar relacionada com o aumento de liberação de neurotransmissores opióides que leva à liberação de dopamina (OSWALD; WAND, 2004). O etanol também deprime a ação do neurônio gabaérgico da substância negra, que exerce influência sobre o neurônio dopaminérgico (GONZALES; WEISS, 1998).

Existem evidências de que a administração aguda de etanol aumenta a liberação de peptídeos opióides e β -endorfinas em várias regiões do cérebro incluindo núcleo accumbens, glândula pituitária e hipotálamo. Por outro lado, a diminuição dos níveis plasmáticos de β -endorfina foi detectada em pacientes com síndrome de abstinência alcoólica, sendo essas mudanças correlacionadas com a manifestação de ansiedade e depressão. Enquanto a administração aguda de etanol provoca “up-regulation” de receptores μ -opióides no núcleo accumbens e amígdala (ROSIN; KITCHEN; GEORGIEVA, 2003) a administração crônica produz “down-regulation” desses receptores no estriado e núcleo accumbens (TURCHAN *et al.*, 1999).

Ghozland *et al.* (2005) demonstraram que a supressão dos receptores μ -opioides em camundongos, bloqueia os efeitos estimulantes e ansiolíticos do etanol administrado agudamente. O efeito ansiolítico do etanol se relaciona com a propriedade reforçadora negativa que implica no desenvolvimento da dependência. Por outro lado, esses camundongos com receptor μ -opioides *knock-out* desenvolveram dependência mais precocemente que outros, o que foi demonstrado nos testes realizados durante a retirada do etanol, após exposição crônica. Esses resultados sugerem que o antagonista opioide naltrexone, usado no tratamento do alcoolismo, possui ação relacionada com o bloqueio dos efeitos reforçadores positivos agudos do etanol e não com os efeitos reforçadores negativos crônicos da abstinência.

Uma exposição aguda ao álcool altera muitos aspectos da transmissão serotoninérgica. Em humanos, por exemplo, os níveis de metabólitos de serotonina na urina e no sangue aumentam após uma única ingestão de álcool, indicando aumento da liberação de serotonina no sistema nervoso (LEMARQUAND; PIHL; BENKELFAT, 1994). Alguns estudos de microdiálise “in vivo” confirmam que a administração aguda de etanol por via intraperitoneal, aumenta os níveis extracelulares de serotonina no núcleo accumbens e no hipocampo ventral de ratos Wistar (YOSHIMOTO *et al.*, 1992; BARE; MCKINZIE; MCBRIDE, 1998; CHASTAIN, 2006).

Os efeitos da administração aguda de álcool nos receptores de serotonina também são mostrados em animais *knock-out*, nos quais certos genes (que codificam diferentes receptores de serotonina) têm sido inativados experimentalmente para que estes animais não produzam a proteína codificada por estes genes. Cientistas têm utilizado camundongos *knock-out* para o receptor 5-HT_{1B}, para estudar os efeitos da exposição aguda ao álcool. Estes animais exibem reduzida intoxicação em resposta a uma única dose de álcool, quando comparados com camundongos normais, indicando que a atividade do receptor 5-HT_{1B} produz alguns efeitos tóxicos do álcool (CRABBE *et al.*, 1996).

O aumento de serotonina nas sinapses centrais pela ingestão aguda de álcool, também afeta outros neurotransmissores. O álcool através da serotonina altera o sistema gabaérgico, e também estimula o aumento de dopamina estimulando o sistema motivacional (CAMPBELL; KOHL; MCBRIDE, 1996).

A serotonina pode interagir com o sistema GABAérgico mediando a excitação dos neurônios que produzem e secretam GABA. A serotonina, por exemplo, eleva a atividade dos neurônios gabaérgicos na formação hipocampal que é a parte do cérebro responsável pela memória e outras funções cognitivas. Para ativar estes neurônios gabaérgicos, a serotonina liga-se ao receptor 5-HT₃ presente em muitas regiões do cérebro além nos neurônios gabaérgicos. O aumento da atividade dos receptores 5-HT₃ resulta na potenciação da ação do GABA (LOVINGER, 1999). Assim, o etanol apresenta propriedades ansiolíticas quando administrado agudamente, pois aumenta a estimulação dos receptores GABA_A.

Em longo prazo, ou após a exposição crônica ao álcool, pode levar à mudanças adaptativas nas células cerebrais. Essa adaptação inclui um processo denominado tolerância, caracterizado por um mecanismo que restabelece a função celular normal ou homeostasia, em resposta às alterações contínuas induzidas pelo álcool. O receptor 5-HT₂ parece ser um dos receptores a sofrer tais mudanças adaptativas. Assim, o número de receptores 5-HT₂ e seus sinais químicos aumentam em animais de laboratório permanecendo durante diversas semanas após a exposição crônica ao álcool (LOVINGER, 1997; VASCONCELOS *et al.*, 2002).

A serotonina tem sido relacionada aos mecanismos que envolvem consumo excessivo de álcool (MEERT; JANSSEN, 1991; SELLERS; HIGGINS; SOBELL, 1992; LEMARQUAND; PHIL; BENKELFAT, 1994). Foi relatado que baixas concentrações dos níveis de serotonina se correlacionaram positivamente com o alto consumo de etanol (HIGLEY; SUOMI; LINNOILA, 1996). Além disso, os níveis de ácido 5-hidroxiindolacético, principal metabólito da serotonina, estavam diminuídos no fluido cerebrospinal de pacientes alcoolistas (MAUREL; DE VRY; SCHREIBER 1999). O consumo excessivo de álcool durante longos períodos por sujeitos dependentes de álcool leva a uma redução da densidade de transportadores para a recaptação de serotonina (BERGGREN *et al.*, 2002).

A redução dos transportadores de serotonina, em alcoolistas, está correlacionada com o tempo de ingestão de álcool e pode também representar um efeito neurotóxico conseqüente ao consumo crônico de álcool sobre esses sítios transportadores e sobre os neurônios serotoninérgicos do tronco cerebral (HEINZ *et al.*, 1998). Em um estudo, após a ingestão crônica de álcool, os sujeitos estavam mais vulneráveis aos efeitos tóxicos do álcool e apresentavam uma pronunciada

diminuição de transportadores de serotonina nos núcleos da rafe (HEINZ *et al.*, 2000).

Várias linhas de pesquisa sugerem que uma disfunção na neurotransmissão dopaminérgica e serotoninérgica central predispõe à dependência do álcool e contribui para o consumo excessivo e prolongado de álcool (HEINZ *et al.*, 1998). A serotonina pode alterar a transmissão dopaminérgica, por exemplo, ao interagir com o seu receptor 5-HT₂ que estimula os neurônios dopaminérgicos da ATV aumentando a liberação de dopamina. Os neurônios dopaminérgicos da ATV estão conectados a áreas do cérebro responsáveis pelo sistema de recompensa. Esta ativação dependente de serotonina destes neurônios sugere que esta interação pode ter um papel importante na produção dos efeitos de recompensa do álcool (LOVINGER, 1999).

Por outro lado, a redução de neurotransmissores em sujeitos dependentes de álcool, ocasionado por longo consumo, altera os números de receptores dopaminérgicos do tipo 2 (DAD₂) do cérebro (OLAUSSON, 2000). Esta interação é uma evidência direta para a conclusão de um estudo de Berggren, Fahlke E Balldin (2000), que mostra que a diminuição da neurotransmissão serotoninérgica central está associada a uma redução da função do receptor DAD₂ central em alcoolistas.

1.2. Neurobiologia da Adição

Muitas pessoas apresentam potencial para desenvolver adição a drogas. Adição é mais do que o mero uso de drogas. Isso é especialmente definido como um padrão compulsivo de busca por drogas e por uso de drogas que sobrepuja a motivação por qualquer outra atividade. A questão primordial na adição, portanto, é o porquê alguns indivíduos são suscetíveis a passar de um uso casual da droga para um padrão de uso compulsivo, e porque para os dependentes é tão difícil parar com a droga (EDWARDS; ARIF; HADGSON, 1981). Cerca de 60% dos americanos experimentou uso de alguma droga ilícita uma vez na vida e mesmo excluindo a maconha, a prevalência do uso de drogas ilícitas ao longo da vida é de 32%. Se o álcool for incluído, a porcentagem de americanos expostos às drogas pelo menos uma vez na vida, sobe para mais de 90%, mas apenas poucas pessoas se tornam adictos. Mesmo sendo relativamente baixo o número de pessoas que se torna

dependente, esse número é substancial e representa um grande problema sócio-econômico e de saúde pública (ROBINSON; BERRIDGE, 2003).

O desenvolvimento da adição parece estar relacionado com várias neuroadaptações induzidas pelas drogas e mudanças na função psicológica. Sabe-se que todas as drogas com potencial de abuso têm a habilidade de influenciar o processamento cerebral de informações por subverter um ou mais dos sistemas neurotransmissores comuns (ácido gama-amino butírico [GABA], glutamato, acetilcolina, dopamina, serotonina, e peptídeos opioides). Dentre esses, o sistema dopaminérgico é o que apresenta estudos com observações mais consistentes principalmente com ação sobre o sistema de recompensa, memória, motivação e autocontrole (TOMKINS; SELLERS, 2001).

Estudos comportamentais e de neuroimagens sugerem que há o envolvimento de pelo menos 4 circuitos cerebrais interativos que medeiam os 3 estágios do processo de adição, isto é, o estágio de intoxicação, o de fissura (ou compulsão) e o de abstinência. O primeiro circuito está localizado no núcleo accumbens (NA) (DI CHIARA, 1997) e na parte ventral do globo pálido modulando o processo de recompensa (VOLKOW *et al.*, 2004). O segundo circuito localiza-se dentro do córtex orbitofrontal e do córtex subcaloso e é o responsável pela geração de motivação e resposta emocional. O terceiro circuito está localizado na amígdala e hipocampo e relaciona-se com memória oferecendo condições ao aprendizado. O último circuito que está localizado no giro do cíngulo anterior e no córtex pré-frontal é responsável pelo controle da cognição e pela função executiva (VOLKOW *et al.*, 1993).

Já é bastante evidente na literatura a predisposição genética associada ao desenvolvimento da dependência. Uma meta-análise sobre a associação entre dependência de substâncias e genética mostrou que genes podem agir em diferentes sistemas como o da serotonina, por exemplo, predispondo o indivíduo a desenvolver dependência a múltiplas substâncias (BECHARA, 2005).

1.3. Neurobiologia da Adição do Etanol

O comportamento de dependência associado com o álcool é caracterizado por preocupação compulsiva em obter a substância, perda do controle sobre o consumo e desenvolvimento da tolerância, assim como prejuízo social e na função

ocupacional. Como os outros transtornos mentais, alcoolismo é caracterizado pela vulnerabilidade crônica para recair, ou seja, voltar a usar a substância após o indivíduo ter parado de beber. Para compreender os fatores que levam alguns indivíduos a beber excessivamente, as pesquisas sobre o alcoolismo têm se focado na identificação dos mecanismos cerebrais que mantêm o reforço do álcool e na progressão de mudanças na função neural induzida pelo consumo crônico de etanol que levam para o desenvolvimento de dependência (WEISS, 2000).

Certas áreas do cérebro têm sido implicadas com as propriedades reforçadoras de todas as drogas de abuso incluindo o álcool. Esse circuito de recompensa inclui o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico que começa na ATV e se projeta para o NA e prosencéfalo incluindo o estriado dorsal (KOOB; NESTLER, 1997). O NA está associado com o aspecto motivacional do circuito, o estriado dorsal está associado com o aprendizado e resposta comportamental (JOHNSON, 2004). A liberação de dopamina nessa via é considerada a chave para a ação das substâncias de abuso. A liberação de dopamina no NA e na ATV é mediada por impulsos excitatórios e inibitórios. Os impulsos excitatórios incluem as projeções glutamatérgicas originadas no córtex cerebral, amígdala e hipocampo e os impulsos inibitórios incluem os neurônios GABAérgicos. A liberação de dopamina no NA é primariamente influenciada pelo GABA, enquanto que na ATV é primariamente influenciada pelo glutamato (JOHNSON, 2004).

Estudos pré-clínicos têm demonstrado que a administração sistêmica de álcool aumenta a liberação de dopamina (WEISS *et al.*, 1993), bem como a taxa de disparos das células dopaminérgicas nas regiões cerebrais envolvidas nas propriedades reforçadoras do álcool (LI *et al.*, 2001). Ao contrário dos estimulantes que possuem um efeito direto sobre a dopamina, o álcool age de forma indireta modulando neurotransmissores. Por exemplo, a administração aguda de álcool leva a inibição do GABA na ATV e NA, desinibindo os neurônios dopaminérgicos nesses locais. O uso crônico de álcool sensibiliza o sistema, levando a deficiência relativa de dopamina (KOOB; LE MOAL, 2001). A este respeito, existe uma hipótese postulando que os indivíduos vulneráveis para desenvolver alcoolismo possuem um tônus dopaminérgico central baixo (VOLKOW *et al.*, 2002).

Numerosos estudos em animais têm demonstrado o envolvimento do GABA em muitos efeitos comportamentais do etanol. Em geral, agentes que aumentam os

níveis de GABA cerebrais ou a atividade dos receptores GABA, aumentam a sensibilização aguda para o etanol e mantêm a preferência por etanol, enquanto drogas que diminuem a transmissão GABAérgica atenuam muitos efeitos agudos do álcool e reduzem a preferência por álcool em animais. O álcool influencia diretamente o receptor GABA_A mas seus efeitos nos neurônios GABAérgicos são modulados via outros mecanismos relacionados ao GABA (KRYSTAL *et al.*, 2006). Existem inúmeras medicações que atuam em receptores GABA_A usadas para tratar sintomas da síndrome de abstinência alcoólica (NUTT; ADINOFF; LINNOILA 1989).

O receptor glutamatérgico NMDA desempenha um importante papel nos efeitos neurofarmacológicos do álcool. O etanol é um antagonista desses receptores (HOFFMAN *et al.*, 1989). Uma série de estudos com quetamina, antagonista NMDA, produziu efeitos dose-dependentes semelhantes ao uso de álcool em pacientes alcoolistas em processo de desintoxicação (KRYSTAL *et al.*, 1998). A ketamina não estimulou a “compulsão” por álcool nos pacientes, apesar do “craving” ter sido associado com efeitos produzidos por outro antagonista NMDA, o dextrometorfano (SCHUTZ; SOYKA, 2000). Mudanças no receptor NMDA ou na sua função têm sido relacionadas com mudanças neurobiológicas associadas à dependência alcoólica, à síndrome de abstinência e aos fenômenos comportamentais como o “craving” (DAVIS; WU, 2001). O aumento do tônus glutamatérgico está associado com o consumo crônico de álcool e pode em parte ser atribuído ao aumento da atividade dos receptores NMDA, bem como dos receptores AMPA e kainato, os quais também são glutamatérgicos (JOHNSON, 2004).

Dados farmacológicos e comportamentais sugerem uma ligação entre o sistema opióide endógeno e o álcool. O álcool interfere com os neuropeptídeos opióides incluindo a liberação de opióides endógenos, e seu efeito é mais marcante em linhagens de animais que preferem álcool (FROEHLICH, 1997). Pacientes alcoolistas apresentam anormalidades nesse sistema de neuropeptídeos como a redução no plasma sanguíneo de opióides endógenos, por exemplo as beta-endorfinas, (GENAZZANI *et al.*, 1982).

A serotonina também parece estar envolvida no comportamento que leva ao consumo abusivo de álcool, tendo um efeito sinérgico com a dopamina (CREWS *et al.*, 2005). Por exemplo, o aumento dos níveis de serotonina nas sinapses ou o bloqueio de certos subtipos de receptores pode diminuir o consumo de álcool

(LEMARQUAND; PHIL; BENKELFAT, 1994). Existem evidências do envolvimento do sistema serotoninérgico em regular a ingestão de álcool (MCBRIDE; LI, 1998). Yoshimoto *et al.* (2000) mostram a relação do consumo de álcool com a atuação do sistema serotoninérgico da amígdala em mediar os efeitos agudos de doses moderadas a altas de álcool. Estes estudos mostraram que a ativação dos receptores 5-HT₃ dentro da amígdala está relacionada com a regulação da ingestão de álcool (MCBRIDE, 2002).

Outros estudos sugerem que a serotonina ajuda a regular o reforço, porque distúrbios no sistema serotoninérgico podem seletivamente afetar o consumo de substâncias recompensadoras como o álcool, outras drogas e substâncias de sabor doce (SELLERS; HIGGINS; SOBELL, 1992). Estudos laboratoriais encontraram anormalidades na atividade serotoninérgica associadas com o uso de álcool, alcoolismo e impulsividade. Estas anormalidades caracterizam-se pela diminuição dos níveis de serotonina e de seus metabólitos nos dependentes de álcool do tipo II, um grupo caracterizado pelo início precoce da ingestão do álcool e um significativo detrimento social relacionado ao alcoolismo (PETRAKIS; KRYSTAL, 1997). Estudos mostram que mudanças da função serotoninérgica influenciam as emoções humanas e os comportamentos decorrentes, indicando que a alteração de excitabilidade do circuito límbico em resposta a um estímulo emocional pode desencadear respostas de ansiedade e aumentar o risco para transtornos afetivos bem como para dependência do álcool (LESCH, 2005).

O sistema serotoninérgico está envolvido na depressão, ansiedade e alcoolismo. As propriedades reforçadoras do etanol, principalmente seus efeitos estimulantes e ansiolíticos, tanto quanto o desenvolvimento da dependência ao etanol tem sido relacionados ao sistema serotoninérgico (GOELDNER *et al.*, 2005).

Há um número considerável de relatos na literatura, além dos estudos já citados, nos últimos 20 anos, que demonstrou um envolvimento crítico da serotonina no controle da ingestão de etanol. Níveis diminuídos de serotonina central foram associados com alto consumo de álcool em humanos e em animais, por influenciar diretamente os efeitos do reforço do álcool, ou por ação indireta através da ação serotoninérgica sobre a dopamina (WILSON; NEIL; COSTALL, 1997, MCBRIDE, 1998, BOYCE-RUSTAY *et al.*, 2006, RISINGER; BOYCE, 2002, BONKALE, 2006, BROWN *et al.*, 2007). De acordo com Kari *et al.* (2004), receptores

serotoninérgicos estão envolvidos em vários comportamentos associados ao etanol, incluindo recompensa, síndrome de abstinência em humanos, primatas não-humanos e em roedores. Além desses comportamentos, níveis baixos de serotonina também levam a um comportamento impulsivo, incluindo uma incapacidade para modular a ingestão de álcool. Anormalidades serotoninérgicas também podem contribuir para a ansiedade, levando potencialmente a “uma automedicação” dos sintomas de ansiedade com o consumo de álcool (PETRAKIS; KRYSTAL, 1997).

No entanto, a literatura permanece ainda controversa no que diz respeito a associação entre a serotonina e a diminuição de consumo de álcool em humanos. Segundo Petrakis (2006), em estudos animais, a função serotoninérgica tem sido consistentemente associada à regulação da ingestão de álcool. Especialmente uma deficiência central serotoninérgica está correlacionada com alta ingestão de álcool. Além disso, a administração de agonistas serotoninérgicos ou de antagonistas de vários subtipos de receptores está associada com diminuição de ingestão alcoólica. Porém, para Petrakis, em contraste com os achados em estudos animais, a função serotoninérgica deficiente não está consistentemente evidenciada no abuso e na dependência de álcool em humanos. Algumas evidências científicas sugerem que a relação da serotonina com a neurobiologia da dependência de álcool pode ser seletivamente associada com um subtipo de pacientes, uma vez que a dependência é um transtorno heterogêneo (PETRAKIS, 2006)

A literatura também demonstra de maneira mais específica o envolvimento dos receptores 5-HT₂ no aumento do efeito excitatório do etanol sobre a excitabilidade neuronal. Esse aumento do efeito do etanol foi demonstrado com a utilização de agonistas 5-HT₂, 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI), metilserotonina, e clomipramina (BRODIE *et al.*, 1995; 1999) e houve reversão desse efeito através da utilização da ketanserina, que é um antagonista 5-HT₂ (TRIFUNOVIC; BRODIE, 1996). Esses estudos demonstraram que o receptor 5-HT₂ medeia importantes aspectos na farmacologia do etanol em camundongos, ratos e macacos. Em geral, um aumento da atividade do receptor 5-HT₂ está relacionado com a gravidade dos sintomas de abstinência em camundongos, com a ativação celular mesolímbica induzida por etanol em ratos e com a habilidade para discriminar os efeitos do etanol em macacos (BUCK *et al.*, 2004; MEERT *et al.*, 1991). O tratamento com baixas doses de ritanserina, um antagonista

serotoninérgico central 5-HT₂, rapidamente reverteu a preferência pela droga sem alterar a ingestão de líquido. De acordo com Brodie (2004), o estímulo dos neurônios dopaminérgicos da ATV pelo etanol é potencializada pela serotonina e por fármacos que agem no receptor serotoninérgico 5-HT₂. A co-administração de ritanserina com etanol preveniu o desenvolvimento da ansiedade induzida pela abstinência do álcool. (GATCH; WALLIS; LAL, 2000). Amperozide, um outro antagonista 5-HT₂, diminuiu o consumo de etanol em ratos, assim como tirospirone, também um antagonista 5-HT₂ com afinidade também para D₂, 5-HT₁ e 5-HT₇, diminuiu o consumo de etanol sem aumentar a ingesta alimentar em ratos. Por outro lado, Wilson, Neill e Costal (1998) demonstraram que a ativação de receptores centrais 5-HT₂ e também dos receptores 5-HT_{1a} e 5-HT_{1b}, reduz a ingesta de etanol.

Quanto ao envolvimento genético, estudos de caso controlados demonstram uma associação entre o polimorfismo no gene transportador da serotonina e o alcoolismo. Schuckit *et al.* (1999) constataram uma associação entre polimorfismo do gene para o transportador da serotonina e um menor nível de resposta ao álcool, variável considerada como uma possível mediadora da vulnerabilidade para o problema. Alguns outros estudos genéticos têm demonstrado que variações genéticas no receptor 5-HT_{2a} estão envolvidas no desenvolvimento do alcoolismo. (NAKAMURA *et al.*, 1999; HWU; CHEN, 2000; DOTTO, 2002).

Apesar de existirem muitos relatos na literatura, a exata natureza da relação entre serotonina e alcoolismo ainda é desconhecida. Segundo Daws e colaboradores (2006), a serotonina cerebral modula os efeitos neurais e comportamentais do etanol, porém isso ainda permanece pouco compreendido e, de uma maneira geral, segundo Gerlai (2006), alcoolismo é uma das doenças mais comuns e mais caras e cujos mecanismos neurobiológicos ainda não estão bem compreendidos.

1.4. Teorias da Dependência/ Adição

As alterações cerebrais e psicológicas que estão implicadas no desenvolvimento da adição podem ser explicadas por teorias como, por exemplo: 1) a tradicional visão hedônica, na qual adição é explicada pelo prazer de usar a droga assim como de evitar o desprazer causado pelos sintomas de abstinência. Esta teoria possui diferentes denominações na literatura, como Teoria do prazer-dor ou

dos processos oponentes reforçadores positivo e negativo, Teoria da homeostasia hedônica, Teoria da desregulação hedônica, etc (WIKLER, 1948; SOLOMON, 1977; KOOB *et al.*, 1998; KOOB; LE MOAL, 1997, 2001); 2) a Teoria do aprendizado aberrante que considera que a adição é decorrente de um aprendizado aberrante relacionado ao desenvolvimento de forte relação estímulo-resposta e de hábito; 3) a Teoria do rebaixamento do juízo crítico ou da impulsividade, que considera a adição como uma disfunção no sistema cortico-frontal, que normalmente regula a tomada de decisão e a inibição do controle sobre o comportamento, e 4) a Teoria do incentivo-sensibilização, na qual a sensibilização do sistema neural motivacional atribui uma saliência ao incentivo como causa da compulsão para usar a droga (ROBINSON; BERRIDGE, 1993). Essa última teoria baseia-se no aumento progressivo de respostas comportamentais e neuroquímicas após a administração repetida de etanol ou de outras drogas de abuso (OJANEN; HYYTIÄ; KIIANMAA; 2005). Essa exposição repetida da droga aumenta “sua característica motivacional” que leva ao desejo pela droga e procura compulsiva. Existem evidências demonstrando que ocorre aumento da auto-administração de drogas de abuso em animais sensibilizados, sugerindo que a sensibilização pode ser importante no processo de desenvolvimento da adição e recaída (OJANEN; HYYTIÄ; KIIANMAA; 2005). No entanto, um estudo realizado em nosso laboratório demonstrou que camundongos pré-sensibilizados com etanol e classificados como “sensibilizados” e “não sensibilizados”, não apresentaram diferenças quanto ao padrão de consumo de etanol quando expostos ao paradigma de livre escolha (BORGES *et al.*, 2006). Outros dados obtidos em nosso laboratório revelaram que camundongos expostos ao paradigma de livre escolha e classificados como “adictos” e “não-adictos”, e posteriormente desafiados com doses agudas de etanol, aumentaram a locomoção indistintamente, ou seja não apresentaram diferenças entre “adictos” e “não-adictos” (RIBEIRO *et al.*, 2008). Essas evidências sugerem que os neurocircuitos envolvidos no desenvolvimento da sensibilização são diferentes daqueles envolvidos no comportamento de procura a droga, o qual é determinante para a adição.

