

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GUSTAVO ROBERTO VILLAS BOAS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO BACLOFENO SOBRE O PADRÃO DE CONSUMO DE
ÁLCOOL EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE ADIÇÃO**

CURITIBA 2011

GUSTAVO ROBERTO VILLAS BOAS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO BACLOFENO SOBRE O PADRÃO DE CONSUMO DE
ÁLCOOL EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE ADIÇÃO**

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.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Roseli Boerngen de Lacerda

CURITIBA 2011

DEDICATÓRIA

Aos meus avós-pais, Walmor e Lúcia, pelo amor, carinho, dedicação, esforço e confiança em mim. Foram de vocês que partiram atitudes que profetizaram palavras de um futuro bom. À minha noiva, Carol, pelo apoio cúmplice e incondicional neste e em todos os projetos nos quais me envolvo. Muito obrigado a vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por alimentar meus sonhos e por ter guiado as minhas decisões, fazendo com que a Sua vontade sempre esteja no centro da minha vida. Agradeço a Ele por ter proporcionado o inigualável sentimento de conquista ao concluir esse mestrado, sei que é um privilégio para poucos. Bendito és Tu Senhor, que com Teu sublime amor me acolheu em Seus átrios nos momentos de solidão, cansaço e tristezas e me livrou do inimigo quando ele quis me desanimar, tragar e trazer dificuldades. Obrigado por me ensinar a perdoar e a amar, porque sublime é o perdão e puro é o amor.

Agradeço a todas as pessoas do meu convívio que acreditaram e contribuíram, mesmo que indiretamente, para a conclusão deste curso.

Aos meus avós-pais Ubaldo Walmor Barbosa e Maria Lúcia de Moraes Barbosa, pelo amor incondicional e pela paciência. Por terem feito o possível e o impossível para me oferecerem a oportunidade de estudar em Curitiba, longe deles, acreditando e respeitando minhas decisões e nunca deixando que as dificuldades acabassem com os meus sonhos, serei imensamente grato.

À minha noiva Caroline Arce, por compreender a importância dessa conquista, com amor, e aceitar a minha ausência quando necessário.

À minha orientadora, Professora Dr^a Roseli, pelas palavras de experiência acurada e estímulo, bem como pela confiança que depositou em mim, permitindo que, com liberdade, chegasse a bom porto e concluísse o meu trabalho. Muito obrigado pelo empenho, paciência e credibilidade.

A todos os familiares, minha mãe Claudia, minhas irmãs Andressa, Lais e Gabi, meu irmão-tio Bruno, Tio “Turco”, tia Mary e tia Nice, minha prima Anna Paula que torceram e acreditaram na conclusão dessa pós-graduação e me agüentaram em dias estressantes, muitas vezes com tristezas, mal humor, cansaço, porém, firme na fé e na esperança, fico muito grato.

Aos amigos, “é uma festa” pelas agradáveis lembranças que serão eternamente guardadas no coração, muito obrigado.

Obrigado.

”Acreditamos saber que existe uma saída, mas não sabemos onde está. Não havendo ninguém do lado de fora que nos possa indicá-la, devemos procurá-la por nós mesmos. O que o labirinto ensina não é onde está a saída, mas quais são os caminhos que não levam a lugar algum”.

Autor Desconhecido

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 FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Mecanismos de Ação do Álcool	4
1.2 Neurobiologia da Adição	6
1.3 Modelos animais de dependência	10
1.3.1 Modelos animais que estudam os efeitos de reforço positivo das drogas.....	12
1.3.2 Modelos animais que estudam os efeitos de reforço negativo das drogas	14
1.3.3. Modelos animais de adição: busca pela droga, uso compulsivo e recaída	15
1.4 Receptores GABAB e efeitos de seus agonistas sobre o consumo, reforço e abstinência de etanol e outras drogas de abuso	20
1.5 Moduladores alostéricos positivos dos receptores GABAB.....	22
1.6 Efeitos neuroquímicos das drogas de abuso.....	26
1.6.1 Efeitos dos agonistas dos receptores GABAB	26
1.6.2 Efeitos no sistema glutamatérgico.....	27
1.6.3 Efeitos no sistema de opióides endógenos	29
1.6.4 Efeitos no sistema de endocanabinóides endógenos	30
1.6.5 Efeitos sobre o Neuropeptídeo Y	31
1.6.6 Efeitos sobre o fator liberador de corticotrofina (CRF)	33
1.7 Drogas utilizadas para o tratamento do alcoolismo.....	35
1.7.1 Sistema opióide e naltrexona	35
1.7.2 Antagonistas dos receptores de glutamato	36
1.7.3 Drogas que atuam no sistema serotoninérgico	40
1.7.4 Drogas que atuam no sistema dopaminérgico	43
1.7.5 Dissulfiram.....	44
2. JUSTIFICATIVA	45
3. OBJETIVOS	46
3.1. Objetivo Geral	46
3.2. Objetivos Específicos	46

4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1 Animais.....	47
4.2 Aparelhos e Procedimentos	47
4.3 Drogas.....	48
4.4 Procedimentos Experimentais.....	49
4.4.1 Curva Dose-Resposta	49
4.4.2 Avaliação comportamental basal.....	49
4.4.3 Experimento 1: Modelo de adição por auto-administração por livre escolha	49
4.4.4 Cálculo da quantidade de álcool consumido em g/kg/dia.....	51
4.4.5 Experimento 2: Tratamento com baclofeno.....	53
4.4.6 Análises Estatísticas	54
5. RESULTADOS - ARTIGO	55
6. CONCLUSÕES	91
7. REFERÊNCIAS.....	91
APÊNDICE 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS ANIMAIS	128
APÊNDICE 2 – DADOS COMPORTAMENTAIS.....	132
APÊNDICE 3 – CONSUMO INDIVIDUAL AO LONGO DE TODAS AS FASES DO MODELO.....	133

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Consumo de álcool per capita, em litros, de etanol puro por ano.....	2
Figura 2. Esquema simplificado das ações agudas convergentes das drogas de abuso no complexo ATV-NAcc.	5
Figura 3. Neurocircuito associado ao reforço positivo agudo das drogas de abuso e o reforço negativo da dependência e como ele altera na transição de um indivíduo não-dependente para dependente de drogas de abuso.....	7
Figura 4. Representação esquemática do receptor GABAB.	23
Figura 5. Ilustração sistemática da hipótese dos efeitos agudo e crônico do etanol, ambos com e sem topiramato, no circuito de recompensa mesocorticolímbico dopaminérgico.....	39
Figura 6. Diagrama do procedimento experimental geral.....	52
Figura 7. Diagrama do Procedimento experimental na fase de tratamento.....	54

FIGURAS DO ARTIGO

Figure 1. Experimental design of addiction model.....	69
Figure 2. Examples of each consumption profile. Individual examples of mice that exhibited differential patterns of ethanol consumption, expressed as a daily intake average (ml).	71
Figure 3. Total ethanol intake over 24 h.	72
Figure 4. Percent open arm time in the withdrawal phase.....	73
Figure 5. Total water intake over 24 h.	75
Figure 6. Total ethanol intake over 90 min.	76
Tabela 1. Ethanol intake during phase acquisition (AC) and adulteration (AD) phases and with saline or different doses of baclofen in mice classified according to their intake profile.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

%OT – percentual de tempo no braço aberto
2-AG – 2-araquidonoilglicerol
5-HT₃ – receptor de serotonina tipo 3
AC – adenilato ciclase
ACTH – hormônio adrenocorticotrófico
ADE – (do inglês - alcohol deprivation effect) efeito de privação do álcool
AEA – N-araquidonoil-etanolamida
AMPA – ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazole-4-propiónico
AMPc - Adenosina monofosfato cíclica
APA – Associação Americana de Psiquiatria
ATV – área tegmental ventral
BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro
CaM - calmodulina
CB1 – receptor endocanabinóide tipo 1
CB2 – receptor endocanabinóide tipo 2
cGKI – guanosina monofostato cíclica dependente de proteína quinase tipo I
cGKII – guanosina monofostato cíclica dependente de proteína quinase tipo II
CRE – elementos responsáveis ao AMPc
CREB – proteína ligante ao elemento responsivo ao AMP cíclico
CRF – fator liberador de corticotrofina
CRF1 – receptor do fator liberador de corticotrofina tipo 1
CRF2 – receptor do fator liberador de corticotrofina tipo 2
DA - dopamina
DNA – ácido desoxirribonucleico
GABA - ácido-gama-aminobutírico
GABAA – receptor do ácido-gama-aminobutírico tipo A
GABAB – receptor do ácido-gama-aminobutírico tipo B
GABABR1 – subunidade 1 do receptor do ácido-gama-aminobutírico tipo B
GABABR2 – subunidade 2 do receptor do ácido-gama-aminobutírico tipo B
GC – guanilato ciclase
GMPc – guanosina monofosfato cíclica
HPA – eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
KA – ácido caínico ou cainato
nACh – Receptor nicotínico de acetilcolina
NAcc – núcleo accumbens
NMDA – n-metil-D-aspartato
NO – óxido nítrico
NOS – óxido nítrico sintase
NP - non-preferring
NPY – neuropeptídeo Y
PDYN – prodinorfina
PKA – proteína quinase A

SNC – sistema nervoso central
PR – esquema de reforço em razão progressiva
Sp - Sardinian preferring
UCN - urocortina

RESUMO

Na busca de medicamentos para tratar a dependência de drogas, muitos modelos animais foram desenvolvidos. Nós adaptamos e validamos um modelo de dependência para camundongos, que permite a caracterização dos diferentes padrões de consumo de etanol. Este modelo é baseado em um paradigma de três garrafas por livre-escolha, que permite estudar o consumo de álcool, quando as soluções possuem sabor menos palatável por meio da adição de quinino, um estímulo gustativo amargo provavelmente aversivo. O modelo possui validade de face (consumo de álcool a longo prazo, ansiedade aumentada durante a abstinência de álcool e ingestão persistente apesar de adulteração das soluções de etanol com quinino); validade preditiva, quando testado com naltrexona e, também, confiabilidade (o modelo foi replicado em vários estudos). Em um desses estudos observou-se que os camundongos caracterizados como "adictos" exibiam diferentes níveis de transcrição dos genes *Gabbr1* e *Gabbr2* em diversas áreas do cérebro relacionadas ao comportamento aditivo. Como estes genes estão relacionados ao GABAB receptor, decidimos estudar o efeito de um agonista desse receptor sobre o consumo de etanol neste modelo de adição. Sessenta camundongos Swiss machos foram alojados individualmente e foram oferecidas soluções de etanol (5% e 10%) e água em um paradigma de livre escolha que consiste em quatro fases: aquisição (AC: 10 semanas), abstinência (W: 2 semanas), reapresentação (RE: 2 semanas) e adulteração (com quinino) (AD: 2 semanas). Os camundongos controle (n = 10) tiveram acesso somente à água. Os camundongos foram caracterizadas como: Adictos (A, n = 15: preferência por etanol durante todas as fases e sem haver redução no consumo de etanol quando adulterado), bebedor pesado (H, n = 16: preferência por etanol durante a fase de AC com uma redução no consumo de etanol quando adulterado) e bebedor de leve (L, n = 20: preferência por a água e baixo consumo de etanol durante todas as fases). Após a classificação, o etanol foi retirado durante quatro dias e, em seguida, metade dos animais dos grupos A, H e L receberam baclofeno intra-peritonealmente (i.p) (0, 1,25, 2,5 e 5,0 mg / kg, administrado aleatoriamente com 4 dias de abstinência entre cada dose) e os demais receberam solução salina. Trinta minutos depois, etanol e água foram oferecidos. O grupo controle recebeu as 3 doses de baclofeno e 30 minutos depois obteve acesso à água (para verificar o efeito do baclofeno sobre o comportamento consumatório). O baclofeno reduziu o consumo de etanol apenas no grupo H. O grupo "adicto", mesmo após o tratamento com baclofeno, apresentou uma "perda de controle" sobre o consumo de etanol. A ativação do receptor GABAB é necessária para o equilíbrio entre as subunidades GABAB1 e GABAB2 e, portanto, os níveis de transcrição genética desproporcionais observados em camundongos "adictos" poderiam explicar essa falta de resposta ao tratamento com baclofeno.

Palavras chave: adição, baclofeno, etanol, paradigma de livre escolha, receptor GABAB, camundongo.

ABSTRACT

In the search for medications to treat drug addiction, many animal models have been developed. We adapted and validated an addiction model for mice which allows the characterization of different ethanol intake patterns. This model is based on a three bottle free-choice paradigm that allows studying alcohol-intake when ethanol solutions are made less palatable through the addition of quinine, a bitter, presumably aversive taste stimulus. It has face validity (long-term high ethanol intake, heightened anxiety during ethanol withdrawal and persistent intake despite adulteration of ethanol solutions with quinine); predictive validity when tested with naltrexone and also, reliability (the model has been replicated in several studies). In one of these studies we observed that mice characterized as “addicted” had different level of transcription for the *Gabbr1* and *Gabbr2* genes in several brain areas related to addictive behavior. As these genes are related to GABAB receptor, we decided to study the effect of an agonist of this receptor on the ethanol consumption in this model. Sixty adult male Swiss mice were individually housed and were offered ethanol (5% and 10%) and water in a free choice paradigm consisting of four phases: acquisition (AC: 10 weeks), withdrawal (W: 2 weeks), re-exposure (RE: 2 weeks) and quinine-adulteration (AD: 2 weeks). Control mice (n=10) had access only to water. Mice were characterized as: addicted (A, n=14: preference for ethanol during all phases and no reduction in ethanol intake when adulterated), heavy drinker (H, n=15: preference for ethanol during AC phase and reduction in ethanol intake when adulterated) and light drinker (L, n=19: preference for water and low ethanol intake during all phases). After the classification, ethanol was withdrawn during 4 days and then, half of the A, H and L groups received i.p. baclofen (0; 1.25; 2.5 and 5.0 mg/kg, randomly administered to each mouse with 4 days of abstinence among each dose) and the others received saline. Thirty minutes later, ethanol and water were offered. The control group received the 3 doses of baclofen and 30 minutes later had access to water (to verify the baclofen effect on consumatory behavior). Baclofen reduced ethanol intake only in group H. The “addicted” mice, even after baclofen treatment, continued to exhibit a “loss of control” over ethanol intake. Activation of the GABA_B receptor is necessary for the precise balance between the GABA_{B1} and GABA_{B2} subunits, so the disproportionate transcription levels observed in “addicted” mice could account for this lack of response to baclofen treatment.

Keywords: addiction; baclofen; ethanol; free-choice paradigm; GABAB receptor; mice.

1. INTRODUÇÃO

O abuso 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 (JAMAL; BOERNGEN-LACERDA, 2008).

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 (OMS, 2000).

O uso de grandes quantidades de álcool causa transtornos para a saúde e grandes impactos sócio-econômicos sobre a população mundial. Assim, em 10-20% dos consumidores, o uso crônico de álcool contribui para uma multiplicidade de complicações médicas, incluindo danos aos sistemas orgânicos e funções imunológicas (SPANAGEL, 2009). Embora a maioria dos órgãos do corpo humano seja afetada pela intoxicação alcoólica e pelo seu uso crônico, doenças induzidas pelo álcool são mais notáveis no fígado, pâncreas e cérebro. Os danos cerebrais induzidos pelo álcool são um problema particular durante a gravidez, resultando em síndrome do alcoolismo fetal, que representa a forma mais comum de deficiência mental adquirida, afetando até 1/7000 crianças (NICCOLS, 2007).

A grande maioria da sociedade ocidental moderna consome regularmente álcool. As principais razões para esse consumo excessivo estão relacionadas com a capacidade do álcool produzir estimulação dos estados de humor e causar efeitos ansiolíticos. De fato, os europeus gastam em torno de 100 bilhões de euros por ano em bebidas alcoólicas, sendo que tal gasto é refletido pela elevada taxa de consumo de álcool per capita de 10 litros de etanol puro por ano. Luxemburgo tem o maior nível de consumo mundial em mais de 13 litros por ano. Em comparação, o consumo médio de

álcool per capita na América do Norte na última década, foi de 8,5 litros por ano (Figura 1) (SPANAGEL, 2009).

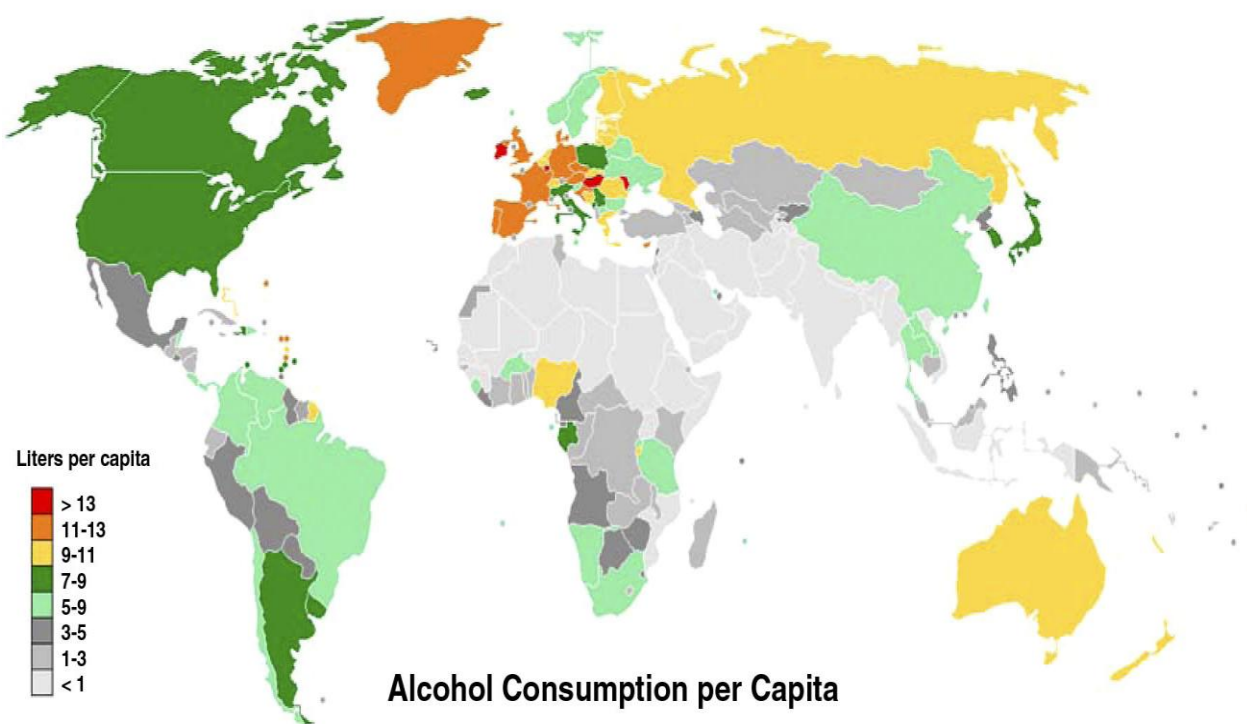


Figura 1. Consumo de álcool per capita, em litros, de etanol puro por ano
Fonte: WHO, 2002.

Os transtornos causados pelo uso de álcool incluem dependência e abuso. A APA (American Psychiatric Association) define dependência de drogas (também denominada adição) como um conjunto de sinais e sintomas que indica que o indivíduo continua a utilizar a substância, apesar dos problemas significativos que o seu consumo acarreta (APA, 1994).

O uso compulsivo de substâncias é uma característica da dependência e um dos critérios diagnósticos centrais apresentados pelo DSM IV (Diagnostic Statistical Manual, 4a edição) (APA, 1994).

Os indícios de tolerância e manifestações de abstinência estão incluídos na lista de sintomas, mas não são nem necessários nem suficientes para definir o diagnóstico de dependência de drogas. A dependência pressupõe a existência de três ou mais sintomas da lista para estabelecer o diagnóstico, enquanto o abuso pode ser

diagnosticado quando o indivíduo apresentar um ou dois desses sintomas. A natureza crônica e recidivante da dependência preenchem os critérios que definem uma doença crônica (MACLELLAN et al., 1979).

A dependência de álcool acomete de 10% a 12% da população mundial e 11,2% dos brasileiros que vivem nas 107 maiores cidades do país, segundo levantamento domiciliar sobre o uso de drogas. É por isso, ao lado da dependência de tabaco, a forma de dependência que recebe maior atenção dos pesquisadores. Muitas características, tais como gênero, etnia, idade, ocupação, grau de instrução e estado civil podem influenciar o uso nocivo de álcool, bem como o desenvolvimento da dependência ao álcool. A incidência de alcoolismo é maior entre os homens do que entre as mulheres. O mesmo se repete entre os mais jovens, especialmente na faixa etária dos 18 aos 29 anos, declinando com a idade (MARQUES; RIBEIRO, 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 estimada foi 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).

O padrão de consumo de álcool é um aspecto relevante na avaliação inicial de qualquer paciente. A investigação detalhada do padrão de consumo, além de detectar os níveis de gravidade, permite a observação de rituais de uso e auxilia no estabelecimento de estratégias de mudanças (MARQUES; RIBEIRO, 2002).

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 (NICCOLS, 2007).

O alcoolismo é uma doença primária crônica, sendo freqüentemente progressiva e fatal. No Brasil, o alcoolismo é a terceira causa de absenteísmo e a oitava para concessão de auxílio doença no sistema previdenciário; pacientes com problemas relacionados ao uso de álcool utilizam três vezes mais os serviços de saúde e estão

sujeitos 13 a 14 vezes mais a atrasos (ODO et al., 2000, *apud*, AMARAL; MALBERGIER, 2004).

O uso excessivo de álcool 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 (NICCOLS, 2007).

Nos últimos 20 anos, grandes progressos foram feitos no estudo do álcool através da farmacologia. Hoje há uma sólida compreensão de como o álcool age no cérebro para induzir os seus efeitos comportamentais agudos. Apesar da opinião generalizada de que o álcool é um agente farmacológico inespecífico, os recentes estudos de farmacologia molecular demonstraram que o álcool tem apenas alguns alvos conhecidos. Estes são os receptores de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA), do ácido-gama-aminobutírico (GABAA e GABAB), de glicina, de 5-hidroxitriptamina tipo 3 (5-HT3) e receptores nicotínico neuronais (nACh), bem como canais de cálcio tipo - L e algumas proteínas G (VENGELIENE, 2008).

1.1 Mecanismos de Ação do Álcool

O etanol, também chamado álcool etílico e, na linguagem popular, simplesmente álcool, é uma substância orgânica obtida da fermentação de açúcares, ou hidratação do etileno, encontrado em bebidas como cerveja, vinho e aguardente, bem como na indústria de perfumaria. (SOLOMONS; FRUHLE, 2001).

Há provas consideráveis, a partir de modelos animais e dos seres humanos, que todas as drogas de abuso convergem em um circuito comum no sistema límbico do cérebro. (KOOB; LE MOAL, 2001).

A via dopaminérgica mesolímbica tem sido alvo de estudos sobre drogas de abuso ao longo do tempo. Essa via inclui os neurônios dopaminérgicos da Área Tegmental Ventral (ATV) do mesencéfalo e suas projeções para o córtex pré-frontal e para o Núcleo Accumbens (NAcc).

Esta via, ATV-NAcc, é um dos substratos mais importantes para os efeitos de gratificação agudos de todas as drogas de abuso, e pesquisas, durante várias décadas

passadas, foram delineadas para demonstrar a forma como cada droga, independentemente dos seus distintos mecanismos de ação, convergem na ATV e no NAcc para produzir determinadas respostas funcionais (figura 2) (KOOB; LE MOAL, 2001).

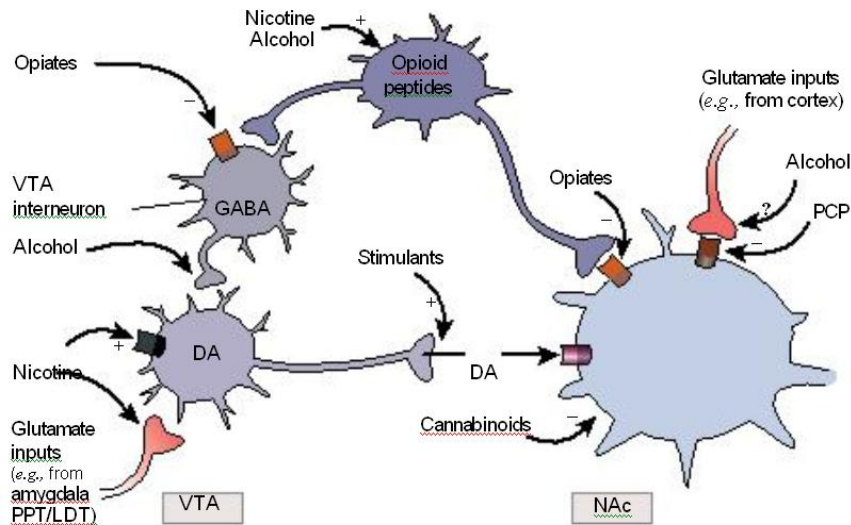


Figura 2. Esquema simplificado das ações agudas convergentes das drogas de abuso no complexo ATV-NAcc.

As drogas de abuso, apesar de diversas ações iniciais, podem produzir alguns efeitos comuns sobre o ATV e NAcc. As drogas estimulantes podem aumentar diretamente a transmissão dopaminérgica no NAcc. Os Opiáceos podem fazer o mesmo indiretamente: eles inibem interneurônios GABAérgicos no eixo ATV, estimulando os neurônios dopaminérgicos da ATV. Os opiáceos também atuam diretamente nos receptores opióides nos neurônios do NAcc. A nicotina parece ativar neurônios dopaminérgicos da ATV diretamente através da estimulação de receptores nicotínicos da acetilcolina e, indiretamente, através da estimulação de receptores glutamatérgicos em terminais nervosos que inervam neurônios dopaminérgicos. O álcool, através da atuação, principalmente, no receptor GABA_A, pode inibir terminais GABAérgicos na ATV e, portanto, desinibir os neurônios dopaminérgicos da ATV e, da mesma forma, inibir terminais glutamatérgicos que inervam os neurônios do NAcc. Muitos mecanismos adicionais (não mostrados) são propostos para o álcool. Os mecanismos dos canabinóides parecem complexos, e envolvem a ativação dos receptores CB₁ (que, como os receptores D₂, são acoplados a proteína Gi) em terminais nervosos glutamatérgicos e GABAérgicos nos neurônios do NAcc. Finalmente, há alguns indícios de que a nicotina e o álcool podem ativar vias de opióides endógenas e que estas, e outras drogas de abuso (tais como os opiáceos), podem ativar vias de canabinóides endógenos (não mostrados). Fonte: NESTLER, 2005.

Os principais efeitos do etanol são observados no sistema nervoso central, onde suas ações depressoras se assemelham às dos anestésicos voláteis. Apesar de o etanol, em concentrações farmacológicas efetivas, produzir uma alteração estrutural detectável (isto é, um aumento na fluidez) das membranas lipídicas, semelhante àquela causada pelos anestésicos voláteis, é provável que suas ações dependam, basicamente, de mudanças nos canais iônicos e receptores específicos de membrana. Ao nível celular, o efeito do etanol é puramente depressor, embora aumente a atividade dos impulsos – presumivelmente por desinibição – em algumas partes do Sistema Nervoso Central (SNC), sobretudo nos neurônios dopaminérgicos mesolímbicos envolvidos na via de recompensa. As principais teorias de ação do etanol são: 1) potencialização da inibição mediada pelo ácido gama-aminobutírico (GABA), semelhante à ação dos benzodiazepínicos; 2) inibição da entrada do cálcio pelos canais de cálcio regulados por voltagem; 3) inibição da função dos receptores de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA) (VIENNE et al., 2010).

1.2 Neurobiologia da Adição

A toxicod dependência, também conhecida como dependência de drogas, é uma doença crônica recidivante caracterizada por (1) compulsão para buscar e consumir a droga, (2) perda de controle sobre o consumo e (3) a emergência de um estado emocional negativo (por exemplo, disforia, ansiedade, irritabilidade) quando o acesso à droga é impedido (KOOB, 2009a).

Koob (2009) afirma que um dos objetivos importante da pesquisa neurobiológica atual é compreender os mecanismos neurofarmacológicos e neuroadaptativos dentro dos neurocircuitos específicos que medeiam a transição do uso ocasional controlado da droga para a perda de controle comportamental sobre a busca e o consumo de drogas, que consiste na característica principal da dependência.

A toxicod dependência foi caracterizada como uma doença que progride da impulsividade à compulsividade em um ciclo de dependência composto de três fases: (1) preocupação / antecipação (craving), (2) intoxicação (manutenção do uso da droga)

e (3) abstinência / afeto negativo (recaída) (KOOB; LE MOAL, 1997; KOOB et al., 2008a; KOOB et al., 2008b).

Dois circuitos neurobiológicos foram propostos por Koob (2009) como essenciais para os aspectos hedônicos de motivação para buscar a droga: (1) os circuitos neurobiológicos envolvidos na desregulação das propriedades de reforço positivo das drogas de abuso e (2) os circuitos neurobiológicos associados ao recrutamento das propriedades reforçadoras negativas das drogas de abuso.

Os efeitos agudos de reforço das drogas de abuso são mediados pela ativação dos sistemas de dopamina (DA), serotonina, peptídeos opióides e GABA, quer por ação direta no prosencéfalo basal (nomeadamente o NAcc e o núcleo central da amígdala) ou por ações indiretas na ATV (KOOB, 1992a; KOOB, 2006).

Dados recentes sugerem não apenas uma mudança na função dos neurotransmissores associados com os efeitos agudos de reforço das drogas de abuso durante o desenvolvimento da dependência, tais como diminuição da função da DA, peptídeos opióides, serotonina e GABA, mas também o sistema de recrutamento do Fator Liberador de Corticotrofinas (CRF) (Figura 3) (KOOB, 2009b).

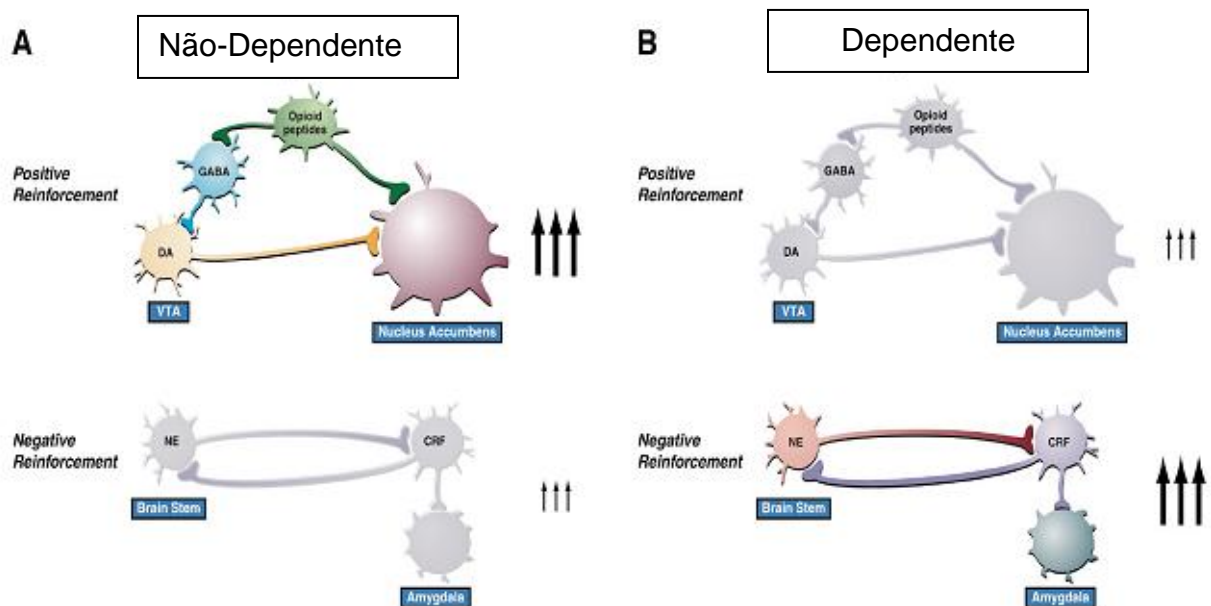


Figura 3. Neurocircuito associado ao reforço positivo agudo das drogas de abuso e o reforço negativo da dependência e como ele altera na transição de um indivíduo não-dependente para dependente de drogas de abuso.

Os elementos-chave do circuito de recompensa são a DA e os neurônios de peptídeos opióides que se cruzam, tanto na ATV como no NAcc, e são ativados durante o uso inicial da droga e o início da fase de intoxicação. Os elementos-chave do circuito de estresse são o CRF e neurônios noradrenérgicos que convergem para interneurônios gabaérgicos no núcleo central da amígdala e são ativados durante o desenvolvimento de dependência. Fonte: KOOB; LE MOAL, 2008a.

Já está bem estabelecido que as respostas comportamentais (ou seja, o reforço e os efeitos locomotores induzidos pelas drogas) de várias substâncias de abuso estão fortemente relacionadas com o aumento da concentração de DA no NAcc com conseqüente ativação do sistema de recompensa (KOOB, 1988).

A questão primordial na adição 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).

Os pesquisadores postularam que havia circuitos neurais específicos no cérebro envolvidos na regulação de processos de recompensa, quando os primeiros estudos demonstraram que os animais pressionavam uma alavanca para obter a estimulação elétrica em certas áreas do cérebro, mas em outras não. O feixe medial do prosencéfalo, que liga a ATV ao NAcc, foi o primeiro local identificado, nesse aspecto (TOMKINS; SELLERS, 2001).

O sistema mesolímbico, formado em parte pela ATV e o NAcc, é parte integrante do circuito de recompensa cerebral. Os neurônios de DA da ATV fornecem uma das principais fontes de DA em estruturas límbicas, incluindo o NAcc. A DA tem sido implicada na codificação de reforço e de aprendizagem (SCHULTZ, 1998), ao passo que o NAcc é considerado uma interface motora do sistema límbico, onde os estímulos relevantes são processados para a iniciação do comportamento (MOGENSON et al., 1980; THOMAS et al., 2008). A ATV e o NAcc, juntamente com outras áreas, tais como o córtex pré-frontal, tálamo e a amígdala, são considerados imprescindíveis e desempenham um papel crítico no controle dos comportamentos de motivação e aos direcionados a objetivos específicos (CHEN et al., 2010).

Através de mecanismos adaptativos de aprendizagem, as drogas de abuso podem induzir algumas formas de plasticidade sináptica duradouras que podem servir para conduzir aos comportamentos persistentes de busca pelas drogas que são

observados com os toxicodependentes. Um dos interesses particulares neste contexto é a observação de que todas as drogas que causam dependência, e somente drogas que causam dependência, desenvolvem formas específicas de plasticidade sináptica no sistema mesolímbico (UNGLESS et al., 2001).

A DA é o principal neurotransmissor do sistema mesocorticolímbico que regula a dinâmica da recompensa e, ao longo dos anos, tem sido classicamente associada aos efeitos de reforço das drogas de abuso e pode ter um papel fundamental no desencadeamento das alterações neurobiológicas, associadas à dependência (VOLKOW et al., 2007).

Este conceito reflete o fato de que todas as drogas de abuso aumentam a concentração extracelular de DA no NAcc. Esses aumentos nos níveis de DA têm um papel importante na codificação de recompensa, na motivação para conseguir a recompensa e na facilitação da aprendizagem (WISE, 2002).

