

RAFAEL CONTE

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DO PROCESSO OPONENTE
DA REGULAÇÃO AFETIVA EM RESPOSTA AO USO
CRÔNICO DE ÁLCOOL**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Rafael Conte

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DO PROCESSO OPONENTE
DA REGULAÇÃO AFETIVA EM RESPOSTA AO USO
CRÔNICO DE ÁLCOOL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora:

Profa. Dra. Débora Amado Scerni

Coorientadora:

Profa. Dra. Isabel Cristina Céspedes

São Paulo
2018

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Antonio Rubino de Azevedo,
Campus São Paulo da Universidade Federal de São Paulo, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Conte, Rafael

Análise Imunoistoquímica do Processo Oponente da Regulação Afetiva em Resposta ao Uso Crônico de Álcool / Rafael Conte. - São Paulo, 2018.
xiv, 63f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Neurologia e Neurociências.

Título em inglês: Immunohistochemical Analysis of the Opponent Process of Affective Regulation in Response to Chronic Use of Alcohol.

1. Álcool. 2. Imunoistoquímica. 3. Dopamina. 4. Fator Liberador de Corticotrofina.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROLOGIA
E NEUROCIÊNCIAS**

Chefe do Departamento:

Prof. Dr. Manoel de Antônio Paiva Neto

Coordenador do curso de pós-graduação:

Profa. Dra. Célia Harumi Tengan

Rafael Conte

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DO PROCESSO
OPONENTE DA REGULAÇÃO AFETIVA EM RESPOSTA
AO USO CRÔNICO DE ÁLCOOL**

Orientadora: Profa. Dra. Débora Amado Scerni

Banca examinadora:

Profa. Dra. Maria Lucia Oliveira de Souza Formigon

Profa. Dra. Rejane Daniele Reginato

Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt

Prof. Dr. Leandro Campi Prearo

Epígrafe

Só é merecedor da liberdade e da vida, quem tem de conquistá-la de novo
todos os dias.

Johann Wolfgang von Goethe

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, aos que vieram antes de mim. Que preservando valores como a honra, dignidade e coragem enfrentaram dificuldades maiores que as minhas deixando seu exemplo como inspiração.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Conceito e Epidemiologia de Problemas Decorrentes do Uso de Álcool.....	1
1.2 Variabilidade Individual no Uso de Álcool e Desenvolvimento do Transtorno de Uso do Álcool.....	2
1.3 Fatores Biológicos e Ambientais no Desenvolvimento do Transtorno por Uso do Álcool.....	4
1.4 Teoria do Processo Oponente da Regulação Afetiva.....	5
1.5. OBJETIVO.....	8
2. REVISÃO LITERÁRIA.....	9
2.1 Sistema de Recompensa: Beber pelas Sensações Prazerosas.....	9
2.2 Envolvimento do Sistema de Estresse: Beber pelo Alívio de Sensações Desagradáveis.....	13
3. MATERIAL E MÉTODO.....	18
3.1 Animais e Tratamento.....	18
3.2 Teste de Atividade Motora.....	19
3.3 Teste de Ansiedade.....	20
3.4 Anestesia.....	21
3.5. Perfusão.....	21
3.6. Microtomia.....	22
3.7. Regiões de Interesse.....	22
3.8. Imunoistoquímica para Dopamina ou CRF.....	22
3.9. Contagem das células imunorreativas.....	23
3.10. Análises Estatísticas.....	24
4. RESULTADOS.....	25
4.1. Teste de Atividade Motora.....	25
4.2. Consumo de Álcool.....	26
4.3. Ingestão de Ração.....	26
4.4. Ingestão de Água.....	27
4.5. Massa Corporal.....	28
4.6. Testes Comportamentais.....	29
4.7. Imunorreatividade à Dopamina e ao CRF.....	30
5. DISCUSSÃO.....	34
6. CONCLUSÕES.....	37
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
8. Anexo.....	49

Lista de Figuras

Figura 1. Consumo de álcool puro em litros por pessoa/ano por país/região	1
Figura 2. Possíveis trajetórias para desenvolvimento da dependência	5
Figura 3. Esquematização do Processo Oponente da Regulação Afetiva e abaixo a esquematização da sobrecarga alostática produzida por um estímulo crônico	7
Figura 4. Número de cruzamentos no Campo Aberto realizados pelos animais dos grupos Alta atividade e Baixa Atividade	25
Figura 5. Consumo médio de solução alcoolizada pelos animais dos grupos Alta atividade e Baixa Atividade	26
Figura 6. Consumo de ração, em gramas, pelos animais dos grupos Controle, Alta atividade e Baixa Atividade	27
Figura 7. Consumo de água, em mililitros, pelos animais dos grupos Controle, Alta atividade e Baixa Atividade durante o tratamento	28
Figura 8. Média da massa corporal, em gramas, dos animais dos grupos Controle, Alta atividade e Baixa Atividade durante o período de tratamento	29
Figura 9. Células imunorreativas (coloração em preto) à dopamina na área tegmental ventral de animais dos grupos Controle, Alta atividade (AAM) e Baixa Atividade (BAM). Aumento: 200x	31
Figura 10. Células imunorreativas (coloração em preto) ao CRF no (A) córtex cingulado anterior, (B) amígdala central, (C) amígdala medial e (D) amígdala basolateral, de animais dos grupos Controle Alta atividade (AAM) e Baixa Atividade (BAM). Aumento: 200x	32
Figura 11. Células imunorreativas (coloração em preto) ao CRF no (A) núcleo intersticial da estria terminal, (B) área septal dorsal, (C) área septal ventral e (D) núcleo <i>accumbens</i> , de animais dos grupos Controle, Alta atividade (AAM) e Baixa Atividade (BAM). Aumento: A,B,C 200x; D 100x	33

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Parâmetros analisados nos testes comportamentais	30
Tabela 2 - Imunorreatividade à dopamina e ao CRF	31

Agradecimentos

Agradeço,

A Deus antes de tudo.

À minha orientadora profa. Débora Amado Scerni e co-orientadora Profa. Isabel Cristina Céspedes pelo auxílio acadêmico e pessoal, exemplo de profissionalismo e de virtude.

À minha família e amigos pelo apoio e companheirismo ao longo dessa trajetória.

Aos colaboradores, sem os quais este projeto seria inviável.

Às agências de fomento Capes e Fapesp por tornarem viável a execução do projeto em questão.

Ao corpo técnico da Unifesp por prover as condições necessárias para um trabalho rigoroso.

À Unifesp por proporcionar recursos intelectuais e físicos para execução desse trabalho.

Lista de Abreviaturas e Siglas

- Acb** – núcleo *accumbens*
- AcbC** – núcleo *accumbens core*
- AcbSh** – núcleo *accumbens shell*
- ACTH** – *adrenocorticotropic hormone* (hormônio adrenocorticotrófico)
- AL** – álcool
- AMI** - amígdala
- AMlvm** – amígdala ventromedial
- AMlce** – amígdala central
- ANOVA** – *Analysis of Variance* (Análise de Variância)
- BAM** –baixa atividade motora
- AAM** – alta atividade motora
- BL** – amígdala basolateral
- BNST** – *bed nucleus of stria terminalis* (núcleo intersticial da estria terminal)
- BOLD-MR** – *Blood oxygenation level-dependent magnetic resonance* - ressonância magnética por nível de oxigenação sanguínea
- C** – controle
- CA** – campo aberto
- Ce** – amígdala central
- CEDEME** – Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Biologia e Medicina
- Cg** – córtex anterior do giro do cíngulo
- COBEA** – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- CPF** – córtex pré Frontal
- CRF** – *corticotrophin release factor* (fator liberador de corticotrofina)
- Crf1** – gene do receptor tipo 1 para fator liberador de corticotrofina
- CRFR/ CRHR** – receptor para fator liberador de corticotrofina
- DA** - dopamina
- DAB** - 3,3'diaminobenzidina tetrahidrocloreto
- DALY-s** - disability adjusted life years (anos de vida ajustados por incapacidade)
- DPX** - *distrene plasticiser xylene* (plastificante distreno + xilol)
- DSM** - *diagnostic and statistical manual of mental disorders* (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais)
- EPM** – erro padrão da média

FSI – *fast spike neurons* (neurônios de disparo rápido)

HPA – eixo hipófise–pituitária-adrenal

hpc – hipocampo

KPBS - *potassium phosphate buffer saline* (salina tamponada com potássio-fosfato)

LCE – labirinto em cruz elevado

LTP – long term potentiation (potencial de longa duração)

Me – amígdala medial

MnR – núcleo mediano da rafe

MSN – *medium spike neurons* (neurônios de disparo médio)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PVN – *paraventricular hypothalamic nucleus* (núcleo paraventricular do hipotálamo)

PBS – *phosphate-buffered saline* (tampão fosfato-salino)

PET-Scan – *positron emission tomography* - tomografia por emissão de pósitrons

SNC – sistema nervoso central

UCN – urocortina

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

VTA – *ventral tegmental area* (área tegmental ventral)

Resumo

Objetivo: Os neurotransmissores dopamina e CRF têm sido associados, respectivamente, às vias responsáveis pelo efeito reforçador positivo e negativo do álcool. Este estudo teve como objetivos: a) analisar os comportamentos motor e associado à ansiedade de ratos submetidos a um protocolo de ingestão crônica de álcool por quatro semanas; b) analisar, nos cérebros dos mesmos animais, quanto à imunorreatividade aos neurotransmissores Dopamina e CRF. **Material e Métodos:** Foram utilizados 24 ratos Wistar provenientes do CEDEME/UNIFESP, submetidos ao protocolo de ingestão voluntária de solução alcoolizada a 20% (paradigma das duas garrafas) de caráter intermitente (álcool oferecido durante as segundas, quartas e sextas-feiras) durante quatro semanas. O teste do Campo Aberto foi utilizado para análise motora e o teste do Labirinto em Cruz Elevado para análise dos comportamentos associados à ansiedade. Após perfusão e preparação histológica do tecido cerebral contendo áreas de interesse do sistema dopaminérgico e CRFérgico, foi realizada a análise de imunorreatividade aos neurotransmissores dos respectivos sistemas através da técnica de imunoperoxidase. **Resultados:** A análise do Campo Aberto permitiu classificar os animais que consumiram álcool em relação à atividade motora (alta atividade e baixa atividade). Os resultados obtidos no teste do Labirinto em Cruz Elevado mostraram que os animais de alta atividade produziram menos bolos fecais indicando efeito ansiolítico do álcool sobre esses animais. A análise imunoistoquímica demonstrou que animais que ingeriram álcool cronicamente apresentaram menor imunorreatividade à dopamina quando comparados ao controle. **Conclusões:** Por meio do presente estudo pode-se concluir que animais que consumiram solução alcoolizada de forma crônica e intermitente puderam ser classificados em animais de alta atividade e de baixa atividade motora, e os considerados de alta atividade foram aqueles que consumiram significativamente mais álcool. Na dose utilizada, não foi observado efeito ansiolítico do etanol nos testes comportamentais, assim como nenhum efeito sobre o sistema cerebral de estresse. No entanto, foi observado efeito inibitório do consumo crônico de álcool sobre o sistema cerebral de recompensa dopaminérgico, independente do perfil de alta ou de baixa atividade motora.

Palavras-chave: álcool, imunoistoquímica, dopamina, fator liberador de corticotrofina, processo oponente da regulação afetiva

Abstract

Objective: The neurotransmitters dopamine and CRF have been associated, respectively, to the neural pathways responsible for the positive and negative reinforcing effect of alcohol. This study had the following objectives: a) to analyze the motor and anxiety-associated behaviors of rats submitted to a protocol of chronic alcohol ingestion for four weeks; b) to analyze, in the brains of the same animals, the immunoreactivity to the neurotransmitters Dopamine and CRF. **Material and Methods:** Twenty-four Wistar rats from CEDEME/UNIFESP were submitted to a voluntary ingestion protocol of alcoholic solution 20% (two-bottle choice paradigm) of an intermittent nature (alcohol was offered on Mondays, Wednesdays, and Fridays) for four weeks. The Open Field test was used for cerebral motor activity analysis and the Elevated Plus Maze test for the analysis of the behaviors associated with anxiety. After perfusion and histological preparation of brain tissue containing areas of interest of the dopaminergic and CRFergic systems, immunoreactivity analysis was performed on the respective systems utilizing the immunoperoxidase technique. **Results:** The Open Field test analysis allowed the classification of the alcohol consuming animals in high motor activity and low motor activity. The results obtained from the Elevated Plus Maze test showed that the high activity animals produced fewer fecal boli indicating an anxiolytic effect of alcohol on these animals. Immunohistochemical analysis showed that animals that chronically ingested alcohol solution showed lower immunoreactivity to dopamine when compared with the control group. **Conclusions:** Through the present study, it can be concluded that animals that consumed alcoholic solution in a chronic and intermittent manner could be classified as animals of high or low motor activity and those classified as high motor activity animals were those that consumed significantly more alcohol. No anxiolytic effect of ethanol was observed in the behavioral tests, as well as no effect on the brain stress system. However, we observed an inhibitory effect of chronic alcohol consumption on the dopaminergic reward brain system, regardless of the motor activity classification.

Keywords: alcohol, immunohistochemistry, dopamine, corticotrophin releasing factor, Opponent-Process Theory of Affective Regulation

1 - INTRODUÇÃO

1.1. Conceito e Epidemiologia de Problemas Decorrentes do Uso de Álcool

Os transtornos por uso de substâncias são um problema mundial e frequente, envolvendo jovens e adultos, sendo que o álcool se destaca como a droga mais comumente utilizada (1). A figura 1 destaca a média de consumo em litros/pessoa/ano de álcool puro por país/região. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) o uso acima de 14 doses-padrão (igual a 43 ml de álcool puro; 142 ml de vinho de mesa - 12% álcool; ou 341 ml de cerveja normal - 5% de álcool) por semana para mulheres e 21 doses-padrão para homens é considerado de risco para a saúde (2).

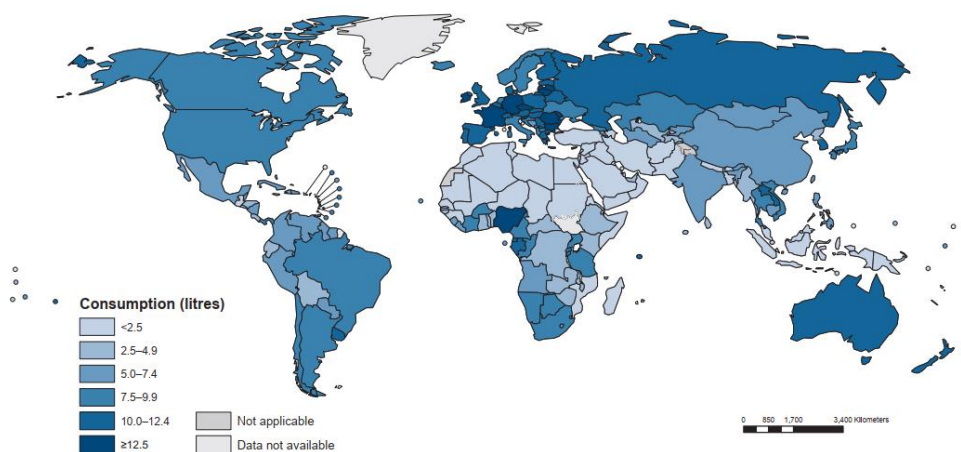


Figura 1 – Consumo de álcool puro em litros por pessoa/ano por país/região.
Fonte: OMS (2018)

O transtorno por uso do álcool (termo referido segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* v. 5 – DSM-5) (3); os termos: “alcoolismo” e “dependência de álcool”; utilizados ao longo do texto são sinônimos para o termo supracitado) é um problema que contribui para mortes, doenças e traumas, assim como o risco de dependência, cirrose, cânceres e outros distúrbios orgânicos. Contribui também para o aumento da violência e alterações no desenvolvimento fetal e infantil. O padrão problemático de uso resulta em aproximadamente 3 milhões de mortes a cada ano, estimativa calculada levando-se em conta o possível impacto benéfico do consumo de baixos níveis de álcool em alguns grupos populacionais. O padrão problemático de consumo de álcool também pode gerar um alto custo para comunidades e sociedade

em geral. Embora o consumo de álcool varie significativamente ao redor do mundo, os índices de doenças a ele relacionados permanecem significativos na maioria dos países. O consumo de álcool é o terceiro maior fator de risco para doenças e incapacidade; em países de renda média é o maior fator de risco. Seu uso problemático é ainda um fator causal para 60 tipos de doenças e distúrbios orgânicos e um dos componentes em outras 200. O álcool também está associado a sérios problemas sociais, incluindo violência, abuso e negligência infantil e absenteísmo (2). Outros relatos têm mostrado que o álcool tem sido identificado como um dos principais fatores de risco para morte e invalidez no mundo, sendo responsável por 5,3% das mortes e 5,8% de anos de vida perdidos se ajustados pela incapacidade (*disability adjusted life years* – DALYs) (2,4). Também tem sido aceito como importante fator de risco para doenças crônicas não transmissíveis, como câncer, doenças cardiovasculares, doenças do fígado, pancreatites e diabetes (5).