Sugere-se que a adição a drogas altera a atividade do núcleo accumbens que modula a função de incentivo sensibilização tornando o circuito neural hipersensível para efeitos específicos das drogas. A ativação do sistema psicocomotor tem sido avaliada para o estudo da sensibilização comportamental (MASUR; BOERNGEN,

1980; BOERNGEN-LACERDA; SOUZA-FORMIGONI, 2000). Vários estudos demonstram o aumento da atividade locomotora e sensibilização em roedores expostos ao etanol (CRABBE *et al.*, 1982). Os sistemas de recompensa relacionados com a ativação psicomotora envolvem o núcleo accumbens e o sistema dopaminérgico. Apesar da importância da neurotransmissão dopaminérgica, as manipulações farmacológicas com agonistas e antagonistas desse sistema em ensaios clínicos têm se mostrado ineficaz nas propriedades reforçadoras da cocaína (PULVERINTI *et al.*, 1998).

As mudanças envolvidas na sensibilização estão relacionadas com vários neurotransmissores incluindo a serotonina. Sabe-se que a exposição crônica ao etanol provoca mudanças neuroadaptativas no sistema serotoninérgico semelhantes às causadas pelo sistema dopaminérgico que contribuem para o comportamento compulsivo de procura pela droga (WEISS, 2000).

Alguns estudos demonstraram que dependentes alcoólicos do tipo II apresentam diminuição dos níveis de serotonina e de seus metabólitos (PETRAKIS; KRYSTAL, 1997). Outros dados sugerem que a serotonina ajuda a regular o reforço porque o consumo de substâncias reforçadoras, como o álcool e outras com sabor doce, são afetados por distúrbios no sistema serotoninérgico (SELLERS; HIGGINS; SOBELL, 1992). Já foi demonstrado que o aumento dos níveis de serotonina nas sinapses ou o bloqueio de certos tipos de seus receptores pode diminuir o consumo de álcool (LEMARQUAND; PIHL; BENKELFAT, 1994). A administração aguda de etanol aumenta a liberação de serotonina no núcleo accumbens enquanto a abstinência de etanol em ratos dependentes gera uma supressão da liberação (WEISS, 2000).

1.5. Modelos Animais de Dependência/ Adição

Nos modelos animais para drogas de abuso, dois objetivos principais são almejados. O primeiro deles visa estudar as conseqüências 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, ou de intubação gástrica, ou por injeção e até mesmo por inalação. O segundo objetivo visa estudar no animal o comportamento de procura à droga. Os modelos de comportamento de procura à

droga tentam demonstrar as propriedades reforçadoras das drogas, as quais se acredita desempenhem um papel central no desenvolvimento da dependência (SPANAGEL, 2000; MEISCH, 2001).

As ações farmacológicas primárias das drogas produzem reforço positivo e/ou negativo. O reforço positivo refere-se a um evento prazeroso que aumenta a probabilidade de resposta de procura à droga. As drogas de abuso são consideradas reforçadores positivos pela sua capacidade de induzir sensações de prazer ou de elevação do humor. O reforço negativo refere-se à propriedade de evitar um evento desagradável. Exemplos de reforçamento negativo pelas drogas de abuso incluem situações nas quais o indivíduo se automedica com a droga na tentativa de tratar um transtorno (depressão ou ansiedade) ou de aliviar um estado desprazeroso gerado pela droga (síndrome de abstinência). Os dois tipos de reforço podem ser responsáveis pelo comportamento de procura à droga, pelo desenvolvimento de dependência e pelo retorno ou recaída ao uso após períodos de abstinência (US DEPARTMENT, 2000).

Um outro tipo de reforçamento não relacionado às propriedades farmacológicas das drogas, mas que também possui propriedades motivacionais importantes, é conhecido como reforço condicionado. Esse reforço refere-se à capacidade dos indivíduos aprenderem a associar os efeitos reforçadores positivos e negativos das drogas com um evento ou estímulo inicialmente neutro. Por exemplo, uma pessoa entrar num bar habitualmente freqüentado por ele pode causar sentimentos/sensações positivos semelhantes aos induzidos pelo álcool. A associação de estímulos pode ocorrer também com situações aversivas como, por exemplo, associar um determinado ambiente com os aspectos desagradáveis da síndrome de abstinência (US DEPARTMENT, 2000).

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, modelos que estudam as propriedades reforçadoras negativas e modelos que tentam mimetizar aspectos diferentes da adição, como o uso compulsivo (craving), a recaída e a perda do controle sobre o uso. (SHIPPENBERG; KOOB, 2002; SPANAGEL, 2000).

1.5.1. Modelos que Estudam as Propriedades Reforçadoras Positivas

As drogas de abuso funcionam como estímulos reforçadores positivos, sendo essa sua propriedade a base conceitual para a auto-administração das drogas. Duas abordagens para o estudo da auto-administração das drogas são empregadas: a preferência oral e o comportamento operante. Na primeira abordagem, os animais têm, em suas gaiolas-casas, livre acesso à droga e escolhem livremente entre água e uma ou várias soluções contendo diferentes concentrações de droga. Normalmente, os animais devem escolher entre duas garrafas, uma contendo a droga, que pode ser adoçada ou não, e a outra contendo uma solução sem a droga. A proporção de droga ingerida em relação ao consumo total de líquidos é usada para caracterizar a preferência pela droga (CUNNINGHAM *et al.*, 2000). Esse modelo de preferência é mais utilizado para o estudo do álcool, inclusive tem sido usado como base para seleção genética entre animais que preferem (P - preferring, sP – Sardinian preferring) e os que não preferem álcool (NP – non-preferring, sNP – Sardinian non-preferring) o álcool (LI, 2000), mas também existem estudos usando cocaína (JENTSCH, 1998). A limitação desse tipo de modelo é que não se pode dizer que o fato do animal preferir a droga signifique que ele esteja dependente. Apenas é possível interpretar que o animal procura a droga quer seja por suas propriedades reforçadoras positivas, quer pelas negativas (por exemplo, esses animais selecionados geneticamente como P, são animais mais ansiosos e apresentam menores níveis de serotonina no SNC) (US DEPARTMENT, 2000).

Na abordagem que utiliza o condicionamento operante (auto-administração operante), a preferência entre água e droga também pode ser medida após treinar os animais para obter água ou droga pressionando uma de duas alavancas (uma para cada líquido) existentes na gaiola ou aprender a percorrer um túnel para obter a droga. A droga pode ser obtida por via oral, por intubação gástrica, por injeção intravenosa ou por injeção intracraniana, dependendo das características da droga e do esquema de condicionamento operante. Por exemplo, o álcool não pode ser administrado por via endovenosa ou intracraniana por ser difícil o controle seguro da sua dose. A quantidade da droga que o animal consome está relacionada à quantidade de trabalho que ele realiza. Esses estudos permitem avaliar não somente a preferência pela droga, mas também a motivação do animal para

trabalhar para obter a droga em diferentes condições e demonstram claramente as propriedades reforçadoras positivas das drogas (KOOB, 2000).

Outro modelo usado para estudar as propriedades reforçadoras positivas das drogas envolve o aprendizado de tarefa de preferência condicionada de lugar. Esse modelo é um procedimento de condicionamento clássico no qual a administração de uma droga por injeção é pareada com um ambiente determinado e a administração de placebo é pareada com um ambiente distinto. Após vários pareamentos, expõem-se os animais, sem ter recebido injeção, à mesma tarefa permitindo seu livre acesso aos ambientes e medindo o tempo gasto em cada ambiente e em cada acesso. Quando o animal escolhe passar a maior parte do tempo no ambiente pareado com a droga interpreta-se como uma medida direta do efeito reforçador positivo da droga. Drogas com propriedades aversivas apresentarão efeito contrário, ou seja, os animais permanecerão menos tempo no ambiente pareado com a droga. Drogas que produzem preferência condicionada para ambientes associados à droga são aquelas que funcionam como reforçadores positivos em outros paradigmas (SHIPPENBERG; KOOB, 2002).

1.5.2. Modelos que Estudam as Propriedades Reforçadoras Negativas

A retirada de uma droga após uso crônico prolongado, normalmente é caracterizada por respostas opostas às ações agudas iniciais da droga, sendo denominada de síndrome de abstinência. Quando esta se manifesta, considera-se que o indivíduo está dependente físico. Os sintomas presentes naquela síndrome são na maioria aversivos ao indivíduo que os experimentam. Postula-se que o retorno ao uso da droga após a experiência da síndrome de abstinência ou para evitá-la representaria uma das propriedades reforçadoras negativas das drogas. Vários modelos animais têm abordado esse fenômeno, seja induzindo uma dependência física através da administração forçada da droga (inalação em uma câmara, infusão intragástrica, dieta líquida balanceada contendo a droga como única fonte de líquido e alimento), ou da ingestão voluntária por condicionamento operante ou não. Quando o animal desenvolve a dependência física e então, apresenta a síndrome de abstinência quando a droga é retirada, observa-se que o consumo na reapresentação da droga pelos animais dependentes é maior do que pelos não-dependentes, mesmo quando os sintomas da abstinência são brandos. As respostas

dos animais ao longo de sessões de abstinência tornam-se mais estáveis, sugerindo que eles aprendem a responder de uma forma controlada para minimizar e evitar os sintomas da abstinência (US DEPARTMENT, 2000).

Também se pode avaliar as propriedades reforçadoras negativas das drogas em modelos de aversão condicionada de lugar. Este teste assemelha-se ao já descrito no item anterior como preferência condicionada de lugar, diferindo quanto ao pareamento de estímulos. No modelo de aversão condicionada de lugar pareia-se um ambiente determinado com a manifestação da síndrome de abstinência e um outro ambiente com a ausência da síndrome. Este modelo tem sido descrito na literatura para o estudo dos opiáceos (SHIPPENBERG; KOOB, 2002).

Modelos que consideram os efeitos discriminantes das drogas também têm sido usados para estudar as propriedades reforçadoras negativas. Animais dependentes de diazepam, opiáceo ou álcool foram treinados a discriminar entre salina e pentilenotetrazol, uma droga ansiogênica. Durante a fase de abstinência daquelas drogas para as quais estavam dependentes, os animais generalizaram para as pistas do pentilenotetrazol, sugerindo a presença do componente de ansiedade na abstinência. (BRANDT; FRANCE, 1998; EMMETT-OGLESBY *et al.*, 1990)

Modelos para avaliar ansiedade em animais, como o labirinto em cruz elevado, caixa claro-escuro, enterrar objetos, interação social, entre outros, também são empregados para avaliar as propriedades reforçadoras negativas de algumas drogas que causam efeito ansiolítico, como o etanol e o diazepam. Desta forma, pode-se estudar o efeito ansiolítico manifestado após a administração aguda ou crônica destas drogas, além da sua presença na síndrome de abstinência. (BOERNGEN-LACERDA; SOUZA-FORMIGONI, 2000).

1.5.3. Modelos de Adição: Procura à Droga, Uso Compulsivo e Recaída

Durante os últimos 20 anos, foram desenvolvidos novos modelos animais propostos para estudar o *craving* (desejo persistente pelo álcool), a recaída e a perda de controle, que são componentes humanos subjetivos da dependência (HEYMAN, 2000; PHILLIPS, 2002; SHIPPENBERG; KOOB, 2002; SPANAGEL, 2003).

Um dos critérios para o diagnóstico da dependência é a perda do controle sobre a ingestão da droga. Comportamentos compulsivos e de procura descontrolada da droga podem ocorrer mesmo após longos períodos de abstinência e estão normalmente associados ao uso compulsivo e à recaída.

Modelos de consumo aumentado da droga após exposição prolongada têm permitido estudar a transição entre uso moderado e controlado para uso excessivo e descontrolado. Esses modelos têm sido descritos para cocaína, opiáceos e álcool. Nestes modelos, várias abordagens experimentais têm sido empregadas: auto-administração intravenosa, intracraniana e oral, auto-administração operante ou por livre escolha, ou até administrar previamente de maneira forçada para induzir síndrome de abstinência e então reapresentar a droga para sua auto-administração (AHMED; KOOB, 1998; AHMED; KOOB, 1999; AHMED; WALKER; KOOB, 2000; ROBERTS *et al.*, 2000).

O modelo de condicionamento operante, já descrito, é utilizado nessa abordagem para avaliar o comportamento de procura pela droga, analisando-se a motivação do animal para obter a droga (CUNNIGHAM *et al.*, 2000; TABAKOFF; HOFFMAN, 2000). Primeiramente, os animais são treinados para realizar uma determinada tarefa (normalmente pressionar uma alavanca) para receber a droga. Então, ajusta-se o número de vezes que o animal precisa pressionar a alavanca para receber uma quantidade de droga (taxa de reforço variável) e assim é possível estudar a disposição dos animais em “trabalhar” para conseguir a droga. Depois que os animais aprendem a executar a tarefa, a droga é retirada e os animais, normalmente, param de pressionar a alavanca. Na etapa seguinte, apresentam-se diferentes estímulos aos animais para avaliar se algum deles faz com que o animal recupere seu comportamento de procura pela droga (pressionar a alavanca). O estresse, injeções com pequenas quantidades da droga (*priming*) e estímulos condicionados pareados previamente com a administração da droga são capazes de gerar a reinstalação do comportamento de procura pela droga. É conhecido que em modelos de condicionamento clássico os estímulos ambientais repetidamente pareados com reforçadores primários podem adquirir propriedades de incentivo (MCFARLAND; ETTEMBERG, 1997; SEE *et al.*, 1999; WEISS *et al.*, 2000). Tem sido postulado que esses efeitos reforçadores condicionados contribuiriam para o *craving* pela droga e para a recaída da dependência. Estudos em humanos também têm

demonstrado que a apresentação de estímulos previamente associados à droga promove aumento na probabilidade de recaída e também de relatos de *craving* e de motivação para obter a droga demonstrando a analogia desses modelos com o que se observa em humanos (CHILDRESS *et al.*, 1988; O'BRIEN *et al.*, 1992).

Esse tipo de modelo foi inicialmente desenvolvido para auto-administração intravenosa de estimulantes e opióides (AHMED; KOOB, 1998; AHMED; KOOB, 1999; AHMED; WALKER; KOOB, 2000; ALTSHULER; PHILLIPS; FEINHANDLER, 1980) e, mais recentemente foi aplicado para a auto-administração oral de álcool (COLOMBO, 1997; COPER; ROMMELSPACHER; WOLFFGRAMM, 1990; CRABBE; WAHLSTEN; DUDEK, 1999). Esses modelos têm sido empregados para estudar possíveis medicamentos *anti-craving* e anti-recaída. No entanto, não se pode afirmar que os animais submetidos a esses modelos estejam verdadeiramente dependentes ou adictos, uma vez que a resposta que eles exibem para consumir álcool ou outras drogas não é controlada por comportamentos normais do seu repertório (SPANAGEL, 2000).

No modelo de auto-administração por livre-escolha, os animais podem escolher entre água e soluções da droga em diferentes concentrações em suas gaiolas-casas. Após um período prolongado de livre acesso à droga segue uma fase de privação (abstinência) onde os animais permanecem abstinentes por alguns dias ou até semanas. Em seguida, todas as soluções contendo droga são então novamente oferecidas. Este procedimento é repetido várias vezes num período normalmente de um ano (SPANAGEL; HÖLTER, 2000; SPANAGEL, 2000). A reapresentação das soluções da droga leva a um aumento temporário no seu consumo e na preferência que é chamado de efeito da privação da droga. Nessa fase os animais consomem maiores quantidades das soluções da droga da mais alta concentração, ocorre ainda uma alteração no ciclo diário normal dos animais, que passam a ingerir a droga durante a fase clara do dia, na qual os animais costumam permanecer mais inativos.

Também naqueles modelos nos quais os animais precisam executar uma tarefa para receber a droga como recompensa, demonstra-se que o consumo e a preferência pela droga aumentam após uma fase de privação. Os efeitos experimentados durante a fase de privação da droga representam uma situação de

aumento da motivação para trabalhar para obtê-la, o que é compatível com a definição de *craving*.

Por último, entre esses modelos, um deles proposto por WOLFFGRAMM e HEYNE (1995) e WOLFFGRAMM e colaboradores (2000) será descrito em maiores detalhes, pois o presente trabalho é baseado no mesmo.

Esse modelo utiliza ratos expostos a um paradigma de auto-administração oral por livre escolha. Os animais têm livre acesso à água e a diferentes soluções de etanol com concentrações de 5, 10 e 20 % em suas gaiolas-casas individuais. Esta múltipla escolha é necessária, pois cada rato tende a preferir uma certa concentração e assim, oferecer uma escolha binária entre água e uma única concentração de álcool, por exemplo 10%, poderia levar a resultados enganadores. 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 seqüência, cada rato desenvolve seu padrão individual de consumo que permanece estável durante vários meses (WOLFFGRAMM, 1990). Esta fase é chamada de fase de consumo controlado. Após 6 meses de acesso contínuo ao álcool, os ratos gradualmente modificam seu padrão sendo que alguns apresentam aumento do consumo nos meses subseqüentes (fase de aumento da demanda). Os animais, então, são submetidos a um longo período de abstinência de 9 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.

Além disso, o comportamento aditivo, definido por uma perda de controle sobre a ingestão de álcool, pode ser testado através da adulteração do sabor com quinino que produz um sabor amargo aversivo. Esta adulteração das soluções de álcool reduz substancialmente o consumo nos animais não-adictos, enquanto que, animais adictos reduzem pouco a ingestão de álcool, de modo que seu consumo e preferência pelo etanol continuam significativamente maiores do que os dos animais controles. Esse modelo utilizado por WOLFFGRAMM (1990) foi validado para camundongos em nosso laboratório (FACHIN-SCHEIT *et al.*, 2006), com a droga naltrexona, antagonista opióide considerada *anti-craving* em alcoólicos 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 seu padrão de consumo. Estes dados foram interpretados como a naltrexona sendo antagonista das propriedades reforçadoras positivas do álcool, porém sem efeito *anti-craving* (FACHIN-SCHEIT *et al.*, 2006).

1.6. Medicamentos Utilizados para Tratamento do Alcoolismo

Existem atualmente alguns fármacos que são utilizados como adjuvantes no tratamento do alcoolismo, como por exemplo o dissulfiram. Esse fármaco causa sensações extremamente desagradáveis após o consumo de álcool, devido ao acúmulo de acetaldeído, por inibir a enzima aldeído-desidrogenase (LIMA, 2003).

Alguns estudos têm focado seus alvos em agentes com ações específicas na função dopaminérgica. Agonistas e antagonistas dopaminérgicos têm sido testados, o primeiro na tentativa de diminuir a ingestão de álcool por mimetizar seus efeitos reforçadores; e o segundo na tentativa de bloquear os efeitos prazerosos do álcool, porém todos sem sucesso (MARRA *et al.*, 2002). A falta de eficácia pode ser em parte devido à interação de outros neurotransmissores na liberação de dopamina.

O antagonista opióide, naltrexona, afeta indiretamente a transmissão dopaminérgica por agir em receptores μ -opióides e tem aprovação do FDA para tratamento do alcoolismo desde 1994. Estudos pré-clínicos e clínicos foram realizados com o naltrexone e os resultados foram controversos. Alguns estudos clínicos como o de Volpicelli *et al.* (1992) demonstraram que a naltrexona foi capaz de diminuir o “craving” e as recaídas, utilizando psicoterapia em conjunto. Outros estudos têm sugerido que outros fatores como história familiar (MONTEROSSO *et al.*, 2001) ou genética pode influenciar na eficácia do naltrexone (OSLIN *et al.*, 2003). Além disso, um estudo em nosso laboratório demonstrou que a naltrexona foi capaz de diminuir o consumo de etanol somente em camundongos com um padrão de bebedores pesados e não naqueles com padrão de adictos (FACHIN-SCHEIT *et al.*, 2006). Outro antagonista opióide, o nalmefeno, tem demonstrado diminuir as recaídas em consumidores pesados se comparado com placebo em um estudo clínico randomizado (MASON *et al.*, 1994) e possui a vantagem de ser menos hepatotóxico que a naltrexona.

Algumas linhas de pesquisa sugerem que medicações que interferem na transmissão glutamatérgica podem auxiliar na prevenção da recaída em dependentes de álcool. Por exemplo, medicações que agem no receptor NMDA podem reduzir o consumo de álcool por dois modos: os agonistas podem atenuar as propriedades reforçadoras do álcool e os antagonistas podem suprimir sintomas da síndrome de abstinência ou “craving”. O Acamprosato diminui a liberação do glutamato, diminui o influxo de cálcio, diminui a excitabilidade dos receptores NMDA, aumenta os níveis de taurina (MASON, 2001). O receptor NMDA contribui para os efeitos da intoxicação, os cognitivos e os indutores de dependência do álcool. O acamprosato reduz a intensidade do *craving* na abstinência quando da exposição a situações de alto-risco para beber, no caso, pistas condicionadas (WEINSTEIN *et al.*, 2003).

Anticonvulsivantes, como o topiramato, que aumentam a atividade GABA e diminuem a função glutamatérgica também podem ser usados no tratamento do alcoolismo. O topiramato pode suprimir a síndrome de abstinência aguda do álcool e conseqüentemente facilitar a manutenção da abstinência. No entanto, a eficácia do topiramato no tratamento da síndrome de abstinência alcoólica ainda não está bem estabelecida (PETRASKI, 2006).

Alguns estudos com anticonvulsivantes que agem nos receptores GABA, com os que interferem com o glutamato ou com os que interferem na excitabilidade dos canais iônicos demonstram redução da ingestão de etanol e do “craving”. Em estudos animais, os anticonvulsivantes têm sido relacionados com a diminuição da ingestão de álcool (GARDELL *et al.*, 1998). Na clínica, o uso de carbamazepina durante a fase de desintoxicação tem sido associado com a diminuição do “craving” e do consumo de álcool, em pacientes com múltiplas histórias de desintoxicações (MALCOLM *et al.*, 2002).

Substâncias que interferem com os níveis ou com os receptores da serotonina representam medicamentos potenciais para o alcoolismo. Um grande número de estudos tem demonstrado que vários agonistas que agem nos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B/1D} e 5-HT_{2C}; antagonistas 5-HT₃ e inibidores da recaptção de serotonina bloqueiam o consumo de álcool e reduzem os sinais da retirada em muitas espécies animais (LEMARQUAND; PIHL; BENKELFAT, 1994; HALLIDAY; BAKER; HARPER, 1995). O antagonista dos receptores 5-HT₃, ondansetrona, é uma promessa na

farmacoterapia para o alcoolismo. Estudos pré-clínicos têm mostrado que alguns dos efeitos neuroquímicos e comportamentais do álcool são modulados pelos receptores 5-HT₃ cerebrais (JOHNSON; AIT-DAOUD, 2000). Alguns estudos demonstraram ser a ondansetrona superior ao placebo em reduzir o consumo e melhorar a abstinência em alcoolistas (KRANZLER *et al.*, 2003).

Dados laboratoriais e clínicos mostram, também, que o tratamento crônico com antidepressivos que inibem seletivamente a recaptação neuronal de serotonina (SSRI) reduz a ingestão de etanol, presumivelmente porque facilita a neurotransmissão mediada por serotonina. Os níveis reduzidos do 5-HIAA no líquor estão associados a maior impulsividade, favorecendo comportamentos de risco, inclusive o abuso de drogas. Assim, a serotonina parece refrear o comportamento de auto-administração de várias classes de drogas, propriedade esta que pode ter implicações terapêuticas (GRAEFF, 2001).