Várias técnicas têm indicado que o sistema mesolímbico dopaminérgico é ativado quando o álcool é administrado aos animais de laboratório e, em particular, a ATV tem sido implicada nos efeitos causados pelo álcool. Gessa et al., 1985, mostraram que doses baixas de etanol administradas sistemicamente produziam um aumento dose-dependente na taxa de disparo dos neurônios dopaminérgicos, sendo mais tarde, consistentemente demonstrado que o álcool estimula a transmissão dopaminérgica na via mesolímbica (DI CHIARA; IMPERATO, 1988). Com o uso da microdiálise, foi demonstrado que a administração aguda de etanol resulta em liberação de DA preferencialmente na porção *Shell do* NAcc (PONTIERI et al., 1995). Sugere-se que a maneira pela qual a administração aguda de etanol aumenta o nível de DA extracelular no NAcc é através de alterações no *feedback* GABAérgico na ATV. O etanol pode diminuir a atividade desses neurônios GABAérgicos, que posteriormente leva a uma desinibição dos neurônios dopaminérgicos do sistema mesolímbico (SPANAGEL; WEISS, 1999). Esse mecanismo de ação proposto é corroborado pela observação de que os níveis de DA no NAcc mantêm-se elevados após a administração sistêmica de etanol, enquanto a liberação somatodendrítica na ATV já havia diminuído, o que implica que o etanol também exerce efeito local no NAcc (KOHL et al., 1998).

1.3 Modelos animais de dependência

Animais são usados no estudo da dependência de drogas, pelas mesmas razões que eles são utilizados em qualquer outro estudo médico: para compreender as causas da doença e desenvolver novos tratamentos (FACHIN-SCHEIT et al., 2006). Mas, nenhum modelo animal reproduz completamente todas as características dos distúrbios humanos. Em geral, algumas características dos distúrbios dos seres humanos são selecionadas e condições semelhantes a estas são desenvolvidas em laboratório (CUNNINGHAM et al., 2000; KOOB, 2000; SPANAGEL, 2000).

Os modelos animais de preferência pelo álcool, ou outras drogas, tem uma longa tradição na pesquisa biomédica sobre alcoolismo. No entanto, estes modelos permitem apenas conclusões limitadas em relação à dependência. Durante os últimos 15 anos, os pesquisadores desenvolveram novos modelos animais que mimetizam os diferentes aspectos característicos da dependência em humanos, tais como o *craving* (ou fissura, desejo persistente pela droga), a recaída e a perda de controle sobre o consumo, que são aspectos importantes da dependência. Estes modelos incluem o modelo de adição por livre escolha, o modelo de privação de álcool, entre outros. Alguns desses modelos foram validados com compostos que são classificados farmacologicamente como *anti-craving* que são utilizados clinicamente para o tratamento de dependentes químicos (SPANAGEL; HÖLTER, 2000).

Cientistas desenvolveram modelos animais para estudar efeitos motivacionais do álcool. Estes modelos incluem auto-administração e condicionamento, e não são vistos como tentativas de desenvolver o alcoolismo. Pelo contrário, são usados para caracterizar efeitos motivacionais do álcool, de maneira que este conhecimento pode ajudar a esclarecer os papéis destes efeitos no desenvolvimento e manutenção do consumo excessivo em humanos. (CUNNINGHAM et al., 2000).

Nenhum dos modelos animais de adição mimetizam totalmente a condição humana, mas eles permitem a investigação de elementos específicos nas diferentes fases de adição à droga (KOOB; LE MOAL, 2008b). Os modelos também têm sido utilizados para estudar a influência das diferenças genéticas na sensibilidade aos

efeitos motivacionais positivos e negativos do álcool, mecanismos cerebrais dos efeitos motivacionais do álcool, bem como a recaída e o *craving* (CUNNINGHAM et al., 2000).

As drogas de abuso têm propriedades de recompensa, a qual pode ser definida como um efeito reforçador positivo com algum valor emocional adicional, como o prazer (KOOB; LE MOAL, 2008b). As drogas que são utilizadas para auto-administração em estudos com animais correspondem àquelas que têm alto potencial de abuso em humanos (COLLINS et al., 1984).

A maioria dos modelos tem utilizado macacos ou roedores. Com o uso de espécies não-humanas, é possível controlar maior número de fatores, como as condições de alojamento, dieta e experiências prévias com a droga. Os modelos animais têm sido uma ferramenta muito útil para estudar as implicações comportamentais, neuroquímicas e moleculares no consumo e preferência pelo álcool em humanos (SPANAGEL, 2000). Pesquisadores também usam estes modelos para estudar os mecanismos genéticos e neurobiológicos responsáveis pelos efeitos motivacionais do álcool, e para desenvolver intervenções comportamentais e farmacológicas para alterar estes efeitos (CUNNINGHAM et al., 2000).

O recente avanço no entendimento da neurobiologia da adição deriva de estudos de modelos animais de adição para drogas específicas, como estimulantes, opióides, álcool e nicotina (KOOB; LE MOAL, 2008a). Recentemente, têm sido demonstrado o papel modulador da transmissão gabaérgica e de seus receptores do tipo B no mecanismo de ação de recompensa de diferentes drogas de abuso. Numerosas observações indicam que a ativação tônica dos receptores GABAB é relevante para abolir os efeitos de recompensa da morfina e cocaína (BREBNER et al., 2002; MALGORZATA et al., 2007), uma vez que antagonistas seletivos destes receptores não alteraram nem a dose auto-administrada de cocaína por via intravenosa, nem a expressão de preferência de lugar induzida pela morfina (TSUJI et al., 1996).

Crítérios para avaliação de modelos animais incluem confiabilidade e validades preditiva, de constructo, etiológica e de face. Confiabilidade refere-se à consistência e estabilidade com que a variável de interesse é observada; validade refere-se aos critérios para avaliação dos modelos. Entretanto, se um modelo animal mimetizar

totalmente a condição humana, então ele não pode mais ser considerado um modelo, mas sim uma doença animal (GEYER; MARKOU, 1995; KOOB, 2000).

1.3.1 Modelos animais que estudam os efeitos de reforço positivo das drogas

Um efeito reforçador é definido operacionalmente como “qualquer evento que aumenta a probabilidade de uma resposta”, e é frequentemente utilizado alternativamente como “recompensa”. Em geral, as drogas funcionam como reforçadores positivos ou condicionados em virtude de seus efeitos de recompensa, e recompensa frequentemente implica atributos adicionais de uma droga (por exemplo, prazer) que não podem ser facilmente definidos operacionalmente (SHIPPENBERG; KOOB, 2002). Assim, efeitos motivacionais positivos produzidos pelo álcool podem incluir aumento nos estados prazerosos (por exemplo, a euforia), bem como alívio dos estados não prazerosos, como aqueles produzidos pelo estresse, ansiedade, ou dependência física e abstinência (CUNNINGHAM et al., 2000).

Há duas formas principais para se desenvolver auto-administração de álcool nos animais: os modelos nos quais os animais são mantidos em suas gaiolas-casas e os que envolvem submeter o animal ao condicionamento operante. Os modelos de condicionamento permitem compreender a natureza dos efeitos motivacionais que influenciam na auto-administração do álcool, assim como os efeitos farmacológicos, tais como o aumento do prazer ou a diminuição do estresse e da ansiedade. Nos modelos desenvolvidos nas gaiolas-casas, uma simples maneira de estudar a motivação para consumir a droga é medir o volume consumido, onde garrafas para consumo permanecem na gaiola (SHIPPENBERG; KOOB, 2002). Quando é dada aos animais uma escolha entre soluções (álcool e água, por exemplo), a proporção entre a ingesta relativa de álcool e a ingesta total (razão de preferência) é frequentemente usada para caracterizar o comportamento do animal. Nos experimentos, as garrafas estão disponíveis 24 horas por dia (livre escolha), ou apenas em pequenos períodos do dia (acesso limitado). Os roedores são cautelosos ao consumir substâncias com um sabor estranho, fenômeno denominado neofobia. Uma estratégia comum é introduzir o álcool em uma concentração relativamente baixa e aumentá-la ao longo do tempo. Outro

artifício é misturar o álcool com uma substância de sabor agradável, como a sacarose ou sacarina, cuja concentração pode ser gradualmente reduzida ao longo do tempo (CUNNINGHAM et al., 2000).

Auto-administração oral centrou-se em grande parte no álcool devido à evidente validade de face (imita a condição humana) deste modelo e porque a auto-administração intravenosa desta substância é difícil de ser mantida e desenvolvida nos animais (HYYTIA et al., 1996). Com algumas exceções (por exemplo, alucinógenos), drogas de abuso são prontamente auto-administradas, muitas por via intravenosa, e, em geral, drogas que são auto-administradas por animais correspondem àquelas com potencial de abuso em humanos (SHIPPENBERG; KOOB, 2002).

No modelo de preferência condicionada de lugar, os animais são expostos a aparelhos que geralmente consistem de dois ambientes neutros, que podem diferir quanto ao tipo de estímulo, incluindo cor, textura, odor e luz (FELTENSTEIN; SEE, 2008). É um modelo no qual um estímulo ambiental, pareado com a exposição à droga, é capaz de levar a propriedades motivacionais de incentivo (TZSCHENTKE, 1998, 2007). Várias drogas, incluindo opióides, nicotina e cocaína, tipicamente induzem à preferência condicionada ao lugar (SWERDLOW et al., 1989). Auto-estimulação elétrica de certas áreas do cérebro é recompensadora para animais e humanos (OLDS; MILNER, 1954). Há uma boa correspondência entre a capacidade de as drogas de abuso em diminuir o limiar para auto-administração intracraniana e o seu potencial de abuso (KORNETSKY; ESPOSITO, 1979). O uso de métodos baseados nas propriedades discriminantes da droga fundamenta-se nos mesmos componentes das ações das drogas relacionados aos efeitos de seu estímulo discriminante em animais e aos efeitos subjetivos em humanos. Os efeitos do estímulo discriminante das drogas, situação em que determinada resposta é seguida de um evento reforçador, podem contribuir para o consumo da droga em usuários intermitentes e à recaída em indivíduos já adictos à droga (SHIPPENBERG; KOOB, 2002).

1.3.2 Modelos animais que estudam os efeitos de reforço negativo das drogas

Os efeitos motivacionais negativos produzidos pelo álcool podem incluir estados não prazerosos como disforia, mal-estar e ressaca, ou mesmo diminuição dos estados prazerosos, como uma redução da euforia (CUNNINGHAM et al., 2000). Animais também mostram uma aversão condicionada de lugar, em vez de preferência, durante o estado de abstinência induzido pela suspensão abrupta após a administração crônica de uma droga (KOOB; LE MOAL, 2008a). A auto-administração operante da droga pode ser conduzida sob condições em que os animais são induzidos a uma “dependência física”. A dependência física pode aumentar a eficácia de reforço da droga. Abstinência da droga pode produzir um estado motivacional negativo ou aversivo que é manifestado por ruptura da resposta, aumento do consumo, mudanças no limiar de recompensa e aversão a lugares (SHIPPENBERG; KOOB, 2002).

O modelo de propriedade discriminante das drogas pode ser usado para caracterizar aspectos específicos ou não da abstinência (SHIPPENBERG; KOOB, 2002). Um aspecto mais específico da abstinência foi estudado em animais dependentes de diazepam, opióides ou álcool, treinados a discriminar entre pentilenotetrazol, uma droga ansiogênica, e salina. Durante a fase de abstinência daquelas drogas, os animais generalizaram para as pistas do pentilenotetrazol, sugerindo a presença do componente de ansiedade na síndrome de abstinência (BRANDT; FRANCE, 1998; EMMETT-OGLESBY et al., 1990). O limiar de recompensa de auto-estimulação intra-craniana tem sido usado para avaliar mudanças nos sistemas que medeiam os processos de reforço durante o curso da abstinência. Nenhum reforço negativo foi medido usando esta técnica, mas ela constitui um modelo de estado motivacional aversivo associado com o reforço negativo da abstinência de droga em animais dependentes. O modelo de aversão condicionada a lugar é quase que exclusivamente utilizado para estudar abstinência de drogas opióides. Neste modelo, os animais são expostos a um ambiente enquanto passam pela fase de abstinência, e a outro ambiente na ausência da abstinência (SHIPPENBERG; KOOB, 2002). Administração de antagonistas do receptor opióide a animais com “dependência física” de morfina produz aversão condicionada a lugares dose-relacionados, um efeito que

pode ser observado após uma simples sessão de condicionamento com o antagonista (FUNADA; SHIPPENBERG, 1996; HAND et al., 1988).

1.3.3. Modelos animais de adição: busca pela droga, uso compulsivo e recaída

Uma variedade de modelos animais cada vez mais sofisticados fornece meios inestimáveis para o entendimento da neurobiologia da adição e a ação farmacológica das drogas de abuso (BALSTER, 1991). Muitos modelos animais mimetizam aspectos de *craving*, recaída e perda de controle sobre o consumo, permitindo a possibilidade de prevenção farmacológica da recaída (SPANAGEL, 2003). *Craving* pode ser definido como “o desejo para os efeitos previamente experimentados de uma substância psicoativa”. Outra definição simples no que se refere ao etanol é o desejo de beber álcool sobreposto ao estado afetivo negativo ou a memória de efeitos de recompensa prazerosos do etanol sobreposta ao estado afetivo negativo (KOOB, 2000). Acredita-se que os efeitos motivacionais positivos e negativos do álcool sejam importantes influências no comportamento de procura da droga e, portanto, fatores-chave entre as muitas e variadas causas da dependência e abuso do álcool (CUNNINGHAM et al., 2000). Adição ao etanol pode ser definida como uso compulsivo, descontrolado da droga, e geralmente acompanhado por tolerância e abstinência e prejuízo nas funções sociais e comportamentais (KOOB, 2000). Abstinência e tolerância são frequentemente associados com uso compulsivo da droga; entretanto, elas não são necessárias isoladamente para um diagnóstico de dependência de drogas (SHIPPENBERG; KOOB, 2002). Adição à droga, também conhecida como dependência à substância, é um transtorno crônico caracterizado por compulsão para procurar e consumir a droga, perda de controle para limitar o consumo, e emergência de um estado emocional negativo (por exemplo, disforia, ansiedade, irritabilidade), refletindo uma síndrome de abstinência motivacional quando o acesso à droga é impedido (KOOB; LE MOAL 1997). Diferentes drogas produzem diferentes padrões de adição com ênfase em diferentes componentes do ciclo de adição (KOOB et al., 2008a). Elementos comuns incluem intoxicação (com psicoestimulantes e etanol, mas não com nicotina), abstinência/afeto negativo (com opióides e etanol, mas comum a todas as drogas de abuso) e

preocupação/antecipação (*craving* (comum a todas as drogas de abuso)). Pesquisas sugerem que a via mesocorticolímbica, incluindo a ATV, NAcc, amígdala e córtex pré-frontal, por meio de vias dopaminérgicas e glutamatérgicas, desempenhem um papel significativo na adição (FELTENSTEIN; SEE, 2008). Supõe-se que elementos-chave neuroquímicos envolvidos na recompensa e estresse dentro de estruturas do prosencéfalo basal envolvendo o estriado ventral e a amígdala estendida estejam desregulados na adição, por transmitir processos motivacionais oponentes que levam à dependência (KOOB; LE MOAL, 2001).

Vários modelos animais de recompensa e reforço (fase de intoxicação) são validados, e incluem auto-administração intravenosa da droga, preferência condicionada de lugar e recompensa por estimulação cerebral (SHIPPENBERG; KOOB, 2002). Modelos animais de estados negativos (abstinência/afeto negativos) incluem aversão condicionada a lugar quer para abstinência espontânea ou precipitada após administração crônica da droga, aumento do limiar de recompensa de estimulação cerebral e dependência induzida por comportamentos de procura e consumo aumentados (KOOB; LE MOAL, 2010). Modelos animais para o estágio de preocupação/antecipação envolvem reinstalação da procura da droga após extinção quando eliciada pelas próprias drogas, por dicas ligadas à droga e por exposição a estressores, e medidas de abstinência prolongada (SHAHAM et al., 2003; WEISS et al., 2001).

Entre os vários modelos, um foi proposto para ratos por Wolffgramm e Heyne (1995) e Wolffgramm et al. (2000) e constituiu a base conceitual do modelo utilizado no presente estudo. A partir deste modelo, foi validado para camundongos um modelo baseado no paradigma de auto-administração oral por livre escolha. Os animais têm livre acesso à água e às soluções com diferentes concentrações de etanol. Inicialmente, o comportamento de ingestão de álcool é exploratório e durante este período, um alto consumo entremeado por baixo consumo é observado. Nesta fase, os animais experimentam os efeitos psicotrópicos do álcool e ajustam seu comportamento ingestivo (FACHIN-SCHEIT et al., 2006). Posteriormente, cada animal desenvolve seu padrão individual de consumo, que permanece estável por vários meses, também descrito para ratos (WOLFFGRAMM et al, 2000). Após 70 dias de acesso contínuo por

livre escolha ao álcool, fase denominada de aquisição, os camundongos gradualmente modificam o padrão e alguns apresentam um aumento no consumo que se mantém nas fases subsequentes. Então, os camundongos são submetidos a um período de abstinência de 2 semanas. Nessa fase, originalmente, os camundongos permaneciam todo o período sem acesso ao etanol, porém no presente estudo foi acrescentada uma modificação na tentativa de aumentar a motivação pela busca ao etanol nas fases subsequentes. A modificação foi baseada no modelo de privação de álcool (ADE) proposto por Spanagel (2003), no qual os animais são expostos durante 2 dias à droga e permanecem em abstinência por 2 dias, assim submetemos os animais a 4 ciclos de abstinência durante as 2 semanas. O modelo ADE reflete a motivação que incentiva o consumo de álcool, sugestiva de, *craving*, e que tem sido proposto como modelo de recaída (SPANAGEL, 2003). Depois disso, os animais voltam a ter acesso às soluções de álcool, sendo essa a fase de reapresentação que dura um período de mais 2 semanas. Alguns animais continuam apresentando alto consumo e preferência pelo álcool nesse período de re-exposição. Além disso, a adição, caracterizada pela "perda de controle" sobre a ingestão de álcool, é avaliada através da adulteração das soluções alcoólicas acrescentando quinino (FACHIN-SCHEIT et al., 2006)), que produz um sabor amargo e supostamente aversivo. Esta adulteração das soluções de álcool reduz substancialmente o consumo em alguns animais que provavelmente não são adictos, enquanto outros continuam a consumir grandes quantidades de álcool sem apresentar redução significativa do seu consumo e preferência pelo etanol em relação às fases anteriores, sendo considerado como camundongo "adicto". Após estas quatro fases, os animais podem ser submetidos ao tratamento com algum composto farmacologicamente ativo com o objetivo de testar algum novo medicamento proposto para o tratamento do alcoolismo ou estudar o papel de sistemas de neurotransmissores/neuromoduladores sobre o comportamento de procura ao álcool. No caso da presente dissertação, foi utilizado o baclofeno, um agonista seletivo dos receptores GABAB com propriedades centrais e periféricas, estas últimas manifestadas principalmente pelos efeitos relaxantes do músculo esquelético agindo a nível medular. (VIENNE et al., 2010).

Na descrição do modelo original de privação do álcool, foram utilizados ratos Wistar com livre acesso a água, comida e três soluções de etanol a 5, 10 e 20% (v/v) em suas gaiolas, em modelo de livre escolha. Após dois meses de acesso contínuo, os ratos eram privados do álcool por alguns dias e a seguir novamente expostos à droga. Quando os ratos eram re-expostos às soluções de álcool, observava-se um fenômeno denominado efeito de privação do álcool (ADE do inglês *alcohol deprivation effect*), que consiste em um aumento pronunciado e temporário de consumo e da preferência pelo álcool, após privação de álcool e abstinência forçada (SPANAGEL, 2003). Um retorno ao nível de etanol consumido igual ou maior que o observado antes da “abstinência” é interpretado como “recaída” (CHIAUZZI, 1991). A adulteração de sabor com quinino ou escolha adicional de uma solução saborosa de sacarose não modificam o comportamento de consumir o etanol durante o efeito de privação. Os ratos preferem concentrações mais altas de álcool e bebem em horários incomuns durante o ciclo claro (SPANAGEL; HÖLTER, 1999). Muitos estudos de modelos que analisam o efeito de privação do álcool empregam um único período de privação, mas os padrões de consumo em humanos alcoolistas são separados em múltiplos períodos de abstinência e consumo (BURISH et al., 1981; HILBROM, 1990; MCMILLEN, 1997). O efeito de privação do álcool pode ser considerado como um aumento pela demanda ao etanol pelo indivíduo privado e este aumento se manifesta pelo aumento do consumo e pela seleção de concentrações mais altas, as quais produzem efeitos farmacológicos mais rápidos (SERRA et al., 2003). A medição do efeito de privação do álcool avalia apenas uma consequência comportamental e nada pode se dizer sobre o estado subjetivo associado à motivação de incentivo a consumir o álcool (SPANAGEL, 2003), aliás, difícil de avaliar até em humanos.

Os modelos de reinstalação da resposta são utilizados para investigar os mecanismos subjacentes à compulsão pela droga, recaída e procura da droga (KAMENETZKY; MUSTACA, 2005; SHAHAM et al., 2003). Um exemplo de desenho experimental, envolve treinar os animais a pressionar uma alavanca para obter álcool. Posteriormente passam pela fase de extinção, na qual a pressão da alavanca deixa de estar pareada com a obtenção da droga. Após esta fase, vários estímulos são apresentados e avaliam-se quais deles reinstalam a resposta de pressão da alavanca,

sem a presença da droga. Quando a reinstalação é induzida (por exemplo, por pistas, estresse ou droga), um aumento das pressões da alavanca pode ser prontamente quantificado. Há evidências de que ao menos três classes de estímulos produzam a reinstalação: a administração de uma pequena dose de álcool, o estresse, e estímulos condicionados que foram associados à droga durante a fase inicial. Em alcoolistas a simples visualização de um bar ou o odor de álcool pode provocar um efeito de *craving* e recaída (SPANAGEL, 2003). O efeito de *priming* está associado a uma pequena quantidade de álcool que pode induzir, nos alcoolistas abstinentes, um intenso estado subjetivo de *craving* e então, a procura pela droga. Os efeitos de reinstalação provocados pelo *priming* do álcool podem ser atribuídos às suas propriedades hedônicas (AGUILAR et al., 2009). De todas as drogas aprovadas pelo FDA para tratar o abuso de drogas, somente a naltrexona e o acamprosato foram testadas pelo modelo de reinstalação da resposta por preferência condicionada de lugar (KUZMIN et al., 2003; MCGEEHAN; OLIVE, 2006). O acamprosato e a naltrexona diminuem a recaída pelo álcool em humanos e atenua a reinstalação da procura do álcool induzida pelo *priming* ou pistas em ratos. Este modelo parece promissor nos estudos de dependência pelo álcool, heroína e nicotina (EPSTEIN et al., 2006). Não foi demonstrado conclusivamente que os animais que passaram pelo processo de reinstalação da resposta sejam verdadeiramente dependentes; também, a extinção do comportamento de procura da droga parece desempenhar um pequeno papel nos pacientes alcoolistas que estão tentando alcançar e manter a abstinência (SPANAGEL, 2003).

Os modelos têm sido farmacologicamente validados, e a partir disto desenvolveram-se drogas atualmente utilizadas para o tratamento do alcoolismo (KAMENETZKY; MUSTACA, 2005). Uma medicação promissora anti-adição em um modelo de auto-administração seria aquela capaz de atenuar a auto-administração e não alterar a resposta para as recompensas essenciais biológicas e naturais da droga (GARDNER, 2008). Novas técnicas moleculares, como amostras de microarranjos de DNA, permitirão aos pesquisadores conduzir análises moleculares dos animais procedentes destes modelos, ajudando a identificar genes que desempenham um papel na dependência do álcool e em outras doenças relacionadas ao álcool (SPANAGEL, 2003).

1.4 Receptores GABAB e efeitos de seus agonistas sobre o consumo, reforço e abstinência de etanol e outras drogas de abuso

Dados bioquímicos, eletrofisiológicos e comportamentais responsabilizam o receptor GABAA como um importante alvo para as ações *in vivo* do etanol. Quando o etanol interage com o receptor GABAérgico, ele facilita a inibição GABAérgica. O resultado é um maior efeito inibitório no cérebro, ocasionando relaxamento e sedação do organismo (CARDOSO et al., 1999; CAMPOS, 2003).

Pode-se exemplificar essa importante ação pela evidência de um antagonista do receptor GABAA reduzir o consumo de álcool em modelos animais ou pela administração de um agonista deste receptor em ratos poder substituir o etanol em estudos sobre suas propriedades discriminantes (HARRIS; MIHIC; VALENZUELA, 1998). No entanto, suas ações terapêuticas são limitadas por potenciais efeitos colaterais envolvendo hiperexcitabilidade do sistema nervoso central. Por outro lado, agonistas ou moduladores dos receptores GABA podem abolir o comportamento de busca da droga através de suas ações na recompensa, dependência ou em ambas. Moduladores de receptores GABA, que aumentam a atividade gabaérgica direta ou indiretamente, diminuem a auto-administração de cocaína, heroína, nicotina e álcool em ratos não-dependentes (MALGORZATA et al., 2007).

No entanto o etanol pode interagir em outras vias neurotransmissoras exercendo efeitos distintos. Há muitos estudos sobre a modulação do etanol em canais iônicos de neurônios centrais. Em neurônios hipocâmpais a transmissão mediada pelo receptor NMDA é inibida por etanol (KOYAMA; BRODIE; APPEL, 2007).

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 GABAA (SANNA et al., 1993). Sugere-se que na síndrome de abstinência provocada pela retirada abrupta do etanol, sintomas como ansiedade possam ser mediados em parte pela redução da função dos receptores GABAA no cérebro, caracterizada pela hiperexcitabilidade do SNC instalada na abstinência (DEVAUD et al., 1997).

Agonistas dos receptores GABAB também bloqueiam os sintomas da retirada abrupta do álcool em animais e humanos, e diminuí o desejo de beber em seres humanos com o alcoolismo (ADOLLORATO et al., 2002).

A estrutura primária do receptor GABAB foi estabelecida exibindo duas subunidades, GABABR1 e GABABR2, sendo elas proteínas com peso molecular de 130 kDa e 110 kDa, respectivamente, e são compostas de uma cadeia de 961 aminoácidos (GABABR1) e 940-941 aminoácidos (GABABR2). Os receptores GABAB foram identificados, tanto no sistema nervoso central quanto periférico. No sistema nervoso central, os receptores GABAB são predominantemente localizados em neurônios com maior densidade no núcleo talâmico, cerebelo, amígdala e córtex cerebral (MALGORZATA et al., 2007). Densidades consideráveis destes receptores também foram detectadas no hipocampo, substância nigra, ATV, NAcc, globo pálido e hipotálamo (BISCHOFF et al., 1999; BOWERY et al., 1987). Embora todos os ligantes dos receptores GABAB conhecidos interajam com a subunidade GABABR1, a subunidade GABABR2 é necessária para o tráfico de GABABR1 normal na superfície da célula (CALVER et al., 2001; COUVE et al., 1998), assim como a ativação da proteína Gi (GALVEZ et al., 2001). Outro papel identificado da subunidade GABABR2 é aumentar a afinidade dos agonistas (porém não dos antagonistas) à subunidade GABABR1 (MALITSCHKEK, 1999).

O ligante do receptor GABAB, ao ativá-lo, altera a conformação da subunidade GABABR1 e subseqüentemente de todo o complexo GABABR1-GABABR2, promovendo a ligação de uma subunidade da proteína Gi ao seu domínio intracelular produzindo alterações funcionais nos respectivos efetores, que incluem enzimas intracelulares (adenilato ciclase e fosfolipase C) e canais iônicos (canais de cálcio e potássio). A estimulação de receptores GABAB normalmente inibe a atividade da adenilato ciclase e bloqueia a síntese de AMPc (MORISHITA et al., 1990) (Figura 4).

Recentes pesquisas vem sendo desenvolvidas com o objetivo de esclarecer a relação do receptor GABAB com a dependência, reforço induzido pelas drogas de abuso e sintomas de abstinência. Diaz e colaboradores (2001) mostraram que o baclofeno, um agonista do receptor GAGAB, inibiu a síndrome de abstinência induzida pela naloxona em camundongos que foram tratados cronicamente com morfina, e

neutralizou a ansiedade induzida pela retirada da droga em ratos que foram expostos cronicamente ao etanol (KNAPP et al., 2007).

Atualmente já há relatos que a administração do agonista protótipo do receptor GABAB, baclofeno, bem como de outros agonistas diretos, como CGP44532 e SKF97541 têm a capacidade de suprimir vários comportamentos relacionados com o álcool em roedores, incluindo a aquisição e a manutenção do uso (COLOMBO et al., 2002).

1.5 Moduladores alostéricos positivos dos receptores GABAB

Os moduladores alostéricos são drogas que interagem com receptores de neurotransmissores ou hormônios em um local separado do sítio de ligação ortostérico de um agonista ou do antagonista competitivo. (URWYLER et al., 2004). Esses moduladores são uma área promissora para descoberta de novas drogas, dada a sua capacidade de “desvendar” mecanismos de sinalização. Esses compostos geralmente não apresentam atividade intrínseca sem a presença de seu respectivo sistema neurotransmissor ou hormônio, ao contrário disso, aumentam os efeitos dos ligantes relevantes. Atualmente, o ligante dos receptores GABAB, mais utilizado em pesquisas, disponível é o baclofeno, um composto que pode resultar em efeitos significativos fora de seu alvo, devido às doses, muitas vezes bastante elevadas, exigidas para a realização de efeitos funcionais eficazes (ADAMS; LAWRENCE, 2007).

Uma estratégia para tentar superar os vários problemas associados ao baclofeno é o desenvolvimento de moduladores alostéricos positivos dos receptores GABAB, o que pode representar uma forma mais sutil e controlável de alterações da função do receptor, ou permitir o uso de doses mais baixas de agonistas para reduzir os efeitos indesejados da droga. O composto mais estudado que age desta forma para facilitar a sinalização mediada pelo receptor GABAB é o CGP7930 (3 - (3, 5-di-terc-butílico-4-hidroxi) fenil-2 ,2 dimetilpropanol) (URWYLER et al., 2001). Foi demonstrado que esse agente interage com a subunidade GABABR2, estabilizando o estado ativo envolvido na ativação da proteína Gi. O antagonista receptor GABAB, CGP54626, liga-se competitivamente ao sítio de ligação do GABA no receptor GABAB, mas não inibem

competitivamente os efeitos da CGP7930, indicando que CGP7930 não interage com a subunidade GABABR1 no domínio extracelular do receptor onde o GABA atua. No estudo das subunidades do receptor GABAB, descobriu-se que CGP7930 não requer ambos os domínios extracelulares GABABR1 ou GABABR2 presentes para atuar. Em vez disso, o sítio de ligação parece estar localizado no domínio heptahelicoidal e, embora mais provável na subunidade GABABR2, a localização exata de ligação do modulador permanece obscura (Figura 4) (BINET et al., 2004)

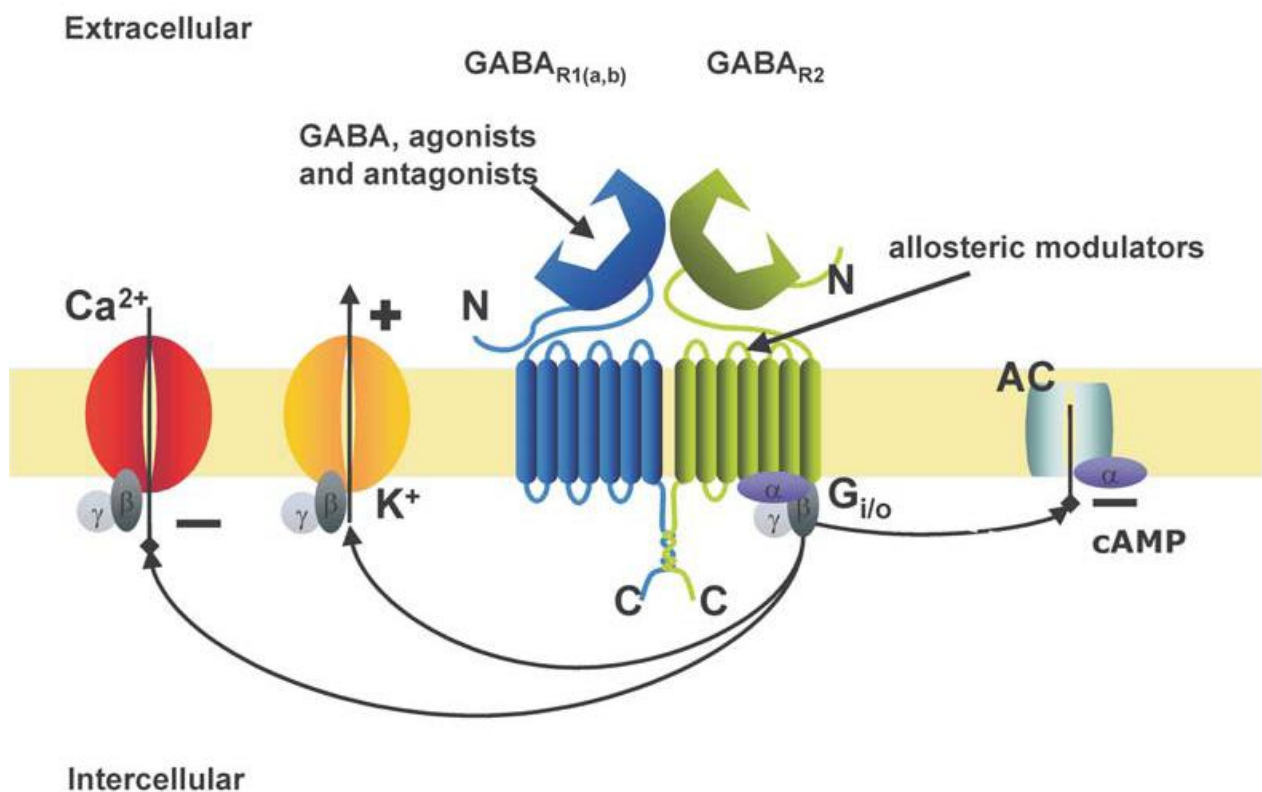


Figura 4. Representação esquemática do receptor GABAB.

Fonte: MALGORZATA, F; MALGORZATA, M, 2008.

Dados experimentais recentes sugerem que a estimulação dos receptores GABAB seja através da ativação do neurotransmissor GABA no seu sítio de ligação ou da ativação através de moduladores alostéricos positivos, suprimem diferentes comportamentos relacionados com o álcool, incluindo a auto-administração de álcool, em roedores de laboratório. Especificamente, o tratamento com doses não sedativas do agonista protótipo, baclofeno (ANSTROM, et al., 2003; JANAK; GILL, 2003; BESHEER

et al., 2004; MACCIONI et al., 2005; LIANG et al., 2006; WALKER; KOOB, 2007), ou moduladores alostéricos positivos, GS39783 e CGP7930, reduziu dose-dependentemente a auto-administração oral de álcool em ratos e camundongos expostos a processos convencionais de condicionamento operante (LIANG et al., 2006; MACCIONI et al., 2007).