1.2. Variabilidade Individual no Uso de Álcool e Desenvolvimento do Transtorno de Uso do Álcool

Pesquisadores têm se esforçado para desenvolver métodos efetivos para estudar e controlar os problemas relacionados ao consumo de álcool (6). Entretanto, há uma grande variabilidade no seu consumo, sendo que características individuais relacionadas aos perfis de comportamento e modo de lidar com as emoções, assim como as diversidades das condições ambientais, levam a diferenças no estilo, na quantidade e no tempo de ingestão (7).

Há vários estudos indicando que entre os fatores que levam ao transtorno de uso do álcool há um considerável componente de susceptibilidade biológica que interage com fatores ambientais (8). Desta forma, levanta-se a questão se o alcoolismo pode ser tratado apenas com tratamentos médicos, uma vez que a eficácia de medicamentos para o alcoolismo é apenas parcial (9). Dentre as pessoas que fazem o tratamento para o alcoolismo que se assemelham em seus traços de personalidade, os resultados de longo prazo são semelhantes (10–13). Porém, os resultados do tratamento e os prejuízos relacionados ao álcool variam bastante entre indivíduos, de maneira que não parece existir uma correlação simples entre o

sucesso da terapêutica utilizada e a participação no tratamento ou o perfil de uso de álcool (11,14).

Embora o diagnóstico dos transtornos de uso de álcool baseie-se em condições que são fenotipicamente similares, os pacientes chegam ao estado de doença através de diferentes trajetórias em seu repertório biológico e social. Em um processo contínuo, a exposição do cérebro a ciclos de intoxicação e abstinência induz progressivas neuroadaptações que, em último caso, resulta em uma escalada da ingestão de álcool (15,16). Quando fatores de risco biológicos estão presentes no indivíduo, a progressão pode ser acelerada a partir de rápidas neuroadaptações promovidas pela droga. Em indivíduos com menor susceptibilidade biológica, a escalada resultará do desenvolvimento de uma exposição prolongada ao álcool a partir dos fatores ambientais com os quais se interage, como o estresse ambiental, que também podem provocar neuroadaptações e tornar o indivíduo susceptível (17).

A sensibilização comportamental é um processo observado em resposta ao uso de drogas de abuso que se expressa diferentemente entre indivíduos, geralmente uma associação entre essa sensibilização e maiores quantidades de droga consumida tem sido feita. Por ser um fenômeno que compartilha bases neurais com comportamentos motores e experiências emocionais envolvidas no consumo de drogas inferências podem ser feitas mediante a observação de parâmetros comportamentais em relação aos efeitos de uma droga de abuso. Desta forma, modificações neurais promovidas pela droga resultarão em respostas motoras e comportamentais alteradas, como por exemplo, atividade motora aumentada ou diminuída (18,19).

Do ponto de vista biológico, os mecanismos dividem-se de forma geral em duas categorias principais. Primeiro, de forma similar a outras drogas de abuso, o álcool pode ativar as vias cerebrais da recompensa atuando como um reforço positivo (reforço de sensação positiva) pela busca e uso do álcool, envolvendo principalmente os neurocircuitos dopaminérgicos (mesocorticolímbico preponderantemente). Secundariamente, o álcool pode ajudar a lidar com emoções negativas (ansiedade e disforia) resultantes do estresse ambiental ou da retirada do álcool em si, definindo assim o cenário para o uso do álcool como reforço negativo (retirada de sensação negativa), envolvendo principalmente os neurocircuitos mediados pelo fator liberador de corticotrofina (CRF) (16,20,21). Para clarear a

diferença entre estes dois tipos de incentivo ao uso do álcool, os termos “*beber pela recompensa*” e “*beber pelo alívio*” têm sido utilizados (22).

1.3. Fatores Biológicos e Ambientais no Desenvolvimento do Transtorno de Uso do Álcool

O alcoolismo tem de moderada a alta hereditariedade, em parte associada a fatores de susceptibilidade biológica a outros tipos de dependência (23). Porém, fatores biológicos e ambientais (estresse, por exemplo) podem resultar em muitos tipos diferentes de vulnerabilidade, que vão desde elevada recompensa pelo álcool a um perfil elevado de resposta diante do estresse (24). Variantes biológicas que alteram a resposta emocional de recompensa (aumento do prazer) ou de estresse (maior sensibilidade a fatores estressantes) são, portanto, possíveis modificadores de possíveis trajetórias da doença e de resposta aos tratamentos que têm como alvo os sistemas de recompensa ou estresse.

Conforme o modelo ilustrado na figura 2, a progressão para o alcoolismo pode ser decorrente de altos níveis de exposição a fatores ambientais de risco, mesmo na ausência de significativa susceptibilidade biológica (subpopulação representada pela *curva verde*). Neste tipo de trajetória, um alto nível de insultos ambientais é inicialmente necessário para disparar um episódio de uso compulsivo de álcool. Ao longo do tempo, entretanto, um nível progressivamente menor de insultos ambientais é necessário para disparar o próximo episódio de uso pesado e compulsivo de álcool que, finalmente, torna-se autoperpetuante. Em outro exemplo de trajetória, ilustrado pela *curva azul*, a susceptibilidade biológica teria um papel mais significativo. Para estes indivíduos, pequenos insultos ambientais resultariam em episódios de uso compulsivo de álcool. Desta forma, cada linha mostrada no gráfico pode ser considerada como representativa de uma classe de trajetórias, porque tanto o risco biológico quanto os fatores ambientais são por si muito diversos. Fatores biológicos representam por volta de 50-60% do risco para alcoolismo. Esta vulnerabilidade biológica pode ser mediada através de características como, diferença na alta recompensa pelo álcool por um lado, e sensibilidade ao estresse pelo outro (25).

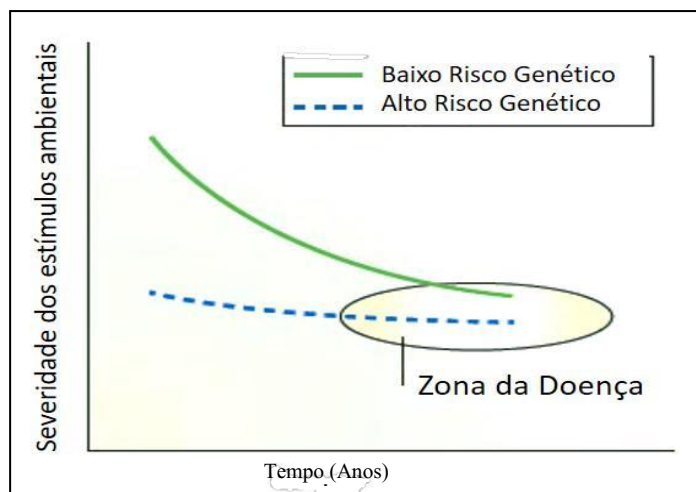


Figura 2 – Possíveis trajetórias para desenvolvimento da dependência;
linha verde= baixo risco genético / **linha azul**= alto risco genético;
 Fonte: Heilig e col. (2011)

1.4. Teoria do Processo Oponente da Regulação Afetiva

A “teoria do processo oponente da regulação afetiva”, que foi originalmente proposta há mais de quatro décadas por Solomon e Corbit (1974) (26) é caracterizada pela regulação de estados motivacionais e afetivos através do recrutamento de processos opostos. Por esta teoria, o organismo irá responder a um estímulo com a emergência de um estado afetivo apropriado, caracterizado como “processo a”, e como consequência um segundo estado ou “processo b” será recrutado. Este estado secundário *b* terá valor afetivo oposto ao primeiro (processo a) e terá como função modular o estado afetivo para que este retorne aos seus padrões de funcionamento típicos. Por exemplo, alguém que fará uma apresentação em público e percebe essa atividade como algo aversivo irá experimentar sensações de ansiedade, disforia e preocupação momentos antes, e até durante sua apresentação. Haverá uma intensa resposta somática e emocional pela ativação da porção simpática do sistema nervoso central, o que aumentará a frequência cardíaca e respiratória, liberação de noradrenalina na circulação sistêmica, sudorese, etc. Este pode ser considerado um estado afetivo negativo, que no caso, caracteriza o “processo a”. Porém, ao término de sua apresentação haverá uma resposta somática e emocional oposta à primeira, ou seja, a emergência do “processo b”. O sujeito estará relaxado, às vezes eufórico e pouco ansioso. A porção parassimpática do sistema nervoso central terá ativação predominante e o indivíduo

apresentará um estado afetivo positivo de alegria e alívio. Conforme o tempo passa, seus estados emocionais e somáticos irão se normalizar, e ele voltará ao seu comportamento típico. O valor (positivo ou negativo) dos processos *a* e *b* podem variar, porém, sempre serão opostos entre si. Em um segundo exemplo, tem-se um sujeito que acaba de receber a notícia que foi aprovado em um vestibular. Sua primeira reação (processo *a*) será de extrema alegria, euforia e satisfação, ou seja, um estado afetivo positivo. Após esse momento de extrema alegria o “processo *b*” entrará em ação, haverá o recrutamento de processos afetivos opostos ao “processo *a*” e o indivíduo experimenta diminuição da euforia, depressão dos sentimentos de alegria exacerbada e rebaixamento do humor. Conforme o tempo passa seu estado afetivo também volta para os padrões típicos. Algumas características desses processos são descritas na teoria. Primeiramente, o estado afetivo eliciado por um estímulo termina quando o estímulo termina. Quando um estímulo ocorre de forma crônica e repetida o “processo *a*” terá intensidade diminuída, da mesma forma que o “processo *b*” tende a ter sua emergência e encerramento mais lentos e duradouros. Por fim, nenhum indivíduo volta ao seu padrão típico de comportamento frente a um estímulo que elicia alterações em seus estados emocional e afetivo sem experimentar o recrutamento de um estado afetivo oposto ao primeiro (eliciado pelo estímulo) (26).

Ao longo do tempo esta teoria vem sendo aplicada para entender o abuso de drogas (27,28). Nesta concepção, o uso de drogas inicialmente ativa um conjunto de processos que coordenam estados emocionais prazerosos e, portanto, conduz a busca pela droga como um reforço positivo, caracterizando o “processo *a*”. Após o término do uso da droga ocorrerá a ativação de processos opostos no sistema nervoso central que medeiam estados emocionais negativos, como disforia e ansiedade, em uma tentativa de recuperar o padrão de funcionamento típico do organismo, caracterizando o “processo *b*”. Com o repetido uso da droga, o “processo *b*” aumenta em intensidade e duração e, em última análise, permanece ativado. Cada vez que o indivíduo experimenta estados emocionais negativos (ocasionados pela retirada da droga, por exemplo) ele passa a buscá-la como um reforço negativo, ou seja, para que os efeitos produzidos pela droga neutralizem o estado emocional negativo ocasionado pela retirada da própria droga e também ocasionado por estressores ambientais que recrutam substratos neurais ativados no “processo *b*” gerando estados afetivos semelhantes a este. O aumento progressivo na atividade

do sistema de estresse é um processo crucial na mudança do ponto de equilíbrio emocional alostático. O conceito de alostasia se refere à capacidade do organismo de manter a estabilidade de seu funcionamento através da constante avaliação das demandas ambientais que estão em constante mudança, respondendo adequadamente a estas demandas (29). Com o uso contínuo da droga e a ativação constante do sistema de resposta ao estresse, o organismo precisa mobilizar recursos para manter seu padrão de funcionamento típico, assim, haverá uma sobrecarga alostática que contribui para o surgimento de transtornos (30,31). A transição para o uso da droga por reforço negativo, associado a esta sobrecarga alostática é o que tem sido chamado de “o lado negro da dependência” (28). A figura 4 mostra resumidamente as fases *a* e *b* do processo oponente, que ao longo do tempo varia em valência; mostra também a repetição do processo em um padrão crônico que produz, inicialmente, uma perturbação no equilíbrio homeostático e ao longo do tempo, esse fenômeno se transforma em uma sobrecarga alostática.

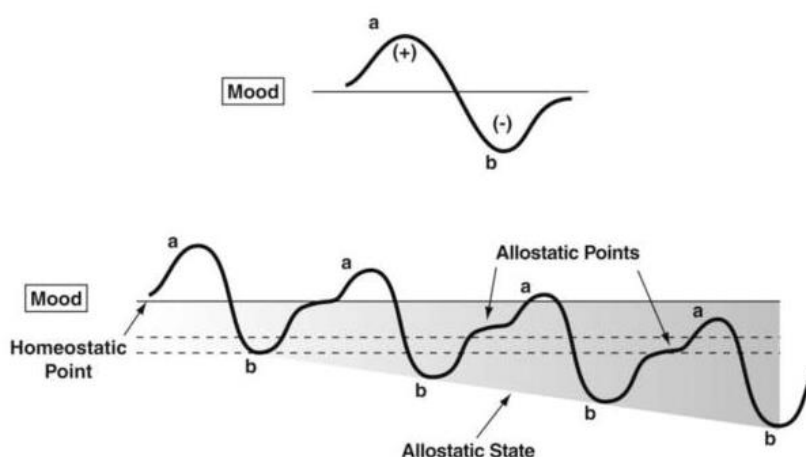


Figura 3 – Acima, esquematização do Processo Oponente da Regulação Afetiva e abaixo a esquematização da sobrecarga alostática produzida por um estímulo crônico (Koob, 2015).

As alterações produzidas pela droga no sistema nervoso podem ser classificadas, paralelamente à teoria do processo oponente da regulação afetiva, em duas alterações: “intra-sistema” e “entre-sistemas”. Primeiramente, durante o “processo a”, ocorrem alterações “intra-sistema”, mais precisamente no sistema de recompensa, envolvendo a neurotransmissão dopaminérgica. Como consequência, a sensibilização da via mesocorticolímbica produzida pela droga pode vir a ocorrer com uma ulterior subregulação do sistema. Em um segundo momento, durante o “processo b”, alterações “entre-sistemas” ocorrerão, ou seja, durante o consumo

crônico e na fase em que há a retirada da droga, ocorrerá o recrutamento do sistema do estresse (CRFérgico) (32).

1.5. OBJETIVOS

Geral

Este estudo teve como objetivo analisar a imunorreatividade aos neurotransmissores: dopamina, na via responsável pelo efeito reforçador positivo do álcool e CRF, nas regiões responsáveis pelo efeito reforçador negativo do álcool, em ratos submetidos a um protocolo de ingestão crônica de álcool por quatro semanas.