1.7. Mianserina

A mianserina é um agente antidepressivo para uso oral, quimicamente denominado como monoclóridrato de 1, 2, 3, 4, 10, 14b-hexahidro-2-metildibenzo [c, f] pirazino [1, 2, a] azepina, não-relacionado com os antidepressivos tricíclicos (ADTs). Ela possui uma estrutura tetracíclica cuja ação farmacológica é diferente da de outras drogas antidepressivas. O clóridrato de mianserina não possui a atividade anticolinérgica dos ADTs, devido à ausência de cadeia lateral básica em sua estrutura (BAUMANN; MAITRE, 1977).

A mianserina bloqueia os receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} e os receptores α_2 -adrenérgicos com aproximadamente igual afinidade. Ela também é um antagonista 5-HT₃ com afinidade mais baixa para esse receptor (Marek, 2003). Essa droga é um potente antihistamínico, agindo nos receptores de histamina H₁ e H₂. Além disso, é um fraco antagonista muscarínico (PIETREZAK, 2002). A mianserina é efetiva em pacientes com depressão leve, sendo que o efeito antidepressivo evidencia-se em 2-3 semanas de uso. Ela é metabolizada no fígado, e o principal metabólito plasmático é a dimetil mianserina, que é um fraco inibidor da recaptação de noradrenalina. Além disso, tem efeito ansiolítico e sedativo. Apesar de efeitos cardíacos documentados em vários estudos animais, essa droga demonstrou ser

bastante segura clinicamente. Há apenas um relato de caso de arritmia cardíaca em pacientes tratados com mianserina na literatura. Nesse caso relatado, após a descontinuação da mianserina a arritmia desapareceu (HAINE , 2006)

Há poucos dados na literatura e poucas observações clínicas sobre a administração combinada de mianserina e etanol, e os resultados publicados não são consistentes. Meert (1994) demonstrou que a mianserina diminui os sintomas de abstinência em ratos. Outros autores demonstraram no teste do labirinto em cruz elevado, que a mianserina diminui os sinais de ansiedade em ratos durante o período agudo de abstinência (PRATHER; REZAZADEH; LAL, 1991). Resultados similares foram obtidos por outros autores no teste de campo aberto em ratos (LAL; PRATHER; REZAZADEH, 1993). Nos estudos clínicos, a mianserina não altera a influência do álcool na função psicomotora, no aprendizado e na MEMÓRIA (MATTILA; LILJEQUIST; SEPPALA; 1998). Outros autores demonstraram que a mianserina administrada em dependentes de álcool diminui a compulsão por beber álcool (IVANTES *et al.*, 1996).

De acordo com Pietrzak e Kubik-Bogucka (2002) a administração única de mianserina associada à administração de etanol em coelhos, potencializa os efeitos centrais do etanol, ou seja, potencializa a toxicidade, influencia o desempenho dos animais no rota-rod, aumenta a hipotermia induzida pelo etanol, prolonga o tempo de sono induzido pelo etanol, e aumenta a influência do etanol no EEG. Também foi demonstrado que a mianserina inibe a atividade estimulante do etanol na motilidade de ratos. Kameyama *et al.* (1985) mostraram em seus experimentos com ratos que a mianserina, tanto na administração crônica como aguda, não influencia na atividade locomotora após eletrochoque. Por outro lado, Stromberg e Matilla (1987) em seu estudo clínico, avaliaram a atividade psicomotora em voluntários após a administração do álcool e da mianserina. A administração combinada de ambos, etanol e mianserina, diminuiu a atividade nesses testes quando comparada com a administração de cada um em separado. Parece que a interação da mianserina com o etanol é farmacodinâmica. A atividade central da mianserina é bastante complexa e ainda não foi completamente explicada. Da mesma maneira, o etanol tem mecanismo central múltiplo, podendo a interação entre essas duas drogas ocorrer em vários níveis, não podendo ser excluída a interação farmacocinética. Cott e Ogren (1980) mostraram que a administração de mianserina associada ao etanol,

em ratos, aumenta a concentração sanguínea do etanol. Entretanto, não há nenhuma observação desta interação em estudos clínicos. Ainda não há relatos na literatura da influência da mianserina no sistema do citocromo P450. Após a administração crônica de mianserina foi observado aumento do turnover de noradrenalina no sistema nervoso central e a diminuição da atividade das catecolaminas, sem alterar a sensibilidade dos receptores beta-adrenérgicos. De acordo com Pietrzak e Kubik-Bogucka (2002) a administração de mianserina por 14 dias não alterou a ação central do etanol com exceção da diminuição da influência estimulante do etanol na motilidade, em ratos. A hiperomotilidade que acontece com a administração crônica do etanol se deve ao aumento da liberação de dopamina. As diferenças que foram encontradas relacionadas a doses agudas e crônicas de mianserina com a administração concomitante do álcool podem ocorrer devido alterações adaptativas dos receptores de dopamina (ANJI et al., 2000). Da mesma maneira, os efeitos ansiolíticos da mianserina na abstinência alcoólica parecem ser promissores. Prather, et al., 1991, estudaram o efeito da administração de uma única dose de mianserina, levando a dessensibilização de receptores 5-HT_{2c}, questionando se a mesma poderia agir no comportamento ansiogênico da abstinência do etanol observada no labirinto em cruz elevado, em ratos. A injeção prévia de mianserina, i.p., reduziu o comportamento ansiogênico, administrada 48 horas ou 7 dias antes do teste.

Risinger e Oakes (1996) demonstraram em camundongos a influência da mianserina (10mg/kg) na propriedade reforçadora do etanol num paradigma de preferência condicionada de lugar. A mianserina co-administrada com etanol aumentou a aquisição de preferência pelo etanol, enquanto que a mianserina administrada sozinha não produziu preferência ou aversão condicionada de lugar. Esses resultados sugerem que o bloqueio do receptor 5-HT₂ aumenta o efeito reforçador do etanol.

Existem vários estudos com outros agonistas e antagonistas serotoninérgicos relacionados com o consumo de álcool. Estudos com FG5606 (amperozide), relataram que esse antagonista 5-HT₂ atenuou significativamente o consumo de etanol, sem modificar a ingestão de alimento, tanto em ratos induzidos a beber e pré-tratados com cianamida (MYERS; LANKFORD; BJÖRK, 1992) como em ratos que preferem álcool (MYERS; LANKFORD; BJÖRK, 1993b), os quais chegam a um

consumo de 11g/kg de 25% de etanol diário. Long *et al.* (1996) demonstraram que o FG5865, que possui propriedades agonistas 5-HT₁ e antagonistas 5-HT₂ com igual afinidade, reduziu a ingestão de álcool de maneira dose dependente em ratos HAD (high alcohol drinking), que apresentam alto consumo de etanol, sem alterar o consumo de água, comida ou peso do animal. Outros agonistas 5-HT₁ também diminuem a preferência por álcool (PRIVETTE *et al.*, 1988), porém antagonistas 5-HT₁ não aumentaram o consumo (KOSTOWSKI; DYR, 1992), sugerindo uma ação combinada em ambos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT₂ para modificar o componente serotoninérgico.

Monti e Alterwain (1991) relataram que a ritanserina, outro antagonista 5-HT₂ diminuiu a compulsão por álcool em pacientes alcoolistas. Wilson, Neill e Costall (1998) investigaram o efeito de agonistas e antagonistas dos receptores serotoninérgicos sobre o consumo de etanol num paradigma de auto-administração de etanol em ratos fêmeas Sprague-Dawley (SD). Esses autores verificaram que a d-fenfluramina (liberador de serotonina), a fluoxetina (ISRS), a bupirona (agonista parcial 5-HT_{1A}), O TFMPP (agonista 5-HT_{1B} / 5-HT_{2C}) e o DOI (agonista 5-HT_{2A} / 5-HT_{2C}) reduziram o consumo de etanol sem alterar a atividade locomotora. As doses mais altas dos antagonistas metergolide (5-HT₁ / 5-HT₂) e ritanserina (5-HT_{2A} / 5-HT_{2C}) também diminuíram o consumo de etanol, porém concomitantemente com a redução da atividade locomotora, sugerindo um efeito inespecífico em reduzir o comportamento geral e a função motora. Além disso, relataram que a administração de serotonina e ondansetrona (antagonista 5-HT₃) não influenciaram no consumo de etanol. A falta de efeito da serotonina sugere que o sistema serotoninérgico periférico não está envolvido nas propriedades reforçadoras do etanol, já que a serotonina administrada periféricamente não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (OLDENDORF, 1971). Os resultados obtidos com a ondansetrona, também diferem de outros estudos que relatam a redução do consumo voluntário de etanol em ratos (Tomkins; Le; Sellers, 1995) e com relatos de que essa substância diminui o desejo de beber em humanos (SELLER *et al.*, 1994). Os resultados obtidos por Wilson, Neill e Costall (1998) com a d-fenfluramina e a fluoxetina demonstraram que o aumento nos níveis de serotonina sináptico/extracelular tem um efeito seletivo na redução do consumo do etanol e manutenção do comportamento. Autores como Lu *et al.* (1993, 1994) também demonstraram que a d-fenfluramina e a fluoxetina

foram mais efetivos na redução da ingestão de etanol se comparado com água ou sacarose. Em um outro estudo, o tratamento crônico com outros ISRS também atenuou a auto-administração de etanol em camundongos (GULLEY *et al.*, 1995). Também foi relatado por outros autores que outro ISRS, a sertralina, foi capaz de atenuar o comportamento de procura de etanol em pacientes alcoolistas (GEORGE *et al.*, 1994). Esses dados sugerem um importante papel do sistema serotoninérgico nas propriedades reforçadoras do etanol, da mesma forma que os resultados obtidos com a buspirona ao agir no receptor 5-HT_{1A}. Alguns estudos com 8-OH-DPAT, agonista 5-HT_{1A}, demonstraram que a redução no consumo de etanol foi restrita para ratos que possuem alta preferência por etanol, não ocorrendo o mesmo para ratos com baixa preferência por etanol, sugerindo uma interferência somente nos efeitos reforçadores positivos do etanol (SVENSSON *et al.*, 1989). Os resultados obtidos por Wilson, Neill e Costall (1998) com DOI e TFMPP também já foram observados em outros estudos (MCBRIDE *ET AL.*, 1990; SELLERS; HIGGINS; SOBELL, 1992) e também sugerem o envolvimento dos receptores 5-HT_{2C} e 5-HT_{1B} nas propriedades reforçadoras do etanol. Mais recentemente, foi verificado que camundongos do tipo selvagem que não expressam o gene para o receptor 5-HT_{1B} possuem um consumo elevado de etanol (CRABBE *et al.*, 1996). Os resultados obtidos por Wilson, Neill e Costall (1998) com os antagonistas metergolide e ritanserina, os quais não foram efetivos em diminuir o consumo de etanol, exceto nas doses mais altas e juntamente com a redução da função motora, estão de acordo com alguns estudos realizados com a ritanserina usando ratos Sardinian que preferem etanol (PANOCKA *et al.*, 1993a) e outro utilizando ratos machos Sprague-Dawley (SD) (MYERS; LANKFORD, 1993a). Entretanto, contrastam com os resultados obtidos por PANOCKA *et al.*, (1993b), que demonstrou que a ritanserina injetada diretamente no núcleo accumbens, diminuiu o consumo de etanol 3% em ratos Wistar. Assim como a ritanserina foi capaz de diminuir a preferência por etanol 3% em ratos machos SD (LIN; HUBBARD, 1994). Wilson, Neill e Costall (1998) atribuem essa controvérsia de resultados a diferenças na linhagem de animais e conseqüentemente nos níveis de serotonina e/ou ao paradigma utilizado. Maurel *et al.* (1998) avaliaram o efeito do agonista 5-HT₂ DOI (mesma afinidade para subtipos A e C), do mCPP, agonista 5-HT_{2C} e 5-HT_{1B} (afinidade relativamente mais alta para o subtipo 1B); da ritanserina (antagonista 5-HT₂) e do MDL 100,907 (antagonista

específico 5-HT_{2A}), na preferência por etanol e no comportamento consumatório de ratos cAA. Nesse estudo o DOI reduziu ingestão e preferência por etanol sem alterar o comportamento consumatório geral, sugerindo efeito seletivo para o álcool. Enquanto que o mCPP reduziu o consumo de álcool não seletivamente, pelo fato de suprimir o comportamento consumatório geral. Esses dados sugerem que a ativação dos receptores 5-HT_{2A} leva a redução do consumo de álcool e ativação dos receptores 5-HT_{2C} e 5-HT_{1B} diminui o comportamento consumatório. Ainda nesse trabalho, verificou-se que o pré-tratamento com ritanserina e com MDL100, 907 bloqueou a redução do consumo de álcool para o DOI, mas não para o mCPP, propondo que o efeito anti-álcool do DOI se deve a ativação dos receptores 5-HT_{2A} e que o efeito supressor gerado pelo mCPP não se deve a estimulação desses receptores.

2. JUSTIFICATIVA

O alcoolismo é um problema social que afeta milhões de pessoas e, apesar de vários medicamentos terem sido propostos para o tratamento, ainda não existem drogas eficazes para controlar a compulsão e a recaída. Diante da possível eficácia de antagonistas 5-HT₂ na redução do consumo de etanol, porém ainda com certa controvérsia, torna-se evidente a importância do estudo com a mianserina num modelo de adição por álcool.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito de um antagonista do receptor serotoninérgico subtipo 5-HT₂, a mianserina, no consumo de etanol em animais que perderam o controle sobre esse consumo.

3.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar os diferentes padrões de consumo de etanol visando a classificação dos animais em “adictos” e “não adictos”.
- Caracterizar os diferentes perfis comportamentais na fase de abstinência de etanol visando auxiliar na classificação dos animais em “adictos” e “não adictos”.
- Avaliar o consumo de água nos animais tratados com mianserina para verificar se o efeito da mianserina é específico sobre o consumo de etanol ou se atua no comportamento consumatório geral.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados 70 camundongos machos Swiss adultos provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os camundongos foram isolados em gaiolas de plástico medindo 20x30x20 cm e mantidos em sala com temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, sob ciclo claro-escuro de 12 horas e alimentação *ad libitum*.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPR sob parecer número 188.

4.2. Equipamentos

4.2.1. Caixa de Movimentação Espontânea

Construída com aço escovado e acrílico, consiste em uma caixa medindo 60x20x30 cm, com três paredes em aço e uma (anterior) em acrílico transparente escuro. O assoalho é formado por barras de aço de 0,5 cm de diâmetro separadas entre si por 1 cm, e o teto de aço (tampa removível). Três células fotoelétricas registram o número de interrupções do feixe luminoso, quando o animal se movimenta no interior da caixa, fornecendo o parâmetro ambulação. O animal foi colocado no centro da caixa e observado por 3 minutos. Foram cronometrados o tempo de auto-limpeza (*grooming*) e o tempo que o animal permaneceu parado (*freezing*) no decorrer do teste. Foram contados o número de elevações nas patas posteriores (*rearing*) e o número de ambulações (Masur; Boerngen, 1980).

4.2.2. Labirinto em Cruz Elevado

Construído em madeira e pintado com tinta óleo cor cinza, elevado 50 cm do piso, apresentando dois braços abertos e opostos medindo 30 x 5 cm cada, e cruzados perpendicularmente por outros dois braços do mesmo tamanho, porém fechados nas suas três faces externas com paredes de 40 cm de altura. Possui uma área central de 25cm^2 delimitada pelos quatro braços. A iluminação da sala de 1,5 m x 1,5 m é feita por uma lâmpada vermelha de 40 watts colocada a 120 cm acima do labirinto. Os camundongos foram colocados individualmente na área central do labirinto e observados por 3 minutos, sendo a latência para entrar em um dos braços cronometrada. O tempo de permanência tanto no braço aberto como no braço

fechado foi cronometrado. O número de entradas no braço aberto e no fechado foi contado. Foi considerada uma entrada a partir do momento em que o animal colocou as quatro patas em um dos braços do labirinto. O tempo em que o animal permaneceu na área central do aparelho foi calculado a partir das outras medidas (LISTER, 1987).

4.2.3. Campo Aberto

Construído com piso de madeira e paredes de aço escovado com 50 cm de altura delimitando uma área circular de 1 m de diâmetro sendo o assoalho pintado de branco, subdividido com linhas pretas traçadas através de dois círculos concêntricos com várias linhas radiais formando figuras semelhantes a trapézios com aproximadamente 20 cm de lado. A um metro acima do assoalho há quatro lâmpadas de 100 watts cada. Cada animal foi colocado no centro da arena e o seu comportamento quantificado durante 3 minutos. Os parâmetros registrados foram os seguintes: número de “quadrados” invadidos (ambulação) e de elevações nas patas posteriores (*rearing*), e os tempos de imobilidade (*freezing*), de auto-limpeza (*grooming*) e de latência para abandonar o centro da arena no início do teste (WALSH; CUMMINS, 1976).

4.3. Drogas

Ao longo da exposição dos camundongos à livre escolha foi utilizado álcool etílico P.A. a 95% (laboratório VETEC) diluído em água nas proporções de 5 e 10% (v/v). 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-SCHEIT, 2006). A mianserina, cedida pelo laboratório Organon, foi diluída em solução salina e administrada por via intraperitoneal nas doses de 2,5; 5,0 e 10,0 mg/kg.

As doses escolhidas foram baseadas em outros trabalhos com uso de mianserina (PIETRZAK; KUBIK-BOGUCKA, 2002).

4.4. Procedimento

4.4.1. Avaliação Comportamental Basal

Os setenta camundongos após ambientação por 5 dias no laboratório, passaram por uma avaliação basal antes do início da exposição ao modelo de livre escolha. Os animais foram expostos à caixa de movimentação espontânea, ao labirinto em cruz elevado e ao campo aberto para uma avaliação comportamental basal (Teste Basal). Vinte e quatro horas após esses testes, os animais foram acondicionados em suas gaiolas individuais e expostos ao modelo de livre escolha.

4.4.2. Modelo de Adição por Auto-Administração por Livre Escolha

Um grupo com 60 camundongos (n=60) foi isolado e submetido a um período de 70 dias (10 semanas - fase de livre escolha), com livre acesso às soluções de etanol 10% e 5% e à água, contidas em garrafas separadas. Um grupo controle com 10 camundongos (n=10) teve acesso somente à água.

As posições das garrafas foram mudadas a cada dois dias e o consumo dos líquidos medidos volumetricamente, sendo as soluções descartadas e repostas nessas ocasiões.

Em seguida, as soluções de etanol foram retiradas por 2 semanas deixando somente água disponível - fase de abstinência.

Uma segunda avaliação comportamental foi realizada 5 horas após a retirada das soluções de etanol - Teste na Abstinência. O grupo controle também passou pelos 3 testes comportamentais novamente. Após a avaliação comportamental retornaram às gaiolas e continuaram o regime de abstinência.

A fase seguinte durou mais 2 semanas - fase de reapresentação - na qual as soluções de etanol foram novamente oferecidas para a livre escolha.

Por último, durante mais 2 semanas as soluções de etanol foram oferecidas para a livre escolha, porém adulteradas com 0,005 g/L de quinino para propiciar um sabor amargo aversivo - fase de adulteração, serão. Nada foi adicionado à água.

Após todo o procedimento de livre escolha, os 60 animais foram classificados, de acordo com seu padrão de consumo de etanol nas diferentes fases, em grupos: adicto, pesado, leve e leve adicto, segundo os seguintes critérios: os animais que preferiam etanol na fase de livre escolha e na fase de adulteração não diminuíram o consumo e foram classificados como adictos (**A**). Os animais que preferiam etanol

(alto consumo) na fase de livre escolha e diminuíram esse consumo na fase de adulteração, foram classificados como pesados (**P**). Os animais classificados como leve (**L**) foram aqueles que preferiam água na fase de livre escolha e na fase de adulteração apresentaram o consumo de etanol menor se comparado com as fases anteriores (livre escolha e/ou reapresentação). Os animais que preferiam água na fase de livre escolha e não apresentaram diferença estatística significativa para o consumo de etanol entre as fases (LE, AD e RE) foram classificados como leve adictos (**LA**).

4.4.3. Tratamento com Mianserina

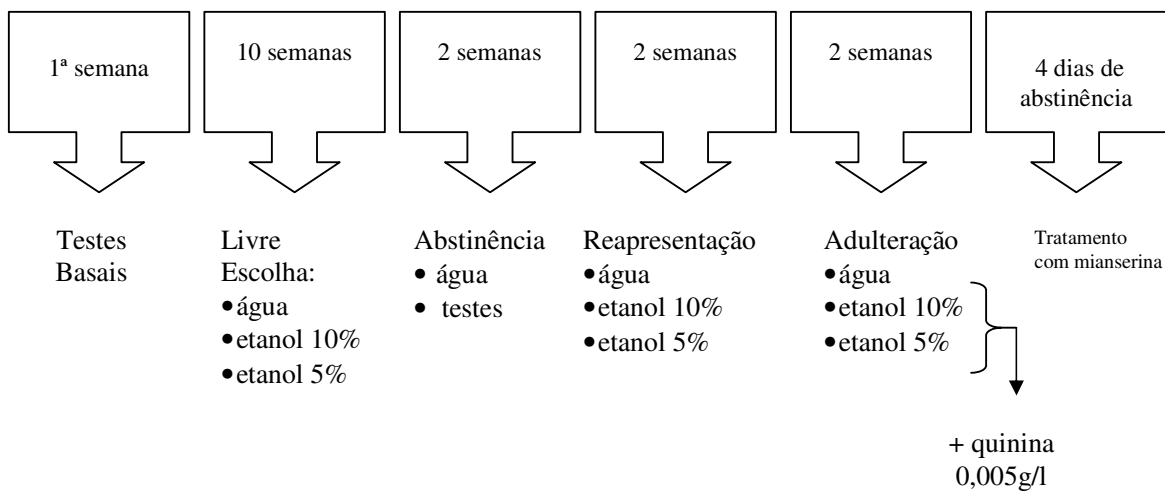
Após o último dia da fase de adulteração, os animais ficaram por 4 dias em abstinência de etanol, com acesso somente à água, a fim de aumentar sua motivação para procurar o álcool. No dia seguinte, foi realizada a primeira das quatro sessões de injeção administradas por dois dias consecutivos. Entre as doses administradas houve um intervalo de 4 dias sem a apresentação das soluções de etanol. Cada grupo foi dividido: metade recebeu as doses de mianserina (0,0, 2,5; 5,0 e 10,0 mg/kg) e a outra metade recebeu apenas salina. Cada animal recebeu todas as doses na seguinte ordem 2,5; 5,0 e 10,0 mg/kg sendo a dose 0,0 (injeção de salina) intercalada de acordo com método de distribuição por quadrado latino. Os animais de cada grupo designados para receber salina foram submetidos às mesmas condições e ao mesmo esquema experimental dos tratados com mianserina.

Os 10 animais do grupo controle também receberam todas as doses de mianserina, sendo que metade continuou com acesso somente à água (controle do consumo de líquido - Controle + água) e a outra metade teve acesso à água e às soluções de álcool (controle do efeito da mianserina sobre o consumo agudo de álcool - Controle + livre escolha).

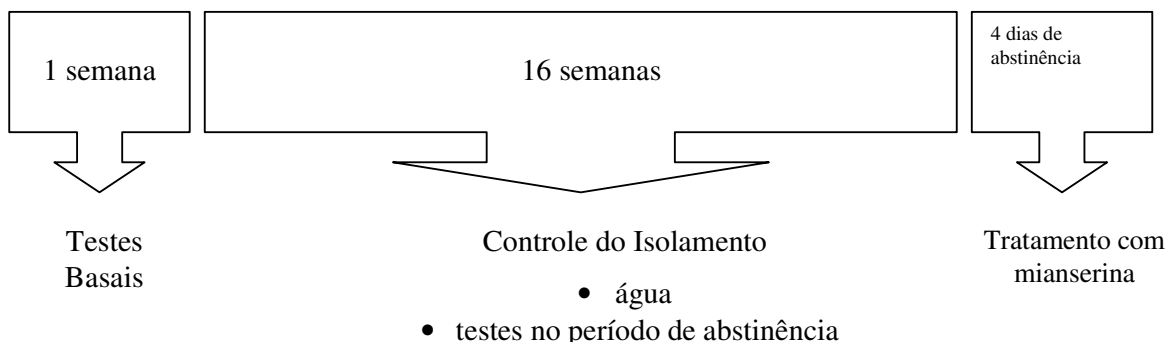
O acesso às soluções de etanol e água (livre escolha) foi permitido 30 min após a injeção de mianserina ou salina. O consumo foi quantificado 90 min e 24 h após o acesso às soluções. O procedimento de administração da mianserina está baseado no trabalho de Grahame e colaboradores (2000).