Um procedimento amplamente utilizado em pesquisas com drogas de abuso através de auto-administração para avaliar as propriedades motivacionais de uma droga é o esquema de reforço em razão progressiva (PR) (DWORKIN; STAIRS 2003). Neste procedimento, os animais são treinados para pressionar uma alavanca em um determinado momento (FR) para receber estímulo reforçador específico (p. ex. FR5, nesse esquema o animal deve pressionar 5 vezes a alavanca para receber a droga) e, então, uma vez que seu comportamento de auto-administração foi estabilizado, a exigência de resposta é progressivamente (PR) aumentada (p. ex. FR5, FR10 e assim sucessivamente) (MACCIONI et al., 2008).

Os moduladores alostéricos positivos dos receptores GABAB possuem efeitos benéficos quanto ao consumo excessivo de álcool em ratos. Assim como baclofeno, o CGP7930 ou GS39783 reduz o comportamento de consumo de etanol em dois tipos de linhagens de ratos que têm preferência pelo álcool. Tanto a aquisição quanto a manutenção da dependência de álcool foram amplamente inibidas pelos moduladores alostéricos positivos, assemelhando-se ao baclofeno (KNIAZEFF et al., 2004; LIANG et al., 2006).

Estudos indicam que tanto o tratamento com o agonista direto do receptor GABAB, baclofeno, como o modulador alostérico positivo, GS39783, reduz o “*break point*” para o álcool, ou seja, reduz as repetições de pressão na barra que os animais desempenham para receber a droga, em ratos da linhagem Sardinian (sP), que têm preferência pelo álcool, expostos a sessões de auto-administração de etanol num esquema de reforçamento de razão progressiva. Estes resultados sugerem que a estimulação do receptor GABAB, quer através da ativação no sítio de ligação do neurotransmissor pelo agonista direto ou pela ligação no sítio de ativação dos moduladores alostéricos positivos, reduz a motivação de ratos SP de consumir o álcool (GALVEZ et al., 2000; MACCIONI et al., 2008). Além do álcool, dados demonstram que

ao utilizar o modelo de auto-administração de cocaína, no esquema de reforço em razão progressiva, o baclofeno (Brebner al., 2000) e o CGP7930, ambos diminuíram o *break point* dos animais (SMITH et al., 2004), o que indica uma redução no reforço causado pela cocaína. Os efeitos inibitórios do agonista do receptor GABAB e do modulador alostérico positivo foram bloqueados ao ser administrado um antagonista desse receptor, SCH 50911, o que corrobora com a hipótese de que a estimulação do receptor GABAB é essencial na redução do reforço causado pela cocaína (MALGORZATA, 2007).

O uso crônico de drogas de abuso induz a sensibilização locomotora, o que resulta em respostas comportamentais duradouras durante a administração das substâncias (KALIVAS; VOLKOW, 2005). Em estudos de sensibilização comportamental, pelo menos, duas fases distintas são focadas, a aquisição e a expressão (PIERCE; KALIVAS, 1997). Resumidamente, a aquisição é a fase em que se desenvolvem as mudanças comportamentais e fisiológicas devido à exposição repetida e intermitente de drogas. A fase de expressão define as mudanças de comportamento em longo prazo que são resultantes de neuroadaptações induzidas por drogas. Evidências têm demonstrado que o modulador alostérico positivo GSC39783 atenua a hiperlocomoção induzida por uma única administração de cocaína (LHULLIER et al., 2007).

Embora as drogas que ativam o receptor GABAB possuam vários mecanismos de ação terapêuticos, estes foram limitados devido à tolerância e efeitos colaterais indesejáveis que incluem sedação, atividade miorrelaxante e hipotermia. Não surpreendentemente, os moduladores alostéricos positivos têm diferentes efeitos comportamentais que o baclofeno. Estas substâncias não possuem os mesmos efeitos adversos que o baclofeno e podem ser usadas em tratamentos de longo prazo sem que o paciente desenvolva tolerância, demonstram uma atividade ansiolítica mais pronunciada e têm efeitos semelhantes aos do baclofeno para o tratamento da dependência. Portanto, os moduladores alostéricos positivos são excelentes alternativas para diversas aplicações terapêuticas (PIN; PREZEAU, 2007).

1.6 Efeitos neuroquímicos das drogas de abuso

1.6.1 Efeitos dos agonistas dos receptores GABAB

Já está estabelecido que as respostas comportamentais (ou seja, o reforço e os efeitos locomotores induzidos pelas drogas) de várias substâncias de abuso estão fortemente relacionados com o aumento da concentração de DA no NAcc (KOOB, 1988). No entanto, após administração sistêmica de baclofeno, uma diminuição significativa no efluxo de DA accumbal foi observada em ratos treinados para se auto-administrar anfetamina (BREBNER et al., 2005). Um mecanismo proposto pelo qual o baclofeno inibe a atividade do sistema dopaminérgico poderia envolver a estimulação dos receptores GABAB localizados no corpo celular dos neurônios de DA na ATV que se projetam para o NAcc (LIANG et al., 2000). A hiperpolarização dos corpos celulares destes neurônios dopaminérgicos poderiam potencialmente inibir a liberação de DA no NAcc. Para confirmar essa hipótese, foram relatados dados nos quais a infusão de baclofeno na ATV reduziu o efluxo de DA no NAcc em ratos que se auto-administravam cocaína (BREBNER et al., 2000) e heroína (XI; STEIN, 1999).

Os neurônios gabaérgicos participam na modulação do sistema dopaminérgico mesolímbico, e são conhecidos devido seu mecanismo de ação peculiar de diminuir a função os neurônios de DA por meio de receptores inibitórios GABAB (BARTHOLINI, 1985; BARDO 1998). Essa interação neuroquímica corrobora com a idéia de que os agonistas do receptor GABAB poderiam ter potencial terapêutico contra a dependência, reduzindo a atividade do sistema dopaminérgico mesolímbico (BUCKETT, 1981; ROBERTS et al., 1996). Drogas gabaérgicas atenuam o aumento da liberação de DA induzido por cocaína e nicotina no sistema mesolímbico, um efeito provavelmente mediado por receptores GABAB (DEWEY et al., 1997). O gama-vinil GABA (vigabatrina), uma substância antiepiléptica inibidora irreversível da gaba-transaminase, enzima que inativa o GABA, reduz o aumento nos níveis de DA em sinapses neostriatais e no NAcc induzido pela cocaína e nicotina (DEWEY et al., 1999), assim como os aumentos de liberação de DA induzidos por heroína, etanol e metanfetamina (GERASIMOV; DEWEY, 1999). Estes efeitos ocorrem em doses que não afetam os

níveis de DA basal. Não há evidência direta que indique que esses efeitos são mediados pelo receptor GABAB, no entanto, o antagonista seletivo do receptor GABAB SCH50911 bloqueou os efeitos neuroquímicos do gama-vinil GABA em reduzir a liberação de DA no NAcc induzida por cocaína (Ashby et al., 1999). Isso mostra que a estimulação de receptores GABAB é suficiente para diminuir a liberação de DA no NAcc produzida por drogas de abuso. Xi e Stein (1999) chegaram a uma conclusão semelhante em seu estudo no qual o baclofeno, dose-dependente, reduziu a liberação de DA do NAcc induzida pela heroína. Parece que este efeito neuroquímico é mediado por receptores GABAB localizado na ATV e tais efeitos do baclofeno foram bloqueados por infusões intra ATV do antagonista do receptor GABAB, 2-hidroxisaclofen.

Ainda faltam evidências conclusivas sobre os efeitos de outros agonistas gabaérgicos inespecíficos (por exemplo, gabapentina divalproato, valproato, carbamazepina) ou agonistas do receptor GABAB (por exemplo, baclofeno, CGP44532) na liberação de DA induzida por drogas de abuso. Além disso, ainda não se sabe se a modulação do receptor GABAB afeta outros sistemas neurotransmissores na presença de cocaína, heroína, álcool, entre outras drogas (COUSINS et al., 2002).

1.6.2 Efeitos no sistema glutamatérgico

O glutamato, principal neurotransmissor excitatório do SNC, atua através de três tipos diferentes de receptores ionotrópicos, localizados no terminal pós-sináptico: o N-metil-D-aspartato (NMDA), o ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazole-4-propiónico (AMPA), e o ácido caínico ou cainato (KA). O glutamato também pode ligar-se a receptores metabotrópicos, localizados na pré-sinapse e em regiões perisinápticas (GASS; OLIVE, 2008).

A transmissão glutamatérgica é uma importante mediadora das mudanças comportamentais causadas pelo etanol (ECKARDT et al., 1998; KRYSTAL et al., 2003a). O glutamato regula a atividade da DA no sistema mesocorticolímbico, estando envolvido na mediação das propriedades de recompensa das drogas de abuso (KOOB, 1988; KOOB, 1992a; WOOLVERTON; JOHNSON, 1992). Os neurônios glutamatérgicos provenientes do córtex pré-frontal, núcleo paraventricular, hipocampo e amígdala atuam

em receptores ionotrópicos do NAcc, induzindo a liberação de DA (BLAHA et al., 1997; HOWLAND et al., 2002; WEISS et al., 2001). O etanol apresenta efeito bifásico, dose dependente, na liberação de glutamato no NAcc. Em baixas doses, o etanol eleva os níveis extracelulares de glutamato, ao passo que, em altas doses, tem efeito oposto (GASS; OLIVE, 2008; MOGHADDAM; BOLINAO, 1994). Não se sabe até que ponto o efeito do álcool sobre a transmissão glutamatérgica no sistema mesocorticolímbico é relevante para a atividade dos neurônios dopaminérgicos, já que a perfusão de um antagonista do receptor NMDA na ATV não afeta os efeitos do etanol relacionados à DA (SPANAGEL, 2009). O sistema glutamatérgico também está fortemente ligado ao óxido nítrico (NO), mensageiro intra e extracelular (BURNETT et al., 1992). A estimulação dos receptores NMDA leva ao influxo de Ca^{2+} e, posteriormente, o complexo Ca^{2+} -calmodulina formado ativa a óxido nítrico sintase (NOS) com a consequente síntese de NO. Uma vez que o NO age como mensageiro retrógrado, pode ocorrer ativação da guanilato ciclase (GC) e elevação nos níveis de guanosina monofosfato cíclica (GMPc), que atua nas proteínas quinase dependentes de GMPc I (cGKI) e II (cGKII) (HOFMANN et al., 2006). O receptor NMDA, as enzimas e as moléculas subseqüentemente ativadas (NOS e cGKII; NO e GMPc) estão envolvidos no reforço e nos comportamentos relacionados ao álcool. Isso é evidenciado pelo fato de camundongos *knockout* para o gene responsável pela síntese de NOS consumirem mais álcool em comparação com os animais selvagens (SPANAGEL et al., 2002). Um comportamento semelhante ocorreu em camundongos *knockout* para o gene responsável pela síntese de cGKII (WERNER et al., 2004).

Antagonistas NMDA, como a dizolcipina (MK-801), podem potencializar alguns dos efeitos da administração aguda de etanol, como a perda de reflexos (WILSON et al., 1990; SILVERI; SPEAR, 2002) e estimulação da atividade locomotora (ROBLEDO et al., 1991; SHEN; PHILLIPS, 1998). Outros estudos, no entanto, indicam que o neramexano, antagonista não competitivo do receptor NMDA, produziu resultados promissores em estudos pré-clínicos, particularmente no que diz respeito à redução do consumo de álcool após privação (HOLTER et al., 2000; VANGELIENE et al., 2005). Em estudos clínicos, porém, observou-se que a eficiência terapêutica dos bloqueadores do

receptor NMDA é dose dependente, ocorrendo apenas quando doses suficientes são administradas (SPANAGEL, 2009).

Os receptores AMPA e KA também parecem ter a função inibida pelo etanol, porém, com pouca sensibilidade à inibição (WIRKNER et al., 2000; NIE et al., 1994; FRÖHLICH et al., 1994; NIEBER et al., 1998; IBBOTSON et al., 1997; AKINSHOLA et al., 2003). Estudos recentes indicam que a presença desses receptores na amígdala central tem se mostrado importante no fenômeno de reforço envolvido com o etanol (GASS; OLIVE, 2008).

1.6.3 Efeitos no sistema de opióides endógenos

Quando administrados no organismo, os opiáceos mimetizam os peptídeos opióides endógenos (Biological Components of Substance Abuse and Addiction September, 1993). Divididos em três famílias distintas – as encefalinas, as endorfinas e as dinorfinas –, os peptídeos opióides endógenos (AKIL et al., 1984) atuam através dos receptores Delta (δ), Mi (μ) e Kappa (κ) (Herz, 1996). As encefalinas e as endorfinas ligam-se aos receptores δ e μ , as encefalinas, porém, têm afinidade maior pelos receptores δ . As dinorfinas ligam-se preferencialmente aos receptores κ (AKIL et al., 1988; CHARNESS, 1989). Os receptores δ e μ mostram algumas similaridades, enquanto que a ativação dos receptores κ resulta em um espectro farmacológico muito diferente (HERZ, 1996). Os opióides endógenos estão envolvidos em três funções principais: 1) modulação da percepção da dor e resposta a estímulos dolorosos; 2) recompensa e 3) regulação das funções homeostáticas relacionadas à alimentação, à água e à temperatura (KOOB, 1992b). As encefalinas e as endorfinas são os substratos neuroquímicos dos processos de recompensa, além de serem importantes para mediar os efeitos euforizantes associados ao uso de etanol (BELLUZZI et al., 1977).

Os efeitos dos antagonistas opióides em modelos animais mostram evidências da participação desse sistema neurotransmissor na modulação dos comportamentos relacionados ao etanol. A interação do sistema opióide com o etanol não é totalmente compreendida, porém, sabe-se que a transmissão dopaminérgica no NAcc está envolvida (WEISS; PORRINO, 2002). Os neurônios dopaminérgicos da ATV, que

enviam projeções para o NAcc, são inibidos através da transmissão GABAérgica. Tal inibição pode ser abolida pela estimulação dos receptores opióides μ e κ por endorfinas e encefalinas. Como a liberação de endorfinas e encefalinas é estimulada pelo etanol, ocorre um aumento da liberação de DA no NAcc (GIANOULAKIS, 1996). Em contraste, a estimulação dos receptores opióides κ por dinorfinas no NAcc pode diminuir a liberação de DA (DE WAELE et al., 1995).

Assim, o aumento da expressão de dinorfinas poderia ser um dos muitos mecanismos compensatórios que diminuiriam o excesso de DA induzido por drogas (STEINER; GERFEN, 1996). Sugere-se que a *upregulation* das dinorfinas estriatais pode contribuir para a tolerância, dependência e sintomas de abstinência, opondo-se a liberação de DA (HYMAN; MALENKA, 2001). A naltrexona, antagonista opióide não específico, reverte a liberação de DA induzida pelo álcool no NAcc em ratos, e a supressão por essa substância do comportamento associado ao álcool é concomitante com a atenuação dos níveis de DA no NAcc (GONZÁLES; WEISS, 1998). O uso clínico da naltrexona pode ser benéfico na redução do número de episódios de recaída (O'MALLEY et al., 1996), além disso, a administração de naltrexona reduz a ingestão voluntária de etanol. O antagonista específico para o receptor κ ICI-174864, tem um efeito similar (FROEHLICH et al., 1991).

1.6.4 Efeitos no sistema de endocanabinóides endógenos

Os endocanabinóides são capazes de ativar um ou ambos os subtipos de receptores canabinóides caracterizados (DI MARZO, 1998) até o momento em animais (PACHER et al., 2005, DI MARZO et al., 1998): CB1, altamente expresso no cérebro (MATSUDA et al., 1990), mas também presente no coração e tecidos vasculares (GEBREMEDHIN et al., 1999; LIU et al., 2000; BONZ et al., 2003), e CB2, expresso principalmente pelas células hematopoiéticas e do sistema imune (MUNRO et al., 1993). Anandamida ou N-araquidonoil-etanolamida (AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG), os principais representantes dos endocanabinóides, são pequenas moléculas derivadas do ácido araquidônico. O sistema canabinóide endógeno é, portanto, um

sistema de sinalização lipídica (DE FONSECA et al., 2005) cuja existência foi demonstrada de forma conclusiva com a descoberta de componentes endógenos do cérebro capazes de ativar receptores canabinóides (DI MARZO, 1998).

Recentes avanços têm ligado o sistema canabinóide endógeno ao alcoolismo (DE FONSECA et al., 2005). Os endocanabinóides atuam na sinalização retrógrada em tecidos neuronais através dos receptores canabinóides pré-sinápticos e, portanto, são envolvidos na supressão da transmissão sináptica clássica. Essa poderosa ação modulatória sobre o transporte sináptico tem importantes implicações funcionais, incluindo seus efeitos nas drogas de abuso, como o álcool (SPANAGEL, et al., 2009). O ácido araquidônico não é detectado no cérebro de ratos expostos ao etanol, podendo ser desviado para a síntese de AEA (HUNGUND et al., 2002). O aumento dos níveis de endocanabinóides no NAcc durante a auto-administração de etanol sugere um papel para essas substâncias do NAcc nos efeitos de reforço produzidos pelo álcool (CAILLÉ et al., 2007).

Segundo Houchi et al. (2005), ratos *knockout* para o gene responsável por sintetizar os receptores CB1 (CB1^{-/-}) demonstraram diminuição da preferência condicionada de lugar (CPP) induzida por etanol em comparação com animais selvagens. Além disso, observou-se diminuição no consumo de etanol em camundongos CB1^{-/-}, associado aos sintomas de abstinência graves e ao aumento da sensibilidade ao etanol (NAASSILA et al, 2004).

O antagonismo dos receptores canabinóides é uma alternativa terapêutica promissora para a dependência do álcool e recaídas (DE FONSECA et al., 2005). A infusão do antagonista do receptor CB1, SR41716A, no NAcc reduz significativamente a auto-administração do etanol em ratos Wistar (CAILLÉ et al., 2007) e em ratos da linhagem Sardinian (SP), com preferência pelo álcool (COLOMBO et al., 1998; WEISS et al., 2002), sugerindo diminuição na motivação de consumo (HUNGUND et al., 2002).

1.6.5 Efeitos sobre o Neuropeptídeo Y

O Neuropeptídeo Y (NPY) é um peptídeo de 36 aminoácidos com cinco resíduos de tirosina em sua estrutura, ao que se deve seu nome ("Y" deriva de

tyrosine) (TATEMOTO, 1982). Secretado pelos neurônios (PALMITER et al., 1998) e amplamente expresso no SNC e periférico, o NPY regula o comportamento alimentar, atividade gastrointestinal, função cardiovascular, influencia a ingestão de álcool (BARABAN et al., 1997; HOKFELT et al., 1998; THIELE et al., 1998), está implicado no controle de crises epiléticas (BARABAN et al., 1997), além de potencializar o efeito sedativo-hipnótico de certas drogas (YAMADA et al., 1996). O NPY atua através de, no mínimo, cinco subtipos de receptores – Y1, Y2, Y4, Y5 e Y6 – (PALMITER et al., 1998) que ligam-se às proteínas G inibitórias heterotriméricas, inibindo a produção de AMPc (HEILIG; WIDERLOV, 1995; GERALD et al., 1996).

Recentemente, evidências genéticas, moleculares e farmacológicas têm sugerido que o NPY é um importante substrato neurobiológico na predisposição para o comportamento de busca do álcool (PANDEY et al., 2003). Thiele et al. (1998) demonstraram que camundongos que expressam um nível aumentado de NPY (*NPY-overexpressing* (NPY-OX)) consumiram significativamente menos etanol, em todas as concentrações testadas, além de terem uma menor preferência por etanol em comparação com os animais selvagens. Contrariamente, os camundongos NPY-OX foram mais sensíveis que os camundongos selvagens à sedação induzida por etanol. Camundongos *knockout* para o gene NPY (NPY^{-/-}), mostraram maior consumo de etanol, além de preferirem etanol à água. No que diz respeito aos efeitos sedativos do etanol, os camundongos NPY^{-/-} foram resistentes, recuperando o reflexo 15 minutos antes que a linhagem de camundongos selvagens (THIELE et al., 1998).

O etanol induz a liberação de DA, que estimula o receptor de DA do tipo 1 (D1) e, conseqüentemente, ativa a proteína G estimulatória (Gs), ocasionando a ativação da enzima adenilato ciclase (AC), o aumento na concentração de adenosina monofosfato cíclica (AMPc) e a ativação de proteína quinase A dependente de AMPc (PKA). O AMPc promove a dissociação entre a subunidade reguladora da PKA e a subunidade catalítica (PKA-C). A PKA-C é responsável pela fosforilação do fator de transcrição de proteínas de ligação do elemento responsivo ao AMPc (CREB). A exposição ao etanol também influencia a expressão da proteína quinase IV dependente de Ca²⁺/calmodulina (CaMKIV) e, assim, a fosforilação do CREB no núcleo central da amígdala. Estes acontecimentos culminam na transcrição de genes que contém o elemento de

resposta ao AMPc (CRE) em sua região promotora, tais como o hormônio liberador da corticotropina (CRH), o neuropeptídeo Y (NPY), prodinorfina (PDYN) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (SPANAGEL et al., 2009). A diminuição da função do CREB no núcleo central da amígdala é responsável por regular a ansiedade e ingestão de álcool via redução da expressão de NPY, o que poderá proporcionar um elo comum entre os transtornos de ansiedade e abuso de álcool (PANDEY et al., 2003). Entretanto, segundo Thiele et al. (1998), as diferenças nos níveis de NPY central pode estar associada a diferenças na ingestão de álcool, independentemente de quaisquer diferenças no que diz respeito à ansiedade.

Em relação à abstinência, a diminuição dos níveis de NPY nos núcleos central e medial da amígdala, assim como em estruturas corticais e do hipotálamo, durante a retirada do etanol pode desempenhar um importante papel nos neuromecanismos de alguns sintomas da abstinência do álcool (ROY; PANDEY, 2002).

1.6.6 Efeitos sobre o fator liberador de corticotrofina (CRF)

O fator liberador de corticotrofina (CRF) ou hormônio liberador de corticotrofina (CRH) é um neuropeptídeo de 41 aminoácidos conhecido por ser o principal hormônio responsável pela síntese e secreção da corticotropina (ACTH), regulando a resposta ao estresse pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (VALE et al., 1981). O CRF também está envolvido em respostas comportamentais relacionadas ao estresse através de regiões extra-hipotalâmicas, especialmente a amígdala (SPANAGEL, 2009). Amplamente distribuídas em todo o cérebro (SWANSON et al., 1983), células e fibras contendo CRF são encontradas em altas concentrações no núcleo central da amígdala, núcleo paraventricular do hipotálamo, núcleos do leito da estria terminal, área parabraquial, *substantia innominata*, *locus coeruleus* e bulbo olfatório (KOOB; HEINRICH, 1999). Os receptores de CRF, CRFR1 e CRFR2, ambos acoplados à proteína G, são encontrados em todo o sistema nervoso central. O CRF propriamente dito, porém, tem maior afinidade para o CRFR1. A urocortina (UCN), peptídeo relacionado ao CRF, é o suposto ligante endógeno do CRFR2, já que se liga ao CRFR2 com 40 vezes maior afinidade do que o CRF (BALE et al., 2000).

CRF tem sido implicado nos efeitos da abstinência de drogas de abuso (TORREGROSSA; KALIVAS, 2008), além disso, dados recentes sugerem que o CRF pode contribuir para a dependência e a vulnerabilidade à recaídas associadas ao uso crônico do etanol (KOOB; HEINRICHS, 1999). Isso se deve ao fato de os sistemas envolvidos com o estresse, nos quais o CRF é principal componente, serem o ponto chave dos processos de reforço negativo, que conduzem a compulsão do uso de substâncias. O reforço negativo é o processo pelo qual a remoção de um estímulo aversivo (por exemplo, estado emocional negativo da retirada da droga), aumenta a probabilidade de uma resposta (por exemplo, a dependência induzida pelo consumo de drogas) (KOOB; LE MOAL, 1997).

Em humanos, o eixo HPA é ativado durante a abstinência e dependência de drogas. O CRF fora desse eixo também parece ter sua função ativada durante a abstinência de álcool e, portanto, pode mediar aspectos comportamentais do estresse associados à abstinência (VALE et al., 1981; RIVIER; PLOTSKY, 1986). Agudamente, a maioria das drogas de abuso ativa o eixo HPA, que pode ser o primeiro facilitador da atividade dos circuitos cerebrais de motivação e recompensa e, como resultado, medeia a aquisição do comportamento de busca pela droga (DUNN; BERRIDGE, 1990; KOOB; HEINRICHS, 1999; SUTTON et al., 1982). A amígdala extendida, composta por várias estruturas do prosencéfalo basal – núcleos do leito da estria terminal, amígdala medial e escudo posterior – (JOHNSTON, 1923), contém os principais componentes do sistema CRF extra-hipotalâmico e é a principal associada ao reforço negativo (KOOB; LE MOAL, 1997).

O antagonismo do CRFR1 (BALDWIN et al., 1991; BRUGGER et al., 1998) e a supressão do gene responsável pela expressão desse receptor (TIMPL et al., 1998), portanto, podem atenuar os sinais comportamentais decorrentes da retirada do álcool (TIMPL et al., 1998; BALDWIN et al., 1991; BRUGGER et al., 1998), assim como os efeitos ansiogênicos (KOOB; HEINRICHS, 1999).

As urocortinas são divididas em três subtipos distintos: 1, 2 e 3 (Ucn 1, Ucn 2 e Ucn3) (VENGELIENE et al., 2005; HSU; HSUEH, 2001; LEWIS et al., 2001; REYES et al., 2001). Estudos recentes demonstram que a Ucn 1 pode ter um papel importante na regulação do consumo de álcool, de acordo com as seguintes evidências: os neurônios

contendo Ucn 1 são extremamente sensíveis ao álcool; o neurocircuito que envolve a Ucn 1 pode contribuir para a predisposição genética de alta ingestão de álcool em camundongos e ratos; e a manipulação do sistema Ucn 1 altera o consumo de álcool e a sensibilidade a essa substância (RYABININ; WEITEMIER, 2006). A Ucn 3, agonista CRFR2 altamente seletivo, quando injetada intracerebroventricularmente ou diretamente no núcleo central da amígdala tem um efeito semelhante a um antagonista CRFR1 na redução da auto-administração de etanol (VALDEZ et al., 2004). Esses resultados indicam que o sistema Ucn 3 pode bloquear o consumo excessivo, além de sugerir para o CRFR2 um papel oposto ao CRFR1 na modulação da ingestão de etanol em animais dependentes (KOOB et al., 2009).

1.7 Drogas utilizadas para o tratamento do alcoolismo

A dependência do álcool é uma doença tratável, quando são selecionados medicamentos eficazes para melhorar os efeitos do tratamento psicossocial. O desenvolvimento destes medicamentos tem sido facilitado pelos avanços da neurociência que tem implicado vários sistemas neurotransmissores alvos, como por exemplo, a via mesocorticolímbica que medeia os efeitos reforçadores do álcool (JOHNSON, 2008).

1.7.1 Sistema opióide e naltrexona

O sistema de opióides endógenos, particularmente através de suas interações com o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, está envolvido na expressão dos efeitos reforçadores do álcool (LEE et al., 2005). Obviamente, os receptores opióides também têm interações com outros neurotransmissores, incluindo os sistemas de glutamato, GABA (FOSTER et al., 2004), serotonina (MATSUZAWA et al., 1999), canabinóides (MANZANARES et al., 2005) e provavelmente com a glicina (RESCH et al., 2005), que contribuem para os seus efeitos sobre o consumo de etanol. A naltrexona, um antagonista opióide, possui afinidade pelo receptor kappa opióide,

porém, seu principal efeito farmacológico sobre o consumo de álcool é através do bloqueio do receptor μ -opióide (FACHIN-SCHEIT et al., 2006). Além disso, a ingestão de álcool aumenta a liberação de beta-endorfinas em regiões do cérebro como o NAcc (MARINELLI et al., 2004), um efeito que é bloqueado pela naltrexona (ZALEWSKA-KASZUBSKA, 2006).

Estudos com humanos que avaliam os efeitos da naltrexona sobre o reforço positivo induzido pelo etanol demonstraram resultados mistos, ou seja, embora tenha sido demonstrado que a naltrexona possa reduzir o reforço positivo induzido pelo álcool, porém com aumento da sedação (SWIFT et al., 1994), e aumentar a latência para o consumo de álcool entre os bebedores sociais (DAVIDSON et al., 1996), outros estudos não relataram qualquer desses efeitos (DOTY; WIT, 1995).

A maioria dos dados confirma que a naltrexona é um medicamento eficaz para o tratamento da dependência de álcool. O tamanho do efeito terapêutico é, no entanto, pequeno. A dosagem administrada é baixa podendo, conseqüentemente, ser associada com o resultado clínico também baixo. Há uma escassez de estudos publicados sobre os efeitos de diferentes doses de antagonistas opióides sobre o consumo de álcool (JOHNSON, 2008).

1.7.2 Antagonistas dos receptores de glutamato

Os principais efeitos neuroquímicos do acamprosato, uma droga semelhante ao GABA, têm sido atribuídos ao antagonismo dos receptores de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA), restaurando o equilíbrio entre a neurotransmissão excitatória e inibitória desregulado após o consumo crônico de álcool (DE WITTE et al., 2005).

O acamprosato demonstrou diminuir: (a) o consumo de etanol em roedores (CZACHOWSKI et al., 2001), (b) a hiperexcitabilidade induzida pela DA no NAcc, durante a retirada do álcool (DAHCHOUR et al., 1998), (c) a hiperexcitabilidade neuronal geral (SPANAGEL et al., 1996), (d) a neurotransmissão glutamatérgica em ratos dependentes de álcool (BOLO et al., 1998), (e) a atividade do canal de cálcio voltagem-dependente, e (f) a expressão de c-FOS do cérebro (PUTZKE et al., 1996). No entanto, é a capacidade do acamprosato de suprimir a sensibilidade do receptor de

glutamato induzida pelo álcool (KRYSTAL et al., 2003b), bem como os efeitos induzidos pelo etanol em animais previamente dependentes, mesmo após a abstinência prolongada (WOLFFGRAMM; HEYNE, 1995), que tem sido associada com seu efeito terapêutico em humanos – diminuição do reforço negativo e ansiedade causada pós-abstinência (JOHNSON, 2008). Curiosamente, houve uma escassez de estudos com humanos que avaliem os efeitos potenciais do acamprosato sobre os efeitos comportamentais relacionados com o álcool e associado com a sua capacidade de gerar o comportamento abusivo no consumo. Evidências de um estudo de ressonância magnética em humanos mostraram, no entanto, a eficácia do acamprosato para atuar como um agente modulador da neurotransmissão glutamatérgica, uma vez que diminui a atividade de regiões do cérebro ricas em N-acetilaspártato e glutamato (BOLO et al., 1998). Pesquisas com indivíduos dependentes de álcool, também têm mostrado que o acamprosato é relativamente seguro tendo poucos efeitos adversos sendo os mais importantes a diarreia, nervosismo e irritabilidade e fadiga, especialmente quando a dose é relativamente alta (3g/dia) (JOHNSON et al., 2003b)

O acamprosato não possui nenhuma interação clínica significativa com o álcool. Recentemente, foi demonstrado que esta droga pode reduzir a frequência cardíaca, não alterando os índices de cortisol nem o desejo subjetivo de consumir a droga, após a apresentação de pistas que ocasionem a lembrança do uso da droga, o que sugere utilidade para acamprosato no controle da desregulação autonômica em alcoolistas abstinentes que estão expostos a um risco elevado para situações de recaída (OOTEMAN et al., 2007).

Outros antagonistas do receptor NMDA, como a memantina e o neramexano estão sendo estudados na tentativa de instaurar um tratamento eficaz da dependência de álcool. Ambos os compostos demonstraram, em modelos animais, que são eficazes para suprimir a *up-regulation* dos receptores NMDA induzida por etanol, reduzindo assim a sensibilização ao etanol e a propensão ao uso de drogas subsequente a esse fenômeno (KOTLINSKA et al., 2006). Em estudos clínicos, a memantina foi capaz de reduzir o *craving*, porém, não foi efetiva quando administrada após a administração experimental de álcool. Isto sugere que a memantina possa ter efeitos semelhantes ao diazepam melhorando sintomas de abstinência do álcool (KRUPITSKY et al., 2007).

O topiramato tem a capacidade de antagonizar os receptores alfa-amino-3-hidróxi-5-metil-4-lisoxazol propiônico (AMPA) e receptores cainato do glutamato (GIBBS et al., 2000). O topiramato também facilita a corrente inibitória mediada pelo receptor GABAA em sítios de ligação não-benzodiazepínicos desses receptores (WHITE et al., 2000), inibe os canais de cálcio tipo L e limita as funções do sistema de segundos mensageiros dependentes de cálcio (ZHANG et al., 2000), reduz atividade celular dependente de despolarização, diminui a excitabilidade dos canais de sódio voltagem-dependentes (TAVERNA et al., 1999), aumenta a condutância do potássio (HERRERO et al., 2002) e é um fraco inibidor das isoenzimas da anidrase carbônica CA-II e CA-IV que são encontradas em neurônios na periferia no organismo (DODGSON et al., 2000). Nos túbulos renais, a inibição destas isoenzimas da anidrase carbônica reduz a secreção do íon hidrogênio e aumenta a secreção de Na^+ , K^+ , HCO_3^- e água, aumentando assim a probabilidade de acidose e formação de cálculos renais (SHANK et al., 2000).

Johnson et al., (2005) propuseram um modelo neurofarmacológico pelo qual o topiramato pode diminuir o reforço positivo induzido pelo etanol e, conseqüentemente, a propensão para consumo. (Figura 5). Pesquisas têm demonstrado efeitos complexos do topiramato sobre o consumo de álcool em camundongos C57BL/6, nas quais altas doses (50 mg/Kg), porém não em baixas doses (1, 5 e 10 mg/Kg), o topiramato suprimiu o consumo de etanol após 2 horas da administração nos animais. Essa droga também diminui a preferência por sacarina, no entanto, a eficácia em suprimir o consumo de etanol foi associado com um aumento no consumo de água, sendo esse um mecanismo compensatório (GABRIEL ; CUNNINGHAM, 2005).