Específicos

Analisar alterações comportamentais motoras por meio do teste de Campo Aberto para a identificação de animais com alta atividade motora ou baixa atividade após o consumo crônico de álcool e analisar os comportamentos associados ao estado de ansiedade gerado pelo consumo crônico de álcool por meio do teste do Labirinto em Cruz Elevado.

Analisar a imunorreatividade à dopamina na área tegmental ventral (local de síntese dopaminérgica e início da via de recompensa) e ao CRF nas amígdalas central, medial e basolateral, núcleo intersticial da estria terminal, núcleo *accumbens*, regiões ventral e dorsal da área septal, e córtex do giro do cíngulo (locais extrahipotalâmicos de síntese de CRF na resposta emocional de estresse) nos animais identificados como de alta atividade motora e baixa atividade motora.

2 – REVISÃO LITERÁRIA

2.1. Sistema de Recompensa: Beber pelas Sensações Prazerosas

A motivação inicial para o consumo do álcool muitas vezes surge do potencial prazeroso que o seu consumo exerce, assim a droga passa a ser buscada como um reforçador positivo. Um comportamento tem mais chances de se repetir se for reforçado, ou seja, se um determinado comportamento é acompanhado de sensações e emoções prazerosas ele é considerado um reforçador positivo (33).

A dopamina (DA) exerce função fisiológica ao se ligar a um de seus receptores que compreendem um total de cinco tipos, receptores dopaminérgicos do tipo D1, D2, D3, D4 e D5 distribuídos amplamente pelo encéfalo (34). São receptores acoplados à proteína G o que faz com que sua ativação produza diversas respostas dependendo das vias de segundos mensageiros envolvidas (35). Esses receptores são agrupados em duas principais famílias. A família “D1” que compreende os receptores D1 e D5, e a família “D2” com os demais receptores (D2, D3, D4). Essa divisão se deve às suas diferenças funcionais. A família D1 tem menor afinidade pela dopamina e é mais sensível ao padrão de ativação neuronal fásico, enquanto que, a família D2 possui maior afinidade para esse neurotransmissor e está associada ao padrão de ativação tônico (basal) (36). A neurotransmissão dopaminérgica está relacionada à recompensa, motivação, modulação motora e hormonal, regulação do sono, atenção, visão, dentre outras funções (35,36). Podem-se destacar as principais vias encefálicas para a neurotransmissão dopaminérgica: a via nigro-estriatal, com função predominantemente motora, a tuberoinfundibular associada ao controle endócrino, e as vias mesolímbica e mesocortical com funções associadas à motivação, recompensa e reforço (37–40). Pelo fato destas últimas compartilharem de substratos neurais e terem funções complementares, elas podem ser analisadas como uma única via: mesolímbocortical (37). Existe grande quantidade de evidências de que os efeitos reforçadores agudos produzidos pelas drogas de abuso são consequência do aumento da ativação do sistema de recompensa, mais precisamente, da via dopaminérgica mesolímbocortical, que resulta no aumento dos níveis desse neurotransmissor ao longo da via (27,37,39,41–46). A apresentação de uma recompensa após um comportamento ou situação caracterizando um processo

de reforço positivo, traz como consequência um aumento dos níveis de DA no núcleo accumbens (Acb) e o indivíduo experimenta sensações subjetivas de prazer. Se a neurotransmissão dopaminérgica for inibida, o reforço positivo não ocorrerá (39).

Apesar de o protagonismo do sistema dopaminérgico nos efeitos relacionados às drogas de abuso receber alguns questionamentos (47), observa-se que no caso do álcool, assim como em outras drogas, a ativação da via mesolímbocortical pode provocar alterações neuroplásticas (como na potenciação de longa duração, *long term potentiation* - LTP) que contribuem para a formação do processo de condicionamento e sensibilização da via de recompensa (48,49). Neste processo há o envolvimento do glutamato e da acetilcolina na superregulação de receptores glutamatérgicos NMDA e AMPA aumentando a eficácia da neurotransmissão ao longo da via. Essas alterações, associadas à vulnerabilidade genética e outros fatores como o estresse ambiental e a retirada intermitente da droga, podem induzir a dependência de drogas e o desenvolvimento do transtorno de uso da substância. Assim, o envolvimento do sistema dopaminérgico nos processos de motivação e consumo é fundamental para a manutenção de comportamentos que podem levar à dependência de drogas durante o consumo de drogas (50).

A seguir, serão descritas as principais estruturas que compõem a via dopaminérgica mesolímbocortical e seu envolvimento no uso do álcool.

A área tegmental ventral (VTA) é um núcleo que se situa na base do mesencéfalo, de caráter heterogêneo com predominância de neurônios dopaminérgicos. Possui projeções para regiões límbicas, corticais, tálamo, hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal e regiões do tronco encefálico (51). O consumo de álcool, por exemplo, ativa neurônios dopaminérgicos na VTA e faz com que interneurônios GABAérgicos, que promovem inibição tônica do núcleo, sejam inativados. Assim, a dopamina produzida na VTA é liberada ao longo da via mesolímbocortical (52). O estriado recebe grande parte das projeções dopaminérgicas da VTA. Nestas regiões há predominância de aferências dopaminérgicas da substância negra (via nigro-estriatal). Também é observada a liberação de dopamina no córtex do giro do cíngulo (Cg) e pré-frontal (CPF). A porção medial do CPF enviará projeções glutamatérgicas para a VTA, regulando a liberação de dopamina na via. A ativação dos receptores D1, promovida pela droga, é necessária para os processos de condicionamento e reforço. Por envolver regiões

límbicas e corticais, esses circuitos são de fundamental importância para os comportamentos relacionados ao consumo da droga (46,53).

O estriado funciona como uma interface límbica-motora e está relacionado à recompensa, formação de hábitos e processos motivacionais. O uso continuado da droga promove aumento dos níveis de dopamina, com sua consequente diminuição quando utilizada cronicamente (54). O padrão de ativação fásica dos neurônios do núcleo accumbens está relacionado ao reforço de comportamentos. O aumento da ativação frente a um estímulo é maior do que frente a uma recompensa prevista, mostrando um processo de predição de erros e de aprendizado. O estriado também é responsável pela codificação de recompensa desencadeada por interações sociais e associadas ao contexto (processando informações motoras e sensoriais) (38).

De forma mais detalhada, o estriado é dividido em porção ventral (Acb) e porção dorsal (núcleo caudado e putâmen). O núcleo accumbens pode ser dividido em duas estruturas, a central (*core*) AcbC e a cortical (*shell*) AcbSh. A porção *shell* apresenta conexões de caráter límbico, que recebe importantes aferências glutamatérgicas do hipocampo (hpc) e da amígdala ventromedial (AMlvm). A porção *core* é uma estrutura de caráter predominantemente motor, pois recebe aferências glutamatérgicas do córtex motor e aferências dopaminérgicas da substância negra, assim como apresenta conexões gabaérgicas que se projetam para o globo pálido ventral, caracterizando assim sua participação na via extrapiramidal (55,56). Testes de atividade psicomotora podem aferir a susceptibilidade às drogas de abuso por detectar alterações nesse núcleo que possui caráter límbico-motor (57). O estriado dorsal, que está envolvido nos processos de estímulo-resposta e formação de hábitos, se divide em lateral e medial. Mais de 90% dos neurônios no estriado são classificados como neurônios GABAérgicos MSN (*medium spike neurons*) que são ativados dependendo do contexto. Existe uma ampla rede de interneurônios intermediando o funcionamento desse núcleo. Receptores para dopamina são expressos em todos os grupos neuronais do estriado. A liberação de dopamina está sob inibição tônica por neurônios GABAérgicos, principalmente no núcleo accumbens, enquanto que interneurônios FSI (*fast spike interneurons*) coordenam a ativação dos neurônios MSN. Interneurônios colinérgicos influenciam tanto a excitabilidade quanto a inibição da região, e a funcionalidade desses neurônios dependerá do receptor com os quais interagem e neurotransmissores envolvidos (acetilcolina ou glutamato). Mediante exposição ao álcool, foi observado efeito direto

sobre neurônios FSI no Acb, aumentando sua atividade *in vitro*; porém, quando analisado *in vivo*, foi observado efeito contrário. Já em neurônios MSN, o álcool possui ação indireta modulada pelo tônus colinérgico. Os níveis de dopamina são alterados quando a droga é administrada (ingerida ou injetada sistematicamente), e de forma geral se observa aumento da liberação desse neurotransmissor no Acb através da VTA (58,59).

Estudos com animais mostram a relação entre a liberação de dopamina em regiões do estriado, incluindo o Acb com os aspectos reforçadores de substâncias como o álcool (59). A autoadministração de álcool gera aumento nos níveis de dopamina no núcleo accumbens, e este aumento parece estar relacionado com a apresentação do álcool como estímulo reforçador (60). A administração de antagonistas dopaminérgicos (D1 ou D2) em regiões como o núcleo accumbens *shell* e o córtex pré-frontal medial (pré-límbico) diminuiu o efeito do álcool sobre a porção posterior VTA (61). Em um estudo com tomografia por emissão de pósitrons (PET-scan), em humanos, foi observado aumento temporário dos níveis de dopamina no estriado ventral (Acb) após a administração intravenosa de solução alcoolizada. O aumento dos níveis de DA no estriado dorsal foi associado às sensações prazerosas subjetivas produzidas pelo álcool (62). O uso repetido de drogas tem como resultado o aumento da impulsividade devido à concomitante diminuição da atividade do CPF, que exerce controle *top-down*, inibindo comportamentos impulsivos associados à intensificação da motivação pela busca e consumo da droga mediada pela ativação fásica de receptores dopaminérgicos no Acb, pois essa substância promove a subregulação de receptores D2 inibitórios neste núcleo (44).

As funções do CPF e suas características funcionais são descritas na revisão de Miller e Cohen (63). Ele está envolvido em processos cognitivos como: memória de trabalho, (64,65), tomada de decisão (66,67) e inibição de impulsos através de projeções que ativam neurônios GABAérgicos em regiões subcorticais, inibição de memórias através da supressão de regiões hipocâmpais (68) e regulação de processos emocionais (69). Solbak e Lovstad (70) demonstraram em detalhes a funcionalidade de diferentes regiões do córtex pré-frontal através de estudos eletrofisiológicos. O CPF pode ser dividido em três grandes áreas: dorsolateral, medial e orbitofrontal. A porção dorsolateral está associada ao controle executivo em humanos, enquanto que em roedores essa função é coordenada pela porção medial.

A porção orbitofrontal realiza conexões com regiões límbicas e é essencial no processo de associação entre um estímulo e uma recompensa. De forma geral, em indivíduos saudáveis, o aumento da atividade dopaminérgica no CPF aumenta capacidades cognitivas e a funcionalidade da região (71). A porção medial do córtex pré-frontal (em roedores) exerce função de controle excitatório sobre neurônios que compõem a via mesolímbocortical na VTA e Acb (46). A regulação entre excitabilidade e inibição dos microcircuitos no CPF medial é conferida pela neurotransmissão dopaminérgica nos interneurônios. O álcool contribui para a diminuição da quantidade de receptores D2, levando ao surgimento de distúrbios no funcionamento dessa região que resultam em problemas no controle executivo e inibição de impulsos (54,72). Após a administração aguda de álcool foi observado um aumento, diminuição ou níveis iguais de dopamina nessa região. Essas variações parecem estar relacionadas ao tipo de ativação neuronal e ao processo de remoção do neurotransmissor das sinapses em questão. Durante o uso crônico e retirada de álcool, modificações alostáticas promovem queda nos níveis de dopamina juntamente com a subregulação de autoreceptores D2. Alterações no sistema dopaminérgico no CPF têm como consequências prejuízos cognitivos causados pelo consumo de álcool (72). Estudo utilizando PET-scan identificou significativa diminuição nos níveis de dopamina no córtex pré-frontal de alcoólatras, apesar de não encontrar diferenças no número de receptores D2 (73). Esses dados contribuem para o conceito de que o álcool induz distúrbios na neurotransmissão dopaminérgica no córtex pré-frontal.

2.2. Envolvimento do Sistema de Estresse: Beber pelo Alívio de Sensações Desagradáveis

Em um contexto clínico, o efeito ansiolítico do álcool estabelece o cenário para seu uso como reforço negativo, que significa o uso para a retirada de uma sensação desagradável, um incentivo que é claramente distinto daquele que é conduzido pela ativação do circuito de recompensa cerebral (vias dopaminérgicas da recompensa e prazer). Recentes evidências pré-clínicas têm apontado para o potencial de uma espiral viciosa, na qual o reforço negativo conduz a uma escalada progressiva no consumo de álcool ao longo do tempo. Neste processo, a retirada do álcool em um episódio de pesada intoxicação leva a sintomas de ansiedade. Com

repetidos ciclos de pesada intoxicação e retirada, este estado emocional negativo acentua-se, resultando em um estado emocional negativo que persiste e provê um poderoso incentivo para o recomeço da ingestão do álcool (recaída) (26).

O fator liberador de corticotrofina (CRF) é um peptídeo com 41 aminoácidos que é altamente expresso em neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (74). Células CRF positivas estão, contudo, também presentes em estruturas extrahipotalâmicas, incluindo amígdala central (AMlce), núcleo intersticial da estria terminal (BNST), neocórtex, hipotálamo, tálamo, cerebelo e tronco encefálico (75). Estas células CRF extrahipotalâmicas também liberam CRF diante de estímulos estressores e medeiam uma ampla gama de respostas comportamentais de estresse, principalmente através de ações sobre o receptor CRFR1 (também conhecido como CRF1 ou CRHR1) (76), um receptor acoplado à proteína G, de sete domínios transmembrana da família de receptores secretina (77,78). Os sistemas CRF extrahipotalâmicos são cruciais para o processo de dependência descrito anteriormente (28). Outros peptídeos da família CRF são a urocortina 1 (Ucn 1), urocortina 2 (Ucn 2) e urocortina 3 (Ucn 3), que também agem em resposta e na adaptação aos estressores, mediando algumas funções originalmente atribuídas ao CRF, mediante acoplamento aos receptores desta família de neuropeptídios (79–81).

Os receptores da família CRF incluem o CRFR1 e o CRFR2 α , β , γ e encontram-se, principalmente, no sistema nervoso central (SNC) e, em pequena quantidade, nos tecidos periféricos. O CRF tem baixa afinidade pelo CRFR2, a Ucn 1 tem afinidade por ambos os receptores enquanto que a Ucn-2 e a Ucn-3 têm maior afinidade pelo CRFR2. O CRFR1 mostra-se amplamente localizado no neocórtex e parece estar relacionado às funções emocionais e comportamentais dos peptídeos CRF; o CRFR2 localiza-se em estruturas subcorticais, sendo relacionado, principalmente, às funções neuroendócrinas e autônomas (79–81). O receptor CRFR1 é um alvo terapêutico atrativo porque o seu ligante endógeno, CRF, não é liberado em áreas extrahipotalâmicas sob condições basais, não estressantes. Em vez disso, o sistema CRF extrahipotalâmico torna-se ativado em resposta ao estresse contínuo, de alta intensidade e incontrolável (82), ilustrando o princípio de que neuropeptídeos são comumente liberados em altas frequências de disparo neuronal e agem como sistemas de alarme (83). Isto sugere que antagonistas CRFR1 podem ter pouco efeito sobre as atividades *in vivo* a menos que o sistema

central de estresse seja ativado, e podem, portanto, ter um perfil de tolerabilidade e segurança extremamente vantajosos. Experimentos com modelos animais têm dado suporte a este conceito (84).