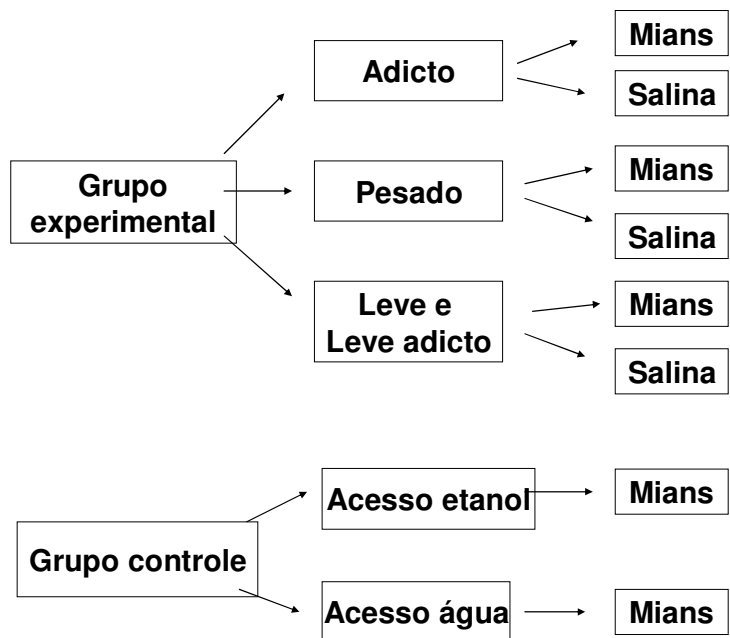
DIAGRAMA DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL GERAL

Grupo Etanol (n=60)



Grupo Controle (n=10)





Tratamento com mianserina

abs	abs	abs	abs	1ª inj	1ª inj	abs	abs	abs	abs	2ª inj	2ª inj
-----	-----	-----	-----	---------------	---------------	-----	-----	-----	-----	---------------	---------------

abs	abs	abs	abs	3ª inj	3ª inj	abs	abs	abs	abs	4ª inj	4ª inj
-----	-----	-----	-----	---------------	---------------	-----	-----	-----	-----	---------------	---------------

4.5. Análise Estatística

- Todas as medidas obtidas nos procedimentos experimentais foram testadas quanto à homogeneidade da variância e normalidade da distribuição. Peso corporal em gramas e o consumo de etanol em mililitros foram usados para o cálculo de consumo de etanol em gramas por quilograma (g/kg). O consumo de água e etanol foi expresso como média diária e erro padrão da média. Para a correlação do consumo de etanol entre as semanas ou entre as fases do experimento foi utilizado a Correlação de Pearson.
- Para a classificação de cada animal como adicto, pesado, leve e leve adicto foi empregada ANOVA com repetição considerando-se as medidas de consumo diário para cada animal nas 2 últimas semanas da livre escolha, nas 2 semanas de reapresentação e nas 2 semanas de adulteração.
- A preferência entre água ou etanol em cada fase foi detectada utilizando-se Teste "t"- Student para amostras independentes para cada animal.
- ANOVA de duas vias seguido do teste de Newman-Keuls foi utilizada para comparar o consumo de água e etanol entre os grupos durante as fases. Outra ANOVA de duas vias seguido do teste de Newman-Keuls foi usada para comparar o consumo de etanol entre os grupos durante o tratamento com mianserina. ANOVA de uma via para cada grupo foi usada para comparar o consumo de água durante o tratamento com mianserina.
- Todas as análises foram realizadas utilizando o software STATISTICA 6.1. As diferenças foram consideradas significantes com $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

Serotonin 5-HT₂ receptor antagonist mianserin reduces ethanol consumption in an addiction model in mice

Jamal Y^{1*}, Correia D^{1}, Boerngen-Lacerda R²**

¹ Master's student, Graduate Program in Pharmacology, Universidade Federal do Parana

² **Associate Professor; * fellowship from Fundação Araucária; ** fellowship from Conselho de Auxilio do Pessoal de Ensino Superior**

Department of Pharmacology, Universidade Federal do Parana, 81531-980 Curitiba, PR, Brazil.

Correspondence and reprint requests to Roseli Boerngen de Lacerda; P.O. Box 19031, 81531-990 Curitiba, PR, Brazil. Tel: +55 (41) 3361-1720; Fax: +55 (41) 3266-2042. E-mail: boerngen@ufpr.br

Running title: 5-HT₂ antagonist in an addiction model in mice

21 pages (excluding the Figures); 7921 words (from the title until legends to the figures) and 5445 words (from the summary until the references)

Summary

Serotonergic receptors are involved in ethanol intake, but which subtypes are most important remains unknown. We aimed to evaluate the effect of the nonselective serotonin 5-hydroxytryptamine-2C (5-HT_{2C}) receptor antagonist mianserin on voluntary ethanol intake. Mice ($n = 60$) were individually housed with *ad libitum* access to food and were allowed access to free choice responding for ethanol (5 and 10%) and water in a four-phase paradigm: free choice (10 weeks), withdrawal (2 weeks), re-exposure (2 weeks), and quinine-adulteration (2 weeks). Mice were characterized as: addicted (ethanol preference without reduced intake with adulterated ethanol, $n = 13$), heavy (ethanol preference with reduced intake with adulterated ethanol, $n = 15$) light (water preference with reduced intake with adulterated ethanol, $n = 14$), and light addicted (water preference without reduced intake with adulterated ethanol, $n = 13$). Mice then were distributed randomly to receive either mianserin (0, 2.5, 5, and 10 mg/kg, i.p., Latin square design) or saline. Thirty minutes later, the mice were allowed access to ethanol solutions and water, and intakes were measured 24 h later. Mianserin at 5 mg/kg reduced ethanol intake in all groups compared with the other doses and to saline, with no effect on water intake. Mianserin may be increasing dopamine release in the nucleus accumbens through specific 5-HT_{2C} receptor blockade, thus rendering ethanol intake less reinforcing.

Keywords: Ethanol. Addiction Model. Serotonin. Mianserin. Mice.

Introduction

Alcohol use disorders include alcohol dependence and alcohol abuse. Substance dependence is characterized by a pattern of repeated self-administration that usually results in tolerance, withdrawal, and compulsive drug-taking behavior. Compulsive substance use is characteristic of dependence (or addiction) and is central to the diagnosis of dependence (American Psychiatric Association 1994). Many animal models mimic aspects of alcoholism established in the *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (American Psychiatric Association 1994; Spanagel 2000). The animal model utilized in the present study is based on an oral free-choice self-administration procedure that allows the study of alcohol-seeking behavior and consumption. This animal model was proposed initially by Wolffgramm and Heyne (1995) for rats and validated for mice in our laboratory and has been shown to have face validity and predictive validity when tested with naltrexone as a pharmacological challenge (Fachin-Scheit et al. 2006). The addictive behavior, defined as “loss of control over the ingestion of alcohol,” can be examined in this model when ethanol solutions are made aversive by the addition of a quinine solution. The “addicted” mice maintain their ethanol consumption despite the aversiveness of the quinine-adulterated alcohol solutions, while “non-addicted” animals substantially reduce their consumption. We propose the use of this model to understand the mechanisms involved in alcohol-seeking behavior and to develop new treatments for alcoholism.

A common action of acutely administered addictive drugs is to increase mesolimbic dopamine activity, an effect that has been linked to their reinforcing effects. For some classes of drugs, such as psychostimulants, this is a direct effect. However, many other abused drugs, such as ethanol, indirectly enhance mesolimbic function by acting on nondopaminergic receptors that modify activity in a complex neuronal circuit. Multiple previous studies have demonstrated interactions with serotonergic (5-hydroxytryptamine, 5-HT) systems. Most 5-

HT receptor subtypes only modulate dopamine release when 5-HT and/or dopaminergic neurons are stimulated, but the 5-HT_{2C} receptor is characterized by high levels of constitutive activity and inhibits tonic as well as evoked dopamine release (Alex and Pehek 2007). Serotonin is one of the key neurotransmitters released in response to acute administration of alcohol (Bare et al. 1998; Chastain 2006; Yoshimoto et al. 1992). Central serotonergic deficiency correlates with high alcohol intake (Higley et al. 1996; LeMarquand et al. 1994; Meert and Janssen 1991; Sellers et al. 1992).

Recent electrophysiological data show that 5-HT, 5-HT₂ agonists, and 5-HT reuptake inhibitors potentiate ethanol-induced excitation of ventral tegmental area (VTA) neurons in brain slice preparations (Alex and Pehek 2007). Brodie et al. (2004) showed that 5-HT₂ receptors are implicated in ethanol-induced increases in neuronal dopamine firing rates in the VTA (see section by Brodie in Buck et al. 2004). These findings support the hypothesis that 5-HT₂ antagonists should result in an attenuation of ethanol's effects that are related to ethanol-induced increases in dopaminergic activity (Szeliga and Grant 1998). This suggestion is supported by our previous results showing that the nonselective 5-HT₂ antagonist mianserin blocked the development of ethanol-induced behavioral sensitization (Ferraz and Boerngen-Lacerda 2008).

The 5-HT_{2C} receptor is found in a variety of forebrain structures, including cortical, amygdala, hippocampal, and striatal/accumbens regions, as well as in monoaminergic cell body areas such as the locus coeruleus, substantia nigra, and VTA (Abramowski et al. 1995; Eberle-Wang et al. 1997; Pompeiano et al. 1994). Eberle-Wang et al. (1997) demonstrated the presence of 5-HT_{2C} mRNA within inhibitory γ -aminobutyric acid (GABA) interneurons making direct synaptic contact with dopaminergic cell bodies in both the VTA and substantia nigra. Electrophysiological studies have shown that activation of 5-HT_{2C} receptors within the VTA inhibits dopaminergic cell body firing, likely through an enhancement of GABA

function (Di Giovanni et al. 2001; Di Matteo et al. 2000b). An important consequence of this is a reduction of extracellular dopamine in the nucleus accumbens (Di Matteo et al. 2000b). Some authors have suggested some degree of endogenous tone at 5-HT_{2C} receptors that serves to dampen mesolimbic function (Di Matteo et al. 1999; Gobert et al. 2000; Martin et al. 1998; Millan et al. 1998). Other authors have reported that 5-HT_{2C} receptor blockade activates midbrain dopaminergic neurons, leading to increased extracellular dopamine levels (Di Matteo et al. 1999; Kennett et al. 1997). In behavioral studies, a selective 5-HT_{2C} receptor agonist dose-dependently reduced the hyperactivity induced by cocaine, cocaine self-administration on fixed- and progressive-ratio schedules, and the priming effect of cocaine to reinstate responding (Grottick et al. 2000).

5-HT_{2A} receptor subtypes are particularly prominent in cortical areas but also are found in dopamine-rich areas such as the striatum, substantia nigra, and VTA (Doherty and Pickel 2000; Lopez-Gimenez et al. 1997; Pompeiano et al. 1994). A selective 5-HT_{2A} antagonist did not influence the spontaneous firing rate of dopaminergic neurons and did not alter basal levels of dopamine release (Kehne et al. 1996). However, the 5-HT_{2A} antagonist reversed the effects of amphetamine on the firing rate of VTA neurons and attenuated dopamine release by methylenedioxymethamphetamine (Schmidt et al. 1995). In behavioral studies, a selective 5-HT_{2A} antagonist attenuated the hyperactivity induced by amphetamine (Moser et al. 1996) and cocaine (McMahon and Cunningham 2001; O'Neill et al. 1999). This profile of 5-HT_{2A} receptor antagonists appears to be opposite to that of 5-HT_{2C} receptor antagonists.

Conflicting findings exist on the effects of 5-HT₂ ligands on ethanol consumption. Whereas most studies have found that 5-HT₂ antagonists decrease ethanol consumption, one report found that a 5-HT₂ antagonist, methysergide, increased ethanol consumption. Consistent with the latter finding, mianserin enhanced ethanol-induced conditioned place

preference, and the 5-HT₂ agonist 1-[2,5-dimethoxy-4-iodophenylaminopropane] (DOI) decreased ethanol consumption in rats selectively bred for ethanol preference (Szeliga and Grant 1998). Although earlier studies demonstrated that ritanserin increased nigrostriatal and mesocorticolimbic dopamine efflux (Devaud et al. 1992; Pehek 1996; Pehek and Bi 1997), this nonselective 5-HT₂ receptor antagonist was ineffective in controlling ethanol drinking in alcoholic patients (Johnson et al. 1996). Consistent with this finding, a study published from Ciccocioppo's laboratory showed that Marchigian-Sardinian preferring (msP) rats (at that time named simply sP rats) were insensitive to ritanserin (Panocka et al. 1993a). The predictive value of msP rats was greater than that of other animal models because blockade of 5-HT₂ receptors with selective antagonists resulted in inhibition of ethanol drinking in non-selected Wistar rats trained to drink a low (3%) ethanol concentration (Panocka et al. 1996), as well as in high ethanol drinking rats such as Fawn Hooded, Finnish alcohol accepting (AA), or Indiana preferring (P) rats (Overstreet et al. 1997; Roberts et al. 1998). Long et al. (1996) showed that FG586 (a mixed 5-HT₁ agonist/5-HT₂ antagonist) dose-dependently attenuated alcohol consumption in the selectively bred high alcohol drinking (HAD) rat.

Considering that 5-HT modulates dopamine release (particularly the 5-HT₂ subtypes modulating dopamine release in an opposite manner), and considering that ethanol-enhanced dopamine release in the nucleus accumbens is responsible for its positive reinforcing properties, an unresolved issue is how a nonselective 5-HT₂ antagonist (mianserin) with equal affinity for 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors would influence alcohol-seeking behavior in "addicted" and "non-addicted" mice with free-choice ethanol self administration.

Material and methods

Animals

Seventy locally bred, naive, male Swiss mice weighing 20–30 g and aged 45 days at the beginning of the experiment were housed individually in cages measuring 20 × 30 × 20 cm in a temperature-controlled room ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) maintained on a 12 h light/dark cycle (lights on at 0700 h). Food was available *ad libitum* (Purina Laboratories, Brazil). The animals were weighed weekly. The experiment began after a 1-week acclimation period. All animal maintenance, care, and treatment procedures were controlled and approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Drugs

Ethanol solutions of 10% and 5% (v/v) were prepared for oral administration by diluting ethanol P.A. 95% (Vtec Laboratories, Bronx, NY, USA) with deionized water every other day (to control for ethanol evaporation). Adulterated ethanol solutions were prepared with 0.005 g/l of quinine hydrochloride. Mianserin hydrochloride solutions (Organon, Sao Paulo, Brazil) were prepared for intraperitoneal administration by diluting with deionized water (0.1 ml/10 g).

Experiment 1: Chronic ethanol self-administration procedure

A group of mice ($n = 60$) was exposed to a free-choice treatment for 10 weeks (free-choice phase, FC), during which they had free access to ethanol 10% and 5% (v/v) and water. The positions of the bottles were changed on alternate days when the fluid intake was measured volumetrically. A separate group of control animals ($n = 10$) only had access to water. Over the next 2 weeks, only tap water was provided (withdrawal phase, W). For the following 2 weeks, the ethanol solutions were again offered to establish free-choice among the ethanol solutions and water (re-exposure phase, RE). At the end of this period, the ethanol solutions were adulterated with 0.005 g/l quinine, creating an aversive bitter-tasting solution, and were offered to the animals for a further 2 week period (adulteration phase, AD). This quinine concentration was chosen because a previous dose-response analysis found that 0.005 g/l significantly reduced quinine solution intake without causing total inhibition of responding (Fachin-Scheit et al. 2006).

At the end of this experiment, mice were classified into groups based on the following criteria: addicted (A) – significant preference for ethanol during all phases and maintenance of ethanol consumption (no significant decrease) during the AD phase; heavy (H) – significant preference for ethanol during the FC phase and a significant decrease in ethanol consumption during the AD phase in relation to the FC phase; light (L) – significant preference for water during all phases and a significant decrease in ethanol consumption during the AD phase in relation to the FC phase; light addicted (LA) – significant preference for water during all phases and maintenance of ethanol consumption (no significant decrease) during the AD phase. The animals that did not conform to any of these patterns were excluded from subsequent analysis.

Experiment 2: Mianserin treatment

After the classification of mice, they were randomly divided into mianserin (M0, 0 mg/kg; M1, 2.5 mg/kg; M2, 5 mg/kg; M3, 10 mg/kg, i.p.) or saline-treated groups. After the last day of the AD phase, the animals spent 4 days in abstinence, with access only to water to increase their motivation to seek alcohol. The first session of injections was carried out on the following day. The 10 animals in the control group were designated to receive the same doses of mianserin and were divided into two groups: half continued to have access only to water (controlling for the consumption of liquid – Control + H₂O group) and half were given access to water and the alcohol solutions (controlling for the effect of mianserin on the acute consumption of alcohol – Control + FC group). Animal assigned to the mianserin group received all of the mianserin doses, which were administered in the following order: 5, 2.5, 10 mg/kg; the 0 mg/kg dose (saline) was interspersed between the other doses using a Latin square design. Each dose was administered twice on two consecutive days, with an interval of 4 days between doses, during which the animals had access only to water. The animals in the group designated to receive saline (S) were subjected to the same conditions and the same experimental design as the group treated with mianserin. Access to the solutions of ethanol and water (free-choice) was allowed 30 min after the injection of mianserin or saline. Ethanol and water consumption were quantified after 24 h of access to the solutions.

Statistical analysis

Data were analyzed for normality and homogeneity of variance. Body weight in grams and ethanol intake in milliliters were used to compute grams of ethanol intake per kilogram of body weight (g/kg). Ethanol and water consumption were expressed as the daily average and standard error of the mean (SEM). Correlation of ethanol consumption between weeks or between phases of the experiment was performed using Pearson's correlation analysis. To

classify each mouse according to its ethanol intake pattern, an analysis of variance (ANOVA) with repeated measures was performed for each animal to compare individual consumption throughout the self-administration phases considering the daily consumption for 2 weeks in each phase (i.e., 14 measures in the FC phase, 14 measures in the RE phase, and 14 measures in the AD phase). The preference between water and total ethanol intake in each phase was detected using Student's *t*-test for independent samples for each mouse. Two-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test was used for the water and ethanol consumption to compare the groups during self-administration phases. Another two-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test was performed to compare groups for ethanol consumption during the mianserin treatment. A one-way ANOVA for each group was performed for water consumption during the mianserin treatment. All analyses were performed using the software STATISTICA 6.1 (StatSoft, Sao Caetano do Sul, Brazil). Differences were considered significant at $p \leq 0.05$.

Results

Experiment 1: Chronic ethanol self-administration procedure

Maintenance of ethanol consumption during all self-administration phases

In the first weeks of the FC phase, the mice exhibited variable consumption that stabilized during the last 4 weeks of this phase. A week-by-week correlation analysis detected the following positive and significant values for consumption between the 7th and 8th weeks ($r = 0.89$, $p < 0.001$), the 7th and 9th weeks ($r = 0.89$, $p < 0.001$), 7th and 10th weeks ($r = 0.87$, $p < 0.001$), 8th and 9th weeks ($r = 0.88$, $p < 0.001$), 8th and 10th weeks ($r = 0.89$, $p < 0.001$), and 9th and 10th weeks ($r = 0.94$, $p < 0.001$). As the consumption of ethanol

stabilized from the 7th week onward, and to equalize the number of measurements for consumption in each different phase, a period of 2 weeks was used for each experimental phase (i.e., the last 2 weeks of FC, 2 weeks of RE, and 2 weeks of AD) for the correlations between phases for ethanol consumption.

Positive and significant correlations were detected between the consumption of ethanol in the last 2 weeks of FC and the 2 weeks of RE ($r = 0.82$, $p < 0.01$) and between the last 2 weeks of FC and the 2 weeks of AD ($r = 0.65$, $p < 0.05$).

Classification of the groups based on individual consumption differences

The analysis of the individual patterns of ethanol consumption in the different phases and the use of the criteria established in the Methods above enabled classification of the mice into 4 groups: addicted (A, $n = 13$), heavy (H, $n = 15$), light (L, $n = 14$), and light addicted (LA, $n = 13$). Three mice did not reach the criteria adopted and were excluded from subsequent analysis. In addition, two mice died (for a more detailed description of the classification procedure, see Fachin-Scheit et al. 2006).

Inter-group differences in consumption

Two-way ANOVA revealed a statistically reliable main effect of group ($F_{(3,51)} = 21.478$, $p < 0.001$) and phase ($F_{(2,102)} = 71.759$, $p < 0.001$) and a significant group \times phase interaction ($F_{(6,102)} = 25.051$, $p < 0.001$).

Group A showed no differences in ethanol consumption among phases ($F_{(2,24)} = 0.616$, $p > 0.05$) (Fig. 1). Group H ($F_{(2,28)} = 89.483$, $p < 0.001$) and group L ($F_{(2,26)} = 40.112$, $p < 0.001$) significantly reduced ethanol consumption in phases RE and AD compared with FC ($p < 0.001$). Ethanol consumption in the AD phase was lower than in the RE phase ($p < 0.001$) for groups H and L. Group LA significantly reduced ethanol consumption in the AD phase

compared with FC and RE ($F_{(2,24)} = 11.067, p < 0.001$). Although no individual LA mouse exhibited reduced ethanol intake in the AD phase (criterion used to classify as Light Addicted group), when the group was considered together, a statistically significant reduction in ethanol intake was observed.

When groups were compared considering each phase, in the FC phase, group A consumed more ethanol than groups L and LA and less ethanol than group H ($F_{(3,51)} = 28.633, p < 0.001$). In the RE phase, groups L and LA showed lower ethanol consumption than groups A and H ($F_{(3,51)} = 16.585, p < 0.001$). In the AD phase, groups H, L, and LA consumed less ethanol than group A, and group H showed higher ethanol consumption than groups L and LA ($F_{(3,51)} = 19.250, p < 0.001$).

Experiment 2: Mianserin treatment

Ethanol consumption during the 24 h period after mianserin administration

When considering the groups A, H, L, LA, and Control + FC, two-way ANOVA revealed a statistically reliable main effect of group ($F_{(4,240)} = 16.200, p < 0.001$) and mianserin dose ($F_{(3,240)} = 22.538, p < 0.001$) but no significant group \times dose interaction ($F_{(12,240)} = 0.569, p > 0.05$). The Newman Keuls test performed for the group factor showed that groups L and LA consumed less ethanol than the others groups. The same analysis performed for the mianserin dose factor revealed that M2 reduced ethanol consumption compared with the other doses.

Only the M2 dose reduced ethanol consumption in all groups, including consumption in the Control + FC group (Fig. 1). One-way ANOVA comparing ethanol consumption under mianserin treatment for each group detected that M2 reduced ethanol intake in all groups: group A compared with M0, M1, M3, and S ($F_{(4,95)} = 4.800; p < 0.002$); group H compared

with M0, M1, and M3 ($F_{(4,112)} = 3.287, p < 0.02$); group L compared with M1, M3, and S ($F_{(4,102)} = 2.932, p < 0.03$); Control + FC compared with M0, M1, and M3 ($F_{(3,28)} = 5.542, p < 0.005$). In group LA, M2 nonsignificantly reduced ethanol intake ($F_{(4,99)} = 1.277, p > 0.05$).

The comparison among groups under mianserin treatment revealed that group L consumed less ethanol than groups A, H, and Control + FC for M0 ($F_{(4,59)} = 3.049, p < 0.03$), M1 ($F_{(4,61)} = 5.022, p < 0.002$), and M3 ($F_{(4,59)} = 6.645, p < 0.001$). For M2, group L consumed less ethanol than group A ($F_{(4,61)} = 2.902, p < 0.03$). Group LA consumed less ethanol than groups A and Control + FC under M3 only ($F_{(4,59)} = 6.645, p < 0.001$).

In Fig. 1, the upper right inset depicts the saline-treated groups and shows that groups L and LA consumed less ethanol than groups A and H ($F_{(3,196)} = 9.307, p < 0.001$).

Water consumption during a 24 h period after mianserin administration

Fig. 2 shows water intake during all experimental phases for all groups. One-way ANOVA revealed no significant mianserin effect for group H ($F_{(4,112)} = 2.21, p = 0.07$), group L ($F_{(4,103)} = 1.97, p = 0.11$), group LA ($F_{(4,98)} = 0.69, p = 0.60$), and Control + H₂O ($F_{(3,34)} = 0.03, p = 0.99$) but revealed significant effects for group A ($F_{(4,96)} = 4.49, p < 0.003$) and Control + FC ($F_{(3,28)} = 2.94, p = 0.051$). Newman Keuls test showed that in group A, M1 and M3 doses increased water intake compared with saline-treated mice (S). In the Control + FC group, M3 increased water intake compared with M0.