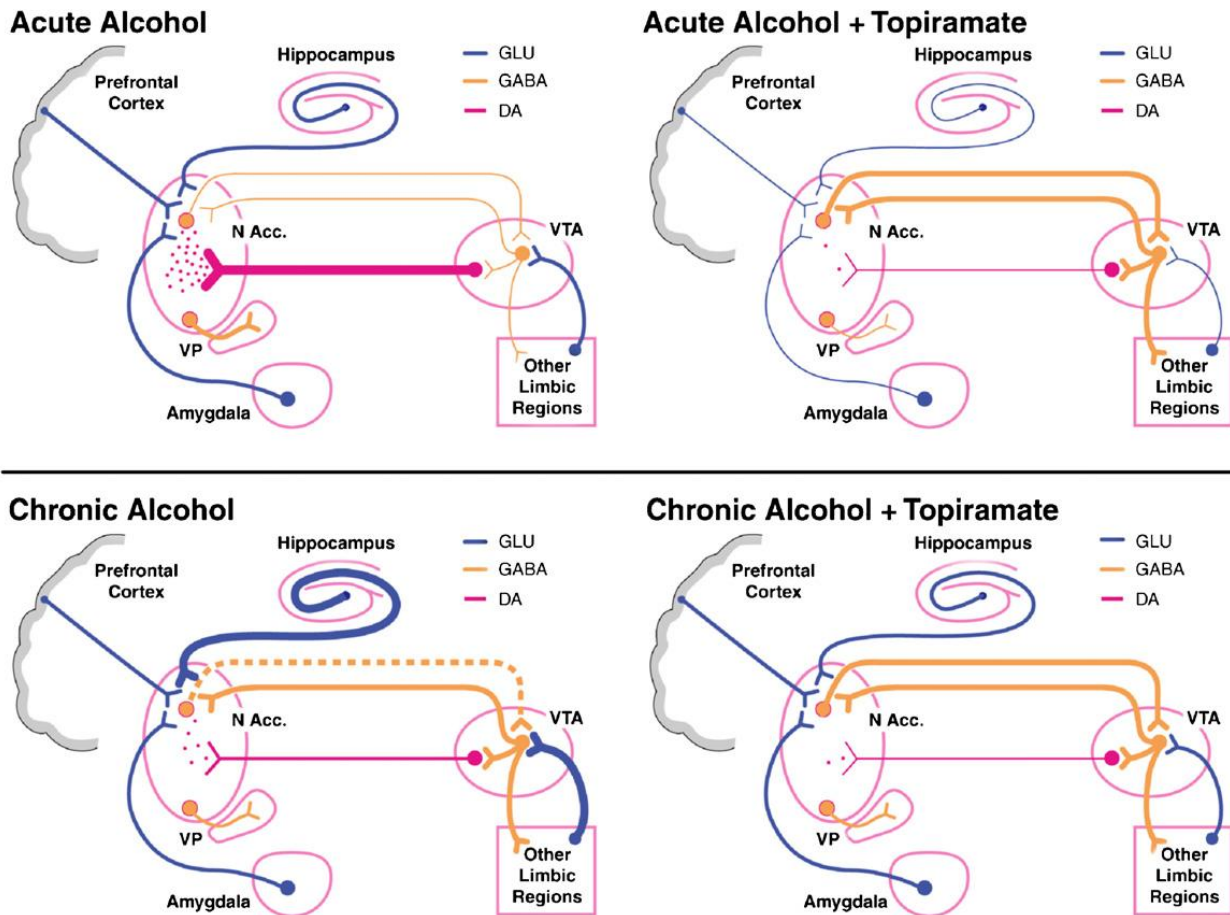


Figura 5. Ilustração sistemática da hipótese dos efeitos agudo e crônico do etanol, ambos com e sem topiramato, no circuito de recompensa mesocorticolímbico dopaminérgico.

(Esquema superior esquerdo) A administração aguda de etanol suprime a taxa de disparos de neurônios gabaérgicos da ATV o que leva a uma desinibição dos neurônios de DA que partem da ATV, aumentando a liberação de DA no NAcc. (Esquema inferior esquerdo) Com a administração crônica de álcool, os neurônios gabaérgicos da ATV permanecem hiperexcitados, principalmente por causa do aumento de entradas glutamatérgicas, aumentando a taxa de disparos desses neurônios de GABA. Com isso ocorre uma hipofunção nos neurônios de dopaminérgicos e uma diminuição na liberação de DA. (Esquema superior direito) Durante a administração aguda de etanol, a atividade neuronal predominante é o estado excitado dos neurônios de GABA da ATV. Com a inibição mediada pelo sistema gabaérgico e o bloqueio do sistema glutamatérgico, o topiramato “normaliza” a atividade gabaérgica na ATV. Embora isso possa, à primeira vista, sugerir um aumento nos níveis de DA no NAcc, isso não ocorre. É mais provável que ocorra uma redução na liberação de DA porque esses terminais dopaminérgicos são simultaneamente inibidos pela inibição mediada pelo GABA e pelo bloqueio glutamatérgico. No consumo crônico de etanol, o efeito antiglutamatérgico do topiramato predomina, assim como os efeitos nos canais de cálcio tipo L mediados por essa droga. Estas ações do topiramato levam a uma inibição dos neurônios de DA no

NAcc. O topiramato inibe concomitantemente os efeitos excitatórios de neurônios glutamatérgicos. Desse modo, o topiramato facilita e favorece a retirada do álcool em um alcoolista crônico, porque a liberação “rebote” de DA não ocorre, assim como facilitaria a prevenção de recaídas, pois os efeitos de reforço do etanol seriam reduzidos (As linhas contínuas representam a relação de intensidade de atividade neuronal (pesada, média e leve). As linhas tracejadas representam uma diminuição no tônus neuronal). Fonte: JOHNSON *et al.*, 2005.

Recentemente Johnson *et al.* (2003a) e Ma *et al.* (2006) demonstraram, em um estudo clínico duplo-cego randomizado, que o topiramato, na dose de 300 mg/dia, é eficaz em reduzir o *craving*, e melhorou a qualidade de vida dos indivíduos alcoolistas que receberam, durante 12 semanas, o tratamento com o topiramato.

Geralmente, o topiramato tem um perfil favorável quanto aos efeitos adversos, sendo os sintomas classificados como leves ou moderados. Os efeitos adversos mais comuns são parestesias, anorexia, dificuldade em memorização ou concentração e alteração do paladar. Um esquema posológico lento para atingir a dose limite (até 300 mg/dia) por 6-8 semanas é fundamental para minimizar os efeitos adversos e melhorar a tolerabilidade, no entanto, cerca de 10% dos indivíduos que tomam o topiramato podem enfrentar alguma dificuldade cognitiva, independentemente do esquema posológico (BITON *et al.*, 2001).

1.7.3 Drogas que atuam no sistema serotoninérgico

Por quase três décadas, houve um intenso interesse nos efeitos dos agentes serotoninérgicos no tratamento da dependência de álcool. Incentivados pelo aumento do conhecimento sobre os vários subtipos de receptores da serotonina (5-HT), os pesquisadores analisaram os efeitos de vários medicamentos que se ligam a sítios receptores específicos (JOHNSON, 2008).

Utilizando os modelos de preferência, os agentes farmacológicos que inibem a recaptção da 5-HT nas sinapses podem reduzir o consumo voluntário de etanol (NACHMAN *et al.*, 1970; MC BRIDE *et al.*, 1989). Camundongos *knockout* para o transportador de 5-HT, no entanto, apresentam uma diminuição geral tanto na preferência como no consumo de etanol (BOYCE-RUSTAY *et al.*, 2006). Desse modo, vários estudos pré-clínicos corroboram com a hipótese de que os inibidores seletivos da

recaptação de serotonina (ISRS) podem suprimir o consumo de etanol em animais (JOHNSON, 2008).

Estudos realizados com técnicas de condicionamento operante também têm demonstrado um papel dos ISRS na supressão do consumo de etanol. Haraguchi et al. (1990), mostraram que pré-tratamentos com fluoxetina reduziram, dose-dependente, as respostas na alavanca para receber o etanol. No entanto, enquanto a administração crônica de ISRS em camundongos machos C57BL/6J produziu uma supressão inicial nas respostas de pressionar a alavanca para receber o etanol, houve uma recuperação posterior aos níveis basais das respostas para o etanol e, conseqüentemente, para o consumo de etanol (GULLEY et al., 1995). Estes resultados são semelhantes aos de Murphy et al. (1988), que observaram que a fluoxetina administrada em ratos em uma infusão única diária produziu uma redução significativa nas pressões na alavanca para receber o reforço, que iniciou logo no primeiro dia de tratamento. Após a interrupção do tratamento com a fluoxetina, as respostas na alavanca retornaram aos níveis basais.

Apesar destes resultados pré-clínicos promissores, não há, atualmente, uma base segura que apóie a proposta de que os ISRSs são um tratamento eficaz para um grupo heterogêneo de indivíduos dependentes de álcool. Os estudos clínicos iniciais relataram que os ISRSs podem produzir a curto prazo (1-4 semanas) uma diminuição no consumo de álcool entre os alcoolistas. No entanto, estes estudos foram limitados por pelo menos três fatores (NARANJO et al., 1992). Primeiro, a maioria dos estudos foi realizada em homens, limitando a generalização dos resultados para a população em geral (NARANJO; Sellers, 1989). Segundo, o tratamento adjuvante psicossocial não foi padronizado. Isso pode diminuir a aparente eficácia da medicação terapêutica e também exercer um importante efeito sobre os resultados de consumo. Terceiro, os períodos de tratamento foram curtos, assim, não foi possível determinar se estes efeitos iniciais são devido a fatores não-específicos ou não. As limitações com estudos de curta duração que têm como foco doenças crônicas recidivantes, como é o caso da dependência do álcool, foram destaques em um estudo proposto mais tarde por Gorelick e Paredes (1992) que descobriram que havia também um efeito da fluoxetina, comparado com placebo, que diminuía o consumo de álcool em cerca de 15% nas

primeiras quatro semanas do experimento, porém tal efeito não era mantido durante todo tratamento.

Alguns estudos pré-clínicos têm sugerido que o agonista parcial dos receptores 5-HT_{1A}, buspirona, pode ser efetivo para reduzir o consumo de etanol em macacos (COLLINS; MYERS, 1987). Em ratos Sprague-Dawley, a buspirona reduziu significativamente o consumo de etanol em animais que foram induzidos a beber devido a injeções repetidas de tetrahidropapaverolina. Em um dos grupos de ratos, que tinha preferência média pelo etanol, doses baixas de buspirona (0,0025-0,63 mg/kg) reduziram, enquanto doses maiores (> 2,5 mg/kg) aumentaram o consumo de álcool, sem afetar o consumo de água (MEERT, 1993).

A buspirona não demonstrou ser um medicamento eficaz para o tratamento de pessoas dependentes de álcool, sem co-morbidades. Em estudos publicados, a buspirona não obteve efeitos convincentes em alcoolistas que não expressavam co-morbidades; no entanto, as pessoas dependentes que tinham quadros com algum distúrbio co-mórbido, como por exemplo, a ansiedade, a buspirona apresentou algum benefício (MALEC et al., 1996).

Pesquisas sugerem que o antagonista dos receptores 5-HT₂, ritanserina, pode reduzir o consumo de etanol em animais (SVENSSON et al., 1993). Além disso, os antagonistas 5-HT₂, amperozida (MYERS; LANKFORD, 1996) e FG5974 (Roberts et al., 1998), demonstraram eficácia em suprimir, significativamente, o consumo de etanol sem afetar o consumo de água. O mecanismo exato pelo qual os antagonistas dos receptores 5-HT₂ podem reduzir o consumo de etanol não está bem compreendido. No entanto, foi sugerido que essas drogas possam exercer seus efeitos substituindo os efeitos farmacocomportamentais do álcool, facilitando os disparos do neurônios de DA da região mesocorticolímbica, ou pela supressão da neurotransmissão da DA após a administração crônica das drogas (UGEDO et al., 1989).

Resultados recentes corroboram com o papel do receptor 5-HT₃ na mediação de importantes efeitos neuroquímicos do álcool, e os antagonistas dos receptores 5-HT₃ podem ser promissores para o tratamento de dependência de álcool. Os antagonistas dos receptores 5-HT₃ possuem três efeitos principais que demonstram sua capacidade de modular o consumo de etanol e comportamentos relacionados. O

primeiro, é que os antagonistas dos receptores 5-HT₃ demonstraram eficácia em reduzir a hiperlocomoção induzida pela DA ou injeções de etanol intra NAcc (BRADBURY et al., 1985). Segundo, os antagonistas dos receptores 5-HT₃ foram capazes de inibir a DiMe-C7 (uma neurocinina) induzida na hiperlocomoção, a qual também é inibida pelo antagonista dopaminérgico flufenazina (HAGAN et al., 1990). Terceiro, estes antagonistas reduzem o consumo de etanol em vários modelos animais e em espécies diferentes (JOHNSON, 2008). Estudos com humanos revelaram um papel eficaz do antagonista 5-HT₃, ondansetrona, em reduzir o *craving* e a preferência dos pacientes ao etanol. Em duas pesquisas distintas, Johnson e Cowen (1993) e Johnson et al. (1993), mostraram que o tratamento prévio dos pacientes com ondansetrona reduziram os efeitos subjetivos positivos induzidos pelo etanol (incluindo o desejo de consumir o etanol). Swift et al. (1996), utilizaram doses muito maiores de etanol e ondansetrona, e também observaram que a ondansetrona, quando comparada com placebo, num esquema de pré-tratamento, diminuiu a preferência dos pacientes pelo álcool, no entanto, foi observada uma interação de ambos os efeitos estimulante e sedativo entre a ondansetrona e o álcool.

1.7.4 Drogas que atuam no sistema dopaminérgico

A via dopaminérgica mesocorticolímbica tem sido apontada como a principal via pela qual o álcool e outras drogas de abuso expressam seus efeitos reforçadores (KOOB, 1992b), como já enfatizado nas sessões anteriores desta dissertação. No entanto, tem sido difícil provar que os antagonistas dos receptores da DA têm um papel direto no tratamento da dependência de álcool. Presumivelmente, oposição direta das vias dopaminérgicas está associada a alterações neuroadaptativas que tendem a reverter os efeitos iniciais do bloqueio (JOHNSON, 2005). Nenhum bloqueador de receptor de DA tradicional tem demonstrado ser um tratamento eficaz para a dependência do álcool. Com o advento dos neurolépticos atípicos, tem havido um interesse intenso em testar esses medicamentos para avaliar seu papel como um potencial tratamento para a dependência do álcool. Desse modo, medicações, como o aripiprazol e a quetiapina

estão atualmente em ensaios clínicos e os resultados são aguardados ansiosamente (JOHNSON, 2008).

1.7.5 Dissulfiram

Dissulfiram é um medicamento aprovado pela FDA que tem sido utilizado para tratar o alcoolismo desde a década de 1940 e talvez ainda seja o mais amplamente utilizado em países como os Estados Unidos atualmente. Seu modo principal de ação é como um agente aversivo. O dissulfiram inibe a aldeído desidrogenase e impede o metabolismo do metabólito primário do álcool, o acetaldeído. Por sua vez, o acúmulo de acetaldeído no sangue provoca efeitos desagradáveis quando o álcool é ingerido, que incluem sudorese, cefaléia, dispnéia, diminuição da pressão arterial, rubor, hiperatividade simpática, palpitações, náuseas e vômitos. A associação desses sintomas com a bebida desestimula o consumo do álcool (AIT-DAOUT; JOHNSON, 2003). Os efeitos secundários sérios também têm sido relatados, incluindo hepatite, hepatotoxicidade, depressão e reações psicóticas (O'SHEA, 2000). O dissulfiram também tem demonstrado inibir a síntese de noradrenalina através do bloqueio da enzima DA beta-hidroxilase, um mecanismo de ação que foi proposto para corroborar os primeiros relatos de sua eficácia potencial como um tratamento para dependência de cocaína (PETRAKIS et al., 2000).

O dissulfiram não possui efeito significativo na compulsão pelo álcool. Assim, os pacientes devem ser motivados para manter o tratamento com o dissulfiram, caso contrário aqueles que desejam beber podem simplesmente parar de tomar a medicação (CARROLL et al., 2004).

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. Em estudo desenvolvido em nosso laboratório, com animais submetidos ao modelo de auto-administração de álcool por livre escolha, houve hiperexpressão de receptores de GABA tipo B. Estudos com humanos, nos quais foram utilizados agonistas GABA-B para reverter a sensibilização induzida por álcool, evidenciam a importância do estudo com o baclofeno, um agonista seletivo do receptor GABAB, num modelo de adição por álcool. Estudos demonstraram que o etanol pode agir em receptores GABAB pré-sinápticos para modular a potencialização global do etanol no SNC, sendo mais um dos motivos para investigar a importância do uso de agonistas GABAB na adição por etanol.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito de um agonista do receptor gabaérgico tipo B, o baclofeno, sobre o consumo de etanol em animais que perderam o controle sobre esse consumo.

3.2. Objetivos Específicos

Caracterizar os diferentes padrões de consumo de etanol.

Avaliar o efeito do baclofeno em camundongos com diferentes perfis de consumo num modelo de adição ao etanol

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 130 camundongos machos Swiss adultos provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Uma curva dose-resposta foi desenvolvida para determinar as doses de baclofeno que seriam utilizadas neste estudo. Durante os experimentos da curva dose-resposta os animais foram agrupados 20 por gaiola (50X30X15 cm) sendo todos mantidos em sala com temperatura controlada de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob ciclo claro-escuro de 12 horas e alimentação *ad libitum*. Para o desenvolvimento do modelo de adição e posterior tratamento com baclofeno foram utilizados 70 camundongos que permaneceram isolados em gaiolas de plástico medindo 20x30x20 cm sendo todos mantidos em sala com temperatura controlada de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob ciclo claro-escuro de 12 horas e alimentação *ad libitum*.

4.2 Aparelhos e Procedimentos

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é construído em madeira e pintado com tinta óleo cor preta, elevado 50 cm do piso, apresentando dois braços abertos e opostos medindo 50x10 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. 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. Durante esse tempo o número e o tempo de entradas nos braços abertos e fechados foram registrados. Foi considerada uma entrada a partir do momento em que o animal colocou as quatro patas em um dos braços do labirinto. A partir dessas variáveis, porcentagem de tempo no braço aberto foi calculada.

O Campo aberto (CA) é construído com piso de madeira e paredes de aço escovado com 50 cm de altura delimitando uma área circular de 50 cm de diâmetro

sendo o assoalho pintado de branco, subdividido com linhas pretas traçadas através de dois círculos concêntricos com várias linhas radiais formando figuras semelhante a trapézios com aproximadamente 100 cm² de área. 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 números de “trapézios” invadidos (ambulação), *rearing* (número de vezes que o animal se mantinha nas patas traseiras), tempo parado, *grooming* (tempo que o animal executava comportamento de auto-limpeza), tempo de latência para o animal abandonar o centro da arena.

A Caixa de Movimentação Espontânea (CME) é 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 *grooming* (auto-limpeza) e o tempo que o animal permanecia parado no decorrer do teste, assim como, o número de *rearing* (posição que o animal assume permanecendo nas patas posteriores).

4.3 Drogas

No tratamento dos camundongos por livre escolha foi utilizado álcool etílico P.A. a 98,3% (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 cloridrato 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). O baclofeno foi diluído em solução salina e administrado por via intraperitonal nas doses de 1,25; 2,5 e 5,0 mg/Kg.

4.4 Procedimentos Experimentais

4.4.1 Curva Dose-Resposta

Cinquenta camundongos ingênuos foram tratados agudamente com diferentes doses de baclofeno (0,65; 1,25; 2,5; 5,0 e 10,0 mg/kg) e após 30 minutos foram expostos aos testes LCE, CME e CA, 3 minutos em cada. Outros 10 animais receberam salina e foram expostos aos mesmos procedimentos.

4.4.2 Avaliação comportamental basal

Setenta camundongos ingênuos, que seriam utilizados no modelo de livre escolha, foram ambientados por 5 dias, passando então, por uma avaliação basal antes do início do modelo de adição por 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 tratamento por livre escolha.

4.4.3 Experimento 1: Modelo de adição por auto-administração por livre escolha

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

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

Em seguida, durante 2 semanas os animais foram submetidos a um esquema de ciclos de abstinência seguidos por ciclos de reapresentação do etanol, a fim de aumentar sua motivação para procurar o álcool (“alcohol deprivation effect” ADE). Os animais tiveram 4 ciclos de 2 dias cada sem álcool e 3 ciclos de 2 dias cada com álcool. No primeiro e último ciclos desta fase, 5 horas após a retirada das soluções de etanol, foram realizadas avaliações comportamentais, seguindo o mesmo procedimento já descrito, nos testes do LCE, CME e CA. O grupo controle também passou pelos testes comportamentais novamente. Após a avaliação comportamental os animais retornaram às gaiolas-casas.

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

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

Após todo o procedimento de livre escolha, os 60 animais expostos ao etanol foram classificados em grupos: adicto, pesado e leve, de acordo com critérios estabelecidos em estudos anteriores do nosso laboratório.

Os critérios utilizados para a caracterização individual e a classificação em um dos 3 grupos consideravam o padrão individual de consumo de etanol e água nas diferentes fases, que estão sumarizados a seguir:

Consumidor adicto:

- Preferência pela solução etílica ou sem preferência durante AC.
- Sem redução significativa do consumo de etanol total na fase de adulteração comparado com o da aquisição.

Consumidor pesado:

- Preferência pela solução etílica ou sem preferência durante AC.
- Com redução significativa no consumo de etanol durante a adulteração quando comparado com o da aquisição.

Consumidor não-adicto leve:

- Preferência pela água em todas as fases.
- Consumo de etanol constante ao longo de todas as fases.

4.4.4 Cálculo da quantidade de álcool consumido em g/kg/dia

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

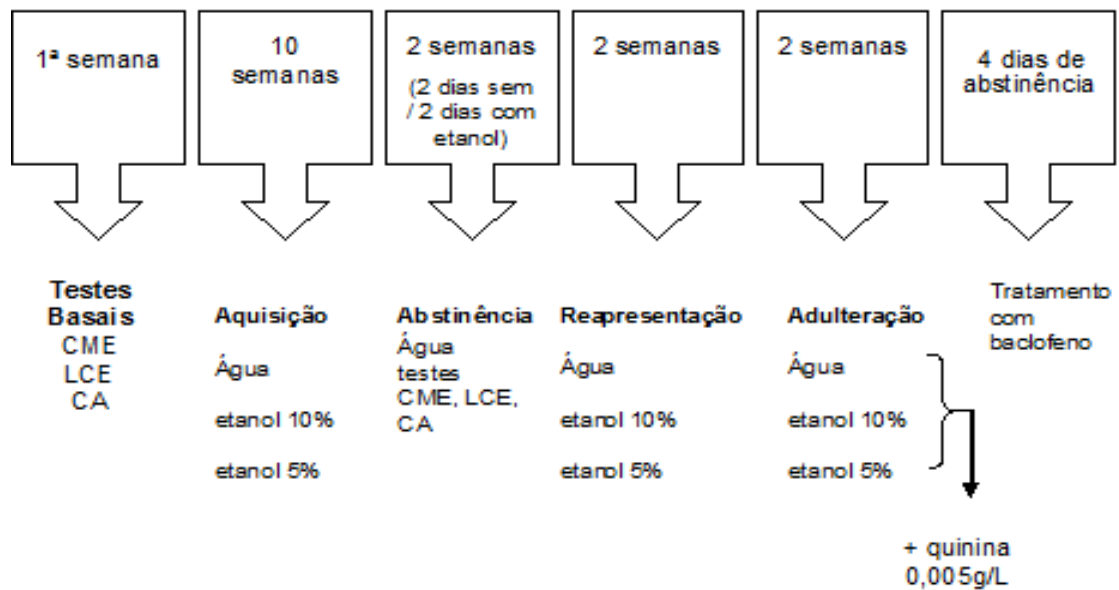
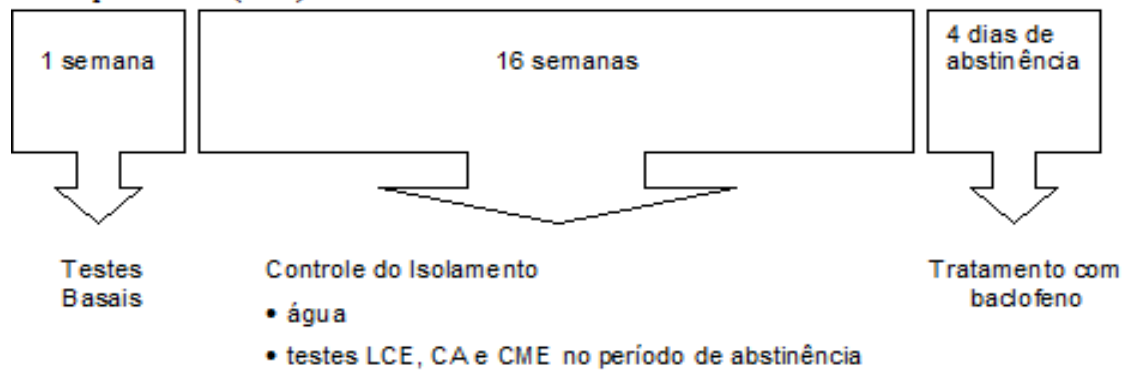
$$Q \text{ (g/kg/dia)} = (V10\% \times 0,075 + V5\% \times 0,0375) / P \times 1000$$

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

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

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

P = peso do animal, em gramas, avaliado semanalmente

Grupo Etanol (n=60)**Grupo Controle (n=10)****Figura 6.** Diagrama do procedimento experimental geral

4.4.5 Experimento 2: Tratamento com baclofeno

Após o último dia da fase de adulteração, os animais classificados no Experimento 1 (groups A, H e L) foram distribuídos aleatoriamente para receber somente salina (grupos salina) ou as 3 doses de baclofeno (B1: 1,25 mg/kg; B2: 2,5 mg/kg e B3: 5,0 mg/kg) intercaladas com salina (B0: salina). Cada animal recebeu todas as doses de baclofeno e salina, utilizando o método de distribuição por quadrado latino. Os animais de cada grupo designados para receber somente salina foram submetidos às mesmas condições e ao mesmo esquema experimental dos tratados com baclofeno. Inicialmente, os animais foram submetidos a 4 dias de abstinência, com acesso somente à água. No dia seguinte foi realizada a primeira das quatro sessões de injeção administradas por dois dias consecutivos. Entre cada dose administrada houve um intervalo de 4 dias sem a apresentação das soluções de etanol.

Os 10 animais do grupo controle também receberam todas as doses de baclofeno, seguindo o mesmo esquema dos grupos A, H e L, sendo que continuaram com acesso somente à água (controle do consumo de líquido).

O acesso às soluções de etanol e água (livre escolha) foi permitido 30 minutos após a injeção de baclofeno ou salina. O consumo foi quantificado 90 minutos e 24 horas após o acesso às soluções.

Abs	abs	abs	Abs	1ª inj	1ª inj	abs	abs	abs	2ª inj	2ª inj
Abs	abs	abs	Abs	3ª inj	3ª inj	abs	abs	abs	4ª inj	4ª inj

abs: dias em que os animais permanecerão sem acesso ao etanol

inj.: administrações de baclofeno em esquema de quadrado latino

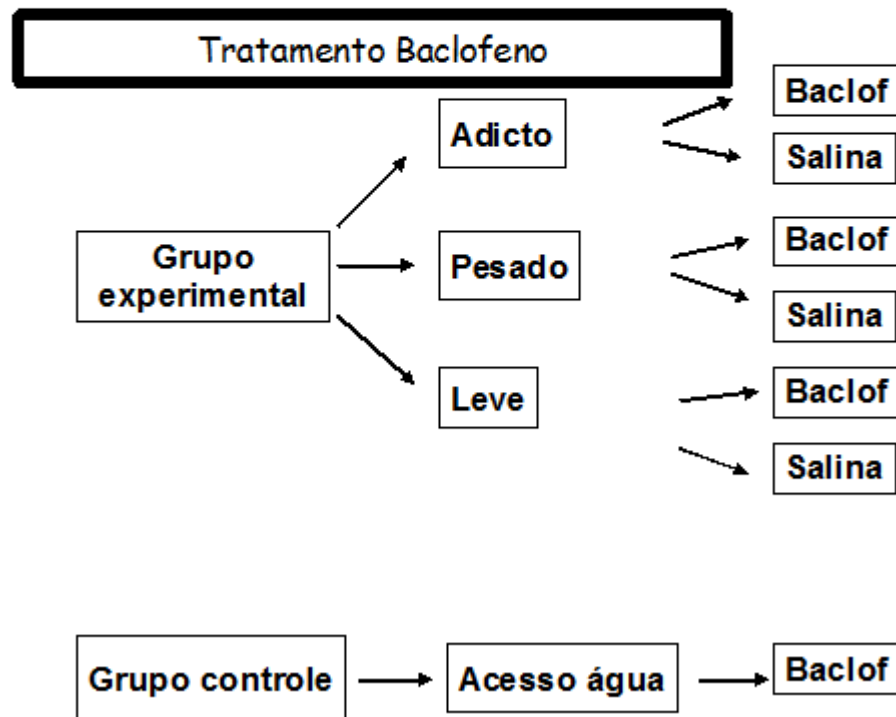


Figura 7. Diagrama do Procedimento experimental na fase de tratamento

4.4.6 Análises Estatísticas

Todas as medidas obtidas nos procedimentos experimentais foram testadas quanto à homogeneidade da variância e normalidade da distribuição. Como as medidas não apresentaram distribuição normal foram analisadas pelos testes não paramétricos de Kruskal Wallis para comparações entre os grupos independentes, e pelo teste de

Friedman para comparações dentro do mesmo grupo ao longo do tempo (tanto para os dados do Experimento 1 como do 2). Após as análises de variância não paramétricas empregou-se o teste de comparações múltiplas. Em todas as comparações se considerou $p < 0,05$, e foi empregado o programa Statsoft 6.1.

5. RESULTADOS - ARTIGO

Baclofen reduced alcohol consumption in “heavy-drinker” but not “addicted” mice

Gustavo Roberto Villas Boas^a, Camila Gadens Zamboni^a, Murilo Peretti^a, Diego Correia^a, Roseli Boerngen-Lacerda^{*a}

^aDepartment of Pharmacology, Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, Curitiba, Paraná, CEP 81531-990; Brazil

Correspondence and reprint requests to: Roseli Boerngen-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

Abstract

Several studies have shown that baclofen, a γ -aminobutyric acid-B (GABA_B) receptor agonist, reduces ethanol intake in animals and humans, but others have shown the contrary. A previous study conducted in our laboratory demonstrated that mice characterized as “addicted” in a three-bottle free-choice paradigm, which allows the

study of the loss of control over alcohol intake, had different *Gabbr1* and *Gabbr2* transcription levels, which express the GABA_{B1} and GABA_{B2} subunits, respectively, in brain areas related to addictive behavior. In the present study, we tested whether “addicted” mice exhibit differential ethanol consumption in response to baclofen treatment. Sixty adult male Swiss mice were individually housed and offered ethanol (5% and 10%) and water orally in a free-choice paradigm that consisted of four phases: acquisition, withdrawal, reexposure, and adulteration. Control mice (n=10) had access only to water. Mice were characterized as “addicted” (A), heavy (H), and light (L) drinkers. After the classification, the three groups of mice were divided into two subgroups that received intraperitoneal injections of baclofen (0, 1.25, 2.5, and 5.0 mg/kg) or saline. The control group received all doses of baclofen and had access only to water. Thirty minutes later, ethanol and water were offered. Fluid consumption was measured for 90 min and 24 h after the injection. Baclofen reduced ethanol intake only in group H. The “addicted” mice, even after baclofen treatment, continued to exhibit a “loss of control” over ethanol intake. Activation of the GABA_B receptor is necessary for the precise balance between the GABA_{B1} and GABA_{B2} subunits, so the disproportionate transcription levels observed in “addicted” mice could account for this lack of response to baclofen treatment. These data suggest that baclofen may only be a useful treatment in individuals who have not lost their control over ethanol intake.

Keywords: addiction; baclofen; ethanol; free-choice paradigm; GABA_B receptor; mice.

1. Introduction

The modulatory role of the γ -aminobutyric acid (GABA) system, mainly GABA_B receptors, has recently been demonstrated in the rewarding properties of different drugs of abuse. Numerous observations indicate that the tonic activation of GABA_B receptors abolishes the rewarding effects of morphine and cocaine (Brebner et al., 2002; Malgorzata et al., 2007). Indeed, selective antagonists of these receptors did not alter the dose range of intravenously cocaine self-administered or the expression of morphine-induced place preference (Tsuji et al., 1996). The rewarding and locomotor effects of several drugs of abuse are strongly related to increased dopamine concentrations in the nucleus accumbens (Koob and Bloom, 1988). However, systemic administration of baclofen, a selective GABA_B receptor agonist, decreased nucleus accumbens dopamine efflux in rats trained to self-administer amphetamine (Brebner et al., 2005). The proposed mechanism underlying the inhibition of dopaminergic activity could involve the stimulation of GABA_B receptors located on cell bodies in ventral tegmental area (VTA) dopamine neurons that project to the nucleus accumbens (Liang et al., 2000).

Numerous preclinical and clinical studies have demonstrated that GABA_B receptor agonists suppress alcohol-related behaviors. For example, in rats, baclofen inhibited the acquisition of ethanol consumption, decreased alcohol-induced craving and withdrawal symptoms (such as anxiety), promoted abstinence, increased ethanol intake in a drinking-in-the-dark procedure, and reduced ethanol consumption in Sardinian alcohol-preferring rats (Addolorato et al., 2000, 2002; Bechtholt and Cunningham, 2005; Colombo et al., 2000, 2002, 2003a; Knapp et al., 2007; Heilig and Egli, 2006; Maccioni

et al., 2005, 2008; Moore et al., 2007; Walker and Koob, 2007). However, although most data have shown that baclofen suppresses ethanol self-administration, few studies have reported that specific doses of baclofen increased ethanol self-administration (Czachowski et al., 2006; Petry, 1997; Smith et al., 1992, 1999) and binge drinking in the drinking-in-the-dark procedure (Moore et al., 2007).

In a study conducted in our laboratory, we found that the genes that encode the GABA_{B1} and GABA_{B2} subunits (*Gabbr1* and *Gabbr2*, respectively) were differentially expressed in mice that exhibit an addiction-like profile in a three-bottle free-choice paradigm (Ribeiro et al., 2010a, b). *Gabbr1* and *Gabbr2* transcription levels were altered in cerebral areas related to drug taking and drug seeking (Kalivas and Volkow, 2005; Everitt and Robbins, 2005) only in mice behaviorally classified as “addicted,” suggesting that these genes may contribute to ethanol addiction.

Considering that (i) GABA_B receptors appear to be involved in ethanol addiction, (ii) some discrepancies have been reported in the literature concerning the relationship between GABA_B receptors and ethanol self-administration, (iii) our demonstration of the differences in *Gabbr1* and *Gabbr2* transcription levels in mice with different alcohol intake phenotypes, and (iv) our validated alcohol consumption model provides an alternative approach to the study of addictive behaviors, the present study investigated the effect of baclofen treatment on ethanol consumption in mice with different intake profiles.

2. Material and methods

2.1. 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/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 (process no. 23075.105451/2009-19; approved November 10, 2009).

2.2. Apparatus and procedure

The elevated plus maze was constructed of black painted wood and arranged in a plus shape with two open arms that faced each other. Walls (40 cm high) enclosed the other two arms. The arms measured 5 × 30 cm and were raised 50 cm above the floor. One red lamp was placed above the maze. At the beginning of a trial, the mouse was placed in the center of the maze facing one of the open arms and allowed to explore the maze for 3 min. During this period, the number of entries into and time spent on the open and closed arms were recorded. A mouse was considered to have visited the arm when all four paws were on that arm. From these variables, percent open arm time (%OT) was calculated as $100 \times \text{time spent on open arms}/180$. Indeed, the elevated plus maze is one of the most widely used animal models of anxiety-related behavior. Based on the results of our previous study (Boerngen-Lacerda and Souza-Formigoni, 2000), we chose %OT as an index of fear/anxiety-like behavior to study the anxiolytic-like

effects of ethanol. The maze was carefully wiped with a damp cloth after each animal's test. The tests were performed in the afternoon between 12:00 and 18:00 h.

All mice were exposed in a drug-free condition to the plus maze on three occasions: 1 week before the beginning of chronic ethanol self-administration and 5 h after ethanol withdrawal in the W1 and W3 cycles of the W phase (see below for descriptions).

