

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

FREDERICO VELASCO COSTA SANGUEDO

**O EFEITO DO DESENVOLVIMENTO DA SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL  
NA ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA ERK EM ESTRUTURAS CEREBRAIS  
RELACIONADAS À DEPENDÊNCIA QUÍMICA**

Campos dos Goytacazes  
2013

FREDERICO VELASCO COSTA SANGUEDO

**O EFEITO DO DESENVOLVIMENTO DA SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL  
NA ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA ERK EM ESTRUTURAS CEREBRAIS  
RELACIONADAS À DEPENDÊNCIA QUÍMICA**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, na Área de Concentração de Ensaios Farmacológicos, Afecções Clínicas e Cirúrgicas de Animais de Pequeno Porte.

ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> Marinete Pinheiro Carrera  
CO-ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> Flávia Regina Cruz Dias

Campos dos Goytacazes  
2013

FREDERICO VELASCO COSTA SANGUEDO

**O EFEITO DO DESENVOLVIMENTO DA SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL  
NA ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA ERK EM ESTRUTURAS CEREBRAIS  
RELACIONADAS À DEPENDÊNCIA QUÍMICA**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, na Área de Concentração de Ensaio Farmacológicos, Afecções Clínicas e Cirúrgicas de Animais de Pequeno Porte.

**Aprovada em 14 de novembro de 2013.**

Membros da Comissão Examinadora:

---

Prof. Arthur Giraldo Guimarães  
(DSc, Ciências Biológicas) – UENF

---

Prof. Enrrico Bloise  
(PhD, Biotecnologia Médica) – UFRJ

---

Prof. Rodrigo Rodrigues de Oliveira  
(DSc, Química de Produtos Naturais) – UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Flávia Regina Cruz Dias  
(DSc, Produção Animal) – UENF  
(Co-orientadora)

---

Prof<sup>a</sup>. Marinete Pinheiro Carrera  
(DSc, Psicobiologia) – UENF  
(Orientadora)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus por guiar meus passos na vida.

Agradeço com muito amor à minha família que sempre me estimulou e torceu por mim incondicionalmente. Especialmente a minha mãe Heloisa, a minha irmã Cristhiane e meu sobrinho Miguel.

Agradeço a minha orientadora Marinete Carrera pelo acompanhamento acadêmico, ensinamentos, paciência, orientação e dedicação a esse trabalho.

Agradeço a minha co-orientadora Flávia Dias pela amizade, acompanhamento acadêmico, dedicação e colaboração em todos os momentos desse trabalho.

Agradeço aos amigos do laboratório e para a vida Victor Hugo Nicácio, João Marcos Bastos e Maria de Fátima Sampaio por toda a amizade, cooperação, confiança, solidariedade e companheirismo ao longo desse tempo. Vocês foram fundamentais nessa caminhada!

Agradeço aos “melhores amigos” Mayara Souza e Ivan Vilela. Obrigado pela confiança, apoio, amor, carinho e amizade. Vocês são essenciais para mim!

Obrigado as pessoas especiais para mim e àqueles que mesmo de longe torcem por mim.

Agradeço aos professores no decorrer da minha formação.

Agradeço aos amigos do Instituto Federal Fluminense, obrigado por acreditarem e investirem em mim! Agradeço a equipe gestora pelo incentivo à qualificação e especialmente aos amigos Guilherme Sá, Thaís Sampaio e Adriana Lima pela amizade, solidariedade e compreensão dos momentos ausentes pela dedicação a esse trabalho.

Agradeço aos meus alunos do curso de técnico de Farmácia por me ensinarem tanto e a toda equipe do SENAC.

Agradeço a professora Izabel Céspedes da UNIFESP e suas alunas Tatiana e Kethlein pela oportunidade do estágio realizado em seu laboratório e por toda a atenção, gentileza e solidariedade.

Agradeço aos professores da banca pela disponibilidade e participação na análise desse trabalho.

Agradeço ao apoio dos funcionários da UENF, especialmente a Jovana e Conceição por toda atenção e gentileza em tantos momentos, às técnicas Beatriz e Jovana do CBB por toda solidariedade e atenção e ao técnico Alexandre pelos ensinamentos.

Agradeço aos professores Richard Samuels e Arthur Giraldi e ao aluno Helder pela solidariedade e cooperação.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UENF e a CAPES pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho.

*“Educação não transforma o mundo. Educação muda pessoas. Pessoas transformam o mundo”.*

*Paulo Freire*

## RESUMO

A dependência química é um dos grandes problemas de saúde pública do mundo moderno que resulta em complicações econômico-sociais. A dependência química se constitui em um conjunto de fenômenos comportamentais, cognitivos e fisiológicos que se desenvolve após o consumo repetitivo de uma substância psicoativa. Caracteriza-se também por um desejo forte de consumo dessa substância associado à sua utilização persistente, apesar das suas consequências negativas, dando-se uma maior prioridade ao uso da substância, em detrimento de outras atividades e obrigações. Dentre as substâncias psicoestimulantes que produzem dependência química estão drogas, como a cocaína e as anfetaminas. A exposição crônica a essas drogas produz mudanças na atividade neural em estruturas cerebrais envolvidas com a ativação dopaminérgica levando ao desenvolvimento da sensibilização comportamental. A sensibilização comportamental se expressa pelo acréscimo significativo da atividade locomotora em resposta a administrações diárias e em doses fixas do psicostimulante. É de grande importância não somente identificar as áreas cerebrais que estão relacionadas à sensibilização, mas também identificar os mecanismos pelos quais a sensibilização se desenvolve. A sensibilização é mediada por marcadores moleculares e entre eles está a proteína quinase regulada por sinais extracelulares (*extracellular signal-regulated kinase* - ERK). Estudos mostram que a cocaína e as anfetaminas aumentam a ativação da ERK em estruturas cerebrais da via dopaminérgica mesolímbica. Diante disso, este trabalho teve como objetivo verificar se o tratamento agudo e crônico com o agonista dopaminérgico apomorfina (APO) produziria o aumento da ativação da proteína ERK em áreas classicamente reconhecidas na dependência química como o córtex pré-frontal, núcleo accumbens, amígdala e hipotálamo lateral, assim como investigar o papel do ambiente sobre a ativação dessas estruturas. Ao contrário de outras drogas psicoestimulantes que são agonistas dopaminérgicos indiretos, a apomorfina é um agonista direto dos receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> e produz sensibilização comportamental na dose de 2,0 mg/kg. Para esta pesquisa foram realizados 3 experimentos. O experimento 1 teve como objetivo a construção de uma curva temporal de ativação da ERK. Para isso, ratos foram divididos em grupos que receberam apomorfina (2,0 mg/kg; sc) ou veículo

e após 15, 30 e 60 minutos da administração foram eutanasiados e os cortes cerebrais foram processados por imunistoquímica. Os resultados mostraram que a apomorfina produziu ativação de ERK fosforilada (ERK-P) no córtex pré-frontal, núcleo accumbens e hipotálamo lateral nos tempos de 15, 30 e 60 minutos após a administração. Não houve ativação da ERK na amígdala. No experimento 2, investigou-se o efeito da administração aguda de apomorfina no ambiente experimental sobre a ativação da ERK. Para tanto, ratos receberam apomorfina (2,0 mg/kg; sc) ou veículo e foram colocados na arena experimental e a locomoção foi medida por 30 min, pois este tempo permite avaliar melhor os efeitos locomotores produzidos pela APO. Após o teste na arena, os animais foram eutanasiados e os cortes cerebrais foram processados por imunistoquímica. Os resultados mostraram que a apomorfina em comparação ao veículo produziu aumento da atividade locomotora e aumentou a ativação de ERK no córtex pré-frontal, núcleo accumbens, hipotálamo lateral. Os resultados também mostraram que houve ativação na amígdala, o que não ocorreu no experimento 1. O experimento 3 teve como objetivo investigar o efeito do desenvolvimento da sensibilização comportamental sobre a ativação da ERK. Para isso, os ratos receberam doses diárias de apomorfina (2,0 mg/kg; sc) e sua atividade locomotora foi registrada por 5 dias para o desenvolvimento da sensibilização comportamental. Ao término da sessão do quinto dia, os ratos foram eutanasiados e os cortes cerebrais foram processados por imunistoquímica. Os resultados mostraram que a apomorfina produziu um aumento progressivo da locomoção ao longo dos dias de administração, característico do desenvolvimento da sensibilização locomotora. Os resultados também mostraram que houve aumento da ativação da ERK em todas as estruturas cerebrais estudadas. Entretanto, ao se comparar com os resultados do tratamento agudo na arena experimental (experimento 2) houve aumento da ativação da ERK no córtex pré-frontal e diminuição na amígdala. Os resultados sugerem o envolvimento do córtex pré-frontal no desenvolvimento da sensibilização comportamental e também mostram a relação da amígdala com o ambiente. Além disso, os resultados mostram que a apomorfina produz ativação da ERK.



**Palavras-chave:** sensibilização comportamental; ERK; apomorfina; contexto ambiental; locomoção; dopamina.

## ABSTRACT

Addiction is a major public health problem of the modern world which results in economic and social complications. Addiction is a set of behavioral, cognitive and physiological phenomena that develops after repeated use of psychoactive substances. It is also characterized by a strong desire to use these substances and associated persistent substance use despite negative consequences, giving a higher priority to substance use to the detriment of other activities and obligations. Among the substances that produce psychostimulant addiction are drugs such as cocaine and amphetamines. Chronic exposure to these drugs produces changes in neural activity in brain structures involved in dopaminergic activation leading to the development of behavioral sensitization. Behavioral sensitization is expressed by the significant increase in locomotor activity in response to daily administration in fixed doses of the psychostimulant. It is of great importance not only identifying the brain areas that are related to awareness, but also identify the mechanisms by which sensitization develops. The sensitization is mediated by molecular markers and among them is protein kinase regulated by extracellular signals (ERK). Studies show that cocaine and amphetamines increase the activation of ERK in brain structures of the mesolimbic dopaminergic pathway. Thus, this study aimed to determine whether acute and chronic treatment with the dopamine agonist apomorphine ( APO ) produce increased activation of ERK protein in areas classically recognized in chemical dependency as the prefrontal cortex, nucleus accumbens, amygdala and lateral hypothalamus, as well as investigate the role of the environment on the activation of these structures. Unlike other psychostimulant drugs which are indirect dopaminergic agonists, apomorphine is a direct agonist at the D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors and produces behavioral sensitization at a dose of 2.0 mg/kg. For this study three experiments were performed. Experiment 1 aimed to build a temporal curve of ERK activation. For this, rats were divided into groups that received apomorphine (2.0 mg / kg) or vehicle and after 15, 30 and 60 minutes after administration were euthanized and brain sections were processed for immunohistochemistry. The results showed that apomorphine produced phosphorylated ERK activation (ERK -P) in the prefrontal cortex, nucleus accumbens and the lateral hypothalamus in times of 15, 30 and 60 minutes

after administration. There was no activation of ERK in the amygdala. In experiment 2, we investigated the effect of acute administration of apomorphine in the experimental environment on the activation of ERK. For this, mice were given apomorphine (2.0 mg/kg) or vehicle and were placed in the experimental arena and locomotion was measured for 30 min, this time allowing for better assess the locomotor effects. After the arena-test, animals were euthanized and brain sections were processed for immunohistochemistry. The results showed that apomorphine produced compared to vehicle increase in locomotor activity and increased ERK activation in the prefrontal cortex, nucleus accumbens, lateral hypothalamus. The results also showed that there was activation in the amygdala, which was not observed in experiment 1. Experiment 3 aimed to investigate the effect of the development of behavioral sensitization on the activation of ERK. For this purpose, mice received daily doses of apomorphine (2.0 mg/kg) and their locomotor activity was recorded for 5 days for the development of behavioral sensitization. At the end of the session of the fifth day, the rats were euthanized and brain sections were processed for immunohistochemistry. The results showed that apomorphine produced a progressive increase in locomotion over days of administration, characteristic of the development of locomotor sensitization. The results also showed that there was increased activation of ERK in all studied brain structures. However, when comparing with the results of acute treatment in the experimental arena (Experiment 2) there was increased activation of ERK in the prefrontal cortex and decreased in the amygdala. The results suggest the involvement of the prefrontal cortex in the development of behavioral sensitization and also show the relationship of the amygdala with the environment. Furthermore, the results show that apomorphine produces activation of ERK.

**Keywords:** behavioral sensitization; ERK; apomorphine; environmental context; locomotion; dopamine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1:</b>	Representação das vias dopaminérgicas principais relacionadas à dependência química	27
<b>FIGURA 2:</b>	Representação das estruturas cerebrais relacionadas à dependência química	28
<b>FIGURA 3:</b>	Estrutura química da apomorfina	34
<b>FIGURA 4:</b>	Representação da cascata de ativação da ERK	37
<b>FIGURA 5:</b>	Gaiola individual	43
<b>FIGURA 6:</b>	Arena experimental	44
<b>FIGURA 7:</b>	Esquema do experimento 1	46
<b>FIGURA 8:</b>	Esquema do experimento 2	47
<b>FIGURA 9:</b>	Esquema do experimento 3	48
<b>FIGURA 10:</b>	Curva temporal da ERK	55
<b>FIGURA 11:</b>	Representação da ativação da ERK no córtex pré-frontal	57
<b>FIGURA 12:</b>	Representação da ativação da ERK no núcleo accumbens	59
<b>FIGURA 13:</b>	Representação da ativação da ERK na amígdala	61
<b>FIGURA 14:</b>	Representação da ativação da ERK no hipotálamo lateral	63
<b>FIGURA 15:</b>	Fase de Habituação do experimento 2	64
<b>FIGURA 16:</b>	Efeito da administração aguda de apomorfina na locomoção	65
<b>FIGURA 17:</b>	Efeito da administração aguda de apomorfina na ativação da ERK no teste da arena experimental	67
<b>FIGURA 18:</b>	Representação da ativação da ERK do experimento 2	69
<b>FIGURA 19:</b>	Fase de Habituação do experimento 3	70
<b>FIGURA 20:</b>	Fase de indução da sensibilização pela apomorfina	71
<b>FIGURA 21:</b>	Ativação da ERK após a sensibilização locomotora	73
<b>FIGURA 22:</b>	Representação da ativação da ERK do experimento 3	75
<b>FIGURA 23:</b>	Ativação da ERK nas estruturas cerebrais entre os experimentos	78

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ABL</b>	amígdala basolateral
<b>AC</b>	adenilato ciclase
<b>AMG</b>	amígdala
<b>AMPA</b>	ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
<b>APO</b>	apomorfina
<b>ATP</b>	adenosina trifosfato
<b>ATV</b>	área tegmental ventral
<b>AMPc</b>	adenosina monofosfato cíclico
<b>BDNF</b>	do inglês <i>brain-derived neurotrophic factor</i>
<b>CEBRID</b>	Centro Brasileiro sobre Drogas Psicotrópicas
<b>CID-10</b>	Classificação Internacional de Doenças
<b>CPP</b>	condicionamento por preferência de lugar
<b>CPF</b>	córtex pré-frontal
<b>CREB</b>	do inglês <i>cAMP response element-binding protein</i>
<b>DARPP-32</b>	do inglês <i>dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa</i>
<b>DSM</b>	do inglês <i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
<b>ERK</b>	do inglês <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
<b>GTP</b>	guanosina 5-trifosfato
<b>IEG</b>	do inglês <i>immediate early gene</i>
<b>MAP</b>	do inglês <i>mitogen activated protein</i>
<b>MAPK</b>	do inglês <i>mitogen activated protein kinase</i>
<b>NAc</b>	núcleo accumbens
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>PKA</b>	do inglês <i>protein kinase A</i>
<b>PP1</b>	do inglês <i>protein phosphatase 1</i>
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SC</b>	subcutânea
<b>STEP</b>	do inglês <i>striatal-enriched tyrosine phosphatase</i>
<b>THC</b>	tetraidrocanabinol

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
2.1 DEPENDÊNCIA QUÍMICA: ASPECTOS GERAIS.....	20
2.2 A SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	22
2.3 O SISTEMA DOPAMINÉRGICO.....	24
2.4 AS ESTRUTURAS CEREBRAIS RELACIONADAS À DEPENDÊNCIA QUÍMICA.....	27
2.5 A APOMORFINA.....	33
2.6 PROTEÍNA QUINASE REGULADA POR SINAIS EXTRA-CELULARES.....	35
2.7 O DESENVOLVIMENTO DA SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL E SUA RELAÇÃO COM A ERK.....	40
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
4.1 SUJEITOS.....	43
4.2 DROGAS.....	44
4.3 AMBIENTE EXPERIMENTAL.....	44
4.4 EXPERIMENTO 1 – CURVA TEMPORAL DE ATIVAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DA PROTEÍNA QUINASE REGULADA POR SINAIS EXTRACELULARES (ERK-P) APÓS A ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE APOMORFINA .....	45

4.5 EXPERIMENTO 2 – O EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE APOMORFINA NA ARENA EXPERIMENTAL SOBRE A ATIVAÇÃO DE ERK-P.....	46
4.6 EXPERIMENTO 3 – O EFEITO DO DESENVOLVIMENTO DA SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL INDUZIDA POR APOMORFINA SOBRE A ATIVAÇÃO DE ERK-P.....	47
4.7 IMUNOISTOQUÍMICA.....	49
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
5.1 EXPERIMENTO 1 – CURVA TEMPORAL DE ATIVAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DA PROTEÍNA QUINASE REGULADA POR SINAIS EXTRACELULARES (ERK-P) APÓS A ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE APOMORFINA.....	53
5.2 EXPERIMENTO 2 – O EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE APOMORFINA NA ARENA EXPERIMENTAL SOBRE A ATIVAÇÃO DE ERK-P.....	64
5.3 EXPERIMENTO 3 – O EFEITO DO DESENVOLVIMENTO DA SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL INDUZIDA POR APOMORFINA SOBRE A ATIVAÇÃO DE ERK-P.....	70
5.4 COMPARAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE ERK-P ENTRE OS EXPERIMENTOS 2 E 3.....	76
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>79</b>
6.1 EXPERIMENTO 1 – CURVA TEMPORAL DE ATIVAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DA PROTEÍNA QUINASE REGULADA POR SINAIS EXTRACELULARES (ERK-P) APÓS A ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE	

A POMORFINA.....	79
6.2 EXPERIMENTO 2 – O EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE A POMORFINA NA ARENA EXPERIMENTAL SOBRE A ATIVAÇÃO DE ERK-P.....	83
6.3 O DESENVOLVIMENTO DA SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL E A ATIVAÇÃO DA ERK PRODUZIDA PELA APO: COMPARAÇÃO ENTRE O EFEITO AGUDO E O CRÔNICO APÓS A ARENA EXPERIMENTAL.....	85
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>89</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>90</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>101</b>
REPRESENTAÇÃO FOTOMICROGRÁFICA DAS ESTRUTURAS CEREBRAIS DO CONTROLE NEGATIVO.....	101



## 1. INTRODUÇÃO

A dependência química é um dos grandes problemas de saúde pública que leva a danos físicos e mentais e complicações econômico-sociais. A dependência química é um conjunto de sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos que apontam que o indivíduo perdeu o controle de uso da substância e continua a usá-la apesar de reconhecer as consequências adversas deste uso. Os fatores que determinam a origem da dependência podem ser genéticos, ambientais. Estima-se que no Brasil haja mais de 900 mil usuários de cocaína entre homens e mulheres, o que corresponde a 0,7 % da população entre 15 a 64 anos, segundo a edição de 2011 do relatório mundial sobre drogas divulgado pelo Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crimes.

Dentre os problemas clínicos relacionados à dependência está a recaída. Sabe-se que existe uma taxa elevada de recaída entre os usuários de drogas de abuso quando estes são re-expostos à droga ou ao ambiente onde o efeito dessas drogas foi experimentado. Uma das explicações para esse fenômeno é o desenvolvimento do processo de sensibilização comportamental que é caracterizado pelo aumento progressivo de uma determinada resposta comportamental quando a mesma dose da droga é administrada repetidamente (ROBINSON e BERRIDGE, 1993). É inegável a contribuição da sensibilização comportamental na gênese e manutenção da dependência. Outro fator relacionado à recaída é a formação de um tipo de aprendizagem gerada entre os efeitos das drogas e um estímulo ambiental neutro (som, lugares, objetos), o que acarreta no desenvolvimento do processo de condicionamento. Assim, a atenuação e/ou bloqueio desses processos, sensibilização e condicionamento, são desejáveis para o tratamento da dependência química.

A dependência química enquanto um problema multifatorial tem recebido destaque ao ser tratada como um estado suscetível a modificações reguladas pelo sistema dopaminérgico. Devido ao fato que as drogas psicoestimulantes que produzem dependência atuam no sistema dopaminérgico, acredita-se que a chave para a compreensão das alterações de tais mecanismos esteja no sistema dopaminérgico.

Os aspectos moleculares enfatizados na compreensão das bases da dependência química apontam novas estratégias para reverter ou modificar suas

consequências. Várias vias de sinalização dopaminérgica e marcadores moleculares têm sido explorados para decifrar os mecanismos da dependência. Acredita-se que a proteína quinase regulada por sinais extracelulares (*extracellular signal-regulated kinase* - ERK) tenha grande importância na plasticidade neural de longo prazo. A ERK é uma das proteínas quinases da cascata de proteínas quinases ativadas por mitógeno (*mitogen activated protein kinase* - MAPK) que pode ser ativada por estimulação dos receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>.

Algumas estruturas cerebrais estão relacionadas diretamente à dependência química. Dentre elas, é relevante o papel do córtex pré-frontal, núcleo accumbens, amígdala e hipotálamo lateral, devido a sua ligação com o sistema dopaminérgico.

A liberação de dopamina estimulada por drogas psicoestimulantes no núcleo accumbens, córtex pré-frontal, amígdala e hipotálamo lateral tem sido relacionada ao processo de dependência produzido por diferentes drogas. Essas estruturas cerebrais relacionadas à formação das emoções são importantes constituintes do sistema límbico.

O núcleo accumbens (estriado ventral) é uma estrutura cerebral relacionada à sensação de prazer pertencente ao sistema mesolímbico dopaminérgico, do qual recebe projeções. O córtex pré-frontal controla a memória, atenção e é importante no reconhecimento de objetos e associação de memórias com o ambiente. A amígdala está relacionada às memórias afetivas duradouras e com a associação ao ambiente. Essa estrutura se relaciona com o hipotálamo, uma das partes mais importantes do sistema límbico. Este desempenha papel nas emoções e suas partes laterais estão relacionadas ao prazer.

Estudos da literatura científica mostraram o papel da ERK na dependência química usando-se agonistas dopaminérgicos indiretos, tais como a cocaína e as anfetaminas. Assim, a escolha da apomorfina (APO) para a realização desse trabalho tem uma aplicação singular, pois é um agonista direto dos receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> e produz sensibilização comportamental em dose elevada. Assim, a hipótese desse trabalho é que o processo de sensibilização comportamental induzida pela apomorfina aumentaria a ativação da ERK nas estruturas cerebrais relacionadas à dependência química.

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo investigar se o tratamento agudo e crônico com apomorfina produziria o aumento da ativação da proteína ERK no córtex pré-frontal, núcleo accumbens, amígdala e hipotálamo lateral através da marcação imunistoquímica da forma fosforilada (ERK-P). Assim, os resultados deste trabalho podem contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos do desenvolvimento da sensibilização comportamental e para a busca por novas estratégias para reverter ou atenuar a dependência química.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 - DEPENDÊNCIA QUÍMICA: ASPECTOS GERAIS

A dependência química é um grave problema de saúde pública que traz prejuízos à saúde física e mental, além de danos econômicos e efeitos legais (KARILA et al., 2008; NESTLER, 2001). Segundo a Classificação Internacional de Doenças, CID-10 (Classificação de Transtornos Mentais e de Comportamento), a dependência é descrita por um conjunto de fenômenos fisiológicos, comportamentais e cognitivos que levam a um estado compulsivo pelo desejo forte de usar drogas apesar de reconhecer seus efeitos negativos.

O problema da dependência era considerado uma deficiência de caráter até o século XIX. Assim, aqueles que utilizavam drogas eram considerados marginalizados pela sociedade, pois se acreditava que os usuários consumiam as drogas porque gostavam de fazê-lo, ou seja, escolhiam ser “indecentes” ou “pecaminosos”, sendo comum a aceitação de que os dependentes tivessem o poder de decidir acerca da ingestão ou não da droga, mas por serem de baixa moral, preferiam ingeri-la (GARCIA-MIJARES e SILVA, 2006).

Mais de 22,8% das pessoas já utilizaram alguma droga de abuso (cocaína, maconha, nicotina, anfetaminas) ao menos uma vez na vida (CARLINI, 2006). Na dependência química ocorre a prioridade de uso da droga em detrimento de doenças decorrentes do uso, tais como arritmias, isquemias ou convulsões e ainda contribui para a perda de papéis sociais importantes na vida (O'BRIEN, 2006; KARILA et al., 2008). A perda do controle sobre o uso da droga é a principal premissa que define a dependência como uma doença (GARCIA-MIJARES e SILVA, 2006).

A dependência pode ser considerada física e psicológica. A dependência física caracteriza-se pela presença de sintomas e sinais físicos que aparecem quando o indivíduo deixa de consumir a droga gerando a síndrome de abstinência. Por outro lado, a dependência psicológica relaciona-se a um estado de mal estar e desconforto, cujos sintomas mais comuns são ansiedade, sensação de vazio e dificuldade de

concentração, segundo o Centro Brasileiro sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID, 2013).

Entre os problemas relacionados à dependência está a recaída. A recaída consiste no comportamento de retomada ao consumo de drogas durante períodos de abstinência (retirada da droga) imposta ou forçada. Este comportamento é apontado como um problema para usuários de drogas, pois muitos indivíduos tendem a consumir estas substâncias mesmo depois de um longo período de abstinência (AGUILAR et al., 2009; NESTLER, 2001).

Atualmente existem duas teorias que explicam a dependência química: o reforço positivo e o reforço negativo. Segundo a teoria do reforço positivo, o uso compulsivo de um psicoestimulante estaria atrelado aos efeitos eufóricos produzidos por ele e não pela tentativa de abolir os sintomas desagradáveis desencadeados pelo seu uso (WISE, 1987). No entanto, essa teoria não explica o fato da perda de controle do uso do psicoestimulante, apesar das consequências negativas, e se mostrou insuficiente para explicar a dependência de drogas que não causam sintomas graves de abstinência, como as anfetaminas (GARCIA-MIJARES e SILVA, 2006). De acordo com a teoria do reforço negativo, o uso do psicoestimulante estaria relacionado à tentativa de diminuição ou abolição dos sintomas negativos desenvolvidos pelo cessar do uso da substância e não pelos sintomas agradáveis produzidos pelo uso da droga (WISE, 1987; ROBINSON e BERRIDGE, 1993).

Embora essas teorias sejam opostas, elas apresentam em comum o envolvimento da via mesolímbica como principal sistema relacionado à dependência (WISE, 1987). Essa via tornou-se um importante guia para os estudos de dependência química e tratando-se da sua importância, as pesquisas direcionaram o seu foco para a área tegmental ventral (ATV) e suas projeções para o córtex pré-frontal (CPF), núcleo accumbens (NAc) e amígdala (AMG), componentes essenciais do sistema límbico formado por um grupo de estruturas corticais e subcorticais responsáveis pelo processamento da memória e das informações emocionais (NESTLER, 2001). Sendo assim, a dependência seria considerada uma doença cerebral:

a doença da adicção é produzida pela administração crônica das próprias drogas, que causam alterações moleculares de longo prazo nas propriedades de sinalização das células nervosas (neurônios). Em

particular as drogas de abuso parecem comandar circuitos intimamente envolvidos no controle da emoção e motivação, diminuindo a introspecção e até a violação da pessoa adicta (HYMAN, 1995 citado por GARCIA-MIJARES e SILVA, 2006).