Discussion

Mianserin was effective in reducing ethanol consumption. All groups reduced ethanol consumption at a mianserin dose of 5 mg/kg. Water consumption was not reduced in any mouse from the control or experimental groups by the administration of mianserin, indicating the specific effect of mianserin on ethanol consumption rather than a more general

suppression of appetitive motivation. The lack of a differential mianserin effect in addicted mice suggests that the “loss of control” over the ingestion of alcohol is not responsible for the mianserin effect (i.e., mianserin does not act through an anti-craving effect).

Mianserin has a wide spectrum of pharmacological action. Mianserin appears to block 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, and α_2 adrenergic receptors with approximately equal affinity (Marek et al. 2003). Mianserin also is a 5-HT₃ receptor antagonist, although with slightly lower affinity, and is a potent antihistamine that binds to H₁ histamine receptors and inhibits H₂ receptors. Mianserin also is a very weak muscarinic antagonist (Pietrzak and Kubik-Bogucka 2002). Which of these actions explains the reduction in ethanol consumption observed in the present study is an intriguing question. Several studies have demonstrated 5-HT₂ receptor involvement in ethanol consumption. FG5606 (amperozide), a 5-HT₂ receptor antagonist, suppresses alcohol consumption in rats induced to drink by pretreatment with the aldehyde dehydrogenase inhibitor cyanamide (Meyers et al. 1992) and in alcohol-preferring (P) rats that consume up to 11 g/kg per day of 25% alcohol (Meyers et al. 1993). Wilson et al. (1998) showed a reduction in ethanol consumption in an operant self-administration paradigm following acute treatment with a dose as high as 10 mg/kg of ritanserin, a 5-HT₂ receptor antagonist, in female Sprague-Dawley rats, which was accompanied by a concomitant reduction in locomotor activity. Panocka et al. (1993b) showed that ritanserin reduced 3% ethanol intake in male Wistar rats when injected directly into the nucleus accumbens. Lin and Hubbard (1994) have shown a reduction in the enhanced preference for 3% ethanol in male Sprague-Dawley rats induced to drink by dark, choice, or drugs as a result of ritanserin administration. In contrast, 5-HT₂ agonists also reduce ethanol consumption. The 5-HT₂ receptor agonist DOI displayed a specific anti-alcohol effect and reduced both alcohol intake and preference in cAA rats (Maurel et al. 1998). Wilson et al. (1998) also showed that DOI, over a specific dose range, reduced ethanol consumption and maintained behavior without

altering locomotor activity in female Sprague-Dawley rats. Regardless of the controversy concerning the role of 5-HT₂ receptors in ethanol intake, our data are in accordance with the inhibitory effect of 5-HT₂ blockade on ethanol consumption. The advantage of using the animal model of addiction proposed in our study is that different intake patterns allow differentiation between addicted and non-addicted mice (Fachin-Scheit et al. 2006). However, mianserin reduced ethanol intake independently of the animal profile (i.e., all animals consumed less ethanol after administration of 5.0 mg/kg of mianserin, including the Control + FC group that had never been exposed to ethanol solutions previously).

Another issue discussed by other researchers is the effect of 5-HT₂ blockade on behaviors such as locomotor activity (Wilson et al. 1998). In our laboratory, we also tested the effect of various acute doses of mianserin on locomotor activity in naive mice. These data are not shown here, but we observed slightly, albeit significantly, reduced locomotor activity with 5.0 mg/kg mianserin. Though reduced ambulation was observed, water intake was not altered, suggesting that the effect of mianserin on ethanol intake was specific.

Nevertheless, in the present study, 5-HT₂ blockade reduced ethanol consumption. One possible mechanism is that mianserin increases dopamine release such that it substitutes for the reinforcing properties of ethanol, thus reducing ethanol intake in all animals (addicted and non-addicted) and also in animals that had not been exposed to ethanol solutions previously. Therefore, mianserin increases the reinforcing effect of ethanol (i.e., an effect equivalent to increasing the unit dose of ethanol). Ethanol increases the release of dopamine at terminal regions innervated by dopaminergic neurons of the VTA, thus explaining its rewarding effect (Di Chiara and Imperato 1988). Several studies have shown that blockade of 5-HT₂ receptors increases dopamine levels in the VTA, nucleus accumbens, and prefrontal cortex. A series of studies has shown that 5-HT exerts tonic and phasic inhibitory control mainly in the mesolimbic and mesocortical dopamine system by stimulating 5-HT_{2C} receptors (Di Matteo et

al. 2002). The most effective and selective 5-HT_{2C} receptor antagonist known to date, SB 242084 (Di Matteo et al. 1999), selectively enhanced mesocorticolimbic dopamine function, while RO 60-0175 and MK 212, two 5-HT_{2C} receptor agonists, reduced mesocorticolimbic dopamine function (Di Matteo et al. 2000b; Millan et al. 1998). Systemic administration of a 5-HT_{2C} inverse agonist or antagonist potentiated cocaine-induced increases in nucleus accumbens dopamine by blocking 5-HT_{2C} receptor-mediated inhibitory tone (Navailles et al. 2004). In support of this mechanism of action, 5-HT_{2C} receptor knockout mice have been shown to exhibit enhanced cocaine-induced elevations of dopamine in the nucleus accumbens (Rocha et al. 2002). 5-HT_{2C} receptors are characterized by high levels of constitutive activity (Di Matteo et al. 2000b) and have been detected by immunohistochemistry on cell bodies in the VTA (Bubar et al. 2005). Evidence shows that these receptors inhibit tonic as well as evoked dopamine release (Alex and Pehek 2007). Several studies have suggested that 5-HT_{2C} receptors localized in the prefrontal cortex do not modulate dopamine release in this region, either tonically (Pozzi et al. 2002; Alex et al. 2005) or evoked (Pozzi et al. 2002; Alex et al. 2005; Pehek et al. 2006). 5-HT_{2C} receptors possess a unique ability to tonically regulate dopamine release from all three major pathways. 5-HT_{2C} receptors in the terminal regions of the nigrostriatal and mesolimbic pathways regulated this tonic inhibition of dopamine release, whereas 5-HT_{2C} receptors in the prefrontal cortex appear to be incapable of tonically or phasically inhibiting the mesocortical pathway. 5-HT_{2C} receptors in the cell body regions of all three pathways are capable, however, of modulating dopamine release in stimulated conditions. Behavioral studies have demonstrated that 5-HT_{2C} receptors also may be responsible for the effects of psychostimulants. Recent studies have shown that systemic administration of the 5-HT_{2C} antagonists SB242084 and SDZ SER-082 enhances cocaine-induced locomotor activity (Fletcher et al. 2002; Filip et al. 2004; Liu and Cunningham 2006), the discriminative stimulus effects of cocaine (Filip et al. 2006), and cocaine self-

administration (Fletcher et al. 2002). Fletcher and colleagues (2002) observed that a 5-HT_{2C} receptor antagonist consistently enhanced the effects of cocaine on cocaine-induced locomotion, cocaine-mediated reinforcement, and cocaine-induced reinstatement of responding, effects that may be attributable to an increase in the endogenous tone of mesolimbic dopamine neurons. Heightened dopaminergic tone following SB242084 pretreatment may prime extracellular dopamine for an increased effect of cocaine, thus leading to an increase in the reinforcing effect of cocaine (i.e., an effect equivalent to increasing the unit dose of cocaine).

In contrast, 5-HT_{2A} receptors appear to have an opposing effect. 5-HT_{2A} receptor agonists were shown to enhance 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced dopamine release (Gudelsky et al. 1994). Indeed, blockade of 5-HT_{2A} receptors attenuated the effects of cocaine to stimulate locomotor activity but did not alter the reinforcing efficacy of cocaine. The differing effects of a specific 5-HT_{2A} antagonist on cocaine-induced locomotion *vs.* self-administration provide an interesting dissociation between these two behaviors. Schmidt et al. (1995) showed that a specific 5-HT_{2A} antagonist, M100907, had little effect on locomotor behavior or terminal dopamine efflux under basal conditions. These parameters were reduced under conditions of dopamine system activation, which occurs with cocaine and which elevates synaptic 5-HT levels (Bradberry et al. 1993).

We have previously demonstrated that mianserin co-administered with ethanol during a 21-day treatment schedule dose-dependently blocked the development of ethanol-induced behavioral sensitization to the stimulant effect of ethanol (Ferraz and Boerngen-Lacerda 2008). Ethanol-induced behavioral sensitization is well established to depend on chronically increased dopamine release. In animals, sensitized locomotor behavior is initiated in the VTA and is then expressed in the nucleus accumbens (Kalivas and Duffy 1990), presumably through enhancement of dopamine responses that are under the control of different

neurotransmitters, including 5-HT (Herve et al. 1987; Lieberman et al. 1998). Mianserin blocked the development of behavioral sensitization, which could be a result of preferential blockade of 5-HT_{2A} receptors and reduced dopamine release.

Mianserin alone (5 mg/kg, i.p.) significantly increased dopamine release as assessed by intracerebral microdialysis in the nucleus accumbens of chloral hydrate-anesthetized rats, but no significant effect was observed at a lower dose (2.5 mg/kg). In addition, the 2.5 mg/kg dose of mianserin blocked the inhibitory effect of the 5-HT_{2C} receptor agonist RO 60-0175 on dopamine release (Di Matteo et al. 2000a). Although in the present study we used mice, these latter effects could be present when the intermediate dose (5 mg/kg) is used. Furthermore, Risinger and Oakes (1996) showed that mianserin (10 mg/kg) enhanced the acquisition of ethanol-induced conditioned place preference in mice and suggested that 5-HT₂ receptor blockade by mianserin increases the rewarding effects of ethanol, possibly through an increase in dopamine.

Mianserin has been shown to block 5-HT_{2C} and 5-HT_{2A} receptors with equal affinity (Marek et al. 2003), making predictions difficult about how ethanol and mianserin interact to modulate the complex serotonin and dopamine effects on reward and locomotion. These two receptor subtypes differentially modulate dopamine release. 5-HT_{2A} receptors mainly modulate dopamine release when 5-HT and/or dopaminergic neurons are stimulated, and 5-HT_{2C} receptors inhibit tonic as well as evoked dopamine release (Alex and Pehek 2007). One possible explanation for the effects observed in the present study is that when mianserin was co-administered with ethanol, the evoked dopamine release induced by the presence of chronic ethanol was inhibited through blockade of 5-HT_{2A} receptors (an effect similar to that observed in the study by Ferraz and Boerngen-Lacerda 2008). When mianserin was administered alone to mice previously exposed to the addiction model, it inhibited the

constitutive 5-HT_{2C} receptor, increasing dopamine release such that ethanol intake was less rewarding and mice subsequently exhibited reduced intake.

The explanation for the lack of an effect of ritanserin on ethanol intake reported in msP rats (Panocka et al. 1993a) may be that msP rats are trained for ethanol-reinforced operant responding in the presence of ethanol. Thus, ethanol increases dopamine and serotonin release, and this evoked release is blocked by 5-HT_{2A} receptors when ritanserin is administered. Therefore, msP rats persist in seeking ethanol to restore dopamine levels, similarly to naltrexone-treated addicted mice in our laboratory (Fachin-Scheit et al. 2006). The addicted mice in Fachin-Scheit et al. (2006) continued to consume ethanol under naltrexone treatment because of compulsive ethanol-seeking behavior and because naltrexone-induced opioid receptor blockade might be dampening the positive reinforcing properties of ethanol through a reduction of dopamine release.

In humans, the inefficacy of ritanserin in controlling ethanol drinking in alcoholic patients (Johnson et al. 1996) certainly reflects a more complex interaction, considering other factors that predispose alcohol-seeking behavior, such as craving and the cues associated with the drug use learning process (Kalivas and Volkow 2005).

Furthermore, H₁ histamine receptors excite GABAergic neurons in the VTA, which, in turn, inhibit dopamine release (Korotkova et al. 2002). A systemically administered H₁ receptor antagonist induced increases in dopamine release (Dringenberg 1998), but the opposite effect was observed when the H₁ antagonist was directly administered into the nucleus accumbens (Galosi et al. 2001). Thus, mianserin shows affinity for H₁ histamine receptors, and H₁ receptor blockade would thus increase dopamine in the nucleus accumbens. Mianserin, therefore, would substitute for the rewarding effects of ethanol. In addition, Weikop et al. (2004) showed that idazoxan, an α_2 noradrenergic antagonist, induced dopamine and serotonin increases in the prefrontal cortex, suggesting that mianserin, which

also blocks the α_2 receptor, could be substituting for the reinforcing effects of ethanol also by this mechanism.

One final consideration is the blood mianserin concentration in the period of measuring ethanol intake. Mianserin (5 mg/kg, s.c.) has been shown to be eliminated from the brain with a half-life of 1-3 h, with peak brain levels at 0.5 to 1 h after injection (Sanders-Bush et al. 1987). We evaluated ethanol consumption 90 min after mianserin administration (data not shown), but the ethanol intake profile was the same as that for the 24 h period. Furthermore, a single injection of mianserin resulted in downregulation of cortical 5-HT_{2A} receptor density observed 6 h and 24 h after injection (Sanders-Bush et al. 1987; Smith et al. 1990). Therefore, in the present study, the mianserin effect on ethanol intake would still be present when evaluated 24 h after mianserin treatment.

Overall, our results demonstrate the complex modulation that 5-HT neurons appear to exert over ethanol consumption and highlight the necessity for more studies on this issue.

Acknowledgments

We thank Silvia N.C. Genaro for technical assistance and Mike Arends for his assistance with the preparation of the manuscript. The authors also thank the *Conselho de Auxilio do Pessoal de Ensino Superior* and the *Fundação Araucária* for fellowships given to the Master's students and thank Organon Laboratories for the donation of mianserin.

References

- Abramowski D, Rigo M, Duc D, Hoyer D, Staufenbiel M (1995) Localization of the 5-hydroxytryptamine_{2C} receptor protein in human and rat brain using specific antisera. *Neuropharmacology* 34: 1635-1645
- Alex KD, Pehek EA (2007) Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. *Pharmacol Ther* 113: 296-320
- Alex KD, Yavarian GJ, McFarlane HG, Pluto CP, Pehek EA (2005) Modulation of dopamine release by striatal 5-HT_{2C} receptors. *Synapse* 55: 242-251
- American Psychiatric Association (1994). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*, 4th edn. American Psychiatric Press, Washington DC, pp 715-718.
- Bare DJ, McKinzie JH, McBride WJ (1998) Development of rapid tolerance to ethanol-stimulated serotonin release in the ventral hippocampus. *Alcohol Clin Exp Res* 22: 1272-1276
- Bradberry CW, Nobiletti JB, Elsworth JD, Murphy B, Jatlow P, Roth RH (1993) Cocaine and cocaethylene: microdialysis comparison of drug brain levels and effects on dopamine and serotonin. *J Neurochem* 60: 1429-1435
- Bubar MJ, Seitz PK, Thomas ML, Cunningham KA (2005) Validation of selective serotonin 5-HT_{2C} receptor antibody for utilization in fluorescence immunohistochemistry studies. *Brain Res* 1063: 105-113
- Buck KJ, Reilly MT, Rogers LM, Szeliga K, Grant K, Brodie MS (2004) Serotonin 5-HT₂ receptors and alcohol: reward, withdrawal and discrimination. *Alcohol Clin Exp Res* 28: 211-216
- Chastain G (2006) Alcohol, neurotransmitter systems, and behavior. *J Gen Psychol* 33: 329-335
- Devaud LL, Hollingsworth EB, Cooper BR (1992) Alterations in extracellular and tissue levels of biogenic amines in rat brain induced by the serotonin₂ receptor antagonist, ritanserin. *J Neurochem* 59: 1459-1466
- Di Chiara G, Imperato A (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5274-5278
- Di Giovanni G, Di Matteo V, La Grutta V, Esposito E (2001) m-Chlorophenylpiperazine excites non-dopaminergic neurons in the rat substantia nigra and ventral tegmental area by activating serotonin-2C receptors. *Neuroscience* 103: 111-116
- Di Matteo V, Cacchio M, Di Giulio C, Esposito E (2002) Role of serotonin_{2C} receptors in the control of brain dopaminergic function. *Pharmacol Biochem Behav* 71: 727-734

- Di Matteo V, Di Giovanni G, Di Maseio M, Esposito E (1999) SB 242084, a selective serotonin_{2c} receptor antagonist, increases dopaminergic transmission in the mesolimbic system. *Neuropharmacology* 38: 1195-1205
- Di Matteo V, Di Maseio M, Di Giovanni G, Esposito E (2000a) Acute administration of amitriptyline and mianserin increases dopamine release in the rat nucleus accumbens: possible involvement of serotonin_{2c} receptors. *Psychopharmacology* 150: 45-51
- Di Matteo V, Di Giovanni G, Di Maseio, Esposito E (2000b) Biochemical and electrophysiological evidence that RO 60-0175 inhibits mesolimbic dopaminergic function through serotonin_{2c} receptors. *Brain Res* 865: 85-90
- Doherty MD, Pickel VM (2000) Ultrastructural localization of the serotonin 2A receptor in dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res* 864: 176-185
- Dringenberg HC, de Souza-Silva MA, Schwarting RKW, Huston JP (1998) Increased levels of extracellular dopamine in neostriatum and nucleus accumbens after histamine H1 receptor blockade. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 358: 423-429
- Eberle-Wang K, Mikeladze Z, Uryu K, Chesselet MF (1997) Pattern of expression of serotonin_{2c} receptor messenger RNA in the basal ganglia of adult rats. *J Comp Neurol* 384: 233-247
- Fachin-Scheit DJ, Frozino Ribeiro A, Pigatto G, Goeldner FO, Boerngen-Lacerda R (2006) Development of a mouse model of ethanol addiction: naltrexone efficacy in reducing consumption but not craving. *J Neural Transm* 113: 1305-1321
- Ferraz IC, Boerngen-Lacerda R (2008) Serotonin 5-HT₂ receptor antagonist does not reverse established ethanol-induced sensitization but blocks its development and expression. *Pharmacol Biochem Behav* 88: 456-464
- Filip M, Bubar MJ, Cunningham KA (2004) Contribution of serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) 5-HT₂ receptor subtypes to the hyperlocomotor effects of cocaine: acute and chronic pharmacological analysis. *J Pharmacol Exp Ther* 310: 1246-1254
- Filip M, Bubar MJ, Cunningham KA (2006) Contribution of serotonin (5-HT) 5-HT₂ receptor subtypes to the discriminative stimulus effects of cocaine in rats. *Psychopharmacology* 183: 482-489
- Fletcher PJ, Grottick AJ, Higgins GA (2002) Differential effects of the 5-HT_{2A} receptor antagonist M100,907 and the 5-HT_{2c} receptor antagonist SB242,084 on cocaine-induced locomotor activity, cocaine self-administration and cocaine-induced reinstatement of responding. *Neuropsychopharmacology* 27: 576-586
- Galosi R, Lenard L, Knoche A, Haas H, Huston JP, Schwarting RKW (2001) Dopaminergic effects of histamine administration in the nucleus accumbens and the impact of H1-receptor blockade. *Neuropharmacology* 40: 624-633
- Gobert A, Rivet JM, Lejeune F, Newman-Tancredi A, Adhumeau-Auclair A, Nicolas JP, Cistarelli L, Melon C, Millan MJ (2000) Serotonin_{2c} receptors tonically suppress the activity

of mesocortical dopaminergic and adrenergic, but not serotonergic, pathways: a combined dialysis and electrophysiological analysis in the rat. *Synapse* 36: 205-221

Grottick AJ, Fletcher PJ, Higgins GA (2000) Studies to investigate the role of 5-HT_{2C} receptors on cocaine- and food-maintained behavior. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 1183-1191

Gudelsky GA, Yamamoto BK, Nash JF (1994) Potentiation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced dopamine release and serotonin neurotoxicity by 5-HT₂ receptor agonists. *Eur J Pharmacol* 264: 325-330

Herve D, Pickel VM, Joh TH, Beaudet A (1987) Serotonin axon terminals in the ventral tegmental area of the rat: fine structure and synaptic input to dopaminergic neurons. *Brain Res* 435: 71-83

Higley JD, Suomi SJ, Linnoila M (1996) A nonhuman primate model of type II excessive alcohol drinking consumption? Part 1. Low cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid concentrations and diminished social competence correlate with excessive alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res* 20: 629-642

Johnson BA, Jasinski DR, Galloway GP, Kranzler H, Weinreib R, Anton RF, Mason BJ, Bohn MJ, Pettinati HM, Rawson R, Clyde C (1996) Ritanserin in the treatment of alcohol dependence: a multi-center clinical trial. *Psychopharmacology* 128: 206-215

Kalivas PW, Duffy P (1990) Effect of acute and daily cocaine treatment on extracellular dopamine in the nucleus accumbens. *Synapse* 5: 48-58

Kalivas PW, Volkow ND (2005) The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry* 162: 1403-1413

Kehne JH, Baron BM, Carr AA, Chaney SF, Elands J, Feldman DJ, Frank RA, Van Giersbergen PLM, McCloskey TC, Johnson MP, McCarty DR, Poirot M, Senyah Y, Siegel BW, Widmaier C (1996) Preclinical characterization of the potential of the putative atypical antipsychotic MDL 100,907 as a potent 5-HT_{2A} antagonist with a favourable CNS profile. *J Pharmacol Exp Ther* 277: 968-981

Kennett GA, Wood MD, Bright F, Trail B, Riley G, Holland V, Avenell KY, Stean T, Upton N, Bromidge S, Forbes IT, Brown AM, Middlemiss DN, Blackburn TP (1997) SB 242084, a selective and brain penetrant 5-HT_{2C} receptor antagonist. *Neuropharmacology* 36: 609-620

Korotkova TM, Haas HL, Brown RE (2002) Histamine excites GABAergic cells in the rat substantia nigra and ventral tegmental area in vitro. *Neurosci Lett* 320: 133-136

LeMarquand D, Pihl RO, Benkelfat C (1994) Serotonin and alcohol intake, abuse, and dependence: findings of animal studies. *Biol Psychiatry* 36: 395-421

Lieberman JA, Mailman RB, Duncan G, Sikich L, Chakos M, Nichols DE, Kraus JE (1998) Serotonergic basis of antipsychotic drug effects in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 44: 1099-1117

- Lin N, Hubbard JI (1994) The increased ethanol preference in rats induced by choice, darkness, or drugs is reduced by ritanserin. *Brain Res Bull* 33: 633-638
- Liu S, Cunningham KA (2006) Serotonin_{2c} receptors (5-HT_{2c}R) control expression of cocaine-induced conditioned hyperactivity. *Drug Alcohol Depend* 81: 275-282
- Long TA, Kalmus GW, Bjork A, Myers RD (1996) Alcohol intake in high alcohol drinking (HAD) rats is suppressed by FG5865, a novel 5-HT_{1A} agonist/5-HT₂ antagonist. *Pharmacol Biochem Behav* 53: 33-40
- Lopez-Gimenez JF, Mengod G, Palacios JM, Vilaro MT (1997) Selective visualization of rat brain 5-HT_{2A} receptors by autoradiography with [³H]MDL 100,907. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 356: 446-454
- Marek GJ, Carpenter LL, McDougale CJ, Price LH (2003) Synergistic action of 5-HT_{2A} antagonists and selective serotonin reuptake inhibitors in neuropsychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology* 28: 402-412
- Martin JR, Bos M, Jenck F, Moreau JL, Mutel V, Sleight AJ, Wichmann J, Andrews JS, Berendsen HHG, Broekkamp CLE, Ruight GSF, Kohler C, van Delft AML (1998) 5-HT_{2C} receptor agonists: pharmacological characteristics and therapeutic potential. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 913-924
- Maurel S, De Vry J, De Beun R, Schreiber R (1998) 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C}/5-HT_{1B} receptors are differentially involved in alcohol preference and consummatory behavior in cAA rats. *Pharmacol Biochem Behav* 62: 89-96
- McMahon LR, Cunningham KA (2001) Antagonism of 5-hydroxytryptamine_{2A} receptors attenuates the behavioral effects of cocaine in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 297: 357-363
- Meert TF, Janssen PAJ (1991) Ritanserin, a new therapeutic approach for drug abuse: Part 1. Effects on alcohol. *Drug Dev Res* 24: 235-249
- Millan MJ, Dekeine A, Gobert A (1998) Serotonin (5-HT)_{2C} receptors tonically inhibit dopamine (DA) and noradrenaline (NA), but not 5-HT, release in frontal cortex in vivo. *Neuropharmacology* 37: 953-955
- Moser PC, Moran PM, Frank RA, Kehne JH (1996) Reversal of amphetamine-induced behaviours by MDL 100,907, a selective 5-HT_{2A} antagonist. *Behav Brain Res* 73: 163-167
- Myers RD, Lankford M, Bjork A (1992) Selective reduction of the 5-HT antagonist amperozide of alcohol preference induced in rats by systemic cyanamide. *Pharmacol Biochem Behav* 43: 661-667
- Myers RD, Lankford MF, Bjork A (1993) 5-HT₂ receptor blockade by amperozide suppresses ethanol drinking in genetically preferring rats. *Pharmacol Biochem Behav* 45: 741-747
- Navailles S, De Deurwaerdere P, Porras G, Spampinato U (2004) *In vivo* evidence that 5-HT_{2C} receptor antagonist but agonist modulates cocaine-induced dopamine outflow in rat nucleus accumbens and striatum. *Neuropsychopharmacology* 29: 319-326