2.3. Drugs

Ethanol solutions (10% and 5%, v/v) were prepared for oral administration by diluting ethanol P.A. (Vetec Laboratories, Bronx, NY, USA) with tap water every other day (to control for ethanol evaporation). Adulterated ethanol solutions were prepared with 0.005 g/l of quinine hydrochloride. Baclofen hydrochloride solutions (RBI, Natick, MA, USA) were prepared for intraperitoneal administration by diluting with saline (0.1 ml/10 g).

2.4. Procedures

2.4.1. Experiment 1: Chronic ethanol self-administration

A group of mice ($n = 60$) was exposed to a free-choice treatment for 10 weeks (acquisition phase, AC), during which they had free access to 10% and 5% (v/v) ethanol 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, mice were submitted to four cycles of ethanol withdrawal, consisting of 2 days with free access to ethanol solutions and water and the next 2 days with access only to tap water (withdrawal phase, W1, W2, W3).

Approximately 5 h after ethanol withdrawal, during the first and last cycles, the animals were subjected, in a drug-free condition, to the elevated plus maze and open field test to measure anxiety-like behavior. For the following 2 weeks, the ethanol solutions were again offered to establish a free choice among the ethanol solutions and water (reexposure phase, RE). At the end of this period, the ethanol solutions were adulterated with 0.005 g/l quinine to create a bitter-tasting solution and offered to the animals for a further 2 week period (adulteration phase, AD). The experimental design is summarized in Fig. 1. The quinine concentration was chosen because a previous dose-response analysis found that 0.005 g/l significantly reduced quinine solution intake without causing a total inhibition of responding (Fachin-Scheit et al., 2006). At the end of this experiment, the mice were allocated to groups based on the following ethanol consumption profiles: addicted (A; significant preference for ethanol during all phases and maintenance of ethanol consumption [i.e., no significant decrease] during the AD phase); heavy (H; significant preference for ethanol during the AC phase and a significant decrease in ethanol consumption and preference for water during the AD phase); light (L; significant preference for water during all phases). The animals that did not conform to any of these patterns were excluded from subsequent analyses.

2.4.2. Experiment 2: Baclofen treatment

After the classification of mice, they were randomly divided in two groups: (1) baclofen group (each animal received i.p. injections of all doses of baclofen: B0 = 0 mg/kg [i.e., the animals received saline to control intra-group variability during baclofen treatment], B1 = 1.25 mg/kg, B2 = 2.5 mg/kg, B3 = 5.0 mg/kg); (2) saline group (S; each animal from all groups received i.p. saline injections during all phases of the

experiment). After the last day of the AD phase, the animals spent 4 days in abstinence, with access only to water. The first injection session was performed on the following 2 days. Animals assigned to the baclofen group received all baclofen doses, and saline injection (B0) was interspersed between the other doses using a Latin square design. Each dose was administered twice on 2 consecutive days, with an interval of 4 days between doses, during which the animals had access only to water. The saline-treated mice (S) were subjected to the same conditions and the same experimental design as the baclofen-treated groups. Access to the solutions of ethanol and water (free-choice) was allowed 30 min after the injection of baclofen or saline. Ethanol and water consumption were then quantified for 90 min (because baclofen is short-acting; Brebner et al., 2002; Shoaib et al., 1998) and 24 h. The 10 animals from the control group were designated to receive the same doses of baclofen and continued to have access only to water as a control for liquid consumption (control group).

2.5. Statistical analysis

Data were analyzed for distribution normality using the Kolmogorov-Smirnov test and homogeneity of variance using Levene's test. Body weight in grams and ethanol intake in milliliters were used to compute the grams of ethanol intake per kilogram of body weight (g/kg). Ethanol and water consumption were expressed as the daily median and lower and upper quartiles. To classify each mouse according to its ethanol intake pattern, we performed a Friedman analysis with repeated measures followed by the multiple comparison test for each animal to compare individual consumption throughout the self-administration phases by considering the daily consumption for each phase (i.e., 20 measures in the AC phase, nine measures in the RE phase, and 10 measures in the

AD phase). We also performed the Mann Whitney test to determine the preference between water and total ethanol intake (ml) for each phase for each mouse. After the classification of mice into three groups (A, H, and L), the following analyses were performed. The Kruskal Wallis test followed by the multiple comparison test was used to compare the groups for the variable %OT in the plus maze obtained during the W1 and W3 cycles compared with basal indices. Kruskal Wallis and Friedman analyses followed by the multiple comparison test were used to compare, respectively, the groups and phases for water and ethanol consumption. Additionally, the Kruskal Wallis test followed by the multiple comparison test was used to compare groups and baclofen doses for ethanol and water consumption during the baclofen treatment period. All analyses were performed using Statistica 6.1 software (StatSoft, Sao Caetano do Sul, Brazil). Differences were considered significant at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Experiment 1: Chronic ethanol self-administration procedure

3.1.1. Group classification based on individual consumption

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 the classification of the mice into three groups: addicted (A, $n = 15$), heavy (H, $n = 16$), and light (L, $n = 20$). Additionally, four mice died and six did not conform to the criteria for classification. Therefore, these mice were excluded from the subsequent analyses (for a more detailed description of the classification procedure, see Fachin-Scheit et al., 2006). For illustration, three examples of each consumption profile are shown in Fig. 2 (2A: “addicted” mouse; 2B: “heavy-drinker” mouse; 2C: “light-drinker” mouse).

3.1.2. Intergroup consumption analysis

Fig. 3 shows the ethanol and water consumption during each phase for each group. The Friedman analysis of variance (ANOVA) performed for ethanol consumption in each group revealed a statistically reliable main effect of phase ($\chi^2_{A(5,15)} = 49.40, p < 0.00001$; $\chi^2_{H(5,16)} = 69.28, p < 0.00001$; $\chi^2_{L(5,21)} = 92.48, p < 0.00001$). The multiple comparison analysis showed that group A maintained the same pattern of ethanol consumption during the AC and AD phases ($p > 0.05$), whereas groups H and L decreased their ethanol consumption in the AD phase compared with the AC phase ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively). In the first withdrawal phase cycle (W1), groups A and H maintained the same pattern of ethanol consumption as the AC phase ($p > 0.05$), whereas group L increased its consumption ($p < 0.001$). In the second and third withdrawal cycles (W2 and W3) and in the RE phase, all groups showed increased ethanol consumption compared with the AC phase ($p < 0.001$). Increased ethanol consumption was also observed in the W2 cycle compared with the W3 and W1 cycles in all groups ($p < 0.001$).

The Kruskal Wallis ANOVA performed for ethanol consumption in each phase revealed a statistically reliable main effect of group, with the exception of the W2 cycle (AC: $H_{2,52} = 30.05, p = 0.00001$; W1: $H_{2,52} = 10.60, p = 0.005$; W2: $H_{2,52} = 4.82, p = 0.09$; W3: $H_{2,52} = 23.17, p = 0.00001$; RE: $H_{2,52} = 9.60, p = 0.01$; AD: $H_{2,52} = 35.56, p = 0.00001$). The multiple comparison analysis showed that groups A and H consumed more ethanol than group L in the AC phase ($p < 0.00002$), W1 cycle ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively), W3 cycle ($p < 0.00001$ and $p < 0.005$, respectively), RE phase ($p <$

0.02 and $p = 0.06$, respectively), and AD phase ($p < 0.0000001$ and $p < 0.01$, respectively). Group A consumed more ethanol than group H in the AD phase ($p < 0.02$).

The Friedman ANOVA performed for water consumption revealed a statistically reliable main effect of phase ($\chi^2_{A(6,15)} = 52.31$, $p < 0.00001$; $\chi^2_{H(6,16)} = 62.45$, $p < 0.00001$; $\chi^2_{L(6,21)} = 67.07$, $p < 0.00001$; $\chi^2_{C(6,9)} = 28.69$, $p < 0.0001$). The *post hoc* analysis showed that group A maintained the same pattern of water consumption during the AC and AD phases and W1 cycle ($p > 0.05$) but increased its water consumption during the W2 and W3 cycles ($p < 0.001$) and RE phase ($p < 0.04$). Group H increased its water intake during the AD and RE phases and W1 ($p < 0.02$), W2 ($p < 0.001$), and W3 ($p < 0.001$) cycles. Group L increased its water consumption only during the W2 and W3 cycles ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively). As expected, all groups increased their water intake when only water was offered (WW).

The Kruskal Wallis ANOVA performed for water consumption in each phase revealed a statistically reliable main effect of group, with the exception of the W2 cycle, W3 cycle, and WW phase (AC: $H_{2,52} = 16.42$, $p = 0.0003$; W1: $H_{2,52} = 10.34$, $p = 0.006$; W2: $H_{2,52} = 1.57$, $p = 0.46$; W3: $H_{2,52} = 5.71$, $p = 0.06$; RE: $H_{2,52} = 6.29$, $p = 0.05$; AD: $H_{2,52} = 6.80$, $p = 0.04$; WW: $H_{2,52} = 1.10$, $p = 0.58$). The multiple comparison analysis showed that group L consumed more water than groups A and H in the AC phase ($p < 0.005$) and more than group A in the AD phase and W1 cycle ($p < 0.03$ and $p < 0.005$, respectively). No differences among groups were observed when only water was offered (WW).

3.1.3. Intergroup behavioral analysis

The elevated plus maze test was performed on three occasions: 1 week before the free-choice model, 5 h after ethanol withdrawal on the first day of the withdrawal phase (W1), and 5 h after ethanol withdrawal during the last withdrawal cycle (W3). For the evaluation performed before the free-choice paradigm, the Kruskal Wallis test performed for %OT revealed a small effect of group, although this effect was not significant ($H_{3,60} = 7.43$, $p = 0.06$). We observed some intergroup variance in this basal evaluation (i.e., groups A and H were slightly less “anxious” than group L and the control groups). Therefore, we considered the difference between this evaluation and the other two evaluations performed during the withdrawal phase for the following analyses (Fig. 4).

For the first (W1) and second (W3) assessments performed 5 h after the discontinuation of ethanol, the Kruskal Wallis test revealed no significant effect of group ($H_{3,60} = 2.66$, $p = 0.45$; $H_{3,60} = 0.89$, $p = 0.83$; respectively). However, the comparison between the two occasions for each group showed a reduction in %OT in the second evaluation, which reached significance for group H ($p < 0.002$), whereas for groups A and L and the control group, no significance was observed ($p = 0.08$, $p = 0.20$, $p = 0.29$, respectively).

3.2. Experiment 2: Baclofen treatment

3.2.1. Ethanol consumption during 24 h period after baclofen administration

Table 1 shows that only group H significantly reduced its ethanol intake with the 1.25 mg/kg baclofen dose compared with the AC phase and the 2.5 mg/kg dose. For the other two doses, group H returned to its consumption profile exhibited during the AC

phase. Group A maintained its consumption profile during all phases and after all doses of baclofen treatment. Group L showed no significant changes in ethanol consumption after all doses of baclofen treatment. Thus, groups A and L maintained their consumption profiles even under baclofen treatment. Indeed, the reduced intake observed in group L compared with group A when they were treated with 1.25 mg/kg baclofen also suggested the maintenance of the consumption profile, similar to the AC and AD phases and saline-treated mice. No difference was observed when groups A and H were compared, with the exception of the AD phase when group H reduced its ethanol consumption, which was the main criterion used to differentiate and classify these two groups. When we considered the three groups with saline treatment (nearly half of each group), we found that groups A and H returned to their ethanol intake patterns exhibited in the AC phase, but group L increased its ethanol consumption, suggesting an “alcohol deprivation effect” (ADE).

We also analyzed the effects of baclofen in all mice (i.e., considering groups A, H, and L together; last line of Table 1) to verify whether a robust pharmacological effect of baclofen would appear. However, the individual differences among groups compensated for each other, and no differences were observed in either analysis (i.e., Friedman analysis that compared ethanol consumption among phases in baclofen-treated mice; Kruskal Wallis analysis that compared saline-treated mice to baclofen-treated mice).

Moreover, no difference was detected in ethanol consumption in the AC and AD phases when each baclofen-treated group was compared with each respective saline-treated group, suggesting that the random distribution of the mice to these two subgroups guaranteed homogeneity (Mann Whitney test, $p > 0.05$).

3.2.2. Water consumption during 24 h period after baclofen administration

We also evaluated water consumption after baclofen treatment to verify whether its effect would be specific to ethanol consumption. Fig. 5 shows that none of the groups exhibited significant changes in water consumption (ml/day) with the different doses of baclofen ($H_{A(3,72)} = 0.17$, $p = 0.98$; $H_{H(3,48)} = 4.75$, $p = 0.19$; $H_{L(3,64)} = 2.88$, $p = 0.41$; $H_{C(3,32)} = 7.27$, $p = 0.06$). No significant differences among groups were observed for each of the doses (1.25 mg/kg [B1]: $H_{2,46} = 1.15$, $p = 0.56$; 2.5 mg/kg [B2]: $H_{2,46} = 0.64$, $p = 0.72$; 5.0 mg/kg [B3]: $H_{2,46} = 1.05$, $p = 0.59$; saline [B0]: $H_{2,46} = 1.29$, $p = 0.52$). The Fig. 5 inset shows that the saline-treated groups maintained their consumption profiles ($H_{2,200} = 29.78$, $p < 0.00001$). Group L showed higher water consumption than groups A and H ($p < 0.000001$ and $p < 0.004$, respectively).

3.2.3. Ethanol consumption during the 90 min period after baclofen administration

We also evaluated ethanol consumption 90 min after baclofen treatment to verify the possibly short duration of action of baclofen. Fig. 6 shows that ethanol consumption was not altered with baclofen treatment when the consumption was assessed for 90 min after baclofen administration when comparing the doses for each group ($H_{A(3,72)} = 0.87$, $p = 0.83$; $H_{H(3,48)} = 3.38$, $p = 0.33$; $H_{L(3,64)} = 2.55$, $p = 0.46$) or the groups for each dose (1.25 mg/kg [B1]: $H_{2,46} = 0.40$, $p = 0.81$; 2.5 mg/kg [B2]: $H_{2,46} = 2.85$, $p = 0.23$; 5.0 mg/kg [B3]: $H_{2,46} = 3.58$, $p = 0.16$; saline [B0]: $H_{2,46} = 5.11$, $p = 0.07$). No significant difference was observed among groups for saline-treated mice ($H_{2,200} = 1.124$, $p = 0.57$; Fig. 5 upper inset).

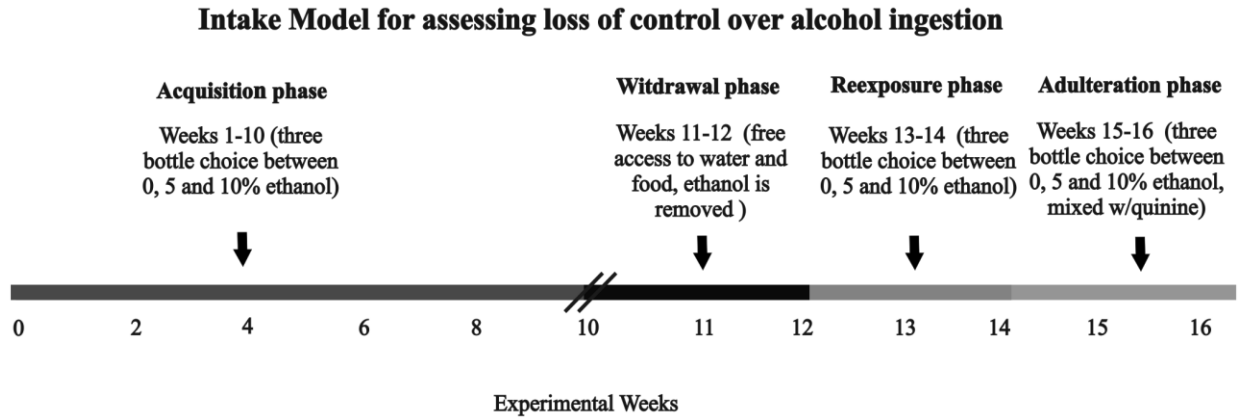
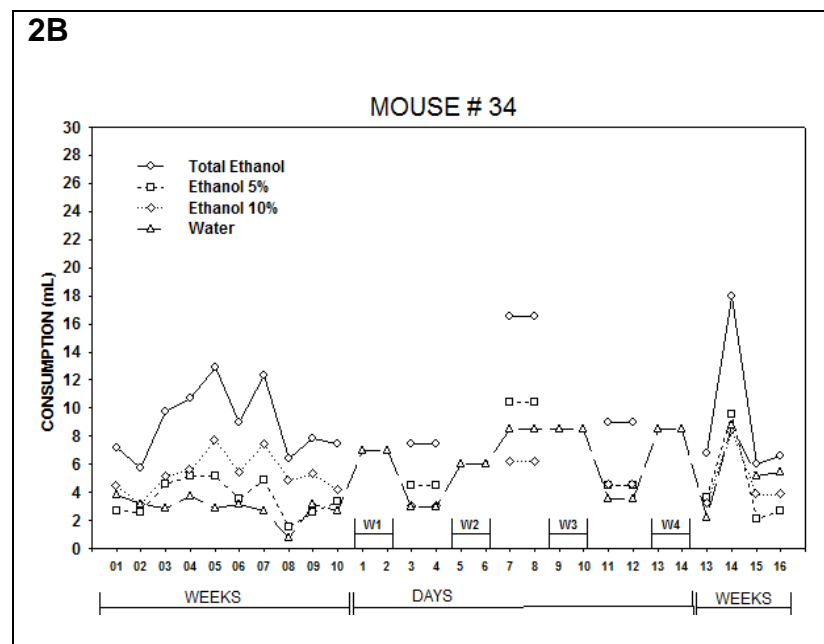
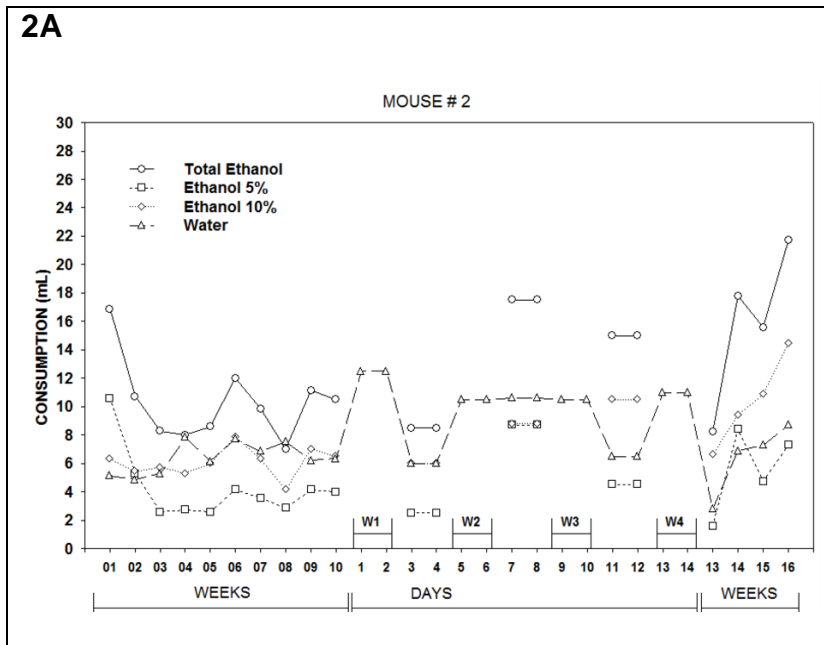


Figure 1. Experimental design of addiction model.



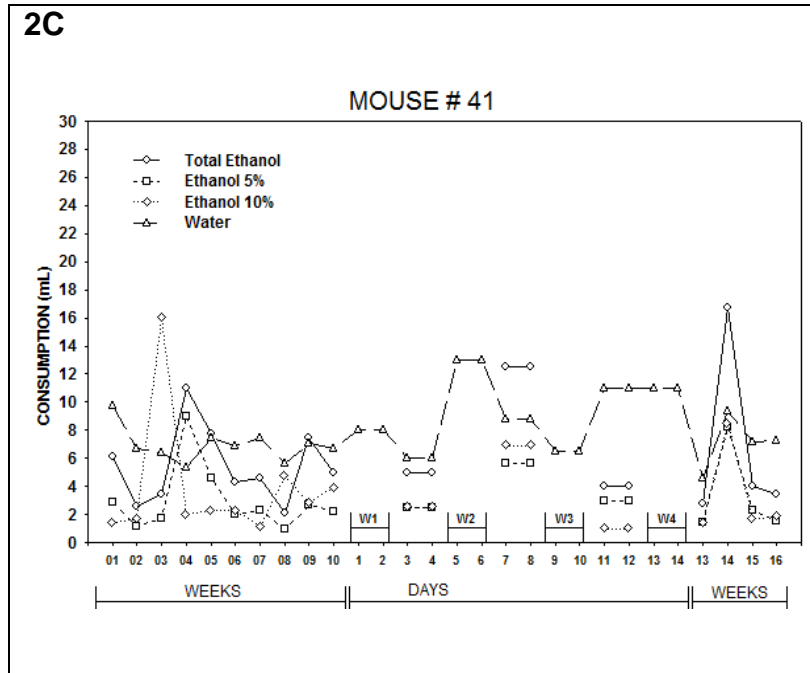


Figure 2. Examples of each consumption profile. Individual examples of mice that exhibited differential patterns of ethanol consumption, expressed as a daily intake average (ml).

(A) An “addicted” mouse whose pattern indicates some degree of loss of control over ethanol ingestion, in which alcohol intake and preference are high throughout the acquisition phase, further increase after the withdrawal phase, and show no reduction when the drug is made less palatable through the addition of quinine (adulteration phase). (B) A “heavy-drinker” mouse shows preference for ethanol throughout most of the weeks tested. The mouse, however, reduces ethanol intake and preference when ethanol solutions are adulterated with quinine. (C) A “light-drinker” mouse exhibits preference for ethanol over water only during the first week of access. Thereafter, ethanol intake and preference remain low, regardless of the cycle of exposure, withdrawal, and reexposure to the drug.

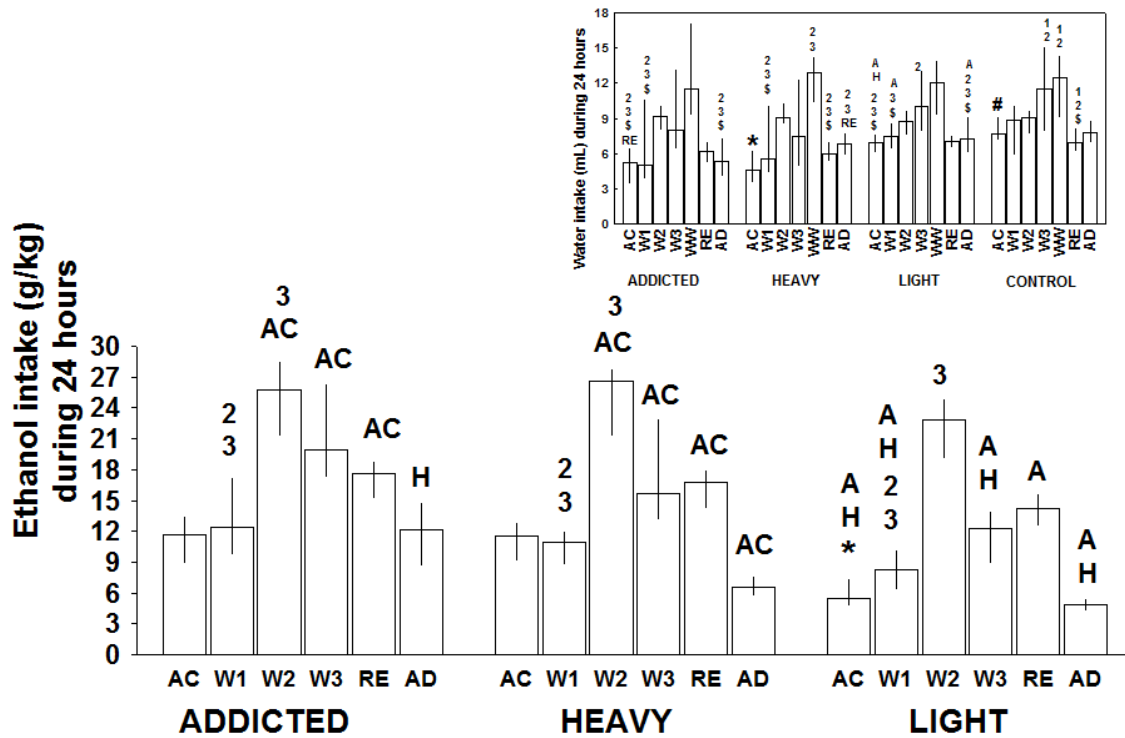


Figure 3. Total ethanol intake over 24 h.

Data are expressed as median \pm interquartile range of ethanol intake (g/kg/day). Ethanol consumption in the addicted, heavy-drinker, and light-drinker groups during each experimental phase prior to baclofen treatment (AC, acquisition phase; W1, first cycle of withdrawal phase; W2, second cycle of withdrawal phase; W3, third cycle of withdrawal phase; RE, reexposure phase; AD, adulteration phase). The upper right inset depicts the median water consumption during each phase for all groups, including the control group. WW represents the median water consumption during all intervals between the ethanol withdrawal cycles when only water was available. The letters or numbers over the bars represent significant differences (A, from group A; H, from group H; AC, from Acquisition phase; RE, from reexposure phase; 1, from W1 cycle; 2, from W2 cycle; 3, from W3 cycle). * $p < 0.05$, difference from all phases; $^{\$}p < 0.05$, difference from WW cycles (Kruskal Wallis and Friedman tests followed by multiple comparison test).

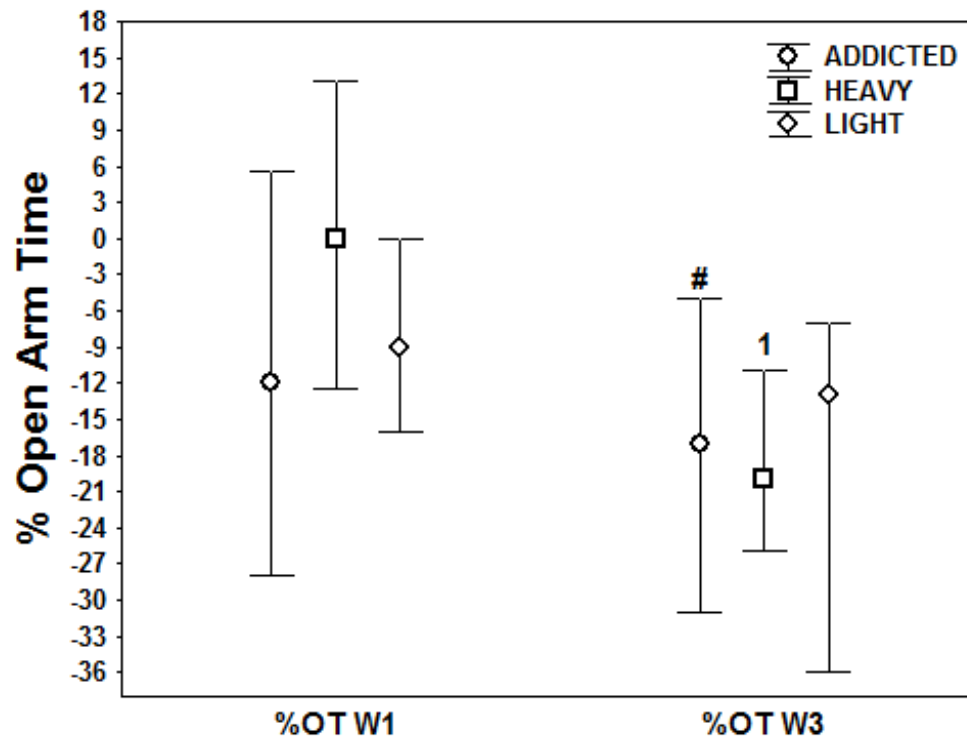


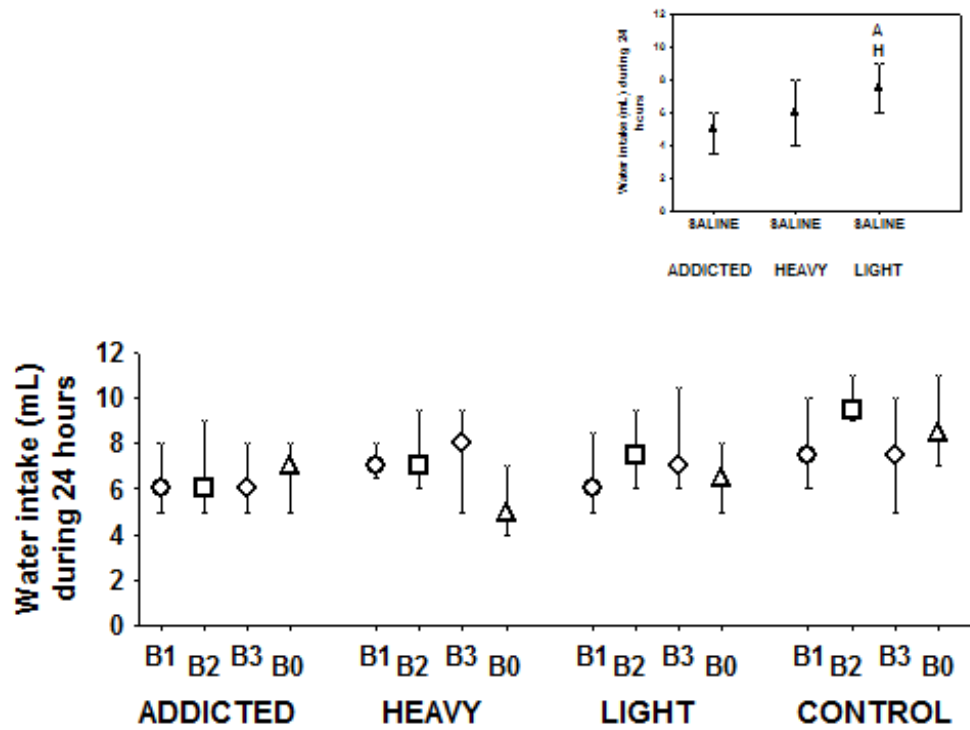
Figure 4. Percent open arm time in the withdrawal phase.

Data are expressed as median \pm interquartile range of percent open arm time in the W1 (%OTW1) and W3 (%OTW3) cycles during the withdrawal phase compared with basal indices obtained before the beginning of the chronic ethanol self-administration model. ¹ $p = 0.002$, difference from the W1 cycle; # $p = 0.08$, difference from the W1 cycle (Kruskal Wallis test followed by multiple comparison test).

Tabela 1. Ethanol intake during phase acquisition (AC) and adulteration (AD) phases and with saline or different doses of baclofen in mice classified according to their intake profile.

GROUP	TREATMENT	ETHANOL INTAKE (G/KG/DAY) IN DIFFERENT PHASES							Friedman
		AC	AD	SALINE	B0	B1	B2	B3	(phases) χ^2 p
ADDICTED (A)	Baclofen $n = 9$	10.7 (9.0-12.1)	12.9 ^H (10.9-14.2)	-	14.3 (7.2-18.8)	12.0 (7.9-14.9)	11.0 (8.6-14.5)	10.5 (6.7-13.0)	1.72 0.89
	Saline $n = 6$	12.9 (10.1-15.2)	11.9 ^H (8.2-14.7)	13.7 (12.2-15.2)	-	-	-	-	6.33 0.06
	KW (SAL \times B0 \times B1 \times B2 \times B3): $H_{4,47} = 2.96, p = 0.56$								
HEAVY (H)	Baclofen $n = 7$	10.2 ^{AD, B1} (8.3-11.7)	6.2 (5.8-6.6)	-	9.4 (4.5-13.6)	7.7 ^{B2} (6.2-9.0)	10.8 ^{AD} (9.5-13.0)	12.1 ^{AD} (7.3-12.5)	16.07 0.007
	Saline $n = 9$	12.4 ^{AD} (10.1-13.9)	7.2 (6.7-8.4)	11.8 ^{AD} (10.4-13.9)	-	-	-	-	13.56 0.002
	KW (SAL \times B0 \times B1 \times B2 \times B3): $H_{4,47} = 3.05, p = 0.55$								
LIGHT (L)	Baclofen $n = 9$	4.9 ^{A, H} (4.7-6.5)	5.3 ^{A, H} (4.8-5.9)	-	5.9 ^{A (0.05)} (4.7-10.1)	6.3 ^A (4.3-8.9)	9.7 (5.5-13.7)	8.2 (6.2-13.0)	6.52 0.26
	Saline $n = 11$	6.3 ^{AD} (5.4-7.7)	4.7 ^{A, H} (4.4-5.3)	9.0 ^{AD, AC, A} (7.5-10.0)	-	-	-	-	22.00 0.00002
	KW (SAL \times B0 \times B1 \times B2 \times B3): $H_{4,47} = 5.63, p = 0.23$								
Kruskal Wallis (groups)	H p	30.05 0.00001	35.56 0.00001	9.27 0.01	5.58 0.06	7.83 0.02	1.88 0.39	1.36 0.51	
NOT CLASSIFIED (Groups A, H, and L combined)	Baclofen $n = 25$	8.9 (6.5-11.4)	6.2 (5.1-10.9)	-	9.4 (4.8-13.7)	7.9 (6.2-10.3)	10.8 (8.3-13.7)	10.5 (6.6-13.0)	9.93 0.08
	Saline $n = 26$	9.7 ^{AD} (7.1-13.0)	7.0 (5.1-11.0)	12.0 ^{AC, AD} (8.8-13.5)	-	-	-	-	39.31 0.000001
	KW (SAL \times B0 \times B1 \times B2 \times B3): $H_{4,125} = 6.76, p = 0.15$								

AC, acquisition phase; AD, adulteration phase; B0, saline injection interspersed between baclofen doses; B1, 1.25 mg/kg baclofen; B2, 2.5 mg/kg baclofen; B3, 5.0 mg/kg baclofen; KW, Kruskal Wallis analysis. The letters above the numbers represent a significant difference from the respective group, phase or dose. The values from the Friedman and Kruskal Wallis analyses are showing in the last column and in lines, respectively.



8Figure 5. Total water intake over 24 h.

All data are expressed as median \pm interquartile range of water intake (ml/kg/day). Water consumption in the addicted, heavy-drinker, and light-drinker groups during each experimental phase after i.p. baclofen treatment (B0, 0 mg/kg/saline; B1, 1.25 mg/kg; B2, 2.5 mg/kg; B3, 5.0 mg/kg). The upper right inset depicts the median water consumption for the saline-treated addicted, heavy-drinker, and light-drinker groups. The letters over the error bars represent significant differences (A, from group A; H, from group H; $p < 0.05$; Kruskal Wallis test followed by multiple comparison test).