A retirada do álcool é um estado altamente estressante. Estudos em ratos feitos dependentes têm mostrado que o CRF é liberado no núcleo central da amígdala (AMlce) durante a retirada aguda do álcool e medeia um comportamento semelhante à ansiedade (85–87). Os sinais comportamentais da retirada do álcool em ratos elevam-se em torno de 12 horas, e desaparecem em torno de 48 a 72 horas depois da retirada. Entretanto, se o estado de dependência de álcool é mantido por um mês ou mais (antes da retirada) e, em particular, se a exposição ao álcool ocorre na forma de repetidas intoxicações e ciclos de retirada, maiores e persistentes consequências comportamentais são observadas. Sob estas condições, a sensibilidade comportamental ao estresse permanece desregulada após os sinais de retirada aguda, e esta desregulação emocional é acompanhada pela escalada voluntária da ingestão de álcool (16,20). Neste estágio, o aumento da sensibilidade comportamental a estímulos estressores reflete uma mudança na capacidade de resposta, uma vez que ocorre aumento na ansiedade basal. Por exemplo, durante a abstinência prolongada de álcool, ratos com uma história de dependência não mostraram aumento no comportamento indicativo de ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado. Entretanto, quando estes animais foram expostos a um estressor antes do teste, os comportamentos indicativos de ansiedade foram acentuados. Esta ansiedade induzida foi bloqueada pela administração intracerebroventricular de antagonista não seletivo do receptor de CRF 12-41 (88). Achados similares de aumento da sensibilidade comportamental a estressores em ratos com uma história de prolongada dependência de álcool têm sido obtidos através do uso de diversos modelos comportamentais (89–92). Um paralelo destes achados em humanos é demonstrado pela observação de que respostas cerebrais a estímulos visuais aversivos, mensurado pela resposta Dependente do Nível de Oxigenação Sanguínea por Ressonância Magnética (BOLD-MR), mostraram-se elevados em pacientes com dependência de álcool durante abstinência prolongada (93). Baseado nesta e em outras observações, tem sido proposto que repetidos ciclos de intoxicação e retirada de álcool conduzem a uma progressão na resposta sensibilizada de estresse e na escalada da ingestão de álcool, e que a expressão

superregulada de *Crf1*, o gene que codifica o receptor CRFR1, desempenha papel importante neste processo (16,90).

O sistema CRF desempenha um papel à parte na recaída. A recaída é um elemento chave das desordens de dependência e pode ser modelada em animais de laboratório (94). Quando a autoadministração de álcool em ratos é retirada ao longo de muitas semanas, a recaída à busca pelo álcool é disparada pelo estresse de choque nas patas, mesmo que o animal não tenha mostrado sinais de dependência física ou quaisquer sinais de retirada (95). Porém, o bloqueio do CRFR1 no cérebro interrompe esta recaída induzida por estresse na procura pelo álcool (96–98), mas a neurocircuitaria exata que medeia esta atividade não está clara. Muitas ações anti-estresse dos antagonistas CRFR1 têm sido observadas na amígdala (AMI), e esta estrutura, juntamente com o BNST, está também envolvida na recaída à busca pela droga (99). Entretanto, o bloqueio da recaída induzida por estresse é, em parte, também mediado pelo bloqueio do CRFR1 no núcleo mediano da rafe (MnR) (100). Projeções do MnR são restritas a estruturas subcorticais medianas e não incluem a AMI ou o BNST (101). Isto sugere que a atividade CRF pode contribuir para a recaída induzida por estresse em múltiplos locais ao longo da complexa neurocircuitaria que comanda o estresse e o comportamento (99).

Em adição ao estresse, a recaída pode ser disparada pela exposição a pistas ambientais associadas ao álcool ou ao álcool em si (94). O antagonismo CRFR1 não bloqueia estes eventos, mas controla a recaída induzida por estresse (96,100). O bloqueio do CRFR1 também bloqueia a procura pelo álcool induzida por um estressor farmacológico, o antagonista $\alpha 2$ -adrenérgico yohimbina (100). Além disso, antagonistas não seletivos dos receptores CRFR ou CRFR1 seletivos diminuem os níveis de escalada da autoadministração do álcool que são observados em ratos submetidos a um período prolongado (um mês ou mais) de dependência de álcool, e esta diminuição é mediada através de suas ações na AMI (30,102). Adicionalmente, o sistema CRF pode tornar-se ativado em estágios precoces do processo de dependência (103,104).

Dados recentes mostram que a Ucn 1 contribui para a escalada progressiva de preferência ao álcool durante o acesso intermitente de longo prazo (81), sugerindo que, de forma similar ao sistema CRF/CRFR1, a Ucn/CRFR2 pode sofrer neuroadaptações nos processos que envolvem a dependência. Injeções de ligante CRFR2 altamente seletivo no interior da AMI aumentam a autoadministração em

ratos não dependentes, mas suprime-a em ratos que se tornaram dependentes de álcool cronicamente (30). Um envolvimento do sistema Ucn/CRFR2 nas neuroadaptações relacionadas à dependência é adicionalmente sustentado pela observação de que a expressão de CRFR2 na amígdala mostrou-se subregulada após histórico de dependência de álcool (90).

Em suma, trabalhos com modelos animais mostram que o aumento da atividade do sistema CRF está associado com a escalada da ingestão voluntária de álcool e o aumento da sensibilidade para uma recaída induzida por estresse. Pode ser especulado que, diferentes populações de neurônios CRF contribuem para estes comportamentos, com a AMI coordenando a intensificação do consumo e o BNST e o MnR estando envolvidos na recaída. Entretanto, a contribuição precisa destas estruturas cerebrais para os respectivos efeitos permanece indeterminada. Porém, os achados com antagonistas CRFRs sugerem que o CRFR1 é um atraente alvo terapêutico para a dependência ao álcool.

3 - MATERIAL E MÉTODO

3.1. Animais e Tratamento

Vinte e quatro ratos Wistar machos provenientes do CEDEME/UNIFESP, com em média 60 dias de vida e peso médio de 240-310g, foram mantidos sob condições ambientais controladas ($21 \pm 1^\circ\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12h, livre acesso à água e ração) no Biotério do Departamento de Biociências - UNIFESP Baixada Santista. Os protocolos experimentais foram desenvolvidos de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP, número de aprovação: 3482080218 (anexo I).

Para a administração de álcool a animais de laboratório, vários modelos laboratoriais são descritos na literatura, como a inalação de vapor contendo álcool, injeção intraperitoneal, gavagem, canulação e administração oral (105). Porém, o modelo mais adequado para o estudo da administração de álcool associado à análise de neurocircuitos de resposta ao estresse (que represente o menor estímulo estressante adicional possível), é o uso de um método não invasivo. O mais indicado neste caso é o uso da administração oral através do protocolo do paradigma de duas garrafas, que permite uma ingestão espontânea da solução alcoolizada. Neste caso, são ofertadas: uma garrafa com solução alcoolizada (20% v. v.) e uma garrafa contendo água, sendo que o controle da ingestão é realizado através da análise periódica da massa ingerida de água ou da solução contendo álcool (subtração entre o peso ofertado e o peso residual em gramas). Neste trabalho, foram utilizadas garrafas hermeticamente fechadas e consumo de ração à vontade (90,106,107).

Os animais foram distribuídos em número de 1 por gaiola, contemplando os seguintes grupos:

Grupo Controle (CO): 6 ratos Wistar não foram submetidos à ingestão de álcool, constituindo o grupo controle. O monitoramento do peso corporal, ingestão de água e ração foi coincidente com os demais animais tratados.

Grupo Álcool (AL): 18 ratos Wistar receberam acesso intermitente à solução de etanol 20% v/v e acesso contínuo à água, por meio do paradigma das duas garrafas: nas segundas, quartas e sextas-feiras teve a oferta da garrafa de solução alcoolizada por 24h, sendo 12h no ciclo claro e 12h no ciclo escuro, durante 4 semanas juntamente com uma outra garrafa contendo água. O local na gaiola da garrafa contendo álcool foi trocado de lugar com a garrafa contendo água, para evitar a influência do comportamento de preferência de lugar. Entre as sessões com a presença de etanol, foram fornecidas duas garrafas contendo água por gaiola. Os fluidos foram colocados em garrafas de 200ml com rolhas herméticas e fixadas de forma segura na grade da gaiola do animal.

3.2. Teste de Atividade Motora

Os animais do grupo AL, no último dia de tratamento, foram submetidos ao teste do Campo Aberto para análise da atividade motora (57,108). O Campo Aberto consiste em uma arena circular de 60x60cm, com paredes de 50cm de altura, sendo a sua base dividida em 12 partes por linhas que são utilizadas como referência para a movimentação do animal dentro do aparato (número de cruzamentos com as quatro patas). A análise foi realizada a partir do cruzamento do animal com as quatro patas em cada linha da base, sendo associada à atividade locomotora do animal (109). O comportamento de cada animal foi filmado no Campo Aberto durante 5 minutos e gravado para análise posterior. Na sala de teste a luminosidade foi de 60lx e depois de cada animal o aparato foi limpo com álcool 10%. Após a análise locomotora, os animais foram classificados como alta atividade motora ou “alta atividade” (AAM) (33% dos animais, n= 6, com maior pontuação na atividade locomotora); baixa atividade motora ou “baixa atividade” (BAM) (33% dos animais, n= 6, com menor pontuação na atividade locomotora); e de resposta intermediária (33% dos animais, n= 6, com resposta motora, estando entre os dois grupos anteriores). Animais com resposta intermediária não foram utilizados no estudo (57,108).

Ainda no teste de Campo Aberto pode ser observado o tempo de permanência e número de levantamentos em sua periferia, característicos de um comportamento ansioso; e o tempo de permanência e número de levantamentos no centro da arena, associados a um comportamento desprovido de ansiedade e

exploratório. A autolimpeza ou *grooming* é realizada quando o animal inicia movimentos de limpeza, especialmente no focinho, e caracteriza medo e comportamentos associados à ansiedade (109).

3.3. Teste de Ansiedade

Após o teste de atividade motora, com a finalidade de avaliar os possíveis efeitos da ingestão crônica de álcool sobre o estado de ansiedade do animal e sua relação com o seu efeito sobre as áreas cerebrais de estresse, foi utilizado o teste de Labirinto em Cruz Elevado. Este instrumento tem sua estrutura em madeira e consiste em dois braços abertos e dois braços fechados em cruz medindo 50x10cm, sendo que as paredes do braço fechado apresentam 40cm de altura. O aparato está elevado do chão a 50 cm.

O labirinto em cruz elevado baseia-se no princípio de que o animal apresenta medo de lugares altos, procurando evitá-los, e que o confinamento nos braços fechados está relacionado com um estado semelhante à ansiedade. Assim, foi analisado o número total de entradas em braços abertos e o número total de entradas no braço fechado. Estes parâmetros demonstraram o comportamento exploratório do animal que ocorre quando o animal ultrapassa com as patas traseiras a linha de intersecção do labirinto em cruz. O maior número de entradas no braço aberto é um comportamento que está normalmente associado à administração de ansiolíticos e o maior número de entradas no braço fechado está associado a um estado de ansiedade. O número de transições entre os braços também permite a análise da atividade locomotora dos animais (110).

A análise dos parâmetros tidos como etológicos auxilia na interpretação do comportamento do animal uma vez que podem refletir de uma forma mais contundente os comportamentos de ansiedade e de atividade locomotora do que os parâmetros clássicos utilizados (111). Esses parâmetros incluem o levantamento (em inglês *rearing*) que é uma medida na qual o animal se apoia sobre as patas traseiras e adota a postura bípede e que caracteriza a exploração de um ambiente desconhecido. O mergulho de cabeça (*head dipping*) que é caracterizado pelo comportamento de quando o animal projeta a cabeça para baixo do braço aberto, o que caracteriza uma atividade livre de ansiedade, pois representa um risco para o animal. O *peeping out* que é caracterizado por quando o animal projeta a cabeça

para o braço aberto, porém sem atravessar a linha de interseção e esta medida comportamental caracteriza medo e ansiedade. O maior número de bolos fecais está associado a um comportamento ansioso (109). Todos os animais foram submetidos a uma seção (5 minutos cada) de teste, caracterizada pela introdução do animal no centro do aparato sob iluminação de 60lx em ambiente silencioso, entre as selções o aparato foi limpo com álcool 10%. Todos os testes comportamentais foram realizados no período da manhã.

3.4. Anestesia

Ao final do tratamento, os animais foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de uma dose de 1 ml/kg da mistura de quetamina (40 mg/kg), xilasina (20 mg/kg), fentanil (0,3 a 0,5 mg/kg) e acepromazina (1ml/kg), para se atingir um estado profundo de anestesia antes da perfusão.

3.5. Perfusão

Para a realização da perfusão, foi criado um acesso na região do processo xifoide do animal, com tesoura. As costelas foram cortadas, o diafragma foi separado assim como os ligamentos da região, os pulmões e o timo foram afastados para melhor acesso ao coração. Imediatamente antes da perfusão, foi recolhido sangue do animal proveniente do coração para tubos Eppendorf heparinizados. Após centrifugação a 2300 rpm a 4 °C por 15 min, o plasma foi extraído e ensaiado quanto ao teor de etanol usando o Teste Múltiplo de Reagente NAH-ADH (Sigma Aldrich, EUA). Em seguida foi feita uma pequena incisão no ventrículo esquerdo e inserida uma cânula de perfusão com solução salina a 0,9%, que foi clipada para melhor fixação. O átrio direito também sofreu uma pequena incisão e, então foi iniciada a perfusão com a solução salina até que não houvesse mais sangue aparente no sistema vascular do animal (cerca de 100 ml em 1 minuto). A seguir foi realizada a perfusão com fixador de formaldeído a 4% em solução aquosa a partir de paraformaldeído aquecido a 60-65⁰C, com pH 9,5 a 4 °C durante 25 minutos. A artéria aorta abdominal foi clipada para que o fixador se concentrasse no segmento cranial do animal.

Depois da decapitação do animal ao nível da medula espinal cervical, o encéfalo foi retirado da caixa craniana e permaneceu em pós-fixação durante 1 hora em 50 ml do fixador à temperatura de 4 °C. Após este período, eles foram colocados em solução para crioproteção durante aproximadamente 24 horas.

3.6. Microtomia

Os encéfalos, após o emblocamento, foram seccionados em cortes frontais de 30µm com um micrótomo de congelamento, de forma a produzir 5 séries de cada encéfalo em 5 compartimentos diferentes, colocados em solução anticongelante (sacarose diluída em uma solução de PBS + etilenoglicol + água). O tecido foi então guardado em solução anticongelante em freezer a -20 °C para serem utilizados na imunoistoquímica.

3.7. Regiões de Interesse

Para a análise da imunorreatividade à dopamina foi analisada a principal região fonte de dopamina da via de recompensa cerebral ou mesolímbocortical: a área tegmental ventral (bregma: -5.04). Para análise da imunorreatividade ao CRF foram analisadas as principais regiões associadas à resposta emocional de estresse em áreas extrahipotalâmicas: amígdala e suas divisões central, medial e basolateral (bregma: -2.76); núcleo intersticial da estria terminal (bregma: -0.60); área septal e suas divisões ventral e dorsal (bregma: +0.60); córtex anterior do giro do cíngulo (bregma: +0.60) e núcleo *accumbens*, parte *core* e *shell* (bregma: +0.60) (112).