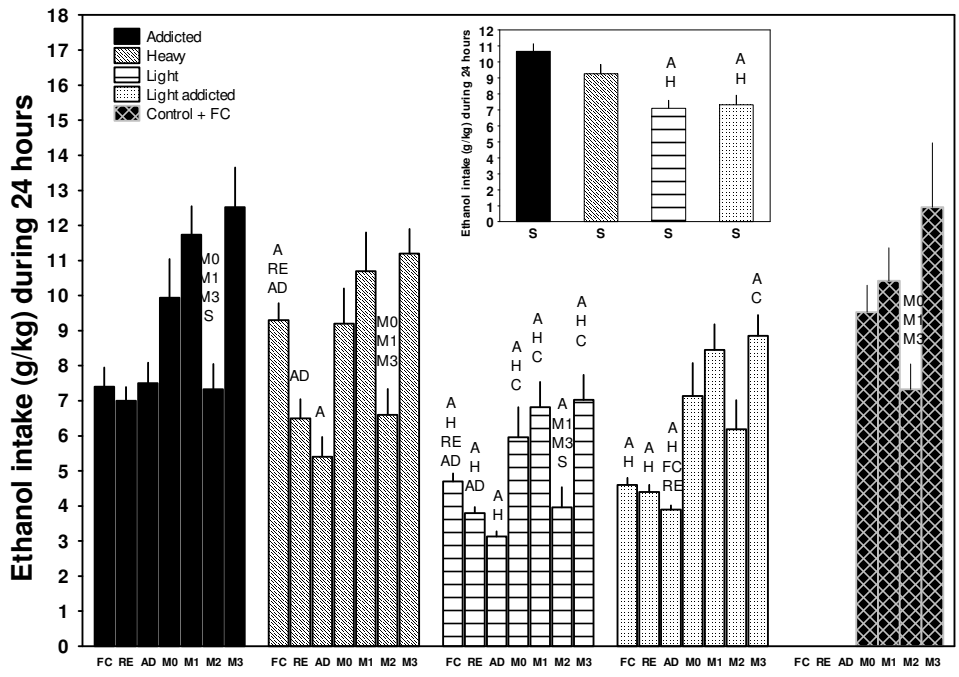
- O'Neill MF, Heron-Maxwell CL, Shaw G (1999) 5-HT₂ receptor antagonism reduces hyperactivity induced by amphetamine, cocaine, and MK-801 but not D₁ agonist C-APB. *Pharmacol Biochem Behav* 63: 237-243
- Overstreet DH, McArthur RA, Rezvani AH, Post C (1997) Selective inhibition of alcohol intake in diverse alcohol-preferring rat strains by the 5-HT_{2A} antagonists amperozide and FG 5974. *Alcohol Clin Exp Res* 21: 1448-1454
- Panocka I, Ciccocioppo R, Pompei P, Massi M (1993a) 5-HT₂ receptor antagonists do not reduce ethanol preference in Sardinian alcohol-preferring (sP) rats. *Pharmacol Biochem Behav* 46: 853-856
- Panocka I, Ciccocioppo R, Polidori C, Massi M (1993b) The nucleus accumbens is a site of action for the inhibitory effect of ritanserin on ethanol intake in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 46: 857-862
- Panocka I, Ciccocioppo R, Polidori C, Romagnoli S, Frolidi R, Massi M (1996) Possible mechanism of action for the attenuation of ethanol intake induced by ritanserin in rats. *Psychopharmacology* 128: 181-190
- Pehek EA (1996) Local infusion of the serotonin antagonists ritanserin or ICS 205,930 increases in vivo dopamine release in the rat medial prefrontal cortex. *Synapse* 24: 12-18
- Pehek EA, Bi Y (1997) Ritanserin administration potentiates amphetamine-stimulated dopamine release in the rat prefrontal cortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 21: 671-682
- Pehek EA, Noejar C, Roth BL, Byrd TA, Mabrouk OS (2006) Evidence for the preferential involvement of 5-HT_{2A} serotonin receptors in stress- and drug-induced dopamine release in the rat medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 31: 265-277
- Pietrzak B, Kubik-Bogucka E (2002) Influence of mianserin on some central effects of ethanol. *Pharmacol Res* 46: 47-54
- Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G (1994) Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Mol Brain Res* 23: 163-178
- Pozzi L, Acconcia S, Ceglia I, Invernizzi RW, Samanian R (2002) Stimulation of 5-hydroxytryptamine (5-HT_{2C}) receptors in the ventro tegmental area inhibits stress-induced but not basal dopamine release in the rat prefrontal cortex. *J Neurochem* 82: 93-100
- Risinger FO, Oakes RA (1996) Mianserin enhancement of ethanol-induced conditioned place preference. *Behav Pharmacol* 7: 294-298
- Roberts AJ, McArthur RA, Hull EE, Post C, Koob GF (1998) Effects of amperozide, 8-OH-DPAT, and FG 5974 on operant responding for ethanol. *Psychopharmacology* 137: 25-32

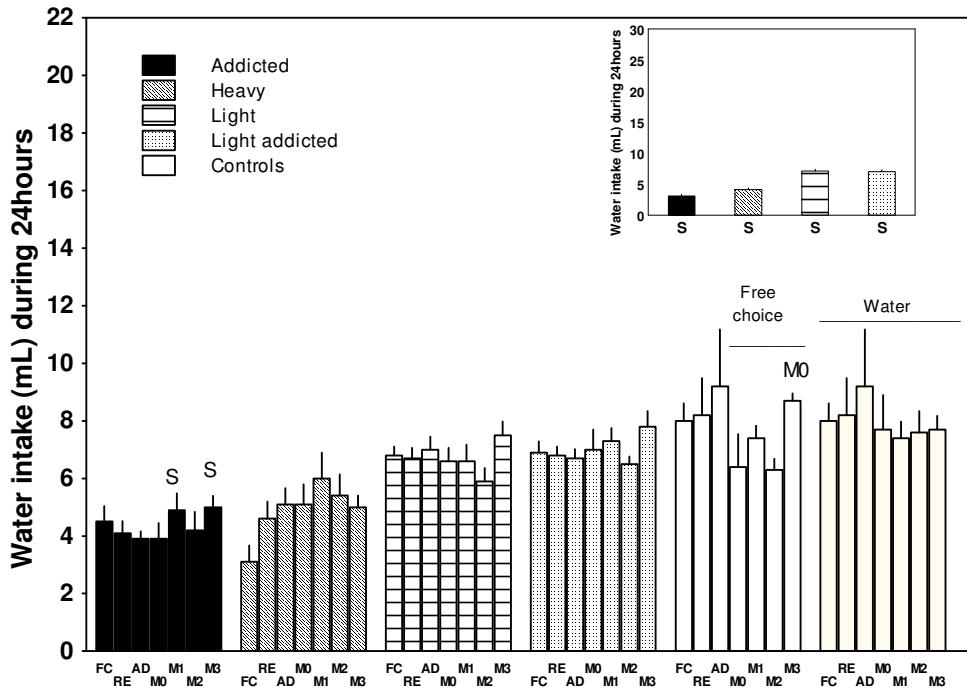
- Rocha BA, Goulding EH, O'Dell LE, Mead AN, Coufal NG, Parsons LH, Tecott LH (2002) Enhanced locomotor, reinforcing, and neurochemical effects of cocaine in serotonin 5-hydroxytryptamine 2C receptor mutant mice. *J Neurosci* 22: 10039-10045
- Sanders-Bush E, Breeding M, Roznoski M (1987) 5-HT₂ binding sites after mianserin: comparison of loss of sites and brain levels of drug. *Eur J Pharmacol* 113: 199-204
- Schmidt CJ, Sorensen SM, Kehne JH, Carr AA, Palfreyman MG (1995) The role of 5-HT_{2A} receptors in antipsychotic activity. *Life Sci* 56: 2209-2222
- Sellers EM, Higgins GA, Sobell MB (1992) 5-HT and alcohol abuse. *Trends Pharmacol Sci* 13: 69-75
- Smith RL, Barrett RJ, Sanders-Bush E (1990) Adaptation of brain 5-HT₂ receptors after mianserin treatment: receptor sensitivity, not receptor binding, more accurately correlates with behavior. *J Pharmacol Exp Ther* 254: 484-488
- Spanagel R (2000) Recent animal models of alcoholism. *Alcohol Res Health* 24: 124-131
- Szeliga KT, Grant KA (1998) Analysis of the 5-HT₂ receptor ligands dimethoxy-4-indophenyl-2-aminopropane and ketanserin in ethanol discriminations. *Alcohol Clin Exp Res* 22: 646-651
- Weikop P, Keher J, Scheel-Kruger J (2004) The role of α_1 and α_2 adrenoreceptors on venlafaxine-induced elevation of extracellular serotonin, noradrenaline and dopamine levels in the rat prefrontal cortex and hippocampus. *J Psychopharmacol* 18: 395-403
- Wilson AW, Neill JC, Costall B (1998) An investigation into the effects of 5-HT agonists and receptor antagonists on ethanol self-administration in the rat. *Alcohol* 16: 249-270
- Wolffgramm J, Heyne A (1995) From controlled drug intake to loss of control: the irreversible development of drug addiction in the rat. *Behav Behav Brain Res* 70: 77-94
- Yoshimoto K, McBride WJ, Lumeng L, Li TK (1992) Alcohol enhances the release of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens of HAD and LAD lines of rats. *Alcohol Clin Exp Res* 16: 781-785

Legends to Figures

Figure 1. Total ethanol intake during 24 h. Data are expressed as mean \pm SEM of ethanol intake (g/kg/day). Ethanol consumption for the addicted, heavy, light addicted, and light groups during each experimental phase prior to mianserin treatment (FC: free-choice phase; RE: re-exposure phase; AD: adulteration phase) and after i.p. mianserin treatment (M0: 0 mg/kg; M1: 2.5 mg/kg; M2: 5 mg/kg; M3: 10 mg/kg). The upper right inset depicts mean ethanol consumption for the saline-treated (S) addicted, heavy, light, and light addicted groups. The letters over the bars represent significant differences: RE: from the RE phase; AD: from the AD phase; A: from the addicted group; H: from the heavy group; C: from the control + FC group; S: from the corresponding saline-treated group; M0: from the 0 mg/kg dose of mianserin; M1: from the 2.5 mg/kg dose of mianserin; M3: from the 10 mg/kg dose of mianserin. $p < 0.05$, ANOVA followed by Newman-Keuls.

Figure 2. Total water intake during 24 h. All data are expressed as mean \pm SEM of water intake (ml/kg/day). Water consumption for the addicted, heavy, light addicted, light, Control + FC, Control +H₂O groups during each experimental phase prior to mianserin treatment (FC: free-choice phase; RE: re-exposure phase; AD: adulteration phase) and after i.p. mianserin treatment (M0: 0 mg/kg; M1: 2.5 mg/kg; M2: 5 mg/kg; M3: 10 mg/kg). The upper right inset depicts mean water consumption for the saline-treated (S) addicted, heavy, light, light addicted, Control + FC, and Control +H₂O groups. The letters over the bars represent significant differences: S: from the corresponding saline-treated group; M0: from the 0 mg/kg dose of mianserin. $p < 0.05$, ANOVA followed by Newman-Keuls.





6. CONCLUSÕES

- A mianserina na dose de 5 mg/kg reduziu o consumo de etanol em animais “adictos” e “não-adictos”.
- Os animais foram classificados como: adicto (n=13), pesado (n=15), leve (n=14) e leve adicto (n=13). Dois camundongos morreram e três não atingiram o critério para classificação.
- Perfis comportamentais no campo aberto e no labirinto em cruz elevado na fase de abstinência foram utilizados para auxiliar na classificação dos animais.
- A mianserina não alterou o consumo de água nos animais “adictos” e “não-adictos”, bem como nos grupos controles.

7. REFERÊNCIAS

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

AHMED, S. H.; KOOB, G. F. Long lasting increase in the set point for cocaine self-administration after escalation in rats. **Psychopharmacol** 1999; 146: 303-312.

AHMED, S. H.; WALKER, J. R.; KOOB, G. F. Persistent increase in the motivation to take heroin in rats with a history of drug escalation. **Neuropsychopharmacol** 2000; 22: 413-421,

ALTSHULER, H. L.; PHILLIPS, P. E.; FEINHANDLER, D. A. Alteration of ethanol self-administration by naltrexone. **Life Sci** 1980; 26: 679-688.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed, Washington, DC, 1994; 715-718.

ANJI, A.; KUMARI, M; SULLIVAN HANLEY N. R.; BRYAN G. L.; HENSLER J.G. Regulation of 5-HT(2A) receptor mRNA levels and binding sites in rat frontal cortex by the agonist DOI and the antagonist mianserin. **Neuropharmacol** 2000; 39(11): 1996-2005.

BARE, D. J; MCKINZIE, J. H; MCBRIDE, W. J. Development of rapid tolerance to ethanol-stimulated serotonin release in the ventral hippocampus. Alcohol: **Clin Exp Res** 1998; 22: 1272-1276.

BAUMANN, P. A.; MAITRE, L. Blockade of presynaptic alpha receptors and of amino uptake in the rat brain by the antidepressant mianserin. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol** 1977; 300: 31-37.

BECHARA, A. Decision making, impulse control and loss of willpower to resist drugs: a neurocognitive perspective. **Nature Neurosci** 2005; 8(11): 1458-1463.

BERGGREN, U.; ERIKSSON, M.; FAHLKE, C.; BALLDIN, J. Is long-term heavy alcohol consumption toxic for brain serotonergic neurons? Relationship between years of excessive alcohol consumption and serotonergic neurotransmission. **Drug Alcohol Depend** 2002; 65: 159-165.

BERGGREN, U.; FAHLKE, C.; BALLDIN, J. Alcohol-dependent patients with neuroendocrine evidence for reduced dopamine D2 receptor function have decreased platelet monoamine oxidase-B activity. **Alcohol Alcohol** 2000; 35: 210-211.

BHAVE, S. V.; SNELL, L. D.; TABAKOFF, B; HOFFMAN, P. I. Mechanism of ethanol inhibition of NMDA receptor function in primary cultures of cerebral cortical cell. **Alcohol Clin Exp Res** 1996; 20: 934-941.

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** 2000; 67 (2): 225-232.

BONKALE, W. L.; MURDOCK, S.; JANOSKY, J. E.; AUSTIN, M. C. Normal levels of tryptophan hydroxylase immunoreactivity in the dorsal raphe of depressed suicide victims. **J Neurochem** 2004; 88(4): 958-964.

BORGES, M.; CORREA, D.; TEIXEIRA, L. M.; BOERNGEN-LACERDA, R. Influence of previous ethanol-induced sensitization on addiction development in mice: a replication study. **Alcohol Clin Exp Res** 2006; 30: 503.

BOYCE-RUSTAY, J. M.; WIEDHOLZ, L. M.; MILLSTEIN, R. A.; CARROLL, J; MURPHY, D. L.; DAWS, L.C.; HOLMES, A. Ethanol-related behaviors in serotonin transporter knockout mice. **Alcohol Clin Exp Res** 2006; 30 (12):1957-65.

BRANDT, M. R.; FRANCE, C. P. Chronic 1-alpha acetylmethadol in rhesus monkeys: discriminative stimulus and other behavioral measures on dependence and withdrawal. **J Pharmacol Exp Ther** 1998;287;1029-1037,

BRODIE, M.S.; TRIFUNOVIC R.D.; SHEFNER, S. Serotonin potentiates ethanol-induced excitation of ventral tegmental area neurons in brain slices from three different rat strains. **J Pharmacol Exp Ther** 1995; 273:1139-1146.

BRODIE M. S. The ionic mechanism of serotonin potentiation of ethanol excitation of ventral tegmental area neurons. **Alcohol Clin Exp Res** 2004; 28: 212-214

BROWN, A. K.; GEORGE, D. T.; FUJITA, M.; LIOW, J. S.; ICHISE, M.; HIBBELN, J.; GHOSE, S.; SANGARE, J.; HOMMER, D.; INNIS, R. B. PET [11C]DASB imaging of

serotonin transporters in patients with alcoholism. **Alcohol Clin Exp Res** 2007; 31(1): 28-32.

BUCK K. J.; REILLY M. T.; ROGERS L. M.; SZELIGA K.; GRANT K.; BRODIE M. S. Serotonin 5-HT₂ receptors and alcohol: reward, withdrawal and discrimination. **Alcohol Clin Exp Res** 2004; 28:211-16.

CAMPBELL, A. D.; KOHL, R. R.; MCBRIDE, W. J. Serotonin-3 receptor and ethanol stimulated somatodendritic dopamine release. **Alcohol** 1996; 13: 569-574.

CAMPOS, S. de. Álcool e sistema nervoso central. 2003. **Revista cérebro e mente**. Disponível em: <<http://www.drashirleydecampos.com.br/categorias.php?categoriaid=33>> Acesso em: 12 nov 2006.

CARDOSO, S. H.; SABBATTINI, R. M. E.; MALAVAZZI, A. L. Neurofarmacologia do álcool. **Revista Cérebro e Mente**. 3 (8), 1999. Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

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. M. II Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do País – 2005; Brasília: Secretaria Nacional Antidrogas, 2007.

CHARNESS, M. E.; SIMOM, R. P.; GREENBERG, D. A. Ethanol and the nervous system. **N Engl J Med** 1989; 321: 442-54.

CHASTAIN, G. Alcohol, neurotransmitter systems, and behavior. *The J Gen Psychol* 2006; 33(4):329-35.

CHERPITEL, C. Alcohol and injuries: a review of international emergency room studies. **Addiction** 1993; 88: 923-937.

CHILDRESS, A. R.; MCLELLAN, A. T.; EHRMAN, R.; O'BRIEN, C. P. Classically conditioned responses in opioid and cocaine dependence: A role in relapse? *NIDA Res. Monogr* 1988 84: 25-43.

COLOMBO, G. ESBRA-NORDMANN 1996 Award Lecture: Ethanol drinking behavior in Sardinian alcohol-preferring rats. **Alcohol Alcoholism** 1997;32: 443-453.

COPER, H.; ROMMELSPACHER, H.; WOLFFGRAMM, J. The "point of no return" as a target of experimental research on drug dependence. **Drug Alcohol Depend** 1990; 25: 129-134,

COTT, J. M.; OGREN, S. O. Antidepressant drugs and ethanol: behavioral and pharmacokinetic interactions in mice. **J Neural Transm** 1980; 48:223-240.

CRABBE, J. C.; JOHNSON, N. A.; GRAY, D. K.; KOSOBUD, A.; YOUNG, E. R. Biphasic effects of ethanol of open field activity: Sensitivity and tolerance in C57BL/6N and DBA/2N mice. **Physiol Psychol** 1982; 96: 440-451.

CRABBE, J. C.; WAHLSTEN, D.; DUDEK, B. C. Genetics of mouse behavior: Interactions with laboratory environment. **Science** 1999; 284: 1670-1672.

CRABBE, J. C.; PHILLIPS, T. J.; FELLER, D. J.; HEN, R; WENGER, C. D.; LESSOV, C. N.; SCHAFER, G. L. Elevated alcohol consumption in null mutant mice lacking 5-HT_{1B} serotonin receptors. **Nat Genet** 1996; 14: 98-101.

CREWS, F. T.; BUCKLEY, T; DODD, P. R.; ENDE, G.; FOLEY, N; HARPER, C; HE, J.; INNES, D.; LOH, EL-W.; PFEFFERBAUM, A; ZOU, J; SULLIVAN, E. V. Alcoholic neurobiology: changes in dependence and recovery. **Alcohol Clin Exp Res** 2005; 29(8):1504-1513.

CUNNINGHAM, C. L.; FIDLER, T. L.; HILL, K. G. Animal models of alcohol's motivational effects. **Alcohol Res Health** 2000; 24:85-92.

DAVIS, K. M.; WU, J.Y. Role of glutamatergic and GABAergic systems in alcoholism. **J Biomed Sci** 2001; 8: 7-19.

DAWS, L. C.; MONTANEZ, S.; MUNN, J. L.; OWENS, W. A.; BAGANZ, N.L.; BOYCE-RUSTAY, J. M.; MILLSTEIN, R. A.; WIEDHOLZ, L. M.; MURPHY, D. L.; HOLMES, A. Ethanol inhibits clearance of brain serotonin by a serotonin transporter-independent mechanism. **J Neurosci** 2006; 26(24): 6431-6438.

DEVAUD, L. L; SMITH, F. D.; GRAYSON, D. R.; MORROW, A. L. Chronic ethanol consumption differentially alters the expression of g-aminobutyric acid A receptor subunit mRNAs in rat cerebral cortex: competitive, quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. **Mol Pharmacol** 1995; 48:861-868.

DEVAUD, L. L.; FRITSCHY, J. M.; SIEGHART, W.; MORROW, A. I. Bidirectional alterations of GABA A receptor subunit peptide levels in rat cortex during chronic ethanol consumption and withdrawal. **J Neurochem** 1997; 69:126-129.

DI CHIARA, G. Alcohol and dopamine. **Alcohol Health Res** 1997; 21(2): 108-113.

DOTTO BAU, C.H. Current status and perspectives on the genetics and epidemiology of alcoholism. **Ciencia e Saude Coletiva** 2002; 7(1): 183-190.

EMMETT-OGLESBY, M. W.; MATHIS, D. A.; MOON, R. T.; LAL, H. Animal models of drug withdrawal symptoms. **Psychopharmacol** 1990; 101: 292-309.

EDWARDS, G.; ARIF, A.; HADGSON R. Nomenclature and classification of drug- and alcohol-related problems: a WHO Memorandum. **Bull World Health Organ** 1981; 59(2): 225-242

FACHIN-SCHEIT D.;J.; FROZINO RIBEIRO A.; PIGATTO G.; GOELDNER O.; BOERNGEN-LACERDA R. Development of a mouse model of ethanol addiction:naltrexone efficacy in reducing consumption but not craving. **J Neural Transm** 2006; 113: 1305–1321.

FERGUSON, D. M.; LYNSKEY, M. T.; HORWOOD, L. J. Alcohol consumption and associated problems in a birth cohort of 15 years olds. **N Zealand Med J** 1994; 107: 167-170.

FROEHLICH, JC. Opioid peptides. **Alcohol Health Res World** 1997; 21: 132-136.

GARBUTT, J. C.; WEST, S. L.; CAREY, T. S.; LOHR, K. N.; CREWS, F.T. Pharmacological treatment of alcohol dependence: a review of the evidence. **JAMA** 1999; 281(14):1318-25.

GARDELL, L. R.; WHALEN, C. A.; CHAMBERS, M. D. Valproate reduces intake of alcoholic beverage among rats. **Behav Pharmacol** 1998; 9: 683-689

GATCH, M. B.; WALLIS, C. J.; LAL, H. Effects of ritanserin on ethanol withdrawal-induced anxiety in rats. **Alcohol** ,2000; 21: 11-17.

GENAZZANI, A. R.; NAPPI, G.; FACCHINETTI, F.; MAZZELLA G. L.; PARRINI, D.; SINFORIANI, E.; PETRAGLIA, F.; SAVOLDI, F. Central deficiency of beta-endorphin in alcohol addicts **J Clin Endocrinol Metab** 1982; 55: 583-586.

GEORGE, F. R.; TUASON, V. B.; EGGERTH, D. E.; RITZ, M. C.; WESTERBERG, V.; TONIGAN, J. S.; SANCHEZ, F. P.; CHAVEZ, R. Impact of sertraline on alcohol consumption in a open clinical trial. **Alcohol Clin** 1994; 18:464.

GERLAI, R.; LEE, V.; BLASER, R. Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (*Danio rerio*) **Pharmacol Biochem Behav** 2006; 85: 752-61.

GOELDNER, F. O.; PIGATTO, G.; RIBEIRO, A. F.; MACHADO, H. B.; BOERNGEN-LACERDA, R. Influence of fluoxetine and paroxetine in behavioral sensitization induced by ethanol in mice. **Pharmacol Biochem Behav** 2005; 82: 388-396.

GHOZLAND, S.; CHU, K.; KIEFFER, B. L.; ROBERTS A. J. Lack of stimulant and anxiolytic-like of ethanol and accelerated development of ethanol dependence in mu-opioid mice. **Neuropharmacol** 2005; 49: 493-501.

GONZALES, R. A.; WEISS, F. Suppression of ethanol-reinforced behavior by naltrexone is associated with attenuation of the ethanol-induced increase in dilysate dopamine levels in the nucleus accumbens. **J Neurosci** 1998; 18: 10663-10671.

GRAEFF, F. G. Abuso e dependência de drogas. In: GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. Fundamentos de psicofarmacologia. São Paulo: Editora Atheneu, 2001. p. 197-221.

GRAHAME, N. J.; MOSEMILLER, A. K.; LOW, M.J.; FROEHLICH, J. C. Naltrexone and alcohol drinking in mice lacking β -endorphin by site-directed mutagenesis. **Pharmacol Biochem Behav** 2000; 67: 759-766.

GULLEY, J. M.; MCNAMARA, C.; BARBERA, T. J.; RITZ, M. C.; GEORGE, F. R. Selective serotonin reuptake inhibitors: Effects of chronic treatment on ethanol-reinforced behaviour in mice. **Alcohol** 1995; 12(30):177-181

HAINÉ, S.E.; MILJOEN, H. P.; BLANKOFF, I.; VRINTS, C. J. Mianserin and ventricular tachycardia: case report and review of the literature. **Cardiology** 2006; 106(4): 195-198.

HALLIDAY, G.; BAKER, K.; HARPER, C. Serotonin and alcohol-related brain damage. **Metab. Brain Dis** 1995; 10: 25-30.

HARRIS, R. A.; MIHIC, S. J.; VALENZUELA, C. F. Alcohol and benzodiazepines: recent mechanistic studies. **Drug Alcohol Depend** 1998; 51: 155-164.

HEINZ, A.; GOLDMANN, D. Genotype effects on neurodegeneration and neuroadaptation in monoaminergic neurotransmitter systems. **Neurochem Inter** 2000; 37: 425-432.

HEINZ, A.; JONES, D. W.; MAZZANTI, C.; GOLDMAN, D.; RAGAN, P.; HOMMER, D.; LINNOILA, M.; WEINBERGER, D. R. Serotonin transporter genotype interacts with in vivo protein expression and chronic alcohol intake. **Biol Psychiatry** 2000; 47: 643-649.

HEINZ, A.; RAGAN, P.; JONES, D. W.; HOMMER, D.; WILLIAMS, W.; KNABLE, M. B.; GOREY, .L; DOTY, L.; GEYER, C.; LEE, K. S.; COPPOLA, R.; WEINBERGER, D. R.; LINNOILA, M. Reduced serotonin transporters in alcoholism. **American J Psyc** 1998; 155: 1544-1549.

HEYMAN, G. M. An Economic approach to animal models of alcoholism. **Alcohol Res Health** 2000; 24 (Suppl. 2): 132-140.

HIGLEY, J. D.; SUOMI, J.; LINNOILA, M. A nonhuman primate model of type II excessive alcohol drinking consumption? Part 1. Low cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid concentrations and diminished social competence correlate with excessive alcohol consumption. **Alcohol Clin Exp Res** 1996; 20: 629-642.

HIROEH, U.; APPLEBY, L.; MORTENSEN, P. B.; DUNN, G. Death by homicide, suicide, and other unnatural causes in people with mental illness: a population-based study. **Lancet** 2001; 358: 2110-2112.

HOFFMAN, P. L.; RABE, C. S.; MOSES, F.; TABAKOFF, B. N-methyl-D-aspartate receptors and ethanol: inhibition of calcium flux and cyclic GMP production. **J Neurochem** 1989; 52: 1937-1940.

HWU, H.G.; CHEN, C.H. Association of 5HT2A receptor gene polymorphism and alcohol abuse with behavior problems. **Am J Med Genet** 2000; 96(6):797-800.

IVANETS, N.N.; ANOKHINA I. P.; KOGAN B. M.; CHIRKO V. V.; NEBARAKOVA T. P.; RUSINOV A.V. The efficacy and mechanisms of action of lerivon in alcoholism. **Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova** 1996; 96(5): 52-58.

JENTSCH, J. D.; JENTSCH, J. D.; HENRY, P. J.; MASON, P. A.; MERRITT, J. H.; ZIRIAX, J. M. Establishing orally self-administered cocaine as a reinforcer in rats using home-cage pre-exposure. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** 1998; 22: 229-239,.

JOHNSON, B. A.; AIT-DAOUD, N. Neuropharmacological treatments for alcoholism: scientific basis and clinical findings. **Psychopharmacol** 2000; 149: 327-344.

JOHNSON, B. A. Progress in the development of topiramate for treating alcohol dependence: from a hypothesis to a proof-of-concept study. **Alcohol Clin Exp Res** 2004; 28: 1137-1144.

KAMEYAMA, T.; NAGASAKA, M.; YAMADA, K. Effects of antidepressant drugs on a quickly-learned conditioned-suppression response in mice. **Neuropharmacol** 1985; 24: 285–290.

KOOB, G. F.; CARRERA, M. R. A.; GOLD, L. H.; HEYSER, C. J.; MALDONADO-IRIZARRY, C.; MARKOU, A.; PARSONS, L. H.; ROBERTS, A.J.; SCHULTEIS, G.; STINUS, L.; WALKER, J. R.; WEISSENBORN, R.; WEISS, F. Substance dependence as a compulsive behavior. **J Psychopharmacol** 1998; 12: 39-48.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Drug abuse: hedonic homeo- Effect of antagonists selective for mu, delta and k opioid receptors static dysregulation. **Science**. 1997; 278: 52–58.

KOOB, G. F. Animal models of craving for ethanol. **Addiction** 2000; 95 (Suppl. 2): 73-81,

KOOB, G.F.; LE MOAL, M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. **Neuropsychopharmacol** 2001; 24: 97–129.

KOOB, G. F.; NESTLER, E. J. The neurobiology of drug addiction. **J. Neuropsychiatry Clin Exp Res** 1997; 9: 482-497.

KOSTOWSKI, W.; DYR, W. Effects of 5-HT1A receptor agonists on ethanol preference in the rat. **Alcohol** 1992; 9: 283-286.

KRANZLER, H. R.; PIERUCCI-LAGHA, A.; FEINN, R.; HERNANDEZ-AVILA, C. Effects of ondansetron in early-versus late-onset alcoholics: a prospective, open-label study. **Alcohol Clin Exp Res** 2003; 27: 1150-1155.

KRYSTAL, J. H.; STALEY, J.; MASON, G.; PETRAKIS, I. L.; KAUFMAN, J.; HARRIS, R. A.; GELERNTER, J.; LAPPALAINEN, J. Gamma-aminobutyric acid type A receptors and alcoholism: intoxication, dependence, vulnerability, and treatment. **Arch Gen Psychiatric** 2006;63: 957-968.

KRYSTAL, J.H.; PETRASKI, I.L.; WEBB, E.; COONEY, N. L.; KARPER, L. P.; .,; STETSON P, TREVISAN, L. A.; CHARNEY, D. S. Dose-related ethanol-like effects of the NMDA antagonist, ketamine, in recently detoxified alcoholics. **Arch Gen Psychiatric** 1998; 55: 354-360.

LAL, H.; PRATHER, P. L.; REZAZADEH, S. M. Potential role of 5HT1C and/or 5HT2 receptors in the mianserin-induced prevention of anxiogenic behaviors occurring during ethanol withdrawal. **Alcohol Clin Exp Res** 1993; 17: 411–417.

LEMARQUAND, D.; PIHL, R. O.; BENKELFAT, C. Serotonin and alcohol intake, abuse, and dependence: findings of animal studies. **Biol Psychiatry** 1994; 36: 395-421.

LESCH, K. –P. Alcohol dependence and gene x environment interaction in emotion regulation: is serotonin the link? **Eur Journ Pharmacol** 2005; 526: 113-124.

LI, T. K. Pharmacogenetics of responses to alcohol and genes that influence alcohol drinking. **J Stud Alcohol** 2000; 61: 5-12.

LI, TK; SPANAGEL, R; COLOMBO, G; et al. Alcohol reinforcement and voluntary ethanol consumption. **Alcohol Clin Exp Res** 2001; 25: 117s-126s

LIMA, D. R. **Manual de Farmacologia Clínica, Terapêutica e Toxicologia**. Rio de Janeiro; Editora Médica e Científica Ltda, 2003. V.1, 892p.

LIN, N.; HUBBARD, J. I. The increased ethanol preference in rats induced by choice, darkness, choice, or drugs is reduced by ritanserin. **Brain Res Bull** 1994; 33:633-638.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacol** 1987; 92: 78-83.

LONG, T. A.; KALMUS G. W.; BJORK, A.; MYERS R. D. Alcohol intake in high alcohol drinking (HAD) rats is suppressed by FG5865, a novel 5-HT_{1A} agonist/5-HT₂ antagonist. **Pharmacol Biochem Behav** 1996; 53: 33-40.

LOVINGER, D. M. Excitotoxicity and alcohol-related brain damage. **Alcohol Clin Exp Res** 1993; 17: 19-27.

LOVINGER, D. M. Alcohols and neurotransmitter gated ion channels: past, present and future. Naunyn Schmiedeberg's **Arch. Pharmacol** 1997; 356: 267-282.

LOVINGER, D. M. The role of serotonin in alcohol's effects on the brain. **Current Separations** 1999; 18 (1): 23-28.

LU, M-R.; WAGNER, G. C.; FISHER, H. Ethanol consumption following acute treatment with methysergide, fluoxetine, fenfluramine, and their combination. **Brain Res Bull** 1994; 44:931-937

LU, M-R.; WAGNER, G. C.; FISHER, H. Ethanol consumption following acute fenfluramine, fluoxetine, and dietary tryptophan. **Pharmacol Biochem Behav** 1993; 44:931-937

MALCOLM, R.; MYRICK, H.; ROBERTS, J.; WANG, W.; ANTON R. F.; BALLENGER, J. C. The effects of carbamazepine and lorazepam on single versus multiple previous alcohol withdrawals in an outpatient randomized trial. **J Gen Intern Med** 2002; 17:349-355.

MAREK ,G. J.; CARPENTER ,L. L.; MCDOUGLE, C. J.; PRICE, L. H. Synergistic action of 5-HT_{2a} antagonists and selective serotonin reuptake inhibitors in neuropsychiatric disorders. **Neuropsychopharmacol** 2003; 28:402-412.

MARQUES, A. C. P. R.; RIBEIRO, M. Projeto diretrizes: abuso e dependência do álcool. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, 2002. 3-20.

MARRA, D.; WAROT, D.; BERLIN, I.; HISPARD, E.; NOTIDES, C.; TILIKETE, S.; PAYAN, C.; LÉPINE, J. P.; DALLY, S.; AUBIN, H. J. Amisulpride does not prevent relapse in primary alcohol dependence: results of a pilot randomized, placebo-controlled trial. **Alcohol Clin Exp Res** 2002; 26:1545-1552.

MASON, J. B. Treatment of alcohol-dependent outpatients with acamprosate: a clinical review. **J Clin Psychiatry** 2001; 62(suppl20): 42-48.

MASON, J. B.; RITVO, E. C.; MORGAN, R. Q.; SALVATO, F. R.; GOLDBERG, G.; WELCH, B.; MANTERO-ATIENZA, E. A double-blind, placebo-controlled pilot study to evaluate the efficacy and safety of oral nalmefene HCl for alcohol dependence. **Alcohol Clin Exp Res** 1994; 18: 1162-1167.

MASUR, J.; BOERNGEN, R. The excitatory component of ethanol in mice: a chronic study. **Pharmacol Biochem Behav** 1980; 13: 777-780.

MATTILA, M.J.; LILJEQUIST, R.; SEPPALA, T. Effects of amitriptyline and mianserin on psychomotor skills and memory in man. **Br J Clin Pharmacol**, 1998; 25: 53-55.

MAUREL, S.; DE VRY, J.; SCHREIBER, R. Comparison of the effects of the selective serotonin-reuptake inhibitors fluoxetine, paroxetine, citalopram and fluvoxamine in alcohol-preferring cAA rats. **Alcohol** 1999; 17: 195-201.

MAUREL, S.; VRY, J.; BEUN, R.; SCHREIBER, R. 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C}/5-HT_{1B} receptors are differentially involved in alcohol preference and consummatory behavior in cAA rats. **Pharmacol Biochem Behav** 1998; 2:89-96.

McBRIDE, W. J. Central nucleus of the amygdale and effects of alcohol and alcohol-drinking behavior in rodents. **Pharmacol Biochem Behav** 2002;71: 509-515.

McBRIDE, W. J.; LI, T.K. Animal models of alcoholism: neurobiology of high alcohol-drinking behavior in rodents. **Crit Rev Neurobiol**. 1998; 12 (4): 339-69.

McBRIDE, W.J.; GAUN, X-M.; CHERNET, E.; LUMENG, L.; LI, T-K. Serotonin , dopamine and GABA involvement in alcohol-drinking of selectively bred rats. **Alcohol** 1990; 7: 199-205

McFARLAND, K.; ETTEMBERG, A. Reinstatement of drug-seeking behavior produced by heroin-predictive environmental stimuli. **Psychopharmacol** 1997; 131: 86-92.

MEERT, T. F. Pharmacological evaluation of alcohol withdrawal induced inhibition of exploratory behaviour and supersensitivity to harmine-induced tremor. **Alcohol** 1994; 29: 91-102.

MEERT, T. F.; JANSSEN, P. A. Ritanserin, a new therapeutic approach for drug abuse. Part 1: Effects on alcohol. **Drug Dev Res** 1991; 24: 235-249.

MEERT, T. F.; AWOUTERS, F.; NIEMEGEREERS, C. J.; SCHELLEKENS, K. H.; JANSSEN, P. A. Ritanserin reduces abuse of alcohol, cocaine, and fentanyl in rats. **Pharmacopsych** 1991; 24 (5): 159-63.

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

MIHIC, S. J. Acute effects of ethanol on GABA_A and glycine receptor function. **Neurochem Int** 1999; 35: 115-123.

MONTEROSSO, J. R.; FLANNERY B. A.; PETINATTI, M.; OSLIN, D.W.; RUKSTALIS, M.; O'BRIEN, C. P.; VOLPICELLI, J. R. Predicting treatment response to naltrexone: the influence of craving and family history. **Am J Addict** 2001; 10: 258-268

MONTI, J.; ALTERWAIN, P. Ritanserin decreases alcohol intake in chronic alcoholics. **Lancet** 1991; 337:60.

MOREAU, R. L. M. Fármacos e drogas que causam dependência. In: Oga, S. (ed) **Fundamentos De Toxicologia**. Atheneu Editora, São Paulo, pp. 230-240, 1996.

MORROW, A. L. Regulation of GABA_A receptor function and gene expression in the central nervous system. In: Bradley, R. J.; Harris, R. A. (eds) *International Review of Neurobiology*. **Academic Press** San Diego 1995; 38: 1-41.

MYERS R, LANKFORD M, BJÖRK A. Selective reduction the 5-HT antagonist amperozide of alcohol preference induced in rats by cyanamide. **Pharmacol Biochem Behav** 1992; 43(3): 661-667.

MYERS, R.; LANKFORD, M.; BJÖRK, A. Failure of the 5-HT₂ receptor antagonist, ritanserin, to alter preference for alcohol in drinking rats. **Pharmacol Biochem Behav** 1993a; 45: 233-237.

MYERS R, LANKFORD M, BJÖRK A. 5-HT₂ receptor blockade by amperozide suppressed ethanol drinking in genetically preferring (P) rats. **Pharmacol Biochem Behav** 1993b; 45(3): 741-747.

NAKAMURA, T.; MATSUSHITA, S.; NISHIGUCHI, N.; KIMURA, M.; YOSHINO, A.; HIGUCHI, S. Association of a polymorphism of the 5HT2A receptor gene promoter region with alcohol dependence. **Mol Psychiatry** 1999; 4(1): 85-8.

NOTO, A. R.; MOURA, Y. G.; NAPPO, S. A.; GALDUROZ, J. C. F.; CARLINI, E. A. Interações por transtornos mentais e de comportamento decorrentes de substâncias psicoativas: um estudo epidemiológico nacional do período de 1988 a 1999. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria** 2002, 51(2): 113-121.

NUTT, D.; ADINOFF, B.; LINNOILA, M. Benzodiazepines in the treatment of alcoholism. **Recent Dev Alcohol** 1989; 7: 283-313.

O'BRIEN, C. P.; CHILDRESS, A. R.; MCLELLAN, A. T.; EHRMAN R. Classical conditioning in drug-dependent humans. **Ann. N.Y. Acad. Sci** 1992.; 654: 400-415.

ODO, A. S.; ARAÚJO, A. C.; SANTOS, A. F.; TOLEDO, F. C. P.; YONAMINE, M.; SILVA, A.; LEITE, M. C. Indicações e limites das análises toxicológicas para substâncias psicoativas. **Rev Psiquiatr Clin** 2000; 27(1): 50-6.

OJANEN S.P.; HYYTIÄ P.; KIIANMAA K. Behavioral sensitization and voluntary ethanol drinking in alcohol-preferring AA rats exposed to different regimens of morphine treatment. **Pharmacol Biochem Behav** 2005; 221-280.

OLAUSSON, P. Nicotine sensitization and loss of inhibitory control. **Doctoral Thesis**, Göteborg University, Sweden, ISBN 2000; 91: 628-4251-X.

OLDENDORF, W.H.; Brain uptake of radiolabelled amino acids, amines and hexoses after artificial injection. **Aim J Physiol** 1971; 221: 1629-1639

OSLIN, D.; ATKINSON, R. M.; SMITH, D. M.; HENDRIE, H. Alcohol related dementia: proposed clinical criteria. **Int. J. Geriatr. Psychiatry** 1998; 13: 203-212.

OSLIN, D. W.; BERRETTINI, W.; KRANZLER, H. R.; PETTINATI, H.; GELERNTER, J.; VOLPICELLI, J. R.; O'BRIEN, C. P. A functional polymorphism of the mu-opioid receptor gene is associated with naltrexone response in alcohol-dependent patients. **Neuropsychopharmacol** 2003; 28: 1546-1552.

OSWALD, L.M.; WAND, G. S. Opioids and alcoholism. **Physiol. Behav** 2004; 81 (2): 339-58.

PANOCKA I, CICCOCIO PPO R, POMPEI P, MASSI M.; 5-HT₂ receptor antagonists do not reduce ethanol preference in Sardinian alcohol-preferring (sP) rats. **Pharmacol Biochem Behav** 1993a; 46:853–856.

PANOCKA I, CICCOCIO PPO R, POLIDORI C, MASSI M.; The nucleus accumbens is a site of action for the inhibitory effect of ritanserin on ethanol intake in rats. **Pharmacol Biochem Behav** 1993b; 46:857-862

PETRAKIS, I. L. A Rational Approach to the Pharmacotherapy of Alcohol Dependence. **J Clin Psychopharmacol** 2006; 26(6) Supplement 1:S3-S12.

PETRAKIS, I. L.; KRYSTAL, J. Neuroscience: implications for treatment. **Alc Health Res World** 1997; 21(2):157-16.

PHILLIPS, T. Animal models for the genetic study of human alcohol phenotypes. **Alcohol Res Health** 2002; 26: 202-207.

PIETRZAK, B.; KUBIK-BOGUĆKA, E. Influence of mianserin on some central effects of ethanol. **Pharmacol Res** 2002; 46: 47-54.

PINSKY, I.; LARANJEIRA, R. O fenômeno do dirigir alcoolizado no Brasil e no mundo: revisão de literatura. **Rev. ABP-APAL** 1998; 20:160-165.

PIVAC, N.; MÜCK-SELER, D.; MUSTAPIC, M.; NENADIC-SVIGLIN, K.; KOZARIC-KOVACIC, D. Platelet serotonin concentration in alcoholic subjects. **Life Sci** 2004; 76: 521-531.

PRATHER, P. L.; REZAZADEH, S. M.; LAL H. Mianserin in treatment of ethanol withdrawal in the rat: prevention of behaviors indicative of anxiety. **Psychopharmacol Bull** 1991; 27: 285–289.

PRIVETTE, T.; HORNSBY, R.; MYERS, R. D. Buspirone alters alcohol drinking induced in rats by tetrahydropapaveroline injected into brain monoaminergic pathways. **Alcohol** 1988; 5: 147-152.

PULVIRENTI, L., BALDUCCI, C. PIERCY, M., KOOB, G. F. Characterization of the effects of the partial dopamine agonist terguride on cocaine self-administration in the rat. **J Pharmacol Exp Ther** 1998; 286(3): 1231-1238.

RATSMA, J. E.; VAN DER STELT, O.; GUNNING, W. B. Neurochemical markers of alcoholism in humans. **Alcohol and Alcoholism** 2002; 37 (6): 522-533.

RIBEIRO, A. F.; PIGATTO, G.; GOELDNER, F. O.; LOPES, J. F.; 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** 2008; 115: 43–54.

RISINGER, F. O.; BOYCE, J. M. 5-HT_{1A} receptor blockade and the motivational profile of ethanol. **Life Sci** 2002; 71: 707-15.

RISINGER, F. O.; OAKES, R. A. Mianserin enhancement of ethanol-induced conditioned place preference. **Behav Pharmacol** 1996; 7(3): 294-298

ROBERTS, A. J.; HEYSER, C. J.; COLE, M.; GRIFFIN, P.; KOOB, G. F. Excessive ethanol drinking following a history of dependence: animal model of allostasis. **Neuropsychopharmacol** 2000; 22: 581-594.

ROBINSON, T.E.; BERRIDGE, K. C. **Addiction**. *Ann Rev Psychol* 2003; 54: 25-53.

ROBINSON, T.E.; BERRIDGE, K. C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. **Brain Res** 1993; 18(3): 247-91.

ROSIN, A.; KITCHEN, I.; GEORGIEVA, J. Effects of single and dual administration of cocaine and ethanol and opioid and ORL1 receptor expression in rat CNS: an autoradiographic study **Brain Res** 2003; 978: 1-13.

SANNA, E.; SERRA, M.; COSSU, A.; COLOMBO, G.; FOLLESA, P.; CUCCHEDDU T.; CONCAS, A.; BIGGIO, G. Chronic ethanol intoxication induces differential effects on GABA_A and NMDA receptor function in the rat brain **Alcohol Clin Exp Res** 1993; 17:115-123.

SCHUCKIT, M. A; MAZZANTI, C; SMITH, T. L; AHMED, U; RADEL, M; IWATA, N; GOLDMAN, D. Selective genotyping for the role of 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, and GABA_α 6 receptors and the serotonin transporter in the level of response to alcohol: a pilot study. **Biol. Psychiatry** 1999; 45: 647–651.

SCHUTZ, C. G.; SOYKA, M. Dextromethorphan challenge in alcohol-dependent patients and controls. **Arch Gen Psychiatric** 2000; 57:291-292.

SEE, R. E.; GRIMM, J. W.; KRUZICH, P. J.; RUSTAY, N. The importance of a compound stimulus in conditioned drug-seeking behavior following one week of extinction from self-administered cocaine in rats. **Drug Alcohol Depend** 1999; 57: 41-49.

SELLERS, E. M.; TONEATTO, T.; ROMACH, M. K.; SOME, G. R.; SOBELL, L. C.; SOBELL, M. B. Clinical efficacy of the 5-HT₃ antagonist ondansetron in alcohol abuse and dependence. **Alcohol Clin Exp Res** 1994; 18: 879-885.

SELLERS, E. M.; HIGGINS, G. A.; SOBELL, M. B. 5-HT and alcohol abuse. **Trends Pharmacol Sci** 1992; 13: 69-75.

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* 2002; 1381-1397.

SOLOMON, R. L. The opponent-process theory of acquired motivation: the affective dynamics of addiction. *Psychopathology Models* 1977; 124-145.

SPANAGEL, R. Alcohol addiction research: from animal models to clinics. *Best Practice Res Clin Gastroenterology* 2003; 17: 507-518.