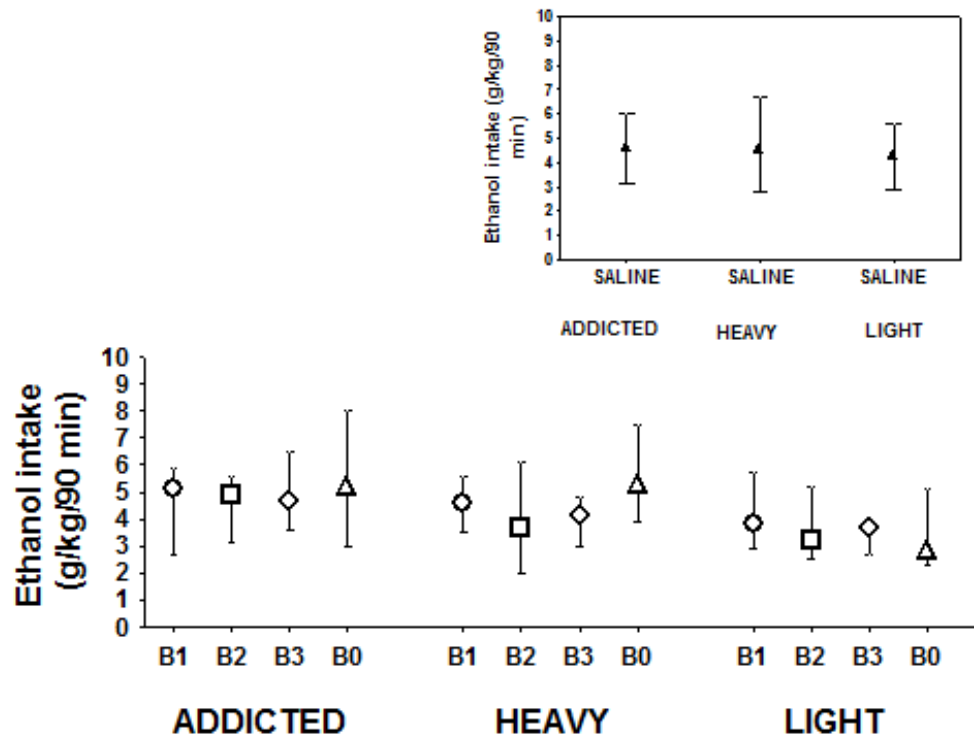


Figure 6. Total ethanol intake over 90 min.

Data are expressed as median \pm interquartile range of ethanol intake (g/kg). Ethanol consumption over 90 min in the addicted, heavy-drinker, and light-drinker groups after i.p. baclofen treatment (B0, 0 mg/kg/saline; B1, 1.25 mg/kg; B2, 2.5 mg/kg; B3, 5.0 mg/kg). The upper right inset depicts the median ethanol consumption in the saline-treated addicted, heavy-drinker, and light-drinker groups. No significant differences were observed.

4. Discussion

The main finding of the present study was the demonstration of the differential effects of baclofen on ethanol consumption depending on intake profile. Mice characterized as “heavy-drinkers” reduced their ethanol intake when a low dose of baclofen was administered, whereas baclofen had no effect in the “addicted” and “light-drinker” groups. The differential effects that depended on the intake profiles were confirmed when we analyzed the effects of baclofen in all animals by considering them together with no group distinctions. In this case, baclofen had no effect, possibly because of the compensation of the individual and group variability related to the

intrinsic features of each pattern of consumption observed in the three groups. Thus, when we analyzed the effects of baclofen on ethanol intake by considering the group differences, we found a differential response. We expected to observe some differential effects of a GABA_B agonist because of the data from a genetic analysis conducted in our laboratory (Ribeiro et al., 2010a).

Some authors have demonstrated that baclofen increased ethanol consumption (Czachowski et al., 2006; Petry, 1997; Smith et al., 1992, 1999; Moore et al., 2007), but the majority of studies have demonstrated the contrary (Addolorato et al., 2000, 2002; Bechtholt and Cunningham, 2005; Colombo et al., 2000, 2002, 2003a, b; Knapp et al., 2007; Heilig and Egli, 2006; Maccioni et al., 2005, 2008; Moore et al., 2007; Walker and Koob, 2007). Our data are consistent with these later studies, at least in “heavy-drinker” mice that have not “lost control over ethanol intake.”

The ethanol consumption observed in the present study, which is a phenotypic manifestation, may have been related to genotypic differences between groups. In a previous study conducted in our laboratory, we found that the genes that encode the GABA_{B1} and GABA_{B2} subunits were differentially expressed in several brain areas related to addictive behavior in mice that exhibited an “addiction” profile using the same paradigm (Ribeiro et al., 2010a). Indeed, this was the main reason why we evaluated the effects of baclofen on ethanol consumption using this paradigm in the present study. Ribeiro and colleagues demonstrated that “addicted” animals (group A) had high *Gabbr1* and *Gabbr2* transcription levels in the prefrontal cortex. *Gabbr1* transcription levels were higher than in control mice and groups H and L. In the hippocampus, the same group showed lower *Gabbr2* mRNA levels compared with the other groups. In the striatum, *Gabbr1* transcription levels were higher than the other groups. In summary, *Gabbr1* and *Gabbr2*

transcription levels were altered in cerebral areas related to drug taking and drug seeking (Kalivas and Volkow, 2005; Everitt and Robbins, 2005) only in mice behaviorally classified as “addicted,” suggesting that these genetic differences may be related to the “persistent chronic consumption with loss of control” when ethanol was adulterated with quinine, which is an intake pattern that characterizes “addiction.” How these differences in transcription levels account for differences in ethanol consumption is unknown. We subjected mice with different intake profiles to baclofen treatment. From the phenotypic analysis, we inferred that the agonist baclofen only exerted its effect of reducing ethanol intake when the GABA_{B1} and GABA_{B2} subunits were effectively balanced. Some authors have demonstrated that conformational alteration of the GABA_{B1} subunit and subsequently conformational alteration of the entire GABA_{B1}-GABA_{B2} complex are necessary for effective activation of the GABA_B receptor (Morishita et al., 1990). Consequently, the precise balance between the two subunits is necessary for the effective activation of the receptor. The “addicted” mice characterized in our model may have had disproportional expression of the two subunits as a result of the differential transcription levels found in the brain areas related to drug taking and drug seeking, suggesting a possible explanation for the lack of effect of baclofen in these mice. Even with baclofen treatment, these mice maintained a “loss of control” over ethanol intake. One question is how this disproportional receptor subtype expression can support a basis for research on individualizing treatment. The present study has some limitations, but our data highlight the importance for more studies.

The animal model used in the present study has some relevant differences from other models that also showed the ability of baclofen to reduce ethanol consumption. The majority of studies used a two-bottle choice paradigm, and the animals were not

classified according to their consumption profiles. They were only considered drinkers or non-drinkers, and the animals generally had access to sweetened alcohol solutions. These studies found that when offered low alcohol concentrations (i.e., up to 6% w/v) that have a sweet taste, rats and mice generally drink more alcohol than water. At higher alcohol concentrations, however, at which the taste of the solution is usually aversive to rodents, large differences in alcohol preference exist among individuals and among strains. Only few animals exhibit alcohol preference and consumption resulting from alcohol's rewarding effect. A major limitation of these models is that alcohol preference alone does not necessarily indicate addictive behavior but often reflects controlled alcohol consumption (Spanagel, 2000; Sanchis-Segura and Spanagel, 2006). Our model is based on the three-bottle free-choice paradigm, in which mice have prolonged (16 week) voluntary access to 5% and 10% unsweetened ethanol solutions and water, which allows the mouse to choose among two concentrations of alcohol and water without forced consumption. During the initial 3 weeks, days of high consumption alternated with days of near abstinence, suggesting that mice experienced the pharmacological effects of the drug and adjusted their ingestion. Each mouse subsequently developed a characteristic pattern of consumption that remained stable for several weeks (week 7 to 10). During this period, some mice preferred to drink alcohol (i.e., 9-15 g/kg/day), whereas others showed low preference (4-7 g/kg/day). After a 2 week abstinence period, access to ethanol was resumed for 2 more weeks. During the abstinence period, the high-consuming mice exhibited behaviors that suggested "anxiety" and could induce unpleasant effects and that the negative reinforcing properties of ethanol may reduce (Koob and Le Moal, 1997), leading to a resumption of ethanol intake during the reexposure phase. Mice that exhibited high consumption and

preference for alcohol during the last weeks of the acquisition phase continued to exhibit the same pattern during the reexposure phase. The adulteration of ethanol with quinine substantially reduced consumption in some high-consuming mice (“heavy-drinker,” group H), but others maintained their high ingestion (“addicted,” group A), suggesting a “loss of control” over intake. This variability could reflect differences in the vulnerability to the effects of ethanol (see Fig. 2 for individual examples of different patterns of ethanol intake in the model). This observation strengthens the relevance of the proposed model because it reflects one of the most prominent characteristics seen in humans, which is the great variability in the individual susceptibility to the development of dependence and in the response to treatment. Additionally, the model incorporates a “natural” development in the progression from initiation to “loss of control” of ethanol consumption (Sanchis-Segura and Spanagel, 2006), which is observed only in some individuals. We previously demonstrated the model’s reliability, which was replicated 10 times, and the same proportions of mice that exhibited the differential intake profiles were always found. The model has proven face validity, including long-term high ethanol intake and persistent intake despite the bitter taste of the adulterated ethanol solution. The model has predictive validity when tested with naltrexone as a pharmacological challenge (Fachin-Scheit et al., 2006; Correia et al., 2009; Ribeiro et al., 2008). Additionally, we characterized mice according their individual patterns of ethanol consumption, allowing the assessment of individualized treatment.

Alcohol dependence generally develops in several stages. Following a relatively long phase of acquisition of alcohol drinking, during which the individual consumes various alcohol doses, controlled alcohol drinking behavior generally develops. Under certain conditions, however, drinking behavior can become uncontrolled in some

individuals. Researchers do not yet know whether a specific “point of no return” exists when irreversible “loss of control” occurs (Coper et al., 1990).

In our model, each mouse develops an individual alcohol intake pattern that remains stable for several months (i.e., a significant part of their lifetime), even after many stressful situations, such as multiple withdrawal periods (e.g., during the withdrawal phase of the model and during the periods of abstinence to which mice were subjected during baclofen treatment), isolation, behavioral manipulations, and injections. Other authors demonstrated that social stressors profoundly influence drinking behavior (Wolffgramm et al., 2000; Wolffgramm and Heyne, 1991).

In the present study, we modified the procedure compared with previous studies from our laboratory (Ribeiro et al., 2008, 2010a, b; Correia et al., 2009; Fachin-Scheit et al., 2006). During the withdrawal phase in the previous studies, we used 2 weeks of prolonged abstinence, but the ADE was not seen. The ADE, defined as the temporary increase in voluntary alcohol intake that occurs in different animal species after a period of alcohol abstinence, has been proposed to model the compulsive, uncontrolled alcohol seeking and consuming behaviors that characterize alcohol relapse in human alcoholics (Boening et al., 2001; McBride et al., 2002). Some authors suggested that the use of the ADE as a model of craving reflects the motivation that promotes the subsequent consumption of alcohol and can cause relapse based on the negative reinforcing properties of ethanol. Similarly, humans exhibit anxiety, depressed mood, and irritability during the ethanol withdrawal syndrome (Koob and Le Moal, 1997, 2001; Koob, 2000; Spanagel, 2003). In the present study, we introduced multiple cycles of abstinence in an attempt to induce “negative affect.” We found that mice exhibited significantly increased ethanol intake during the cycles, suggesting an ADE, compared with the AC phase (see

Fig. 3, W1, W2, and W3 cycles in which the mice had access to ethanol after withdrawal). A degree of anxiety-like behavior was also observed in groups A and H, which had the highest ethanol intake during the preceding phase. These findings suggest that at least in chronically drinking mice, the ADE represents a situation of increased motivation to seek and drink alcohol, which is compatible with the operational definition of craving (Markou et al., 1993). However, we observed the ADE in all groups (A, H, and L) after the withdrawal phase, although during the period when mice received baclofen or saline treatment, only group L showed an ADE. Nevertheless, groups A and H returned to their intake profile associated with saline treatment (saline-treated groups and B0 dose in baclofen-treated groups), and group L also returned to its intake profile when treated with the B0 dose. These observations confirm the internal reliability of the model.

Tanchuck et al. (2011) reported that 5.0 mg/kg baclofen decreased binge alcohol consumption in mice but also tended to decrease water intake and significantly decreased operant sucrose self-administration, suggesting that this high dose is not specific to ethanol-taking behavior. In our study, we did not observe any effect of baclofen on water consumption, suggesting that its effects were specific to ethanol consumption. If adverse effects of baclofen were present, such as muscle relaxation and sedation, they did not interfere with consummatory behavior, similar to observations by other authors (Anstrom et al., 2003). We also examined weight gain during the entire experiment, and baclofen had no effect, confirming its specific effect on ethanol consumption.

In the recent study by Tanchuck et al. (2011), baclofen was effective at reducing ethanol consumption up to 8 h after injection, but this effect disappeared 10 h after the

injection, suggesting that the timing of the baclofen injection and subsequent access to ethanol might be critical in determining how the drug affects ethanol intake, which was also proposed by Moore et al. (2007). In our study, considering that baclofen is short-acting (Brebner et al., 2002; Shoaib et al., 1998), we assessed ethanol consumption for 90 min, 30 min after baclofen treatment, and all groups maintained their previous profile with no suppressant effect of baclofen. A possible explanation may be that mice from the Tanchuck study reduced their ethanol intake only while baclofen suppressed the reinforcing effects of ethanol. In the present study, the “heavy-drinker” mice (group H) may have consumed ethanol because of its reinforcing effects, such that the higher the blood baclofen concentration, the lower the ethanol consumption. Group A was hypothesized to consume ethanol because of a “loss of control” in limiting intake, rendering the reinforcing properties of ethanol less important and abolishing the effects of baclofen. However, these speculations require more studies.

Some evidence that may support this hypothesis is that GABA_B receptor expression is most highly concentrated in the frontal cortex, hippocampus, and thalamus (Margeta-Mitrovic et al., 1999; Princivalle et al., 2001). These regions are preferentially activated by cues paired with drug availability and use (Chang et al., 1994; Childress et al., 1999; George et al., 2001; Grant et al., 1996; Woodward et al., 1999). Activity within these regions may provide a substrate for anticipatory behavioral states that precede actual drug use, and these states are not dependent on the acute or reinforcing actions of a drug. Our previous study demonstrated differences in *Gabbr1* and *Gabbr2* transcription levels in group A in some of these brain areas, which might explain the lack of response to baclofen. These neural mechanisms that sustain behavioral activation states may be required for the initiation of responding for alcohol, natural reinforcers,

and other drugs of abuse and may be disrupted in “addicted” animals, thus explaining the lack of effect of baclofen. Our hypothesis is that baclofen does not effectively alleviate the compulsive drive to use drugs that contributes to relapse and other drug-seeking states, which has been suggested by other authors (Addolorato et al., 2002; Anstrom et al., 2003; Ling et al., 1998; Callahan and de la Garza, 1997; Lacey et al., 1988; Zaleski et al., 2001).

In the present study, only the lowest dose of baclofen (1.25 mg/kg) showed an effect. Recent data indicate that a 2.5 mg/kg dose of baclofen selectively reduces binge drinking using the scheduled high alcohol consumption procedure in mice (Tanchuck et al., 2011). However, in this animal model, mice have access to ethanol for a limited time (4-10 h for only a few days) in a binge drinking model. Janak and Gill (2003) showed that ethanol self-administering rats that received 1 mg/kg baclofen reduced their ethanol intake, but 3 mg/kg had no effect.

In conclusion, baclofen reduced ethanol intake only in mice that had not lost control over ethanol intake when they were exposed to a three-bottle free-choice paradigm.

5. References

- Addolorato G, Caputo F, Capristo E, Colombo G, Gessa GL, Gasbarrini G. Ability of baclofen in reducing alcohol craving and intake: II. Preliminary clinical evidence. *Alcohol Clin Exp Res* 2000;24:67-71.
- Addolorato G, Caputo F, Capristo E, Janiri L, Bernardi M, Agabio R, Colombo G, Gessa GL, Gasbarrini G. Rapid suppression of alcohol withdrawal syndrome by baclofen. *Am J Med* 2002;112:226-9.

- Anstrom KK, Cromwell HC, Markowski T, Woodward DJ. Effect of baclofen on alcohol and sucrose self-administration in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2003;27:900-8.
- Bechtholt AJ, Cunningham CL. Ethanol-induced conditioned place preference is expressed through a ventral tegmental area dependent mechanism. *Behav Neurosci* 2005;119:213-23.
- Boening JAL, Lesch, OM, Spanagel R, Wolffgramm J, Narita M, Sinclair D, Mason BJ, Wiesbeck GA. Pharmacological relapse prevention in alcohol dependence: from animal models to clinical trials. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25(5 Suppl ISBRA):127S-131S.
- Boerngen-Lacerda R, Souza-Formigoni MLO. Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties? *Pharmacol Biochem Behav* 2000;67:225-32.
- Brebner K, Childress AR, Roberts DCS. A potential role for GABA_B agonists in the treatment of psychostimulant addiction. *Alcohol Alcohol* 2002;37:478-84.
- Brebner K, Ahn S, Phillips AG. Attenuation of d-amphetamine self-administration by baclofen in the rat: behavioral and neurochemical correlates. *Psychopharmacology* 2005;177:409-17.
- Callahan PM, de la Garza R 2nd, Cunningham KA. Mediation of the discriminative stimulus properties of cocaine by mesocorticolimbic dopamine systems. *Pharmacol Biochem Behav* 1997;57:601-7.
- Chang JY, Sawyer SF, Lee RS, Woodward DJ. Electrophysiological and pharmacological evidence for the role of the nucleus accumbens in cocaine self-administration in freely moving rats. *J Neurosci* 1994;14:1224-44.

- Childress AR, Mozley PD, McElgin W, Fitzgerald J, Reivich M, O'Brien CP. Limbic activation during cue-induced cocaine craving. *Am J Psychiatry* 1999;156:11-8.
- Colombo G, Agabio R, Carai MAM, Lobina C, Pani M, Reali R, Addolorato G, Gessa GL. Ability of baclofen in reducing alcohol intake and withdrawal severity: I. Preclinical evidence. *Alcohol Clin Exp Res* 2000;24:58-66.
- Colombo G, Serra S, Brunetti G, Atzori G, Pani M, Vacca G, Adollorato G, Froestl W, Carai MAM, Gessa GL. The GABA_B receptor agonists baclofen and CGP 44532 prevent acquisition of alcohol drinking behaviour in alcohol-preferring rats. *Alcohol Alcohol* 2002;37:499-503.
- Colombo G, Serra S, Brunetti G, Vacca G, Carai MAM, Gessa GL. Suppression by baclofen of alcohol deprivation effect in Sardinian alcohol-preferring (sP) rats. *Drug Alcohol Depend* 2003a;70:105-8.
- Colombo G, Vacca G, Serra S, Brunetti G, Carai MAM, Gessa GL. Baclofen suppresses motivation to consume alcohol in rats. *Psychopharmacology* 2003b;167:221-4.
- Coper H, Rommelspacher H, Wolffgramm J. The 'point of no return' as a target of experimental research on drug dependence. *Drug Alcohol Depend* 1990;25:129-34.
- Correia D, Ribeiro AF, Brunialti Godard A, Boerngen-Lacerda R. Trait anxiety and ethanol: anxiolysis in high-anxiety mice and no relation to intake behavior in an addiction model. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009;33:880-8.
- Czachowski CL, Legg BH, Stansfield KH. Ethanol and sucrose seeking and consumption following repeated administration of the GABA_B agonist baclofen in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2006;30:812-8.

- Everitt BJ, Robbins TW. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 2005;8:1481-9 [erratum: 9:979].
- Fachin-Scheit DJ, Ribeiro AF, Pigatto G, Goeldner FO, Boerngen de Lacerda R. Development of a mouse model of ethanol addiction: naltrexone efficacy in reducing consumption but not craving. *J Neural Transm* 2006;113:1305-21.
- Malgorzata F, Malgorzata F, Przegaliński E. Effects of GABA_B receptor antagonist, agonists and allosteric positive modulator on the cocaine-induced self-administration and drug discrimination. *Eur J Pharmacol* 2007;574:148-57.
- George MS, Anton RF, Bloomer C, Teneback C, Drobos DJ, Lorberbaum JP, Nahas Z, Vincent DJ. Activation of prefrontal cortex and anterior thalamus in alcoholic subjects on exposure to alcohol-specific cues. *Arch Gen Psychiatry* 2001;58:345-52.
- Grant S, London ED, Newlin DB, Villemagne VL, Liu X, Contoreggi C, Phillips RL, Kimes AS, Margolin A. Activation of memory circuits during cue-elicited cocaine craving. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:12040-5.
- Heilig M, Egli M. Pharmacological treatment of alcohol dependence: target symptoms and target mechanisms. *Pharm Therap* 2006;111:855-76.
- Janak PH, Gill MT. Comparison of the effects of allopregnanolone with direct GABAergic agonists on ethanol self-administration with and without concurrently available sucrose. *Alcohol* 2003;30:1-7.
- Kalivas PW, Volkow ND. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry* 2005;162:1403-13.
- Knapp DJ, Overstreet DH, Breese GR. Baclofen blocks expression and sensitization of anxiety-like behavior in an animal model of repeated stress and ethanol withdrawal. *Alcohol Clin Exp Res* 2007;31:582-95.
- Koob GF. Animal models of craving for ethanol. *Addiction* 2000;95(Suppl 2):s73-81.

- Koob GF, Bloom FE. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science* 1988;242:715-23.
- Koob GF, Le Moal M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 1997;278:52-8.
- Koob GF, Le Moal M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* 2001;24:97-129.
- Lacey MG, Mercuri NB, North RA. On the potassium conductance increase activated by GABA_B and dopamine D₂ receptors in rat substantia nigra neurones. *J Physiol* 1988;401:437-53.
- Liang F, Hatanaka Y, Saito H, Yamamori T, Hashikawa T. Differential expression of γ -aminobutyric acid type B receptor-1a and -1b mRNA variants in GABA and non-GABAergic neurons of the rat brain. *J Comp Neurol* 2000;416:475-95.
- Ling W, Shoptaw S, Majewska D. Baclofen as a cocaine anti-craving medication: a preliminary clinical study. *Neuropsychopharmacology* 1998;18:403-4.
- Maccioni P, Serra S, Vacca G, Orru A, Pés D, Agabio R, Addolorato G, Carai MAM, Gessa GL, Colombo G. Baclofen-induced reduction of alcohol reinforcement in alcohol-preferring rats. *Alcohol* 2005;36:161-8.
- Maccioni P, Bienkowskic P, Carai MAM, Gessa GL, Colombo G. Baclofen attenuates cue-induced reinstatement of alcohol-seeking behavior in Sardinian alcohol-preferring (sP) rats. *Drug Alcohol Depend* 2008;95:284-7.
- Margeta-Mitrovic M, Mitrovic I, Riley RC, Jan LY, Basbaum AI. Immunohistochemical localization of GABA_B receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 1999;405:299-321.
- Markou A, Weiss F, Gold LH, Caine SB, Schulteis G, Koob GF. Animal models of drug craving. *Psychopharmacology* 1993;112:163-82.
- McBride WJ, Le AD, Noronha A. Central nervous system mechanisms in alcohol relapse. *Alcohol Clin Exp Res* 2002;26:280-6.

- Moore EM, Serio KM, Goldfarb KJ, Stepanovska S, Linsenbardt DN, Boehm SL Jr. GABAergic modulation of binge-like ethanol intake in C57BL/6J mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2007;88:105-13.
- Morishita R, Kato K, Asano T. GABA_B receptors couple to G proteins G_o, G^{*}_o and G_{i1} but not to G_{i2}. *FEBS Lett* 1990;271:231-5.
- Petry NM. Benzodiazepine-GABA modulation of concurrent ethanol and sucrose reinforcement in the rat. *Exp Clin Psychopharmacol* 1997;5:183-94.
- Princivalle AP, Pangalos MN, Bowery NG, Spreafico R. Distribution of GABA_{B(1a)}, GABA_{B(1b)} and GABA_{B2} receptor protein in cerebral cortex and thalamus of adult rats. *Neuroreport* 2001;12:591-5.
- Ribeiro AF, Pigatto G, Goeldner FO, Lopes JF, Lacerda RB. 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.
- Ribeiro AF, Correia D, Chiavegatto S, Boerngen-Lacerda R, Brunialti-Godard AL. The Gabbr1 and Gabbr2 genes are involved in addictive behavior: study of different ethanol consumption phenotypes. *PLoS One* 2010a;in press.
- Ribeiro AF, Correia D, Chiavegatto S, Boerngen-Lacerda R, Brunialti-Godard AL. The Gabbr1 and Gabbr2 genes are involved with addictive behavior: a study in different phenotypes of ethanol consumers. *Alcohol Clin Exp Res* 2010b;34(Suppl 2):39A.
- Sanchis-Segura C, Spanagel R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol* 2006;11:2-38.
- Shoaib M, Swanner LS, Beyer CE, Goldberg SR, Schindler CW. The GABA-B agonist baclofen modifies cocaine self-administration in rats. *Behav Pharmacol* 1998;9:195-206.
- Smith BR, Robidoux J, Amit Z. GABAergic involvement in the acquisition of voluntary ethanol intake in laboratory rats. *Alcohol Alcohol* 1992;27:227-31.

- Smith BR, Boyl AEL, Amit Z. The effects of GABA_B agonist baclofen on the temporal and structural characteristics of ethanol intake. *Alcohol* 1999;17:231-40.
- Spanagel R. Recent animal models of alcoholism. *Alcohol Res Health* 2000;24:124-31.
- Spanagel R. Alcohol addiction research: from animal models to clinics. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:507-18.
- Tanchuck MA, Yoneyama N, Ford MM, Fretwell AM, Finn DA. Assessment of GABA-B, metabotropic glutamate, and opioid receptor involvement in an animal model of binge drinking. *Alcohol* 2011;45:33-44.
- Tsuji M, Nakagawa Y, Ishibashi Y, Yoshii T, Takashima T, Shimada M, Suzuki T. Activation of ventral tegmental GABA_B receptors inhibits morphine-induced place preference in rats. *Eur J Pharmacol* 1996;313:169-73.
- Walker BM, Koob GF. The γ -aminobutyric acid-B receptor agonist baclofen attenuates operant responding for ethanol in ethanol-dependant rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2007;31:11-8.
- Wolffgramm J, Heyne A. Social behavior, dominance, and social deprivation of rats determine drug choice. *Pharmacol Biochem Behav* 1991;38:389-99.
- Wolffgramm J, Galli G, Thimm F, Heyne A. Animal models of addiction: models for therapeutic strategies? *J Neural Transm* 2000;107:649-68.
- Woodward DJ, Chang JY, Janak P, Azarov A, Anstrom K. Mesolimbic neuronal activity across behavioral states. *Ann N Y Acad Sci* 1999;877:91-112.
- Zaleski MJ, Nunes Filho JR, Lemos T, Morato GS. GABA_B receptors play a role in the development of tolerance to ethanol in mice. *Psychopharmacology* 2001;153:415-24.

6. CONCLUSÕES

- No modelo de adição foi possível separar os animais em animais adictos e não-adictos, pesados e leves, o que nos possibilita o estudo da dependência sobre perfis de consumo caracterizados. Isto também é importante para estudarmos os fenômenos, como *craving*, que ocorrem durante o desenvolvimento da dependência.
- Os resultados mostraram a importância de se considerar que quando testamos uma população heterogênea de animais devemos lembrar que existem diferenças individuais na resposta ao efeito do etanol e ao tratamento.
- O baclofeno reduziu o consumo de etanol somente nos camundongos que não perderam o controle sobre o consumo, quando estes forem expostos ao paradigma de auto-administração por livre escolha.
- Uma compreensão dos mecanismos neurobiológicos que contribuem para um fenótipo de alcoolismo pode orientar as estratégias para as pesquisas de novas drogas, que podem ser usadas para aumentar a qualidade de vida dos indivíduos dependentes e reduzir o desenvolvimento de dependência.

7. REFERÊNCIAS

ADAMS, C. L.; LAWRENCE, A. J. CGP7930: A positive allosteric modulator of the GABAB receptor. **CNS Drug Reviews**, v. 13, n. 3, p. 308-316, 2007.

ADDOLORATO, G.; CAPUTO, F.; CAPRISTO, E.; DOMENICALI, M.; BERNARDI, M.; JANIRI, L.; AGABIO, R.; COLOMBO, G.; GESSA, G. L.; GASBARRINI, G. Baclofen efficacy in reducing alcohol craving and intake: a preliminary double-blind randomized controlled study. **Alcohol Alcohol**, v. 37, n. 5, p. 504-508, 2002.

AGUILAR, M. A.; RODRÍGUEZ-ARIAS, M.; MIÑARRO, J. Neurobiological mechanisms of the reinstatement of drug-conditioned place preference. **Brain Res Rev**, v. 59, n. 2, p. 253-277, 2009.

AIT-DAOUD, N.; JOHNSON, B. A. Medications for the treatment of alcoholism. In: JOHNSON, B. A.; RUIZ, P.; GALANTER, M. (Ed.). **Handbook of clinical alcoholism treatment**. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2003. p. 119-130.

AKIL, H.; BRONSTEIN, D.; MANSOUR, A. Overview of the endogenous opioid systems: anatomical, biochemical and functional issues. In: RODGERS, R. J.; COOPER, S. J. (Ed). **Endorphins, Opiates and Behavioural Processes**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, Altshuler, H. L.; Phillips, P. E.; Feinhandler, D. A, 1988. p. 1-23.

AKIL, H.; WATSON, S. J.; YOUNG, E.; LEWIS, M. E.; KHACHATURIAN, H.; WALKER, J. M. Endogenous Opioids: biology and function. **Annu Rev Neurosci**, v. 7, p. 223-255, 1984.

AKINSHOLA, B. E.; YASUDA, R. P.; PEOPLES, R. W.; TAYLOR, R. E. Ethanol sensitivity of recombinant homomeric and heteromeric AMPA receptor subunits expressed in *Xenopus* oocytes. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 27, n. 12, p. 1876-1883, 2003.

AMARAL R. A. do; MALBERGIER, A. Avaliação de instrumento de detecção de problemas relacionados ao uso do álcool (CAGE) entre trabalhadores da Prefeitura do Campus da Universidade de São Paulo (USP) – Campus Capital. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 26, n. 3, p. 156-163, 2004.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. 6th ed. Washington DC: American Psychiatric Press, 1994. p. 715-718.

ANSTROM, K. K.; CROMWELL, H. C.; MARKOWSKI, T.; WOODWARD, D. J. Effect of baclofen on alcohol and sucrose self-administration in rats. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 27, n. 6, p. 900-908, 2003.

ASHBY, C. R.; ROHATGI, R.; NGOSUWAN, J.; BORDA, T.; GERASIMOV, M. R.; MORGAN, A. B.; KUSHNER, S.; BRODIE, J. D.; DEWEY, S. L. Implication of the GABA(B) receptor in gamma vinyl-GABA's inhibition of cocaine-induced increases in nucleus accumbens dopamine. **Synapse**, v. 31, n. 2, p. 151-153, 1999.

BALDWIN, H. A.; RASSNICK, S.; RIVIER, J.; KOOB, G. F.; BRITTON, K. T. CRF antagonist reverses the "anxiogenic" response to ethanol withdrawal in the rat. **Psychopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 227-232, 1991.

BALE, T. L.; CONTARINO, A.; SMITH, G. W.; CHAN, R.; GOLD, L. H.; SAWCHENKO, P. E.; KOOB, G. F.; VALE, W. W.; LEE, K. F. Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. **Nat Genet**, v. 24, p. 410-414, 2000.

BALSTER, R. L. Drug abuse potential evaluation in animals. **Br J Addict**, v. 86, n. 12, p. 1549-1558, 1991.

BARABAN, S. C.; HOLLOPETER, G.; ERICKSON, J. C.; SCHWARTZKROIN, P. A.; PALMITER, R. D. Knock-out mice reveal a critical antiepileptic role for neuropeptide Y. **J Neurosci**, v.17, n.23, p.8927-8936, 1997.

BARDO, M. T. Neuropharmacological mechanisms of drug reward: beyond dopamine in the nucleus accumbens. **Crit Rev Neurobiol**, v. 12, n.1-2, p. 37-67, 1998.

BARTHOLINI, G. GABA receptor agonists: pharmacological spectrum and therapeutic actions. **Med Res Rev**, v. 5, n. 1, p. 55-75, 1985.

BELLUZZI, J. B.; STEIN, L. Enkephalin may mediate euphoria and drive-reduction reward. **Nat**, v. 266, p. 556-558, 1977.

BESHEER, J.; LEPOUTRE, V.; HODGE, C. W. GABAB receptor agonists reduce operant ethanol self-administration and enhance ethanol sedation in C57BL/6J mice. **Psychopharmacology**, v. 174, n. 3, p. 358-366, 2004.

BINET, V.; GOUDET, C.; BRAJON, C.; LE CORRE, L.; ACHER, F.; PIN, J. P.; PREZEAU, L. Molecular mechanisms of GABAB receptor activation: New insights from the mechanism of action of CGP7930, a positive allosteric modulator. **Biochem Soc Trans**, v. 32, pt. 5, p. 871-872, 2004.

BISCHOFF, S.; LEONHARD, S.; REYMAN, N.; SCHULER, V.; SHIGEMOTO, R.; KAUPMANN, K.; BETTLER, B. Spatial distribution of GABABR1 receptor mRNA and binding sites in the rat brain. **J Comp Neurol**, v. 412, n. 1, p. 1-16, 1999.

BITON, V.; EDWARDS, K. R.; MONTOURIS, G. D.; SACKELLARES, J. C.; HARDEN, C. L.; KAMIN, M. Topiramate titration and tolerability. **Ann Pharmacother**, v. 35, n. 2, p. 173-179, 2001.

BLAHA, C. D.; YANG, C. R.; FLORESCO, S. B.; BARR, A. M.; PHILLIPS, A. G. Stimulation of the ventral subiculum of the hippocampus evokes glutamate receptor-mediated changes in dopamine efflux in the rat nucleus accumbens. **Eur J Neurosci**, v. 9, n. 5, p. 902-911, 1997.

BOERNGEN-LACERDA, R.; SOUZA-FORMIGONI, M. L. O. Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties? **Pharmacol Biochem Behav**, v. 67, n. 2, p.225-232, 2000.

BOLO, N.; NÉDÉLEC, J. F.; MUZET, M.; DE WITTE, P.; DAHCHOUR, A.; DURBIN, P.; MACHER, J.P. Central effects of acamprosate: Part 2. Acamprosate modifies the brain in-vivo proton magnetic resonance spectrum in healthy young male volunteers. **Psychiatry Res**, v. 82, n. 2, p. 115-27, 1998.

BONZ, A.; LASER, M.; KULLMER, S.; KNIESCH, S.; EBELL, J. B.; POPP, V.; ERTL, G.; WAGNER, J. A. Cannabinoids acting on cb1 receptors decrease contractile performance in human atrial muscle. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 41, n. 4, p. 657-664, 2003.

BOWERY, N. G.; HILL, D. R.; HUDSON, A. L.; DOBLE, A.; MIDDLEMISS, D. N.; SHAW, J.; TURNBULL, M. Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. **Nat**, v. 283, p. 92-94, 1980.

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**, v. 30, n. 12, p. 1957-1965, 2006.

BRADBURY, A. J.; COSTALL, B.; DOMENEY, A. M.; NAYLOR, R. J. Laterality of dopamine function and neuroleptic action in the amygdala in the rat. **Neuropharmacology**, v. 24, n. 12, p. 1163–1170, 1985.

BRANDT, M. R.; FRANCE, C. P. Chronic l-alpha acetylmethadol in rhesus monkeys: discriminative stimulus and other behavioral measures of dependence and withdrawal. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 287, n. 3, p. 1029–1037, 1998.

BREBNER, K.; AHN, S.; PHILLIPS, A. G. Attenuation of d-amphetamine self-administration by baclofen in the rat: behavioral and neurochemical correlates. **Psychopharmacology**, v. 177, n. 4, p. 409-417, 2005.

BREBNER, K.; CHILDRESS, A. R.; ROBERTS, D. C. A potential role of GABA_B agonists in the treatment of psychostimulant addiction. **Alcohol**, v. 37, n. 5, p. 478-484, 2002.

BREBNER, K.; PHELAN, R.; ROBERTS, D. C. Effect of baclofen on cocaine self-administration in rats reinforced under fixed-ratio 1 and progressive-ratio schedules. **Psychopharmacology**, v. 148, n. 3, p. 314-321, 2000.

BRUGGER, S.; SANCHEZ, R.; BRUGGER, A. J.; MARTINEZ, J. A. ICV administration of CRF blocker (CRF9-41 δ helical) reduces morphine withdrawal in rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 22, n. 5, p. 775-785, 1998.

BUCKETT, W. R. The influence of a GABA transaminase inhibitor, gamma-vinyl GABA, on voluntary morphine consumption in the rat. **Psychopharmacology**, v. 75, n. 2, p. 214-216, 1981.

BURISH, T. G.; MAISTO, S. A.; COOPER, A. M.; SOBELL, M. B. Effects of voluntary short-term abstinence from alcohol on subsequent drinking patterns of college students. **J Stud Alcohol**, v. 42, n. 11, p. 1013-1020, 1981.

BURNETT, A. L.; LOWENSTEIN, C. J.; BREDT, D. S.; CHANG, T. S. K.; SNYDER, S. H. Nitric Oxide: a physiologic mediator of penile erection. **Science**, v. 257, n. 5068, p. 401-403, 1992.

CAILLÉ, S.; JAIMES, L. A.; POLIS, I.; STOUFFER, D. G.; PARSONS, L. H. Specific alterations of extracellular endocannabinoid levels in the nucleus accumbens by ethanol, heroin, and cocaine self-administration. **J Neurosci**, v. 27, n. 14, p. 3695-3702, 2007.

CALVER, A. R.; ROBBINS, M. J.; COSIO, C.; RICE, S. Q.; BABBS, A. J.; HIRST, W. D. The C-terminal domains of the GABAB receptor subunits mediate intracellular trafficking but are not required for receptor signaling. **J Neurosci**, v. 21, n. 4, p. 1203-1210, 2001.

CAMPOS, S. de. Álcool e sistema nervoso central. **Revista cérebro e mente**, 2003. Disponível em: <<http://www.drashirleydecampos.com.br/categorias.php?categoriaid=33>>. Acesso em: 12/11/2010.

CARDOSO, S. H.; SABBATTINI, R. M. E.; MALAVAZZI, A. L. Neurofarmacologia do álcool. **Revista Cérebro e Mente**, v. 3, n. 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.

CARROLL, K. M.; FENTON, L. R.; BALL, S. A.; NICH, C.; FRANKFORTER, T. L.; SHI, J.; ROUNSAVILLE, B. J. Efficacy of disulfiram and cognitive behavior therapy in cocaine-dependent outpatients: a randomized placebo-controlled trial. **Arch Gen Psychiatry**, v. 61, n. 3, p. 264-72, 2004.

CHARNESS, M. E. Ethanol and opioid receptor signaling. **Experientia**, v. 45, n. 5, p. 418-428, 1989.

CHEN, B. T.; HOPF, W. F.; BONCI, A. Synaptic plasticity in the mesolimbic system: Therapeutic implications for substance abuse. **Ann NY Acad Sci**, v. 1187, p. 129-139, 2010.

CHIAUZZI, E. J. **Preventing relapse in the addictions: a biopsychosocial approach.** New York: Pergamon Press, 1991.

COLLINS, D. M.; MYERS, R. D. Buspirone attenuates volitional alcohol intake in the chronically drinking monkey. **Alcohol**, v. 4, p. 49-56, 1987.

COLLINS, R. J.; WEEKS, J. R.; COOPER, M. M.; GOOD, P. I.; RUSSELL, R. R. Prediction of abuse liability of drugs using IV self-administration by rats. **Psychopharmacology**, v. 82, p. 6-13, 1984.

COLOMBO, G. C.; AGABIO, R.; FÀ, M.; GUANO, L.; LOBINA, C.; LOCHE, A.; REALI, R.; GESSA, G. L. Reduction of voluntary ethanol intake in ethanol-preferring sP rats by the cannabinoid antagonist SR-141716. **Alcohol Alcohol**, v. 33, n. 2, p. 126-130, 1998.

COLOMBO, G.; SERRA, S.; BRUNETTI, G.; ATZORI, G.; PANI, M.; VACCA, G.; ADOLLORATO, G.; FROESTL, W.; CARAI, M.; GESSA, G. L. The GABAB receptor agonists baclofen and CGP 44532 prevent acquisition of alcohol drinking behaviour in alcohol-preferring rats. **Alcohol Alcohol**, v. 37, n. 5, p. 499-503, 2002.

COUSINS, M. S.; ROBERTS, D. C. S.; WIT, H. de. GABAB receptor agonists for the treatment of drug addiction: a review of recent findings. **Drug Alcohol Depend**, v. 65, n. 3, p. 209-220, 2002.

COUVE A.; FILIPPOV A. K.; CONNOLLY C. N.; BETTLER, B.; BROWN, D. A.; MOSS, S. J. Intracellular retention of recombinant GABAB receptors. **J Biol Chem**, v. 273, n. 41, p. 26361-26367, 1998.

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

CZACHOWSKI, C. L.; LEGG, B. H.; SAMSON, H. H. Effects of acamprosate on ethanol-seeking and self-administration in the rat. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 25, n. 3, p. 344-50, 2001.

DAHCHOUR, A.; DE WITTE, P.; BOLO, N.; NÉDÉLEC, J.- F.; MUZET, M.; DURBIN, P.; MACHER, J. P. Central effects of acamprosate. Part 1. Acamprosate blocks the glutamate increase in the nucleus accumbens microdialysate in ethanol withdrawn rats. **Psychiatry Res**, v. 82, n. 2, p. 107-114, 1998.

DAVIDSON, D.; SWIFT, R.; FITZ, E. Naltrexone increases the latency to drink alcohol in social drinkers. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 20, n. 4, p. 732–739, 1996.

de FONSECA, F. R.; DEL ARCO, I.; BERMUDEZ-SILVA, F. J.; BILBAO, A.; CIPPITELLI, A.; NAVARRO, M. The Endocannabinoid System: physiology and pharmacology. **Alcohol Alcohol**, v. 40, n. 1, p. 2-14, 2005.

DE WAELE, J. P.; KIIANMAA, K.; GIANOULAKIS, C. Distribution of the mu and delta opioid binding sites in the brain of the alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA lines of rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 275, n. 1, p. 518-527, 1995.

DE WITTE, P.; LITTLETON, J.; PAROT, P.; KOOB, G. Neuroprotective and abstinence-promoting effects of acamprosate: elucidating the mechanism of action. **CNS Drugs**, v. 19, n. 6, p. 517-537, 2005.

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**, v. 69, n. 1, p. 126-130, 1997.

DEWEY, S. L.; BRODIE, J. D.; GERASIMOV, M.; HORAN, B.; GARDNER, E. L.; ASHBY, C. R. J. A pharmacologic strategy for the treatment of nicotine addiction. **Synapse**, v. 31, n. 1, p. 76-86, 1999.

DEWEY, S. L.; CHAURASIA, C. S.; CHEN, C. E.; VOLKOW, N. D.; CLARKSON, F. A.; PORTER, S. P.; STRAUGHTER-MOORE, R. M.; ALEXOFF, D. L.; TEDESCHI, D.; RUSSO, N. B.; FOWLER, J. S.; BRODIE, J. D. GABAergic attenuation of cocaine-induced dopamine release and locomotor activity. **Synapse**, v. 25, n. 4, p. 393-398, 1997.

DIAZ, S. L.; KEMMLING, A. K.; RUBIO, M. C.; BALERIO, G. N. Lack of sex-related differences in the prevention by baclofen of the morphine withdrawal syndrome in mice. **Behav Pharmacol**, v. 12, p.75–79, 2001.

DI CHIARA, G.; IMPERATO, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 85, n. 14, p. 5274-5278, 1988.

DI MARZO, V. 'Endocannabinoids' and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance. **Biochim Biophys Acta**, v. 1392, n. 1-2, p. 153-175, 1998.

DI MARZO, V.; MELCK, D.; BISOGNO, T.; DE PETROCELLIS, L. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. **Trends Neurosci**, v. 21, n. 12, p. 521-528, 1998.

DODGSON, S. J.; SHANK, R. P.; MARYANOFF, B. E. Topiramate as an inhibitor of carbonic anhydrase isoenzymes. **Epilepsia**, v. 41, n. 1, p. 35-39, 2000.

DOTY, P. de; WIT, H. Effects of naltrexone pretreatment on the subjective and performance effects of ethanol in social drinkers. **Behav Pharmacol**, v. 6, n. 4, p. 386-394, 1995.

DUNN, A. J.; BERRIDGE, C. W. Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? **Brain Res Rev**, v. 15, n. 2, p. 71-100, 1990.

DWORKIN, S. I.; STAIRS, D. J. Self-administration of drugs of abuse, in methods in drug abuse research: cellular and circuit level analyses. Waterhouse BD ed. Boca Raton: CRC Press, 2003. p. 17-49.

ECKARDT, M. J.; FILE, S. E.; GESSA, G. L.; GRANT, K. A.; GUERRI, C.; HOFFMAN, P. L.; KALANT, H.; KOOB, G. F.; LI, T. K.; TABAKOFF, B. Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 22, n. 5, p. 999-1040, 1998.

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

EMMETT-OGLESBY, M. W.; MATHIS, D. A.; MOON, R. T. Animal models of drug withdrawal symptoms. **Psychopharmacology**, v. 101, n. 3, p. 292-309, 1990.

EPSTEIN, D. H.; PRESTON, K. L.; STEWART, J.; SHAHAM, Y. Toward a model of drug relapse: An assessment of the validity of the reinstatement procedure. **Psychopharmacology**, v. 189, n. 1, p. 1-16, 2006.

FACHIN-SCHEIT, D. J.; RIBEIRO, A. F.; PIGATTO, G.; GOELDNER, F. O.; BOERNGEN-LACERDA, R. Development of a mouse model of ethanol addiction: naltrexone efficacy in reducing consumption but not craving. **J Neural Transm**, v. 113, n. 9, p. 1305-1321, 2006.

FELTENSTEIN, M. W.; SEE, R. E. The neurocircuitry of addiction: an overview. **Br J Pharmacol**, v. 154, n. 2, p. 261-274, 2008.

FERGUSON, D. M.; LYNSKEY, M. T.; HORWOOD, L. J. Alcohol consumption and associated problems in a birth cohort of 15 years olds. **N Z Med J**, v. 107, n. 977, p. 167-170, 1994.

FOSTER, K. L.; MCKAY, P. F.; SEYOUM, R.; MILBOURNE, D.; YIN, W.; SARMA, P. V. V. S.; COOK, J. M.; JUNE, H. L. GABA(A) and opioid receptors of the central nucleus of the amygdala selectively regulate ethanol-maintained behaviors. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 269-284, 2004.

FROELICH, J. C.; ZWEIFEL, M.; HARTS, J.; LUMENG, L.; LI, T. K. Importance of delta opioid receptors in maintaining high alcohol drinking. **Psychopharmacology**, v. 103, n. 4, p. 467-472, 1991.

FRÖHLICH, R.; PATZELT, C.; ILLES, P. Inhibition by ethanol of excitatory amino acid receptors and nicotinic acetylcholine receptors at rat locus coeruleus neurons. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 350, n. 6, p. 626-631, 1994.

FUNADA, M.; SHIPPENBERG, T. S. Differential involvement of D1 and D2 dopamine receptors in the expression of morphine withdrawal in rats. **Behav Pharmacol**, v. 7, n. 5, p. 448-453, 1996.

GABRIEL, K. I.; CUNNINGHAM, C. L. Effects of topiramate on ethanol and saccharin consumption and preferences in C57BL/6J mice. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 29, n. 1, p. 75-80, 2005.

GALVEZ, T.; DUTHEY, B.; KNIAZEFF, J.; BLAHOS, J.; ROVELLI, G.; BETTLER, B.; Prézeau, L.; Pin, J. P. Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABAB receptor function. **EMBO J**, v. 20, p. 2152-2159, 2001.

GALVEZ, T.; URWYLER, S.; PREZEAU, L.; MOSBACHER, J.; JOLY, C.; MALITSCHKEK, B.; HEID, J.; BRABET, I.; FROESTL, W.; BETTLER, B.; KAUPMANN, K.; PIN, J. P. Ca^{2+} requirement for high-affinity gamma-aminobutyric acid (GABA) binding at GABA(B) receptors: involvement of serine 269 of the GABA(B)R1 subunit. **Mol Pharmacol**, v. 57, n. 3, p. 419-426, 2000.

GARDNER, E. L. Use of animal models to develop antiaddiction medications. **Curr Psychiatry Rep**, v. 10, n. 5, p. 377-384, 2008.

GASS, J. T.; OLIVE, M. F. Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. **Biochem Pharmacol**, v. 75, n. 1, p. 218-265, 2008.

GEBREMEDHIN, D.; LANGE, A. R.; CAMPBELL, W. B.; HILLARD, C. J.; HARDER, D. R. Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca^{2+} channel current. **Am J Physiol**, v. 276, n. 6, p. 85-93, 1999.

GERALD, C.; WALKER, M. W.; CRISCIONE, L.; GUSTAFSON, E. L.; HARTMANN, C. B.; SMITH, K. E.; VAYSSE, P.; DURKIN, M. M.; LAZ, T. M.; LINEMEYER, D. L.; SCHAFFHAUSER, A. O.; WHITEBREAD, S.; HOFBAUER, K. G.; TABER, R. I.; BRANCHEK, T. A.; WEINSHANK, R. L. A receptor subtype involved in neuropeptide-Y-induced food intake. **Nat**, v. 382, p. 168-171, 1996.

GERASIMOV, M. R.; DEWEY, S. L. Gamma-vinyl γ -aminobutyric acid attenuates the synergistic elevations of nucleus accumbens dopamine produced by a cocaine/heroin (speedball) challenge [In Process Citation]. **Eur J Pharmacol**, v. 380, n. 1, p. 1-4, 1999.

GESSA, G. L.; MUNTONI, F.; COLLU, M.; VARGIU, L.; MEREU, G. Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons of the ventral tegmental area. **Brain Res**, v. 348, n. 1, p. 201-203, 1985.

GEYER, M. A.; MARKOU, A. Animal models of psychiatric disorders. In: BLOOM, F. E.; KUPFER, D. J. (Ed.). **Psychopharmacology: the fourth generation of progress**. New York: Raven Press, 1995. p. 787-798.

GIANOULAKIS, C. Implications of endogenous opioids and dopamine in alcoholism: human and basic science studies. **Alcohol Alcohol**, v. 31, n. 1, p. 33-42, 1996.

GIBBS, J. W.; SOMBATI, S.; DELORENZO, R. J.; COULTER, D. A. Cellular actions of topiramate: blockade of kainate-evoked inward currents in cultured hippocampal neurons. **Epilepsia**, v. 41, n. 1, p.10-16, 2000.

GONZALES, R. A.; WEISS, F. Suppression of ethanol-reinforced behavior by naltrexone is associated with attenuation of the ethanol-induced increase in dialysate dopamine levels in the nucleus accumbens. **J Neurosci**, v. 18, n. 24, p. 10663-10671, 1998.

GORELICK, D. A; PAREDES, A. Effect of fluoxetine on alcohol consumption in male alcoholics. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 16, n. 2, p. 261-265, 1992.

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 behavior in mice. **Alcohol**, v. 12, n. 3, p. 177-181, 1995.

HAGAN, R. M.; JONES, B. J.; JORDAN, C. C.; TYERS, M. B. Effect of 5-HT₃ receptor antagonists on responses to selective activation of mesolimbic dopaminergic pathways in the rat. **Br J Pharmacol**, v. 99, n. 2, p. 227-232, 1990.

HAND, T. H.; KOOB, G. F.; STINUS, L. Aversive properties of opiate receptor blockade: evidence for exclusively central mediation in naive and morphine-dependent rats. **Brain Res**, v. 474, n. 2, p. 364-368, 1988.

HARAGUCHI, M.; SAMSON, H. H.; TOLLIVER, G. A. Reduction in oral ethanol self-administration in the rat by the 5-HT uptake blocker fluoxetine. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 35, n. 1, p. 259-262, 1990.

HARRIS, R. A.; MIHIC, S. J.; VALENZUELA, C. F. Alcohol and benzodiazepines: recent mechanistic studies. *Drug Alcohol Depend*, v. 51, n. 1-2, p. 155-164, 1998.

HEILIG, M.; WIDERLOV, E. Neurobiology and clinical aspects of neuropeptide Y. **Crit Rev Neurobiol**, v. 9, n. 2-3, p. 115-36, 1995.

HERRERO, A. I.; DEL OLMO, N.; GONZALEZ-ESCALADA, J. R.; SOLIS, J. M. Two new actions of topiramate: inhibition of depolarizing GABA(A)-mediated responses and activation of a potassium conductance. **Neuropharmacology**, v. 42, n. 2, p. 210-220, 2002.

HERZ, A. Endogenous opioid systems and alcohol addiction. **Psychopharmacology**, v. 129, n. 2, p. 99-111, 1996.

HILBROM, M. E. Alcohol withdrawal seizures and binge vs chronic drinking. In: PORT, R. J.; MATTSON, R. H.; CRAMER, J. A.; DIAMOND, I. **Alcohol and seizures: basic mechanisms and clinical concepts**. Philadelphia: FA Davis, 1990. p. 206-215.

HOFMANN, F.; FEIL, R.; KLEPPISCH, T.; SCHLOSSMANN, J. Function of cgmp-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. **Physiol Rev**, v. 86, n. 1, p. 1-23, 2006.

HOKFELT, T.; BROBERGER, C.; ZHANG, X.; DIEZ, M.; KOPP, J.; XU, Z. Q.; LANDRY, M.; BAO, L.; SCHALLING, M.; KOISTINAHO, J.; DEARMOND, S. J.; PRUSINER, S.; GONG, J.; WALSH, J. H. Neuropeptide Y: some viewpoints on a multifaceted peptide in

the normal and diseased nervous system. **Brain Res Rev**, v. 26, n. 2-3, p. 154-166, 1998.

HOLTER, S. M.; DANVSZ, W.; SAPANAGEL, R. The non-competitive NMDA receptor antagonist MRZ 2/579 suppresses the alcohol deprivation effect in long-term alcohol drinking rats and substitutes the alcohol cue in a discrimination task. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 292, n. 2, p. 545-552, 2000.

HOUCHI, H.; BABOVIC, D.; PIERREFICHE, O.; LEDENT, C.; DAOUST, M.; NAASSILA, M. CB1 receptor knockout mice display reduced ethanol-induced conditioned place preference and increased striatal dopamine d2 receptors. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, p. 339-349, 2005.

HOWLAND, J. G.; TAEPAVARAPRUK, P.; PHILLIPS, A. G. Glutamate receptor-dependent modulation of dopamine efflux in the nucleus accumbens by basolateral, but not central, nucleus of the amygdala in rats. **J Neurosci**, v. 22, n. 3, p. 1137-1145, 2002.

HSU, S. Y.; HSUEH, A. J. W. Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. **Nat**, v. 7, p. 605-611, 2001.

HUNGUND, B. L.; BASAVARAJAPPA, B. S.; VADASZ, C.; KUNOS, G.; FONSECA, F. R. de; COLOMBO, G.; SERRA, S.; PARSONS, L.; KOOB, G. F. Ethanol, endocannabinoids, and the cannabinoidergic signaling system. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 26, n. 4, p. 565-574, 2002.

HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C. Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, p. 695-703, 2001.

HYTTIA, P.; SCHULTEIS, G.; KOOB, G. F. Intravenous heroin and ethanol self-administration by alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. **Psychopharmacology**, v. 125, n. 3, p. 248-254, 1996.

IBBOTSON, T.; FIELD, M. J.; BODEN, P. R. Effect of chronic ethanol treatment in vivo on excitability in mouse cortical neurones in vitro. **Br J Pharmacol**, v. 122, n. 5, p. 956-962, 1997.

JAMAL, Y.; BOERNGEN-LACERDA, R. **Avaliação do efeito da Mianserina sobre o padrão de consumo de álcool em camundongos**. Dissertação – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

JANAK, P. H.; GILL, T. M. Comparison of the effects of allopregnanolone with direct GABAergic agonists on ethanol self administration with and without concurrently available sucrose. **Alcohol**, v. 30, n. 1, p. 1-7, 2003.

JOHNSON, B. A.; CAMPLING, G. M.; GRIFFITHS, P.; COWEN, P. J. Attenuation of some alcohol-induced mood changes and the desire to drink by 5-HT₃ receptor blockade: a preliminary study in healthy male volunteers. **Psychopharmacology**, v. 112, n. 1, p. 142-144, 1993.

JOHNSON, B. A.; COWEN, P. J. Alcohol-induced reinforcement: dopamine and 5-HT₃ receptor interactions in animals and humans. **Drug Dev Res**, v. 30, n. 3, p. 153-169, 1993.

JOHNSON, B. A.; AIT-DAOUD, N.; BOWDEN, C. L.; DICLEMENTE, C. C.; ROACHE J. D.; LAWSON, K.; JAVORS, M.; MA, J. Oral topiramate for treatment of alcohol dependence: a randomised controlled trial. **Lancet**, v. 361, n. 9370, p. 1677-1685, 2003.

JOHNSON, B. A.; O'MALLEY, S. S.; CIRAULO, D. A.; ROACHE, J. D.; CHAMBERS, R. A.; SARID-SEGAL, O; COUPER, D. Dose-ranging kinetics and behavioral

pharmacology of naltrexone and acamprosate, both alone and combined, in alcoholdependent subjects. **J Clin Psychopharmacol**, v. 23, n. 3, p. 281-293, 2003.

JOHNSON, B. A. Recent advances in the development of treatments for alcohol and cocaine dependence: focus on topiramate and other modulators of GABA or glutamate function. **CNS Drugs**, v. 19, n. 10, p. 873-896, 2005.

JOHNSON, B. A. Update on neuropharmacological treatments for alcoholism: scientific basis and clinical findings. **Biochem Pharmacol**, v. 75, n. 1, p. 34-56, 2008.

JOHNSTON, J. B. Further contributions to the study of the evolution of the forebrain. **J Comp Neurol**, v. 35, n. 2, p. 337-481, 1923.

KALIVAS, P. W.; VOLKOW, N. D. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. **Am J Psychiatry**, v. 162, p. 1403-1413, 2005.

KAMENETZKY, G. Y.; MUSTACA, A. E. Modelos animales para el estudio del alcoholismo. **Terapia Psicológica**, v. 23, n. 1, p. 63-72, 2005.

KNAPP, D. J.; OVERSTREET, D. H.; BREESE, G. R. Baclofen blocks expression and sensitization of anxiety-like behavior in an animal model of repeated stress and ethanol withdrawal. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 31, n. 4, p. 582-595, 2007.

KNIAZEFF, J.; SAINTOT, P. P.; GOUDET, C.; LIU, J.; CHARNET, A.; GUILLON, G.; PIN, J. P. Locking the dimeric GABAB G-protein coupled receptor in its active state. **J Neurosci**, v. 24, n. 2, p. 370-377, 2004.

KOHL, R. R.; KATNER, J. S.; CHARNET, E.; MCBRIDE, W. J. Ethanol and negative feedback regulation of mesolimbic dopamine release in rats. **Psychopharmacology**, v. 139, n. 1-2, p. 79-85, 1998.

KOOB, G. F. Cellular and Molecular Mechanisms of Drug Dependence. **Science**, v. 242, n. 4879, p. 715-723, 1988.

KOOB, G. F.; BLOOM, F. E. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. **Science**, v. 242, n. 4879, p. 715-723, 1988.

KOOB, G. F. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology, and function of reward pathways. **Trends Pharmacol Sci**, v. 13, p. 177-184, 1992a.

KOOB, G. F. Neural mechanisms of drug reinforcement. **Ann NY Acad Sci**, v. 654, p. 171-191, 1992b.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. **Science**, v. 278, n. 5335, p. 52-58, 1997.

KOOB, G. F.; HEINRICHS, S. C. A role for corticotropin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors. **Brain Res**, v. 848, n. 1-2, p. 141-152, 1999.

KOOB, G. F. Animal models of craving for ethanol. **Addiction**, v. 86, n. 2, p. 73-81, 2000.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 2, p. 97-129, 2001.

KOOB, G. F.; The neurobiology of addiction: a neuroadaptational view relevant for diagnosis. **Addiction**, v. 101, n. 1, p. 23-30, 2006.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. **Phil Trans Royal Society B Biol Sci**, v. 363, p. 3113-3123, 2008a.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Addiction and the brain antireward system. **Ann Rev Psychol**, v. 59, p. 29-53, 2008b.

KOOB, G. F. Dynamics of neuronal circuits in addiction: reward, antireward, and emotional memory. **Pharmacopsychiatry**, v. 42, p. 32-41, 2009a.

KOOB, G. F. The role of CRF and CRF-related peptides in the dark side of addiction. **Brain Res**, v.1314, p. 3-14, 2009b.

KOOB, G. F.; LLOYD, K.; MASON, B. J. Development of pharmacotherapies for drug addiction: a Rosetta Stone approach. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, p. 500-515, 2009.

KORNETSKY, C.; ESPOSITO, R. U. Euphorogenic drugs: effects on the reward pathways of the brain. **Fed Proc**, v. 38, n. 11, p. 2473-2476, 1979.

KOTLINSKA, J.; BOCHENSKI, M.; DANYSZ, W. N-Methyl-D-aspartate and group I metabotropic glutamate receptors are involved in the expression of ethanol-induced sensitization in mice. **Behav Pharmacol**, v. 17, n. 1, p.1-8, 2006.

KOYAMA, S.; BRODIE, M. S.; APPEL, S. B. Ethanol inhibition of m-current and ethanol-induced direct excitation of ventral tegmental area dopamine neurons. **J Neurophysiol**, v. 97, p. 1977-1985, 2007.

KRUPITSKY, E. M.; NEZNANOVA, O.; MASALOV, D.; BURAKOV, A. M.; DIDENKO, T.; ROMANOVA, T.; TSOY, M.; BESPALOV, A.; SLAVINA, T. Y.; GRINENKO, A. A.; PETRAKIS, I. L.; PITTMAN, B.; GUEORGUIEVA, R.; ZVARTAU, E. E.; KRYSTAL, J. H. Effect of memantine on cue-induced alcohol craving in recovering alcoholdependent patients. **Am J Psychiatry**, v. 164, p. 519-523, 2007.

KRYSTAL, J. H.; PETRAKIS, I. L.; KRUPITSKY, E.; SCHUTZ, C.; TREVISAN, L.; D'SOUZA, D. C. NMDA receptor antagonism and the ethanol intoxication signal: from alcoholism risk to pharmacotherapy. **Ann NY Acad Sci**, v. 1003, p. 176-184, 2003a.

KRYSTAL, J. H.; PETRAKIS, I. L.; MASON, G.; TREVISAN, L.; D'SOUZA, D. C. N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and alcoholism: reward, dependence, treatment, and vulnerability. **Pharmacol Ther**, v. 99, n. 1, p. 79-94, 2003b.

KUZMIN, A.; SANDIN, J.; TERENIUS, L.; OGREN, S. O. Acquisition, expression, and reinstatement of ethanol-induced conditioned place preference in mice: effects of opioid receptor-like 1 receptor agonists and naloxone. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 304, n. 1, p. 310-318, 2003.

LEE, Y. K.; PARK, S. W.; KIM, Y. K.; KIM, D. J.; JEONG, J.; MYRICK, H.; KIM, Y. H. Effects of naltrexone on the ethanol-induced changes in the rat central dopaminergic system. **Alcohol Alcohol**, v. 40, n. 4, p. 297-301, 2005.

LEWIS, K.; LI, C.; PERRIN, M. H.; BLOUNT, A.; KUNITAKE, K.; DONALDSON, C.; VAUGHAN, J.; REYES, T. M.; GULYAS, J.; FISCHER, W.; BILEZIKJIAN, L.; RIVIER, J.; SAWCHENKO, P. M.; VALE, W. W. Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 13, p. 7570-7575, 2001.

LHUILIER, L.; MOMBÉREAU, C.; CRYAN, J. F.; KAUPMANN, K. GABAB receptor positive modulation decreases selective molecular and behavioral effects of cocaine. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 2, p. 388-398, 2007.

LIANG, F.; HATANAKA, Y.; SAITO, H.; YAMAMORI, T.; HASHIKAWA, T. Differential expression of γ -aminobutyric acid type B receptor-1a and -1b mRNA variants in GABA and non-GABAergic neurons of the rat brain. **J Comp Neurol**, v. 416, n. 4, p. 475-495, 2000.

LIANG, J. H.; CHEN, F.; KRSTEW, E.; COWEN, M. S.; CARROLL, F. Y.; CRAWFORD, D.; BEART, P. M.; LAWRENCE, A. J. The GABAB receptor allosteric modulator CGP7930, like baclofen, reduces operant self-administration of ethanol in alcohol-preferring rats. **Neuropharmacology**, v. 50, n. 1, p. 632-639, 2006.

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

LIU, J.; GAO, B.; MIRSHAHI, F.; SANYAL, A. J.; KHANOLKAR, A. D.; MAKRIYANNIS, A.; KUNOS, G. Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. **Biochem J**, v. 346, n. 3, p. 835-840, 2000.

MA, J. Z.; AIT-DAOUD, N.; JOHNSON, B. A. Topiramate reduces the harm of excessive drinking: implications for public health and primary care. **Addiction**, v. 101, n. 11, p. 1561-1568, 2006.

MACCIONI, P.; FANTINI, N.; FROESTL, W.; GESSA, G. L.; CARAI, M. A. M.; COLOMBO, G. Specific reduction of alcohol's motivational properties by the positive allosteric modulator of the GABAB receptor, GS39783 comparison with the effect of the GABAB receptor direct agonist, baclofen. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 32, n. 9, p. 1558-1564, 2008.

MACCIONI, P.; PES, D.; ORRU, A.; FROESTL, W.; GESSA, G. L.; CARAI, M. A. M.; COLOMBO, G. Reducing effect of the positive allosteric modulator of the GABAB receptor, GS39783, on alcohol self-administration in alcohol-preferring rats. **Psychopharmacology**, v. 193, n. 2, p. 171-178, 2007.

MACCIONI, P.; SERRA, S.; VACCA, G.; ORRU, A.; PES, D.; AGABIO, R.; ADDOLORATO, G.; CARAI, M. A. M.; GESSA, G. L.; COLOMBO, G. Baclofen-induced

reduction of alcohol reinforcement in alcohol-preferring rats. **Alcohol**, v. 36, n. 3, p. 161-168, 2005.

MACLELLAN, A. T.; WOOD, G. E.; O'BRIEN, C. P. Development of psychiatric illness in drug abusers: possible role of drugs preference. **New Engl J Med**, v. 301, p. 1310-1314, 1979.

MALEC, T. S.; MALEC, E. A.; DONGIER, M. Efficacy of buspirone in alcohol dependence: a review. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 20, n. 5, p. 853-858, 1996.

MALGORZATA, F.; MALGORZATA, F.; EDMUND, P. Effects of GABAB receptor antagonist, agonists and allosteric positive modulator on the cocaine-induced self-administration and drug discrimination. **Eur J Pharmacol**, v. 574, n. 2-3, p. 148-157, 2007.

MALGORZATA, F.; MALGORZATA, F. GABAB receptors in drug addiction. **Pharmacol Rep**, v. 60, p. 755-770, 2008.

MALITSCHKEK, B.; SCHWEIZER, C.; KEIR, M.; HEID, J.; FROESTL, W.; MOSBACHER, J.; KUHN1, R.; HENLEY, J.; JOLY, C.; PIN, J. P.; KAUPMANN1, K.; BETTLER, B. The N-terminal domain of g-aminobutyric acidB receptors is sufficient to specify agonist and antagonist binding. **Mol Pharmacol**, v. 56, n. 2, p. 448-454, 1999.

MANZANARES, J.; ORTIZ, S.; OLIVA, J. M.; PEREZ-RIAL, S.; PALOMO, T. Interactions between cannabinoid and opioid receptor systems in the mediation of ethanol effects. **Alcohol Alcohol**, v. 40, n. 1, p. 25-34, 2005.

MARINELLI, P. W.; QUIRION, R.; GIANOULAKIS, C. An in vivo profile of beta-endorphin release in the arcuate nucleus and nucleus accumbens following exposure to stress or alcohol. **Neuroscience**, v. 127, n. 3, p. 777-784, 2004.

MARQUES, A. C. P. R.; RIBEIRO, M. **Abuso e dependência do Álcool**. Boletim Científico, Associação Brasileira de Psiquiatria, 2002.

MATSUDA, L. A.; LOLAIT, S. J.; BROWNSTEIN, M. J.; YOUNG, A. C.; BONNER, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nat**, v. 346, p. 561-564, 1990.

MATSUZAWA, S.; SUZUKI, T.; MISAWA, M.; NAGASE, H. Roles of 5-HT₃ and opioid receptors in the ethanol-induced place preference in rats exposed to conditioned fear stress. **Life Sci**, v. 64, n. 21, p. 241-249, 1999.

MCBRIDE, W. J.; MURPHY, J. M.; LUMENG, L.; LI, T. K. Serotonin and ethanol preference. **Recent Dev Alcohol**, v. 7, p. 187-209, 1989.

MCGEEHAN, A. J.; OLIVE, M. F. Attenuation of cocaine-induced reinstatement of cocaine conditioned place preference by acamprosate. **Behav Pharmacol**, v. 17, n. 4, p. 363-367, 2006.

MCMILLEN, B. A. Toward a definition of a valid animal model of alcoholism: multiple animal models for multiple diseases. **Alcohol**, v. 14, n. 4, p. 409-419, 1997.

MEERT, T. F. Effects of various serotonergic agents on alcohol intake and alcohol preference in Wistar rats selected at two different levels of alcohol preference. **Alcohol Alcohol**, v. 28, n. 2, p. 157-170, 1993.

MOGENSON, G. J.; JONES, D. L.; YIM, C. Y. From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. **Prog Neurobiol**, v. 14, n. 2-3, p. 69-97. 1980.

MOGHADDAM, B.; BOLINAO, M. L. Biphasic effect of ethanol on extracellular accumulation of glutamate in the hippocampus and the nucleus accumbens. **Neurosci Lett**, v. 178, n. 1, p. 99-102, 1994.

MORISHITA, R.; KATO, K.; ASANO, T. GABAB receptors couple to G proteins Go, Go* and Gi1 but not to Gi2. **FEBS Lett**, v. 271, n. 1-2, p. 231-235, 1990.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; SHAAR, M. A. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nat**, v. 365, p. 61-65, 1993.

MURPHY, J. M.; WALLER, M. B.; GATTO, G. J.; MCBRIDE, W. J.; LUMENG, L.; LI, T. K. Effects of fluoxetine on the intragastric selfadministration of ethanol in the alcohol preferring P line of rats. **Alcohol**, v. 5, n. 4, p. 283-286, 1988.

MYERS, R. D.; LANKFORD, M. F. Suppression of alcohol preference in high alcohol drinking rats: efficacy of amperozide versus naltrexone. **Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 2, p. 139-149, 1996.