3.8. Imunoistoquímica para Dopamina ou CRF

As séries de secções dos encéfalos foram submetidas à imunoistoquímica para dopamina ou CRF. As secções foram retiradas da solução anticongelante e lavadas por 6 vezes de 5 minutos cada, em solução salina tamponada com potássio-fosfato (KPBS) à temperatura ambiente, sob agitação constante a 70 rotações por minuto em agitador orbital ajustável (Fischer Scientific, USA,). Para a neutralização da peroxidase endógena, as secções foram lavadas por 30 minutos sob agitação em uma solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 0,3% em KPBS e então lavadas por

pelo menos 6 vezes de 5 minutos em KPBS. Após isso, as séries foram encubadas em anticorpo primário anti-Dopamina (MyBiosource, San Diego, USA) policlonal feito em coelho na concentração de 1:500, ou anticorpo primário anti-CRF (Bioss, Massachusetts, USA) policlonal feito em coelho na concentração de 1:1000, diluído em KPBS contendo Triton X-100 a 0,3%, e albumina de soro bovino a 1% (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA). As secções mergulhadas na solução do anticorpo primário, permaneceram sob agitação constante em agitador orbital a 4 °C, durante 48 horas. Em seguida, as secções foram retiradas da solução do anticorpo primário, e lavadas por 6 vezes de 5 minutos em solução de KPBS à temperatura ambiente e sob agitação constante. A detecção do anticorpo primário foi obtida pelo método da imunoperoxidase indireta usando a técnica do complexo avidina-biotina (ABC; Vector, Burlingame, CA). As secções foram colocadas em solução de anticorpo secundário biotinilado (imunoglobulinas G conjugadas à biotina) anti-coelho feito em cabra (Vector) na concentração de 1:1000, diluído em KPBS + Triton X-100 a 0,3%. As secções mergulhadas na solução do anticorpo secundário ficaram sob agitação constante no agitador orbital à temperatura ambiente por 60 minutos. Em seguida, as secções foram retiradas desta solução e lavadas por 6 vezes de 5 minutos em KPBS à temperatura ambiente, sob agitação constante. As secções foram mergulhadas em uma solução de avidina e em uma solução de biotina peroxidase (Vector), alternadamente, diluídas em KPBS a uma concentração de 1:500 por 30 minutos. As secções mergulhadas nessa solução permaneceram sob agitação constante, à temperatura ambiente por 60 minutos. Após isso, foram lavadas por 3 vezes de 5 minutos em KPBS à temperatura ambiente, ainda sob agitação constante e por 3 vezes de 5 minutos em solução de tampão acetato de sódio. A reação imunoistoquímica foi revelada utilizando-se a 3,3'diaminobenzidina tetrahydroclorato (DAB 0,05%, Sigma, Missouri, EUA) e o níquel como cromógenos, e H₂O₂ (0,01%, Sigma) durante 10 minutos. Para a finalização, as secções passaram por mais uma lavagem por 3 vezes de 5 minutos em KPBS e por 3 vezes de 5 minutos em solução de tampão acetato de sódio.

3.9. Contagem das células imunorreativas

Os resultados foram analisados em um microscópio Zeiss – Axio Observer D1. A quantificação das células imunorreativas foi realizada de forma cega, a partir do

software Image Pro-Plus, sendo que o espectro de coloração para contagem foi ajustado para a pigmentação preta e foi adotada uma área bidimensional de aproximadamente 500 x 500 μm , respeitando as dimensões de cada região específica de interesse para contagem de cada área cerebral.

3.10. Análise Estatística

A comparação entre os resultados quantitativos dos grupos controle e tratados foi realizada através dos testes t de Student ou Análise de Variância (ANOVA) uma via seguida do teste de Tukey dependendo do caso (software JAMOV v. 0.9). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

4 - RESULTADOS

4.1. Teste de Atividade Motora

O teste do Campo Aberto foi utilizado para a análise da atividade motora, e categorização dos animais que consumiram solução alcooolizada em alta atividade motora e baixa atividade motora. Os resultados da atividade motora (número de cruzamentos nas linhas da base do equipamento) dos animais mostraram diferença significativa, por meio do teste *t* de Student, entre os tercís de animais que consumiram mais e menos álcool [média $\pm$ EPM; AAM: 51,83 $\pm$ 2,18; BAM: 29,0 $\pm$ 3,33 ($t=5,727$; $p = 0,002$); figura 4].

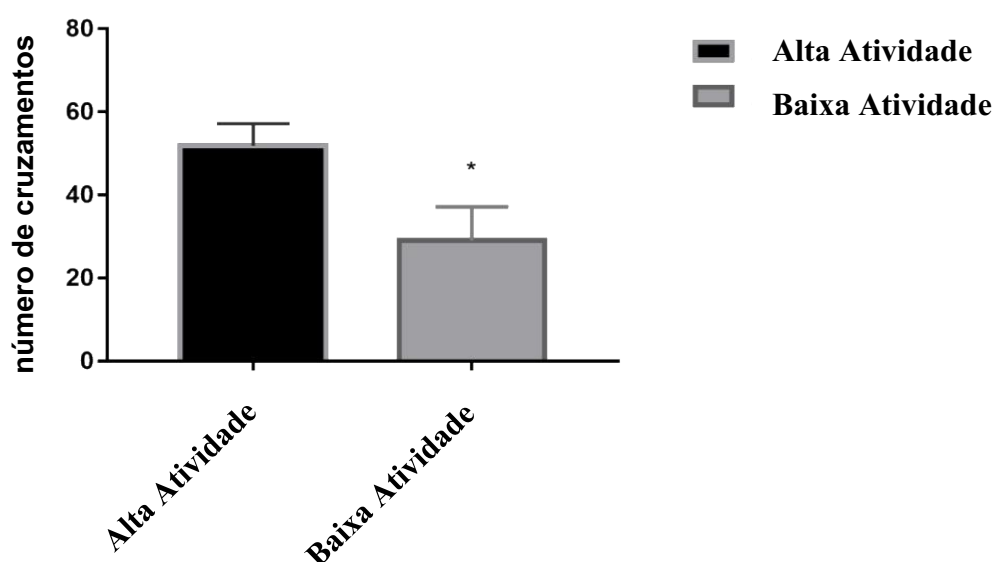


Figura 4 – Número de cruzamentos no Campo Aberto realizados pelos animais dos grupos AAM e BAM. Os valores estão expressos em média $\pm$ EPM (teste *t* de Student; * $p < 0,05$).

4.2. Consumo de Álcool

O consumo de álcool foi em média, durante o período de tratamento, de $15,2 \pm 0,64$ g/kg/24h para o grupo AAM e $13,3 \pm 0,42$ g/kg/24h para o grupo BAM, com diferença significativa entre os dois grupos analisada por meio do teste *t* de Student ($t=2,456$; $p = 0,04$; figura 5).

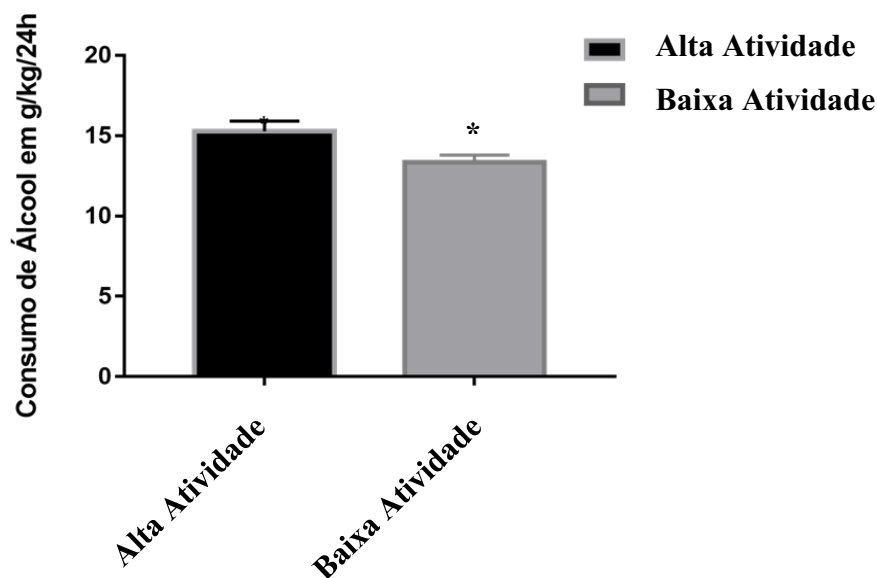


Figura 5 – Consumo médio de solução alcoolizada pelos animais dos grupos AAM e BAM. Valores expressos em g/Kg/24h $\pm$ EPM (teste *t* de Student; * $p<0,05$).

Com relação à concentração de álcool no sangue, não foram observadas diferenças significativas, por meio do teste *t* de Student, entre os dois grupos que consumiram a solução alcoolizada, AAM ($70,01 \pm 14,8$ mg/ dL) e BAM ($61,3 \pm 12,2$ mg/ dL).

4.3. Ingestão de Ração

Com relação ao consumo de ração ao longo do tratamento, o consumo médio pelos animais dos grupos Controle, Alta Atividade e Baixa Atividade foi respectivamente de: $52,91 \pm 5,89$; $63,42 \pm 7,14$ e $64,66 \pm 6,77$ (valores em gramas $\pm$ EPM), sem diferença significativa entre os grupos, analisada por meio do teste ANOVA uma via (figura 6).

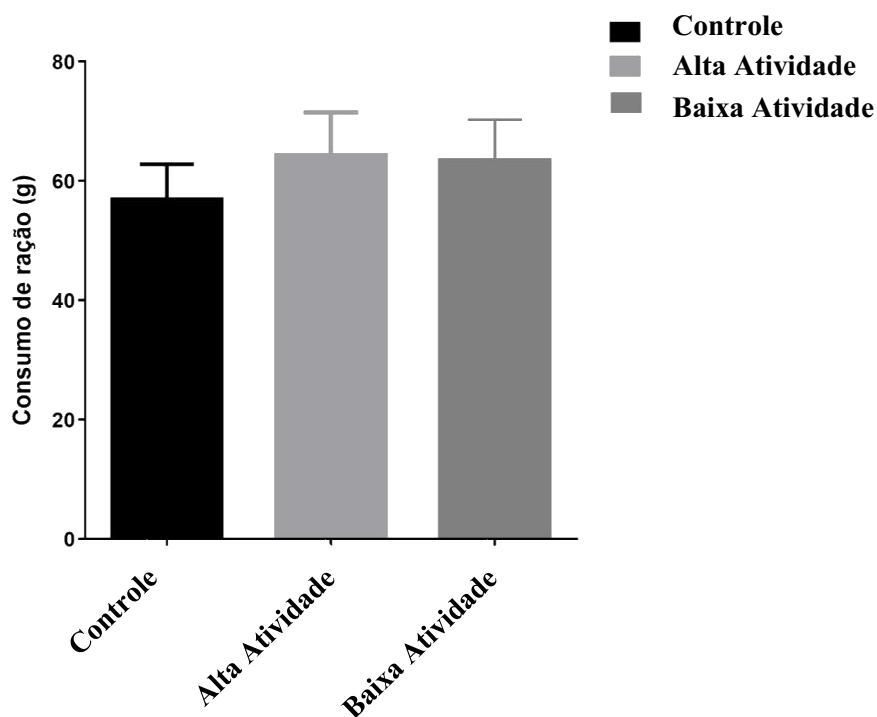


Figura 6 – Consumo de ração, em gramas, pelos animais dos grupos Controle, AAM e BAM (ANOVA uma via).

4.4. Ingestão de Água

O consumo de água ao longo do tratamento foi em média $\pm$ EPM de $338,38 \pm 19,46$; $365,30 \pm 16,62$ e $366,70 \pm 15,94$ ml pelos animais dos grupos Controle, Alta Atividade e Baixa Atividade, respectivamente, sem diferença significativa analisada por meio do teste ANOVA uma via (figura 7).

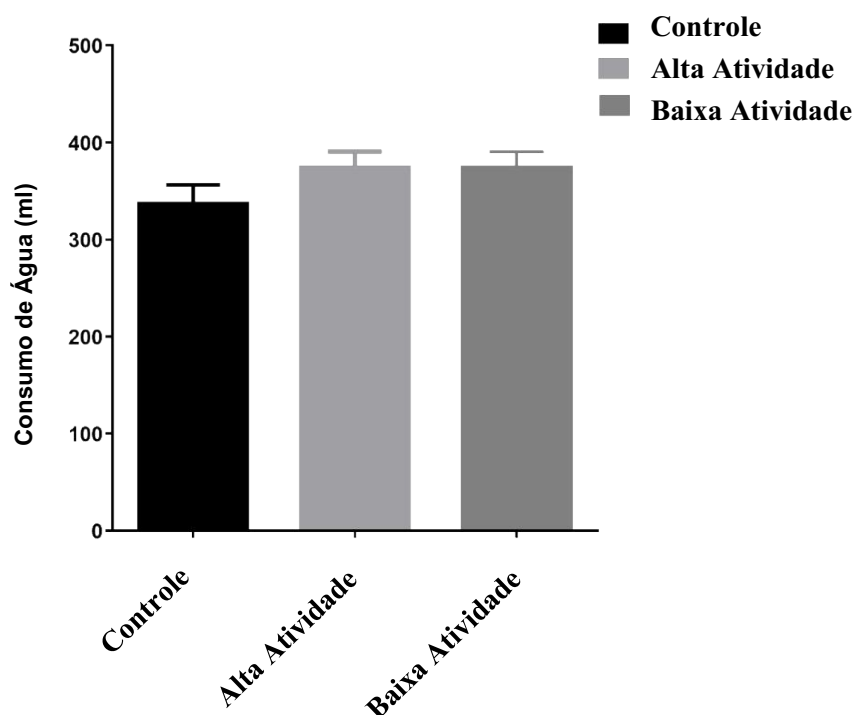


Figura 7 – Consumo de água, em mililitros, pelos animais dos grupos Controle, AAM e BAM durante o tratamento (ANOVA uma via).

4.5. Massa Corporal

A média da massa corporal (em gramas $\pm$ EPM) dos animais dos grupos Controle, Alta Atividade e Baixa Atividade, ao longo do tratamento, foi respectivamente de $306,50 \pm 17,63$; $296,30 \pm 12,07$ e $314,80 \pm 12,98$ g. Por meio do teste ANOVA uma via não foi observada diferença significativa entre estes valores (figura 8).

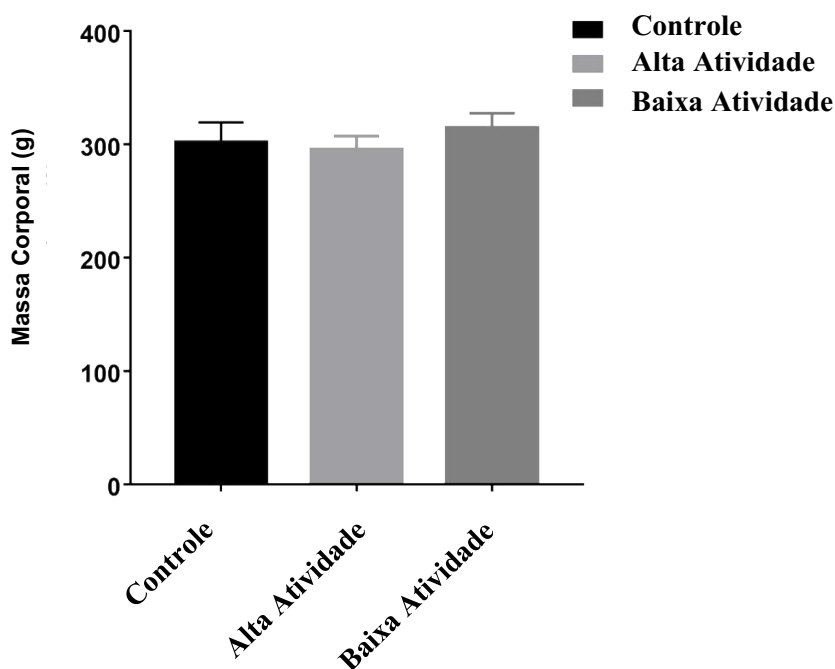


Figura 8 – Média da massa corporal, em gramas, dos animais dos grupos Controle, AAM e BAM durante o período de tratamento (ANOVA uma via).

4.6. Testes Comportamentais

Em relação às medidas comportamentais no Labirinto em Cruz Elevado, o parâmetro de bolos fecais no grupo Alta Atividade apresentou quantidade significativamente menor em relação aos demais grupos, caracterizando um efeito ansiolítico promovido pelo álcool (ANOVA uma via; $F(2, 15) = 5,918$; $p = 0,01$; pós-teste de Tukey entre os grupos Alta Atividade e Controle, $p = 0,01$). Todos os outros parâmetros medidos no Labirinto em Cruz Elevado e no Campo Aberto, não apresentaram diferença significativa entre os grupos (tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetros analisados nos testes comportamentais de Labirinto em Cruz Elevado e de Campo Aberto (média $\pm$ EPM; teste ANOVA uma via; pós-teste de Tukey; *p < 0,05).