SPANAGEL, R. Recent animal models of alcoholism. **Alcohol Res Health** 2000; 24 (Suppl. 2): 124-131,

SPANAGEL, R.; HÖLTER, S. M. Pharmacological validation of a new animal model of alcoholism. **Journal of Neural Transmission** 2000; 107: 669-680.

STROMBERG, C.; MATTILA, M. J. Acute comparison of clovoxamine and mianserin, alone and in combination with ethanol, on human psychomotor performance. **Pharmacol Toxicol** 1987; 60: 374-379.

SVENSSON, L.; ENGEL, J.; HARD, E.; effects of the 5-HT_{1A} receptor agonist, 8-OH-DPAT, on ethanol preference in the rat. **Alcohol** 1989; 9: 857-861.

TABAKOFF, B.; HOFFMAN, H. L. Animal models in alcohol research. **Alcohol Res Health** 2000; 24 ; 77-84.

TERENINA-RIGALDIE, E.; JONES B. C.; MORMED, P. The High-ol Preferring rat as a model to study the shift between alcohol abuse and dependence. **Eur J Pharmacol** 2004; 504: 199-206.

TOMKINS, D. M; LE, A. D; SELLERS, E. M. Effect of the 5-HT₃ antagonist ondasetron on voluntary ethanol intake in rats and mice maintained on a limited access procedure. **Psychopharmacol** 1995; 117 (4): 479-485.

TOMKINS, D. M; SELLERS, E. M. Addiction and brain: the role of neurotransmitters in the cause and treatment of drug dependence. **CMAJ** 2001; 164 (6): 817821.

TRIFUNOVIC, R. D.; BRODIE, M. S. The effects of clomipramine on the excitatory action of ethanol on dopaminergic neurons of the ventral tegmental area in vitro. **J Pharmacol Exp Ther** 1996; 276: 34-40.

TURCHAN, J.; PRZEWLOCKA, B.; TOTH, G.; LASON, W.; BORSODI, A.; PRZEWLOCKI, R. The effect of repeatd administration of morphini,cocaine and ethanol on mu and delta opioid receptor density in the nucleus accumbens and striatum of the rat. **Neurosci** 1999; 91: 971-977.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Special report to the US Congress on Alcohol and Health. 10 ed., United States: National Institutes of Health 2000; 78-133.

VAILLANT, G. E. A long term follow-up of male alcohol abuse. Arch Gen **Psychiatry** 1996; 53: 243-249.

VASCONCELOS, S. M. M.; FEITOSA, L. B.; FELIX, P. A.; AGUIAR, L. M. V.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B. Motivação, vias neuronais e drogas de abuso. **Rev Psiq Clin** 2002; 29(3): 130-134.

VIZCARRA, M. B.; CORTES, J.; BUSTOS, L.; ALARCON, M.; MUNOZ, S. Conjugal violence in the city Temuco. Prevalence studies and associated factors. **Rev Med Chil** 2001; 129: 1405-1412.

VOLKOW, N. D.; FOWLER, J. S.; WANG, G. J.; SAWNSON, J. M. Dopamine i drug abuse and addiction: results from imaging studies and treatment implications. **Mol Psychiatry** 2004; 9: 557-569.

VOLKOW, N. D.; FOWLER, J. S.; WANG, G.; GOLDSTEIN, R. Z. Role of dopamine, the frontal cortex and memory circuits in drug addiction: insight from imaging studies. **Neurobiol Learn Mem** 2002; 78: 610-624.

VOLKOW, N. D.; WANG, G. J.; HITZEMANN, R.; FOWLER, J. S.; WOLF, A. P.; PAPPAS, N.; BIEGON, A.; DEWEY, S. L. Decreased cerebral response to inhibitory neurotransmission in alcoholics. **Am J Psychiatry**.1993; 150: 417-422.

VOLPICELLI, J. L.; ATERMAN, A. I.; HAYASHIDA, M.; O'BRIEN, C. P. Naltrexone in the treatment of alcoholism dependence. A controlled study. **Arch Gen Psychiatric** 1992; 49:881-887.

WALSH, R.; CUMMINS, R. A. The open-field test: a critical review. **Psychol Bull** 1976; 83: 482-504.

WEINSTEIN, A.; FELDTKELLER, B.; FENNEY, A.; LINGFORD-HUGHES, A.; NUTT D. A pilot study on the effects of treatment with acamprosate on craving for alcohol in alcohol-dependent patients. **Addict Biol** 2003: 229-232.

WEISS, F. MALDONADO-VLAAR, C. S.; PARSONS, L. H.; KERR, T. M.; SMITH, D. L.; BEN-SHAHAR, O. Control of cocaine-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats: effects on recovery of extinguished operant-responding and extracellular dopamine levels in amygdala and nucleus accumbens. **Proc Natl Acad Sci USA** 2000; 97: 4321-4326.

WEISS, F. Neuroadaptive changes in neurotransmitter systems mediating ethanol-induced behaviors. Review of NIAAA's **Neurosci Beh Res** Portfolio 2000; 34: 261-314.

WEISS, F; LORANG, M. T.; BLOOM, F. E. Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus accumbens: genetic and motivational determinants. **J Pharmacol Ther** 1993, 267: 250-258.

WHITE, H. R.; CHEN, P. H. Problem drinkink and intimate partner violence. **J Stud Alcohol** 2002; 63: 205-214.

WHO (World Health Organization). Global status report on alcohol. Geneva: WHO, 1999. Disponível em<http://www.who.int/substance_abuse/pubs_alcool.htm> Acesso em: 10 dez 2006.

WHO (World Health Organization) The World Health Report 2002 Quantifying selected major risks to health. 2002. cap. 4, p. 47-92.

WIKLER A. Recent progress in research on the neurophysiological basis of morphine addiction. **Am J Psychiatry** 1948; 105: 329-338.

WILSON, A. W.; NEIL, J. C.; COSTALL, B. Strain differences in ethanol preference and reinforced behaviour: a comparison of two-bottle choice and operant self-administration paradigms. **Behav Pharmacol** 1997; 8(1): 37-46.

WILSON, A. W.; NEIL, J. C.; COSTALL, B. An investigation into the effects of 5-HT agonists and receptor antagonists on ethanol self-administration in the rat.. **Alcohol** 1998; 16 (3):249-70.

WOLFFGRAMM, J. Free choice ethanol intake of laboratory rats under different social conditions. **Psychopharmacol** 1990; 101: 233-239.

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 Res** 1995; 70: 77-94.

WOLFFGRAMM, J. et al. Animal models of addiction: models for therapeutic strategies? **J Neural Trans** 2000; 107: 649-668.

YOSHIMOTO, K.; UEDA, S.; KATO, B.; TAKEUCHI, Y.; KAWAI, Y.; NORITAKE, K.; YASUHARA, M. Alcohol enhances characteristic release of dopamine and serotonin in the central nucleus of the amygdale. **Neurochem. Int** 2000; 37: 369-376.

YOSHIMOTO, K.; MCBRIDE, W. J.; LUMENG, L.; LI, T. K. Alcohol stimulates the release of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens. **Alcohol** 1992; 9: 17-22.

APÊNDICE 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS ANIMAIS

TABELA 1 - PADRÃO INDIVIDUAL DE CONSUMO DE ETANOL DO GRUPO LEVE (L) E PREFERÊNCIA ENTRE ETANOL E ÁGUA

LE - 15					RE - 11		AD - 14		ANOVA	
Na	Pref	M (g/kg) ± SE	T	P	Na	M (g/kg) ± SE	Na	M (g/kg) ± SE	F(2,45)	P
5	A	3,5±0,22	6,820	0,000	5	3,9±0,51	5	2,2±0,31 a,b	5,646	0,006
6	A	3,2±0,18	17,660	0,000	6	3,5±0,30	6	2,3±0,31 a,b	4,460	0,170
9	A	4,6±0,29	8,020	0,000	9	4,8±0,42	9	3,0±0,40 a,b	6,220	0,004
11	A	4,5±0,19	24,540	0,000	11	4,4±0,36	11	3,4±0,52 b	3,003	0,059
13	A	5,8±0,39	4,050	0,000	13	4,3±0,51 a	13	3,2±0,20 a	12,430	0,000
20	A	5,7±0,41	2,340	0,030	20	4,6±0,33	20	3,5±0,38 a,b	8,183	0,000
22	A	4,5±0,22	17,680	0,000	22	3,5±0,35 a	22	2,7±0,24 a,b	12,167	0,000
25	A	3,3±0,29	21,160	0,000	25	2,9±0,0	25	2,3±0,29 a	3,325	0,049
42	A	4,2±0,14	23,270	0,000	42	3,6±0,29	42	3,2±0,30 a	4,338	0,018
45	A	4,3±0,15	4,370	0,000	45	2,7±0,24 a	45	3,1±0,25 a	16,449	0,000
46	A	4,0±0,19	18,260	0,000	46	3,7±0,52	46	2,9±0,15 a	3,267	0,047
48	A	5,9±0,31	12,890	0,000	48	4,7±0,41 a	48	4,0±0,29 a	7,976	0,001
58	A	5,0±0,32	13,640	0,000	58	3,4±0,31 a	58	4,0±0,37 a	6,112	0,004
59	A	5,3±0,26	10,870	0,000	59	3,9±0,41 a	59	3,7±0,11 a	10,040	0,000

NOTA: O consumo de etanol está expresso como média ± erro padrão do consumo diário durante as semanas de cada fase (livre escolha: últimas 2 semanas antes da abstinência; reapresentação: 2 semanas após a abstinência; adulteração: 2 semanas seguintes à reapresentação).. A preferência está expressa como Pref.: A – preferência pela água. Na coluna da direita estão os valores de F para análise de variância (ANOVA) de uma via para o consumo individual de etanol e os respectivos valores de p. a- diferente da fase de livre escolha; b- diferente da fase de reapresentação (p≤0,05 pelo menos, Newman-Keuls). Na- número do animal.

TABELA 2 - PADRÃO INDIVIDUAL DE CONSUMO DE ETANOL DO GRUPO LEVE ADICTO (LA) E PREFERÊNCIA ENTRE ETANOL E ÁGUA

LE - 15					RE - 11		AD - 14		ANOVA	
Na	Pref	M (g/kg) ± SE	T	P	Na	M (g/kg) ± SE	Na	M (g/kg) ± SE	F(2,45)	P
7	A	3,8±0,30	4,840	0,000	7	4,1±0,34	7	3,5±0,21	1,007	0,373
10	A	3,1±0,20	16,200	0,000	10	4,2±0,41 a	10	3,8±0,24	3,857	0,028
16	A	3,7±0,30	12,540	0,000	16	3,9±0,35	16	3,2±0,30	1,379	0,257
18	A	5,6±0,42	12,940	0,000	18	4,9±0,53	18	4,2±0,40	2,341	0,107
19	A	3,7±0,38	13,250	0,000	19	3,3±0,53	19	3,2±0,25	0,526	0,594
24	A	4,0±0,32	15,720	0,000	24	4,1±0,29	24	3,5±0,24	0,997	0,376
27	A	4,2±0,26	29,730	0,000	27	3,7±0,32	27	3,5±0,23	1,475	0,239
37	A	3,7±0,33	16,900	0,000	37	4,1±0,45	37	4,1±0,28	0,567	0,570
40	A	4,4±0,34	12,300	0,000	40	4,4±0,57	40	4,5±0,37	0,011	0,988
47	A	4,4±0,4	5,090	0,000	47	4,2±0,46	47	3,8±0,22	0,544	0,584
51	A	4,3±0,30	13,860	0,000	51	6,0±0,85 a	51	4,3±0,55 b	3,782	0,030
55	A	5,2±0,29	17,540	0,000	55	5,5±0,52	55	4,4±0,23	2,368	0,105
56	A	4,6±0,41	17,950	0,000	56	4,8±0,40	56	4,1±0,42	0,581	0,562

NOTA: O consumo de etanol está expresso como média ± erro padrão do consumo diário durante as semanas de cada fase (livre escolha: últimas 2 semanas antes da abstinência; reapresentação: 2 semanas após a abstinência; adulteração: 2 semanas seguintes à reapresentação). A preferência está expressa como Pref.: A – preferência pela água. Na coluna da direita estão os valores de F para análise de variância (ANOVA) de uma via para o consumo individual de etanol e os respectivos valores de p. diferente da fase de livre escolha; b- diferente da fase de reapresentação ($p \leq 0,05$ pelo menos, Newman-Keuls). Na- número do animal.

TABELA 3 - PADRÃO INDIVIDUAL DE CONSUMO DE ETANOL DO GRUPO PESADO (P) E PREFERÊNCIA ENTRE ETANOL E ÁGUA

LE - 15					RE - 11		AD - 14		ANOVA	
Na	Pref	M (g/kg) ± SE	T	P	Na	M (g/kg) ± SE	Na	M (g/kg) ± SE	F(2,45)	P
1	E	10,8±0,30	-28,71	0,000	1	5,5±0,62 a	1	3,9±0,26 a.,	85,880	0,000
2	E	9,1±0,56	-9,270	0,000	2	6,8±0,53 a	2	6,5±0,20 a	9,180	0,000
3	E	7,7±0,40	-10,76	0,000	3	5,6±0,45 a	3	5,8±0,61 a	6,361	0,003
4	E	8,4 ±0,26	-29,98	0,000	4	4,6±0,30 a	4	3,4 ±0,28 a,b	91,647	0,000
12	E	14,0 ±0,51	-22,38	0,000	12	12,2 ±0,80 a	12	11,1±0,54 a	6,220	0,004
17	E	10,7±0,49	-20,69	0,000	17	7,7±0,65 a	17	6,6±0,40 a	17,078	0,000
29	E	9,0±0,29	-19,73	0,000	29	7,3±0,39 a	29	6,3±0,45 a	14,551	0,000
32	E	7,3±0,28	-6,500	0,000	32	3,6 ±0,69 a	32	1,9 ±0,18 a, b	46,793	0,000
33	E	6,8±0,39	-6,010	0,000	33	5,2±0,46 a	33	3,0±0,30 a,b	22,577	0,000
43	E	10,5 ±0,52	-18,23	0,000	43	9,0 ±0,51 a	43	6,7 ±0,18 a,b	16,972	0,000
49	E	9,2±0,59	-0,420	0,790	49	5,6±0,7 a	49	4,4±0,37 a	19,657	0,000
50	E	6,0±0,25	0,500	0,620	50	4,2±0,50 a	50	3,4±0,29 a	15,872	0,000
54	E	8,4±0,60	-3,810	0,000	54	6,0±0,47 a	54	5,8±0,46 a	7,543	0,001
57	E	7,0±0,41	-1,940	0,060	57	6,2±0,42	57	5,3±0,31 a	4,889	0,011
60	E	9,8±0,37	-5,690	0,000	60	7,9±0,83 a	60	6,5±0,56 a	8,288	0,008

NOTA: O consumo de etanol está expresso como média ± erro padrão do consumo diário durante as semanas de cada fase (livre escolha: últimas 2 semanas antes da abstinência; reapresentação: 2 semanas após a abstinência; adulteração: 2 semanas seguintes à reapresentação). A preferência está expressa como Pref.: E – preferência pelo etanol. Na coluna da direita estão os valores de F para análise de variância (ANOVA) de uma via para o consumo individual de etanol e os respectivos valores de p. diferente da fase de livre escolha; b- diferente da fase de reapresentação ($p \leq 0,05$ pelo menos, Newman-Keuls). Na- número do animal.

TABELA 4 - PADRÃO INDIVIDUAL DE CONSUMO DE ETANOL DO GRUPO ADICTO (A) E PREFERÊNCIA ENTRE ETANOL E ÁGUA

LE - 15					RE - 11		AD - 14		ANOVA	
Na	Pref	M (g/kg) ± SE	T	P	Na	M (g/kg) ± SE	Na	M (g/kg) ± SE	F(2,45)	P
8	E	10,5±0,50	-19,88	0,000	8	9,0±0,57	8	9,7±0,32	2,451	0,097
15	E	6,5±0,34	1,120	0,270	15	6,2±0,44	15	6,5±0,15	0,294	0,746
21	E	7,3±0,44	-9,580	0,000	21	7,4±0,52	21	6,1±0,19	2,670	0,080
28	E	6,0 ±0,47	-2,150	0,040	28	7,7±0,65	28	7,5 ±0,27 a	3,849	0,028
30	E	5,0 ±0,28	1,430	0,160	30	5,0 ±0,23	30	5,0±0,28	0,014	0,985
31	E	4,2±0,39	15,620	0,000	31	5,7±0,72 a	31	5,9±0,29 a	4,002	0,025
34	E	5,7±0,26	-1,170	0,250	34	7,0±0,39 a	34	6,7±0,24 a	5,179	0,009
35	E	10,9±0,38	-19,98	0,000	35	9,5 ±0,63	35	10,4 ±0,22	2,935	0,063
39	E	6,2±0,79	1,260	0,210	39	8,0±0,55	39	8,6±0,17 a	3,295	0,026
41	E	6,3 ±0,32	-2,960	0,006	41	7,1 ±0,42	41	6,7 ±0,26	1,609	0,211
44	E	6,2±0,32	-1,910	0,064	44	5,1±0,23 a	44	5,3±0,23	3,967	0,025
52	E	7,2±0,42	-0,880	0,380	52	5,5±0,50 a	52	6,3±0,29	3,980	0,025
53	E	8,2±0,55	-2,790	0,010	53	7,5±0,96	53	12,0±0,41 a,b	11,883	0,000

NOTA: O consumo de etanol está expresso como média ± erro padrão do consumo diário durante as semanas de cada fase (livre escolha: últimas 2 semanas antes da abstinência; reapresentação: 2 semanas após a abstinência; adulteração: 2 semanas seguintes à reapresentação). A preferência está expressa como Pref.:E– preferência pelo etanol. Na coluna da direita estão os valores de F para análise de variância (ANOVA) de uma via para o consumo individual de etanol e os respectivos valores de p. diferente da fase de livre escolha; b- diferente da fase de reapresentação ($p \leq 0,05$ pelo menos, Newman-Keuls). Na- número do animal.

APÊNDICE 2 – DADOS COMPORTAMENTAIS

TABELA 01
Comparações entre variáveis comportamentais medidas no labirinto em cruz elevado

Variável	Grupos	Basal	Abstinência	F/P	F/P	F/P
LCE - EA	A	8 ± 0,8	7 ± 0,9	(grupo)	(ocasião)	(interação)
	P	7 ± 0,4	7 ± 0,5	0,644/0,63	1,641/0,21	0,619/0,65
	L	6 ± 0,5	7 ± 0,8	gl (1, 60)	gl (1, 60)	gl (4, 60)
	LA	7 ± 0,5	6 ± 0,8			
	C	7 ± 0,6	6 ± 0,6			
LCE - TA	A	83 ± 3,8	73 ± 8,1	1,079/0,375	5,345/0,02*	0,650/0,63
	P	87 ± 3,6	83 ± 5,8	gl (4, 60)	gl (1, 60)	gl (4, 60)
	L	86 ± 6,3	86 ± 4,6			
	LA	91 ± 6,4	83 ± 8,0			
	C	81 ± 6,0	66 ± 10			
LCE - EF	A	7 ± 0,8	7 ± 0,4	1,090/0,369	0,053/0,82	0,547/0,70
	P	7 ± 0,4	8 ± 0,7	gl (4, 60)	gl (1, 60)	gl (4, 60)
	L	6 ± 0,8	6 ± 0,4			
	LA	6 ± 0,8	6 ± 0,5			
	C	7 ± 1,0	7 ± 0,8			
LCE - TF	A	67 ± 7,8	60 ± 7,0	0,584/0,675	1,453/0,23	0,997/0,42
	P	68 ± 6,4	55 ± 4,3	gl (4, 60)	gl (1, 60)	gl (4, 60)
	L	59 ± 6,1	53 ± 2,5			
	LA	54 ± 6,0	58 ± 6,3			
	C	62 ± 4,0	65 ± 8,1			
LCE - TL	A	1 ± 0,5	1 ± 0,3	1,786/0,143	0,001/0,98	1,448/0,23
	P	2 ± 0,5	1 ± 0,5	gl (4, 60)	gl (1, 60)	gl (4, 60)
	L	1 ± 0,3	2 ± 0,4			
	LA	3 ± 0,8	2 ± 0,8			
	C	1 ± 0,5	2 ± 0,7			

Nota: Média ± ep. das variáveis comportamentais medidas durante o teste basal (Basal), e período de abstinência (Abstinência): LCE: Labirinto em cruz elevado; EA: número de entrada no braço aberto; TA: tempo de permanência no braço aberto; EF: número de entrada no braço fechado; TF: tempo de permanência no braço fechado; TL: tempo de latência; Gl: graus de liberdade. *Diferença entre ocasião ($p < 0,05$, ANOVA com medidas repetidas, Duncan)

TABELA 02
Comparações entre comportamentais medidas no campo aberto

Variável	Grupos	Basal	Abstinência	F/P	F/P	F/P
CA - AMBCE	A	25 ± 3,0	24 ± 3,4	(grupo)	(ocasião)	(interação)
	P	26 ± 2,60	24 ± 2,9	0,952/044 gl (4, 60)	1,544/0,22 gl (1, 60)	0,633/0,65 gl (4, 60)
	L	23 ± 2,0	22 ± 3,3			
	LA	20 ± 2,2	21 ± 3,3			
	C	22 ± 2,5	16 ± 3,2			
CA - AMBPE	A	119 ± 9,8	91 ± 11,1 #	0,768/0,55 gl (4, 60)	25,813/0,00* gl (1, 60)	0,370/0,83 gl (4, 60)
	P	109 ± 6,2	92 ± 8,0			
	L	100 ± 8,0	80 ± 7,1 #			
	LA	101 ± 9,2	80 ± 14,0			
	C	123 ± 16,7	90 ± 12,8 #			
CA-TL	A	3 ± 0,6	8 ± 3,9	0,726/0,57 gl (4, 60)	7,666/0,00** gl (1, 60)	0,646/0,63 gl (4, 60)
	P	4 ± 1,2	11 ± 4,3			
	L	6 ± 2,7	10 ± 2,3			
	LA	15 ± 9,7	15 ± 7,1			
	C	4 ± 0,9	11 ± 5,5			
CA - REA	A	41 ± 4,6	22 ± 4,0 #	0,489/0,74 gl (4, 60)	74,776/0,00* gl (1, 60)	0,772/0,55 gl (4, 60)
	P	35 ± 2,2	20 ± 3,8 #			
	L	45 ± 4,6	22 ± 4,7 #			
	LA	37 ± 4,1	23 ± 5,3 #			
	C	36 ± 3,2	21 ± 4,0 #			
CA - GRO	A	1,4 ± 1,0	1,9 ± 0,7	0,711/0,59 gl (4, 60)	0,088/0,76 gl (1, 60)	0,306/0,87 gl (4, 60)
	P	1,2 ± 0,6	0,4 ± 0,3			
	L	10 ± 0,6	0,8 ± 0,5			
	LA	1,4 ± 1,2	0,6 ± 0,4			
	C	1,6 ± 1,2	2 ± 0,7			
CA - FRE	A	0,8 ± 0,5	2,6 ± 1,6	0,879/0,48 gl (4, 60)	0,005/0,94 gl (1, 60)	0,482/0,75 gl (4, 60)
	P	1,0 ± 0,5	-			
	L	0,7 ± 0,6	0,9 ± 0,9			
	LA	5,1 ± 5,0	3,5 ± 2,1			
	C	1,0 ± 0,8	1,9 ± 1,9			
CA - BF	A	2 ± 0,4	2 ± 0,5	0,593/0,69 gl (4, 60)	9,332/0,00* gl (1, 60)	0,979/0,43 gl (4, 60)
	P	1 ± 0,5	2 ± 0,5 #			
	L	1 ± 0,4	2 ± 0,5			
	LA	1 ± 0,6	2 ± 0,4			
	C	2 ± 0,7	2 ± 0,7			

Nota: média ± e.p das variáveis comportamentais medidas durante o teste basal e período de Abstinência (Abstinência); CA: campo aberto; AMBCE: ambulacão no centro; AMBPE: ambulacão na periferia; TL: tempo de latência; REA: rearing (número de levantar); FRE: tempo de 'freezing'; (tempo de imobilidade); GRO: tempo de grooming (auto-limpeza); BF: número de bolos fecais; gl: graus de liberdade. *Diferença entre ocasião (p<0,05; ANOVA com medidas repetidas, Duncan). ** Diferença entre ocasião (p<0,05; A NOVA com medidas repetidas, LSD). # Diferença entre ocasião (p< 0,05; Teste t dependente).