Tendo em vista a complexidade do desenvolvimento da dependência química, é necessário considerar que o contexto ambiental exerce um papel modulatório nos efeitos comportamentais produzidos por psicoestimulantes. A dependência resultaria de um fenômeno de interação entre a droga e o ambiente, e essa interação seria responsável pelos efeitos de neuroadaptação produzidos pelo consumo das drogas. Na teoria comportamental, todo comportamento é consequência da interação do indivíduo com seu ambiente. O comportamento de auto-administração de drogas, característico da dependência é então resultado dessa interação (GARCIA-MIJARES e SILVA, 2006). Em outras palavras, Robinson e Berridge (1993) propõem que os estímulos e dicas do ambiente se tornariam muito atrativos (salientes) para o dependente e seriam responsáveis pelo desejo compulsivo pelo uso do psicoestimulante. Então a vulnerabilidade à recaída seria causada pelo aumento da saliência dos estímulos. Assim, os comportamentos de busca pela substância e as recaídas seriam explicados por essa “fissura” e estariam atrelados aos estímulos ambientais associados aos efeitos da droga.

Portanto, o processo de neuroadaptação, estimulado pelo comportamento induzido pela droga, contribui para o estabelecimento dos novos rearranjos sinápticos responsáveis pela alteração da forma e função do sistema nervoso frente às exigências adaptativas ambientais, o qual se manifesta através do incentivo motivacional.

## 2.2 - A SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL

Em roedores, a sensibilização comportamental se expressa pelo acréscimo significativo da atividade locomotora em resposta a administrações diárias e em doses fixas (constantes) do psicostimulante (ROBINSON e BECKER, 1986). Entre as drogas que induzem a sensibilização comportamental estão a cocaína (MISERENDINO e NESTLER, 1995), a apomorfina (BLOISE et al., 2007; BRAGA et al., 2009a) e as

anfetaminas (FRAIOLI et al., 1999). O processo de sensibilização em ratos reforça a auto-administração de drogas e os animais quando sensibilizados podem assim permanecer por longos períodos, meses ou anos, mesmo cessada a administração da droga (HYMAN et al., 2006; HOPE et al. 2006; CARLEZON e NESTLER, 2002; ROBINSON e BECKER 1986).

Se por um lado, algumas drogas tem seu efeito diminuído com o uso crônico, como os analgésicos opióides que induzem o processo de tolerância<sup>1</sup>, outras drogas apresentam o aumento dos seus efeitos com o uso crônico sendo esse processo conhecido como sensibilização comportamental ou também denominado de tolerância reversa (CADOR et al., 1995; HYMAN et al., 2006; O'BRIEN, 2006; VALJENT et al., 2006).

As adaptações na via mesolímbica são importantes para o desenvolvimento da sensibilização comportamental. Acredita-se que o desenvolvimento da sensibilização comportamental esteja relacionado ao aumento da liberação de dopamina (processo neuroquímico) no núcleo accumbens gerando uma hipersensibilidade comportamental duradoura (STEKETEE e KALIVAS, 2011; HYMAN et al., 2006; VALJENT et al., 2006; ROBINSON e BERRIDGE, 1993). Sabe-se ainda que o uso de certos antagonistas dopaminérgicos podem inibir o desenvolvimento da sensibilização comportamental, o que reforça a participação dos receptores dopaminérgicos nesse processo (VEZINA, 1996).

Entre as hipóteses que buscam explicar a sensibilização comportamental induzida por agonistas dopaminérgicos estão as hipóteses do condicionamento, da tolerância dos auto-receptores e da neuroquímica (ROBINSON e BECKER, 1986). Em relação à participação do condicionamento na sensibilização comportamental, acredita-se que o acréscimo do efeito motor estaria relacionado ao desenvolvimento de uma resposta locomotora condicionada a um estímulo associado ao ambiente de exposição à droga. Uma explicação para a hipótese da tolerância dos auto-receptores seria a de que os receptores se tornariam menos sensíveis com a exposição repetida aos agonistas dopaminérgicos levando a uma diminuição do efeito inibitório sobre a síntese e liberação da dopamina, ou seja, ocorreria o aumento da liberação de dopamina e

---

<sup>1</sup>Redução do efeito da droga após a sua administração repetida (O'BRIEN, 2006).

consequentemente da resposta locomotora (ROBINSON e BECKER, 1986; BERKE e HYMAN, 2000). Segundo a hipótese neuroquímica, a sensibilização ocorreria pelo aumento da liberação de dopamina induzida por agonistas dopaminérgicos. Dessa forma, a neuroquímica seria explicada pelo mecanismo de liberação da dopamina de forma indireta, como ocorre com drogas como cocaína e as anfetaminas que atuam como agonistas dopaminérgicos pré-sinápticos (CADOR et al., 1995; KALIVAS e DUFFY, 1989; KALIVAS e DUFFY, 1998; MATTINGLY et al., 1991). Mais recentemente a sensibilização comportamental tem sido atribuída às alterações intracelulares como fatores de transcrição, função protéica e enzimática (NESTLER, 2001).

O desenvolvimento da sensibilização comportamental também depende de fatores relacionados ao procedimento experimental. O tempo de permanência do animal no ambiente experimental pode determinar o aumento ou a diminuição da resposta locomotora. A presença e as ações típicas do manipulador tais como os procedimentos de manipulação e de administração que podem influenciar no estado de alerta dos animais (TODTENKOPF e CARLEZON, 2006; SANCHIS-SEGURA e SPANAGEL, 2006). Dessa forma, alterações dos procedimentos podem afetar de modo extremo a sensibilização comportamental.

### 2.3 - O SISTEMA DOPAMINÉRGICO

A dopamina é uma catecolamina endógena considerada um neurotransmissor de importantes funções, tais como: alertar o organismo para novos estímulos e eventos motivacionais relevantes associados ao ambiente, bem como é importante na neuroplasticidade. A dopamina ainda está relacionada à atividade locomotora, cognição, emoção, regulação endócrina, modulação cardíaca, motilidade gastrointestinal, liberação de catecolaminas e função renal (GOODMAN e GILMAN, 2006; KATZUNG, 2005; MISSALE et al., 1998; RANG et al., 2001; VOLKOW et al., 2011).

A doença de Parkinson e a esquizofrenia são as principais patologias que envolvem o sistema dopaminérgico (MISSALE et al., 1998). Por isso, agonistas dopaminérgicos tem sido desenvolvidos para aliviar os sintomas do Parkinson. Além



disso, o sistema dopaminérgico é o principal alvo do estudo da dependência química em modelos animais (NESTLER et al., 2001; WOLF, 2002).

A dopamina produz uma variedade de efeitos biológicos mediados por interações com receptores específicos da dopamina (BERRIDGE e ROBINSON, 1998). Os receptores dopaminérgicos foram primeiramente descritos levando-se em conta os aspectos farmacológicos, sendo distinguidos em dois grupos, um grupo de receptores acoplados a enzima adenilato ciclase e o outro, formado por receptores independentes do AMPc (adenosina monofosfato cíclico) (BERKE e HYMAN, 2000; BERRIDGE e ROBINSON, 1998; HYMAN et al., 2006; SPANO et al., 1978). Atualmente, existem evidências relevantes sobre a existência de pelo menos cinco subtipos de receptores dopaminérgicos farmacologicamente distintos: D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub> e D<sub>5</sub>. Esses receptores estão divididos em duas famílias diferentes, o grupo dos receptores semelhantes a D<sub>1</sub> (*D<sub>1</sub>-like*) e o grupo semelhante a D<sub>2</sub> (*D<sub>2</sub>-like*). Os receptores D<sub>1</sub> e D<sub>5</sub> seriam semelhantes entre si, assim como os receptores D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub> (BERKE e HYMAN, 2000; BERRIDGE e ROBINSON, 1998; COOPER et al., 2003; GOODMAN e GILMAN, 2006; KATZUNG, 2005; MISSALE et al., 1998; NESTLER et al., 2001). Os subtipos dos receptores D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub> e D<sub>5</sub> não foram completamente descritos, pois esses subtipos de receptores são expressos em quantidades muito menores que os receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> (MISSALE et al., 1998).

A análise da estrutura dos principais receptores dopaminérgicos, D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>, apontam semelhanças e diferenças entre si, principalmente em relação aos domínios transmembrânicos acoplados à proteína G. Dessa forma, certos receptores da mesma família podem apresentar nível elevado de homologia, como os receptores D<sub>1</sub> e D<sub>5</sub>, ou em menor nível como os receptores D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>. A afinidade dos agonistas dopaminérgicos por receptores D<sub>1</sub> e D<sub>5</sub> é praticamente idêntica, no entanto a dopamina apresenta uma afinidade superior em dez vezes pelo receptor D<sub>5</sub> em relação à D<sub>1</sub> (CIVELLI et al., 1993; GINGRICH et al., 1993; JACKSON et al. 1994).

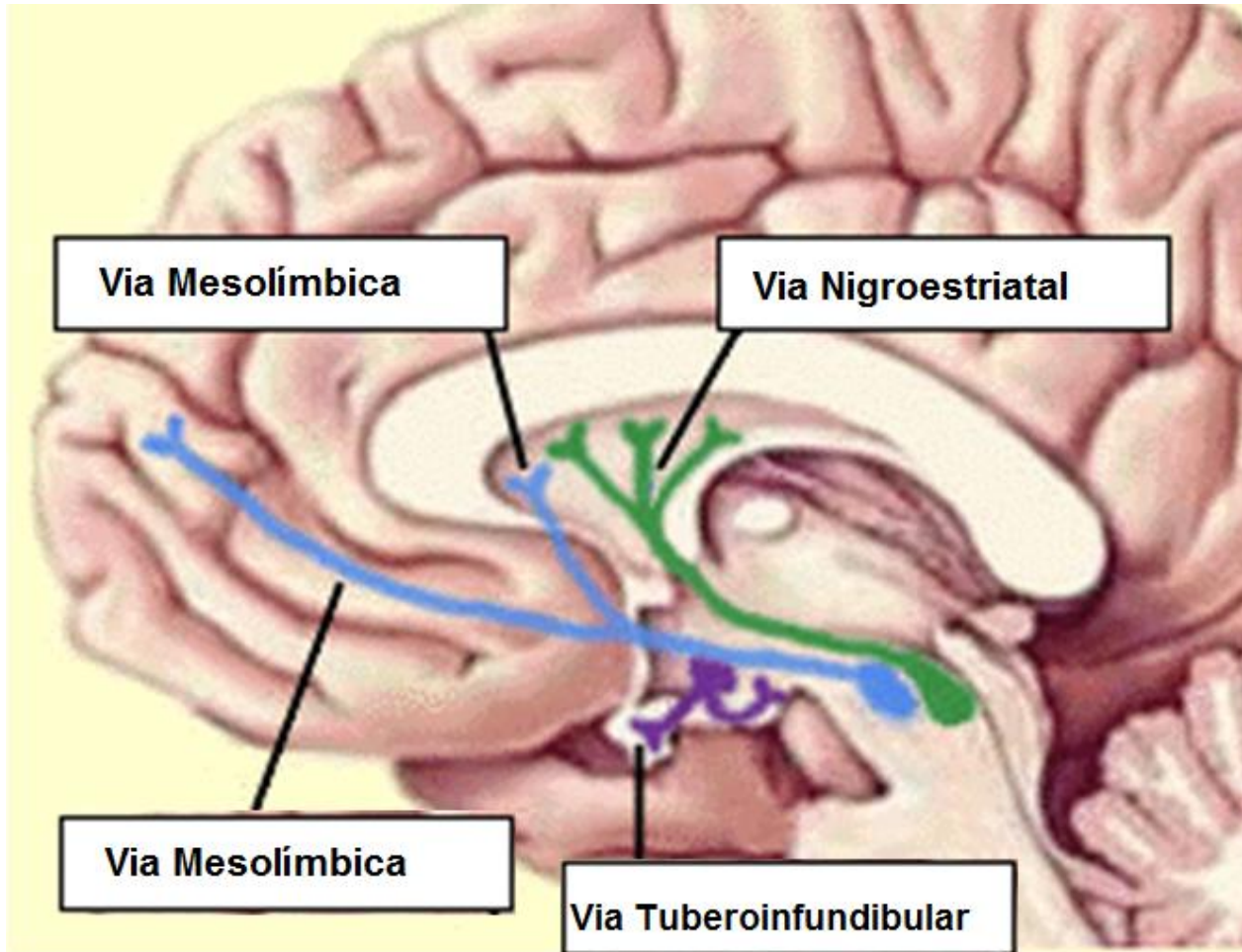
Em relação às diferenças entre os receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>, notou-se que o D<sub>1</sub> está relacionado ao efeito estimulante através da ação da enzima adenilato ciclase (AC), o que propicia a elevação do AMPc intracelular (BERKE e HYMAN, 2000; HYMAN et al., 2006). Esses receptores estão localizados principalmente no sistema límbico (nos

núcleos putâmem e accumbens), tálamo, hipotálamo e no tubérculo olfatório (MISSALE et al., 1998). Por outro lado, o receptor D<sub>2</sub> tem ação inibitória através da inibição da atividade da adenilato ciclase, diminuição do influxo de cálcio e abertura dos canais de potássio. Estes receptores estão localizados principalmente no corpo estriado, nos núcleos caudado, putâmem, na porção *core* do accumbens e no tubérculo olfatório. Também estão presentes nos córtex pré-frontal, giro cingulado, temporal, entorrinal, amígdala e hipotálamo (BERKE e HYMAN, 2000; COOPER et al., 2003; GOODMAN e GILMAN, 2006; KATZUNG, 2005; HYMAN et al., 2006; NESTLER et al., 2001).

Os receptores dopaminérgicos estão distribuídos principalmente na substância negra, área tegmental ventral e hipotálamo dando origem às vias dopaminérgicas (Fig. 1, p. 27). As vias dopaminérgicas são a via mesolímbica que se projeta dos corpos celulares próximos da substância negra para o sistema límbico e o córtex. A segunda via é a nigroestriatal que consiste dos neurônios que se projetam da substância negra até os núcleos caudado e putâmem (corpo estriado). A terceira via é a túbero-infundibular que liga os núcleos arqueados e neurônios periventriculares ao hipotálamo e à hipófise posterior. A quarta via do sistema dopaminérgico é a medular-periventricular formada pelos neurônios no núcleo motor vago, cujas projeções ainda não estão bem definidas. A quinta via é a incerta-hipotalâmica, que estabelece conexões entre a zona incerta medial, o hipotálamo e a amígdala (BRANDÃO, 1993; KATZUNG, 2005; VOLKOW et al., 2011).

A administração de psicoestimulantes aumenta a liberação de dopamina em áreas mesolímbicas e a retirada dessas drogas leva a uma redução da transmissão dopaminérgica (HYMAN et al., 2006; WOLF, 2002). O sistema dopaminérgico mesolímbico, que compreende os neurônios da área tegmental ventral e suas projeções para o núcleo accumbens e outras estruturas do prosencéfalo está relacionado às respostas recompensadoras de psicoestimulantes (BERHOW et al., 1996). A estimulação dos receptores D<sub>2</sub> por agonistas dopaminérgicos diretos (apomorfina) ou indiretos (cocaína, anfetaminas) aumenta a atividade motora e o comportamento estereotipado em ratos (DI CHIARA e IMPERATO, 1988; KATZUNG, 2005). A ação da dopamina na área mesolímbica tem papel sobre a memória e a aprendizagem, e a

ativação dos receptores  $D_1$  e  $D_2$  no hipocampo possibilitou uma melhoria na retenção da memória e desempenho de tarefas em ratos (LEVIN et al., 1995).

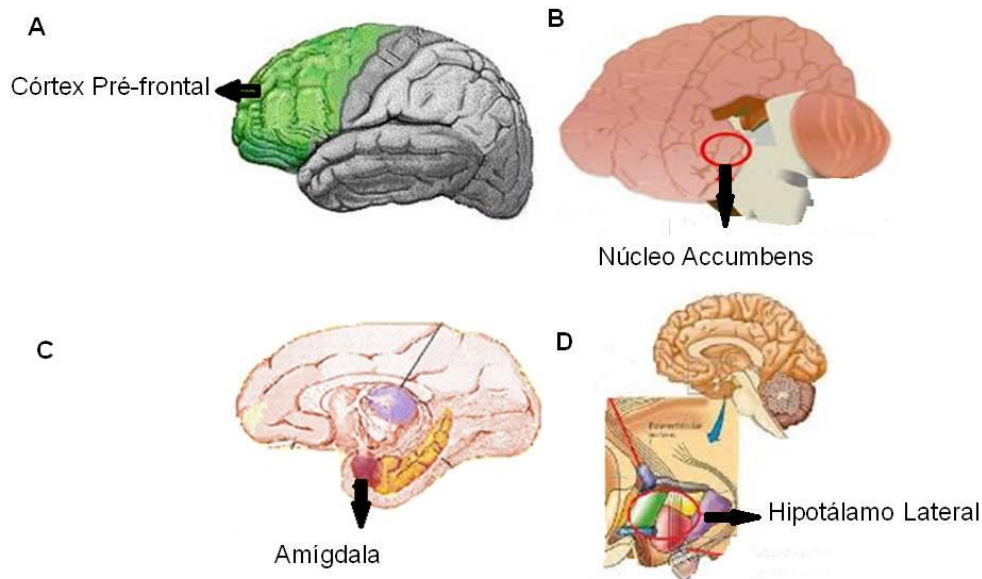


**Figura 1:** Representação das vias dopaminérgicas principais relacionadas à dependência química. Gravura modificada extraída da página eletrônica: <http://dameunsilbidito.wordpress.com/2009/12/21/dopamina-esa-gran-desconocida/>

#### 2.4 - AS ESTRUTURAS CEREBRAIS RELACIONADAS À DEPENDÊNCIA QUÍMICA

A neurobiologia tem focado suas pesquisas em quatro estruturas cerebrais principais relacionadas à dependência química e ao sistema dopaminérgico: o córtex pré-frontal, o núcleo accumbens, o hipotálamo e a amígdala (Fig. 2, p. 28) (KALIVAS e VOLKOW, 2005; LI et al., 2012; BERRIDGE e ROBINSON, 1998; ITO et al., 2004; ZHOU et al., 2012). Tais estruturas estão inter-relacionadas pela via mesolímbica,

permitindo assim que a informação de uma estrutura influencie a outra (EVERITT et al., 1999).



**Figura 2:** Representação das estruturas cerebrais relacionadas à dependência química. (A) Córtex Pré-frontal; (B) Núcleo Accumbens; (C) Amígdala; (D) Hipotálamo lateral. Gravuras modificadas extraídas das páginas eletrônicas: (A) <http://mecsrv70.mec.gov.br/pontodeencontro/DesenvCog2.htm#slide0004.htm>; (B) <http://www.asociacioneducar.com/neurociencias-codicia.php>; (C) <http://www.cerebromente.org.br/n01/memo/memoria.htm>; (D) [http://psicologia-fisiologica-roiel.blogspot.com.br/2010\\_04\\_23\\_archive.html](http://psicologia-fisiologica-roiel.blogspot.com.br/2010_04_23_archive.html).

O córtex pré-frontal (CPF) é uma área heterogênea do cérebro que compreende as áreas orbitofrontal, a insular agranular, o cíngulo anterior e a área pré-límbica (PAXINOS e WATSON, 2004). Estas áreas atuam de modo diferente na expressão de comportamentos emocionais ou motivacionais. O CPF é a parte anterior dos lobos frontais do cérebro situada em frente das áreas motoras e pré-motoras (KALIVAS e VOLKOW, 2005; WOLF et al., 2002). Em relação às suas principais ações, o CPF está envolvido no controle da atenção e da memória, regulação da atenção, aprendizagem, importantes para o reconhecimento de objetos, respostas associadas às pistas e interage amplamente com a amígdala e com o núcleo accumbens (CHAO et al., 2013; GLICKSTEIN et al., 2005; DARDENNE et al., 2012; MORGAN e LEDOUX, 1999).

O córtex tornou-se um guia importante para estudos da memória especialmente relacionados à sensibilização comportamental (KALIVAS e VOLKOW, 2005; WOLF et al., 2002). As projeções do CPF para o núcleo accumbens, hipocampo e amígdala são

alvos importantes nas funções de recompensa (MORGAN e LEDOUX, 1999; KALIVAS e VOLKOW, 2005; WOLF et al., 2002).

A porção insular do córtex é importante na armazenagem e recuperação de memórias e permite que os ratos relacionem estímulos, como por exemplo, a presença do alimento, através de suas vias sensoriais (CARDINAL et al., 2002; BALLEINE e DICKINSON, 2002). A porção orbitofrontal está amplamente envolvida com a ABL e orienta os comportamentos de escolha (ONGUR e PRICE, 2000; CARDINAL et al., 2002). O cíngulo anterior se relaciona ao processamento das emoções, humor e especificidade dos estímulos condicionados e tem papel na resposta a estímulos emocionais (ONGUR e PRICE, 2000; CARDINAL et al., 2002).

Estímulos como a presença do animal no ambiente com pistas relacionadas à droga são mediados pela via do estriado ventral, especificamente pelo núcleo accumbens. A amígdala também apresenta influência sobre os comportamentos inatos através das suas projeções para o hipotálamo e para o tronco cerebral (PARKINSON et al., 2000). Este núcleo se projeta para estruturas envolvidas na expressão do comportamento, é considerado um receptor de informações de estruturas límbicas, como a amígdala e o córtex pré-frontal (ALEXANDER et al., 1990).

O núcleo accumbens (estriado ventro-medial) pode ser dividido histologicamente em dois compartimentos: o núcleo (*core*) e a concha (*shell*). Essas duas subdivisões formam juntas uma importante área cerebral relacionada às funções motora, recompensadora e emocional (ZAHM e BROG, 1992; BERENDSE et al., 1992; PAXINOS e WATSON, 2004; BASSAREO e DICHIARA, 1999). A diferença entre as duas porções ocorre principalmente pelo diferente padrão de inervação que apresentam e estão relacionadas à ação da dopamina no núcleo accumbens (BASSAREO e DICHIARA, 1999). Enquanto a porção *core* apresenta semelhanças ao estriado dorsal e não se distingue histologicamente do resto do corpo estriado, a porção *shell* se projeta para estruturas subcorticais, como o hipotálamo lateral (BERENDSE et al., 1992).

A função dopaminérgica do núcleo accumbens tem sido bastante explorada tendo em vista seu papel no efeito de recompensa e nos efeitos motivacionais gerados pelos psicoestimulantes que contribuem para a dependência química (BERRIDGE e ROBINSON, 1998). Ele é considerado o alvo principal dos neurônios dopaminérgicos

da via mesolímbica, que se origina a partir da área tegmental ventral e do mesencéfalo (BASSAREO e DICHIARA, 1999). A exposição repetida a drogas induz ao processo de sensibilização produzida principalmente por estimulação da transmissão dopaminérgica no núcleo accumbens (DICHIARA, 2002).

Em relação às áreas em que se subdivide o núcleo accumbens, o compartimento *shell* interligado ao hipotálamo contribui para estabelecer associações entre os eventos motivacionais e as percepções ambientais (ITO et al., 2004). Logo, é uma área fortemente ligada à emoção, na qual a ação dopaminérgica influencia a resposta a novos estímulos de recompensa (ROBBINS e EVERITT, 1992; BERRIDGE e ROBINSON, 1998; ITO et al., 2004). Por outro lado, o compartimento *core* medeia a expressão do comportamento em resposta a estímulos relacionados ao consumo da droga (KALIVAS e VOLKOW, 2005).

Os estímulos incondicionados contribuem para o aumento da liberação da dopamina no núcleo accumbens, porém especialmente a porção *shell* do núcleo accumbens é responsável por regular as ações induzidas por estímulos incondicionados e se relaciona aos processos de aprendizagem (CARDINAL et al., 2002). Bassareo e Dichiara (1999) relataram que os níveis da dopamina aumentaram na porção *shell* em resposta a estímulos incondicionados como a comida e a droga (cocaína) (ITO et al., 2000). Por outro lado, a porção *core* do núcleo accumbens está relacionada aos estímulos condicionados (ITO et al., 2000; BASSAREO e DICHIARA, 1999). Ambos os compartimentos, *core* e *shell* influenciam o comportamento locomotor, a estimulação dopaminérgica e induziram a locomoção (SWANSON et al., 1997).

O hipotálamo é considerado importante na alimentação, termorregulação, sono, alimentação e desejo sexual. Este se subdivide nas áreas: paraventricular, medial, infundibular, lobo anterior, camadas interna e externa mediais, lobo intermediário da pituitária e lateral (PAXINOS e WATSON, 2004). No entanto, o hipotálamo lateral é uma área do cérebro relacionada à recompensa. Os neuropeptídeos orexina e hormônio concentrador de melanina expressos no hipotálamo lateral seriam os responsáveis por sua regulação (ASTON-JONES et al., 2009). Embora a capacidade homeostática do hipotálamo seja amplamente conhecida, sabe-se que os neurônios orexina que expressam esses neuropeptídeos tem projeções para regiões do cérebro importantes

para respostas comportamentais a drogas de abuso, como o córtex pré-frontal, área tegmental ventral (DIOLEONE et al., 2003), amígdala (VALJENT, 2004b) e núcleo accumbens (HARRIS et al., 2005) reforçando que vias importantes na dependência química possam estar inter-relacionadas.

Os peptídeos laterais hipotalâmicos desempenham papel importante na modulação da recompensa em estados de dependência e podem proporcionar um elo entre os substratos clássicos de recompensa e os seus circuitos neurais (ASTON-JONES et al., 2009; DIOLEONE et al., 2003).

Estudos foram realizados na tentativa de demonstrar a ainda pouco conhecida relação do hipotálamo lateral com as outras estruturas cerebrais classicamente reconhecidas no processamento da recompensa. Segundo Haghparast e colaboradores (2011) a estimulação do hipotálamo lateral pelo carbachol produziu condicionamento por preferência de lugar em ratos. Segundo Valjent e colaboradores (2004b) a administração de tetraidrocannabinol (THC) produziu o aumento da ativação da ERK em estruturas como o hipotálamo ventromedial, dorsomedial e no septo. Também foi observada marcação de ERK fosforilada após administração aguda de cocaína (20 mg/kg) no hipotálamo paraventricular, sendo estes efeitos dependentes de dose.

Em outro trabalho, Harris e colaboradores (2005) avaliaram que a ativação do hipotálamo lateral foi fortemente influenciada pelo contexto de uso da cocaína/morfina, visto que a sua estimulação química promoveu a ativação dos neurônios orexina, ocasionando o reestabelecimento de um comportamento de procura pela droga, até então abolido. Além disso, foi verificado que a administração de um antagonista de orexina inibiu esse comportamento. No modelo de condicionamento por preferência de lugar, os ratos condicionados com cocaína, morfina e alimento apresentaram maior ativação de Fos no hipotálamo lateral do que os ratos do grupo controle.

Esses resultados fornecem uma evidência de que as projeções do sistema orexina no hipotálamo lateral sobre áreas importantes como a área tegmental ventral desempenham um papel importante na expressão de preferência de drogas, e podem também estar envolvidos na recaída e desejo (“fissura”) por drogas.