Parâmetro	Controle	Alta Atividade	Baixa Atividade
Labirinto em Cruz Elevado			
entradas braço aberto	1,83 $\pm$ 1,13	5,16 $\pm$ 1,53	2,00 $\pm$ 0,85
espreita braço aberto	2,83 $\pm$ 1,64	6,66 $\pm$ 1,62	2,66 $\pm$ 1,25
entradas braço fechado	8,33 $\pm$ 1,60	9,50 $\pm$ 1,02	5,66 $\pm$ 1,33
espreita braço fechado	13,50 $\pm$ 1,60	14,67 $\pm$ 2,52	10,00 $\pm$ 2,42
transições	10,17 $\pm$ 2,65	14,67 $\pm$ 2,14	7,66 $\pm$ 1,78
levantamentos	15,50 $\pm$ 2,12	20,17 $\pm$ 2,75	12,67 $\pm$ 2,56
mergulho de cabeça	4,00 $\pm$ 0,00	2,75 $\pm$ 1,18	1,66 $\pm$ 0,33
bolos fecais*	7,16 $\pm$ 1,30	2,00 $\pm$ 1,18	3,16 $\pm$ 0,79
Campo Aberto			
tempo imobilidade periferia (seg.)	0,63 $\pm$ 0,33	0,11 $\pm$ 0,03	0,64 $\pm$ 0,33
tempo imobilidade centro (seg.)	0,02 $\pm$ 0,003	0,02 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,008
levantamentos periferia	13,00 $\pm$ 2,42	18,83 $\pm$ 3,37	13,33 $\pm$ 2,53
levantamentos centro	2,33 $\pm$ 0,84	6,83 $\pm$ 2,22	1,50 $\pm$ 0,84
tempo grooming (seg.)	0,20 $\pm$ 0,07	0,21 $\pm$ 0,05	0,17 $\pm$ 0,03

4.7. Imunorreatividade à Dopamina e ao CRF

Os dados da análise imunoistoquímica mostraram que somente na imunorreatividade à dopamina foram observadas diferenças significativas entre os grupos, sendo na área tegmental ventral entre os grupos Alta Atividade e Baixa Atividade e o grupo Controle (ANOVA uma via; F(14): 5,80 p = 0,01; pós-teste de Tukey, Alta Atividade e Controle, p = 0,05; Baixa Atividade e Controle, p = 0,01; tabela 2; figuras 9, 10 e 11).

Tabela 2 – Número de células imunorreativas à dopamina e ao CRF nas áreas encefálicas analisadas (média $\pm$ EPM; ANOVA uma via com pós-teste de Tukey; * $p < 0,05$).

Áreas Neurais	Controle	Alta Atividade	Baixa Atividade
Dopamina			
Área Tegmental Ventral *	885,0 $\pm$ 146,0	492,0 $\pm$ 51,5	421,0 $\pm$ 81,4
CRF			
Córtex do giro do Cíngulo	666,0 $\pm$ 73,5	655,0 $\pm$ 99,7	482,2 $\pm$ 42,2
Amígdala Central	1050,0 $\pm$ 156,7	1254,0 $\pm$ 208,7	824,0 $\pm$ 119,1
Amígdala Medial	417,0 $\pm$ 66,3	342,3 $\pm$ 47,3	388,6 $\pm$ 44,6
Amígdala Basolateral	561,0 $\pm$ 166,4	354,0 $\pm$ 90,3	273,0 $\pm$ 65,1
Área Septal Dorsal	344,0 $\pm$ 70,5	270,8 $\pm$ 43,7	316,0 $\pm$ 57,1
Área Septal Ventral	419,0 $\pm$ 52,9	393,8 $\pm$ 18,1	375,2 $\pm$ 71,5
BNST	381,0 $\pm$ 99,1	408,2 $\pm$ 56,0	358,0 $\pm$ 36,1
<i>Accumbens</i> Core	370,0 $\pm$ 95,0	218,4 $\pm$ 55,8	333,7 $\pm$ 42,6
<i>Accumbens</i> Shell	173,0 $\pm$ 35,9	190,8 $\pm$ 42,7	228,8 $\pm$ 35,0

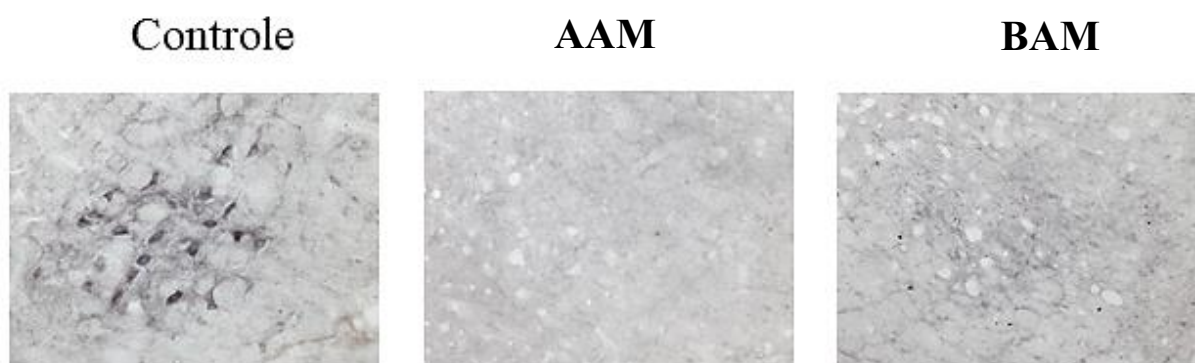


Figura 9 – Células imunorreativas (coloração em preto) à dopamina na área tegmental ventral de animais dos grupos Controle, Alta Atividade (AAM) e Baixa Atividade (BAM). Aumento: 200x.

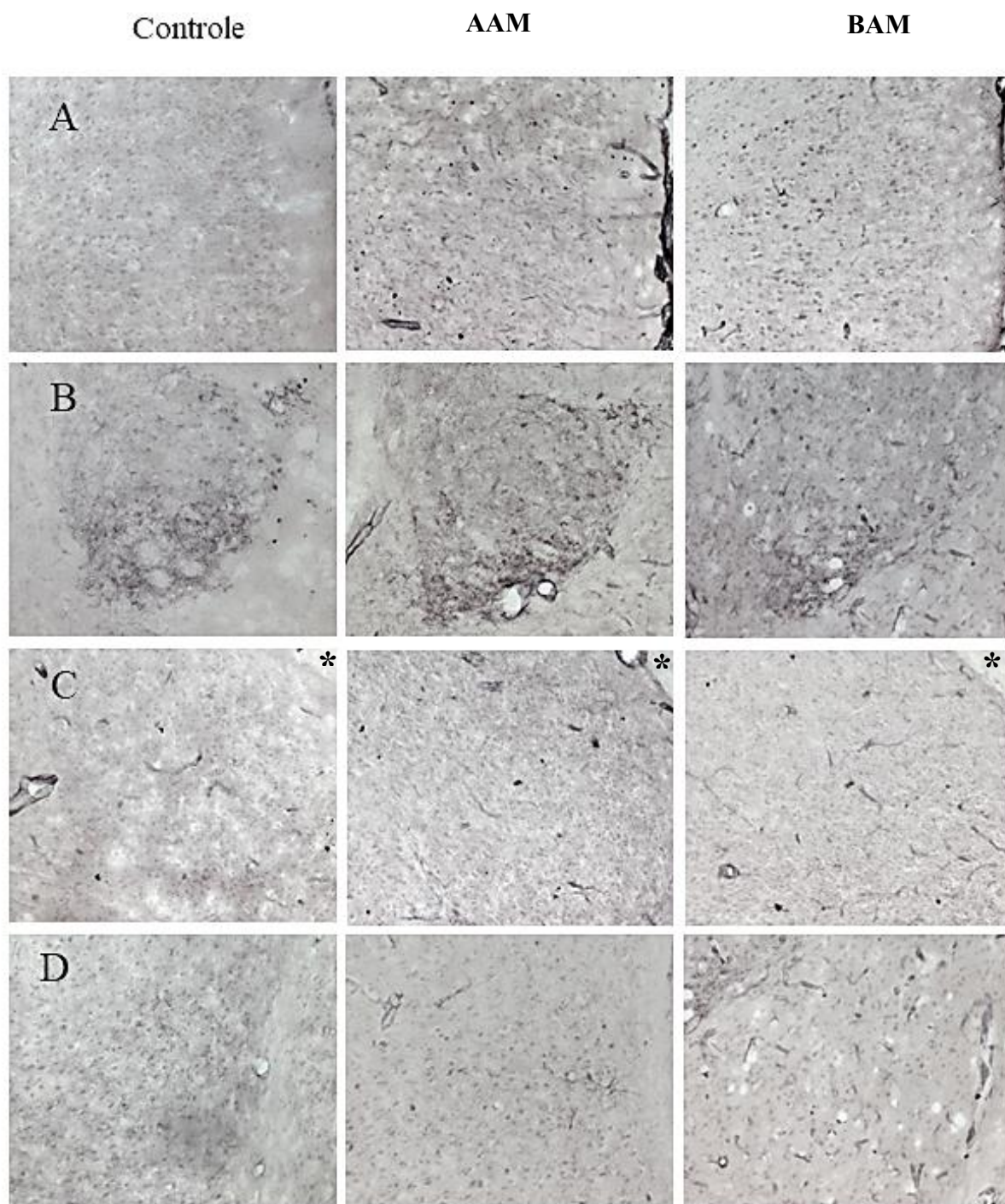


Figura 10 – Células imunorreativas (coloração em preto) ao CRF no (A) córtex cingulado anterior, (B) amígdala central, (C) amígdala medial e (D) amígdala basolateral, de animais dos grupos Controle, Alta Atividade (AAM) e Baixa Atividade (BAM). Aumento: 200x. * trato óptico.

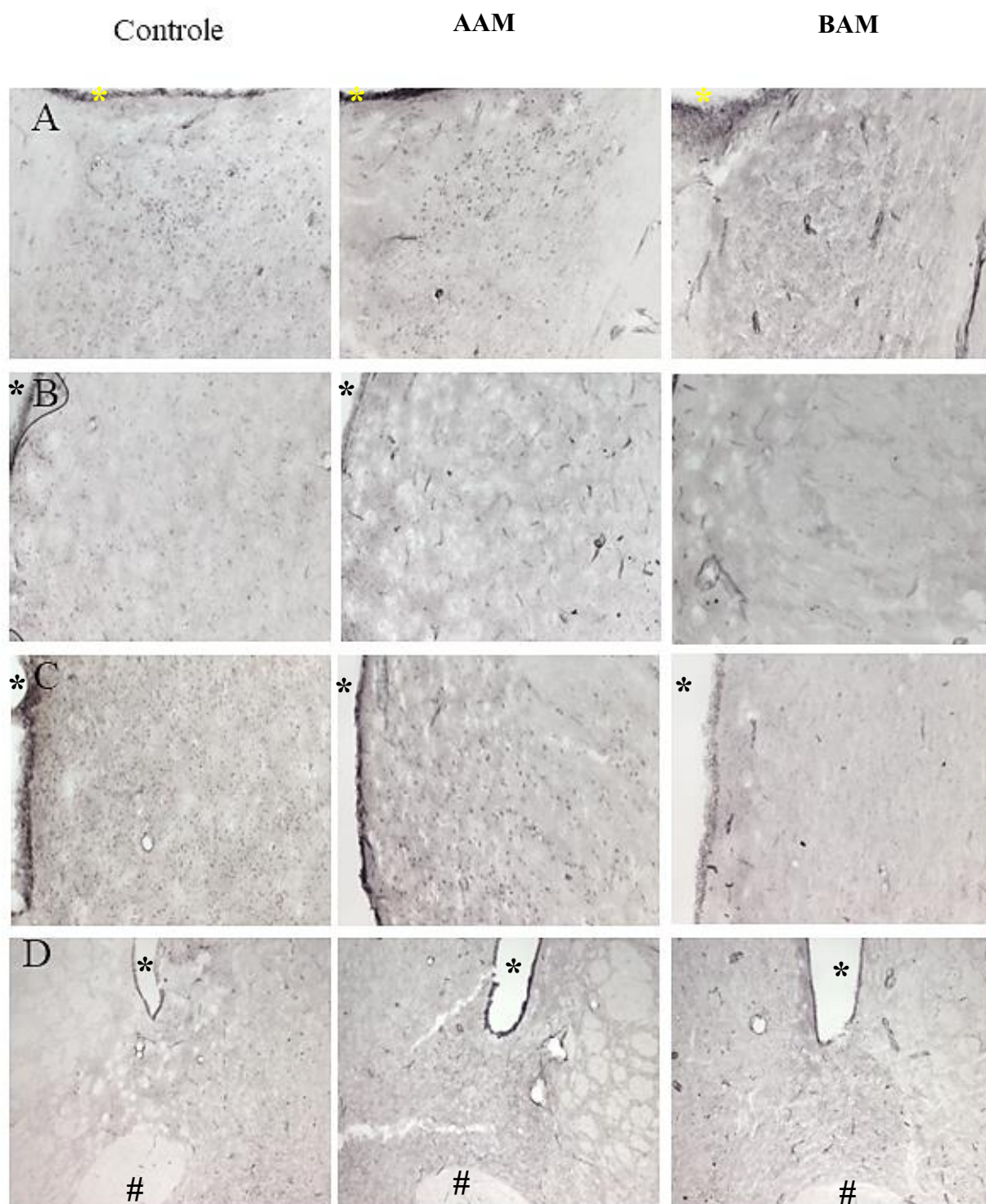


Figura 11 – Células imunorreativas (coloração em preto) ao CRF no (A) núcleo intersticial da estria terminal, (B) área septal dorsal, (C) área septal ventral e (D) núcleo *accumbens*, de animais dos grupos Controle, Alta Atividade (AAM) e Baixa Atividade (BAM). Aumento: A, B, C 200x; D 100x. * ventrículo lateral; # comissura anterior.

5 – DISCUSSÃO

Neste estudo foi possível observar um consumo da solução alcoolizada significativamente maior nos animais categorizados como de alta atividade, por meio do teste de atividade motora, em relação aos categorizados como de baixa atividade, por meio de um protocolo de ingestão de álcool de caráter voluntário, crônico e intermitente. Pode-se sugerir que o álcool exerceu efeito em relação à sensibilização neuronal nesses animais. Segundo dados da literatura, este parâmetro motor e sua relação com a sensibilização cerebral promovida pelo álcool podem ser associados à vulnerabilidade ao alto consumo e à dependência da droga (57,108). O protocolo de ingestão de álcool utilizado, mesmo de caráter voluntário e não invasivo, foi capaz de induzir um alto consumo da solução alcoolizada se comparado a outros estudos (113). Com relação a parâmetros como consumo de ração, água e ganho de peso, não foram observadas diferenças significativas entre animais controle, AAM e BAM, o que contribui para a análise comparativa dos demais parâmetros analisados.

Por meio do teste comportamental do labirinto em cruz elevado, notamos apenas através de um parâmetro comportamental um efeito ansiolítico promovido pela ingestão da solução alcoolizada, em animais de alta atividade motora. A ausência de diferença nos outros parâmetros pode ser associada à ausência de resposta CRFérgica ao tratamento, tanto em animais AAM como em animais BAM. Testes comportamentais em camundongos (114) mostraram que animais que apresentam comportamentos sugestivos de ansiedade, nos testes comportamentais, estiveram associados a uma maior chance de serem sensibilizados pelo álcool, o que está de acordo com grande parte dos estudos que associam a ansiedade ao consumo do álcool; no entanto, resultados opostos também já foram observados (114).