NAASSILA, M.; PIERREFICHE, O.; LEDENT, C.; DAOUST, M. Decreased alcohol self-administration and increased alcohol sensitivity and withdrawal in CB1 receptor knockout mice. **Neuropharmacology**, v. 46, n. 2, p. 243-253, 2004.

NACHMAN, M.; LESTER, D.; LE MAGNEN, J. Alcohol aversion in the rat: behavioral assessment of noxious drug effects. **Science**, v. 168, n. 3936, p. 1244-1246, 1970.

NARANJO, C. A.; POULOS, C. X.; BREMNER, K. E.; LANCTOT, K. L. Citalopram decreases desirability, liking, and consumption of alcohol in alcohol-dependent drinkers. **Clin Pharmacol Ther**, v. 51, p. 729-739, 1992.

NARANJO, C. A.; SELLERS, E. M. Serotonin uptake inhibitors attenuate ethanol intake in problem drinkers. **Recent Dev Alcohol**, v. 7, p. 255-266, 1989.

NESTLER, E. J.; Is there a common molecular pathway for addiction? **Nat neuroscience**, v.8, n.11, p. 1445 – 1449, 2005.

NICCOLS, A. Fetal alcohol syndrome and the developing socio-emotional brain. **Brain Cogn**, v. 65, n. 1, p. 135-142, 2007.

NIE, Z.; MADAMBA, S. G.; SIGGINS, G. R. Ethanol inhibits glutamatergic neurotransmission in nucleus accumbens neurons by multiple mechanisms. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 271, n. 3, p. 1566-1573, 1994.

NIEBER, K.; POELCHEN, W.; SIELER, D.; ILLES, P. Inhibition by ethanol of excitatory amino acid receptors in rat locus coeruleus neurons in vitro. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 357, n. 3, p. 299-308, 1998.

O'MALLEY, S. S.; JAFFE, A. J.; CHANG, G.; RODE, S.; SCHOTTENFELD, R.; MEYER, R. E.; ROUNSAVILLE, B. Six-month follow-up of naltrexone and psychotherapy for alcohol dependence. **Arch Gen Psychiatry**, v. 53, n. 3, p. 217-224, 1996.

O'SHEA, B. Disulfiram revisited. **Hosp Med**, v. 61, n. 12, p. 849-851, 2000.

ODO, S. A.; ARAÚJO, A. C.; SANTOS, A. F.; TOLEDO, F. C. P.; YONAMINE, M.; SILVA, O. A.; LEITE, M. C. Indicações e limites das análises toxicológicas para substâncias psicoativas. **Rev Psiquiatr Clin**, v. 27, n. 1, p. 50-56, 2000.

OLDS, J.; MILNER, P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. **J Comp Physiol Psychol**, v. 47, p. 419-427, 1954.

OOTEMAN, W.; KOETER, M. W.; VERHEUL, R.; SCHIPPERS, G. M.; VAN DEN BRINK, W. The effect of naltrexone and acamprosate on cue-induced craving, autonomic nervous system and neuroendocrine reactions to alcohol-related cues in alcoholics. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 17, n. 8, p. 558-566, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde. CID 10. 8. São Paulo: EDUSO, 2000.

PACHER, P.; BÁTKAI, S.; KUNOS, G. Blood pressure regulation by endocannabinoids and their receptors. **Neuropharmacology**, v. 48, n. 8, p. 1130-1138, 2005.

PALMITER, R. D.; ERICKSON, J. C.; HOLLOPETER, G.; BARABAN, S. C.; SCHWARTZ, M. W. Life without neuropeptide Y. **Recent Prog Horm Res**, v. 53, p. 163-199, 1998.

PANDEY, S. C. Anxiety and alcohol abuse disorders: a common role for CREB and its target, the neuropeptide Y gene. **Trends Pharmacol Sci**, v. 24, n. 9, p. 456-460, 2003.

PANDEY, S. C.; CARR, L. G.; HEILIG, M.; ILVESKOSKI, E.; THIELE, T. E. Neuropeptide Y and alcoholism: genetic, molecular, and pharmacological evidence. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 27, n. 2, p. 149-154, 2003.

PETRAKIS, I. L.; CARROLL, K. M.; NICH, C.; GORDON, L. T.; MCCANCE-KATZ, E. F.; FRANKFORTER, T.; ROUNSAVILLE, B. J. Disulfiram treatment for cocaine dependence in methadone maintained opioid addicts. **Addiction**, v. 95, n. 2, p. 219-228, 2000.

PIERCE, R. C.; KALIVAS, P. W. A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetaminelike psychostimulants. **Brain Res Rev**, v. 25, n. 2, p. 192-216, 1997.

PIN, J. P.; PREZEAU L. Allosteric modulators of GABAB receptors: mechanism of action and therapeutic perspective. **Curr Neuropharmacol**, v. 5, n. 3, p. 195-201, 2007.

PONTIERI, F. E.; TANDA, G.; DI CHIARA, G. Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the “shell” as compared with the “core” of the rat nucleus accumbens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 26, p. 12304-12308, 1995.

PUTZKE, J.; SPANAGEL, R.; TOLLE, T. R.; ZIEGLGANSBERGER, W. The anti-craving drug acamprosate reduces c-fos expression in rats undergoing ethanol withdrawal. **Eur J Pharmacol**, v. 317, n. 1, p. 3948, 1996.

RESCH, G. E.; SHRIDHARANI, S.; MILLINGTON, W. R.; GARRIS, D. R.; SIMPSON, C. W. Glycyl-glutamine in nucleus accumbens reduces ethanol intake in alcohol preferring (P) rats. **Brain Res**, v. 1058, n. 1-2, p. 73-81, 2005.

REYES, T. M.; LEWIS, K.; PERRIN, M. H.; KUNITAKE, K. S.; VAUGHAN, J.; ARIAS, C. A.; HOGENESCH, J. B.; GULYAS, J.; RIVIER, J.; VALE, W. W.; SAWCHENKO, P. E. Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 5, p. 2843-2848, 2000.

RIVIER, C. L.; PLOTSKY, P. M. Mediation by corticotropin releasing factor (CRF) of adenohipophyseal hormone secretion. **Annu Rev Physiol**, v. 48, p. 475-494, 1986.

ROBERTS, A. J.; MCARTHUR, R. A.; HULL, E. E.; POST, C.; KOOB, G. F. Effects of amperozide, 8-OH-DPAT, and FG 5974 on operant responding for ethanol. **Psychopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 25-32, 1998.

ROBERTS, D. C.; ANDREWS, M. M.; VICKERS, G. J. Baclofen attenuates the reinforcing effects of cocaine in rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 15, n. 4, p. 417-423, 1996.

ROBLEDO, P.; KANEKO, W.; EHLERS, C. L. Combined effects of ethanol and MK 801 on locomotor activity in the rat. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 39, n. 2, p. 513-516, 1991.

ROY, A.; PANDEY, S. C. The decreased cellular expression of neuropeptide Y protein in rat brain structures during ethanol withdrawal after chronic ethanol exposure. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 26, n. 6, p. 796-803, 2002.

RYABININ, A. E.; WEITEMIER, A. Z. The urocortin 1 neurocircuit: ethanol-sensitivity and potential involvement in alcohol consumption. **Brain Res Rev**, v. 52, n. 2, p. 368-380, 2006.

SANNA, E.; SERRA, M.; COSSU, A.; COLOMBO, G.; FOLLESA, P.; CUCCHEDDU T.; CONCAS, A.; BIGGIO, G. Chronic ethanol intoxication induces differential effects on GABAA and NMDA receptor function in the rat brain. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 17, n. 1, p. 115-123, 1993.

SCHULTZ, W. Predictive reward signal of dopamine neurons. **J Neurophysiol**, v. 80, n. 1, p. 1-27, 1998.

SERRA, S.; BRUNETTI, G.; VACCA, G.; LOBINA, C.; CARAI, M. A. M.; GESSA, G. L.; COLOMBO, G. Stable preference for high ethanol concentrations after alcohol deprivation in Sardinian alcohol-preferring (sP) rats. **Alcohol**, v. 29, n. 2, p. 101-108, 2003.

SHAHAM, Y.; SHALEV, U.; LU, L.; DE WIT, H.; STEWART, J. The reinstatement model of drug relapse: history, methodology and major findings. **Psychopharmacology**, v. 168, n. 1-2, 3-20, 2003.

SHANK, R. P.; GARDOCKI, J. F.; STREETER, A. J.; MARYANOFF, B. E. An overview of the preclinical aspects of topiramate: pharmacology, pharmacokinetics, and mechanism of action. **Epilepsia**, v. 41, n. 1, p.3-9, 2000.

SHEN, E. H.; PHILLIPS, T. J. MK-801 Potentiates ethanol's effects on locomotor activity in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 59, n. 1, p. 135-143, 1998.

SHIPPENBERG, T. S.; KOOB, G. F. Recent advances in animal models of drug addiction and alcoholism. In: DAVIS, K. L.; CHARNEY, D.; COYLE, J. T.; NEMEROFF, C. **Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress**. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2002. p. 1381-1397.

SILVERI, M. M.; SPEAR, L. P. The effects of nmda and GABAA pharmacological manipulations on acute and rapid tolerance to ethanol during ontogeny. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 28, n. 6, p. 884-894, 2004.

SMITH, M. A.; YANCEY, D. L.; MORGAN, D.; LIU, Y.; FROESTL, W.; ROBERTS, D. C. Effects of positive allosteric modulators of the GABAB receptor on cocaine self-administration in rats. **Psychopharmacology**, v. 173, n. 1-2, p. 105-111, 2004.

SOLOMONS, T. W. G.; FRUHLE, C. B. **Química Orgânica**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC –Livros Técnicos e Científicos Editora S. A. 2001.

SPANAGEL, R.; PUTZKE, J.; STEFFERL, A.; SCHOBITZ, B.; ZIEGLGANSBERGER, W. Acamprosate and alcohol: II. Effects on alcohol withdrawal in the rat. **Eur J Pharmacol**, v. 305, n. 1-3, p. 45-50, 1996.

SPANAGEL, R.; HÖLTER, S. M. Long-term alcohol self-administration with repeated alcohol deprivation phases: an animal model of alcoholism? **Alcohol Alcohol**, v. 34, n. 2, p. 231-243, 1999.

SPANAGEL, R.; WEISS, F. The dopamine hypothesis of reward: past and current status. **Trends Neurosci**, v. 22, n. 11, p. 521-527, 1999.

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

SPANAGEL, R.; HÖLTER, S. M. Pharmacological validation of a new animal model of alcoholism. **J Neural Transm**, v. 107, n. 6, p. 669-680, 2000.

SPANAGEL, R. Alcohol addiction research: from animal models to clinics. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 17, n. 4, p. 507-518, 2003.

SPANAGEL, R.; SIEGMUND, S.; COWEN, M.; SCHROFF, K. C.; SCHUMANN, G.; FISEROVA, M.; SILLABER, I.; WELLEK, S.; SINGER, M.; PUTZKE, J. The neuronal nitric oxide synthase gene is critically involved in neurobehavioral effects of alcohol. **J Neurosci**, v. 22, n. 19, p. 8676-8683, 2002.

SPANAGEL, R. Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior. **Physiol Rev**, v. 89, n. 2, p. 649-705, 2009.

STEINER, H.; GERFEN, C. R. Dynorphin regulates di dopamine receptor-mediated responses in the striatum: relative contributions of pre and postsynaptic mechanisms in dorsal and ventral striatum demonstrated by altered immediate-early gene induction. **J Comp Neurol**, v. 376, n. 4, p. 530-541, 1996.

SUTTON, R. E.; KOOB, G. F.; LE MOAL, M.; RIVIER, J.; VALE, W. Corticotropin releasing factor produces behavioural activation in rats. **Nat**, v. 297, n. 5864, p. 331-333, 1982.

SVENSSON, L.; FAHLKE, C.; HARD, E.; ENGEL, J. A. Involvement of the serotonergic system in ethanol intake in the rat. **Alcohol**, v. 10, n. 3, p. 219-224, 1993.

SWANSON, L. W.; SAWCHENKO, P. E.; RIVIER, J.; VALE, W. W. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. **Neuroendocrinology**, v. 36, n. 3, p. 165-186, 1983.

SWERDLOW, N. R.; GILBERT, G.; KOOB, G. F. Conditioned drug effects on spatial preference: critical evaluation. In: BOULTON, A. A.; BAKER, G. B.; GREENSHAW, A. J. **Psychopharmacology**. Clinton: Humana Press, 1989. p. 399-446.

SWIFT, R. M.; DAVIDSON, D.; WHELIHAN, W.; KUZNETSOV, O. Ondansetron alters human alcohol intoxication. **Biol Psychiatry**, v. 40, n. 6, p. 514-521, 1996.

SWIFT, R. M.; WHELIHAN, W.; KUZNETSOV, O.; BUONGIORNO, G.; HSUING, H. Naltrexone-induced alterations in human ethanol intoxication. **Am J Psychiatry**, v. 151, p. 1463-1467, 1994.

TATEMOTO, K. Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 79, n. 18, p. 5485-5489, 1982.

TAVERNA, S.; SANCINI, G.; MANTEGAZZA, M.; FRANCESCHETTI, S.; AVANZINI, G. Inhibition of transient and persistent Na⁺ current fractions by the new anticonvulsant topiramate. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 288, n. 3, p. 960-968, 1999.

THIELE, T. E.; MARSH, D. J.; MARIE L. S.; BERNSTEIN, I. L.; PALMITER, R. D. Ethanol consumption and resistance are inversely related to neuropeptide Y levels. **Nat**, v. 396, n. 26, p. 366-369, 1998.

THOMAS, M. J.; KALIVAS, P. W.; SHAHAM, Y. Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. **Br J Pharmacol**, v. 154, n. 2, p. 327-342. 2008.

TIMPL, P.; SPANAGEL, R.; SILLABER, I.; KRESSE, A.; REUL, J.M.H.M.; STALLA, G. K.; BLANQUET, V.; STECKLER, T.; HOLSBOER, F.; WURST, W. Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. **Nat Genet**, v. 19, p. 162-166, 1998.

TOMKINS, D. M; SELLERS, E. M. Addiction and brain: the role of neurotransmitters in the cause and treatment of drug dependence. **CMAJ**, v. 164, n. 6, p. 817-821, 2001.

TORREGROSSA, M. M.; KALIVAS, P. W. Microdialysis and the neurochemistry of addiction. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 90, n. 2, p. 261-272, 2008.

TSUJI, M.; NAKAGAWA, Y.; ISHIBASHI, Y.; YOSHII, T.; TAKASHIMA, T.; SHIMADA, M.; SUZUKI, T. Activation of ventral tegmental GABAB receptors inhibits morphine-induced place preference in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 313, n. 3, p. 169-173, 1996.

TZSCHENTKE, T. M. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. **Prog Neurobiol**, v. 56, p. 613-672, 1998.

TZSCHENTKE, T. M. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. **Addict Biol**, v. 12, n. 3-4, p. 227-462, 2007.

UGEDO, L.; GRENHOFF, J.; SVENSSON, T. H. Ritanserin, a 5-HT₂ receptor antagonist, activates midbrain dopamine neurons by blocking serotonergic inhibition. **Psychopharmacology**, v. 98, n. 1, p. 45-50, 1989.

UNGLESS, M. A.; WHISTLER, J. L.; MALENKA, R. C.; BONCI, A. Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. **Nat**, v. 411, p. 583-587, 2001.

URWYLER, S.; MOSBACHER, J.; LINGENHOEHL, K.; HEID, J.; HOFSTETTER, K.; FROESTL, W.; BETTLER, B.; KAUPMANN, K. Positive allosteric modulation of native and recombinant gamma-aminobutyric acid(B) receptors by 2,6- Di-tert-butyl-4-(3-hydroxy-2,2-dimethyl-propyl)-phenol (CGP7930) and its aldehyde analog CGP13501. **Mol Pharmacol**, v. 60, n. 5, p. 963-971, 2001.

URWYLER, S.; GJONI, T.; KAUPMANN, K.; POZZA, M. F.; MOSBACHER, J. Selected amino acids, dipeptides and arylalkylamine derivatives do not act as allosteric modulators at GABAB receptors. **Eur J Pharmacol**, v. 483, n. 2-3, p. 147-153, 2004.

VALDEZ, G. R.; SABINO, V.; KOOB, G. F. Increased anxiety-like behavior and ethanol self-administration in dependent rats: reversal via corticotropin-releasing factor-2 receptor activation. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 28, n. 6, p. 865-872, 2004.

VALE, W.; SPIESS, J.; RIVIER, C.; RIVIER, J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β -endorphin. **Science**, v. 213, p. 1394-1397, 1981.

VAUGHAN, J.; DONALDSON, C.; BITTERCOURT, J.; PERRIN, M. H.; LEWIS, K.; SUTTON, S.; CHAN, R.; TURNBULL, A. V.; LOVEJOY, D.; RIVIER, C.; VENGELIENE, V.; VOLLMAYER, B.; HENN, F. A.; SPANAGEL, R. Alcohol self-administration in two rat lines selectively bred for helplessness and non-helplessness behavior. **Psychopharmacology**, v. 178, p. 125-132, 2005.

VENGELIENE, V.; BILBAO, A.; MOLANDER, A.; SPANAGEL R. Neuropharmacology of alcohol addiction. **Br J Pharmacol**, v. 154, n. 2, p. 299-315, 2008.

VIENNE J, BETTLER B, FRANKEN P, TAFTI M. Differential effects of GABAB receptor subtypes, γ -hydroxybutyric Acid, and Baclofen on EEG activity and sleep regulation. **J Neurosci**, v. 30, n. 42, p. 194-204, 2010.

VOLKOW, N. D; FOWLER, J. S.; WANG, G. J; SWANSON, J. M.; TELANG, F. Dopamine in drug abuse and addiction: results of imaging studies and treatment implications. **Arch Neurol**, v. 64, n. 11, p. 1575-1579. 2007.

WALKER, B. M.; KOOB, G. F. The γ -aminobutyric acid-B receptor agonist baclofen attenuates responding for ethanol in ethanol-dependent rats. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 31, n. 1, p. 11-18, 2007.

WEISS, F.; PORRINO, L. J. Behavioral Neurobiology of alcohol addiction: recent advances and challenges. **J Neurosci**, v. 22, n. 9, p. 3332-3337, 2002.

WEISS, F.; CICCOCIOPPO, R.; PARSONS, L. H.; KATNER, S.; LIU, X.; ZORRILLA, E. P. Compulsive drug-seeking behavior and relapse: neuroadaptation, stress, and conditioning factors. **Ann NY Acad Sci**, v. 937, p. 1-26, 2001.

WERNER, C.; RAIVICH, G.; COWEN, M.; STREKALOVA, T.; SILLABER, I.; BUTERS, J. T.; SPANAGEL, R.; HOFMANN, F. Importance of NO/cGMP signalling via cGMP-dependent protein kinase II for controlling emotionality and neurobehavioural effects of alcohol. **Eur J Neurosci**, v. 20, n. 12, p. 3498-3506, 2004.

WHITE, H. S.; BROWN, S. D.; WOODHEAD, J. H.; SKEEN, G. A.; WOLF, H. H. Topiramate modulates GABA-evoked currents in murine cortical neurons by a nonbenzodiazepine mechanism. **Epilepsia**, v. 41, n. 1, p. 17-20, 2000.

WHO ASSIST WORKING GROUP – ALI R, AWWAD R, BABOR T, BRADLEY F, BUTAU T, FARRELL, M, FORMIGONI ML, ISRALOWITZ R, LACERDA RB, MARSDEN BM, MC REE B, MONTEIRO M, PAL H, RUBIO-STIPEC M, VENDETTI J.

The alcohol, smoking and substance involvement screening test (ASSIST): development, reability and feasibility. **Addiction**; n. 97, p. 1183-1194, 2002.

WILSON, W. R.; BOSY, T. Z.; RUTH, J. A. NMDA agonists and antagonists alter the hypnotic response to ethanol in LS and SS mice. **Alcohol**, v. 7, n. 5, p. 389-395, 1990.

WIRKNER, K.; EBERTS, C.; POELCHEN, W.; ALLGAIER, C.; ILLES, P. Mechanism of inhibition by ethanol of NMDA and AMPA receptor channel functions in cultured rat cortical neurons. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 362, n. 6, p. 568-576, 2000.

WISE, R. A. Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. **Neuron**, v. 36, n. 2, p. 229-240, 2002.

WOLFFGRAMM, J.; HEYNE, A. From controlled drug intake to loss of control: the irreversible development of drug addiction in the rat. **Rev Behav Brain Res**, v. 70, n. 1, p. 77-94, 1995.

WOLFFGRAMM, J.; GALLI, G.; THIMM, F.; HEYNE, A. Animal models of addiction: models for therapeutic strategies? **J Neural Transm**, v. 107, n. 6, p. 649-668, 2000.

WOOLVERTON, W. L.; JOHNSON K. M. Neurobiology of cocaine abuse. **Science**, v. 13, n. 5, p. 193-200, 1992.

XI, Z. X.; STEIN, E. A. Baclofen inhibits heroin self-administration behavior and mesolimbic dopamine release. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 290, n. 3, p. 1369-1374, 1999.

YAMADA, K.; SHIBASAKI, T.; TSUMORI, C.; IMAKI, T.; HOTTA, M.; WAKABAYASHI, I.; DEMURA, H. Neuropeptide Y reverses corticotropin-releasing hormone- and

psychological stress-caused shortening of sodium pentobarbital-induced sleep in rats. **Brain Res**, v. 725, n. 2, p. 272-275, 1996.

ZALEWSKA-KASZUBSKA, J.; GORSKA, D.; DYR, W.; CZARNECKA, E. Effect of acute administration of ethanol on beta-endorphin plasma level in ethanol preferring and non-preferring rats chronically treated with naltrexone. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 85, n. 1, p. 155-159, 2006.

ZHANG, X.; VELUMIAN, A. A.; JONES, O. T.; CARLEN, P. L. Modulation of high-voltage-activated calcium channels in dentategranule cells by topiramate. **Epilepsia**, v. 41, n. 1, p. 52-60, 2000.

APÊNDICE 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS ANIMAIS

TABELA 1 - PADRÃO INDIVIDUAL DE CONSUMO DE ETANOL DO GRUPO ADICTO

ANIMAL	GRUPO ADICTO						
	CONSUMO DE ETANOL AO LONGO DAS FASES (g/kg/dia)			H (3,39) (p)	PREFERÊNCIA		
	AC	RE	AD		AC	RE	AD
2	14 (9-15)	11 (11-20)	14 (13-16)	14.8 (.002)	E	E	E
4	10 (7-11)	11 (11-22)	14 (11-16)*	18.8 (.0003)	E	E	E
17	7 (5-10)	7 (7-17)	6 (5-7)	11.5 (.01)	E	N	N
18	6 (5-13)	13 (13-25)	12 (9-13)	14.3 (.003)	N	E	E
24	8 (5-17)	9 (8-11)	8 (5-8)	5.3 (.15)	N	E	N
26	13 (9-15)	7 (7-26)	15 (7-16)	17.3 (.001)	E	E	N
27	17 (12-28)	21 (12-25)	16 (9-16)	6.4 (.10)	E	E	N
28	9 (7-12)	7 (7-25)	8 (6-9)	13.2 (.005)	N	N	N
31	15 (11-18)	14 (14-31)	15 (3-15)	10.9 (.02)	E	E	E
51	8 (4-13)	5 (5-32)	8 (6-10)	13.8 (.004)	N	E	N
58	11 (10-13)	13 (13-21)	12 (10-13)	9.4 (.03)	E	E	E
63	16 (15-20)	9 (9-22)	9 (6-36)	13.1 (.005)	E	E	N
64	8 (6-11)	7 (7-17)	7 (5-8)	13.7 (.004)	E	E	N
65	13 (8-15)	8 (8-27)	13 (12-13)	16.8 (.001)	E	E	E
70	11 (7-13)	10 (8-28)	9 (9-9)	9.5 (.03)	E	E	E

*Diferente da fase de AC (Teste de Mann Whitney , $p < .05$)

N = Sem preferência entre etanol e água; E = Preferência por etanol; W = preferência por água.

TABELA 2 - PADRÃO INDIVIDUAL DE CONSUMO DE ETANOL DO GRUPO PESADO

ANIMAL	GRUPO PESADO						
	CONSUMO DE ETANOL AO LONGO DAS FASES (g/kg/dia)			H (3, 39) (p)	PREFERÊNCIA		
	AC	RE	AD		AC	RE	AD
3	14 (12-13)	9 (9-25)	8 (8-8)*	18.6 (.0003)	N	N	W
16	8 (6-10)	6 (6-15)	5 (5-7)*	20.1 (.0002)	E	E	W
19	12 (10-17)	6 (5-17)	8 (7-8)*	26.6 (.00001)	E	E	N
20	8 (7-10)	5 (5-11)	5 (3-10)*	19.5 (.0002)	E	E	W
29	9 (8-11)	9 (8-22)	7 (6-10)*	14.6 (.003)	E	E	N
34	15 (12-16)	11 (11-29)	5 (5-8)*	29.8 (.00001)	E	E	W
43	9 (6-12)	6 (6-22)	5 (3-6)*	22.5 (.0001)	N	N	W
44	10 (8-12)	10 (8-25)	5 (5-7)*	24.6 (.00001)	E	E	W
46	9 (7-14)	8 (8-25)	5 (4-9)*	16.3 (.001)	N	E	W
48	8 (5-9)	6 (6-25)	5 (5-7)*	14.7 (.002)	N	N	W
49	10 (8-14)	8 (8-19)	6 (6-8)*	22.9 (.00001)	E	E	N
52	11 (7-15)	6 (6-29)	6 (3-8)*	23.4 (.00001)	N	N	W
53	11 (8-14)	13 (10-21)	6 (5-7)*	25.0 (.00001)	E	E	W
54	14 (9-18)	11 (11-29)	6 (6-10)*	21.1 (.0001)	E	N	W
66	18 (13-23)	10 (10-30)	11 (10-21)*	22.0 (.0001)	E	W	N
67	7 (5-9)	6 (6-20)	4 (3-6)*	15.9 (.001)	E	E	W

*Diferente da fase de AC (Teste de Mann Whitney , $p < .05$)

N = Sem preferência entre etanol e água; E = Preferência por etanol; W = preferência por água.

TABELA 3 - PADRÃO INDIVIDUAL DE CONSUMO DE ETANOL DO GRUPO LEVE

ANIMAL	GRUPO LEVE						
	CONSUMO DE ETANOL AO LONGO DAS FASES (g/kg/dia)			H (p)	PREFERÊNCIA		
	AC	RE	AD		AC	RE	AD
6	7 (4-8)	15 (15-20)	8 (7-10)	21.4 (.0001)	W	E	W
8	5 (3-7)	4 (4-19)	5 (3-6)	13.6 (.004)	W	W	W
9	5 (3-6)	5 (5-21)	5 (3-6)	12.1 (.01)	W	W	W
11	5 (2-7)	7 (7-26)	6 (4-7)	12.6 (.01)	W	E	W
12	4 (3-6)	5 (5-22)	5 (4-6)	11.4 (.01)	W	W	W
13	4 (2-4)	3 (3-15)	4 (3-5)	16.0 (.001)	W	W	W
22	4 (3-8)	3 (3-9)	4 (3-5)	19.7 (.0002)	W	W	W
30	8 (4-13)	8 (8-19)	5 (5-6)	13.5 (.004)	W	N	W
33	5 (3-6)	6 (6-20)	4 (2-5)	15.3 (.002)	W	W	W
36	5 (3-7)	6 (6-23)	4 (3-5)	14.4 (.003)	W	W	W
38	6 (4-8)	6 (6-27)	5 (3-6)	11.9 (.01)	W	W	W
39	5 (3-8)	7 (6-25)	4 (3-5)	12.6 (.01)	W	W	W
40	5 (5-11)	8 (8-23)	5 (4-5)	13.3 (.004)	W	E	W
41	4 (3-6)	4 (4-21)	3 (2-4)*	15.1 (.002)	W	W	W
56	6 (4-8)	5 (5-17)	4 (4-5)	13.9 (.003)	W	W	W
59	6 (4-16)	6 (6-26)	4 (2-6)*	14.8 (.002)	N	W	W
61	6 (4-12)	6 (6-21)	5 (3-5)*	12.4 (.01)	N	N	W
62	6 (4-11)	7 (7-27)	7 (4-9)	10.6 (.02)	W	W	N
68	5 (4-7)	4 (4-20)	4 (3-5)	12.6 (.01)	W	W	W
69	6 (4-8)	7 (5-22)	5 (4-5)	8.2 (.05)	W	W	W

*Diferente da fase de AC (Teste de Mann Whitney , $p < .05$)

N = Sem preferência entre etanol e água; E = Preferência por etanol; W = preferência por água.

TABELA 4 - PADRÃO INDIVIDUAL DE CONSUMO DE ETANOL DO GRUPO INDEFINIDO

ANIMAL	GRUPO INDEFINIDO						
	CONSUMO DE ETANOL AO LONGO DAS FASES (g/kg/dia)			H (p)	PREFERÊNCIA		
	AC	RE	AD		AC	RE	AD
1	13 (9-18)	10 (10-24)	8 (6-10)*	16.2 (.001)	E	E	E
5	13 (12-17)	9 (9-25)	10 (6-10)*	29.5 (.00001)	E	E	E
10	12 (11-14)	12 (10-19)	9 (9-10)*	16.6 (.001)	E	E	E
23	16 (9-25)	16 (16-16)	9 (9-11)*	8.9 (.03)	E	E	E
32	7 (5-8)	9 (9-25)	8 (7-9)	12.5 (.01)	W	N	E
35	15 (11-16)	14 (14-31)	8 (6-11)*	18.9 (.0003)	E	E	E

*Diferente da fase de AC (Teste de Mann Whitney , $p < .05$)

N = Sem preferência entre etanol e água; E = Preferência por etanol; W = preferência por água.

APÊNDICE 2 – DADOS COMPORTAMENTAIS

TABELA 1. TESTES COMPORTAMENTAIS DESENVOLVIDOS EM DUAS ETAPAS NA FASE DE ABSTINÊNCIA (TESTE 1 E TESTE 2).

Parâmetros analisados	Grupo Adicto		Grupo Pesado		Grupo Leve		Grupo controle	
	Teste 1	Teste 2	Teste 1	Teste 2	Teste 1	Teste 2	Teste 1	Teste 2
AM CM_ABS	94,4 (65,0-109,0)	89,3 (72,0-105,0)	98,5 (70,5-116,5)	96,5 (66,5-118,0)	90,0 (71,0-105,0)	92,0 (78,0-115,0)	73,0 (51,0-102,0)	89,0 (68,0-107,0)
LA PM_ABS	7,5 (3,0-11,0)	5,1 (2,0-4,0)	5,0 (2,0-10,5) <i>p < 0,03</i>	1,5 (1,0-3,0)* <i>p < 0,03</i>	4,5 (2,0-12,0)	2,0 (1,0-6,0)	5,0 (2,0-23,0)	3,0 (1,0-14,0)
EF PM_ABS	8,5 (6,0-10,0)	8,7 (7,0-11,0)	7,5 (5,0-10,0) <i>p < 0,004</i>	9,0 (6,5-13,5)* <i>p < 0,004</i>	7,0 (6,0-10,0) <i>p < 0,04</i>	10,0 (1,0-29,0)* <i>p < 0,04</i>	9,0 (8,0-10,0)	11,5 (6,0-14,0)
TF PM_ABS	75,9 (46,0-98,0)	80,9 (50,0-95,0)	57,5 (43,0-73,5) <i>p < 0,02</i>	69,5 (56,0-82,5)* <i>p < 0,02</i>	82,0 (64,0-95,0)	86,0 (68,0-125,0)	77,0 (69,0-121,0)	92,5 (63,0-128,0)
EA PM_ABS	8,6 (5,0-12,0)	8,5 (4,0-12,0)	9,0 (6,0-13,0)	8,0 (3,5-12,5)	5,0 (3,0-6,0)	5,0 (2,0-10,0)	5,5 (3,0-9,0)	7,0 (2,0-11,0)
TA PM_ABS	64,3 (36,0-93,0)	51,0 (25,0-72,0)	89,5 (53,0-108,0) <i>p < 0,001</i>	46,0 (28,5-65,0)* <i>p < 0,001</i>	57,0 (15,0-76,0)	35,0 (10,0-52,0)	50,0 (18,0-102,0)	39,0 (8,0-76,0)
%TA_ABS	35,7 (20,0-51,7)	28,3 (13,8-40,0)	49,7 (29,4-60,0) <i>p < 0,001</i>	25,6 (15,8-52,5)* <i>p < 0,001</i>	31,7 (8,3-42,2)	19,4 (5,5-28,9)	27,8 (10,0-56,7)	21,7 (4,4-42,2)
LA OP_ABS	8,3 (3,0-22,0)	21,0 (7,0-35,0)	1,5 (1,0-2,0)	1,0 (1,0-2,0)	1,0 (1,0-2,0)	1,0 (1,0-1,0)	0,00	4,0 (4,0-4,0)
AMC OP_ABS	32,6 (23,0-44,0)	32,6 (23,0-45,0)	37,0 (28,0-63,5)	45,5 (35,0-52,0)	21,0 (14,0-39,0) <i>p < 0,006</i>	30,0 (22,0-49,0)* <i>p < 0,006</i>	28,0 (18,0-44,0)	45,5 (31,0-60,0)
AMP OP_ABS	99,3 (56,0-87,0)	78,0 (48,0-78,0)	85,5 (46,5-110,5) <i>p < 0,04</i>	63,5 (43,5-86,0)* <i>p < 0,04</i>	71,0 (59,0-87,0)	75,0 (56,0-95,0)	99,5 (73,0-118,0) <i>p < 0,04</i>	80,0 (71,0-95,0)* <i>p < 0,04</i>
RE OP_ABS	17,1 (10,0-26,0)	18,1 (14,0-24,0)	16,5 (9,5-31,0)	17,0 (11,5-25,5)	15,0 (6,0-20,0)	11,0 (7,0-18,5)	16,0 (13,0-20,0)	13,0 (11,0-17,0)
FR OP_ABS	0,00 <i>p < 0,001</i>	32,8 (14,0-47,0)* <i>p < 0,001</i>	0,00 <i>p < 0,0005</i>	15,0 (7,0-28,5)* <i>p < 0,0005</i>	15,0 (15,0-15,0) <i>p < 0,0001</i>	26,0 (12,0-32,0)* <i>p < 0,0001</i>	0,00 <i>p < 0,005</i>	17,0 (7,0-55,0)* <i>p < 0,005</i>
GR OP_ABS	5,0 (3,0-6,0)	8,0 (5,0-8,0)	3,0 (2,0-7,0)	5,0 (2,0-8,0)	4,0 (2,0-7,0)	5,0 (3,0-11,0)	2,5 (1,0-5,5)	5,5 (3,0-9,5)
DE OP_ABS	2,4 (2,0-3,0)	2,0 (1,0-2,0)	3,0 (1,0-4,0)	2,0 (1,0-3,0)	2,0 (1,0-6,0)	2,0 (1,0-2,0)	3,0 (1,0-14,0)	2,0 (1,5-4,0)

*Diferente do teste 1 (Teste de Wilcoxon , $p < 0,05$)

APÊNDICE 3 – CONSUMO INDIVIDUAL AO LONGO DE TODAS AS FASES DO MODELO