A amígdala é uma estrutura cerebral complexa, com vários núcleos, responsável por mediar aspectos específicos dos comportamentos emocionais (CARDINAL et al.,

2002). O envolvimento da amígdala com a dependência química tem sido alvo de estudos em animais e humanos (GRANT et al., 1996; EVERITT et al., 1999). A amígdala detecta o perigo no ambiente externo e prepara fisiologicamente o organismo para se confrontar com a ameaça (FEINSTEIN et al., 2013).

Os principais núcleos em que a amígdala se subdivide são: central e o basolateral, responsáveis pelo controle dos processos emocionais (BECHARA et al., 1995; ADOLPHS, et al. 1994; YOUNG, et al. 1995). No entanto, o núcleo basolateral da amígdala é considerado o principal no controle desses processos. Ele é composto pelos subnúcleos lateral, basal e acessório-basal. O núcleo central da amígdala apresenta uma morfologia e conectividade estriatal diferente e tem uma função filogenética mais simples do que a ABL (CARDINAL et al., 2002). Este núcleo recebe estímulos sensoriais próprios e tem capacidade de aprendizagem e de expressar comportamentos independentes da ABL, mesmo apresentando papel principal de receptor de informações da ABL (PARKINSON et al., 2000).

A ABL está conectada a outras estruturas cerebrais apresentando projeções para os lobos frontais e ligações ao neocórtex e ao estriado ventral (CARDINAL et al., 2002) e é essencial para a associação do contexto ambiental com o afeto e memórias emocionais (BECHARA et al., 1995).

A porção basolateral da amígdala está frequentemente relacionada a dicas relacionadas à administração, a recaída, desejo pela droga (“fissura”) e a respostas afetivas (KRUZICH e SEE, 2001; KALIVAS e MCFARLAND, 2003). Entre suas funções estão os aprendizados emocionais, recebimento de informações sensoriais pela via lateral da amígdala e o controle da atividade do núcleo central (EVERITT, 2000). A participação da ABL é necessária para que os estímulos condicionados (condicionamento pavloviano) tenham o valor dos estímulos incondicionados (CARDINAL et al., 2002). Adicionalmente, a projeção da ABL para o estriado ventral e para o córtex pré-frontal possibilita a sua modulação sobre o comportamento (EVERITT, 1999). Ademais, a amígdala é responsável pela formação da associação entre estímulos e recompensas (BLANCHARD et al., 2011).

A amígdala está envolvida nas respostas emocionais do condicionamento pavloviano de modo que o medo condicionado depende da porção basolateral



(BECHARA et al., 1995). As lesões na amígdala podem levar ao aumento das deficiências na aprendizagem emocional, dificuldade de percepção de emoções nas expressões faciais e também pode causar prejuízos na memória associada a eventos emocionais (BECHARA et al., 1995; ADOLPHS et al. 1994; YOUNG, et al. 1995). A ABL é necessária para que os estímulos condicionados ganhem valor emocional (PARKINSON et al., 2000). Embora, os animais com lesões na ABL sejam capazes de adquirir respostas condicionadas, estas não são tão visíveis quanto nos animais sem lesões na ABL (HITCHCOTT e PHILLIPS, 1998).

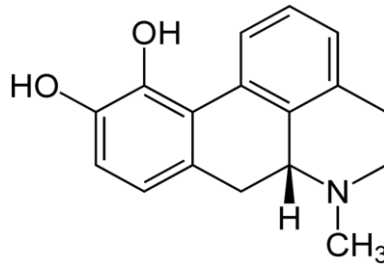
A administração aguda e crônica de psicoestimulantes induz às alterações nos complexos moleculares da amígdala. Essas mudanças são consideradas necessárias para comportamentos relacionados à dependência química (NESTLER, 2001). Portanto, a ABL atua na modulação emocional do armazenamento da memória sendo seu papel importante no mecanismo pelo qual situações emocionais afetam a memória (CARDINAL et al., 2002).

## 2.5 - A APOMORFINA

A apomorfina é uma substância alcalóide derivada da morfina (não-narcótica) pertencente à classe das dibenzoquilonas com amplo uso em medicina. A sua obtenção ocorreu a partir do aquecimento da morfina em solução de ácido clorídrico e não apresenta características narcóticas da sua precursora, possui características lipofílicas sendo suscetível a oxidações pela exposição à luz ou ao ar. A apomorfina possui a capacidade de ativar principalmente os receptores dopaminérgicos ( $D_1$ ,  $D_2$ ,  $D_3$ ,  $D_4$  e  $D_5$ ) de forma não seletiva, mas também os receptores de serotonina e alfa-adrenérgicos. (LEWITT, 2004; LI et al., 2012; RIBARIC, 2012). Essa droga ativa tanto receptores pré quanto pós-sinápticos em doses elevadas (MATTINGLY e GOTSICK, 1988).

A estrutura química da APO (Fig. 3, p. 34) explica suas atividades farmacológicas, pois apresenta grande homologia à molécula da dopamina. A sua estrutura policíclica e terciária de amina possui porção homóloga a molécula de dopamina. Além de sua ação reguladora através de receptores, a APO possui atividade antioxidante (LEWITT, 2004; LI et al., 2012; RIBARIC, 2012). A APO apresenta um

início de ação que varia em torno de 7 a 14 minutos, efeito tem duração breve e o tempo de meia vida varia de 30 a 90 minutos independente da via de administração intravenosa (LEWITT, 2004).



**Figura 3:** Estrutura química da apomorfina. Gravura extraída da página eletrônica: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9f/Apomorphine\\_Structural\\_Formulae.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9f/Apomorphine_Structural_Formulae.png).

As vias enterais de administração da APO são contraindicadas, pois a APO sofre metabolismo hepático de primeira passagem intenso. Suas ações farmacodinâmicas duram até 30 minutos, a partir do momento em que se inicia o declínio. Em relação aos aspectos de excreção, a APO sofre metabolização hepática principalmente com reações de glicuronidação e sulfatação e outras vias não enzimáticas (LEWITT, 2004; LI et al., 2012; RIBARIC, 2012).

Em relação a sua aplicação clínica, a APO começou a ser utilizada pelo fim do século XIX com a finalidade de tratamento de doenças como depressão, insônia e esquizofrenia. Também se utilizou a APO por suas propriedades fortemente eméticas (LEWITT, 2004). Com o passar dos anos passou a ser empregada para o tratamento da doença de Parkinson, na qual se sugeriu que a APO ativasse os receptores  $D_2$  dos núcleos caudado e putâmem contribuindo para a redução dos efeitos parkinsonianos. Em humanos teve seu uso substituído pela levodopa devido a seus efeitos adversos. Na medicina veterinária possui aplicação para a indução de vômito e no tratamento do envenenamento (LEWITT, 2004; MATTINGLY e GOTSICK, 1988).

Os tratamentos repetidos com os agonistas dopaminérgicos como a apomorfina resulta em um reforço na atividade comportamental, medido pelo aumento da atividade locomotora. A APO produz o aumento da atividade locomotora em doses elevadas

(BLOISE et al., 2007; BRAGA et al., 2009a; BRAGA et al., 2009b) possivelmente pela sua ação sobre os receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>, modulada pelo núcleo accumbens e corpo estriado (MATTINGLY e GOTSICK, 1988). As doses baixas produzem ativação dos auto-receptores D<sub>2</sub> mais do que os receptores D<sub>2</sub> pós-sinápticos promovendo assim a diminuição da atividade locomotora (MOLLER et al., 1987). Segundo Li e colaboradores (2012), a APO estimula os receptores D<sub>1</sub> ativando a via de sinalização da ERK, na qual promove o aumento da fosforilação das proteínas através do aumento de concentrações dos segundo mensageiros como o AMPc e proteína quinase A.

## 2.6 – PROTEÍNA QUINASE REGULADA POR SINAIS EXTRACELULARES

A proteína quinase regulada por sinais extracelulares, a ERK, pertence à família das proteínas quinases ativadas por mitógenos, as MAPK. Elas pertencem a um grupo de enzimas da família das proteínas serina-treonina quinases que inicialmente foram descritas no controle da reprodução de leveduras ativadas em resposta a vários estímulos celulares. Elas são responsáveis pela transmissão de sinais mitogênicos, geração de respostas adaptativas frente a mudanças ambientais, regulação da expressão genética, síntese de proteínas, movimento, metabolismo, crescimento, diferenciação celular e apoptose (HERSKOWITZ, 1995; ALIAGA et al., 1999; JOHNSON e LAPADAT, 2002; SHIFLETT e BALLEINE, 2011).

As ERKs são conhecidas como ERK 1 e ERK 2, sendo também denominadas de p44 e p42 de acordo com o seu peso molecular, respectivamente (BERHOW et al., 1996; ADAMS e SWEATT, 2002). No entanto, a isoforma ERK 2 tem sido mais relacionada a estudos comportamentais de dependência química (GIRAULT et al., 2006). A fosforilação de ERK 2 é maior do que ERK 1, embora tenham grande semelhança entre si, as ERK 1 e 2 apresentam efeitos distintos, pois a ERK 1 pode inibir a ERK 2 pela competição da fosforilação pela isoforma da proteína MAPK, a MEK. A via de ativação da ERK 2 leva o neurônio a um estado permissivo à plasticidade (GIRAULT et al., 2006; LU et al., 2006) e está envolvida na retenção de memórias espaciais e tarefas de medo condicionado, também a comportamentos de

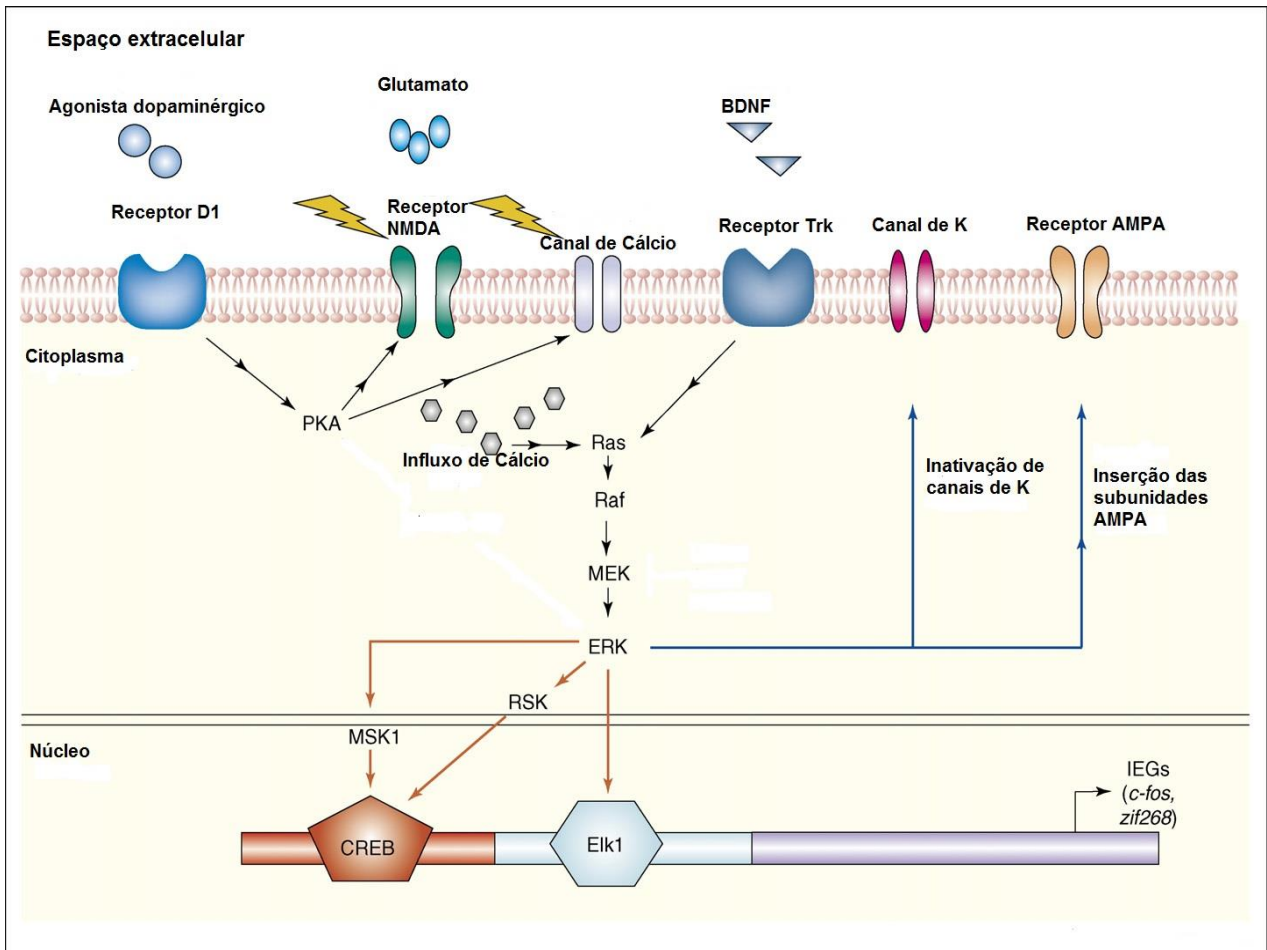
longa duração mediados por mudanças sinápticas e participa do desenvolvimento da sensibilização locomotora (SHIFLETT e BALLEINE, 2011).

Assim, a ERK apresenta importantes funções: participa do controle do crescimento celular e sua diferenciação (SHIFLETT e BALLEINE, 2011), contribui para a neuroplasticidade sináptica resultante da exposição repetida à droga, contribui para a estabilidade celular (GIRAULT et al., 2006; LU et al., 2006) e é um parâmetro em modelos animais de aprendizagem e transdução do sinal da memória a nível molecular (ADAMS e SWEATT, 2002; SHIFLETT e BALLEINE, 2011; KIM et al., 2011). A ERK fosforilada a nível citoplasmático possivelmente controla substratos, canais iônicos, proteínas do citoesqueleto e liberação de neurotransmissores. Quando translocada para o núcleo estimula a transcrição genética (HYMAN et al., 2006).

A exposição aos psicoestimulantes produz uma forte ativação da ERK se comparada às recompensas naturais e a exposição crônica aumenta os níveis basais de ERK (VALJENT et al., 2004a ; SHIFLETT e BALLEINE, 2011). A ERK pode converter um estado de baixo potencial para um de elevado potencial rapidamente, sendo esta capacidade considerada importante no desencadeamento da neuroplasticidade. Os sinais ambientais ou celulares levaram a uma ativação duradoura da ERK em certas regiões cerebrais, sendo a ERK um elemento de reforço no mecanismo bioquímico de armazenamento da memória (ADAMS e SWEATT, 2002; KIM et al., 2011). Tendo em vista que uma das formas de aprendizagem é pela estimulação repetitiva, a ERK atuaria como integradora dos sinais celulares no tempo. Além disso, as fosfatases induzidas pela ativação da ERK seriam importantes no bloqueio das sinapses em estado “aplástico”, contribuindo assim para a consolidação da memória (ADAMS e SWEATT, 2002; KIM et al., 2011).

A proteína ERK é ativada por uma via de transdução que resulta da fosforilação dos aminoácidos tirosina e treonina em sua estrutura (Fig. 4, p. 37) (GIRAULT et al., 2006). A sua fosforilação pode ocorrer mediante a ação das proteínas tirosinas quinases como pelos processos desencadeados por receptores acoplados a proteína G, GTP (guanossina 5-trifosfato) e da família Ras-Raf. Dessa forma, podem ocorrer dois mecanismos: desfosforilação por STEP (do inglês proteína tirosina fosfatase estriatal

enriquecida) ou aumento na fosforilação por MAPK (LU et al., 2006, VALJENT et al., 2004b).



**Figura 4:** Representação da cascata de ativação da ERK. Gravura modificada de Lu e colaboradores, 2006.

A via de sinalização das MAPKs compreende também as proteínas p38 e JNK (c-jun N-terminal quinase). Em relação à ERK, os receptores Trk ativam a proteína Ras acoplada a GTP que por sua vez ativam a proteína Raf responsável por ativar a MEK e em por último ativar a ERK (ADAMS e SWEATT, 2002; BERHOW et al., 1996; RADWANSKA et al., 2005; SALZMANN et al., 2003; SWEATT, 2004; VALJENT et al., 2000).

As ERKs fosforiladas atuam diretamente sobre seus substratos como canais iônicos, transportadores, fatores de transcrição como *c-fos*, e outras quinases como a RSK (quinase ribossomal S6 de 90 kDa) e a MSK (proteína quinase ativada por mitógenos e stress). Ambas as proteínas podem fosforilar CREB (elemento protéico

regulado por AMPc), embora a RSK apresente maior afinidade pelo sítio de fosforilação (DEAK et al., 1998; FRÖDIN et al., 1999).

Os psicoestimulantes ativam a ERK na área mesolímbica do cérebro, tanto em administrações agudas quanto crônicas (GIRAULT et al., 2006; VALJENT et al., 2000). Na ativação de ERK, a dopamina atua principalmente sobre os receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>, embora os D<sub>2</sub> contribuam de forma menos significativa. Pode-se notar ainda a participação de outros tipos de receptores, como os de glutamato (NMDA) que influenciam a ativação de ERK (LU et al., 2006; SALZMANN et al., 2003; VALJENT et al., 2004).

Os receptores D<sub>1</sub> estão em sua maioria acoplados a enzima adenilato ciclase tipo 5 (AC 5) através da proteína G. Após a ligação da dopamina ao receptor D<sub>1</sub>, os eventos subsequentes levam a conversão de adenosina trifosfato (ATP) em AMPc. Em seguida, o aumento de AMPc ativa a proteína quinase A (PKA) levando à estimulação de CREB, embora o próprio aumento do nível de AMPc também possa aumentar a ERK (ADAMS e SWEATT, 2002; GIRAULT et al., 2006; LU et al., 2006; SALZMANN et al., 2003; VALJENT et al., 2000).

Os processos decorrentes da ativação dos receptores dopaminérgicos promovem uma alteração conformacional dos canais de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) voltagens dependentes propiciando o aumento do influxo cálcio para o meio intracelular (GIRAULT et al., 2006; LU et al., 2006). O aumento da concentração intracelular de cálcio é fundamental para a ativação da cascata Ras-Raf-MEK, responsável pela ativação da ERK. Algumas interações proteicas possibilitam a ativação da família de proteínas Ras, como também das proteínas quinases da família Raf. As quinases da Raf ativam a forma MEK. Em seguida, formas ativas da MEK fosforilam quinases pertencentes à família MAP, entre elas a ERK e a proteína quinase Jun<sup>2</sup> (JNK) (BERHOW et al., 1996; CHERRIER et al., 2005; RADWANSKA et al., 2005; VALJENT et al., 2004).

De acordo com Lu e colaboradores (2006), as ERKs também podem ser ativadas por outras vias. Eles sugerem que na área do corpo estriado, mas não no córtex pré-

---

<sup>2</sup> Proteína quinase cuja atividade é regulada em resposta a citocinas ou stress.

frontal, é necessária a participação do DARPP-32<sup>3</sup>, uma fosfoproteína também responsável pela fosforilação da ERK e sua ativação. O DARPP-32 seria fosforilado pela PKA tornando-se assim um agente potente na inibição da proteína fosfatase 1 (PP1). O DARPP-32 inibiria a PP1, assim as fosfatases STEP ficariam fosforiladas (STEP-P) permitindo o aumento da concentração de ERK fosforilada (ERK-P) (LU et al. 2006; VALJENT et al., 2004b). Segundo Valjent e colaboradores (2004b), mutações no DARPP-32 provocariam alterações na sensibilização locomotora induzida pela administração de psicoestimulantes.

Depois de ativada, a ERK tem muitos alvos celulares e influencia um grande grupo de funções celulares (SHIFLETT e BALLEINE, 2011). A fosforilação da ERK leva a produção de fatores de transcrição, proteínas que atuam direta ou indiretamente sobre o DNA nas regiões genéticas promotoras para estimular ou reprimir a transcrição genética. Alguns dos produtos como o CREB e Elk-1 desencadeiam a ação de proteínas quinases nucleares, como a p90 através da ação de MSK 1 e 2 e por RSK, através da ação da proteína quinase ribossomal S6 (CHERRIER, 2005; RADWANSKA et al., 2005; SALZMANN et al., 2003; VALJENT et al., 2000). A ativação dos fatores de transcrição tem papel importante para a indução e transcrição de genes imediatos (*immediate early genes* – IEG) como o *c-fos* e o *zif-268*. Estes são alvos importantes na caracterização dos efeitos sobre a plasticidade de longa duração induzida pelas drogas, pois a regulação genética é considerada essencial para o estudo das mudanças comportamentais duradouras (CHERRIER, 2005; HYMAN et al., 2006; LU et al., 2006; SALZMANN et al., 2003).

A proteína ERK atua como elemento indireto na ativação do CREB e do Elk-1, responsáveis pela transcrição de fatores como o *c-fos* e *zif-268*. O fator complexo ternário Elk-1 é um elemento de transcrição e de resposta sobre vários IEG (*c-fos* e *zif-268*), e também é um dos primeiros alvos nucleares da ERK (SALZMANN et al., 2003; VALJENT et al., 2000). O CREB está envolvido na plasticidade da memória a nível celular e é um importante elemento para síntese protéica que pode ser ativado a partir da fosforilação no resíduo de serina 133 por diversas quinases (PKA, RSK2 e CaMK I/IV) (ADAMS e SWEATT, 2002; RADWANSKA et al., 2005; SALZMANN et al., 2003).

---

<sup>3</sup> Fosfoproteína de 32 kDa modulada por AMPc responsável pela regulação de cascatas de fosforilação.

Portanto, a ERK possui papel direto e indireto na transcrição genética fosforilando os fatores de transcrição e os componentes da cromatina (RADWANSKA et al., 2005). A ERK fosforilada, ERK-P, provoca a fosforilação dos canais de K<sup>+</sup> aumentando a excitabilidade celular (SHIFLETT e BALLEINE, 2011). Outro efeito de sinalização intracelular da ERK-P é a inserção de ácido alfa-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) nas subunidades receptoras transmembrana ionotrópicas para glutamato (diferentes dos receptores NMDA), responsáveis pela mediação da transmissão sináptica rápida no sistema nervoso central (SNC) (LU et al., 2006).

## 2.7 – O DESENVOLVIMENTO DA SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL E SUA RELAÇÃO COM A ERK

O contexto ambiental no qual a droga é administrada influencia de modo significativo o desenvolvimento da sensibilização comportamental. Sendo assim, a sensibilização não se desenvolveria ou sofreria uma redução caso o teste de sensibilização ocorresse em um contexto ambiental diferente daquele no qual os animais foram pré-sensibilizados com a droga (CROMBAG et al., 2001; BADIANI et al., 1995). De acordo com Robinson e colaboradores (1998), a sensibilização comportamental não seria uma consequência inevitável da administração da droga psicoestimulante em doses diárias e fixas, mas resultaria de interações entre as manipulações farmacológicas e o seu ambiente de administração (ANAGNOSTARAS e ROBINSON, 1996; CROMBAG et al., 2001).

Em um experimento, Badiani e colaboradores (1995) observaram que quando os animais recebiam a administração da droga (anfetamina ou cocaína) em sua própria caixa-viveiro e em seguida eram devolvidos para sua moradia, a sensibilização desenvolvida era menor do que aquela ocorrida quando os animais recebiam a injeção e eram colocados em um ambiente novo, diferente daquele no qual receberam a droga. Assim, os fatores extra-farmacológicos seriam responsáveis em grande parte pela modulação dos efeitos de desenvolvimento e de expressão da sensibilização comportamental.



Além de o ambiente novo exercer um papel modulatório no desenvolvimento da sensibilização comportamental, esse processo também poderia ser resultado específico da associação do ambiente aos efeitos da droga. Por exemplo, a sensibilização induzida pela anfetamina levou ao comportamento rotacional quando o animal foi colocado no ambiente no qual se desenvolveu a sensibilização, no entanto, esse fenômeno não ocorreu em um ambiente não associado (ANAGNOSTARAS e ROBINSON, 1996).

A ERK teria papel mais importante na fase de desenvolvimento da sensibilização do que na expressão da sensibilização. O desenvolvimento da sensibilização consiste na fase de administração diária do psicoestimulante levando ao aumento significativo da atividade locomotora. Já a expressão da sensibilização ocorreria em um teste realizado após o desenvolvimento da sensibilização para verificar a atividade locomotora.

Segundo Valjent e colaboradores (2006), ratos permaneceram sensibilizados no teste de expressão da sensibilização mesmo usando-se um antagonista da ERK, ou seja, impedir a ativação da ERK no teste de expressão da sensibilização não afetou a sensibilização previamente desenvolvida. No entanto, também foi demonstrado que o uso de antagonista de ERK no núcleo accumbens pode inibir sua ativação e conseqüentemente a expressão da sensibilização comportamental induzida por cocaína. Assim, a ativação da ERK estaria relacionada à expressão da sensibilização no núcleo accumbens (KIM et al., 2011). A sensibilização produzida pela cocaína é dependente do contexto foi acompanhada pelo aumento do número de núcleos imunorreativos a ERK em um grupo pequeno de neurônios do núcleo accumbens. Esses neurônios seriam os mesmos relacionados com o aprendizado de associação entre os efeitos da droga com o ambiente (MARIN et al., 2009).

Assim, é de grande importância avaliar o efeito que a apomorfina tem sobre processo de desenvolvimento da sensibilização comportamental nas áreas cerebrais envolvidas com a dependência química, pois é uma droga agonista direto dos receptores dopaminérgicos e mimetiza os efeitos da dopamina.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 - OBJETIVO GERAL

Avaliar se o tratamento agudo e crônico com apomorfina produz o aumento da ativação da proteína ERK, através da marcação de ERK fosforilada, no córtex pré-frontal, núcleo accumbens, amígdala e hipotálamo lateral, assim como investigar o papel da sensibilização comportamental sobre a ativação dessas estruturas cerebrais.

#### 3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir uma curva temporal para se verificar a ativação da ERK fosforilada no córtex pré-frontal, núcleo accumbens, amígdala e hipotálamo lateral após o tratamento agudo com apomorfina utilizando os tempos de 15, 30 e 60 minutos após a administração;
- Avaliar a influência do ambiente e da atividade locomotora na ativação da ERK fosforilada após a administração aguda de apomorfina no córtex pré-frontal, núcleo accumbens, amígdala e hipotálamo lateral;
- Verificar o padrão de ativação da ERK fosforilada no córtex pré-frontal, núcleo accumbens, amígdala e hipotálamo lateral após o desenvolvimento do processo de sensibilização comportamental.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 - SUJEITOS

Foram utilizados ratos machos, albinos, Wistar, pesando entre 200-250 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de plástico (Fig. 4) tendo livre acesso à água e à ração padronizada de laboratório. As gaiolas ficaram em uma sala do setor de Farmacologia do Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA), com temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ) e com ciclo de luz claro e escuro de 12 em 12 horas (luz das 7 às 19 horas). Os experimentos foram conduzidos na fase clara, no horário entre 8:00 e 13:00 horas. Os animais foram manipulados individualmente por cinco minutos diários, durante sete dias antes do início do procedimento experimental e foram habituados ao procedimento de injeção com solução de veículo durante 3 dias antes do início do experimento. Todo o procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.



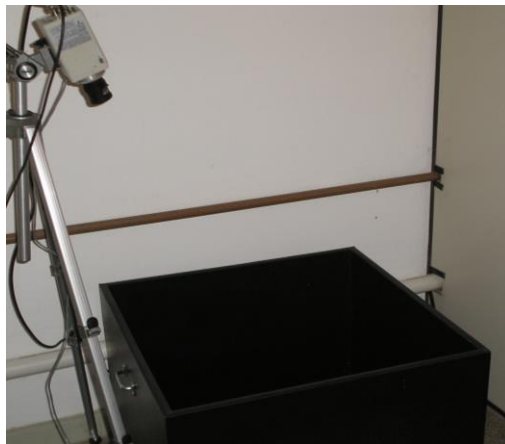
**Figura 5:** Gaiola individual (caixa-viveiro)

## 4.2 - DROGA

A apomorfina-Hcl (Sigma, ST. Louis, Mo, USA) – na dose de 2 mg/kg (volume de administração: 1 mL/kg) dissolvida numa solução 0,1% m/v de ácido ascórbico – foi administrada por via subcutânea. A solução de ácido ascórbico 0,1% m/v foi utilizada como veículo. Todas as doses foram administradas em um volume de 1mL/kg.

## 4.3 - AMBIENTE EXPERIMENTAL

Os experimentos comportamentais foram realizados em uma sala (Fig. 5) apresentando iluminação vermelha, temperatura ( $22 \pm 2$  °C) controlada e o som de um ventilador como ruído de fundo. A sala continha uma arena quadrada (campo aberto), de cor preta, medindo 60x60x45cm. Uma câmera (SONY, modelo IR575M) foi colocada a uma altura de 60 cm acima da arena experimental e ficou acoplada a um computador PC compatível, contendo um sistema de análise de imagens EthoVision (Noldus), localizado fora da sala experimental, o qual quantificou a atividade locomotora em distância percorrida (m).



**Figura 6:** Arena experimental

#### 4.4 - EXPERIMENTO 1 – CURVA TEMPORAL DE ATIVAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DA PROTEÍNA QUINASE REGULADA POR SINAIS EXTRACELULARES (ERK-P) APÓS A ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE APOMORFINA

Os animais foram administrados com a apomorfina na dose de 2,0 mg/kg e após 15, 30 ou 60 minutos foram retirados de sua caixa-viveiro e eutanasiados com tiopental sódico (50 mg/kg i.p.) e perfundidos transcárdicamente (Fig. 7, p. 46). Os tempos pós-administração foram escolhidos levando-se em conta o tempo de meia-vida da apomorfina (LEWITT, 2004). Em seguida, os encéfalos foram retirados da caixa craniana e armazenados para a avaliação imunoistoquímica de ERK fosforilada (ERK-P). Os grupos experimentais (Fig. 7, p. 46) foram:

##### a) GRUPO – 15 MINUTOS

- **APO** (n=4): Os animais foram administrados com apomorfina (2,0 mg/Kg; subcutânea - sc).
- **VEI** (n=4): Os animais receberam veículo da apomorfina (solução de ácido ascórbico 0,1%; sc).

##### b) GRUPO – 30 MINUTOS

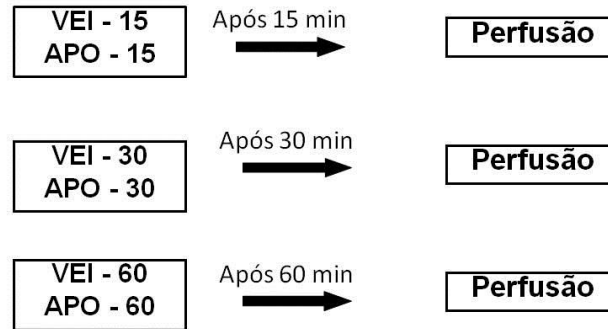
- **APO** (n=4): Os animais foram administrados com apomorfina (2,0 mg/Kg; sc).
- **VEI** (n=4): Os animais receberam veículo da apomorfina (solução de ácido ascórbico 0,1%; sc).

##### c) GRUPO – 60 MINUTOS

- **APO** (n=4): Os animais foram administrados com apomorfina (2,0 mg/Kg; sc).
- **VEI** (n=4): Os animais receberam veículo da apomorfina (solução de ácido ascórbico 0,1%; sc).

## ESQUEMA DA CURVA TEMPORAL DE ATIVAÇÃO DE ERK-P

### GRUPOS EXPERIMENTAIS



**Figura 7:** Esquema do experimento 1.

#### 4.5 - EXPERIMENTO 2 – O EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE APOMORFINA NA ARENA EXPERIMENTAL SOBRE A ATIVAÇÃO DE ERK-P

##### a) Período de Habituação (1<sup>o</sup> - 3<sup>o</sup> dia)

O objetivo desta fase foi adaptar os animais ao ambiente e aos procedimentos experimentais e também para que posteriormente pudessem ser divididos nos grupos do tratamento farmacológico, sem que houvesse diferença entre os mesmos quanto à locomoção. Para isso, os ratos foram administrados com salina e imediatamente colocados na arena-teste por 30 minutos durante 3 dias consecutivos sendo a atividade locomotora registrada.

##### b) Tratamento farmacológico

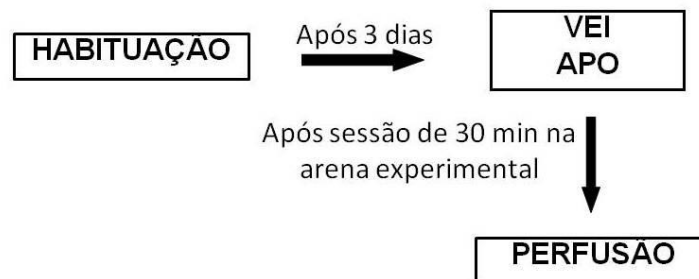
Os animais receberam seus respectivos tratamentos farmacológicos e foram colocados na arena-teste para o registro de sua atividade locomotora durante trinta minutos. Imediatamente após o término da sessão experimental, os animais foram

eutanasiados com tiopental sódico (50 mg/kg i.p.) e perfundidos transcárdicamente, os encéfalos foram retirados e armazenados até a realização das reações imunoistoquímicas para a detecção da ERK-P. Os grupos experimentais (Fig 8, p. 47) foram:

- **APO** (n=4): Os animais foram administrados com apomorfina (2,0 mg/Kg; sc).
- **VEI** (n=4): Os animais receberam veículo da apomorfina (solução de ácido ascórbico 0,1%; sc).

## ESQUEMA DO EXPERIMENTO 2

### GRUPOS EXPERIMENTAIS



**Figura 8:** Esquema do experimento 2.

### 4.6 - EXPERIMENTO 3 – O EFEITO DO DESENVOLVIMENTO DA SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL INDUZIDA POR APOMORFINA SOBRE A ATIVAÇÃO DE ERK-P

#### a) Período de Habituação (1<sup>o</sup> - 3<sup>o</sup> dia)

O objetivo desta fase foi adaptar os animais ao ambiente e aos procedimentos experimentais e também para que posteriormente pudessem ser divididos nos grupos do tratamento farmacológico, sem que houvesse diferença entre os mesmos quanto à locomoção. Para isso, os ratos foram administrados com salina e imediatamente

colocados na arena-teste por 30 minutos durante 3 dias consecutivos sendo a atividade locomotora registrada.

b) Fases de tratamento farmacológico – Fase de indução (4<sup>o</sup> - 8<sup>o</sup> dia)

Os animais receberam os seus respectivos tratamentos farmacológicos e foram imediatamente colocados na arena experimental. Essa fase teve a duração de 5 dias consecutivos e cada sessão experimental teve a duração de 30 min para o registro da sua atividade locomotora. Imediatamente após o término da sessão experimental de 30 min, os animais foram colocados de volta as suas respectivas caixas-viveiro. Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais (Fig. 9, p. 48):

- **APO** (n=6): Os animais foram administrados com apomorfina (2,0 mg/Kg; sc).
- **VEI** (n=6): Os animais receberam veículo da apomorfina (solução de ácido ascórbico 0,1%; sc).

Imediatamente após o último dia do teste na arena experimental, os animais foram eutanasiados com tiopental sódico (50 mg/kg i.p.) e perfundidos transcárdicamente, os encéfalos foram retirados e armazenados até a realização das reações imunoistoquímicas para a detecção da ERK-P.

### ESQUEMA DO EXPERIMENTO 3

#### GRUPOS EXPERIMENTAIS



**Figura 9:** Esquema do experimento 3.



#### 4.7 - IMUNOISTOQUÍMICA

Nos experimentos foram quantificados o número de neurônios imunorreativos às formas ativas ERK-P (ERK fosforilada no resíduo 204 da tirosina). Os ratos foram eutanasiados com tiopental sódico (50 mg/kg - injeção intraperitoneal). Em seguida foram perfundidos transcardicamente com 100 mL de solução salina 0,9% e depois com 500 mL de solução de paraformaldeído 4% (em solução tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7.4) durante 30 minutos.

Após a perfusão, os encéfalos foram removidos e pós-fixados por 2 h em solução de paraformaldeído 4% antes da transferência para a solução de sacarose 20% (sacarose diluída em solução tampão 0,1 M fosfato de sódio, pH 7,4) por 48 horas a 4 ° C. Os encéfalos foram colocados em um suporte de papel alumínio e depois foram imersos e crioprotetidos com uma solução de glicóis solúveis em água e resinas, Tissue Tek O.C.T.<sup>®</sup> (Sakura Finetek<sup>®</sup>, USA). Em seguida foram congelados em nitrogênio líquido e posteriormente cortados em um criostato mantido a temperatura de -24° C.

Os cortes foram realizados no plano coronal com espessura de 30 µm. Foram recolhidos 4 cortes em sequencia de cada estrutura cerebral de interesse para o presente trabalho. Foram recolhidos cortes do córtex pré-frontal (aproximadamente +2.68 mm de bregma), do núcleo accumbens (*core* e *shell* aproximadamente +1.70 mm de bregma), amígdala e hipotálamo lateral (aproximadamente -2.40 mm de bregma). As coordenadas adotadas como referência foram obtidas do “*The rat brain: in stereotaxic coordinates*” (PAXINOS e WATSON, 2004). Os cortes foram fixados em lâminas para microscopia previamente gelatinizadas para permitir a fixação.

Imediatamente após a realização dos cortes, os mesmos foram lavados com solução de PBS por 3 vezes com duração de 10 minutos cada, sob agitação. Em seguida, os cortes foram colocados em solução tampão de bloqueio (soro normal de cabra 3% e Triton X-100 0,25% em PBS) e incubados por 1 h a 22 ° C.

Depois de transcorrido este tempo, os cortes foram incubados por 24 h a 4 ° C na diluição de 1:500 com o anticorpo primário anti-ERK-P (Cat #9101, Cell Signaling Technology<sup>®</sup>, Boston, MA, USA) diluído na solução tampão de bloqueio.

Após o término do tempo de incubação a 4 ° C , os cortes foram lavados com solução de PBS por 3 vezes com duração de 10 minutos cada, sob agitação e incubados a 22 ° C por 1 hora em uma solução do anticorpo secundário biotilado de coelho anti-IgG (BA-1000 Vector Laboratories<sup>®</sup>, Burlingame, CA, USA) em uma diluição de 1:100 em solução contendo soro normal de cabra 1% e Triton X-100 0,25% em PBS.

Após este tempo, os cortes foram lavados novamente com solução de PBS por 3 vezes de 10 minutos, sob agitação, e em seguida foram processados com kit padrão ABC Elite (Vector Laboratories<sup>®</sup>, Burlingame, CA, USA). Foram adicionados 150 µL do reagente A (avidina) a 5 mL de solução de PBS 10 mM, pH 7,4 seguida pela adição de 150 µL do reagente B (enzima biotilada). A mistura foi agitada e a solução permaneceu em repouso por 30 minutos antes do uso. Após o preparo da solução reagente, os cortes foram incubados durante 30 minutos à temperatura de 22 ° C .

Na etapa seguinte, os cortes foram lavados novamente em solução de PBS por 3 vezes de 10 minutos cada, sob agitação, e processados com o kit de substrato DAB para peroxidase (SK-4100, Vector Laboratories<sup>®</sup>, Burlingame, CA, USA). De acordo com o protocolo do fabricante, foram adicionadas 150 µL da solução tampão estoque 15 %, 300 µL de solução estoque DAB (3,3'-diaminobenzidina) 2,4 % à 5 mL de água destilada, seguida por agitação. Por último, adicionaram-se 150 µL da solução de peróxido de hidrogênio 1,5 %.

Os cortes foram incubados com o substrato de DAB em temperatura 22 ° C por 3 minutos para o desenvolvimento da coloração de boa intensidade. Depois de passado este tempo, os cortes foram imediatamente mergulhados em água destilada por 5 minutos e deixados à temperatura ambiente para secagem.

Como controle negativo, cortes do córtex pré-frontal, núcleo accumbens, amígdala e hipotálamo lateral de animais do grupo veículo e apomorfina do experimento 1 foram processados por imunistoquímica de maneira que ao serem incubados houve a substituição do anticorpo primário pela solução tampão de bloqueio.

Após a secagem, as lâminas foram montadas com lamínula usando-se o DPX<sup>®</sup> (Sigma<sup>®</sup>, ST. Louis, Mo, USA) como substância de montagem para posterior análise.

Fotomicrografias dos cortes cerebrais foram obtidas por uma câmera CCD (*Photometrics cool snap*, Roper Scientific Inc., Trenton, NJ) acoplada a um microscópio Nikon usando ampliação de 40, 100 e 200 vezes. A área padronizada para a contagem do número de núcleos imunorreativos à ERK-P foi de 200 000  $\mu\text{m}^2$  para cada um dos dois hemisférios de cada estrutura cerebral (córtex pré-frontal, núcleo accumbens, amígdala e hipotálamo lateral). A contagem do número núcleos imunorreativos à ERK-P foi realizada dentro do espaço delimitado como área padrão nas imagens captadas utilizando-se a ferramenta “multi-point” do programa Image J. O número total de núcleos imunorreativos à ERK-P para cada estrutura cerebral correspondeu à soma do número de núcleos de ERK-P em cada área padrão dos dois hemisférios.

#### 4.8 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

No experimento 1, a análise de variância (ANOVA) por medidas repetidas de dois fatores foi usada para avaliar ativação de ERK nas diferentes estruturas cerebrais para determinar o efeito do grupo, o efeito da estrutura cerebral, assim como a interação entre as variáveis, grupo e estrutura cerebral. No experimento 2, o tempo total da atividade locomotora na arena foi dividido em 12 intervalos de 2,5 minutos cada. A ANOVA por medidas repetidas de dois fatores foi utilizada para avaliar a locomoção ao longo do tempo para determinar o efeito do grupo, o efeito do intervalo, bem como a interação entre as variáveis, grupo e intervalo. Para a ativação da ERK nas diferentes estruturas cerebrais, a ANOVA por medidas repetidas de dois fatores foi usada para determinar o efeito do grupo, o efeito da estrutura cerebral, assim como a interação entre as variáveis, grupo e estrutura cerebral. No experimento 3, a ANOVA por medidas repetidas de dois fatores foi utilizada para avaliar a atividade locomotora, a fim de determinar o efeito de grupo, o efeito do dia, assim como a interação entre as variáveis, grupo e dia. Para as análises de ERK, uma ANOVA por medidas repetidas de dois fatores foi utilizada para avaliar a ativação de ERK nas estruturas cerebrais para determinar o efeito do grupo, o efeito da estrutura cerebral, assim como a interação entre as variáveis, grupo e estrutura cerebral. Quando um efeito significativo de interação dos grupos foi identificado, os dados foram avaliados estatisticamente por um

teste t para amostras independentes ou por ANOVA de um fator seguido pelo *post-hoc* de Duncan. Foi adotado  $p < 0,05$  como o critério para a significância estatística.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 - EXPERIMENTO 1 – CURVA TEMPORAL DE ATIVAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DA PROTEÍNA QUINASE REGULADA POR SINAIS EXTRACELULARES (ERK-P) APÓS A ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE APOMORFINA

A figura 10 (p.55) mostra o número de núcleos imunorreativos à ERK-P no córtex pré-frontal, núcleo acumbens, amígdala e no hipotálamo lateral produzido pela administração aguda de apomorfina (2,0 mg/kg) 15, 30 e 60 min após a administração de apomorfina.

Para o córtex pré-frontal (Fig. 10A) houve efeito do grupo [ $F(1, 24) = 19,30, p < 0,01$ ], um efeito do tempo pós-injeção [ $F(2, 24) = 15,70, p < 0,01$ ], mas não houve interação grupo X tempo [ $F(2, 24) = 1,90, p > 0,05$ ]. Mesmo não ocorrendo interação, foi realizado um teste t para amostras independentes que mostrou que o grupo apomorfina apresentou maior número de núcleos imunorreativos à ERK-P do que o grupo veículo 15 e 30 min após a injeção ( $p < 0,05$ ), mas não depois de 60 min ( $p > 0,05$ ). Os resultados também mostraram que houve uma diminuição gradual do número de núcleos imunorreativos à ERK-P através do tempo para ambos os grupos apomorfina e veículo ( $p < 0,05$ ). Para o grupo veículo, o tempo de 15 min apresentou o número de núcleos imunorreativos à ERK-P superior aos tempos de 30 e 60 min e o número de núcleos imunorreativos à ERK-P no tempo de 30 min pós-injeção foi superior ao de 60 min ( $p < 0,05$ ). Para o grupo apomorfina, a quantidade de ERK-P foi superior no tempo de 15 min pós-injeção do que no de 60 min. Não houve diferença entre os tempos de 15 e 30 min e entre os tempos de 30 e 60 minutos pós-injeção ( $p > 0,05$ ).

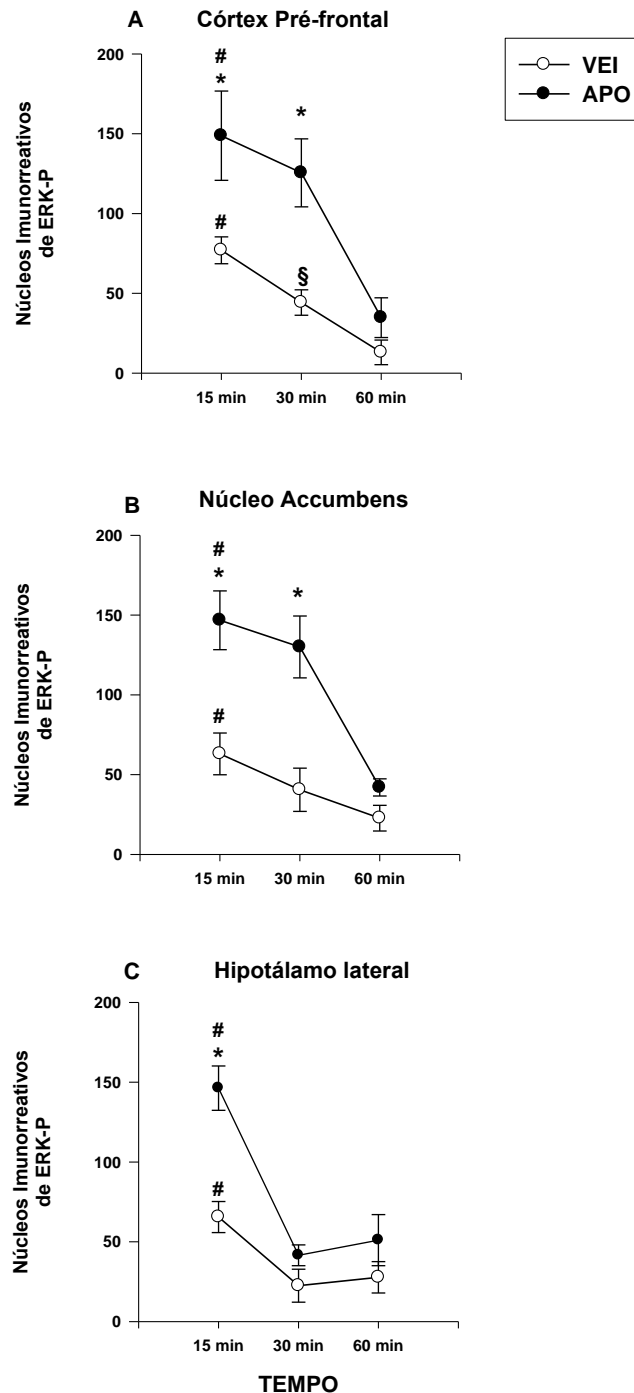
Para o núcleo accumbens (Fig. 10B), a ANOVA de dois fatores indicou interação grupo X tempo pós-injeção [ $F(2, 24) = 4,0, p < 0,05$ ], efeito dos grupos [ $F(1, 24) = 31,90, p < 0,01$ ] e um efeito do tempo pós-injeção [ $F(2, 24) = 14,52, p < 0,01$ ]. Para o desdobramento da interação grupo X tempo de pós-injeção, foi realizada a análise utilizando o teste t para amostras independentes entre os grupos apomorfina e veículo para cada tempo pós-injeção e os resultados mostraram que nos tempos de 15 e 30 min pós-injeção, o grupo apomorfina apresentou número mais elevado de núcleos

imunorreativos à ERK-P do que o grupo veículo ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença entre os grupos veículo e apomorfina no tempo de 60 min pós-injeção ( $p > 0,05$ ). Os resultados também mostraram que houve decréscimo do número de núcleos imunorreativos à ERK-P no decorrer do tempo para ambos os grupos ( $p < 0,05$ ). Para os grupos veículos, o número de núcleos imunorreativos à ERK-P foi maior no tempo de 15 min após a injeção do que no tempo de 60 min ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença entre o tempo de 15 min e o tempo de 30 min ( $p > 0,05$ ) e nem entre o tempo de 30 min e 60 min ( $p > 0,05$ ).

Para o hipotálamo (Fig. 10C), a ANOVA de dois fatores indicou interação grupo X tempo [ $F(2, 24) = 4,52, p < 0,05$ ], efeito dos grupos [ $F(1, 24) = 19,20, p < 0,01$ ] e efeito do tempo pós-administração [ $F(2, 24) = 25,20, p < 0,01$ ]. O teste t para amostras independentes foi realizado e os resultados mostraram que apenas no tempo de 15 min após a injeção, o grupo apomorfina apresentou maior número de núcleos imunorreativos à ERK-P do que o grupo tratado com veículo ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença entre os grupos apomorfina e veículo durante os tempos pós-injeção de 30 e 60 min ( $p > 0,05$ ). Os resultados também mostraram que houve uma diminuição de ERK-P no decorrer do tempo para ambos os grupos ( $p < 0,05$ ). Para os grupos veículos, o número de núcleos imunorreativos à ERK-P foi maior no tempo de 15 min após a injeção do que no tempo de 60 min ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença entre o tempo de 15 min e o tempo de 30 min ( $p > 0,05$ ) e nem entre o tempo de 30 min e 60 min ( $p > 0,05$ ).

Em relação à amígdala, os resultados não mostraram núcleos imunorreativos de ERK-P em ambos os grupos, apomorfina e veículo.

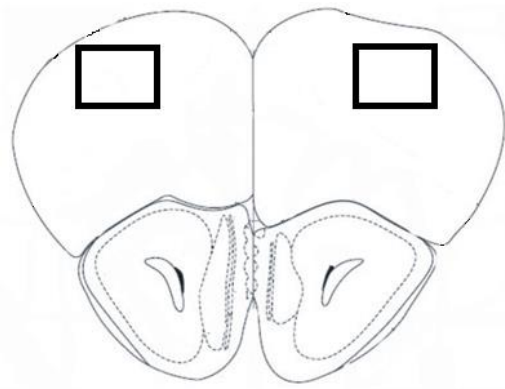
## CURVA TEMPORAL DA ERK



**Figura 10:** Média e Erro Padrão da Média (E.P.M.) dos núcleos imunorreativos à ERK-P. CórTEX pré-frontal (A), Núcleo accumbens (B) e Hipotálamo lateral (C). \* Indica maior número de núcleos imunorreativos de ERK-P do grupo apomorfina em relação ao veículo na mesma estrutura cerebral. # Indica maior número de núcleos imunorreativos de ERK-P 15, 30 e 60 min após a administração dos tratamentos em relação aos diferentes tempos para o mesmo grupo experimental. § Indica maior número de núcleos de ERK-P do veículo no tempo de 30 min em relação ao de 60 min ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo teste de Duncan).

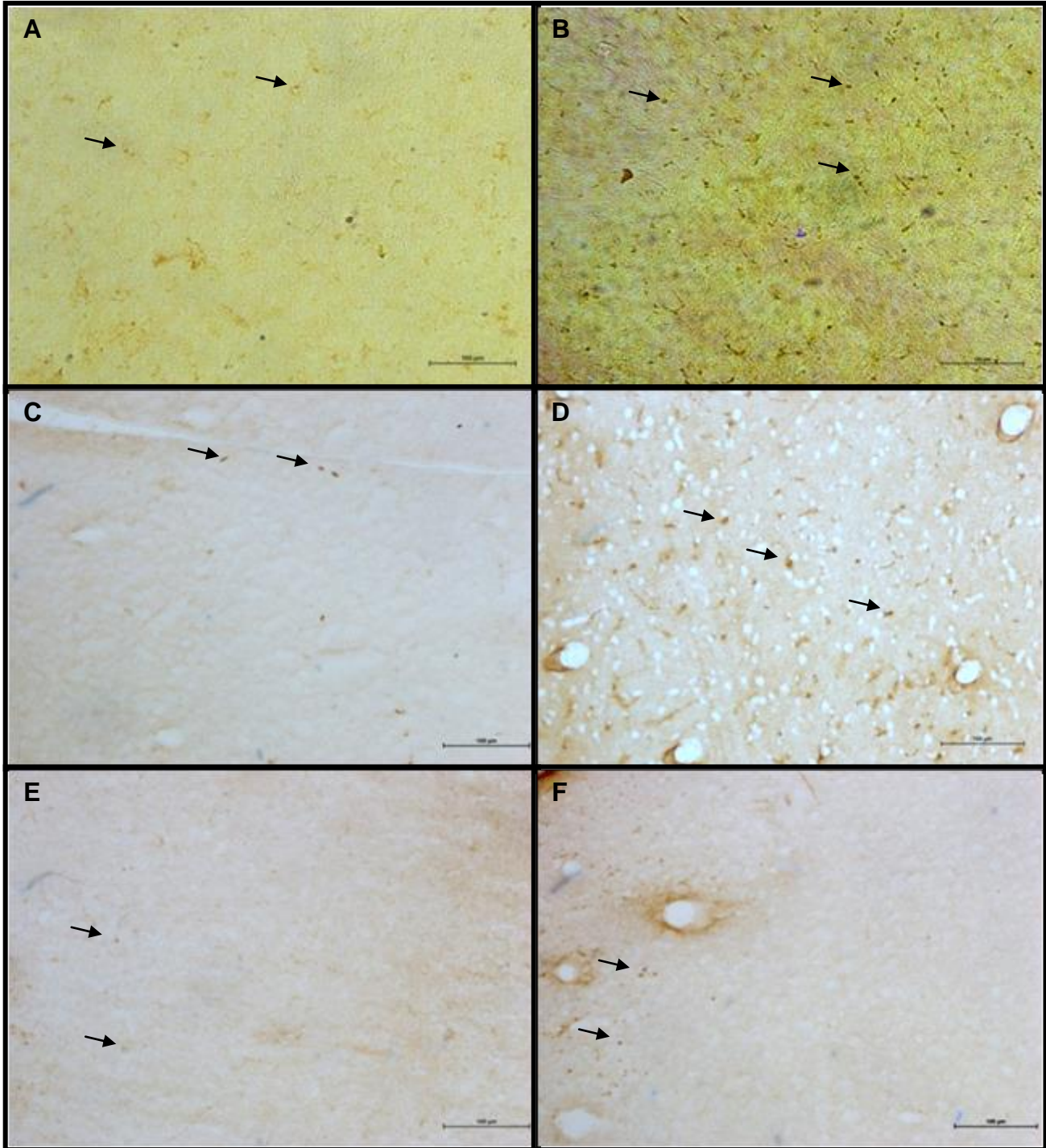
A figura 11(p.57) representa esquematicamente o corte do córtex pré-frontal segundo o atlas "*The rat brain: in stereotaxic coordinates*" (PAXINOS e WATSON, 2004) e as imagens da imunoistoquímica do córtex pré-frontal após a administração aguda de veículo ou apomorfina (2 mg/kg). O retângulo indicado na figura corresponde à região usada para a quantificação protéica. Os cortes usados na imunodeteção foram obtidos aproximadamente a +5.64 anterior à bregma. As figuras A, C e E correspondem às imagens do CPF 15, 30 e 60 min após administração do veículo, respectivamente e as figuras B, D e F correspondem às imagens do CPF 15, 30 e 60 min após a administração da apomorfina, respectivamente. As setas indicam as células imunorreativas.



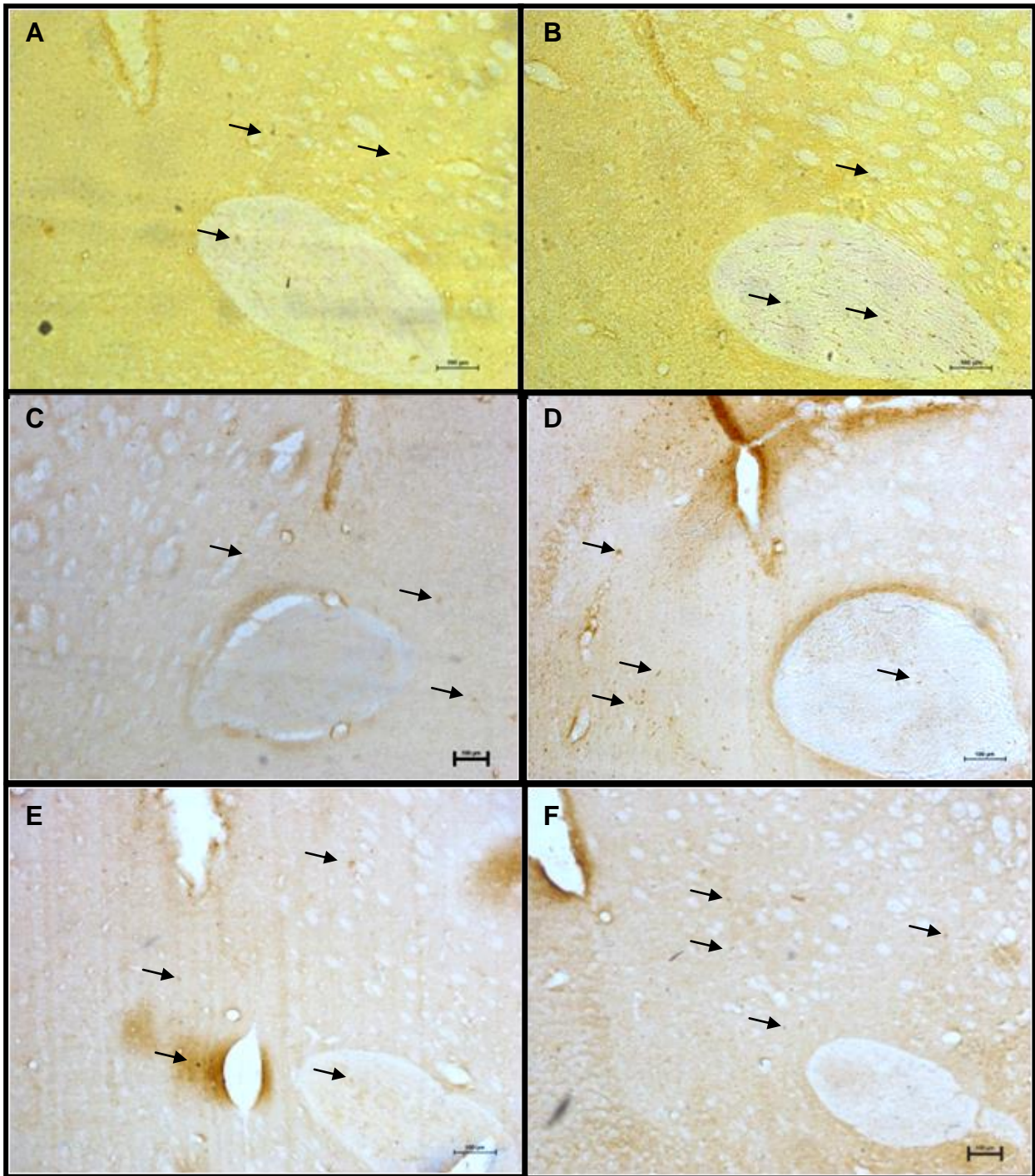
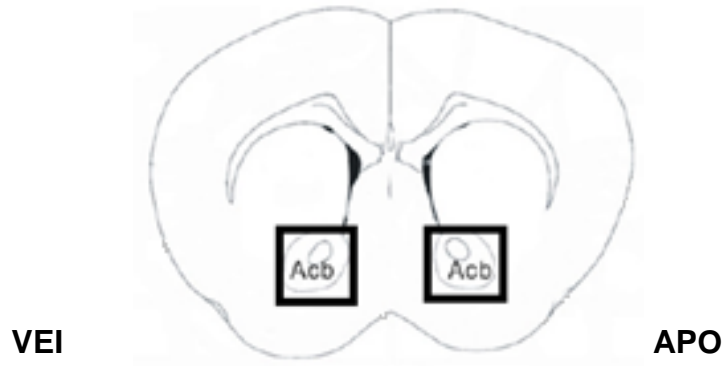


VEI

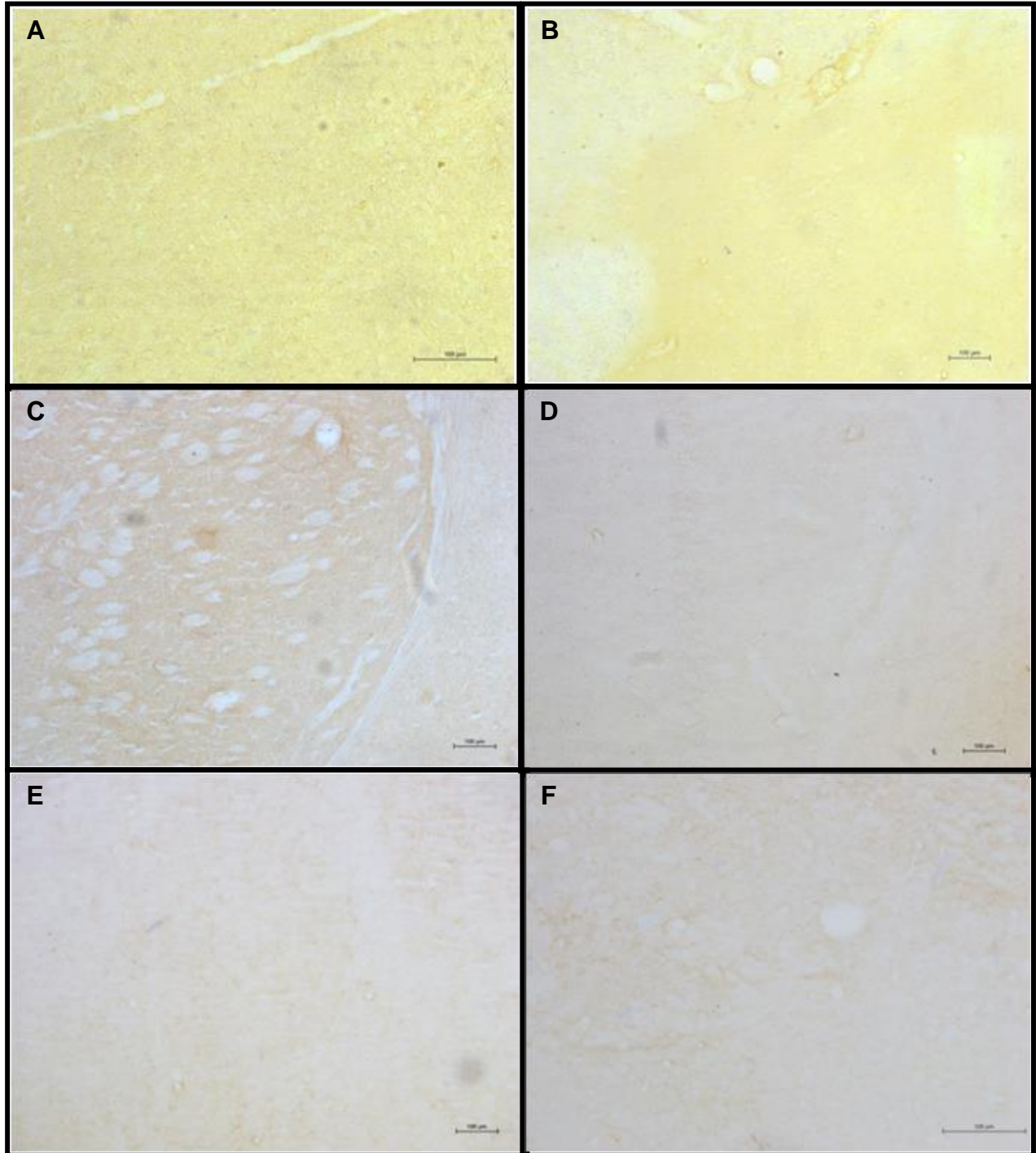
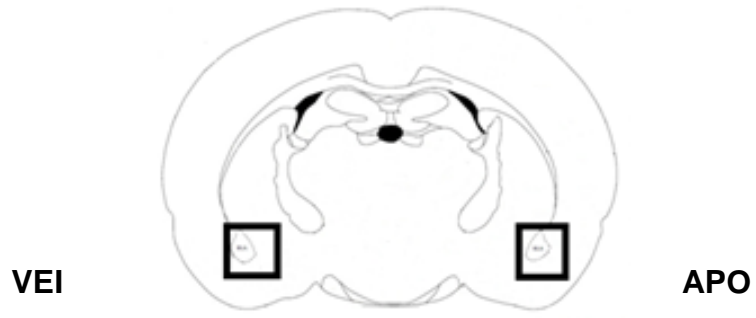
APO



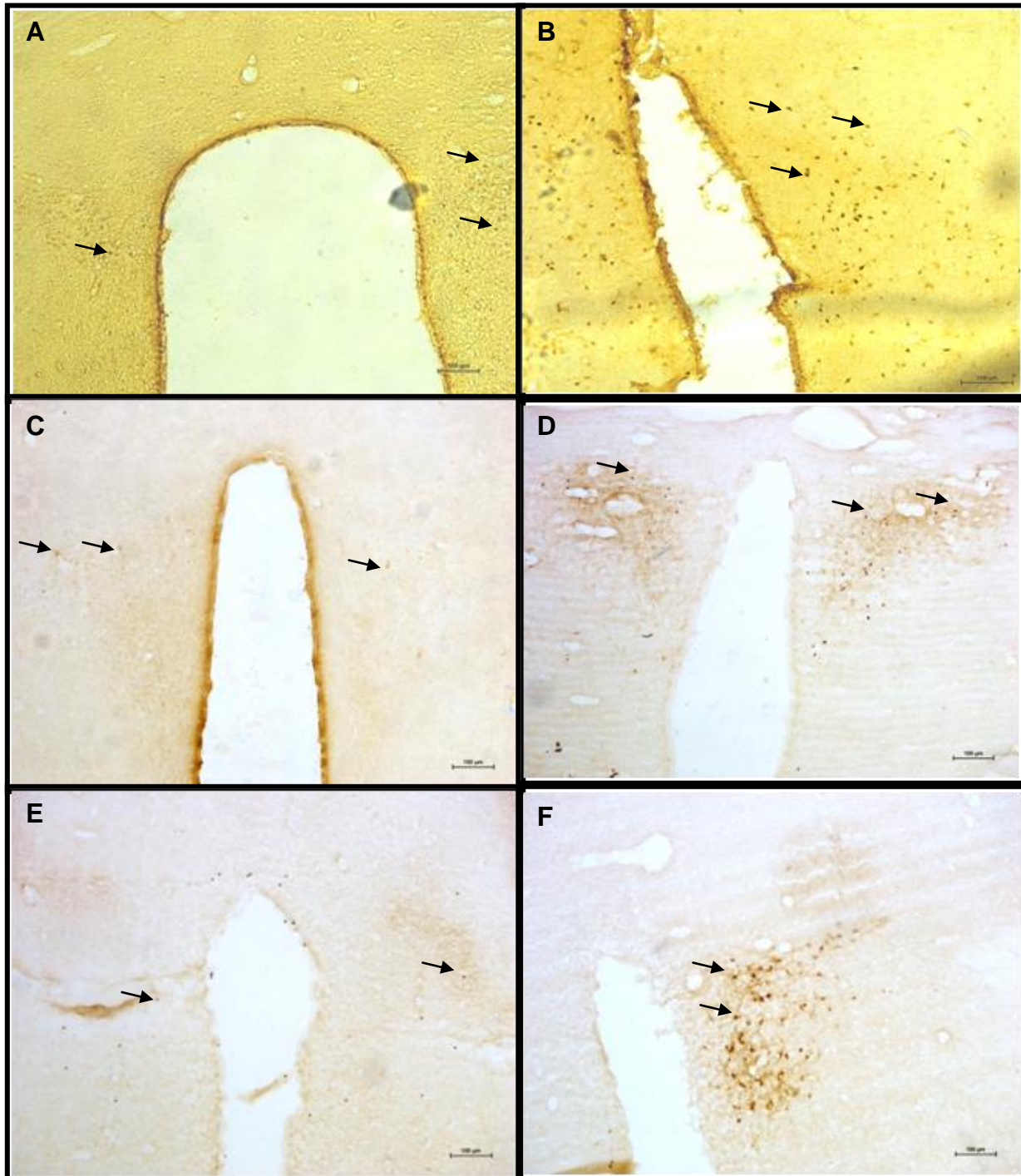
A figura 12 (p. 59) representa esquematicamente o corte do núcleo accumbens segundo o atlas "*The rat brain: in stereotaxic coordinates*" (PAXINOS e WATSON, 2004) e as imagens da imunohistoquímica do núcleo accumbens após a administração aguda de veículo ou apomorfina (2 mg/kg). O retângulo indicado na figura corresponde à região usada para a quantificação protéica. Os cortes usados na imunodeteção foram obtidos aproximadamente a +1.70 anterior à bregma. As figuras A, C e E correspondem às imagens do NAc 15, 30 e 60 min após administração do veículo, respectivamente e as figuras B, D e F correspondem às imagens do NAc 15, 30 e 60 min após a administração da apomorfina, respectivamente. As setas indicam as células imunorreativas.



A figura 13 (p. 61) representa esquematicamente o corte da amígdala segundo o atlas "*The rat brain: in stereotaxic coordinates*" (PAXINOS e WATSON, 2004) e as imagens da imunoistoquímica da amígdala após a administração aguda de veículo ou apomorfina (2 mg/kg). O retângulo indicado na figura corresponde à região usada para a quantificação protéica. Os cortes usados na imunodeteção foram obtidos aproximadamente a -2.40 à bregma. As figuras A, C e E correspondem às imagens da amígdala 15, 30 e 60 min após administração do veículo, respectivamente e as figuras B, D e F correspondem às imagens da AMG 15, 30 e 60 min após a administração da apomorfina, respectivamente.



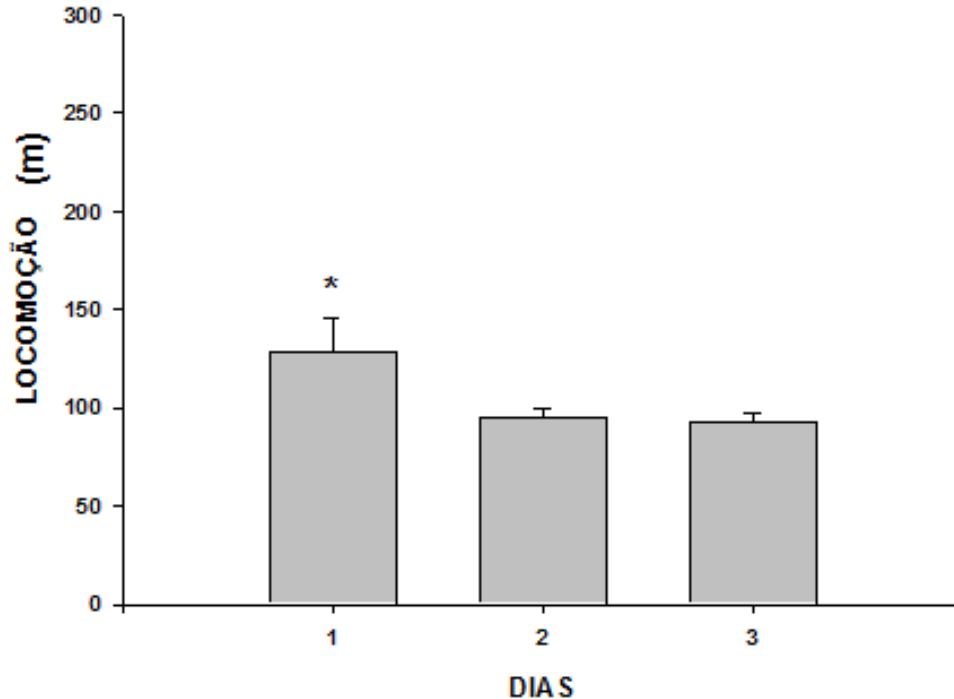
A figura 14 (p. 63) representa esquematicamente o corte do hipotálamo lateral segundo o atlas "*The rat brain: in stereotaxic coordinates*" (PAXINOS e WATSON, 2004) e as imagens da imunoistoquímica do hipotálamo lateral após a administração aguda de veículo ou apomorfina (2 mg/kg). O retângulo indicado na figura corresponde à região usada para a quantificação protéica. Os cortes usados na imunodeteção foram obtidos aproximadamente a -2.40 à bregma. As figuras A, C e E correspondem às imagens do HL 15, 30 e 60 min após administração do veículo, respectivamente e as figuras B, D e F correspondem às imagens do HL 15, 30 e 60 min após a administração da apomorfina, respectivamente. As setas indicam as células imunorreativas.



## 5.2 - EXPERIMENTO 2 – O EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE APOMORFINA NA ARENA EXPERIMENTAL SOBRE A ATIVAÇÃO DE ERK-P

Antes do início do experimento, os animais foram submetidos à fase de habituação de três dias. A figura 15 (p. 64) mostra a atividade locomotora dos animais durante o período de habituação. A ANOVA de um fator mostrou uma diminuição significativa na locomoção ao longo de dias [F (2, 23) = 3,65,  $p < 0,01$ ], tal como o esperado para o desenvolvimento de habituação a um ambiente novo (CERBONE e SADILE, 1994). O teste de Duncan mostrou que o dia 1 apresentou atividade locomotora superior aos dias 2 e 3 ( $p < 0,05$ ). Assim, antes do início do experimento não houve diferença entre os grupos de tratamento ( $p > 0,05$ ).

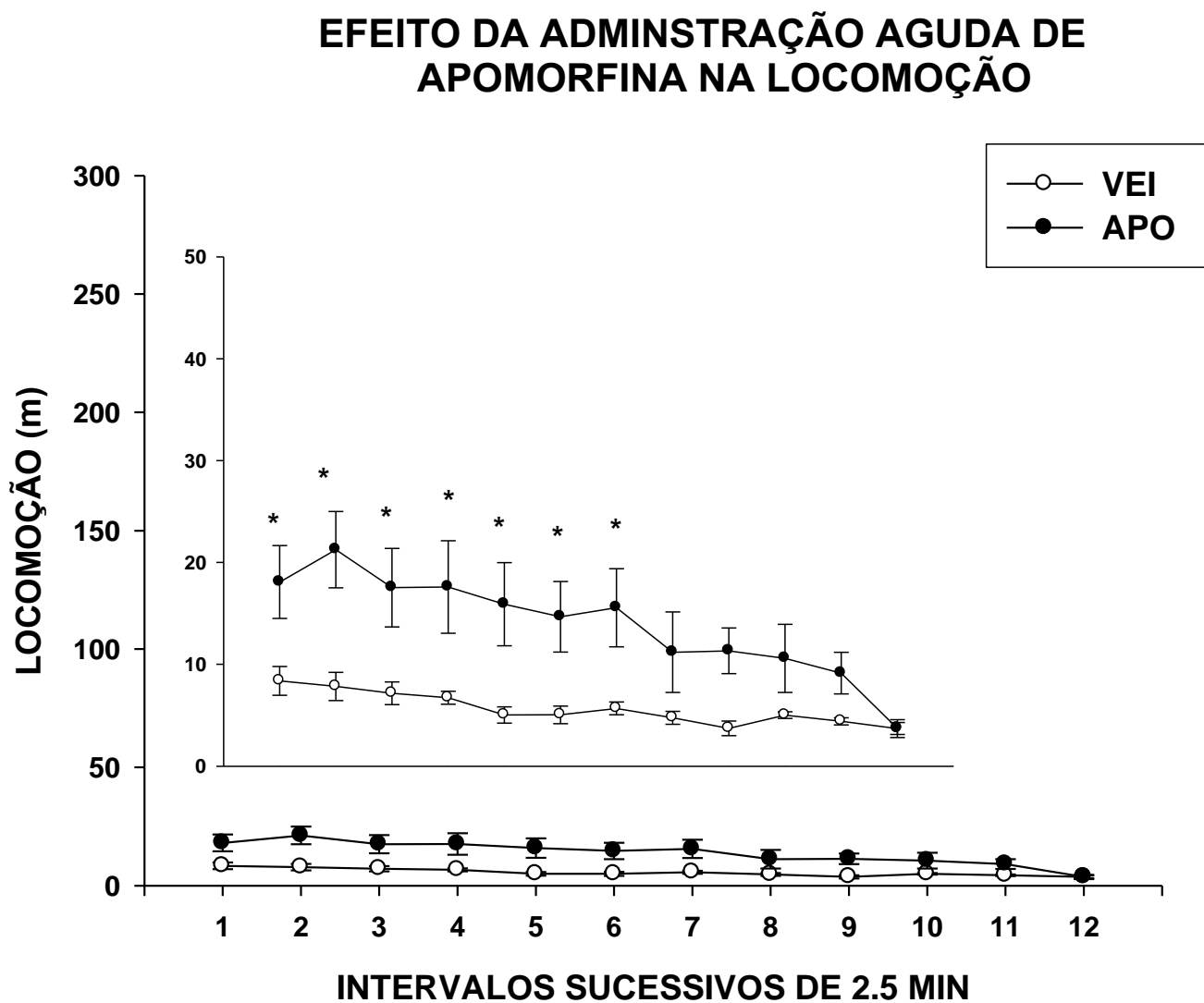
### FASE DE HABITUAÇÃO DO EXPERIMENTO 2



**Figura 15:** Média e Erro Padrão da Média (E.P.M.) da locomoção no período de habituação. \*Indica locomoção maior que nos demais dias ( $p < 0,05$ ; ANOVA de um fator, seguida do teste de Duncan).



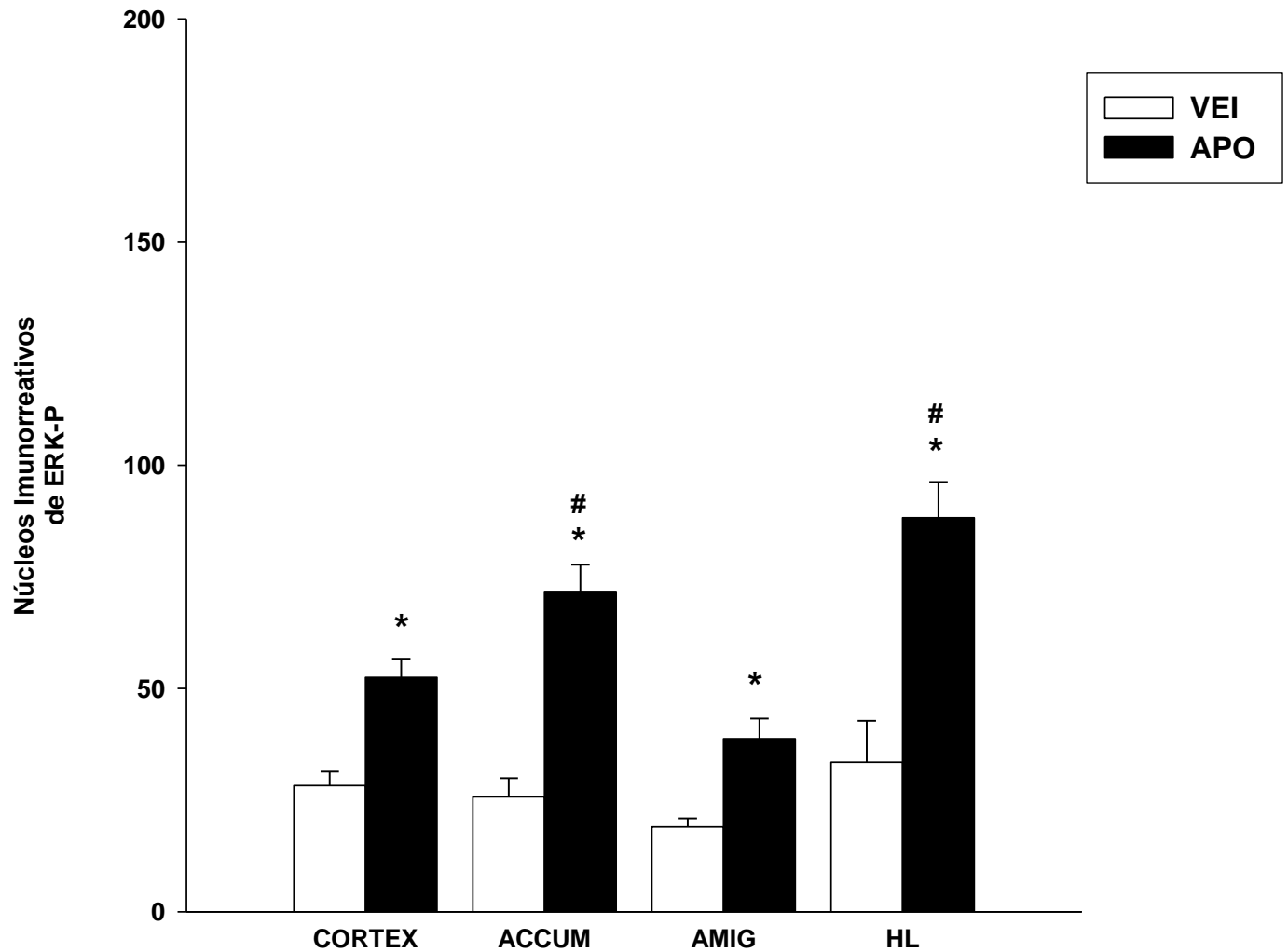
A figura 16 (p. 65) mostra os resultados para a atividade locomotora dos grupos apomorfina (2,0 mg/kg) e veículo testados imediatamente após a administração dos tratamentos. O tempo total da atividade locomotora (30 min) foi dividido em 12 intervalos de 2,5 min cada. A ANOVA por medidas repetidas de dois fatores indicou interação grupo X intervalo de tempo [ $F(11, 66) = 2.06, p < 0,05$ ], efeito dos grupos [ $F(1, 6) = 10,0, p < 0,05$ ] e efeito do intervalo de tempo [ $F(11, 66) = 6,13, p < 0,05$ ]. O grupo apomorfina apresentou um aumento da atividade locomotora nos 6 primeiros intervalos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 16:** Média e Erro Padrão da Média (E.P.M.) da atividade locomotora após a administração de apomorfina e veículo na arena experimental.\* Indica maior atividade locomotora do grupo apomorfina do que o grupo veículo ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo teste de Duncan). A inserção apresenta os mesmos dados de locomoção em uma escala diferente.

A figura 17 (p. 67) apresenta o número de núcleos imunorreativos de ERK-P no córtex pré-frontal, núcleo accumbens, amígdala e no hipotálamo lateral, após o fim do teste da arena em que os animais receberam a apomorfina ou veículo. A ANOVA de dois fatores indicou interação grupo X estrutura cerebral [ $F(3, 24) = 4,50, p < 0,01$ ], efeito dos grupos [ $F(1, 24) = 82,30, p < 0,01$ ] e efeito da estrutura cerebral [ $F(3, 24) = 11,50, p < 0,01$ ]. O teste t para amostras independentes mostrou que o grupo apomorfina apresentou maior número de núcleos imunorreativos de ERK-P do que o grupo veículo ( $p < 0,05$ ), em todas as estruturas cerebrais do estudo ( $p < 0,05$ ). A ANOVA de um fator mostrou que não houve diferença para o grupo veículo entre as estruturas cerebrais [ $F(3, 15) = 1,24, p > 0,05$ ]. Entretanto, entre os grupos tratados com apomorfina, a ANOVA de um fator, seguida por teste de Duncan mostrou que o núcleo accumbens e o hipotálamo lateral apresentaram maior número de núcleos imunorreativos de ERK-P do que o córtex pré-frontal e a amígdala ( $p < 0,05$ ).

## EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE APOMORFINA NA ATIVAÇÃO DA ERK NO TESTE DA ARENA EXPERIMENTAL



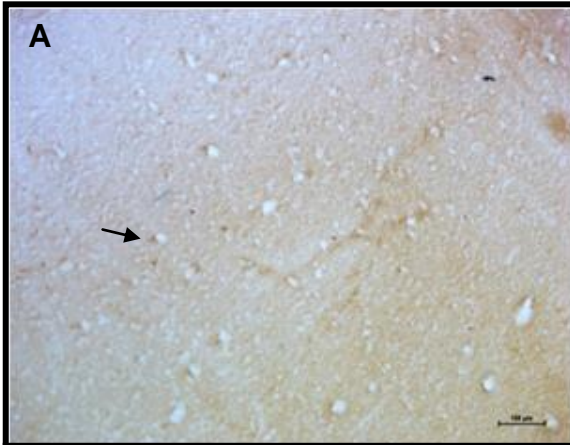
**Figura 17:** Média e Erro Padrão da Média (E.P.M.) dos núcleos imuno-reativos à ERK-P nas estruturas cerebrais. \* Indica maior número de núcleos imuno-reativos de ERK-P do grupo apomorfina em relação ao veículo na mesma estrutura. # Indica que a imuno-reatividade de ERK-P nos grupos apomorfina foi maior do que nas outras estruturas ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo teste de Duncan).

A figura 18 (p. 69) representa as imagens da imunohistoquímica após a administração do veículo ou apomorfina (2 mg/kg) no ambiente experimental. Os cortes usados na imunodeteção foram obtidos a partir das coordenadas do atlas Paxinos e Watson (2004). As figuras A, B, C e D correspondem às imagens do CPF, NAc, AMG e HL 30 min após administração do veículo no ambiente experimental, respectivamente. As figuras E, F, G e H correspondem às imagens do CPF, NAc, AMG e HL 30 min após a administração da apomorfina no ambiente experimental, respectivamente. As setas indicam as células imunorreativas.

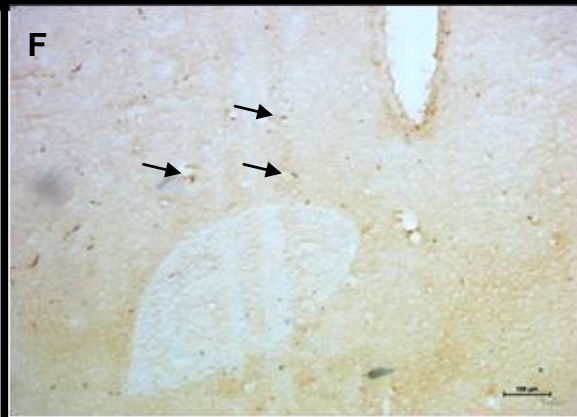
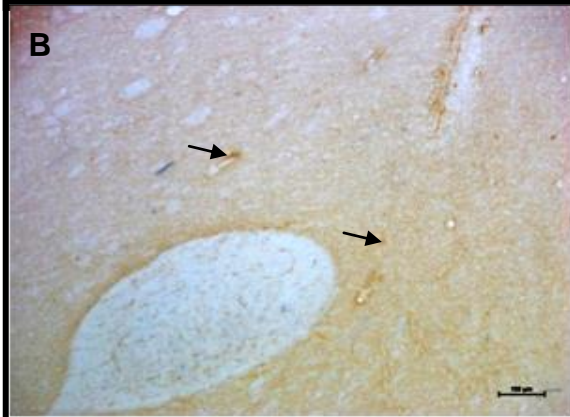
VEI

APO

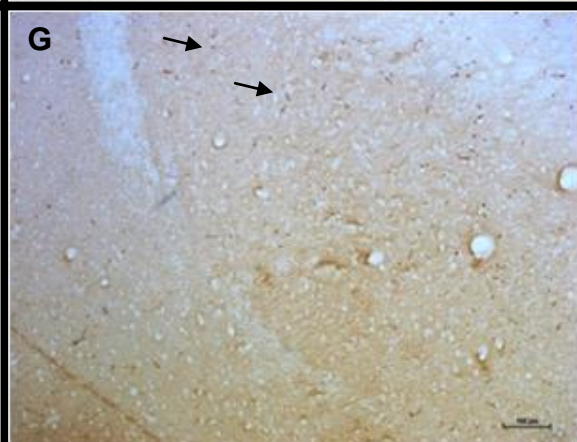
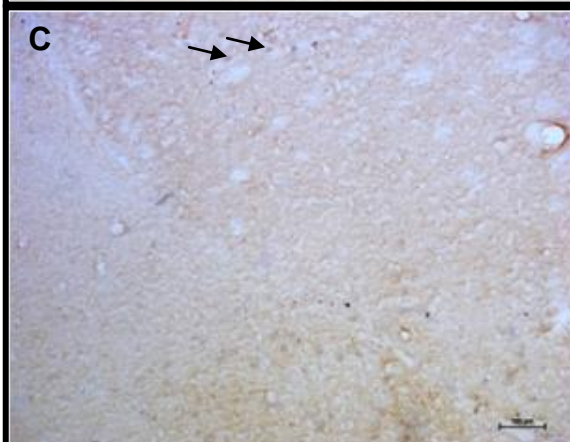
69



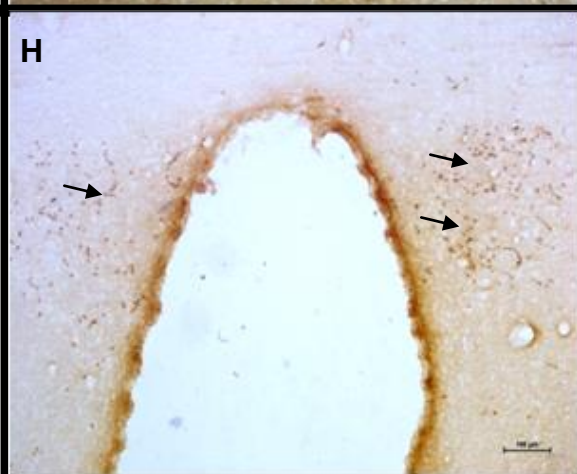
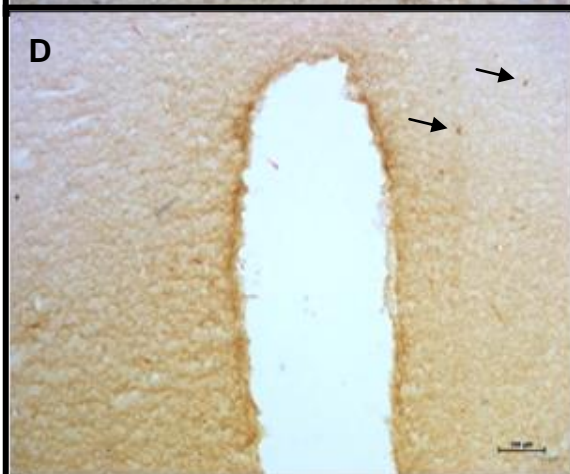
CPF



NAc



AMG

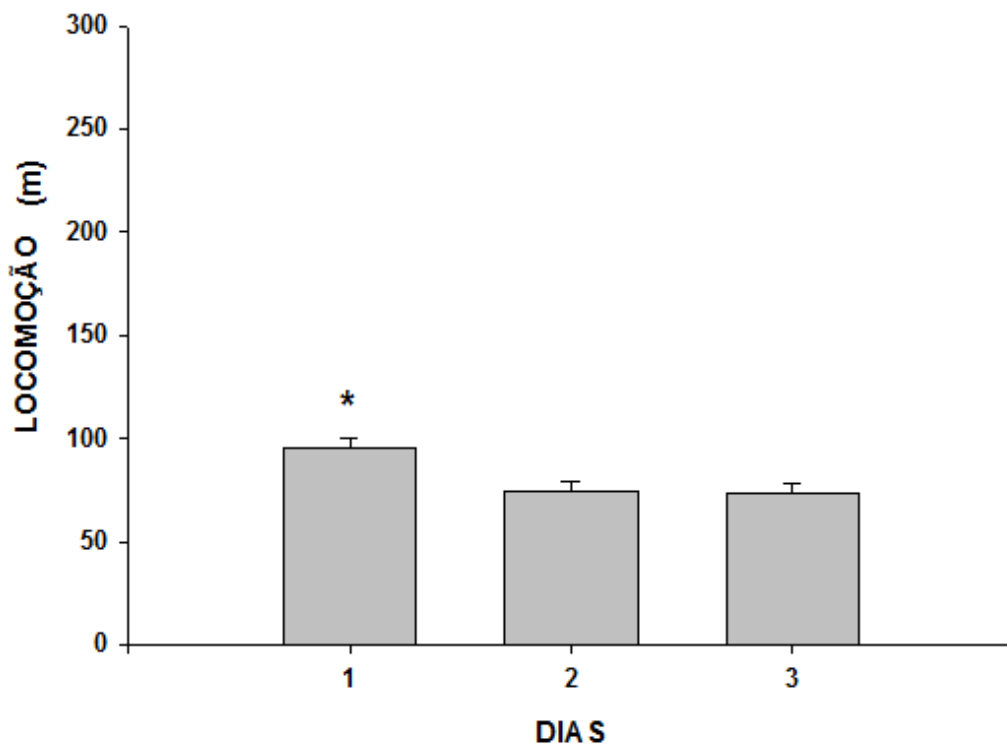


HL

### 5.3 - EXPERIMENTO 3 – O EFEITO DO DESENVOLVIMENTO DA SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL INDUZIDA POR APOMORFINA SOBRE A ATIVAÇÃO DE ERK-P

Antes do início do experimento, os animais foram submetidos à fase de habituação de três dias. A figura 19 (p. 70) mostra a atividade locomotora dos animais durante a fase de habituação. A ANOVA de um fator mostrou que houve uma diminuição significativa na locomoção ao longo de dias [F (2, 23) = 3,65,  $p < 0,01$ ]. O teste de Duncan mostrou que o dia 1 tinha atividade locomotora superior aos dias 2 e 3 ( $p < 0,05$ ). Antes do início do experimento não houve diferença entre os grupos de tratamento ( $p > 0,05$ ).

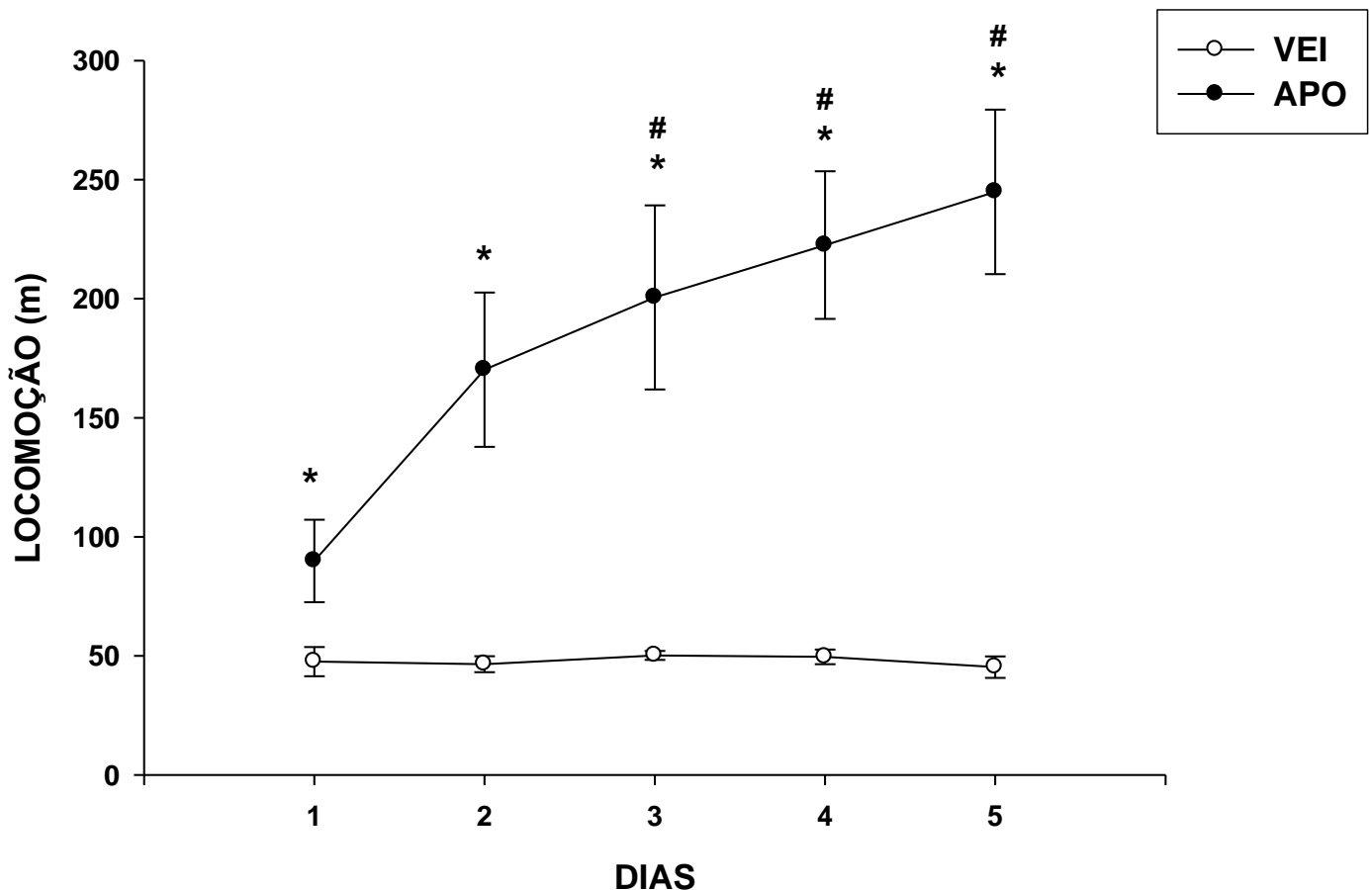
#### FASE DE HABITUAÇÃO DO EXPERIMENTO 3



**Figura 19:** Média e Erro Padrão da Média (E.P.M.) da locomoção no período de habituação. \*Indica locomoção maior que nos demais dias ( $p < 0,05$ ; ANOVA de um fator, seguida do teste de Duncan).

A figura 20 (p. 71) mostra os resultados da fase de indução da sensibilização no qual os animais receberam veículo ou a apomorfina durante 5 dias consecutivos. A ANOVA de medidas repetidas mostrou interação grupo X dias [F (4, 40) = 9,0,  $p < 0,01$ ], efeito dos grupos [F (1, 10) = 28,0;  $p < 0,01$ ] e efeito dos dias de tratamento [F (4, 40) = 8,70,  $p < 0,01$ ]. Para o desdobramento da interação do grupo X dias, um teste t para amostras independentes foi utilizado para cada dia da fase de indução e os resultados mostraram que desde o dia 1 até ao dia 5, o grupo apomorfina apresentou atividade locomotora maior do que o grupo veículo ( $p < 0,05$ ). A ANOVA de um fator seguido por teste de Duncan realizada para o grupo apomorfina entre os dias de administração mostrou atividade locomotora maior nos dias 5, 4 e 3 do que nos dias 1 e 2 ( $p < 0,05$ ).

### FASE DE INDUÇÃO DA SENSIBILIZAÇÃO PELA APOMORFINA

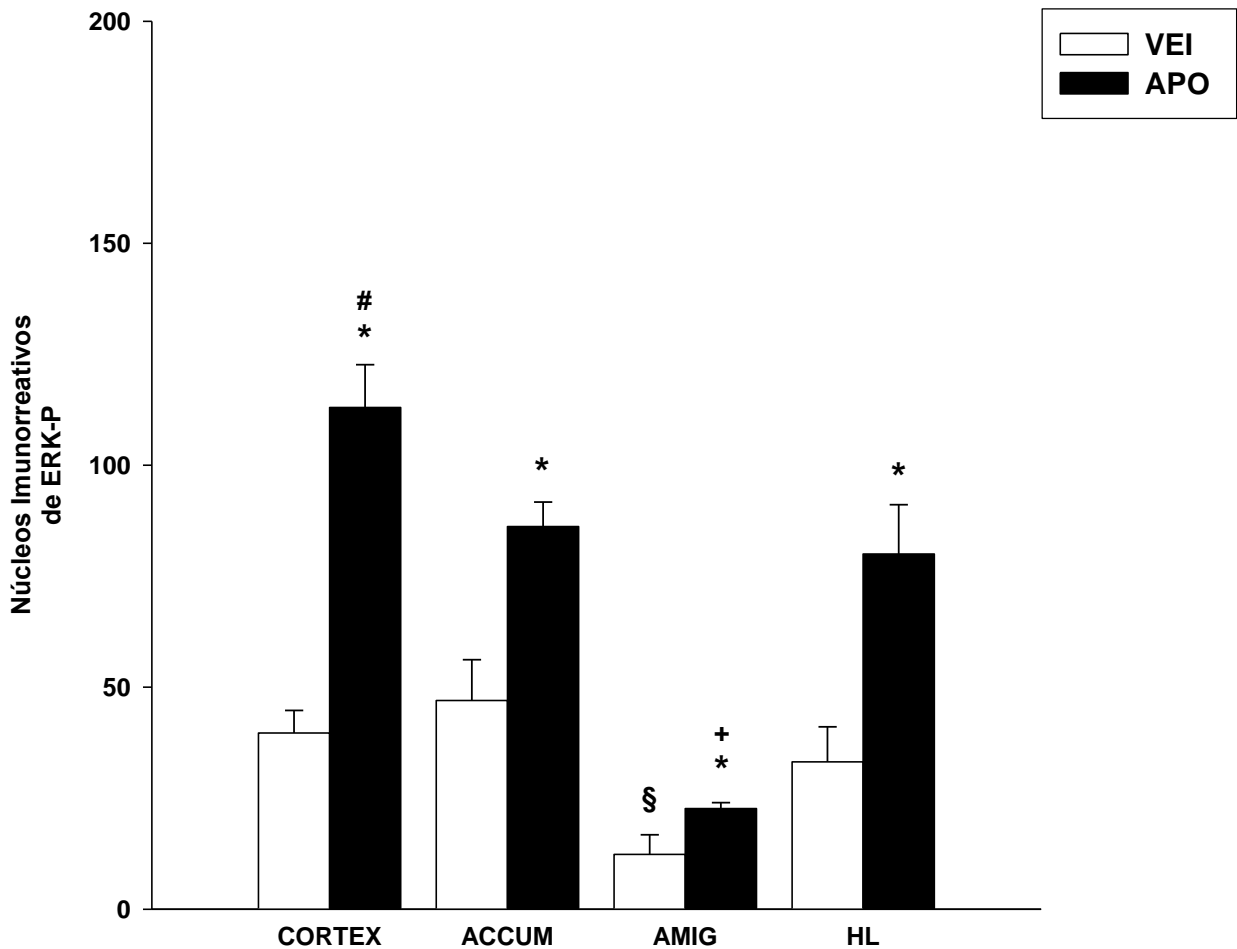


**Figura 20:** Média e Erro Padrão da Média (E.P.M.) da atividade locomotora durante os 5 dias de administração crônica de veículo e apomorfina. \* Indica atividade locomotora maior do grupo apomorfina em relação ao grupo veículo para o mesmo dia. # Indica que a atividade locomotora nos dias 3, 4 e 5 do grupo apomorfina foi maior do que nos dias 1 e 2 ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo teste de Duncan).

A figura 21 (p. 72) mostra o número de núcleos imunorreativos de ERK-P no córtex pré-frontal, núcleo accumbens, amígdala e hipotálamo lateral após o último dia da fase de indução de sensibilização. A ANOVA de dois fatores indicou uma interação grupo X estrutura cerebral [ $F(3, 48) = 5,0, p < 0,01$ ], efeito dos grupos [ $F(1, 48) = 57,0, p < 0,01$ ] e efeito de estrutura cerebral [ $F(3, 48) = 21,04, p < 0,01$ ]. O teste t para amostras independentes mostrou que o grupo apomorfina apresentou maior número de ERK-P do que o grupo tratado com veículo ( $p < 0,05$ ) para todas as estruturas cerebrais ( $p < 0,05$ ). Entre os grupos veículo, a ANOVA de um fator seguido por teste de Duncan mostrou que a amígdala apresentou menor número de núcleos imunorreativos de ERK-P do que o córtex pré-frontal, núcleo accumbens e hipotálamo lateral ( $p < 0,05$ ). Entre os grupos apomorfina, os resultados mostraram que o córtex pré-frontal apresentou maior número ERK-P do que as outras estruturas cerebrais ( $p < 0,05$ ) e a amígdala apresentou menor número ERK-P do que as outras áreas cerebrais ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença entre o núcleo accumbens e o hipotálamo lateral, mas ambas as áreas tiveram maior número de núcleos imunorreativos de ERK-P do que a amígdala ( $p < 0,05$ ).



## ATIVAÇÃO DA ERK APÓS A SENSIBILIZAÇÃO LOCOMOTORA

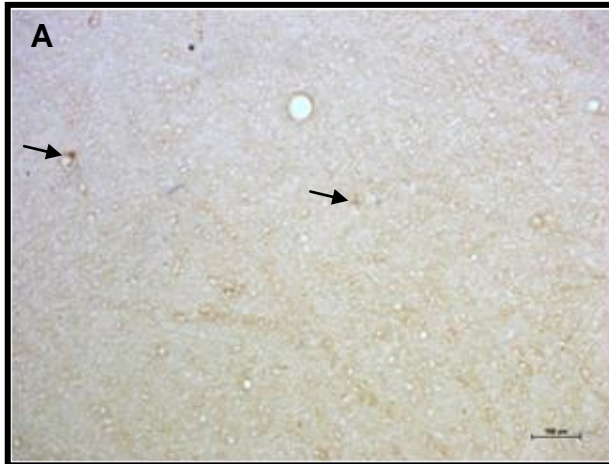


**Figura 21:** Média e Erro Padrão da Média (E.P.M.) dos núcleos imunorreativos à ERK-P após a administração repetida de veículo ou apomorfina.\* Indica maior número de núcleos imunorreativos de ERK-P do grupo apomorfina em relação ao grupo veículo para a mesma estrutura. # Indica maior número de núcleos imunorreativos de ERK-P do grupo apomorfina no córtex pré-frontal do que nas demais estruturas cerebrais. + Indica menor número de núcleos imunorreativos de ERK-P do grupo apomorfina da amígdala do que as demais estruturas cerebrais. § Indica menor número de núcleos imunorreativos de ERK-P no grupo veículo da amígdala em relação as demais estruturas cerebrais ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo teste de Duncan).

A figura 22 (p. 75) representa as imagens da imunohistoquímica após a administração do veículo ou apomorfina (2 mg/kg) durante 5 dias consecutivos do desenvolvimento da sensibilização comportamental. Os cortes usados na imunodeteção foram obtidos a partir das coordenadas do atlas Paxinos e Watson (2004).

VEI

APO



75

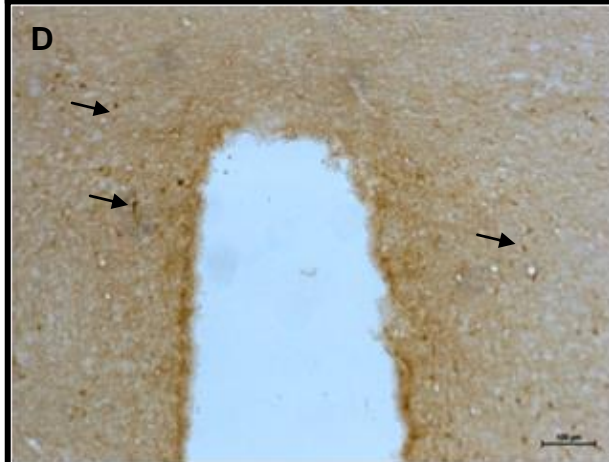
CPF



NAc



AMG



HL

#### 5.4 – COMPARAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE ERK-P ENTRE OS EXPERIMENTOS 2 E 3

A figura 23 mostra a comparação da ativação da ERK entre os experimentos 2 e 3. Para o córtex pré-frontal (Fig. 23A), os resultados mostraram uma interação grupos X experimentos [ $F(1, 20) = 12,0, p < 0,01$ ], efeito de grupo [ $F(1, 20) = 47,0, p < 0,01$ ] e efeito de experimentos [ $F(1, 20) = 25,52, p < 0,01$ ]. Para o desdobramento da interação dos grupos X experimentos, um teste t para amostras independentes foi utilizado para cada experimento e os resultados mostraram que, para todos os experimentos, os grupos apomorfina apresentaram maior número de núcleos imunorreativos de ERK-P do que os grupos veículo ( $p < 0,05$ ).

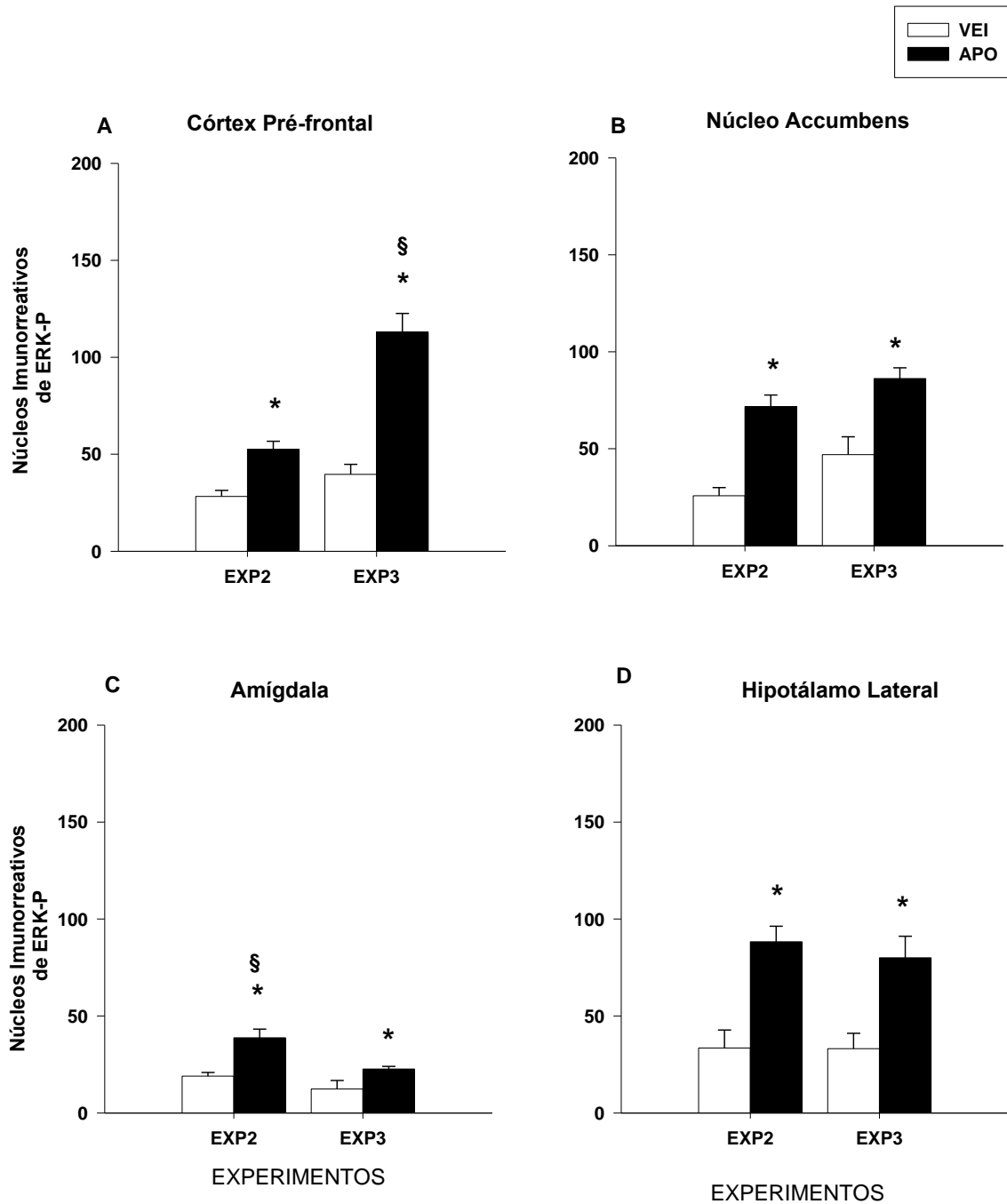
Os resultados também mostraram que não houve diferença quanto ao número de núcleos imunorreativos de ERK-P entre os grupos veículos em todos os experimentos ( $p > 0,05$ ), mas para os grupos apomorfina, os resultados mostraram que o experimento 3 apresentou um número maior de núcleos imunorreativos de ERK-P do que o experimento 2 ( $p < 0,05$ ).

Para o núcleo accumbens (Fig. 23B), os resultados indicaram um efeito de grupos [ $F(1, 20) = 34,01, p < 0,01$ ], efeito de experimentos [ $F(1, 20) = 6,0, p < 0,05$ ], mas não houve interação grupos X experimentos [ $F(1, 20) = 0,22, p > 0,05$ ]. Um teste t para amostras independentes mostrou que, para todos os experimentos, os grupos apomorfina apresentaram maior número de núcleos imunorreativos de ERK-P do que os grupos veículo ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença entre os grupos veículos ou entre os grupos apomorfina através dos experimentos ( $p > 0,05$ ).

Para a amígdala (Fig. 23C), os resultados indicaram um efeito de grupos [ $F(1, 20) = 19,0, p < 0,01$ ], efeito de experimentos [ $F(1, 20) = 10,74, p < 0,01$ ], mas não houve interação grupos X experimentos [ $F(1, 20) = 1,84, p > 0,05$ ]. Um teste t para amostras independentes mostrou que, para os experimentos 2 e 3, os grupos apomorfina tinham maior número de núcleos imunorreativos a ERK-P do que os grupos veículo ( $p < 0,05$ ). Os resultados também mostraram que não houve diferença entre os grupos veículos em todos os experimentos ( $p > 0,05$ ), mas para os grupos apomorfina, os resultados mostraram que o experimento 2 apresentou maior número de ERK-P do que o experimento 3 ( $p < 0,05$ ).

Para o hipotálamo lateral (Fig. 23D), os resultados mostraram apenas um efeito de grupos [ $F(1, 20) = 26,84$ ,  $p < 0,01$ ]. Não houve efeito de experimentos [ $F(1, 20) = 0,20$ ,  $p > 0,05$ ] ou interação grupo X experimentos [ $F(1, 20) = 0,16$ ,  $p > 0,05$ ]. O teste t para amostras independentes mostrou que, para todos os experimentos, os grupos apomorfina tiveram maior número de núcleos imunorreativos de ERK-P do que os grupos veículo ( $p < 0,05$ ).

### ATIVAÇÃO DA ERK NAS ESTRUTURAS CEREBRAIS ENTRE OS EXPERIMENTOS



**Figura 23:** Média e Erro Padrão da Média (E.P.M.) dos núcleos imunorreativos à ERK-P após os tratamentos agudo e crônico. \* Indica maior número de núcleos imunorreativos de ERK-P do grupo apomorfina em relação ao grupo veículo. § Indica diferença na imunorreatividade à ERK-P dos ratos injetados com apomorfina entre os experimentos ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo teste de Duncan).

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 - EXPERIMENTO 1 – CURVA TEMPORAL DE ATIVAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DA PROTEÍNA QUINASE REGULADA POR SINAIS EXTRACELULARES (ERK-P) APÓS A ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE APOMORFINA

O objetivo do presente experimento foi verificar se a administração de apomorfina na dose de 2,0 mg/kg produziu ativação da ERK avaliada no córtex pré-frontal, núcleo accumbens, amígdala e hipotálamo lateral após os tempos de administração de 15, 30 e 60 minutos.

Os resultados da imunistoquímica da ERK-P no córtex pré-frontal mostraram que a administração de apomorfina aumentou o número de neurônios imunorreativos a essa proteína fosforiladora. Houve aumento de núcleos imunorreativos a ERK-P observado 15 e 30 minutos após a administração de apomorfina quando comparados aos resultados obtidos com os animais tratados com o veículo. Não houve diferença entre a apomorfina e o veículo 60 minutos após a administração de apomorfina. Assim, os resultados indicaram que ocorreu uma redução gradativa da ativação de ERK-P para essa estrutura ao longo do tempo.

Esses resultados estão de acordo com outros relatos da literatura que mostraram que a proteína ERK-P foi ativada no córtex pré-frontal após a administração aguda de cocaína e anfetamina, sugerindo que essa ativação poderia participar das adaptações moleculares necessárias à sensibilização induzida por estas drogas (VALJENT et al., 2000; JENAB et al., 2005; VALJENT et al., 2006; KIM et al., 2011). Um outro estudo utilizando a cafeína na dose de 15 mg/kg mostrou que houve ativação da ERK no córtex pré-frontal 15 minutos após a administração (VALJENT et al., 2004b). Assim, os dados do presente trabalho estendem esses resultados mostrando que a apomorfina produz ativação de ERK no córtex pré-frontal.

Resultados semelhantes foram obtidos para o núcleo accumbens, ou seja, houve uma ativação de ERK-P no tempo pós-administração de 15 e 30 minutos maior que no tempo de 60 minutos. Assim, no núcleo accumbens (*shell* e *core*) houve maior aumento do número de núcleos imunorreativos à ERK-P após 15 e 30 minutos da administração

de apomorfina se comparado ao resultado da ativação de ERK-P obtido para os animais tratados com o veículo. Valjent e colaboradores (2000) mostraram que houve um aumento significativo da ERK-P no intervalo de 5 a 10 minutos após a administração de cocaína (20 mg/kg) no núcleo accumbens.

Os resultados do presente trabalho mostram que a ativação de ERK-P acontece entre 15 e 30 minutos após a administração da apomorfina, pois após esse período se observou uma redução gradativa da ativação da ERK-P no córtex pré-frontal e no núcleo accumbens e passados 60 minutos, a marcação de ERK-P se aproximou aos níveis basais. Esse resultado se assemelha ao de Valjent e colaboradores (2000), no qual se constatou que após 20 minutos da administração de cocaína houve uma redução gradativa da fosforilação de ERK-P e depois de transcorridos 60 minutos da administração de cocaína, o número de ERK-P não se diferenciou do tratamento com o veículo. Em outro estudo utilizando a técnica de “western-blot”, Jenab e colaboradores (2005) observaram que a administração aguda de cocaína (20 mg/kg) produziu fosforilação de ERK nos núcleos caudado e putâmem de ratos 30 minutos após a administração.

Outros psicoestimulantes também tiveram sua ativação de ERK-P verificada após a administração aguda. A morfina, agonista dos receptores opióides, e a nicotina, agonista dos receptores colinérgicos, apresentaram aumento de ativação de ERK-P no núcleo accumbens após 20 minutos da administração. A imunorreatividade à ERK-P produzida pela morfina no núcleo accumbens foi mais significativa na porção *shell*, na amígdala central e no córtex pré-frontal (VALJENT et al., 2004b). Já a nicotina (0,4 mg/kg) produziu o aumento significativo da ativação de ERK-P no núcleo accumbens e na amígdala central após 20 minutos da administração aguda (VALJENT et al., 2004b). Também foi verificado que após 20 minutos da administração de tetraidrocanabinol (maconha), agonista dos receptores canabinóides, na dose de 1 mg/kg ocorreu aumento da ativação de ERK-P no estriado dorsal e lateral e no núcleo accumbens (VALJENT et al., 2001).

Os resultados para avaliação dos núcleos imunorreativos à ERK-P no hipotálamo lateral (HL) após a administração aguda de apomorfina mostraram maior ativação da proteína no tempo de 15 minutos do que nos tempos de 30 e 60 minutos. Esse



resultado está de acordo com outros relatos da literatura científica que mostraram que psicoestimulantes como a cocaína (20 mg/kg) também produziram ativação de ERK-P no HL (VALJENT et al., 2004b). Também foi mostrado que a nicotina (0,4 mg/kg) produziu o aumento moderado na fosforilação de ERK-P no septo lateral do hipotálamo. Já o tetraidrocanabinol (1 mg/kg) elevou o número de núcleos imunorreativos de ERK-P nas áreas dorsomedial, ventromedial e paraventricular do hipotálamo (VALJENT et al., 2004b). A morfina (5 mg/kg) e a nicotina (0,4 mg/kg) também aumentaram o nível de ERK-P no hipotálamo paraventricular. Esses resultados foram obtidos por análise imunistoquímica 20 minutos após a administração das drogas (VALJENT et al., 2004b).

Em relação à amígdala, os resultados do presente trabalho mostraram que não houve ativação de ERK-P em nenhum tempo após a administração aguda da apomorfina. Valjent e colaboradores (2004b) mostraram que a administração aguda de cocaína (20 mg/kg) produziu a ativação da ERK na amígdala. Já Radwanska e colaboradores (2005) encontraram os produtos resultantes da transcrição de genes imediatos mediados por ERK-P (*c-fos*, *JunB* e *zif268*) e também núcleos imunorreativos a ERK-P na amígdala central após a administração aguda de cocaína (20 mg/kg). No entanto, esses trabalhos foram metodologicamente diferentes em relação ao presente trabalho. Entre as diferenças, Valjent e colaboradores (2004b) utilizaram a via de administração intraperitoneal e os animais permaneceram por 10 dias na caixa-viveiro antes do início do experimento. Já no experimento de Radwanska e colaboradores (2005), os animais foram mantidos por 2 dias no laboratório antes do início do experimento. No presente trabalho foi utilizada a via subcutânea para a administração e os animais passaram por um período de 7 dias de habituação, manuseamento e foi realizada adaptação ao procedimento de injeção antes do início do experimento.

Outra possível explicação para essa diferença é o mecanismo de ação das drogas utilizadas nos trabalhos. Enquanto a cocaína é um agonista indireto dos receptores dopaminérgicos, aumentando a concentração de dopamina na fenda sináptica pelo bloqueio da recaptação de dopamina, a apomorfina é um agonista que atua diretamente nos receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>. Outra explicação seria a relação entre o ambiente e a amígdala. Os resultados do presente trabalho sugerem

que a ativação de ERK-P induzida pela apomorfina na amígdala está relacionada à participação do contexto ambiental. Corroborando a essa ideia, outro estudo mostrou que a resposta locomotora e o grau dos efeitos de ativação neuronal da amígdala basolateral foram maiores quando a anfetamina foi administrada em um novo ambiente do que quando é administrada na caixa-viveiro (RADEMACHER et al., 2010). Em outras palavras, as alterações moleculares ocasionadas pela apomorfina na amígdala dependeriam da associação com o ambiente.

As estruturas cerebrais estudadas no presente trabalho estão envolvidas diretamente com a dependência química. O córtex pré-frontal desempenha o papel de regulação da atenção, memória e aprendizagem, importantes para o reconhecimento de objetos, sendo a sua capacidade de associar os estímulos com as dicas do ambiente um dos elementos principais responsáveis pelo seu papel na dependência (CHAO et al., 2013; GLICKSTEIN et al., 2005; DARDENNE et al., 2012). Além disso, as interações do córtex pré-frontal com o núcleo accumbens e amígdala também são importantes, pois são estruturas classicamente reconhecidas como participantes do circuito de recompensa (KALIVAS e VOLKOW, 2005; WOLF et al., 2002). Tais estruturas envolvidas na dependência química estão inter-relacionadas, pois existem projeções do accumbens para o hipotálamo lateral (BERENDSE et al., 1992), bem como do accumbens para a amígdala e para o córtex pré-frontal (ALEXANDER et al., 1990). Dessa forma, a ação dos psicosestimulantes sobre uma estrutura pode contribuir para a ativação de outra ao qual se relaciona.

Ademais, os resultados do presente experimento mostram que a apomorfina (2,0 mg/kg) produziu ativação de ERK-P após a administração aguda em 3 importantes áreas dopaminérgicas relacionadas aos processos de dependência de drogas e que os tempo de 15 e 30 minutos apresentaram maior ativação.

Tomados juntos, os resultados do experimento 1 mostraram que a administração aguda de APO, em uma dose que atua preferencialmente nos receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>, produziu a ativação da ERK em estruturas relacionadas com o processo de dependência química. Esses resultados estendem relatos da literatura científica que mostraram que a fosforilação da ERK induzida por cocaína requer a ativação dos receptores D<sub>1</sub> (LU et al., 2006; GIRAULT et al., 2006). A estimulação do

receptor  $D_1$  e de PKA aumentaria a sensibilidade ao glutamato e levaria ao aumento do influxo de cálcio pela ativação dos canais de cálcio voltagem dependentes (LI et al., 2008).

Por outro lado, de acordo com Yan e colaboradores (1999), e Valjent e colaboradores (2000, 2001) os agonistas  $D_2$  também podem ativar a ERK-P independentemente das sub-unidades beta e gama da proteína G, mas através do acoplamento à proteína Gq por ação da fosfolipase C e sua mobilização das reservas intracelulares de cálcio, o que causaria a elevação das reservas de cálcio, ativação da proteína quinase C, fosforilação e ativação de MAPK. Tendo em vista que a apomorfina atua tanto em receptores  $D_1$  quanto  $D_2$  (MATTINGLY et al., 1991), os resultados do presente trabalho sugerem que o aumento na reatividade à ERK-P induzido pela apomorfina estaria relacionado à ativação dos dois grupos de receptores,  $D_1$  e  $D_2$ .

## 6.2 - EXPERIMENTO 2 – O EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE APOMORFINA NA ARENA EXPERIMENTAL SOBRE A ATIVAÇÃO DE ERK-P

O objetivo do presente experimento foi quantificar o número de núcleos imunorreativos de ERK-P no córtex pré-frontal, núcleo accumbens, amígdala e hipotálamo lateral após o fim do teste na arena experimental, no qual os animais receberam uma dose do veículo ou de apomorfina (2,0 mg/kg) imediatamente antes de serem colocados no ambiente experimental.

Nos experimentos 2 e 3, os animais receberam os seus respectivos tratamentos farmacológicos e foram colocados imediatamente na arena experimental por 30 minutos para o registro da atividade locomotora. Trabalhos do nosso laboratório mostraram que o tempo de 30 minutos permite avaliar melhor a atividade locomotora induzida pela apomorfina (BRAGA et al., 2009a; BRAGA et al., 2009b; BLOISE et al., 2007). Esses resultados são corroborados por outros grupos de pesquisa (MATTINGLY e GOTSICK, 1988; LEWITT, 2004; LI et al., 2012; RIBARIC, 2012). Ademais, reafirma-se a escolha do tempo de 30 minutos levando-se em conta que o tempo de meia vida da APO varia de 30 a 90 minutos (LEWITT, 2004). O fato de que no experimento da curva temporal de ERK verificou-se maior ativação da ERK 15 e 30 minutos após a administração da

APO, fez do tempo de 30 minutos um parâmetro confiável tanto para avaliar o comportamento motor no ambiente experimental quanto para avaliar o efeito desse ambiente experimental na ativação da ERK.

Os resultados relativos à atividade locomotora mostraram que houve uma diferença significativa entre o grupo que recebeu a apomorfina em relação ao grupo veículo ao longo dos trinta minutos de registro da locomoção. Os animais que foram administrados com a apomorfina e colocados no ambiente experimental apresentaram aumento da atividade locomotora se comparados aos animais administrados com o veículo. Este resultado corrobora com aquele obtido por Braga e colaboradores (2009a), no qual os animais administrados com a apomorfina na dose de 2,0 mg/kg apresentaram efeito locomotor superior aos animais que receberam veículo durante 60 minutos de registro da atividade locomotora divididos em intervalos de tempo sucessivos de 5 minutos. Em outro trabalho, Bloise e colaboradores (2007) mostraram que após os 3 dias de administração de apomorfina, a administração de apomorfina (2 mg/kg) associada ao ambiente produziu um aumento da atividade locomotora nos ratos se comparados aos animais que receberam veículo. Esses resultados estão de acordo com a literatura científica que utilizaram outras substâncias psicoestimulantes e mostraram um aumento da atividade locomotora após a administração de cocaína (20 mg/kg) se comparados aos animais tratados com solução salina no primeiro dia da sensibilização locomotora (MARIN et al., 2009). Carey e Gui (1998) também obtiveram resultado semelhante com a administração de cocaína (10 mg/kg) associada ao ambiente na qual a resposta locomotora foi significativamente maior do que a resposta obtida com o veículo no primeiro dia do teste na arena experimental.

Além disso, é possível notar pela figura 16 que a partir do sexto intervalo de tempo ocorreu uma diminuição da atividade locomotora dos animais do grupo apomorfina se comparados aos animais do grupo veículo em relação aos primeiros seis intervalos de tempo (correspondentes aos primeiros quinze minutos do teste). Teoricamente, esses resultados obtidos no tratamento agudo com a apomorfina se relacionam com o tempo de maior ativação da ERK-P, observado no experimento 1. Corroborando a esses resultados, Shiflett e Balleine (2011) afirmaram que o nível de

ativação de ERK recrutado durante uma atividade pode determinar a magnitude dos efeitos comportamentais mediados por esta proteína.

Um resultado interessante observado foi a marcação de ERK-P na amígdala, uma vez que este efeito não havia sido observado no tratamento agudo. A amígdala detecta o perigo no ambiente externo e fisiologicamente prepara o organismo para se confrontar com a ameaça (FEINSTEIN et al., 2013). Segundo Koya e colaboradores (2009), a ativação da ERK pela cocaína na amígdala central induziu a mudanças rápidas na transmissão sináptica que regulam o desejo pela droga.

É provável que o ambiente tenha influenciado no aparecimento de uma resposta na amígdala, pois os resultados da imunistoquímica deste experimento estão relacionados ao teste experimental. A amígdala é ativada em situação com marcante significado emocional. Está também relacionada aos aprendizados emocionais e ao armazenamento de memórias afetivas. Ademais, a amígdala é responsável pela formação da associação entre estímulos e recompensas (BLANCHARD et al., 2011) e é uma estrutura na qual ocorre à associação de estímulos condicionados (emocionais) com os estímulos incondicionados (efeito da droga) (CARDINAL et al., 2002).

Portanto, os resultados desse experimento mostram que a administração aguda de apomorfina (2,0 mg/kg) no ambiente experimental produz a ativação da ERK-P nas áreas mesolímbicas dopaminérgicas e que os mecanismos relacionados a associação entre os efeitos da apomorfina e o ambiente possam ser diferentes daqueles produzidos pela simples administração aguda de apomorfina.

### 6.3 – O DESENVOLVIMENTO DA SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL E A ATIVAÇÃO DA ERK PRODUZIDA PELA APO: COMPARAÇÃO ENTRE O EFEITO AGUDO E O CRÔNICO APÓS A ARENA EXPERIMENTAL

O objetivo do presente experimento foi quantificar o número de núcleos imunorreativos da ERK-P no córtex pré-frontal, núcleo accumbens, amígdala e hipotálamo lateral após o desenvolvimento da sensibilização comportamental.

Os resultados relativos à atividade locomotora mostraram que os animais apresentaram aumento da locomoção após a administração da mesma dose de

apomorfina no decorrer de cinco dias consecutivos. Esses resultados corroboram os resultados do nosso laboratório que mostram que a APO 2,0 mg/kg produz o desenvolvimento da sensibilização comportamental (BLOISE et al., 2007; BRAGA et al., 2009a; BRAGA et al., 2009b) e estão de acordo com outros dados da literatura científica utilizando outros psicoestimulantes (CAREY e GUI, 1998; HOPE et al. 2006; MARIN et al., 2009) que mostraram que a administração de um psicoestimulante em doses diárias e constantes produz o aumento da locomoção, levando ao desenvolvimento da sensibilização comportamental.

Quanto à ativação da ERK, os resultados mostraram que houve o aumento do número de núcleos imunorreativos de ERK-P induzida pela APO nas estruturas estudadas, em relação aos animais que receberam veículo. Assim, no córtex pré-frontal, núcleo accumbens, amígdala e hipotálamo lateral foi observado o aumento da ativação de ERK induzida pela apomorfina. O córtex pré-frontal apresentou maior número de núcleos imunorreativos de ERK-P no grupo apomorfina em relação às demais estruturas cerebrais. A ativação da ERK induzida pela apomorfina no núcleo accumbens não se diferenciou daquela produzida no hipotálamo lateral. A ativação da ERK na amígdala foi menor do que as demais estruturas, assim como a ativação da ERK no grupo veículo da amígdala foi menor em relação ao grupo veículo das demais estruturas cerebrais.

O desenvolvimento da sensibilização comportamental influenciou a ativação da ERK no córtex pré-frontal e na amígdala. Este processo produziu o aumento significativo do número de núcleos imunorreativos de ERK-P no córtex pré-frontal em relação ao tratamento agudo na arena (experimento 2). As interações entre o sistema dopaminérgico e as projeções frontais do cérebro, especialmente o córtex pré-frontal, são importantes para o processamento da memória, aprendizado e reconhecimento de objetos (CHAO et al, 2013; GLICKSTEIN et al., 2005; DARDENNE et al., 2012). Outras drogas, tais como a cocaína, a anfetamina e a nicotina, também são conhecidas por aumentarem a dopamina no CPF (DICHIARA e BASSAREO, 2007; OLIVEIRA, 2010). As respostas celulares nas subáreas do córtex pré-frontal, que recebem estímulos específicos do NAc, sugerem um papel específico das interações cortico-estriatais nas respostas comportamentais a psicoestimulantes (VANDERSCHUREN et al., 2008), ou

seja, a interação córtex-accumbens é um fator importante na ativação dopaminérgica. A região frontal do córtex estaria mais relacionada à procura por drogas do que a porção dorsal, o que poderia ser atribuído a sua ligação ao núcleo accumbens (KOYA et al., 2009).

Assim, os resultados do presente trabalho reforçam a funcionalidade das conexões entre o córtex pré-frontal e o núcleo accumbens. Os resultados para o núcleo accumbens mostraram que o processo de sensibilização comportamental produziu a ativação da ERK, embora não tenha ocorrido aumento da ativação nessa estrutura em relação ao tratamento agudo na arena (experimento 2). Uma possível explicação para isso é que o núcleo accumbens é uma região conhecida por ser um substrato neural para a expressão da sensibilização comportamental induzida por drogas e contribui para o desenvolvimento de neuroplasticidade (ROBINSON e BERRIDGE, 1993; CADOR et al., 1995; PIERCE e KALIVAS, 1995). Outros estudos mostraram que a administração crônica de cocaína 20 mg/kg produziu ativação da ERK nos neurônios do núcleo accumbens (VALJENT et al., 2006; MATTSON et al., 2005). Vanderschuren e colaboradores (2008) mostraram que o desenvolvimento da sensibilização induzida por anfetamina 1 mg/kg produziu aumento dos núcleos imunorreativos a *c-fos* no núcleo accumbens core.

A amígdala está envolvida com o ambiente, memórias afetivas e adaptações do organismo aos estímulos de perigo ou ameaça (RADEMACHER et al., 2010; FEINSTEIN et al., 2013; CARDINAL et al., 2002). No desenvolvimento da sensibilização comportamental (experimento 3), os resultados da imunistoquímica de ERK-P na amígdala mostraram que o processo de sensibilização induzido pela apomorfina levou a ativação de ERK, porém o número de núcleos imunorreativos a ERK-P foram inferiores ao tratamento agudo na arena (experimento 2). Uma possível explicação para isso é que o ambiente tenha desenvolvido uma resposta adaptativa aos efeitos da droga na amígdala (FEINSTEIN et al., 2013). Em outras palavras, a adaptação ao novo ambiente no decorrer dos dias de desenvolvimento da sensibilização recrutou menos a ativação da amígdala. Outra explicação é que a amígdala esteja mais relacionada aos processos de expressão da sensibilização ou de recaída do que propriamente com o desenvolvimento da sensibilização comportamental (LU et al., 2005). Assim, é possível

que esta estrutura seja ativada nos testes de expressão da sensibilização. Corroborando essa ideia, Koya e colaboradores (2009) verificaram que a exposição às pistas relacionadas à cocaína aumentou a fosforilação de ERK na amígdala central somente após 30 dias de retirada da droga, o que não ocorreu após o primeiro dia.

Quanto à ativação da ERK no hipotálamo lateral, os resultados do experimento 3 não se diferenciaram do experimento 2, ou seja, não ocorreu diferença quanto ao número de núcleos imunorreativos de ERK-P. O papel do hipotálamo lateral no processo de sensibilização comportamental ainda foi pouco explorado, embora seja uma área cerebral envolvida na recompensa (HARRIS et al., 2005). Quanto à ativação da ERK, os resultados do tratamento agudo na arena experimental (experimento 2) não se diferenciaram dos resultados do desenvolvimento da sensibilização comportamental (experimento 3), sugerindo que o processo de sensibilização comportamental não teve efeito sobre a ativação da ERK-P para essa estrutura. Também se pode atribuir esses resultados ao fato de que as alterações no HL estejam mais relacionadas aos processos de expressão da sensibilização, após a retirada da droga. Segundo Harris e colaboradores (2005), somente animais condicionados com morfina ou cocaína apresentaram aumento significativo de Fos no hipotálamo lateral em relação aos animais não condicionados. Portanto, a estimulação do HL pode levar ao comportamento de procura e consequente recaída.

Assim, os resultados mostraram que a ERK participa tanto nos efeitos agudos locomotores da APO quanto no desenvolvimento da sensibilização locomotora. Os resultados do experimento 3 estendem a importância da via mesolímbica no desenvolvimento da sensibilização comportamental induzida pela apomorfina e sugerem que dentre as estruturas estudadas, o córtex pré-frontal e amígdala tenham grande importância. No entanto, estudos futuros são necessários para avaliar a influência dos processos de expressão da sensibilização sobre a ativação da ERK-P induzida pela apomorfina nessas estruturas cerebrais.



## 9. CONCLUSÃO

- As administrações aguda e crônica de apomorfina (2,0 mg/kg) produziram ativação de ERK-P no córtex pré-frontal, núcleo accumbens, amígdala e hipotálamo lateral.
- Quanto à curva temporal, o tempo de 15 minutos foi considerado o pico de ativação de ERK-P induzida pela apomorfina (2,0 mg/kg) no córtex pré-frontal, núcleo accumbens e hipotálamo lateral.
- A administração de APO só produziu ativação da ERK na amígdala quando o efeito foi em um ambiente diferente da caixa-viveiro.
- A sensibilização comportamental induzida pela APO produziu um aumento da ativação da ERK no córtex pré-frontal e redução na amígdala.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. P.; SWEATT, J. D. Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 42, p. 63-135, 2002.
- ADOLPHS, R. et al. Impaired recognition of emotion in facial expressions following bilateral damage to the human amygdala. **Nature**, v. 372, p. 72-669, 1994.
- AGUILAR, M. A. et al. Neurobiological mechanisms of the reinstatement of drug-conditioned place preference. **Brain Research Review**, v. 59, p. 253-277, 2009.
- ALEXANDER, G. E. et al. Basal Ganglia-thalamo-cortical circuits-parallel substrates for motor, oculomotor, prefrontal and limbic functions. **Progress in Brain Research**, v. 85, p. 46-119, 1990.
- ALIAGA, J. C. et al. Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. **American Physiological Society**, v. 277, n. 3, p. 631- 641, 1999.
- ANAGNOSTARAS, S. G.; ROBINSON, T. E. Sensitization to the psychomotor stimulant effects of amphetamine: modulation by associative learning. **Behavioral Neuroscience**, v. 110, p. 1397-1414, 1996.
- ASTON-JONES, G. et al. Role of lateral hypothalamic orexin neurons in reward processing and addiction. **Neuropharmacology**, v. 56, 112–121, 2009.
- ATKINS, C. M. et al. The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. **Nature Neuroscience**, v. 1, 1998.
- BADIANI, A. et al. Influence of novel versus home environments to the stimulant effects of cocaine and amphetamine. **Brain Research**, p. 291-298, 1995.
- BALLEINE, B.; DICKINSON, A. The role of Learning in the Operation of Motivational Systems. In: Steven´s handbook of experimental psychology: Learning Motivation and Emotion, v. 3, p. 497-534, 2002.
- BASSAREO, V.; DI CHIARA, G. Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens Shell/core compartments. **Neuroscience**, v. 89, p. 41-637, 1999.
- BECHARA, A. et al. Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humans. **Science**, v. 26, p. 8-1115, 1995.

BEDINGFIELD, J. B. et al. The role of the striatum in the mouse in behavioral sensitization to amphetamine. **Pharmacology Biochemistry and Behavioral**, v.56, p. 305-310, 1996.

BERENDSE, H. W. et al. Topographical organization and relationship with ventral striatal compartments of prefrontal corticostriatal projections in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 316, p. 47-314, 1992.

BERHOW, M. T. et al. Regulation of ERK (Extracellular Signal Regulated Kinase), Part of the neurotrophin Signal Transduction Cascade, in the Rat Mesolimbic Dopamine System by Chronic Exposure to Morphine or Cocaine. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, p. 4707–4715, 1996.

BERKE, J. D.; HYMAN, S. E. Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. **Neuron**, v. 25, p. 515–532, 2000.

BERRIDGE, K. C.; ROBINSON, T. E. What's the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? **Brain Research Reviews**, v. 28, p. 309–369, 1998.

BLANCHARD, D. C. et al. Risk assessment as an evolved threat detection and analysis process. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, p. 991–998, 2011.

BLOISE, E. et al. Behavioral sensitization produced by a single administration of apomorphine: implications for the role of Pavlovian conditioning in the mediation of context-specific sensitization. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, p. 57-449, 2007.

BRAGA, P. Q. et al. The expression of locomotor sensitization to apomorphine is dependent on time interval between injection and testing. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, p. 278-282, 2009a.

BRAGA, P. Q. et al. Low dose apomorphine induces context-specific sensitization of hypolocomotion without conditioning: support for a new state dependent retrieval hypothesis of drug conditioning and sensitization. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, p. 33-128, 2009b.

BRANDÃO, M. L. **Sistema nervoso central**. In: GRAEFF, F. G.; BRANDÃO, M. L. *Neurobiologia das doenças mentais*. 2ª ed. Lemos editorial e gráficos Ltda, p. 31-50. 1993.

CADOR, M. et al. Evidence of a complete independence of the neurobiological substrates for the induction and expression of behavioral sensitization to amphetamine. **Neuroscience**, v. 65, p. 385-395, 1995.

CARDINAL, R. N. et al. Emotion and motivation: the role of the amygdale, ventral striatum and prefrontal cortex. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, p. 321-352, 2002.

CAREY, R. J.; GUI, J. Cocaine conditioning and cocaine sensitization: what is the relationship? **Behavioural Brain Research**, v. 92, p.67–76, 1998.

CARLEZON, W. A.; NESTLER, E. Elevated levels of GluR1 in the midbrain: a trigger for sensitization to drugs abuse? **Trends neuroscience**, v.13, p. 610-615, 2002.

CARLINI, E. A. **II Levantamento domiciliar sobre uso de drogas psicotrópicas no Brasil**: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país – 2005. São Paulo: CEBRID, 2006.

CARRERA, M. P. et al. Drug conditioning induced by intrastriatal apomorphine administration. **Brain Research**, v. 790, p. 60-66, 1998.

CEBRID. O que é dependência? Disponível em: [http:// www.unifesp.br/dpsicobio/quest\\_drogas/dependência.htm](http://www.unifesp.br/dpsicobio/quest_drogas/dependencia.htm). Acesso em 26 abril 2013.

CERBONE, A.; SADILE, A.G. Behavioral habituation to spatial novelty: interference and noninterference studies. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**., v. 18, p.497–518, 1994.

CHAO, O. Y. H. et al. The interaction between the dopaminergic forebrain projections and the medial prefrontal cortex is critical for memory of objects: Implications for Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 247, p. 373–382, 2013.

CHERRIER, K. B. et al. Parsing molecular and behavioral effects of cocaine in mitogen- and stress-activated protein kinase-1-deficient mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 11444–11454, 2005.

CID-10. Dependência e Personalidade. Disponível em: <http://www.psiqweb.med.br/site/?area=NO/LerNoticia&idNoticia=224>. Acesso em 26 abril 2013.

CIVELLI, O. et al. Molecular diversity of the dopamine receptors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 32, p. 281–307, 1993.

COOPER, J. et al. **The biochemical basis of neuropharmacology**. Oxford University Press, New York, 2003.

CROMBAG, H. S. et al. The ability of environmental context to facilitate psychomotor sensitization to amphetamine can be dissociated from its effect on acute drug responsiveness and on conditioned responding. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, p. 680-689, 2001.

DARDENNE, K. et al. Role of prefrontal cortex and the midbrain dopamine system in working memory updating. **PNAS**, v. 109, n. 49, 2012.

DE MATTOS, L. W. Estudo das diferenças individuais espontâneas e a sua relação com o processo de sensibilização comportamental induzido por apomorfina em ratos. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, p. 01-44, 2007.

DEAK M. et al. Mitogen and stress activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. **The EMBO Journal**, v. 17, p. 4426-4441, 1998.

DIAS, F. R. C. et al. Conditioned locomotion induced by unilateral intrastriatal administration of apomorphine: D(2) receptor activation is critical but not the expression of the unconditioned response. **Brain Research**, p. 85-95, 2006.

DICHIARA, G. Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. **Behavioural Brain Research**, v. 137, p. 75-114, 2002.

DICHIARA, G.; IMPERATO, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, 1988.

DIOLEONE, R. J. et al. Lateral hypothalamic neuropeptides in reward and drug addiction. **Life Sciences**, v. 73, p. 759–768, 2003.

EVERITT, B. J. et al. Associative Process in Addiction and Reward: the Role of Amygdala-ventral Striatal Subsystems. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.38, p. 412-877, 1999.

EVERITT, B. J. et al. Differential involvement of amygdala subsystems in appetitive conditioning and drug addiction. *The amygdala: a functional analysis*, Oxford University Press, 2000.

FEINSTEIN, J. S. et al. Fear and panic in humans with bilateral amygdala damage. **Nature Neuroscience**, v. 16, n.3, p. 270–272, 2013.

FILIPKOWSKI, R. K. et al. Expression of c-fos, fos B, jun B and zif 268 transcription factor proteins in rat barrel cortex following apomorphine-evoked whisking behavior. **Neuroscience**, v. 106, n. 4, p. 679-688, 2001.

FRAIOLI, S. et al. Susceptibility to amphetamine-induced locomotor sensitization is modulated by environmental stimuli. **Neuropsychopharmacology**, v. 20, p. 533-541, 1999.

FRODIN M. et al. Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. **Molecular and Cell Endocrinology**, v. 151, p. 65-77, 1999.

GARCIA-MIJARES, M.; SILVA, M. T. A. Dependência de drogas. **Psicologia USP**, v.17, p.213-240, 2006.

GINGRICH, J. A. et al. Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. **Annual Review of Neuroscience**. v. 16, p. 299–321, 1993.

GIRAULT, J. et al. ERK2: a logical AND gate critical for drug-induced plasticity? **Current opinion in pharmacology**, v. 7, p. 77-85, 2006.

GLICKSTEIN, D. A. et al. Mice Lacking Dopamine D2 and D3 Receptors Exhibit Differential Activation of Prefrontal Cortical Neurons during Tasks Requiring Attention. **Cerebral Cortex**,v.15, 2005.

GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Mc Graw Hill: Rio de Janeiro, 11 ed, 2006.

GRANT, S. et al. Activation of memory circuits during cue-elicited cocaine craving. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 12040-12045, 1996.

HAGHPAST, A. et al. Changes in phosphorylation of CREB, ERK, and c-fos induction in rat ventral tegmental area, hippocampus and prefrontal cortex after conditioned place preference induced by chemical stimulation of lateral hypothalamus. **Behavioral Brain Research**, v. 220, p. 112–118, 2011.

HARRIS, G. C. et al. A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. **Nature**, v. 473, p. 556-559, 2005.

HERSKOWITZ, I. MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. **Cell**, v. 80, p. 187-197, 1995.

HITCHCOTT, P. K.; PHILLIPS, G. D. Double dissociation of the behavioral effects of R(+) 7-OH-DPAT infusions in the central and basolateral amygdala nuclei upon Pavlovian and instrumental conditioned appetitive behaviours. **Psychopharmacology**, v. 140, p. 69-458, 1998.

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

HYMAN, S. E. et al. Neural Mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. **The annual review of neuroscience**, v. 29, 2006.

IKRAM, H. et al. Effects of apomorphine on locomotive activity and monoamine metabolism: a dose related study. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, p. 315-321, 2011.

ITO, R. et al. Differential control over cocaine-seeking behavior by nucleus accumbens core and shell. **Nature Neuroscience**, v. 7, p. 97-389, 2004.

ITO, R. et al. Dissociation in conditioned dopamine release in the nucleus accumbens core and shell in response to cocaine cues and during cocaine-seeking behavior in rats. **Journal Neuroscience**, v. 20, p. 95-7489, 2000.

JACKSON, D. M., et al. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioral aspects. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 64, p. 291–369, 1994.

JENAB, S. et al. Cocaine induction of ERK proteins in dorsal striatum of Fisher rats. **Molecular Brain Research**, v. 142, p. 134-138, 2005.

JOHNSON, G. L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science**, v. 298, p. 1911-1912, 2002.

KALIVAS, P. W.; DUFFY, P. Similar effects of daily cocaine and stress on mesocorticolimbic dopamine neurotransmission in the rat. **Biological Psychiatry**, v. 25, p. 913-928, 1989.

KALIVAS, P. W.; MCFARLAND, K. Brain Circuit and the reinstatement of cocaine-seeking behavior. **Psychopharmacology**, v. 168, p. 44-56, 2003.

KALIVAS, P. W.; VOLKOW, N. D. The Neural Basis of Addiction: A Pathology of Motivation and Choice. **American Journal of Psychiatry**, 2005.

KARILA, L. et al. New treatments for cocaine dependence: a focused review. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v.11, p. 425-438, 2008.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia: Básica & Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 9 ed., 2005.

KIM, S. et al. Blockade of ERK phosphorylation in the nucleus accumbens inhibits the expression of cocaine-induced behavioral sensitization in rats. **Korean Journal Physiology Pharmacology**, v.15, p. 389-395, 2011.

KOOB, G. F. et al. Neuroscience of addiction. **Neuron** v. 21, p. 467–476, 1998.

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

- KOYA, E. et al. Role of ventral medial prefrontal cortex in incubation of cocaine craving. **Neuropharmacology**, v.56, p. 177–185, 2009.
- KRUZICH, P. J.; SEE, R. E. Differential Contributions of the Basolateral and Central Amygdala in the Acquisition and Expression of Conditioned Relapse to Cocaine-Seeking Behavior. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, 2001.
- LEVIN, E. D. et al. Acute and chronic nicotinic interaction with dopamine systems and working memory performance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 757, p. 245–252, 1995.
- LEWITT, P.A. Subcutaneously administered apomorphine pharmacokinetics and metabolism. **Neurology**, v. 62, p. 8-11, 1984.
- LI, A. et al. Apomorphine-induced activation of dopamine receptors modulates FGF-2 expression in astrocytic cultures and promotes survival of dopaminergic neurons. **The FASEB Journal**. Disponível em: <<http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.05-5510fje>>. Acesso em 11 maio 2012.
- LI, T. et al. Cue-elicited drug craving represses ERK activation in mice prefrontal association cortex. **Neuroscience Letters**, v. 448, p. 99–104, 2008.
- LU, L. et al. Central amygdala ERK signaling pathway is critical to incubation of cocaine craving. **Nature Neuroscience**, v. 8, p. 212-219, 2005.
- LU, L. et al. Role of ERK in cocaine addiction. **TRENDS in neurosciences**, v. 29, n. 12, 2006.
- MARIN, M. T. et al. Context-specific modulation of cocaine-induced locomotor sensitization and ERK and CREB phosphorylation in rat nucleus accumbens. **Europe Journal of Neuroscience**, p.1931–1940, 2009.
- MATTIGLY, B. A.; GOTSICK, C. M. Locomotor activity and stereotypy in rats following repeated apomorphine treatments at 1-, 3-, or 7- day intervals. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 31, p. 871-875, 1988.
- MATTINGLY, B. A. et al. Effects of selective D1 and D2 dopamine antagonists on the development of behavioral sensitization to apomorphine. **Psychopharmacology**, v.105, p. 501-507, 1991.
- MATTSON, B. J. et al. Context-specific sensitization of cocaine-induced locomotor activity and associated neuronal ensembles in rat nucleus accumbens. **Europe Journal of Neuroscience**, v. 27, p. 201-212, 2008.



MISERENDINO, M. J.; NESTLER, E. J. Behavioral sensitization to cocaine: modulation by the cyclic AMP system in the nucleus accumbens. **Brain Research**, v. 674, p. 299-306, 1995.

MISSALE, C. et al. Dopamine Receptors: from structure to function. **Physiological Reviews**, v.78, p. 189-225.

MOLLER, H. G. et al. Studies on interactions between conditioned and unconditioned behavioral responses to apomorphine in rats. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 335, p. 673-679, 1987.

MORGAN, M. A.; LEDOUX, J. E. Contribution of Ventrolateral Prefrontal Cortex to the Acquisition and Extinction of Conditioned Fear in Rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 72, p. 244-251, 1999.

NESTLER, E. J. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. **Nature Review Neuroscience**, v. 2, p. 119-128, 2001.

O'BRIEN, C. P. Drug addiction and abuse. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (ed.). Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11<sup>th</sup> ed. New York: Pergamon, p. 621-642, 2006.

OLIVEIRA, P. E. N. **Sensibilização cruzada entre anfetamina e nicotina: avaliação neuroquímica do núcleo acumbens e córtex préfrontal em ratos adolescentes e adultos.** Disponível em:

[http://biblioteca.universia.net/html\\_bura/ficha/params/title/sensibiliza%C3%A7%C3%A3o-cruzada-anfetamina-nicotina-avalia%C3%A7%C3%A3o-neuroquimica-do-nucleo-acumbens-cortex/id/49864441.html](http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/title/sensibiliza%C3%A7%C3%A3o-cruzada-anfetamina-nicotina-avalia%C3%A7%C3%A3o-neuroquimica-do-nucleo-acumbens-cortex/id/49864441.html). Acesso em 01 out. 2013.

ONGUR, D.; PRICE, J. L. The Organization of Networks within the Orbital and Medial prefrontal Cortex in Rats, Monkeys and Humans. **Cerebral Cortex**, v. 10, p. 206-219, 2000.

PARKINSON, J. A. et al. Disconnection of the anterior cingulate cortex and nucleus accumbens core impairs Pavlovian approach behavior: further evidence for limbic cortical-ventral striatopallidal systems. **Behavioral Neuroscience**, v. 114, p. 42-63, 2000.

PAXINOS G., WATSON C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Sidney: Academic Press, 2004.

PIERCE, R. C.; KALIVAS, P. W. Amphetamine produces sensitized increases in locomotion and extracellular dopamine preferentially in the nucleus accumbens shell of rats administered repeated cocaine. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 275, p. 1019-1029, 1995.

RADEMACHER, D. J. et al. Amphetamine-Associated Contextual Learning is Accompanied by Structural and Functional Plasticity in the Basolateral Amygdala. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 13, p. 4676–4686, 2010.

RADWANSKA, K. et al. Extracellular signal-regulated kinases (ERK's) modulate cocaine-induced gene expression on the mouse amygdala. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 939-948, 2005.

RANG, H. P., et al. O Sistema Nervoso Central. IN: **Farmacologia**. Ed.Guanabara Koogan. 4<sup>a</sup> ed. Caps. 31,34,39, 2001.

RIBARIC, S. The Pharmacological Properties and Therapeutic Use of Apomorphine. **Molecules**, v. 17, 2012.

ROBBINS, T. W. e EVERITT, B. J. Functions of dopamine in the dorsal and ventral striatum. **Seminars in Neuroscience**, v. 4, p. 27-119, 1992.

ROBERTSON, G. S. et al. D1 and D2 dopamine receptors increase Fos-like immunoreactivity in accumbal projections to the ventral pallidum and midbrain. **Neuroscience** v. 64, p. 1019–1034, 1995.

ROBINSON T. E. et al. Modulation of the induction or expression of psychostimulant sensitization by the circumstances surrounding drug administration. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 22, p. 347-54, 1998.

ROBINSON, T. E.; BECKER, J. B. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. **Brain Research Reviews**, v. 11, p. 157-189, 1986.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The neural basis of drug craving: an incentive sensitization theory of addiction. **Brain Research Reviews**, v. 18, p. 247-291, 1993.

SAKURAI, T. et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. **Cell**, v. 92, p. 573–585, 1998.

SALZMANN, J. et al. Importance of ERK activation in behavioral and biochemical effects induced by MDMA in mice. **British Journal of Pharmacology**, p. 831–838, 2003.

SANCHIS-SEGURA, C.; SPANAGEL, R. Behavioral assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. **Addiction Biology**, v. 11, p. 2-38, 2006.

SCHOENBAUM, G. et al. Neural encoding in orbitofrontal cortex and basolateral amygdala during olfactory discrimination learning. **Journal Neuroscience**, v. 19, p. 84-1876, 1999.

SHIFLETT, M. W.; BALLEINE, B. W. Contributions of ERK signaling in the striatum to instrumental learning and performance. **Behavioral Brain Research**, v. 218, p. 240-427, 2011.

SPANO, P. F., et al. Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system. **Advances in Biochemical Psychopharmacology**, v. 19, p. 155–165, 1978.

STEKETEE, J. D; KALIVAS, P. W. Drug-wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. **Pharmacology Review**, v. 63, p. 348-365, 2011.

SWANSON, C. J. et al. Differential behavioral responses to dopaminergic stimulation of nucleus accumbens subregions in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 58, p. 45-933, 1997.

SWEATT, J. Mitogen-activated protein kinase in synaptic plasticity and memory. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 14, p. 311-317, 2004.

TODTENKOPF, M. S. et al. Differential distribution of parvalbumin immunoreactive neurons in the striatum of cocaine sensitized rats. **Neuroscience**, v.127, p. 35-42, 2004.

TODTENKOPF, M. S. et al. The dorsomedial shell of nucleus accumbens facilitates cocaine induced locomotor activity during of behavioral sensitization. **Behavioral Brain Research**, v. 131, p. 9-16, 2002.

TODTENKOPF, M. S.; CARLEZON, W. A. Contribution of drug doses and conditioning periods to psychomotor stimulant sensitization. **Psychopharmacology**, v. 185, p. 451-458, 2006.

VALJENT, E. et al. 9-tetrahydrocannabinol-induced MAPK/ ERK and Elk-1 activation *in vivo* depends on dopaminergic transmission. **European Journal of Neuroscience**, v. 14, p. 342-352, 2001.

VALJENT, E. et al. Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 1826-1836, 2004b.

VALJENT, E. et al. Involvement of the Extracellular Signal-regulated Kinase Cascade for Cocaine-Rewarding Properties. **The Journal of Neuroscience**, p. 8701–8709, 2000.

VALJENT, E. et al. Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. **The National Academy of Sciences of the USA**, v.102, p. 491–496, 2004a.

VALJENT, E. et al. Role of the ERK pathway in psychostimulant-induced locomotor sensitization. **BMC Neuroscience**, 2006.

VANDERSCHUREN, N. R. E. et al. Expression of amphetamine sensitization is associated with recruitment of a reactive neuronal population in the nucleus accumbens core. **Psychopharmacology**, v. 198, n. 1, p. 113-26, 2008.

VEZINA, P. D1 Dopamine receptor activation is necessary for the induction of sensitization by amphetamine in the ventral tegmental area. **Journal Neuroscience**, v. 16, p. 2411-2420, 1996.

VEZINA, P. Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity and the self-administration of psychomotor stimulant drugs. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v. 27, p. 827-839, 2004.

VOLKOW, N. D., et al. Addiction: Beyond dopamine reward circuitry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 37, 2011.

WISE, R. A. The role of reward pathways in the development of drug dependence. **Pharmacotherapy**, v. 35, p. 227-263, 1987.

WOLF, M. E. Addiction: making the connection between behavioral changes and neuronal plasticity in specific pathways. **Molecular Interventions**, v. 2, p. 146-157, 2002.

WOLF, M. E. et al. Psychomotor stimulants and neuronal plasticity. **Neuropharmacology**, v. 47, p. 61–79, 2004.

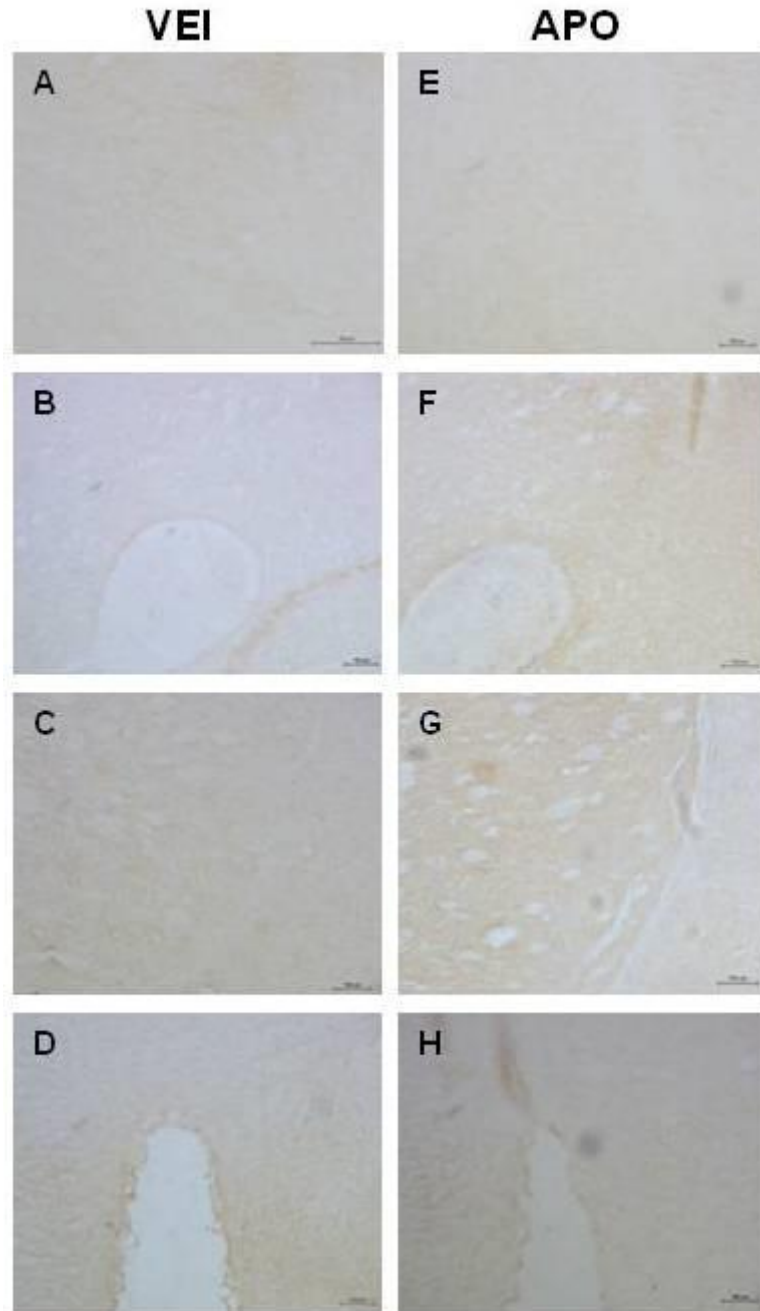
YAN, Z. et al. D2 dopamine receptors induce mitogen-activated protein kinase and cAMP response element-binding protein phosphorylation in neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 11607-11612, 1999.

YOUNG, A. W. et al. Face processing impairments after amygdalotomy. **Brain**, v. 118, p. 15-24, 1995.

ZAHM, D. S.; BROG, J. S. On the significance of subterritories in the accumbens part of the rat ventral striatum. **Neuroscience**, v. 50, p. 67-751, 1992.

ZHOU, Y. et al. Cocaine place conditioning increases pro-opiomelanocortin gene expression in rat hypothalamus. **Neuroscience Letters**, v. 530, p. 59– 63, 2012.

**ANEXO**  
**REPRESENTAÇÃO FOTOMICROGRÁFICA DAS ESTRUTURAS CEREBRAIS DO**  
**CONTROLE NEGATIVO.**



Representação das imagens da imunistoquímica do controle negativo após a administração veículo ou apomorfina. (A), (B), (C) e (D) Imagens do CPF, NAc, AMG e HL após administração do veículo, respectivamente. (E), (F), (G) e (H) Imagens do CPF, NAc, AMG e HL após a administração da apomorfina, respectivamente.