A análise imunoistoquímica do sistema dopaminérgico de animais tratados com solução alcoolizada indicou redução da imunoreatividade à Dopamina na VTA, sem efeito sobre o sistema CRFérgico. Tendo em mente que o consumo agudo do álcool gera um aumento da imunoreatividade para dopamina na área tegmental ventral (115), observamos neste estudo que o uso crônico induziu uma resposta oposta, o que apoia a teoria do Processo Oponente da Regulação Afetiva (26,32). Segundo esta teoria, no primeiro momento o consumo da droga está associado ao seu efeito

de reforço positivo e ativação dopaminérgica, mas em um segundo momento o consumo passa a estar associado ao seu efeito de reforço negativo e ativação CRFérgica. A menor imunorreatividade à dopamina na área tegmental ventral nos animais que consumiram álcool cronicamente, pode estar associada às suas consequências comportamentais e emocionais de rebaixamento do humor e anedonia (116), que contribuiriam para o aumento progressivo da ingestão da droga. De acordo com Koob (117), a diminuição da resposta prazerosa decorrente do uso crônico da droga contribuiria para o desenvolvimento da dependência de drogas. Não foi observada diferença significativa entre os animais de alta e baixa atividade motora na imunorreatividade dopaminérgica na área tegmental ventral, que representa o início do sistema de recompensa cerebral, sem até o momento uma explicação viável para isso (118). A literatura científica tem mostrado que outros fatores, como modificações epigenéticas e interações entre diversos circuitos neuronais, contribuem aumentando ou diminuindo as chances de se desenvolver transtornos relacionados com o uso do álcool (119). No entanto, a diminuição da imunorreatividade dopaminérgica nos animais que consumiram álcool cronicamente pode estar associada ao que Cloninger definiu em 1987 (24) como a “Dependência de Tipo I”. Esse tipo de dependência se caracteriza por uma baixa expressão de dopamina, alta expressão de serotonina e comportamentos de evitação de danos (*harm avoidance*). Ainda segundo Abrahão e colaboradores (57), a diferença entre sensibilizados e não sensibilizados pode estar relacionada à maior sensibilidade de receptores para dopamina no núcleo *accumbens* ou a eventos de recaptação do neurotransmissor neste núcleo, independentemente da quantidade de dopamina liberada pela área tegmental ventral (120). Desta forma, alterações causadas por drogas de abuso no sistema mesolímbocortical mostram uma grande variabilidade de atuação, tornando complexo seu estudo (121).

Seria esperado o aumento da imunorreatividade ao CRF nos circuitos CRFérgicos extrahipotalâmicos como efeito da ingestão crônica de álcool (117). Este efeito não pôde ser observado no presente estudo, talvez pelo fato de que a análise cerebral não ocorreu durante períodos de abstinência. Pode-se supor que o período de quatro semanas, apesar de ser suficiente para induzir mudanças na neurotransmissão dopaminérgica, não tenha sido suficiente para que alterações no sistema CRFérgico extrahipotalâmico se estabelecessem, já que a literatura mostra que a exposição crônica ao álcool pode diminuir a expressão de CRF nessas

regiões encefálicas, sendo observado o contrário durante os períodos de retirada (102). Tem-se também o fato de que a baixa imunorreatividade ao CRF pode ser devido à sua maior taxa de exocitose e consequentemente maior concentração do peptídeo no meio extracelular. Muitos métodos de administração crônica de álcool, por si mesmos são estressantes, variam quanto ao perfil de administração, se contínuos ou intermitentes, e estes fatores interferem significativamente nos resultados associados à expressão de CRF no encéfalo, em estudos sobre o consumo de álcool (122). São necessários estudos que possam controlar ou reduzir ao máximo os efeitos estressores da administração de álcool sobre o indivíduo e a padronização de modelos de administração, para que resultados mais comparáveis sejam obtidos (123).

Este estudo teve como limitações o tamanho reduzido da amostra impactando no poder dos testes estatísticos, associado à alta variabilidade de alguns parâmetros analisados. Da mesma forma, dados comportamentais foram avaliados somente ao fim do tratamento, não se estabelecendo parâmetros basais dos mesmos.

Muitos estudos ainda são necessários para a consolidação dos efeitos do álcool sobre os sistemas neurais assim como sobre a associação de determinados perfis neurológicos e a suas implicações quanto à vulnerabilidade ou não para a dependência de álcool.

6 – CONCLUSÕES

Por meio do presente estudo pode-se concluir que animais que consumiram solução alcoolizada de forma crônica e intermitente puderam ser classificados em animais de alta e baixa atividade motora, os animais de alta atividade foram aqueles que consumiram significativamente mais álcool. O álcool esteve pouco associado a um efeito ansiolítico nos testes comportamentais, com nenhum efeito sobre o sistema cerebral de estresse. No entanto, foi observado efeito inibitório do consumo crônico de álcool sobre o sistema cerebral de recompensa dopaminérgico, independente do perfil de atividade motora.

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Spanagel R. Alcoholism: A Systems Approach From Molecular Physiology to Addictive Behavior. *Physiol Rev* [Internet]. 2009;89:648–705. Available from: <http://physrev.physiology.org/content/physrev/89/2/649.full.pdf>
2. World Health Organisation. Global status report on alcohol and health 2018. 2018.
3. Association AP. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. 2014.
4. Rehm J, Mathers C, Popova S, Thavorncharoensap M, Teerawattananon Y, Patra J. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. *Lancet* [Internet]. 2009 Jun;373(9682):2223–33. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673609607467>
5. Parry CD, Patra J, Rehm J. Alcohol consumption and non-communicable diseases: epidemiology and policy implications. *Addiction*. 2011 Oct;106(10):1718–24.
6. Devos-Comby L, Lange JE. Standardized Measures of Alcohol-Related Problems: A Review of Their Use Among College Students. *Psychol Addict Behav*. 2008;22(3):349–61.
7. Jones BT, Corbin W, Fromme K. Conceptualizing Addiction: A Review of Expectancy Theory and Alcohol Consumption. *Addiction*. 2001;96(February 2000):57–72.
8. McLellan AT. Have we evaluated addiction treatment correctly? Implications from a chronic care perspective. *Addiction*. 2002;97(3):249–52.
9. Amato L, Davoli M, Perucci CA, Ferri M, Faggiano F, Mattick RP. An overview of systematic reviews of the effectiveness of opiate maintenance therapies: Available evidence to inform clinical practice and research. *J Subst Abuse Treat*. 2005;28(4):321–9.
10. Vaillant GE. A Long-term Follow-up of Male Alcohol Abuse. *Arch Gen Psychiatry* [Internet]. 1996 Mar 1;53(3):243. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2013.01.023>
11. Vaillant GE, HillerSturmhofel S. The natural history of alcoholism. *Alcohol Heal Res World*. 1996;20(3):152–61.
12. Fein G, Landman B. Treated and treatment-naïve alcoholics come from different populations. *Alcohol*. 2005;36(2):19–26.
13. Hasin DS, Stinson FS, Ogburn E, Grant BF. Prevalence, Correlates, Disability, and Comorbidity of DSM-IV Alcohol Abuse and Dependence in the United States. *Arch Gen Psychiatry*. 2007 Jul;64(7):830.
14. Vaillant GE. A long-term follow-up of male alcohol abuse. *Arch Gen Psychiatry* [Internet]. 1996;53(3):243–9. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1001/archpsyc.1996.01830030065010%7CAmerican>
15. Ballenger JC, Goodwin FK, Major LF, Brown GL. Alcohol and central serotonin metabolism in man. *Arch Gen Psychiatry* [Internet]. 1979;36(2):224–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=420544
 16. Heilig MKGF. A key role for corticotropin-releasing factor in alcohol dependence. *Trends Neurosci.* 2007;30(8):399–406.
 17. Dick DM, Kendler KS. The impact of gene-environment interaction on alcohol use disorders. *Alcohol Res* [Internet]. 2012;34(3):318–24. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3606909&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 18. Masur J, dos Santos HMLM. Response variability of ethanol-induced locomotor activation in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 1988;96(4):547–50.
 19. Camarini R, Pautassi RM. Behavioral sensitization to ethanol: Neural basis and factors that influence its acquisition and expression. *Brain Res Bull* [Internet]. 2016;125:53–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.04.006>
 20. Heilig M, Egli M, Crabbe JC, Becker HC. Acute withdrawal, protracted abstinence and negative affect in alcoholism: Are they linked? *Addict Biol.* 2010;15(2):169–84.
 21. Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology* [Internet]. 2010 Jan 26;35(1):217–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2805560/>
 22. Heinz A, Löber S, Georgi A, Wrase J, Hermann D, Rey E-R, et al. Reward craving and withdrawal relief craving: assessment of different motivational pathways to alcohol intake. *Alcohol Alcohol* [Internet]. 2010;38(1):35–9. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cin20&AN=104928233&site=ehost-live>
 23. Goldman D, Oroszi G, Ducci F. The genetics of addictions: Uncovering the genes. *Nat Rev Genet.* 2005;6(7):521–32.
 24. Cloninger CR. A Systematic Method for Clinical Description and Classification of Personality Variants. *Arch Gen Psychiatry* [Internet]. 1987 Jun 1;44(6):573. Available from: <http://archpsyc.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archpsyc.1987.01800180093014>
 25. Cippitelli A, Damadzic R, Frankola K, Goldstein A, Thorsell A, Singley E, et al. Alcohol-Induced Neurodegeneration, Suppression of Transforming Growth Factor- β , and Cognitive Impairment in Rats: Prevention by Group II Metabotropic Glutamate Receptor Activation. *Biol Psychiatry* [Internet]. 2010;67(9):823–30. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsycho.2009.12.018>
26. Solomon RL, Corbit JD. An opponent-process theory of motivation: I. Temporal dynamics of affect. *Psychol Rev* [Internet]. 1974;81(2):119–45. Available from: <http://content.apa.org/journals/rev/81/2/119>
 27. Koob, G F; Bloom FE. Cellular and Molecular Mechanisms of Drug Dependence. *Science* (80-). 1988;242(4879):715–23.
 28. Koob GF, Le Moal M. Addiction and the Brain Antireward System. *Annu Rev Psychol* [Internet]. 2008;59(1):29–53. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.psych.59.103006.093548>
 29. McEwen BS, Gianaros PJ. Stress- and Allostasis-Induced Brain Plasticity. *Annu Rev Med* [Internet]. 2011 Feb 18;62(1):431–45. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-med-052209-100430>
 30. Funk CK, Koob GF. A CRF(2) agonist administered into the central nucleus of the amygdala decreases ethanol self-administration in ethanol-dependent rats. *Brain Res* [Internet]. 2007 Jun 25;1155:172–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2741495/>
 31. Koob GF, Buck CL, Cohen A, Edwards S, Park PE, Schlosburg JE, et al. Addiction as a stress surfeit disorder. *Neuropharmacology*. 2014;76(PART B):370–82.
 32. Koob GF. The dark side of emotion: the addiction perspective. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2015 Apr 15;753:73–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4380644/>
 33. Jones FN, Skinner BF. The Behavior of Organisms: An Experimental Analysis. *Am J Psychol* [Internet]. 1939;52(4):659. Available from: <http://www.jstor.org/stable/1416495?origin=crossref>
 34. Beaulieu J-M, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev*. 2011;63(1):182–217.
 35. Beaulieu JM, Espinoza S, Gainetdinov RR. Dopamine receptors - IUPHAR review 13. *Br J Pharmacol*. 2015;172(1):1–23.
 36. Baik J-H. Dopamine Signaling in reward-related behaviors. *Front Neural Circuits* [Internet]. 2013 Oct 11;7:152. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3795306/>
 37. Tisch S, Silberstein P, Limousin-Dowsey P, Jahanshahi M. The basal ganglia: Anatomy, physiology, and pharmacology. *Psychiatr Clin North Am*. 2004;27(4):757–99.
 38. Schultz W. Reward functions of the basal ganglia. *J Neural Transm*. 2016;123(7):679–93.
 39. Wise RA. Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci* [Internet].

- 2004;5(6):483–94. Available from:
<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrn1406%0Apapers3://publication/doi/10.1038/nrn1406>
40. Grattan DR. The hypothalamo-prolactin axis. *J Endocrinol*. 2015;226(2):T101–22.
 41. Koob GF. Neural Mechanisms of Drug Reinforcement. *Ann NEW YORK Acad Sci*. 1992;171–91.
 42. Wise, Roy A RP. Brain dopamine and reward. *Annu Rev Psychol*. 1989;40:191–225.
 43. Vena AA, Gonzales RA. Temporal Profile Dissociates Regional Extracellular Ethanol versus Dopamine Concentrations. 2015;
 44. Volkow ND, Morales M. Review The Brain on Drugs : From Reward to Addiction. *Cell* [Internet]. 2015;162(4):712–25. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.046>
 45. Stickel A, Rohdemann M, Landes T, Engel K, Banas R, Heinz A, et al. Changes in Nutrition-Related Behaviors in Alcohol-Dependent Patients after Outpatient Detoxification: The Role of Chocolate. *Subst Use Misuse*. 2016;51(5):545–52.
 46. Koob GF, Volkow ND. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The Lancet Psychiatry* [Internet]. 2016;3(8):760–73. Available from:
[http://dx.doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)00104-8](http://dx.doi.org/10.1016/S2215-0366(16)00104-8)
 47. Nutt DJ, Lingford-Hughes A, Erritzoe D, Stokes PRA. The dopamine theory of addiction: 40 years of highs and lows. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2015 May;16(5):305–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3939>
 48. Creed MC, Lu C. Drug-evoked synaptic plasticity : beyond metaplasticity. 2013;1–6.
 49. Rinaldi R. Dopamine and reward seeking: The role of ventral tegmental area. *Rev Neurosci*. 2014;25(5):621–30.
 50. Nestler EJ. Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci* [Internet]. 2005 Nov 1;8(11):1445–9. Available from:
<http://www.nature.com/articles/nn1578>
 51. Oades, R.D.; Halliday G. Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. anatomy and connectivity. 1987. p. 117–65.
 52. IMPERATO Assunta, DI CHIARA G. Preferential Accumbens Stimulation of Dopamine Release in the Nucleus of Freely Moving Rats by Ethanol1. *J Pharmacol Exp Ther*. 1986;239(1):219–39.
 53. Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology* [Internet]. 2009 Aug 26;35(1):217–38. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1038/npp.2009.110>
 54. Trantham-Davidson H, Chandler LJ. Alcohol-induced alterations in dopamine modulation of prefrontal activity. *Alcohol* [Internet]. 2015;49(8):773–9. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.alcohol.2015.09.001>
55. Fernández-Espejo E. Bases neurobiológicas de la drogadicción. *Rev Neurol* [Internet]. 2002 [cited 2018 Aug 27];34(7):659–64. Available from: <https://idus.us.es/xmlui/handle/11441/32332>
 56. Shirayama Y, Chaki S. Neurochemistry of the Nucleus Accumbens and its Relevance to Depression and Antidepressant Action in Rodents. *Curr Neuropharmacol* [Internet]. 2006 Oct 30;4(4):277–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2475798/>
 57. Abrahao KP, Quadros IMH, Andrade ALM, Souza-Formigoni MLO. Accumbal dopamine D2 receptor function is associated with individual variability in ethanol behavioral sensitization. *Neuropharmacology*. 2012 Feb;62(2):882–9.
 58. Clarke R, Adermark L. Dopaminergic Regulation of Striatal Interneurons in Reward and Addiction: Focus on Alcohol. *Neural Plast* [Internet]. 2015;2015:1–11. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/np/2015/814567/>
 59. Shnitko TA, Robinson DL. Regional variation in phasic dopamine release during alcohol and sucrose self-administration in rats. *ACS Chem Neurosci*. 2015;6(1):147–54.
 60. Doyon WM, York JL, Diaz LM, Samson HH, Czachowski CL, Gonzales RA. Dopamine activity in the nucleus accumbens during consummatory phases of oral ethanol self-administration. *Alcohol Clin Exp Res*. 2003;27(10):1573–82.
 61. Ding Z-M, Ingraham CM, Rodd ZA, McBride WJ. The reinforcing effects of ethanol within the posterior ventral tegmental area depend on dopamine neurotransmission to forebrain cortico-limbic systems. *Addict Biol* [Internet]. 2015 May;20(3):458–68. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/adb.12138>
 62. Aalto S, Ingman K, Alakurtti K, Kaasinen V, Virkkala J, Nagren K, et al. Intravenous ethanol increases dopamine release in the ventral striatum in humans: PET study using bolus-plus-infusion administration of [(11)C]raclopride. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 2015;35(3):424–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25492110>
 63. Miller EK, Cohen JD. AN INTEGRATIVE THEORY OF PREFRONTAL CORTEX FUNCTION. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:167–202.
 64. Smith EE, Jonides J. Neuroimaging analyses of human working memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(20):12061–8.
 65. Goldman-Rakic PS. Architecture of the prefrontal cortex and the central executive. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;769:71–83.
 66. Bechara a, Damasio H, Damasio a R. Emotion, decision making and the orbitofrontal cortex. *Cereb Cortex*. 2000;10(3):295–307.

67. Bechara A, Tranel D, Damasio H. Characterization of the decision-making deficit of patients with ventromedial prefrontal cortex lesions. *Brain* [Internet]. 2000;123(11):2189–202. Available from: <https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/123.11.2189>
68. Munakata Y, Herd S a., Chatham CH, Depue BE, Banich MT, O'Reilly RC. A unified framework for inhibitory control. *Trends Cogn Sci* [Internet]. 2011;15(10):453–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tics.2011.07.011>
69. Beauregard M, Lévesque J, Bourgouin P. Neural correlates of conscious self-regulation of emotion. *J Neurosci*. 2001;21(18):RC165.
70. Solbakk AK, Løvstad M. Effects of focal prefrontal cortex lesions on electrophysiological indices of executive attention and action control. *Scand J Psychol*. 2014;55(3):233–43.
71. Abernathy K, Chandler LJ, Woodward JJ. Alcohol and the Prefrontal Cortex [Internet]. Vol. 91, *International Review of Neurobiology*. Elsevier Inc.; 2010. 289-320 p. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7742\(10\)91009-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7742(10)91009-X)
72. Trantham-Davidson H, Burnett EJ, Gass JT, Lopez MF, Mulholland PJ, Centanni SW, et al. Chronic alcohol disrupts dopamine receptor activity and the cognitive function of the medial prefrontal cortex. *J Neurosci* [Internet]. 2014;34(10):3706–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24599469>
73. Narendran R, Mason NS, Paris J, Himes ML, Douaihy AB, Frankle WG. Decreased prefrontal cortical dopamine transmission in alcoholism. *Am J Psychiatry*. 2014;171(8):881–8.
74. Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* (80-) [Internet]. 1981 Sep 18;213(4514):1394 LP-1397. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/213/4514/1394.abstract>
75. Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW. Organization of Ovine Corticotropin-Releasing Factor Immunoreactive Cells and Fibers in the Rat Brain: An Immunohistochemical Study. *Neuroendocrinology* [Internet]. 1983;36(3):165–86. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/123454>
76. Hauger RL. International Union of Pharmacology. XXXVI. Current Status of the Nomenclature for Receptors for Corticotropin-Releasing Factor and Their Ligands. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2003;55(1):21–6. Available from: <http://pharmrev.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/pr.55.1.3>
77. Heinrichs SC, Koob GF. Corticotropin-Releasing Factor in Brain : A Role in Activation , Arousal , and Affect Regulation. *Pharmacology* [Internet]. 2004;311(2):427–40. Available from: <http://jpet.aspetjournals.org/cgi/content/abstract/311/2/427>

78. Müller MB, Wurst W. Getting closer to affective disorders: The role of CRH receptor systems. *Trends Mol Med*. 2004;10(8):409–15.
79. Bittencourt JC, Vaughan J, Arias C, Rissman RA, Vale WW, Sawchenko PE. Urocortin expression in rat brain: Evidence against a pervasive relationship of urocortin-containing projections with targets bearing type 2 CRF receptors. *J Comp Neurol*. 1999;415(3):285–312.
80. Sawchenko PE, Li H-Y, Ericsson A. Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: a tale of two paradigms. In: *Progress in Brain Research*. Elsevier; 2000. p. 61–78.
81. Giardino WJ, Cote DM, Li J, Ryabinin AE. Characterization of Genetic Differences within the Centrally Projecting Edinger–Westphal Nucleus of C57BL/6J and DBA/2J Mice by Expression Profiling. *Front Neuroanat* [Internet]. 2012 Feb 14;6:5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3278674/>
82. Gully D, Geslin M, Serva L, Fontaine E, Roger P, Lair C, et al. 4-(2-Chloro-4-methoxy-5-methylphenyl)-N-[(1S)-2-cyclopropyl- 1-(3-fluoro-4-methylphenyl)ethyl]5-methyl-N-(2-propynyl)-1,3- thiazol-2-amine Hydrochloride (SSR125543A): A Potent and Selective Corticotrophin-Releasing Factor1 Receptor Antagonist. I. *Biochemi. Pharmacology*. 2002;301(1):322–32.
83. Hokfelt T, Johansson O, Goldstein M. Chemical anatomy of the brain. *Science* (80-). 1984 Sep;225(4668):1326–34.
84. Gully D, Geslin M, Serva L, Fontaine E, Roger P, Lair C, et al. thiazol-2-amine Hydrochloride (SSR125543A): A Potent and Selective Corticotrophin-Releasing Factor 1 Receptor Antagonist . II . *Biochemical and Pharmacological Characterization. Pharmacology*. 2002;301(1):322–32.
85. Baldwin HA, Rassnick S, Rivier J, Koob GF, Britton KT. CRF antagonist reverses the “anxiogenic” response to ethanol withdrawal in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 1991;103(2):227–32.
86. Rassnick S, Heinrichs SC, Britton KT, Koob GF. Microinjection of a corticotropin-releasing factor antagonist into the central nucleus of the amygdala reverses anxiogenic-like effects of ethanol withdrawal. *Brain Res* [Internet]. 1993 Mar 5 [cited 2018 Aug 27];605(1):25–32. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000689939391352S?via%3Dihub>
87. Merlo Pich E, Lorang M, Yeganeh M, Rodriguez de Fonseca F, Raber J, Koob GF, et al. Increase of extracellular corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity levels in the amygdala of awake rats during restraint stress and ethanol withdrawal as measured by microdialysis. *J Neurosci* [Internet]. 1995;15(8):5439–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7643193>

88. Valdez GR, Zorrilla EP, Roberts AJ, Koob GF. High-priority communication I Antagonism of corticotropin-releasing factor attenuates the enhanced responsiveness to stress observed during protracted ethanol abstinence. *Alcohol*. 2003 Feb;29(2):55–60.
89. Overstreet DH, Knapp DJ, Breese GR. Modulation of multiple ethanol withdrawal-induced anxiety-like behavior by CRF and CRF(1) receptors. *Pharmacol Biochem Behav* [Internet]. 2004 Feb;77(2):405–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2864717/>
90. Möller C, Wiklund L, Sommer W, Thorsell A, Heilig M. Decreased experimental anxiety and voluntary ethanol consumption in rats following central but not basolateral amygdala lesions. *Brain Res* [Internet]. 1997 Jun 20;760(1–2):94–101. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899397003089>
91. Overstreet DH, Knapp DJ, Breese GR. Accentuated decrease in social interaction in rats subjected to repeated ethanol withdrawals. *Alcohol Clin Exp Res*. 2002 Aug;26(8):1259–68.
92. Breese GR, Overstreet DH, Knapp DJ, Navarro M. Prior multiple ethanol withdrawals enhance stress-induced anxiety-like behavior: inhibition by CRF1- and benzodiazepine-receptor antagonists and a 5-HT1a-receptor agonist. *Neuropsychopharmacology* [Internet]. 2005 Sep;30(9):1662–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15726114>
93. Gilman JM, Hommer DW. Modulation of brain response to emotional images by alcohol cues in alcohol-dependent patients. *Addict Biol*. 2008;13(3–4):423–34.
94. Epstein DH, Preston KL, Stewart J, Shaham Y. Toward a model of drug relapse: An assessment of the validity of the reinstatement procedure. *Psychopharmacology (Berl)* [Internet]. 2006 Nov 22;189(1):1–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1618790/>
95. Lê AD, Shaham Y. Neurobiology of relapse to alcohol in rats. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2002 Apr;94(1–2):137–56. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725802002000>
96. Liu X, Weiss F. Additive effect of stress and drug cues on reinstatement of ethanol seeking: exacerbation by history of dependence and role of concurrent activation of corticotropin-releasing factor and opioid mechanisms. *J Neurosci* [Internet]. 2002;22(18):7856–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12223538>
97. Lê AD, Harding S, Juzysch W, Watchus J, Shalev U, Shaham Y. The role of corticotrophin-releasing factor in stress-induced relapse to alcohol-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)* [Internet]. 2000 Jun;150(3):317–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10923760>

98. Balan S, Widner G, Chen H, Husdon D, Gehlert S, Price RK. Motherhood, Psychological Risks, and Resources in Relation to Alcohol Use Disorder: Are There Differences between Black and White Women? *ISRN Addict*. 2014;2014(437080).
99. Kalivas PW, McFarland K. Brain circuitry and the reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Psychopharmacology (Berl)* [Internet]. 2003;168(1):44–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00213-003-1393-2>
100. Marinelli PW, Funk D, Juzysch W, Harding S, Rice KC, Shaham Y, et al. The CRF1receptor antagonist antalarmin attenuates yohimbine-induced increases in operant alcohol self-administration and reinstatement of alcohol seeking in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007;195(3):345–55.
101. Vertes RP, Fortin WJ, Crane AM. Projections of the median raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* [Internet]. 1999;407(4):555–82. Available from: [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19990517\)407:4%3C555::AID-CNE7%3E3.0.CO;2-E](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19990517)407:4%3C555::AID-CNE7%3E3.0.CO;2-E)
102. Funk CK, O'Dell LE, Crawford EF, Koob GF. Corticotropin-Releasing Factor within the Central Nucleus of the Amygdala Mediates Enhanced Ethanol Self-Administration in Withdrawn, Ethanol-Dependent Rats. *J Neurosci* [Internet]. 2006 Nov 1;26(44):11324–32. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.3096-06.2006>
103. Sparta DR, Sparrow AM, Lowery EG, Fee JR, Knapp DJ, Thiele TE. Blockade of the corticotropin releasing factor type 1 receptor attenuates elevated ethanol drinking associated with drinking in the dark procedures. *Alcohol Clin Exp Res*. 2008;32(2):259–65.
104. Lowery EG, Spanos M, Navarro M, Lyons AM, Hodge CW, Thiele TE. CRF-1 antagonist and CRF-2 agonist decrease binge-like ethanol drinking in c57bl/6j mice independent of the HPA axis. *Neuropsychopharmacology* [Internet]. 2010;35(6):1241–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2009.209>
105. Dolganiuc A. *In vitro* and *in vivo* models of acute alcohol exposure. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2009;15(10):1168. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/15/1168.asp>
106. Koros E, Kostowski W, Bienkowski P. OPERANT RESPONDING FOR ETHANOL IN RATS WITH A LONG-TERM HISTORY OF FREE-CHOICE ETHANOL DRINKING. *Alcohol Alcohol* [Internet]. 1999 Sep 1;34(5):685–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/alcalc/34.5.685>
107. Koenig HN, Olive MF. Ethanol consumption patterns and conditioned place preference in mice lacking preproenkephalin. *Neurosci Lett* [Internet]. 2002 Jun 7 [cited 2018 Aug 27];325(2):75–8. Available from:

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304394002002422>
108. Souza-Formigoni ML, De Lucca EM, Hipólido DC, Enns SC, Oliveira MG, Nobrega JN. Sensitization to ethanol's stimulant effect is associated with region-specific increases in brain D2 receptor binding. *Psychopharmacology (Berl)*. 1999 Oct;146(3):262–7.
 109. Kliethermes CL. Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005 Jan;28(8):837–50.
 110. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 1985 Aug;14(3):149–67.
 111. Cruz APM, Frei F, Graeff FG. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* [Internet]. 1994 Sep 1 [cited 2018 Aug 27];49(1):171–6. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0091305794904723>
 112. Keith Franklin, Paxinos G. The rat brain in stereotaxic coordinates [Internet]. Vol. 3, *Neuropeptides*. 2007. 319 p. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0143417983900495>
 113. Leeman RF, Heilig M, Cunningham CL, Stephens DN, Duka T, O'Malley SS. Ethanol consumption: How should we measure it? Achieving consilience between human and animal phenotypes. *Addict Biol*. 2010;15(2):109–24.
 114. Botia B, Legastelois R, Houchi H, Naassila M. Basal Anxiety Negatively Correlates with Vulnerability to Ethanol-Induced Behavioral Sensitization in DBA/2J Mice: Modulation by Diazepam. *Alcohol Clin Exp Res*. 2015;39(1):45–54.
 115. You C, Vandegrift B, Brodie MS. Ethanol actions on the ventral tegmental area: novel potential targets on reward pathway neurons. *Psychopharmacology (Berl)* [Internet]. 2018 Jun 16;235(6):1711–26. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00213-018-4875-y>
 116. Moretti R, Signori R. Neural correlates for apathy: Frontal-prefrontal and parietal cortical- subcortical circuits. *Front Aging Neurosci*. 2016;8(DEC).
 117. George O, Koob GF. Transition from Drug Use to Drug Dependence. 2011;35(2):232–47.
 118. Egervari G, Ciccocioppo R, Jentsch JD, Hurd YL. Shaping vulnerability to addiction – the contribution of behavior, neural circuits and molecular mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. 2018 Feb;85:117–25. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.05.019>
 119. Matošić A. NEUROBIOLOGICAL BASES OF ALCOHOL ADDICTION. *Acta Clin Croat*. 2016 Jun;47(6):134–50.
 120. Sulzer D. How Addictive Drugs Disrupt Presynaptic Dopamine Neurotransmission.

- Neuron. 2011 Feb;69(4):628–49.
121. Hu H. Reward and Aversion. *Annu Rev Neurosci* [Internet]. 2016;39(1):297–324. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-neuro-070815-014106>
 122. Phillips TJ, Reed C, Pastor R. Preclinical evidence implicating corticotropin-releasing factor signaling in ethanol consumption and neuroadaptation. *Genes, Brain Behav*. 2015 Jan;14(1):98–135.
 123. Palmisano M, Pandey SC. Epigenetic mechanisms of alcoholism and stress-related disorders. *Alcohol* [Internet]. 2017 May;60(2):7–18. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0741832916302889>

8 – ANEXO I: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Análise Imunoistoquímica do Processo Oponente da Regulação Afetiva em Resposta ao Uso Crônico de Alcool", protocolada sob o CEUA nº 3482080218, sob a responsabilidade de **Rafael Conte** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 20/03/2018.

We certify that the proposal "Immunohistochemical Analysis of the Opponent Process of Affective Regulation in Response to Chronic Use of Alcohol", utilizing Heterogenics rats, protocol number CEUA 3482080218, under the responsibility of **Rafael Conte** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 03/20/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **03/2018** a **02/2019**

Área: **Neurociências/neurologia**

Origem: **CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia**

Especie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **4 a 10 semanas**

N: **---**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **250 a 400 g**

Local do experimento: Laboratório Multiusuário - Departamento de Morfologia e Genética

São Paulo, 20 de março de 2018

Prof. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dra. Daniela Santoro Rosa
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo