

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**VALIDAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE TRANSCRITOS NO CÓRTEX  
PRÉ-FRONTAL EM MODELO ANIMAL DE CONSUMO DE ETANOL**

INCIPIT VITA NOVA

ORIENTADA: Carolina de Paiva Lima

ORIENTADORA: Dra. Ana Lúcia Brunialti Godard

BELO HORIZONTE

Janeiro de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

**Validação de genes diferencialmente transcritos no córtex pré-  
frontal em modelo animal de consumo de etanol**

**Carolina de Paiva Lima**

Dissertação submetida ao programa de Pós-graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Dra. Ana Lúcia Brunialti Godard

Área de concentração: Genética Molecular, de Microrganismos e Biotecnologia.



**Pós-Graduação em Genética**  
**Departamento de Biologia Geral, ICB**  
**Universidade Federal de Minas Gerais**  
Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG  
e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570



**"Validação de genes diferencialmente transcritos no córtex pré-frontal  
em modelo animal de consumo de etanol."**

**Carolina de Paiva Lima**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Dra. Ana Lucia Brunialti Godard - Orientadora  
(UFMG)

Dr. Bruno Rezende de Souza  
(UFMG)

Dr. Renan Pedra de Souza  
(UFMG)

Belo Horizonte, 25 de janeiro de 2016.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à Deus por me dar forças para superar as dificuldades, me abençoar e guiar a minha vida.

À minha orientadora, Dra. Ana Lúcia Brunialti Godard, por ter aberto as portas do Laboratório de Genética Animal e Humana (LGAH) para mim. Obrigada pela oportunidade, correções e ensinamentos na realização deste trabalho.

À Ma. Samara Damasceno pela ajuda nas dúvidas e pelos ensinamentos de bancada.

À todos os integrantes do LGAH, Ágatha, Daniel, Diego, Isabella, Keila, Luana, Renato, Samara, Taciani e Yan, pelas conversas, conselhos, risadas e por tornarem o meu ambiente de trabalho, um lugar tranquilo e prazeroso.

À todos os professores que me proporcionaram conhecimento durante o processo de formação profissional.

À minha mãe, Lidyé, por sempre me apoiar nas horas difíceis, acreditar que eu sou capaz e me dar forças para continuar correndo atrás dos meus objetivos; à minha avó, Marilda, por ser meu alicerce e meu porto seguro; à toda a minha família que sempre esteve me incentivando.

Ao Be que esteve ao meu lado durante toda essa trajetória, me alegrando e me dando forças nas horas em que tive desânimo, cansaço e vontade de desistir. Obrigado por ser tão paciente comigo.

À todos os meus amigos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação e que torceram pelo sucesso deste trabalho. Com certeza, irão continuar presentes na minha vida.

**“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita”**

(Mahatma Gandhi)

# SUMÁRIO

|   |      |
|---|------|
| Lista de figuras .....  | viii |
| Lista de tabelas .....  | ix   |
| Lista de abreviaturas .....                                   | x    |
| Resumo .....  | xiii |
| Abstract .....  | xiv  |
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 15   |
| 1.1 Etanol .....  | 15   |
| 1.2 Mecanismos neurobiológicos da adição .....                | 17   |
| 1.2.1 Córtex pré-frontal e adição .....                       | 21   |
| 1.3 Estudo genético do alcoolismo .....                       | 22   |
| 1.4 Modelo animal de dependência alcoólica .....              | 25   |
| 1.4.1 O modelo de livre escolha .....                         | 26   |
| 1.5 Justificativa e relevância da realização do projeto ..... | 30   |
| 2. OBJETIVOS .....  | 31   |
| 2.1 Geral .....   | 31   |
| 2.2 Específicos .....   | 31   |
| 3. METODOLOGIA .....  | 32   |
| 3.1 Animais .....   | 32   |
| 3.2 Procedimentos para análise molecular .....                | 32   |
| 3.2.1 Extração de RNA total .....                             | 32   |
| 3.2.2 Desenho dos iniciadores ( <i>primers</i> ) .....        | 33   |

|   |    |
|---|----|
| 3.2.3 Síntese de cDNA .....                               | 33 |
| 3.2.4 PCR quantitativa em tempo real (qPCR) .....         | 34 |
| 3.3 Análise estatística .....                             | 35 |
| 4. RESULTADOS .....                                       | 36 |
| 4.1 Desenho da sequência dos iniciadores .....            | 36 |
| 4.2 Quantificação relativa dos transcritos por qPCR ..... | 37 |
| 4.3 Análise de correlação .....                           | 39 |
| 5. DISCUSSÃO .....  | 45 |
| 6. CONCLUSÕES .....                                       | 52 |
| REFERÊNCIAS .....   | 53 |
| ANEXOS .....  | 62 |

## Lista de figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Esquema simplificado das ações das drogas de abuso na via VTA-NAc .....   | 18 |
| Figura 2. Esquema da interação entre os circuitos neurais envolvidos nos três estágios da adição .....  | 19 |
| Figura 3. Vias metabólicas do etanol .....  | 22 |
| Figura 4. Desenho experimental para avaliar a perda de controle sobre o consumo de etanol .....   | 26 |
| Figura 5. Quantidade relativa de mRNA dos genes com diferença estatística significativa no córtex pré-frontal dos grupos experimentais expressas como média e erro padrão ..... | 37 |
| Figura 6. Diagrama de dispersão dos dados da quantidade de mRNA em unidades arbitrárias de dois genes, independente do fenótipo e dentro dos grupos .....                       | 39 |



## Lista de tabelas

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1. Critérios para diagnóstico de desordem do uso do álcool .....  | 15 |
| Tabela 2. Genes selecionados e a ontologia genética das proteínas, que engloba função molecular, processo biológico e componente celular ..... | 28 |
| Tabela 3. Sequências dos iniciadores utilizados na validação por PCR quantitativa em tempo real .....  | 35 |
| Tabela 4. Correlação dos genes diferencialmente transcritos entre os grupos no córtex pré-frontal resultantes da técnica de qPCR .....         | 41 |

## Lista de abreviaturas

**5-HTR** – *5-hydroxytryptamine receptor*

**5-HTT** – *5-hydroxytryptamine transporter*

**Actb** – *β-actina*

**ADH** – *Alcohol dehydrogenase*

**ALDH** – *Aldehyde dehydrogenase*

**AMPA** - *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*

**ANKK1** - *Ankyrin repeat and kinase domain containing-1*

**Arntl** - *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like*

**AUD** – *Alcohol Use Disorder*

**BEC** – *Blood Ethanol Concentration*

**BLA** – *Amígdala Basolateral*

**BNST** – *Núcleo da Estria Terminal*

**CaMKII** – *Proteína quinase II dependente de cálcio/calmodulina*

**Camk2n1** - *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1*

**CeA** – *Núcleo Central da Amígdala*

**CHRM** – *Cholinergic receptor, muscarinic*

**CHRNA** – *Cholinergic receptor, nicotinic*

**Clic6** - *Chloride intracellular channel 6*

**CLOCK** - *Circadian locomotor output cycles kaput*

**COMT** – *Catecol-O-metiltransferase*

**CRF** – *Corticotropin Release Factor*

**Ct** – *Threshold cycle*

**DβH** – *Dopamina-β-hidroxilase*

**DA** – *Dopamina*

**DAT1** – *Dopamine transporter 1*

**Dcx** - *Doublecortin*

**DGP** – *Globo Pálido Dorsal*

**Drd1** – *Dopamine receptor D1*

***Drd2*** – Dopamine receptor D2

**DRD4** – Dopamine receptor D4

**EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético

**FC** – *FoldChange*

**FI** – Filamento intermediário

**GABA** – Ácido gama-aminobutírico

**GABRA** – *Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha*

**GABRB** – *Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit beta*

**GABRG** – *Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit gamma*

***Gapdh*** - *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

**GWAS** – *Genome-Wild Association Study*

**HPA** – Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

**MAO-A** – Monoamina oxidase A

**MBP** – *Myelin basic protein*

**mPFC** – Córtex Pré-Frontal medial

***Mobp*** - *Myelin-associated oligodendrocytic basic protein*

**mRNA** – RNA mensageiro

**NAc** – Núcleo Accumbens

**NE** – Norepinefrina

**NMDA** – N-metil-D-aspartato

**NMDAR** – *N-methyl-D-aspartate receptor*

**PCA** - *Principal Component Analysis*

***Pcdh20*** – *Protocadherin 20*

**PFC** – Córtex Pré-Frontal

***Pkp2*** – *Plakophilin 2*

**PP1** – Proteína fosfatase 1

***Prox1*** - *Prospero homeobox 1*

**qPCR** – PCR quantitativa em tempo real

**RankProd** – *RankProduct*

***Rem2*** - *Rad and gem related GTP binding protein 2*

**RNAi** – RNA de interferência

**ROR** - Receptor órfão relacionado ao retinóide

**SNc** – Substancia nigra

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**TAE** – Tris-Acetato-EDTA

**TCF/LEF** - *T cell factor/lymphoid enhancer factor*

**TM** – Temperatura de *melting*

**Ttr** - *transthyretin*

**UFMG** – Universidade Federal de Minas Gerais

**UFPR** – Universidade Federal do Paraná

**VGP** – Globo Pálido Ventral

**VNRT** – Variação no Número de Repetições em Tandem

**VTA** – Área Tegmental Ventral

## Resumo

A desordem no uso do etanol, substância psicoativa mais consumida em todo o mundo, é caracterizada por sintomas comportamentais e físicos que podem incluir abstinência, tolerância e fissura, além de ser um problema de saúde pública mundial. Esse transtorno é uma doença multifatorial com herdabilidade de aproximadamente 50% sem diferença qualitativa entre homens e mulheres. O objetivo desse trabalho foi identificar diferentes padrões de regulação transcricional relacionados ao fenótipo adicto no consumo de etanol em modelo animal de livre escolha. 80 camundongos *Swiss* machos adultos foram utilizados, na qual 60 animais tiveram acesso ao etanol e 20 animais controle tiveram acesso somente à água. O desenho experimental foi definido com uma semana de ambientação; dez semanas de livre escolha entre soluções de etanol e água; duas semanas de abstinência; duas semanas de reapresentação das soluções etílicas; e, por último, duas semanas de adulteração das soluções de etanol com quinino. Os animais foram fenotipicamente classificados como Leve (L), aqueles que tiveram preferência por água e baixo consumo de etanol; Pesado (P), aqueles que tiveram preferência por etanol com redução significativa no consumo durante a fase de adulteração; Adicto (A), aqueles que tiveram preferência constante pelo consumo de álcool durante todo o tratamento; e Controle (C), aqueles que tiveram acesso somente a água. A quantificação relativa dos genes foi realizada pela técnica de q-PCR em tempo real com N=20 animais (C=7; L=4; P=3; A=6) seguida pela análise estatística dos níveis de transcritos. Logo após, foi realizada a análise de correlação de *Pearson* entre os genes com diferença significativa entre os grupos. Dentre aqueles escolhidos para validação, os genes *Camk2n1* e *Pkp2* apresentaram um perfil hipo-regulado no grupo Controle comparado com o grupo Adicto; o gene *Drd2* mostrou um perfil hiper-regulado no grupo Adicto em relação ao grupo Leve; o gene *Prox1* apresentou um perfil hiper-regulado no grupo Pesado comparado com o grupo Controle; e o gene *Mobp* mostrou uma tendência a hipo-regulação no grupo Controle em relação aos demais grupos. Esses diferentes padrões de transcrição foram associados à presença do álcool, nos genes *Camk2n1* e *Mobp*; à perda de controle no consumo de etanol, nos genes *Pkp2* e *Drd2*; e à quantidade de solução etílica consumida, no gene *Prox1*. A maioria desses genes codificam proteínas de membrana que se ligam a íons e outras proteínas, participando de regulações, respostas a estímulos e processos metabólicos. Além disso, a análise de correlação de *Pearson* mostrou que os genes *Camk2n1-Pkp2* e *Drd2-Pkp2* possuem uma forte correlação positiva entre si. Com isso, podemos concluir que a ingestão crônica ao etanol está relacionada com alterações transcricionais no córtex pré-frontal nesse modelo animal e, pela primeira vez, demonstramos o possível envolvimento do gene *Pkp2* na perda de controle sobre o consumo de etanol.

## Abstract

The ethanol use disorder, the most consumed psychoactive substance in the world, is characterized by behavioral and physical symptoms that might include abstinence, tolerance and craving, besides being a worldwide public health problem. This disorder is a multifactorial illness with 50% heritability with no qualitative difference between men and women. The aim of this study was to identify different patterns of transcriptional regulation related to the addict phenotype in ethanol consumption in an animal model of free-choice. 80 Swiss male adult mice were used in which a group of 60 animals had access to ethanol and 20 control animals had access to water only. The experimental design was set with a week of ambience; ten weeks of free choice treatment between ethanol and water solutions; two weeks of abstinence; two weeks of ethylic solutions restatement; and last two weeks adding quinine to the ethanol solutions. The animals were phenotypically classified as Light (L), those who had a preference for water and low consumption of ethanol; Heavy (H), those that had a preference for ethanol with a significant reduction in the consumption during the quinine addition phase; Addict (A), those who had constant preference for alcohol use throughout treatment; and Control (C), those who had access only to water. Relative quantification of the genes was performed by real time q-PCR with N = 20 animals (C=7; L=4; H=3; A=6) followed by statistical analysis of transcript levels. Next, the Pearson correlation analysis between the genes with a significant difference between groups was performed. Among those chosen for validation, the *Camk2n1* and *Pkp2* genes showed a downregulated profile in the Control group compared to the Addict group; the *Drd2* gene showed a upregulated profile in the Addict group compared to the Light group; the *Prox1* gene showed a upregulated profile in the Heavy group compared to the Control group; and the *Mobp* gene showed a tendency to downregulation in the Control group compared to the other groups. These different transcription patterns have been associated to the presence of alcohol, in the *Camk2n1* and *Mobp* genes; to the loss of control in the ethanol consumption, in the *Pkp2* and *Drd2* genes; and to the amount of consumed ethylic solution, in the *Prox1* gene. The majority of these genes encode membrane proteins that bind to ions and other proteins participating in regulations, responses to stimuli and metabolic processes. In addition, Pearson correlation analysis showed that the *Camk2n1-Pkp2* and *Drd2-Pkp2* genes have a strong positive correlation. Thus, we conclude that chronic ethanol intake is related to transcriptional changes in the prefrontal cortex in this animal model and for the first time, we demonstrated the possible involvement of *Pkp2* gene in loss of control over the ethanol consumption.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Etanol

O álcool é a substância com efeitos psicoativos mais consumida em todo o mundo, além de ter um relevante papel econômico, social, religioso e político desde o mundo antigo, onde há evidências sobre a sua produção e o seu consumo, até os dias atuais (Dietler, 2006; 2014 Global Drug Survey, 2014). No quarto milênio a.C., as bebidas fermentadas já faziam parte do cotidiano das populações do antigo Oriente Médio e, com isso, as elites formadas realizavam trocas comerciais com populações distantes e exerciam controle sob seus recipientes e a geração de bens (Joffe, 1998).

A partir do início do século XIX, observou-se o comportamento equivalente à perda do controle sobre o uso de bebidas alcoólicas (Toscano, 2000), e o consumo foi associado a uma patologia individual ou um problema social (Dietler, 2006). Seu uso inapropriado evidencia uma das principais causas de morte evitável, lesões, doenças e efeitos sociais em várias civilizações, incluindo pancreatite, cirrose hepática, danos ao feto em mulheres grávidas, diversos tipos de câncer e doença mental, assim como comportamento agressivo, redução no rendimento industrial, rompimento dos laços afetivos, lesões por conduzir veículos sob efeito do etanol e mortes (World Health Organization, 2000).

A “Desordem no uso de substâncias” é um transtorno caracterizado principalmente por um conjunto de sintomas comportamentais, cognitivos e fisiológicos que evidenciam a busca persistente e o consumo demasiado da substância em questão, apesar dos malefícios relacionados a ela. Essa desordem abrange 10 classes separadas de drogas, sendo elas: o álcool; a cafeína; a maconha; os alucinógenos; os inalantes; os opióides; os sedativos; os hipnóticos e ansiolíticos; os estimulantes; o tabaco; e outras substâncias (American Psychiatric Association, 2013).

Diante dessas classes, destacamos a desordem no uso do etanol que é caracterizada por um grupo de sintomas comportamentais e físicos que pode abranger a abstinência, tolerância e fissura (*craving*). Aproximadamente 4 a 12 horas após a redução da ingestão pesada do álcool se iniciam os sintomas da abstinência. Os indivíduos podem continuar ingerindo essa substância psicoativa apesar das suas consequências adversas, muitas vezes, para evitar ou aliviar estes sintomas, que podem ser intensos e desagradáveis ou podem se manter em menores intensidades por meses, ou até mesmo podem contribuir

para recaídas. A tolerância é definida como a exigência do aumento de doses para alcançar efeito semelhante daquele obtido anteriormente com a ingestão de doses inferiores ou como a diminuição gradativa do efeito pela ingestão da mesma dosagem da droga. Já a fissura pelo etanol é designada por um desejo incontrolável de beber mesmo após longos períodos de abstinência, dificultando o pensamento e a realização de outras tarefas, além de ser um dos principais fatores responsáveis pela recaída. E, apesar do conhecimento sobre os problemas significativos que o consumo contínuo provoca, tanto nos aspectos físicos e psicológicos como nos sociais e interpessoais, os indivíduos com desordem no uso do álcool podem continuar consumindo a droga (WHO, 2000; APA, 2013).

Os critérios de diagnóstico desse transtorno foram criados pela APA (2013) e publicados na quinta, e última, edição do Manual de Diagnóstico e Estatística de Desordens Mentais (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V, DSM-5), na qual a classificação da gravidade do transtorno é determinada pela quantidade de sintomas apresentados pelo indivíduo em questão, sendo necessária a apresentação de, no mínimo, 2 desses sintomas ocorrendo dentro de um período de 12 meses (Tabela 1).

Tabela 1. Critérios para diagnóstico de desordem do uso do álcool

| <b>Um padrão mal-adaptativo de uso de álcool levando a prejuízo ou sofrimento clinicamente significativo, manifestado por dois (ou mais) dos seguintes critérios, ocorrendo a qualquer momento no mesmo período de 12 meses:</b>   |
|--|
| 1. O álcool é frequentemente consumido em maiores quantidades ou por um período mais longo do que o pretendido.  |
| 2. Existe um desejo persistente ou esforços mal-sucedidos no sentido de reduzir ou controlar o uso de álcool.  |
| 3. Muito tempo é gasto em atividades necessárias para a obtenção do álcool, na utilização do álcool ou na recuperação de seus efeitos.   |
| 4. Fissura, desejo intenso ou urgência em consumir álcool ("craving").   |
| 5. Uso recorrente de álcool resultando em fracasso em cumprir obrigações importantes relativas a seu papel no trabalho, na escola ou em casa.  |
| 6. O uso de álcool continua, apesar de problemas sociais ou interpessoais persistentes ou recorrentes causados ou exacerbados pelos efeitos do álcool.   |
| 7. Importantes atividades sociais, ocupacionais ou recreativas são abandonadas ou reduzidas em virtude do uso de álcool.   |
| 8. Uso de álcool recorrente em situações nas quais isto representa perigo físico.  |
| 9. O uso do álcool continua, apesar da consciência de ter um problema físico ou psicológico persistente ou recorrente que tende a ser causado ou exacerbado pelo álcool.   |
| 10. Tolerância, definida por qualquer um dos seguintes aspectos:<br>a) necessidade de quantidades progressivamente maiores de álcool para adquirir a intoxicação ou efeito desejado;<br>b) acentuada redução do efeito com o uso continuado da mesma quantidade de álcool. |



|   |
|---|
| 11. Abstinência, manifestada por qualquer dos seguintes aspectos:<br>a) síndrome de abstinência característica para a substância (consultar os Critérios A e B dos conjuntos de critérios para Abstinência do álcool);<br>b) o álcool (ou uma substância estreitamente relacionada, como benzodiazepínicos) é consumido para aliviar ou evitar sintomas de abstinência. |
| <b>A classificação da gravidade do transtorno baseia-se na quantidade de critérios acima preenchidos pelo indivíduo, sendo:</b>   |
| <b>Leve:</b> presença de 2 a 3 sintomas   |
| <b>Moderada:</b> presença de 4 a 5 sintomas   |
| <b>Grave:</b> presença de 6 ou mais sintomas  |

Fonte: Centro de Informações sobre Saúde e Álcool (CISA), 2014.

Em termos nacionais, o Brasil, em comparação com países desenvolvidos, possui maiores danos à qualidade de vida da população no que se refere ao consumo excessivo do etanol. De acordo com o II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas realizado em 2012, cerca de 59% de 3000 brasileiros entrevistados fizeram consumo de etanol a níveis intoxicantes naquele ano, sendo que, 14% deles apresentam dependência. Além disso, mais de duas a cada dez tentativas de suicídio estavam ligadas a esse consumo, havendo uma forte conexão entre o abuso da droga e a depressão. As bebidas alcoólicas também estavam relacionadas com 20% dos casos de violência física na infância e 50% dos casos de violência doméstica (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas do Álcool e Outras Drogas, 2012).

## 1.2 Mecanismos neurobiológicos da adição

Há uma grande confusão envolvida no diagnóstico de dependência devido ao fato da maioria das pessoas relacionarem a dependência com a adição, popularmente conhecida como “vício” (APA, 2013). Dependência é o estado que se desenvolve quando os neurônios se adaptam à exposição repetida de uma droga, funcionando normalmente apenas na sua presença, e podendo ocorrer várias reações fisiológicas quando ela é retirada, como por exemplo, a síndrome de abstinência. Já a adição é o estado na qual o organismo desencadeia um comportamento compulsivo de reforço ou recompensa, mesmo quando se depara com consequências negativas, perdendo o controle em limitar a ingestão da

substância aditiva (National Institute on Drug Abuse, 2007). Com isso, fica claro que a dependência e a adição são estados diferentes e independentes entre si.

A compreensão dos sistemas e mecanismos que levam o indivíduo ao comportamento adicto é de suma importância na neurobiologia. Com isso, estudos acerca desse assunto já foram realizados e corroborados com a hipótese de que os circuitos que abrangem esse comportamento são semelhantes para as drogas de abuso. Essas drogas induzem a aprendizagem, sentimentos positivos, comportamento, emoções e produção de memória, gerando, dessa forma, recompensas. Além disso, alteram o sistema de recompensa fisiológico do cérebro, levando à sua desordem (Schultz, 2011; Volkow et al., 2011; Ikemoto & Bonci, 2014).

Cada droga possui receptores específicos onde se ligam quando consumida de forma aguda, gerando inúmeros efeitos fisiológicos e, quando consumidas de forma crônica, compartilham vários mecanismos entre elas (Volkow et al., 2011). Destacando o etanol, seus principais alvos são sítios de ligação alostéricos presentes na proteína do receptor GABA<sub>A</sub> capazes de modular a atividade desse receptor (Santhakumar et al., 2007). O receptor GABA<sub>A</sub> é um receptor ionotrópico na qual o seu ligante endógeno é o GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico), o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central. O etanol age pré-sinápticamente aumentando a liberação de GABA e há receptores, como os extrasinápticos que são sensíveis a essa liberação exacerbada, resultando no aumento da função GABAérgica (Lobo & Harris, 2008). Além disso, a ingestão aguda de etanol causa modificações na função em determinados sistemas neuronais, enquanto a sua existência crônica no cérebro induz mudanças adaptativas permanentes causando dependência, que pode ser predisposta pela variabilidade genética na sensibilização inicial dos sistemas afetados ou na sua tendência a se adaptar (Tabakoff & Hoffman, 1996). As neuroadaptações provenientes do comportamento adicto podem ser vistas sob diversas formas de plasticidade sináptica e estrutural, desde modificações nos níveis de neurotransmissores até alterações na atividade transcricional e morfologia celular, ocorrendo principalmente nas regiões cerebrais relacionadas à regulação do humor, ao processamento de recompensa e à motivação (Frascella et al., 2010; Russo et al., 2010; Koob & Volkow, 2010).

As drogas de adição agem direta e/ou indiretamente na via dopaminérgica mesolímbica, também conhecida como sistema de recompensa, que compreende neurônios dopaminérgicos na área tegmental ventral (VTA) se projetando para áreas límbicas, especialmente o núcleo accumbens (NAc). O aumento da dopamina sináptica nesta via interage com a sinalização de diversos neurotransmissores (GABA, glutamato, serotonina,

peptídeos opióides e cannabinoídes) (Figura 1) e com modificações complexas nas vias de sinal de transdução (Nestler, 2005; Enoch, 2013).

O sistema de recompensa consiste em estabelecer hábitos por meio de mecanismos reforçadores. As principais ações neste circuito são ativadas através de recompensas naturais, como comida e comportamento sexual, e recompensas artificiais, como o abuso de drogas de adição (Wise, 1987; Wise, 1996; Tzschentke & Schmidt, 2003; Schultz, 2011). Os mecanismos reforçadores são divididos em duas grandes categorias: reforço positivo e reforço negativo. O reforço positivo é definido como o processo que apresenta um estímulo geralmente agradável, como prazer, gratificação ou euforia, aumentando a probabilidade de uma resposta. Já o reforço negativo é definido como o processo que remove ou alivia estados de dor, aversão ou distresse, como disforia, ansiedade e outras sensações desagradáveis, também aumentando a probabilidade de uma resposta. Tanto o reforço positivo como o negativo podem ser obtidos por meio de comportamento sexual, ingestão de comida e abuso de drogas de adição (Wise, 1987; Goodman, 2008; Koob & Volkow, 2010).

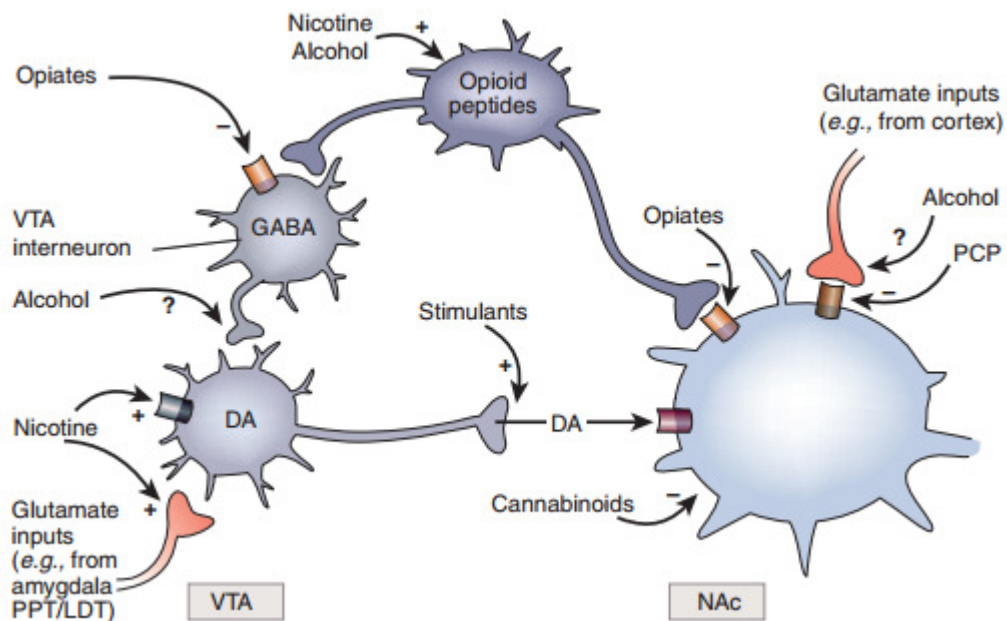


Figura 1. Esquema simplificado das ações das drogas de abuso na via VTA-NAc. Drogas estimulantes aumentam diretamente a transmissão dopaminérgica no NAc; cannabinoídes ativam receptores CB1 nos terminais nervosos GABAérgicos e glutamatérgicos no NAc e nos neurônios do NAc; opióides inibem interneurônios GABAérgicos na VTA desinibindo os neurônios dopaminérgicos dessa região e também agem diretamente nos receptores opióides dos neurônios do NAc; a nicotina ativa diretamente os neurônios dopaminérgicos da VTA através dos receptores colinérgicos nicotínicos desses neurônios e indiretamente pelos seus receptores presentes nos terminais nervosos glutamatérgicos que inervam as células de dopamina; o álcool pode inibir terminais GABAérgicos na

VTA, desinibindo os neurônios dopaminérgicos dessa área e pode inibir terminais glutamatérgicos que inervam os neurônios do NAc. Há evidências de que a nicotina e o álcool podem ativar vias de opióide endógeno e vias de canabinóide endógeno.

Fonte: (Nestler, 2005)

O comportamento de busca pela droga é gerado pela interação das neuroadaptações presentes nos circuitos cerebrais envolvidos no ciclo de adição que é dividido em três estágios. No primeiro estágio, chamado de *binge/intoxicação*, atua o mecanismo agudo envolvendo principalmente o sistema dopaminérgico mesolímbico na área tegmental ventral (VTA), substância nigra (SNc), tálamo, globo pálido ventral (VGP) e dorsal (DGP) com a participação do reforço positivo. No segundo estágio, chamado abstinência, atua o mecanismo crônico na amígdala estendida envolvendo a participação do reforço negativo. Além disso, com o objetivo de diminuir os efeitos agudos das drogas, a participação mesolímbica é reduzida e os sistemas relacionados ao estresse, como o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e o sistema aversivo mediado pelo fator de liberação de corticotropina (CRF, do inglês *Corticotropin Release Factor*), são ativados. No terceiro e último estágio, chamado antecipação/*craving*, atua principalmente o sistema glutamatérgico no córtex pré-frontal (PFC), hipocampo e amígdala basolateral, e é caracterizado pela fissura, neuroadaptações permanentes e predisposição à recaídas. (Barr & Phillips, 1999; Koob & Volkow, 2010) (Figura 2).

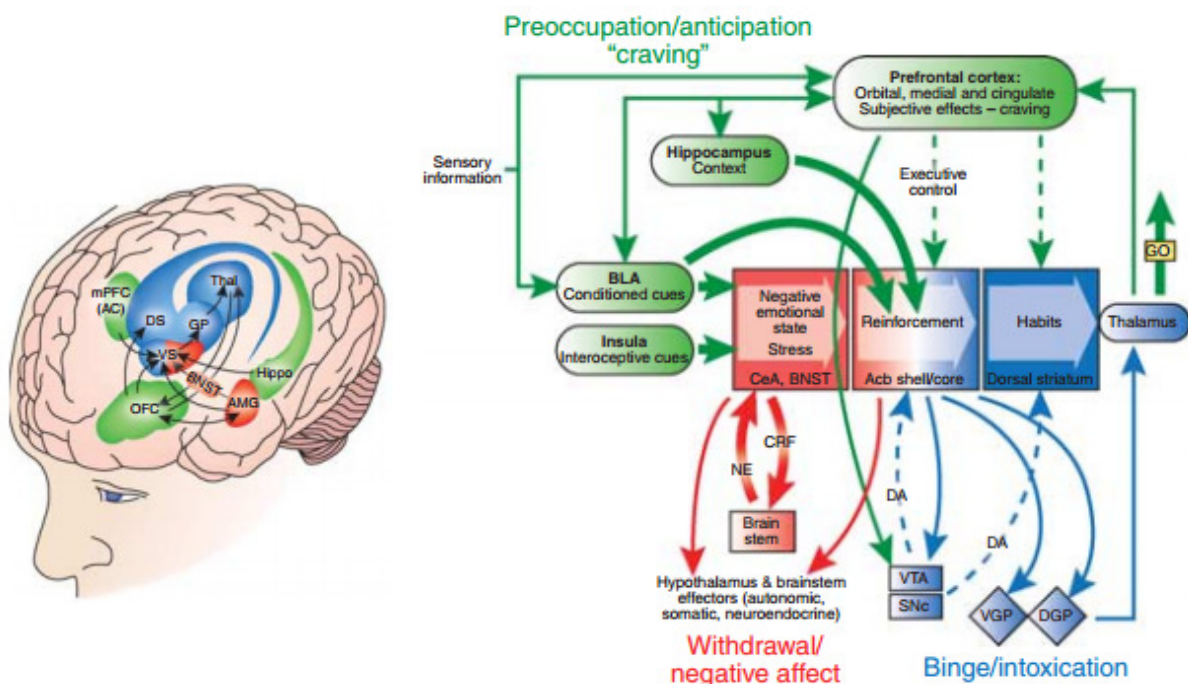


Figura 2. Esquema da interação entre os circuitos neurais envolvidos nos três estágios da adição. A região ilustrada em azul representa o estágio de *binge*/intoxicação, cujos neurotransmissores do sistema de recompensa e dos demais sistemas associados são comprometidos pelos efeitos reforçadores das drogas. Esses efeitos também estabelecem hábitos de estímulo-resposta que dependem do estriado dorsal. A dopamina e os peptídeos opióides são os dois principais neurotransmissores que medeiam os efeitos recompensadores das drogas de abuso. A região ilustrada em vermelho representa o estágio de abstinência/estado negativo, cuja amígdala estendida, que se projeta principalmente para o hipotálamo e o tronco encefálico, é ativada. O CRF, a norepinefrina e a dinorfina são os principais neurotransmissores na amígdala estendida que, hipoteticamente, têm função no reforço negativo. A região ilustrada em verde representa o estágio de preocupação/antecipação (*craving*), envolvendo o reforço condicionado na BLA e o processamento de informações contextuais pelo hipocampo. O controle executivo depende do córtex pré-frontal e inclui processos mentais, utilizados no planejamento, organização, concentração e administração de tempo e espaço, que auxiliam na conexão de experiências passadas e ações presentes, além dos estados subjetivos (desejo e sentimentos) associados às drogas. O glutamato é o principal neurotransmissor envolvido nesta etapa. Acb, núcleo accumbens; BLA, amígdala basolateral; VTA, área tegmental ventral; SNc, substância nigra; VGP, globo pálido ventral; DGP, globo pálido dorsal; BNST, núcleo da estria terminal; CeA, núcleo central da amígdala; NE, norepinefrina; CRF, fator de liberação de corticotropina.

Fonte: (Koob & Volkow, 2010)

### 1.2.1 Córtex pré-frontal e adição

Dentre as estruturas cerebrais envolvidas no processo de adição, destaca-se o córtex pré-frontal que é objeto de estudo deste trabalho.

O córtex cerebral possui seis camadas de neurônios que realizam funções distintas, sendo elas: camada molecular, rica em fibras e com poucos neurônios; camada granular externa, predominando células granulares que são os principais interneurônios corticais e as principais células receptoras do córtex cerebral; camada piramidal externa, uma camada predominantemente efetuidora prevalecendo células piramidais; camada granular interna; camada piramidal interna; camada de células fusiformes, que são efetuidoras (Hall & Guyton, 2011; Machado, 2000).

O córtex pré-frontal (PFC) é uma área do córtex que desempenha função executiva, compreendendo o planejamento de movimentos complexos, elaboração de pensamentos racionais, memória de trabalho, manutenção da atenção, flexibilidade cognitiva, tomada de

decisão, supervisão sobre comportamentos impulsivos, aquisição e reversão de associações estímulo-recompensa, além do controle do processamento emocional, regulando efetivamente o *craving* e gerando sentimentos subjetivos relacionados à experiência emocional (Hall & Guyton, 2011; Kober et al., 2010; NIDA, 2007; Purves et al., 2004).

O controle executivo sobre o comportamento motivado pode ser prejudicado pela alteração da participação de um subconjunto específico de interneurônios GABAérgicos e dos fatores de liberação de corticotropina situados no PFC medial (mPFC) durante a fase de abstinência, juntamente com a desconexão funcional da via mPFC-CeA. Com isso, um indicador inicial de neuroadaptações que geram danos cognitivos e consumo exacerbado de etanol pode ser caracterizado pela desregulação da atividade dessa região (George et al., 2012). Muitos estudos associaram o transtorno no uso do etanol com mudanças adaptativas no mPFC pela exposição prolongada da droga, causando déficits comportamentais, estruturais, fisiológicos, cognitivos, de impulsividade e de tomada de decisões (Kroener et al., 2012; Lu & Richardson, 2014; Purves et al., 2004). Drogas, estresse, ambiente/estímulos associados com o consumo da droga ou períodos de abstinência desencadeiam um papel crucial no funcionamento do mPFC, incluindo a hiperfunção e hipofunção do mPFC dorsal e ventral, respectivamente, levando à busca pelas substâncias, *craving*, recaída e ao aumento da susceptibilidade à realização de ações recompensadoras a curto prazo, mesmo diante de consequências negativas (Bechara et al., 2001; Bechara & Damasio, 2002; Kalivas et al., 2005; Kalivas & Volkow, 2005; Willcocks & McNally, 2013).

### **1.3 Estudo genético do alcoolismo**

A desordem no uso do álcool (AUD, do inglês *Alcohol Use Disorder*) é uma doença multifatorial com herdabilidade de aproximadamente 50% sem diferença qualitativa entre homens e mulheres nos efeitos genéticos para AUDs (Verhulst et al., 2014). A vulnerabilidade para desenvolver a adição depende de condições genéticas, epigenéticas, fisiológicas e ambientais e, devido à incapacidade do efeito ambiental e do *background* genético de serem controlados com precisão em populações humanas, torna-se difícil separar as contribuições genéticas das ambientais que formam os fenótipos relacionados ao alcoolismo. Inúmeras variantes, sendo elas comuns e raras, e suas interações entre si e com o meio ambiente geram esses fenótipos complexos, não existindo a predisposição para transtornos de abuso do álcool e dependência proveniente de um único locus (Ducci & Goldman, 2008; Morozova et al., 2012; Edenberg, 2013). Vale ressaltar que as variantes

comuns são compostas por vários genes, cada um contribuindo para um efeito pequeno no fenótipo, enquanto que as variantes raras consistem em poucos genes, cada um contribuindo para um efeito grande no alcoolismo (Enoch, 2013).

Os genes envolvidos no metabolismo do etanol e nos sistemas dopaminérgico, GABAérgico, glutamatérgico, serotoninérgico e colinérgico foram relacionados ao comportamento adicto por meio de diferentes estudos moleculares, como ligação, genes candidatos, associação de todo o genoma (GWAS, do inglês *Genome-Wide Association Study*) com base em caso-controle, ligação com base em famílias, gêmeos e adoção (Köhnke, 2008; Ducci & Goldman, 2008; Kimura & Higuchi, 2011; Edenberg, 2013).

A metabolização do álcool ocorre principalmente no fígado com a participação das enzimas álcool desidrogenase (ADH), que converte a molécula de etanol em acetaldeído, um produto altamente tóxico; e aldeído desidrogenase (ALDH), que oxida o acetaldeído a acetato (Figura 3). As duas primeiras enzimas alteram o comportamento de ingestão, afetando a vulnerabilidade da dependência ao álcool, quando sofrem variações nas suas atividades. Muitas variantes envolvendo sete genes ADH e um gene ALDH foram associadas a traços relacionados ao álcool ou dependência alcoólica, incluindo ADH1A, ADH1B, ADH1C, ADH2, ADH4 e ALDH2. Além disso, trabalhos anteriores indicam que populações do leste asiático e da Polinésia possuem alelos de proteção no gene ADH1B (ADH1B\*2) e ALDH inativo (ALDH2\*2), tornando o alcoolismo menos comum nessas populações quando comparado às populações europeias (Whitfield et al., 1998; Ducci & Goldman, 2008; Kimura & Higuchi, 2011; Edenberg, 2013; Morozova et al., 2014).

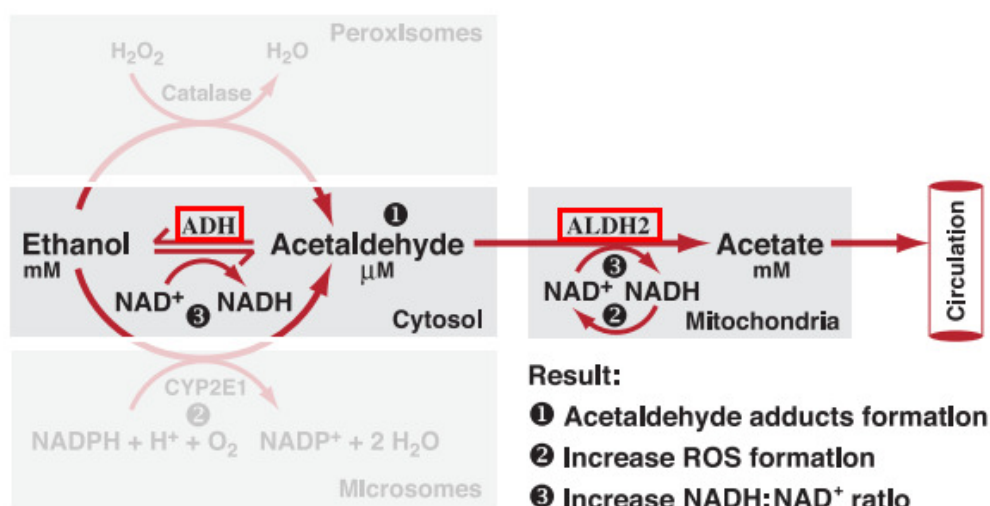


Figura 3. Vias metabólicas do etanol. No citosol do fígado, o etanol é convertido em acetaldeído pela enzima álcool desidrogenase e, ao entrar na mitocôndria, o acetaldeído é metabolizado em acetato pela enzima aldeído desidrogenase.

O sistema dopaminérgico é um importante alvo na etapa de intoxicação das drogas de abuso devido às propriedades reforçadoras dessas substâncias que ativam o sistema de recompensa (Koob, 1992). Na busca pelo esclarecimento do *background* genético do alcoolismo, alguns genes dessa via foram relacionados à dependência alcoólica. Dentre eles, podemos destacar o polimorfismo Taq1A, anteriormente identificado na região não-codificadora do gene receptor de dopamina D2 (DRD2) e, posteriormente, revelou-se estar presente na região codificadora de um gene próximo ao DRD2, o ANKK1 (*ankyrin repeat and kinase domain containing-1*) (Neville et al., 2004); a variação no número de repetições em tandem (VNRT) na região codificadora do gene receptor de dopamina D4 (DRD4) que, apesar de não estar diretamente relacionada à dependência, se mostrou associada à busca por novidades e ao desejo pelo álcool (Soyka et al., 2002); a VNRT no gene transportador de dopamina DAT1; polimorfismos nas enzimas metabolizadoras de dopamina, catecol-O-metiltransferase (COMT), monoamina oxidase A (MAO-A) e dopamina- $\beta$ -hidroxilase (D $\beta$ H) (Samochowiec et al., 2006; Köhnke et al., 2006; Contini et al., 2006; Ducci & Goldman, 2008; Köhnke, 2008; Kimura & Higuchi, 2011).

Já o sistema GABAérgico possui o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) que medeia os efeitos farmacológicos do álcool no cérebro. Esse sistema é dividido em dois subgrupos: receptores GABA<sub>A</sub> e receptores GABA<sub>B</sub>, na qual o primeiro está mais associado ao alcoolismo por ter uma interação direta com o etanol, alterando suas funções em determinadas áreas cerebrais. Os genes codificadores das subunidades do receptor GABA<sub>A</sub> estão agrupados no genoma sendo que, no cromossomo 4 estão localizados os genes GABRA2, GABRA4, GABRB1 e GABRG1, no cromossomo 5, os genes GABRA1, GABRA6, GABRB2 e GABRG2, e no cromossomo 15 estão os genes GABRA5, GABRB3 e GABRG3. Estudos evidenciaram a relação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do GABRB1, GABRA2 e GABRB3 com a dependência do álcool (Song et al., 2003; Edenberg et al., 2004; Köhnke, 2008; Tsurugizawa et al., 2010; Kimura & Higuchi, 2011).

No que se refere ao sistema glutamatérgico, os polimorfismos mais comuns no estudo dessa via estão nos genes do receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDAR), NMDAR1 e NMDAR2B. Alguns efeitos comportamentais devido ao uso agudo do etanol, como problemas na tomada de decisões, podem estar relacionados com a função reduzida dos receptores NMDA pela interrupção de *output* do córtex pré-frontal. Além disso, a inibição da atividade desses receptores, localizados nos neurônios piramidais do mPFC, reduz a



neurotransmissão mediada por NMDA que pode estar relacionada com o comportamento impulsivo, a perda de controle na ingestão do álcool e a função anormal do córtex pré-frontal de sujeitos dependentes, e pode diminuir os mecanismos de plasticidade envolvidos na capacidade neuronal de se adaptar rapidamente às mudanças ambientais (Weitlauf & Woodward, 2008). No entanto, apesar dos efeitos excitatórios do glutamato no sistema nervoso central serem mediados pela cascata de sinalização NMDA e essa ser inibida pelo álcool, ainda há controvérsia na associação desses polimorfismos ao alcoolismo e mais genes de relevância funcional precisam ser analisados (Wernicke et al., 2003; Konhke, 2008).

No sistema SEROTOninérgico, o maior foco dos estudos relacionados ao alcoolismo está nos genes transportadores (5-HTT, do inglês *5-hydroxytryptamine transporter*) e receptores (5-HTR, do inglês *5-hydroxytryptamine receptor*) de serotonina. E, no COLInérgico, muitos polimorfismos nos genes receptores colinérgicos nicotínicos, CHRNA5 e CHRNA3, foram relacionados com a dependência alcoólica, sendo que as maiores quantidades de mRNA do gene CHRNA5 presentes no córtex frontal humano estão relacionadas com os menores alelos desses polimorfismos (Wang et al., 2008b). Também há estudos sugerindo que polimorfismos no gene receptor colinérgico muscarínico 2 (CHRM2) estão associados com a severidade da dependência etílica (Jung et al., 2011).

#### **1.4 Modelo animal de dependência alcoólica**

A busca por elementos específicos do processo de adição das drogas é possível em modelos animais, mesmo que nenhum deles represente plenamente a condição humana (Koob & Volkow, 2010). Estudos em organismos modelos, como ratos, camundongos, moscas e nematódeos, têm sido fundamentais na identificação de potenciais genes candidatos que colaboram para a intoxicação ao etanol devido à conservação evolutiva das vias e genes que afetam principais processos biológicos entre seres humanos, invertebrados e vertebrados (Morozova et al., 2012).

O uso crônico e o comportamento de busca por uma droga são os dois principais alvos para estudar drogas de adição em modelos animais. O primeiro consiste em administrar a droga de maneira forçada por inalação, gavagem, injeção ou dieta, a fim de compreender as consequências do uso abusivo, que engloba o desenvolvimento de tolerância/sensibilização e a dependência física/síndrome de abstinência. Já o segundo alvo consiste em submeter os animais a métodos de reforço ou de livre escolha objetivando

evidenciar as propriedades reforçadoras das drogas que desempenham um papel-chave no comportamento adicto (Meisch, 2001; Morozova et al., 2012).

O controle das influências ambientais para intensificar os efeitos dos genes é um fator útil proveniente da manipulação de modelos animais (Ducci & Goldman, 2008). Excelentes modelos para estudar a susceptibilidade genética na dependência humana ao álcool são compostos por roedores, pois ambos roedores e seres humanos possuem a organização conservada das regiões do sistema nervoso que medeiam a adição e semelhantes sistemas de neurotransmissores que regulam o comportamento adicto (Morozova et al., 2014).

Camundongos, quando comparados com ratos, são mais utilizados e favoráveis para realizar técnicas de eliminação completa do gene de interesse, silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi) e utilizar tecnologias de super-expressão e mutagênicas (Bennett et al., 2006). Além de ter mais de 90% do seu genoma dividido em regiões de sintenia com o genoma humano (Ehlers et al., 2010).

#### **1.4.1 O modelo de livre escolha**

Este estudo é parte de um projeto maior realizado por Ribeiro e colaboradores em 2012, na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), no Laboratório de Genética Animal e Humana (Departamento de Biologia Geral), juntamente com a Universidade Federal do Paraná (UFPR), intitulado como: “Caracterização molecular e comportamental de um modelo animal de consumo de etanol”. Neste trabalho foi utilizado o modelo animal de livre escolha, inicialmente proposto para ratos (Wolffgramm & Heyne, 1995) e mais tarde validado farmacologicamente para camundongos (Fachin-Scheit et al., 2006), descrito a seguir.

Foram utilizados 80 camundongos *Swiss* machos adultos (45 dias), provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, sem nenhuma experiência anterior com drogas. Os procedimentos realizados no tratamento e cuidado dos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPR (protocolo número 281) e Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (protocolo número 159/2007). Os animais foram alojados individualmente desde a semana de ambientação sendo numerados de 01 a 80 de acordo com o número da gaiola (20x30x20cm) e as condições de temperatura (22°C ± 2°C) e luminosidade (ciclo de 12hrs claro/escuro) foram mantidas.

O desenho experimental (Figura 4) consiste em 5 etapas. Durante a fase de ambientação (semana 1), foram medidos o peso e o consumo basal de água de todos os animais. Ao longo do tratamento, os camundongos foram alimentados com ração PURINA® (Chow, São Paulo, Brasil) à vontade, pesados uma vez por semana e o volume das soluções foi medido em dias alternados. Além disso, as garrafas tiveram suas posições alteradas na gaiola a cada troca de solução. Na fase de aquisição (semanas 2-11), um grupo de camundongos (n=60) teve um tratamento através do método de livre escolha durante 10 semanas com acesso simultâneo a 3 garrafas (água, etanol a 5% (v/v) e etanol a 10% (v/v)), enquanto o outro grupo de animais (controle n=20) teve o mesmo tratamento, porém sem acesso às soluções de etanol. Na fase de abstinência (semanas 12-13), as soluções etílicas foram retiradas e, após esse período, elas foram reapresentadas (fase de reapresentação – semanas 14-15). Por último, na fase de adulteração (semanas 16-17), as soluções etílicas foram adulteradas de sabor devido ao acréscimo de quinino e continuaram sendo ofertadas aos animais.

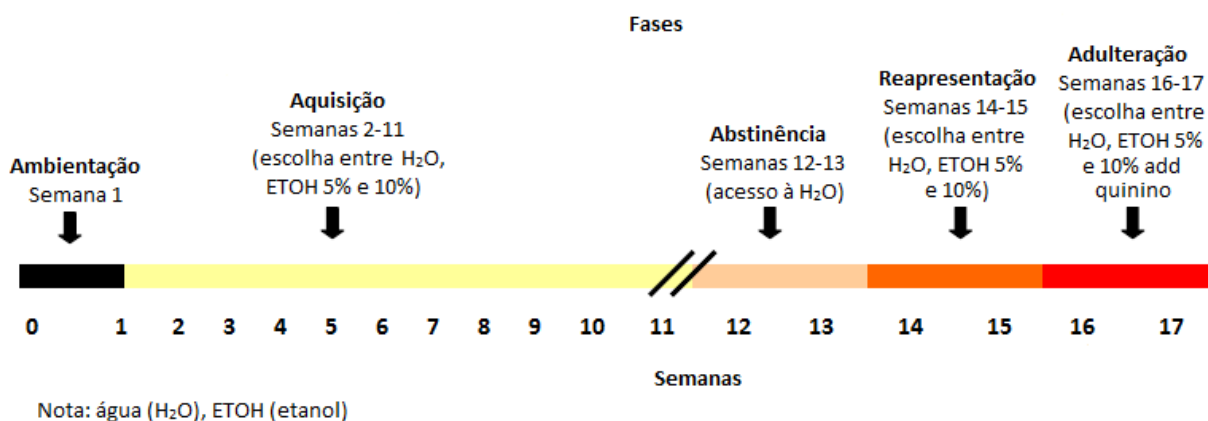


Figura 4. Desenho experimental para avaliar a perda de controle sobre o consumo de etanol

Após o experimento, os camundongos foram classificados fenotipicamente de acordo com o consumo da droga em: controle (C: tiveram acesso somente a água durante todo o experimento); leve (L: possuíram preferência pela água com baixo consumo de etanol); pesado (P: possuíram preferência pelo etanol com redução significativa no consumo durante a fase de adulteração) e adicto (A: possuíram preferência pelo etanol sem redução significativa no consumo durante a fase de adulteração, apresentando uma “perda de controle” na ingestão da droga sob condição “aversiva”). Em seguida, os animais foram eutanasiados e as regiões do córtex pré-frontal, hipotálamo, núcleos da amígdala, hipocampo e estriado foram dissecadas no gelo e guardadas em 1 mL de RNAlater®

(Ambion-Qiagen, São Paulo, Brasil). Como vimos anteriormente, essas regiões cerebrais participam das etapas da adição sendo de suma importância na neurobiologia e na compreensão da genética desse fenótipo.

O consumo e a concentração plasmática de etanol (BEC, do inglês *Blood Ethanol Concentration*) foram medidos (Ribeiro et al., 2012) (Anexo A) e genes potencialmente envolvidos no comportamento adicto foram obtidos por meio da análise comparativa entre um *pool* de quatro animais do grupo leve e do grupo adicto do transcriptoma do córtex pré-frontal, hipocampo e núcleo estriado. Cada *pool* foi hibridizado em triplicatas, totalizando 18 chips GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array, com 45000 conjuntos de sondas correspondendo a 39000 transcritos. Para a análise da expressão gênica foi feita, primeiramente, a normalização dos dados com o intuito de homogeneizar as intensidades de fluorescência determinadas nas triplicatas em cada grupo (Anexo B). Posteriormente, a análise de clusterização foi realizada através da análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) objetivando agrupar os dados semelhantes entre os *arrays*. Por último, a análise estatística dos valores de expressão de cada gene foi feita através do teste não paramétrico *RankProduct* (RankProd), que identifica genes diferencialmente transcritos e os ordena utilizando o *FoldChange* das replicatas, e o valor p corrigido foi fixado em  $\leq 0,05$  (Anexo C).

A técnica de microarranjo necessita de uma confirmação dos seus dados por meio de outros métodos independentes, pois apontam variações generalizadas mesmo sob condições experimentais, além de permitir a análise da expressão de milhares de genes em conjunto (Jayapal & Melendez, 2006). Neste estudo realizamos a análise do microarranjo e a seleção dos genes a serem validados pela técnica de qPCR em tempo real. Devido às suas funções moleculares e seus envoltimentos nos processos biológicos reportados na literatura (Tabela 2), assim como o fato de possuírem um log FC superior a 2 nos dados do microarranjo (ANEXO C), os genes *Camk2n1*, *Clic6*, *Dcx*, *Drd1*, *Drd2*, *Mobp*, *Pcdh20*, *Pkp2*, *Prox1*, *Rem2* e *Ttr* foram escolhidos.

Todos esses genes codificam proteínas, sendo que a maioria destas são proteínas de membrana na qual, juntamente com íons e outras proteínas, participam de regulações, respostas a estímulos e processos metabólicos, além de estarem relacionados à ligação a receptores e proteínas presentes na região extracelular (National Center of Biotechnology Information, 2015).

Tabela 2. Genes selecionados e a ontologia genética das proteínas, que engloba função molecular, processo biológico e componente celular

| Genes       | Proteína   | Genes          | Proteína   |  |
|-------------|--|----------------|--|--|
| <i>Pkp2</i> | Componente da membrana plasmática<br>Ligante de filamento intermediário<br>Ligante de proteína quinase C<br>Envolvida na montagem de desossomo e junção gap<br>Envolvida na regulação negativa da proliferação/migração celular  | <i>Drd2</i>    | Componente do axônio, dendrito e membrana plasmática<br>Atividade receptora acoplada a proteína G<br>Atividade receptora do neurotransmissor dopamina<br>Ligante à droga<br>Atividade transdutora de sinal<br>Ligante ao receptor de glutamato ionotrópico<br>Ativa a atividade da proteína quinase C<br>Envolvida na axonogênese<br>Migração do interneurônio GABAérgico do córtex cerebral<br>Processo metabólico de dopamina<br>Envolvida no alcoolismo<br>Envolvida na via de sinalização de cálcio<br>Envolvida na sinapse dopaminérgica<br>Junção gap<br>Interação receptor-ligante neuroativo |  |
| <i>Dcx</i>  | Ligante de microtúbulo<br>Envolvida na orientação do axônio<br>Desenvolvimento cerebral<br>Diferenciação celular<br>Morfogênese de dendritos<br>Transdução de sinal intracelular<br>Formação da camada do córtex cerebral<br>Migração neuronal<br>Desenvolvimento de neurônio piramidal  |                | <i>Pcdh20</i>  | Componente integral de membrana<br>Ligante ao íon cálcio<br>Ligante à RNA poly(A)<br>Adesão celular  |
| <i>Drd1</i> | Componente do axônio, dendrito e membrana plasmática<br>Ligante de ATPase<br>Atividade receptora acoplada a proteína G<br>Atividade receptora do neurotransmissor dopamina<br>Ligante à droga<br>Atividade transdutora de sinal<br>Envolvida no desenvolvimento de astrócito<br>Migração do interneurônio GABAérgico do córtex cerebral<br>Envolvida no alcoolismo<br>Envolvida na via de sinalização de cálcio<br>Envolvida na sinapse dopaminérgica<br>Junção gap<br>Interação receptor-ligante neuroativo | <i>Camk2n1</i> |  | Componente da junção celular<br>Componente da membrana pós sináptica<br>Inibição da atividade da proteína quinase dependente de cálcio   |
|             |  | <i>Clic6</i>   |  | Componente integral de membrana<br>Ligante aos receptores de dopamina D2, D3 e D4<br>Regulação do transporte transmembrana de cloreto  |
|             |  | <i>Prox1</i>   |  | Ligante de proteína<br>Envolvida na diferenciação e determinação do destino celular<br>Regulação negativa da proliferação celular<br>Regulação negativa da transcrição a partir do promotor da RNA polimerase II |
| <i>Mobp</i> | Constituinte estrutural da bainha de mielina<br>Desenvolvimento do sistema nervoso   | <i>Ttr</i>     |  | Atividade hormonal<br>Organização da matriz extracelular<br>Transdução de sinal  |
| <i>Rem2</i> | Componente da membrana plasmática<br>Atividade GTPase<br>Transdução de sinal   |                |  |  |

Fonte: (NCBI, 2015)

### **1.5 Justificativa e relevância da realização do projeto**

O uso abusivo do álcool é um problema significativo de saúde pública mundial que causa malefícios ao indivíduo relacionados a problemas sociais, físicos e psicológicos, além de ser uma das principais causas de morte evitável. Apesar das inúmeras pesquisas acerca do alcoolismo, ainda há muitos aspectos desconhecidos referentes a essa patologia, incluindo mecanismos genéticos e moleculares vinculados ao comportamento adicto. Na tentativa de elucidar alguns dos mecanismos moleculares relacionados a adição, desenvolvemos um modelo animal de livre escolha. Para tanto, utilizamos camundongos *Swiss* heterogêneos expostos ao tratamento de livre escolha entre água e soluções etílicas (5% e 10% v/v) e que são modelos genéticos ideais para os estudos do alcoolismo, visto que apresentam semelhanças com os seres humanos no que se refere à neurobiologia e variabilidade genética. Estudando a adição nesses camundongos, foi possível identificar genes candidatos relacionados ao comportamento adicto que poderão ser importantes na busca pela prevenção, diagnóstico e tratamentos mais eficazes.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Identificar diferentes padrões de regulação transcricional relacionados ao fenótipo adicto no consumo de etanol em modelo animal de livre escolha.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Selecionar e validar genes identificados pela técnica de microarranjo através da quantificação relativa dos transcritos pela técnica de PCR em tempo real (qPCR) no córtex pré-frontal entre os grupos controle, leve, pesado e adicto.
- Revisar a função dos genes diferencialmente transcritos, expor seus possíveis envolvimento com o fenótipo adicto e fazer a correlação entre eles.

## 3. METODOLOGIA

### 3.1 Animais

Os camundongos *Swiss* utilizados neste estudo pertenciam ao trabalho de doutorado da aluna Andrea Frozino Ribeiro, 2012 (RIBEIRO et al., 2012).

### 3.2 Procedimentos para análise molecular

Desde a coleta da região cerebral até a extração de RNA total, o córtex pré-frontal dos camundongos ficou armazenado em microtubos de 2 mL contendo RNAlater® a -80 °C.

#### 3.2.1 Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada de acordo com o protocolo de TRIzol® (Invitrogen, São Paulo, Brasil). O TRIzol®, na proporção de 1 mL/50 mg de tecido, foi adicionado aos microtubos de 2 mL contendo as amostras ainda congeladas que, por sua vez, foram maceradas com o homogeneizador Tissue Master 125 (OMNI International, USA) na rotação mínima por, no máximo, 10 segundos. Logo em seguida, a solução ficou em temperatura ambiente (20-25°C) por 5 minutos e, depois, foi adicionado 200 µL de clorofórmio PA, agitado por inversão durante 15 segundos e incubado por mais 2-3 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 12000 G por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foi adicionado 500 µL de isopropanol PA 100%, misturado por inversão durante 15 segundos e incubado por mais 10 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram novamente centrifugadas a 12000 G por 10 minutos a 4°C. Após essa etapa, o sobrenadante foi desprezado cuidadosamente e 800 µL de etanol PA 75% gelado foi adicionado ao precipitado e, logo em seguida, misturado por inversão até o *pellet* se desprender, e centrifugado a 7500 G durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado cuidadosamente e o precipitado ficou em temperatura ambiente por aproximadamente 20 a 30 minutos, até que todo resíduo de etanol tenha evaporado. Por último, o *pellet* foi ressuscitado em 20 µL de água ultra pura® (Qiagen, São Paulo, Brasil).



O RNA total foi quantificado utilizando os equipamentos DeNovix® DS-11 Spectrophotometer (Uniscience, São Paulo, Brasil) e Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, São Paulo, Brasil). As amostras utilizadas apresentaram razões 260/230 nm e 260/280 nm entre 1,8 e 2,0. Para verificar a integridade das amostras, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% corado com 15 µL brometo de etídio 0,1% utilizando tampão TAE 1X (Ácido acético glacial 20 mM, Tris 40 mM, EDTA 1 mM), na qual foi possível observar a presença das bandas ribossomais 28S e 18S. As condições da corrida foram 300 mA, 90 V por aproximadamente 30 minutos.

### 3.2.2 Desenho dos iniciadores (*primers*)

A sequência dos *éxons* dos genes de interesse foi extraída dos bancos de dados *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e comparadas com as sequências depositadas no *Ensembl Genome Browser* (<http://www.ensembl.org/index.html>). Em seguida, a sequência foi inserida no *software* Primer3 v.4.0.0 disponível *on-line* (<http://primer3.ut.ee/>), redefinindo o tamanho do produto (70-150 bases), tamanho do iniciador (mínimo 19 bases, ótimo 20 bases e máximo 23 bases), temperatura de *melting* (TM) (mínimo 59°C, ótimo 60°C e máximo 61°C) e %GC (mínimo 40%, ótimo 50% e máximo 60%), e os demais parâmetros não foram alterados. Depois, os pares de iniciadores foram avaliados através do *software* NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>) com a finalidade de evitar pares com grandes defeitos estruturais (formação de dímeros, alças, palíndromos e repetições). E, por último, a especificidade dos *primers* escolhidos foi verificada pela análise por alinhamento local através do *software* Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Os pares de iniciadores dos genes constitutivos (dito genes endógenos ou de referência) foram desenhados anteriormente (Bibancos et al., 2007). A lista completa dos *primers* utilizados nesse estudo pode ser observada na Tabela 3.

Os iniciadores desenhados foram testados por PCR convencional e os produtos visualizados em gel de agarose 1% corado com 15 µL brometo de etídio 0,1% utilizando tampão TAE 1X (Ácido acético glacial 20 mM, Tris 40 mM, EDTA 1 mM), onde não foi observada qualquer inespecificidade. As condições da corrida foram 300 mA, 80 V por aproximadamente 75 minutos.

### 3.2.3 Síntese de cDNA

Para a confecção do DNA complementar (cDNA) foram utilizados 500 ng de RNA total em um volume final de 20  $\mu$ L. Primeiramente, em um microtubo de 200  $\mu$ L, foram adicionados água ultra pura® (Qiagen, São Paulo, Brasil), 500 ng de RNA total e 2  $\mu$ L de oligodT, sendo o volume total igual a 12,5  $\mu$ L e o volume da água dependendo da concentração da amostra. Após essa etapa, o microtubo foi aquecido a 65°C por 5 minutos e, em seguida, colocado em gelo para a dissociação das moléculas e sua permanência em fita simples. Posteriormente, foram adicionados 2  $\mu$ L de dNTP mix (10  $\mu$ M), 4  $\mu$ L de Reaction Buffer 5X (Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brasil), 0,5  $\mu$ L de Ribolock RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brasil) e 1  $\mu$ L da enzima RevertAID® Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brasil), totalizando um volume final de 20  $\mu$ L. Por último, o microtubo foi colocado no termociclador Peltier Thermal Cycler (Biocycler) com programação de 50°C por 30 minutos e 85°C por 5 minutos, conforme instruções do fabricante. O cDNA sintetizado foi estocado a -20°C.

### 3.2.4 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

As reações foram realizadas no Laboratório de Genética Animal e Humana (LGAH), Departamento de Biologia Geral, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) através do aparelho CFX 96™ Real Time system (BioRad) utilizando o agente intercalante KAPA SYBR® FAST Universal qPCR Kit (Kapa Biosystems). Primeiramente, uma curva de diluição seriada de 5 concentrações de cDNA (20 ng; 10 ng; 5 ng; 2,5 ng; 1,25 ng) foi realizada para cada gene (genes alvos e constitutivos) a fim de testá-los, sendo que as reações foram pipetadas em triplicata. A eficiência das reações de amplificação foi calculada pelo software Bio-Rad CFX Manager® (Biorad) e o valor aceitável foi estipulado entre o intervalo de 95-105%, não admitindo uma diferença de eficiência maior que 10% entre os genes alvos e seus controles endógenos. A concentração de 10 ng de cDNA foi escolhida, com base na melhor eficiência relativa, para as próximas reações. Um controle negativo (NTC) foi utilizado em todas as reações e o volume da reação foi mantido em 20  $\mu$ L. As curvas de dissociação foram analisadas e nenhum dímero de *primer* ou iniciador com problemas de especificidade foi encontrado.

Para a quantificação relativa dos genes selecionados, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata a partir de: 10  $\mu$ L de KAPA SYBR® FAST Universal qPCR Kit; 1  $\mu$ L de cDNA (10 ng); 0,4  $\mu$ L da solução primers (10  $\mu$ M); 8,2  $\mu$ L de água, sendo que foi adicionado 1,0  $\mu$ L de água ao invés do cDNA no controle negativo da reação, mantendo o volume final de 20  $\mu$ L. As condições da ciclagem foram: 95°C por 3 minutos e

40 ciclos de 95°C por 3 segundos e 60°C por 20 segundos, com adicional da curva de dissociação (curva de *melting*). Os dados de quantificação, valores de *threshold cycle* (Ct), foram exportados para uma planilha no Excel e a quantidade relativa dos transcritos foi calculada conforme a metodologia de Vandesompele e colaboradores (VANDESOMPELE et al., 2002). Nesse cálculo, a média aritmética das réplicas é definida como a quantidade relativa da amostra considerando a eficiência para cada gene. A amostra com o menor Ct é considerada o valor máximo (igual a 1) e usada como referência para o cálculo das quantidades relativas das outras amostras. Essas quantidades relativas são normalizadas dividindo-as pela média geométrica dos dois genes de referência. Por último, os valores de quantificação foram para a análise estatística.

Para a normalização dos níveis de RNA mensageiro dos genes em estudo foram utilizados 2 genes constitutivos (*Actb*, *beta-actin*; *Gapdh*, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*). Esses genes foram selecionados de acordo com a estabilidade (i.e., menor variabilidade) e o nível de transcrição no sistema nervoso central.

### 3.3 Análise estatística

A distribuição da normalidade foi testada através do teste *Shapiro-Wilk* para todas as análises. Devido ao n baixo (C=7; L=4; P=3 e A=6), os genes não puderam ser analisados quanto à distribuição da normalidade. Com isso, para todos os dados foi utilizado o teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste *post-hoc Dunns* comparando todos os pares de colunas a fim de fazer comparações entre os 4 grupos (controle, leve, pesado e adicto) dos genes de interesse e o teste ANOVA de 1-via seguido pelo teste *post-hoc Newman-Keuls*. Os *outliers* foram detectados pelo software GraphPad (<http://graphpad.com/quickcalcs/grubbs2/>) e retirados das análises estatísticas. Correlações de *Pearson*, juntamente com teste t, foram usadas para verificar a relação significativa entre os genes diferencialmente transcritos. As análises foram realizadas com o software GRAPHPAD PRISM 5 (GraphPad Software, Inc.). O nível de significância foi mantido  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Desenho da sequência dos iniciadores

As sequências dos iniciadores dos genes alvo e de referência (Tabela 3) foram desenhadas através de *softwares* disponíveis *on line* já citados acima. Anteriormente às reações de PCR quantitativa em tempo real (qPCR), os iniciadores foram testados por PCR convencional com os *amplicons* sendo visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e foram avaliados através das curvas de dissociação pela qPCR. Nenhum produto inesperado foi amplificado em ambos os procedimentos, confirmando a especificidade dos iniciadores. Além disso, as eficiências de amplificação de cada gene alvo estavam próximas de 100%, com uma diferença inferior a 10% quando comparadas com as eficiências de amplificação dos genes de referência.

Tabela 3. Sequências dos iniciadores utilizados na validação por PCR quantitativa em tempo real. Genes de referência escolhidos para normalizar os dados (*Actb*, *beta-actin*; *Gapdh*, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) e genes alvo (*Camk2n1*, *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1*; *Clic6*, *chloride intracellular channel 6*; *Dcx*, *doublecortin*; *Drd1*, *dopamine receptor D1*; *Drd2*, *dopamine receptor D2*; *Mobp*, *myelin-associated oligodendrocytic basic protein*; *Pcdh20*, *protocadherin 20*; *Pkp2*, *plakophilin 2*; *Prox1*, *prospero homeobox 1*; *Rem2*, *rad and gem related GTP binding protein 2*; *Ttr*, *transthyretin*). As sequências estão representadas no sentido 5' → 3'.

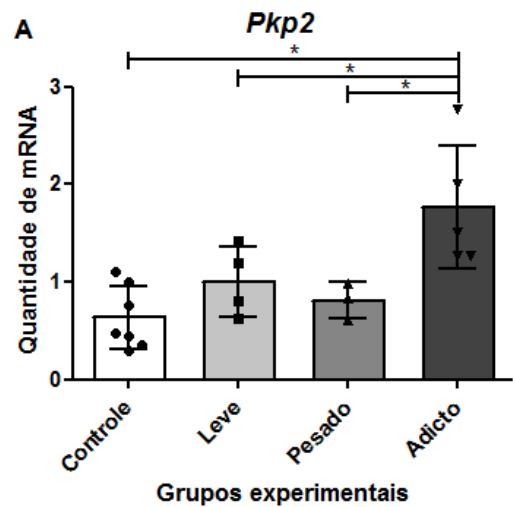
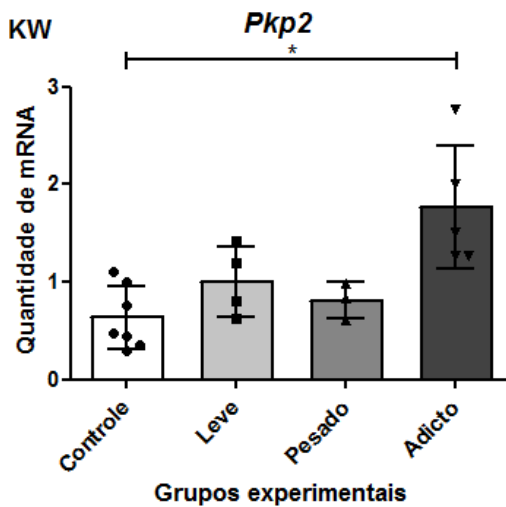
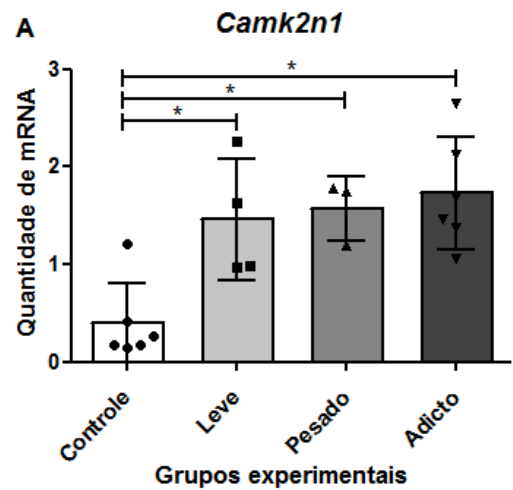
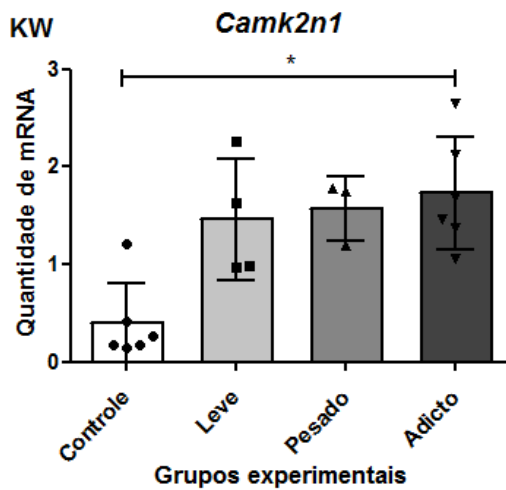
| Gene           | Sequência <i>Forward</i> (5' – 3') | Sequência <i>Reverse</i> (5' – 3') |
|----------------|------------------------------------|------------------------------------|
| <i>Actb</i>    | GTGGGAATGGGTCAGAAGG                | GGTCATCTTTTCACGGTTGG               |
| <i>Gapdh</i>   | AGGAGCGAGACCCCACTAAC               | GTGGTTCACACCCATCACAA               |
| <i>Camk2n1</i> | AACAACCTTCTTCGGGGCTGG              | CAACACATTGTCTTTGGGGCA              |
| <i>Clic6</i>   | TAGAGGAGAAGTTAGTTCCCCCG            | GCAAAAACATCATTTCCTCGCT             |
| <i>Dcx</i>     | ATGATGTGTTTATTGCTTGTGGTC           | CGGCAGATGGATTCCCTTTC               |
| <i>Drd1</i>    | GAGTCGGGGAGCGTGGTCT                | CAATCTCAGTCACTTTTCGGGG             |
| <i>Drd2</i>    | GCCAACCTGAAGACACCACTCA             | CTTGACAGCATCTCCATTTCAG             |
| <i>Mobp</i>    | TCAAATGAGAGCAAGACAAGCG             | AGGAAGGTGAAGGGTGGGC                |
| <i>Pcdh20</i>  | CACCCGTGCCTGGATATGG                | CACGAAGAGGAAAAGCAGAAAAC            |
| <i>Pkp2</i>    | TCATTGGTCCACTATGTCAGAGG            | GCTGGTAGGAGAGGTTATGAAGAA           |
| <i>Prox1</i>   | GCTCCAACATGCTGAAGACCTAC            | TCACGAAATTGCTGAACCAC               |
| <i>Rem2</i>    | CCGTAGCACTTTGTTCTTCCAG             | CCCGCTCAGGTCCAACCTCT               |
| <i>Ttr</i>     | GACACTTGGCATTTCCTCGT               | CGATGGTGTAGTGGCGATGG               |

## 4.2 Quantificação relativa dos transcritos por qPCR

Amostras da região do córtex pré-frontal dos animais representantes de todos os grupos experimentais (Controle, n = 7; Leve, n = 4; Pesado, n = 3; Adicto, n = 6, exceto quando *outliers* foram encontrados na análise) foram utilizadas para os experimentos de quantificação relativa dos genes alvo através da qPCR. Para os cálculos de quantidade relativa de transcritos, foi utilizada uma metodologia de normalização (Vandesompele et. al., 2002) que engloba os valores das eficiências de amplificação dos genes de interesse e endógenos, e faz uso de um calibrador interno, na qual o valor de referência é fixado em uma unidade arbitrária, que é base para o cálculo das demais amostras. Os resultados dos cálculos para todos os genes foram avaliados tanto pelo teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste *post-hoc Dunns* como pelo teste ANOVA de 1-via seguido pelo teste *post-hoc Newman-Keuls* ao nível de 5%. Os genes *Camk2n1*, *Drd2* e *Pkp2* apresentaram resultados diferentes em cada teste estatístico, por isso eles foram apresentados em dois gráficos cada um, sendo o teste não paramétrico identificado por KW (*Kruskal-Wallis*) e o teste paramétrico identificado por A (ANOVA de 1-via).

No córtex pré-frontal, região responsável pelo comportamento de *craving* e perda de controle no fenótipo de adição, foram avaliados onze genes que estavam presentes no resultado do microarranjo como diferencialmente transcritos no grupo Leve comparado ao Adicto e com log *FoldChange* superior a 2. Todos os resultados das diferentes quantificações ou tendências estão apresentados na Figura 5. No teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* (KW) seguido pelo teste *post-hoc Dunns*, a análise da quantidade dos transcritos referente aos genes *Camk2n1* e *Pkp2* (KW = 9,947; p<0,05 e KW = 11,39; p<0,01, respectivamente) mostrou uma diminuição na quantidade de mRNA nos animais do grupo Controle em relação aos animais do grupo Adicto, evidenciando o perfil hipo-regulado neste primeiro grupo. No teste ANOVA 1-via seguido pelo teste *post-hoc Newman-Keuls*, o gene *Camk2n1* (F (3,18) = 8,048; p<0,01) apresentou um perfil hipo-regulado no grupo Controle comparado aos demais grupos e o gene *Pkp2* (F (3,18) = 7,315; p<0,01) apresentou um perfil hiper-regulado no grupo Adicto comparado aos demais grupos. No teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste *post-hoc Dunns*, o gene *Drd2* (KW = 8,227; p<0,05) se mostrou hiper-regulado no grupo Adicto em comparação com o grupo Leve, corroborando com os dados do microarranjo, além de mostrar uma tendência a hiper-regulação do grupo Adicto comparado com os grupos Controle e Pesado. Enquanto que no teste ANOVA 1-via seguido pelo teste *post-hoc Newman-Keuls*, o gene *Drd2* (F (3,14) = 2,470; p=0,1165) apresentou uma tendência a hiper-regulação no grupo Adicto comparado com os demais grupos. Independente do teste, o gene *Prox1* (KW = 7,905; p<0,05 e F (3,18)

= 3,624;  $p < 0,05$ ) se mostrou hiper-regulado no grupo Pesado em relação ao grupo Controle. Apesar do gene *Mobp* (KW = 5,825,  $p = 0,1205$  e  $F(3,16) = 1,431$ ;  $p = 0,2787$ ) não apresentar diferença estatística significativa, ele mostrou uma tendência para hipo-regulação nos animais do grupo Leve comparado com os demais grupos (Controle, Pesado e Adicto). Nos demais genes, *Clic6* (KW = 1,928;  $p = 0,5875$  e  $F(3,15) = 0,7199$ ;  $p = 0,5591$ ), *Dcx* (KW = 3,676;  $p = 0,2987$  e  $F(3,19) = 1,275$ ;  $p = 0,3165$ ), *Drd1* (KW = 1,860;  $p = 0,6020$  e  $F(3,17) = 1,174$ ;  $p = 0,3549$ ), *Pcdh20* (KW = 2,539;  $p = 0,4683$  e  $F(3,17) = 1,117$ ;  $p = 0,3756$ ), *Rem2* (KW = 4,719;  $p = 0,1935$  e  $F(3,17) = 1,647$ ;  $p = 0,2237$ ) e *Ttr* (KW = 2,265;  $p = 0,5193$  e  $F(3,16) = 0,8907$ ;  $p = 0,4718$ ), não foi possível evidenciar diferença estatística significativa entre todos os grupos testados (ANEXO D).



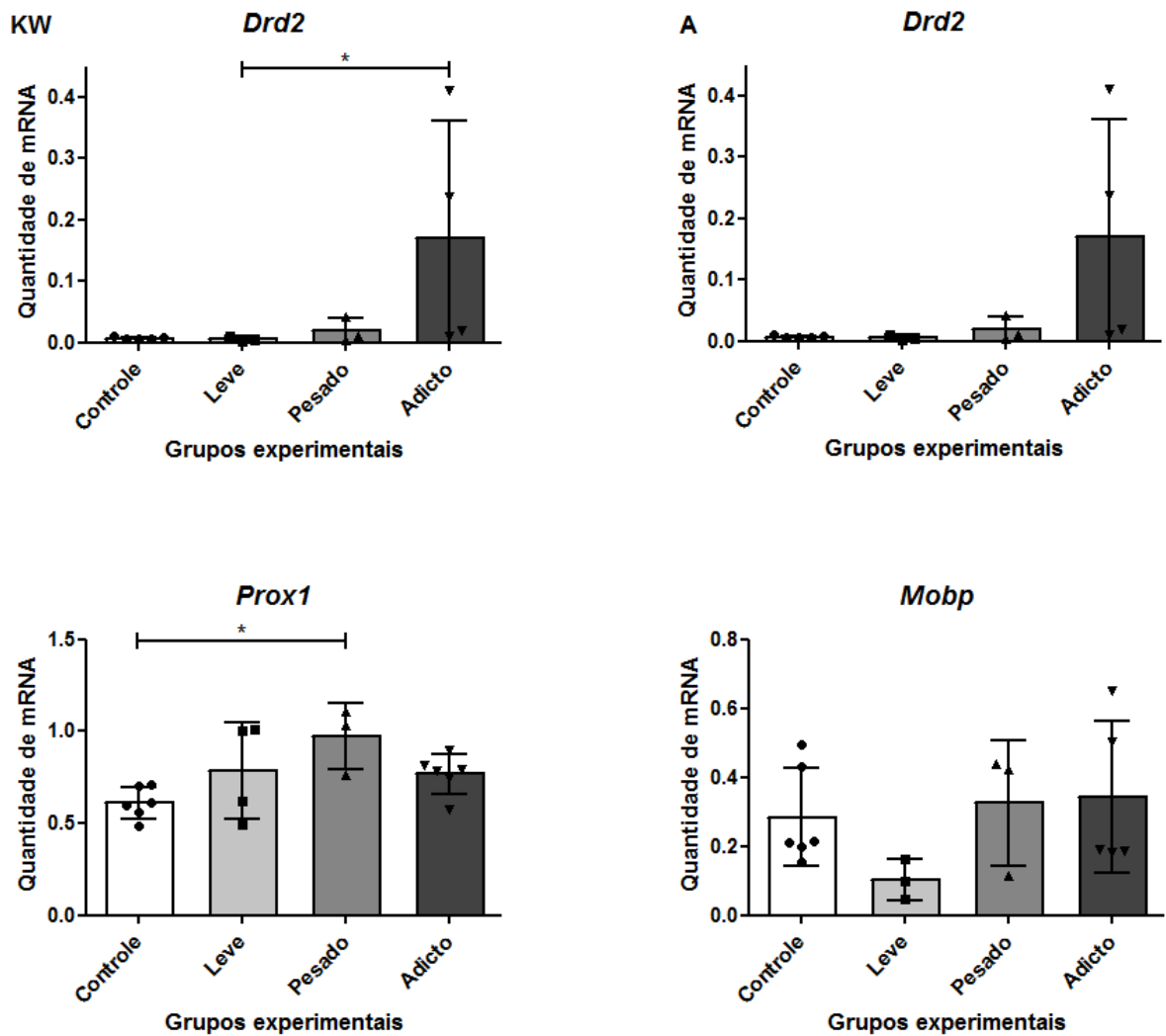


Figura 5. Quantidade relativa de mRNA dos genes com diferença estatística significativa no córtex pré-frontal dos grupos experimentais expressas como média e desvio padrão. Ordenada: Quantidade de mRNA em unidades arbitrárias; Abscissa: Grupos experimentais. Todos os genes foram avaliados tanto pelo teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste *post-hoc Dunns* como pelo teste ANOVA de 1-via seguido pelo teste *post-hoc Newman-Keuls* ao nível de 5%, no entanto, os genes *Camk2n1*, *Drd2* e *Pkp2* apresentaram resultados diferentes em cada teste estatístico, por isso eles foram apresentados em dois gráficos cada um, sendo o teste não paramétrico identificado por KW (*Kruskal-Wallis*) e o teste paramétrico identificado por A (ANOVA de 1-via). O asterisco (\*) indica diferença estatística em  $p < 0,05$ ; *Camk2n1*, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1; *Pkp2*, plakophilin 2; *Drd2*, dopamine receptor D2; *Prox1*, prospero homeobox 1; *Mobp*, myelin-associated oligodendrocytic basic protein.

#### 4.3 Análise de correlação

O coeficiente de correlação ( $r$ ) é uma análise estatística descritiva que mede o grau de relação linear, positiva ou negativa, entre duas variáveis quantitativas. Essa análise foi realizada a fim de verificar a existência ou ausência de uma correlação entre os genes diferencialmente transcritos. Com isso, a quantidade relativa de mRNA de cada um dos genes foi comparada de forma generalizada, independente do fenótipo, e de forma pareada dentro de um mesmo grupo (Figura 6 e Tabela 4).

Diagrama de dispersão independente do fenótipo

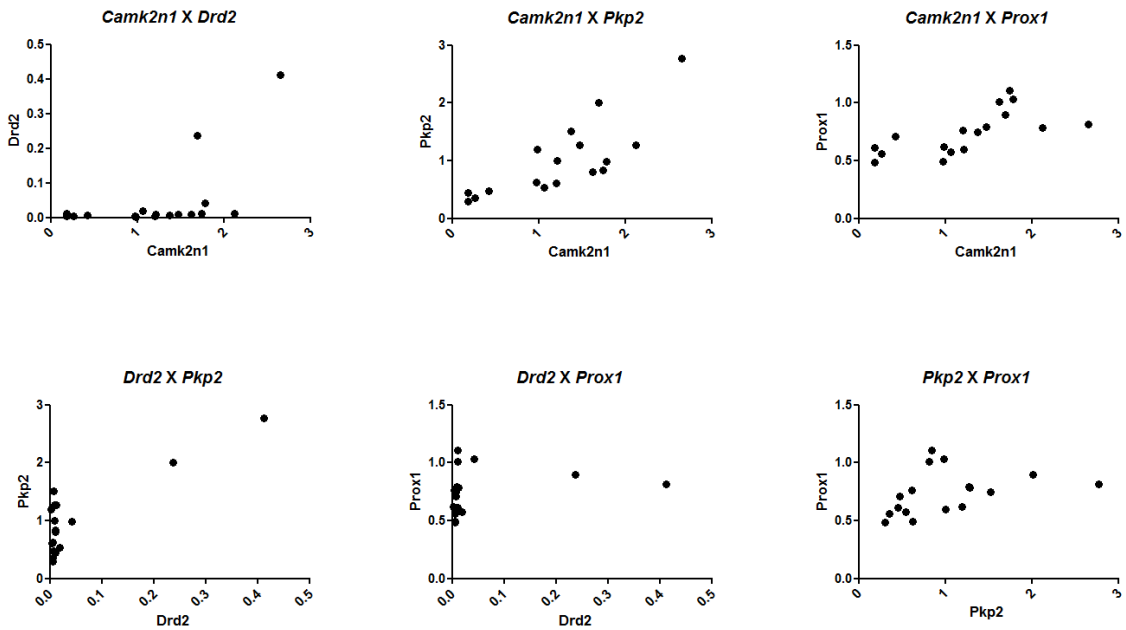


Diagrama de dispersão no grupo Controle

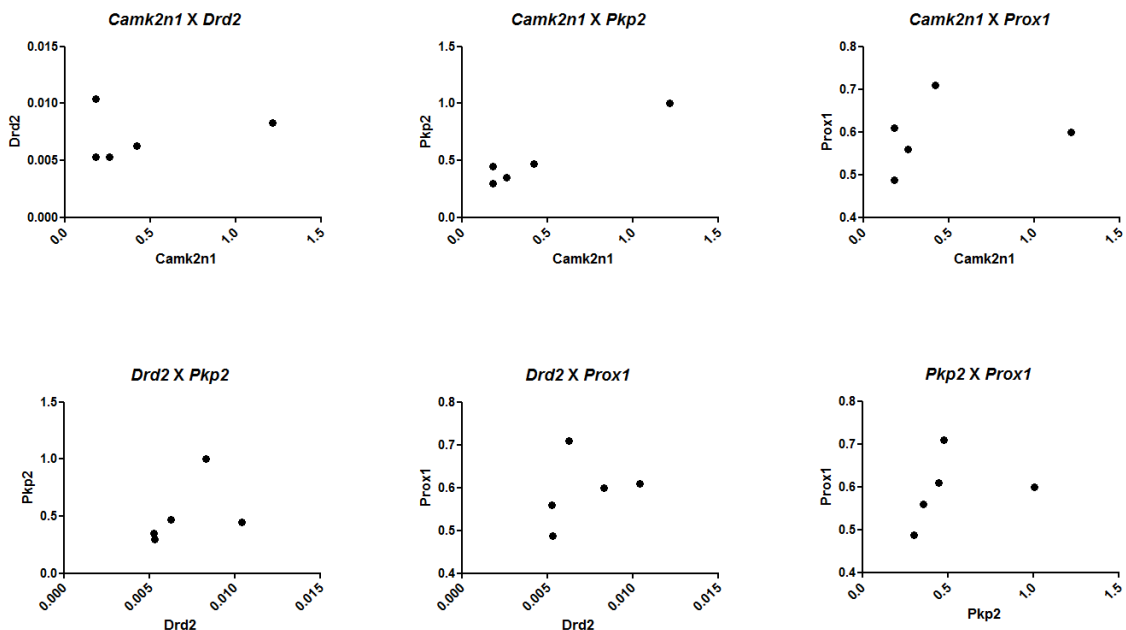




Diagrama de dispersão no grupo Leve

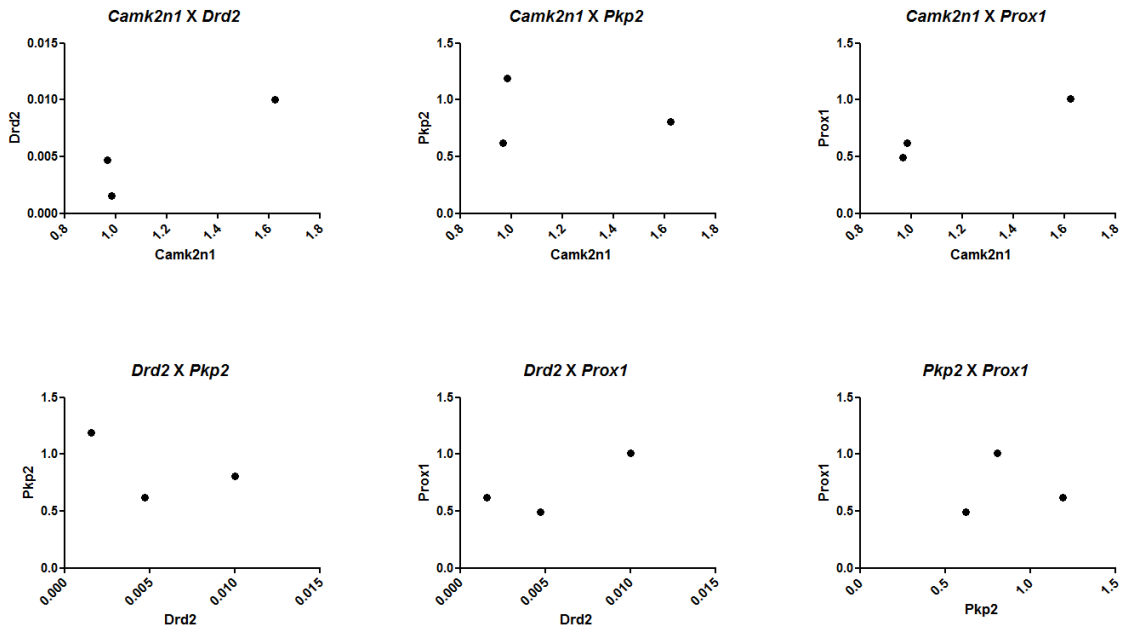


Diagrama de dispersão no grupo Pesado

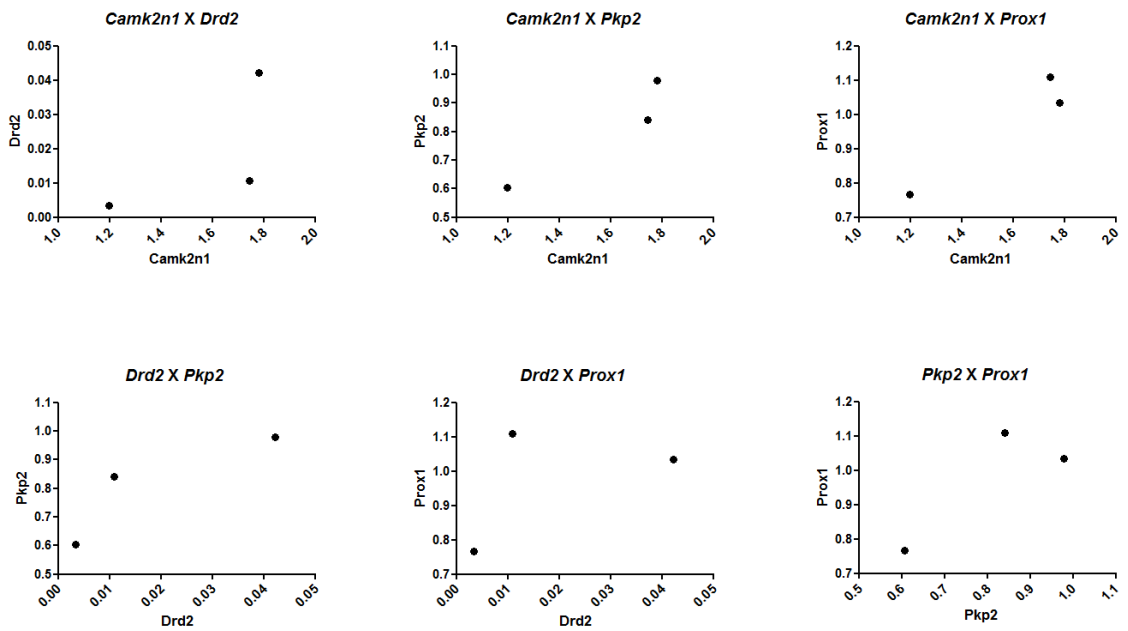


Diagrama de dispersão no grupo Adicto

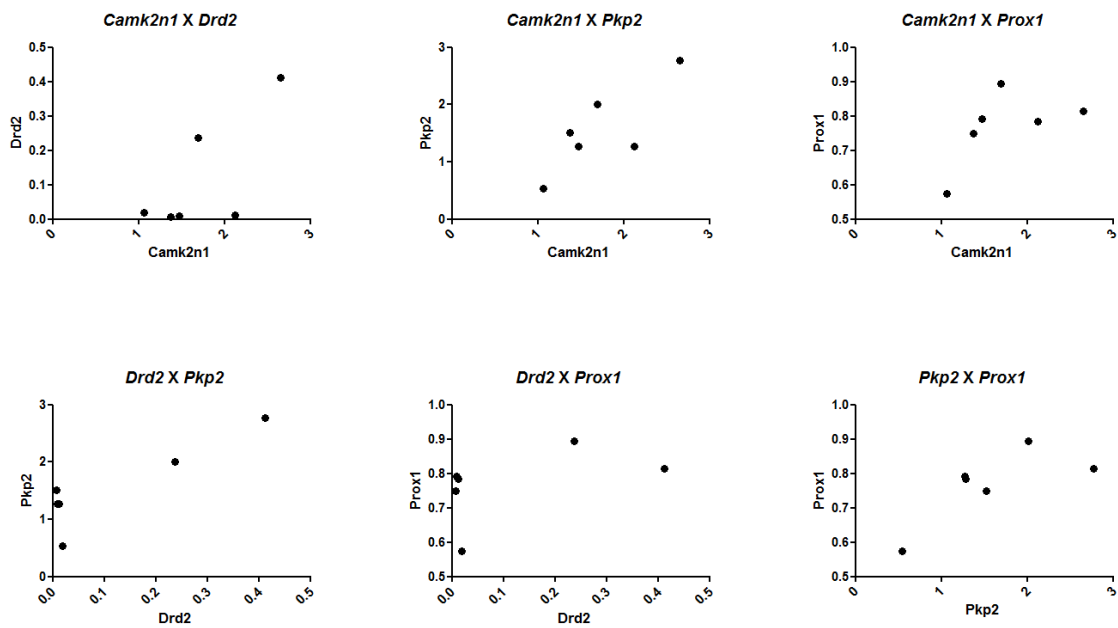


Figura 6. Diagrama de dispersão dos dados da quantidade de mRNA em unidades arbitrárias de dois genes, independente do fenótipo e dentro dos grupos. Esse gráfico de dispersão mostra o padrão de relacionamento entre dois genes, o que permite verificar a existência ou não de relação entre eles. *Camk2n1*, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1; *Drd2*, dopamine receptor D2; *Pkp2*, plakophilin 2; *Prox1*, prospero homeobox 1.

Tabela 4. Correlação dos genes diferencialmente transcritos entre os grupos no córtex pré-frontal resultantes da técnica de qPCR: (*Camk2n1*, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1; *Drd2*, dopamine receptor D2; *Pkp2*, plakophilin 2; *Prox1*, prospero homeobox 1). Correlação de *Pearson* juntamente com teste t, na qual o asterisco (\*) refere-se à diferença estatística em  $p < 0,05$ . Valores modulares de 0 a 0,3 indicam fraca correlação; de 0,3 a 0,6 indicam correlação moderada; de 0,6 a 0,9 indicam forte correlação; e de 0,9 a 1,0 indicam correlação muito forte. Valores negativos correspondem a uma correlação pareada em sentido oposto e valores positivos correspondem a uma correlação no mesmo sentido.

A) Correlação de *Pearson* independente do fenótipo (n=17)

|         | Camk2n1 | Drd2  | Pkp2  | Prox1 |
|---------|---------|-------|-------|-------|
| Camk2n1 | 1,00    | *0,58 | *0,79 | *0,67 |
| Drd2    |         | 1,00  | *0,84 | 0,23  |
| Pkp2    |         |       | 1,00  | 0,37  |
| Prox1   |         |       |       | 1,00  |

B) Correlação de *Pearson* no grupo Controle (n=5)

|         | Camk2n1 | Drd2 | Pkp2  | Prox1 |
|---------|---------|------|-------|-------|
| Camk2n1 | 1,00    | 0,22 | *0,98 | 0,22  |
| Drd2    |         | 1,00 | 0,43  | 0,30  |
| Pkp2    |         |      | 1,00  | 0,27  |
| Prox1   |         |      |       | 1,00  |

C) Correlação de *Pearson* no grupo Leve (n=3)

|         | Camk2n1 | Drd2 | Pkp2  | Prox1 |
|---------|---------|------|-------|-------|
| Camk2n1 | 1,00    | 0,92 | -0,17 | 0,98  |
| Drd2    |         | 1,00 | -0,54 | 0,82  |
| Pkp2    |         |      | 1,00  | 0,04  |
| Prox1   |         |      |       | 1,00  |

D) Correlação de *Pearson* no grupo Pesado (n=3)

|         | Camk2n1 | Drd2 | Pkp2 | Prox1 |
|---------|---------|------|------|-------|
| Camk2n1 | 1,00    | 0,69 | 0,95 | 0,99  |
| Drd2    |         | 1,00 | 0,88 | 0,56  |
| Pkp2    |         |      | 1,00 | 0,89  |
| Prox1   |         |      |      | 1,00  |

E) Correlação de *Pearson* no grupo Adicto (n=6)

|         | Camk2n1 | Drd2 | Pkp2  | Prox1 |
|---------|---------|------|-------|-------|
| Camk2n1 | 1,00    | 0,73 | *0,81 | 0,57  |
| Drd2    |         | 1,00 | *0,89 | 0,50  |
| Pkp2    |         |      | 1,00  | 0,75  |
| Prox1   |         |      |       | 1,00  |

Ao serem comparados independentemente do fenótipo, os genes *Camk2n1-Drd2* ( $r = 0,58$ ;  $p < 0,05$ ) mostraram uma relação positiva e moderada, enquanto que os genes *Camk2n1-Pkp2* ( $r = 0,79$ ;  $p < 0,01$ ), *Camk2n1-Prox1* ( $r = 0,67$ ;  $p < 0,01$ ) e *Drd2-Pkp2* ( $r = 0,83$ ;  $p < 0,01$ ) mostraram uma forte relação linear positiva entre eles. Analisando os genes dentro de cada grupo, o Adicto foi o único que apresentou uma forte correlação positiva e significativa entre os genes *Drd2-Pkp2* ( $r = 0,89$ ;  $p < 0,05$ ), e indícios de forte correlação positiva entre os genes *Camk2n1-Drd2* ( $r = 0,73$ ;  $p = 0,097$ ) e *Pkp2-Prox1* ( $r = 0,75$ ;  $p = 0,089$ ). Analisando as semelhanças entre as correlações nos grupos, observou-se uma forte

correlação positiva e significativa entre os genes *Camk2n1-Pkp2* nos grupos Adicto ( $r = 0,81$ ;  $p < 0,05$ ) e Controle ( $r = 0,98$ ;  $p < 0,01$ ). Além disso, foi verificado indícios de forte correlação positiva entre os genes *Camk2n1-Prox1* nos grupos Leve ( $r = 0,98$ ;  $p = 0,137$ ) e Pesado ( $r = 0,99$ ;  $p = 0,102$ ).

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo é parte de um projeto maior desenvolvido pelo nosso laboratório e grupo (LGAH) na UFMG em parceria com a UFPR utilizando um modelo animal de livre escolha de consumo de etanol. Na fase inicial do projeto, Ribeiro e colaboradores realizaram o experimento classificando comportamentalmente os camundongos em quatro grupos: controle, leve, pesado e adicto, identificaram genes diferencialmente transcritos entre animais do grupo leve e adicto na região da amígdala através da técnica de microarranjo e avaliaram onze desses genes por meio da técnica de qPCR em tempo real, sendo que seis apresentaram diferença na quantidade relativa de transcritos entre os quatro grupos (Ribeiro et. al., 2012). Posteriormente, Silva e Silva realizou a técnica de microarranjo identificando os genes diferencialmente transcritos entre os animais do grupo leve e adicto nas regiões do núcleo estriado e do córtex pré-frontal. Neste estudo, nós assumimos a validação dos genes diferencialmente transcritos no córtex pré-frontal identificados pelo microarranjo através da qPCR em tempo real.

O córtex pré-frontal (PFC) é a região que desempenha um papel essencial na função executiva, incluindo a regulação da fissura e da recaída que são comportamentos subjetivos característicos do último estágio do ciclo da adição (Koob & Volkow, 2010; Hall & Guyton, 2011). Por esse motivo, escolhemos estudar essa região a fim de verificar genes que possam estar envolvidos com o desenvolvimento do fenótipo adicto relacionado ao etanol. Na análise do microarranjo do PFC, foram encontrados 249 genes normalizados e com diferença quantitativa de transcritos entre os grupos leve e adicto (ANEXO C). Dessa lista, onze genes foram selecionados para confirmação devido às suas funções: a maioria codifica proteínas de membrana, sendo predominantemente localizadas na região das fendas sinápticas, local onde ocorrem as neurotransmissões que medeiam os efeitos do etanol. Os genes *Camk2n1* e *Drd2* codificam proteínas ligantes de proteínas quinase; *Drd2*, *Drd1* e *Pcdh20* codificam proteínas ligantes de íons, sendo que os dois primeiros são receptores de neurotransmissor acoplados à proteína G; o gene *Clic6* codifica uma proteína ligante à receptores de dopamina; os genes *Dcx* e *Pkp2* codificam proteínas ligantes de proteínas do citoesqueleto/junções aderentes e, o primeiro, também está envolvido com transdução de sinal assim como os genes *Rem2* e *Ttr*; o gene *Mobp* codifica uma proteína constituinte da bainha de mielina; e o gene *Prox1* codifica uma proteína ligante a outras proteínas e que regula a transcrição de outros genes. Além disso, todos esses genes apresentaram um log FC superior a 2 nos dados do microarranjo (ANEXO C).

Como pôde ser observado, a maioria desses genes são codificadores de proteínas de membrana que se ligam à íons e outras proteínas, além de codificarem proteínas do citoesqueleto e relacionadas com a ligação à receptores. Sabe-se que vários receptores glutamatérgicos, GABAérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos, além de vários canais iônicos, como canais de cálcio voltagem-dependente e de potássio, têm suas funções diretamente moduladas pelo álcool e que essa modulação depende da concentração etílica e da composição da subunidade de um canal ou receptor particular, podendo levar a uma cascata de eventos sinápticos envolvendo interação complexa de diversos neurotransmissores (Vengeliene et al., 2008). Além do mais, a exposição ao etanol induz modificações nos níveis dos diferentes fatores que regulam a organização dos componentes do citoesqueleto, estrutura que desempenha um papel crucial na formação, maturação e plasticidade das espinhas dendríticas (Romero et al., 2013; Erdozain et al., 2014).

Como resultado da técnica de qPCR em tempo real, os genes *Camk2n1*, *Pkp2*, *Drd2* e *Prox1* apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os grupos, e o gene *Mobp* evidenciou uma tendência sugestiva (Figura 5). Já os demais genes, *Clic6*, *Dcx*, *Drd1*, *Pcdh20*, *Rem2* e *Ttr* não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os grupos (ANEXO D).

No teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste *post-hoc Dunns*, o gene *Camk2n1* apresentou um perfil de transcritos hiper-regulado nos animais adictos quando comparado com os animais controles, além disso, os demais grupos (leve e pesado) também apresentaram uma tendência a hiper-regulação em relação ao controle (Figura 5 – *Camk2n1* A). No teste ANOVA 1-via seguido pelo teste *post-hoc Newman-Keuls*, o gene *Camk2n1* apresentou um perfil hipo-regulado no grupo Controle comparado aos demais grupos (Figura 5 – *Camk2n1* B). Esse gene codifica uma proteína que bloqueia a atividade da proteína quinase II dependente de cálcio/calmodulina (CaMKII) afetando sua função catalítica ou se ligando ao seu sítio de ligação de cálcio/calmodulina (Wang et al., 2008). Sabe-se que a CaMKII desempenha um papel importante na neurotransmissão glutamatérgica e regulação de importantes funções neuronais, que inclui a modulação da atividade de canais iônicos, expressão gênica, plasticidade sináptica e síntese e liberação de neurotransmissores, além de estar envolvida no desenvolvimento cerebral e nas diversas formas de aprendizagem e memória (Yamauchi & Fujisawa, 1980; Malenka et al., 1989; Malinow et al., 1989; Braun & Schulman, 1995; Fink & Meyer, 2002). A CaMKII fosforila a espinofilina, uma proteína *scaffold* que se liga à proteína fosfatase 1 (PP1) e aos filamentos de actina que estão localizados abaixo da superfície das espinhas dendríticas interagindo direta ou indiretamente com proteínas de sinalização e receptores glutamatérgicos

ionotrópicos, como AMPA (do inglês  *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) e NMDA (Feng et al., 2000; Grossman et al., 2004; Okamoto et al., 2009). Estudos anteriores encontraram um aumento na quantidade de transcritos que codificam a proteína CaMKII em diferentes regiões cerebrais, incluindo córtex cerebral, amígdala e núcleo accumbens nos animais que receberam exposição crônica ao etanol comparado às mesmas regiões cerebrais dos animais controles (Mahadev et al., 2001; McBride et al., 2009; Salling et al., 2014). A abundância da CaMKII promove a redução da afinidade da espinofilina pelos filamentos de actina, promovendo a liberação desses filamentos e, conseqüentemente, permitindo a flexibilidade do transiente do citoesqueleto, posterior remodelação da estrutura da espinha dendrítica e a influência da localização subcelular das proteínas e receptores AMPA e NMDA nos neurônios (Feng et al., 2000; Grossman et al., 2004; Okamoto et al., 2009). Diante do exposto, o perfil do gene *Camk2n1* encontrado no presente estudo mostrou-se estar relacionado com a presença do etanol e pode ser a consequência de um processo compensatório ao aumento da proteína CaMKII via liberação de cálcio pela exposição crônica ao álcool, que por sua vez, reduz a afinidade da espinofilina pelos filamentos de actina, reorganizando o citoesqueleto e desregulando a sinalização glutamatérgica pós-sináptica.

No teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste *post-hoc Dunns*, o gene *Pkp2* apresentou um perfil de transcritos hiper-regulado nos animais adictos quando comparado com os animais controles, além disso, os demais grupos (leve e pesado) também apresentaram uma tendência para hipo-regulação em relação ao adicto (Figura 5 – *Pkp2* A). No teste ANOVA 1-via seguido pelo teste *post-hoc Newman-Keuls*, o gene *Pkp2* apresentou um perfil hiper-regulado no grupo Adicto comparado aos demais grupos (Figura 5 – *Pkp2* B). Esse gene codifica uma proteína, integrante da família das placofilinas, que está envolvida com a sinalização celular, com a organização do citoesqueleto, na montagem/manutenção das junções desmossomais e dentro do núcleo (Schmidt & Jäger, 2005). Apesar de não ter na literatura nenhuma interação da proteína PKP2 com outras proteínas no cérebro ou seu possível envolvimento com a perda de controle sobre a ingestão do etanol, sabe-se que essa proteína interage com a conexina 43 nas junções GAP em outros tecidos e que astrócitos possuem tanto conexina 43 quanto essas junções na qual participam da inserção de receptores AMPA, modulam a liberação de neurotransmissores e a excitabilidade neuronal, e removem potássio e glutamato extracelular durante atividade sináptica (Sato et al., 2011; Dere & Zlomuzica, 2012; Moore & O'Brien, 2015). Estudos anteriores reportaram que o alcoolismo reduz a quantidade de astrócitos no hipocampo e os níveis da conexina 43 no córtex frontal (Korbo, 1999; Miguel-Hidalgo et al., 2014). Diante do exposto, e de acordo com o perfil de regulação transcricional

do gene *Pkp2* encontrado no presente estudo, podemos supor que este gene esteja envolvido com a perda de controle na ingestão do etanol, visto que a diferença foi observada somente nos animais do grupo adicto e que sua hiper-regulação pode ser consequência de um processo compensatório à redução de astrócitos e dos níveis da conexina 43 diante da exposição ao etanol. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar o envolvimento deste gene na adição.

No teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste *post-hoc Dunns*, o gene *Drd2* apresentou um perfil de transcritos hiper-regulado nos animais adictos quando comparado com os animais leves, além disso, os demais grupos (controle e pesado) também apresentaram uma tendência a hipo-regulação em relação ao adicto (Figura 5 – *Drd2* A). No teste ANOVA 1-via seguido pelo teste *post-hoc Newman-Keuls*, o gene *Drd2* apresentou uma tendência a hiper-regulação no grupo Adicto comparado aos demais grupos (Figura 5 – *Drd2* B). Esse gene codifica o receptor D2 de dopamina acoplado à proteína G e está relacionado na patofisiologia de várias doenças psiquiátricas principais, como esquizofrenia e adição de drogas, sendo altamente susceptível à regulação compensatória ou adaptativa em resposta a vários estímulos (Amar et al., 2008; Jeong et al., 2013). Além disso, ele aumenta a capacidade transcricional do complexo BMAL1/CLOCK que controla o ritmo circadiano (Yujnovsky et al., 2006). Sabe-se que perturbações nos relógios periféricos do hipocampo, córtex pré-frontal, amígdala ou VTA possivelmente causam a ligação entre transtornos psicóticos e desregulação dos ritmos circadianos, e que o etanol provoca a hipo-regulação do gene *Bmal1* no hipotálamo, VTA e NAc (Menet & Rosbash, 2011; McBride et al., 2013; Ozburn et al., 2013; Gonzalez et al., 2014). Estudos anteriores também reportaram que a ingestão aguda de etanol causa a liberação de dopamina (DA) no núcleo accumbens (NAc) e, seu consumo crônico, causa a hipo-regulação dos receptores D2 no NAc e hipocampo, enquanto que no córtex pré-frontal, o álcool reduz a inervação dopaminérgica e, conseqüentemente, os níveis extracelulares de DA (Yoshimoto et al., 1991; Engleman et al., 2006; Bice et al., 2008; Huang et al., 2010). O perfil hiper-regulado do gene *Drd2* encontrado nesse estudo corrobora com um trabalho na literatura que encontrou uma hiper-regulação no gene *Drd2* nos animais que receberam tratamento com etanol intermitente crônico comparado com os animais controles no córtex pré-frontal (Osterndorff-Kahanek et al., 2013). Diante do exposto, esse perfil possivelmente está envolvido com a perda de controle na ingestão do etanol, visto que esse perfil foi observado somente nos animais do grupo adicto, e pode ter uma relação de causa/consequência dentro de um processo adaptativo, nessa região, com a redução da inervação dopaminérgica, dos níveis de dopamina e com a hipo-regulação do gene *Bmal1*.



Tanto no teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste *post-hoc Dunns* quanto no teste ANOVA 1-via seguido pelo teste *post-hoc Newman-Keuls*, o gene *Prox1* apresentou um perfil de transcritos hiper-regulado nos animais do grupo Pesado quando comparado com os animais do grupo Controle (Figura 5 – *Prox1 A/B*). Esse gene codifica um proteína membro da família do fator de transcrição homeobox envolvida nos processos de determinação do destino celular e de regulações, incluindo transcricional, neurogênese em adultos, ritmo circadiano, entre outras funções (Abe, 2000; Karalay et al., 2011; Iwano et al., 2012; Takeda & Jetten, 2013). Sabe-se que a  $\beta$ -catenina é uma proteína multifuncional que pode se translocar para o núcleo atuando como co-ativadora através da via de sinalização Wnt canônica. Uma vez no núcleo, ela interage com a família TCF/LEF dos fatores de transcrição regulando, dessa forma, o gene *Prox1* (Karalay et al., 2011; Narasipura et al., 2011). A proteína do gene *Prox1*, por sua vez, reprime a atividade transcricional mediada pelos receptores órfãos relacionados ao retinóide  $\alpha$  e  $\gamma$  (ROR  $\alpha/\gamma$ ), contribuindo para a hipo-regulação de vários genes envolvidos no ritmo circadiano (Takeda & Jetten, 2013). A proteína ROR $\alpha$  ativa diretamente a transcrição do gene *Arntl* (do inglês, *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like*, também conhecida como *Bmal1*), na qual a proteína traduzida se liga à proteína CLOCK (do inglês, *circadian locomotor output cycles kaput*) formando o complexo BMAL1/CLOCK que regula a ritmicidade circadiana (Akashi & Takumi, 2005; Langmesser et al., 2008). Além disso, sabe-se que o córtex pré-frontal possui relógios periféricos que, quando perturbados, podem causar a conexão entre desregulação dos ritmos circadianos e transtornos psicóticos (Menet & Rosbash, 2011). Estudos anteriores revelaram que o abuso crônico do álcool provoca a hiper-regulação da  $\beta$ -catenina no córtex frontal superior de humanos e a hipo-regulação do gene *Bmal1* no hipotálamo, VTA e Nac (Al-Housseini et al., 2008; McBride et al., 2013; Ozburn et al., 2013; Gonzalez et al., 2014). Diante do exposto, o perfil do gene *Prox1* encontrado no presente estudo possivelmente está relacionado com a quantidade de álcool consumida, visto que os animais do grupo Pesado foram os que mais consumiram etanol durante a fase de aquisição (ANEXO A) e pode ser consequência do aumento da proteína  $\beta$ -catenina mediante a ingestão excessiva de etanol. Esse aumento pode elevar a quantidade de complexo  $\beta$ -catenina-TCF/LEF que irá hiper-regular o gene *Prox1*, contribuindo para a inibição da atividade transcricional de ROR $\alpha$  e, conseqüentemente, para a hipo-regulação do gene *Bmal1*, perturbando o ritmo circadiano.

Embora o gene *Mobp* não tenha apresentado uma diferença estatística significativa, ele mostrou uma tendência à hipo-regulação nos animais do grupo Leve quando comparado com os demais grupos (Controle, Pesado e Adicto) (Figura 5 - *Mobp A*). Esse gene codifica uma proteína básica de oligodendrócitos associada à mielina que se expressa

exclusivamente no sistema nervoso central (SNC) e se localiza na linha densa principal da mielina compacta, sendo a terceira proteína da mielina mais abundante no SNC de mamíferos (Yamamoto et al., 1994; Yool et al., 2002). A proteína MOBP desempenha um papel na compactação, manutenção da integridade, remielinização e na cinética de rotação da bainha de mielina (Baumann & Pham-Dinh, 2001; Montague et al., 2006; Han et al., 2013). Estudos anteriores demonstraram que a exposição crônica ao etanol causa modificações estruturais e funcionais na substância branca do cérebro, alterações na morfologia e/ou redução da bainha de mielina, morte dos oligodendrócitos e hipo-regulação das proteínas associadas à mielina no córtex pré-frontal, incluindo a proteína básica da mielina (MBP, do inglês *myelin basic protein*) e a proteína MOBP (Lewohl et al., 2000; Yool et al., 2002; Zahr et al., 2011; Alfonso-Loeches et al., 2012; Kim et al., 2015). Diante do exposto, o perfil do gene *Mobp* encontrado nos animais do grupo Leve corrobora com a literatura, na qual esses animais, diante do consumo etílico crônico, apresentaram uma tendência para hipo-regulação desse gene. No entanto, o perfil encontrado nos animais dos grupos Pesado e Adicto pode ser uma resposta adaptativa à hipo-regulação do gene *Mobp* em consequência da grande quantidade de ingestão de etanol.

Com o objetivo de verificar o perfil de interação entre os genes diferencialmente transcritos que possam estar relacionados com o fenótipo adicto, a análise de correlação de *Pearson* foi realizada. Essa análise mostra como os genes se correlacionam entre eles dentro de cada grupo. As análises das quantidades de mRNA mostraram uma forte correlação positiva e significativa entre os genes *Camk2n1-Pkp2* nos animais dos grupos Controle e Adicto. Relacionando os dados de expressão à análise de correlação, verifica-se que os animais do grupo Adicto apresentaram uma hiper-regulação para os genes *Camk2n1* e *Pkp2* quando comparados com os animais do grupo Controle, e que esses dois genes são co-regulados. Sabe-se que a proteína quinase CAMKII fosforila a conexina 43 nos astrócitos da medula espinhal de camundongos e que o etanol hiper-regula a proteína CAMKII e reduz os astrócitos no hipocampo e os níveis de conexina 43 no córtex frontal (De Pina-Benabou et al., 2001). Com os níveis reduzidos, a conexina 43 pode causar uma resposta compensatória de hiper-regulação das proteínas PKP2 e CAMKII que, por sua vez, causará uma hiper-regulação da proteína CAMK2N1 nos animais que possuem a perda de controle no consumo do etanol quando comparados aos animais controles. Além disso, houve uma forte correlação positiva e significativa entre os genes *Drd2-Pkp2* apenas nos animais do grupo Adicto. Relacionando os dados de expressão à análise de correlação, verifica-se que os animais do grupo Adicto apresentaram um aumento na transcrição dos genes *Drd2* e *Pkp2*, e que esses dois genes são co-regulados. Sabe-se que o receptor DRD2 está presente também nos oligodendrócitos e a proteína PKP2 pode estar interagindo com a

conexina 43 no astrócitos, e que a ingestão crônica de etanol causa a redução dessas duas células da glia (Howard et al., 1998; Korbo, 1999). Nos animais adictos, essa correlação aumentada pode estar relacionada com o aumento da PKP2 e DRD2 como uma resposta compensatória à redução das células da glia nos animais que tiveram perda de controle.

## 6. CONCLUSÕES

Com esse trabalho podemos concluir que a ingestão crônica de etanol está relacionada com alterações transcricionais no córtex pré-frontal nesse modelo animal, na qual podemos ver diferentes genes com diferentes padrões associados à presença do álcool, como visto nos genes *Camk2n1* e *Mobp*, à perda de controle no consumo de etanol, como visto nos genes *Pkp2* e *Drd2*, e à quantidade de solução etílica consumida, como visto no gene *Prox1*.

Pela primeira vez, demonstramos o possível envolvimento do gene *Pkp2* na perda de controle sobre o consumo de etanol. No entanto, apenas as alterações nos níveis de mRNA relacionadas a diferentes padrões de consumo de etanol foram avaliadas neste trabalho, sendo necessária a realização de estudos adicionais desses genes, das vias em que eles participam e de alterações no perfis de expressão proteica, que podem esclarecer mecanismos envolvidos na transição entre o consumo controlado de etanol e o consumo compulsivo presentes no córtex pré-frontal.

Além disso, com a análise de correlação de *Pearson* foram encontradas fortes correlações positivas entre os genes *Camk2n1-Pkp2* nos animais dos grupos Controle e Adicto e *Drd2-Pkp2* apenas nos animais do grupo Adicto.

## REFERÊNCIAS

- ABE, K. Therapeutic potential of neurotrophic factors and neural stem cells against ischemic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, v. 20, n. 10, p. 1393-1408, 2000.
- AKASHI, M.; TAKUMI, T. The orphan nuclear receptor ROR $\alpha$  regulates circadian transcription of the mammalian core-clock *Bmal1*. *Nature Structural and Molecular Biology*, v. 12, n. 5, p. 441-448, 2005.
- ALFONSO-LOECHES, S.; PASCUAL, M.; GÓMEZ-PINEDO, U.; PASCUAL-LUCAS, M.; RENAU-PIQUERAS, J.; GUERRI, C. Toll-like receptor 4 participates in the myelin disruptions associated with chronic alcohol abuse. *Glia*, v. 60, n. 6, p. 948-964, 2012.
- AL-HOUSSEINI, A.M.; SIVANANDAM, T.M.; BRADBURY, E.L.; TANNENBERG, R.K.; DODD, P.R.; GU, Q. Upregulation of  $\beta$ -catenin levels in superior frontal cortex of chronic alcoholics. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 32, n. 6, p. 1080-1090, 2008.
- AMAR, S.; SHALTIEL, G.; MANN, L.; SHAMIR, A.; DEAN, B.; SCARR, E.; BERSUDSKY, Y.; BELMAKER, R.H.; AGAM, G. Possible involvement of post-dopamine D2 receptor signalling components in the pathophysiology of schizophrenia. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 11, n. 2, p. 197-205, 2008.
- BARR, A.M.; PHILLIPS, A.G. Withdrawal following repeated exposure to d-amphetamine decreases responding for a sucrose solution as measured by a progressive ratio schedule of reinforcement. *Psychopharmacology*, v. 141, n. 1, p. 99-106, 1999.
- BAUMANN, N.; PHAM-DINH, D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiological Reviews*, v. 81, n. 2, p. 871-927, 2001.
- BECHARA, A.; DAMASIO, H. Decision-making and addiction (part I): impaired activation of somatic states in substance dependent individuals when pondering decisions with negative future consequences. *Neuropsychologia*, v. 40, n. 10, p. 1675-1689, 2002.
- BECHARA, A.; DOLAN, S.; DENBURG, N.; HINDES, A.; ANDERSON, S.W.; NATHAN, P.E. Decision-making deficits, linked to a dysfunctional ventromedial prefrontal cortex, revealed in alcohol and stimulant abusers. *Neuropsychologia*, v. 39, n. 4, p. 376-389, 2001.
- BENNETT, B.; DOWNING, C.; PARKER, C.; JOHNSON, T.E. Mouse genetic models in alcohol research. *Trends in Genetics*, v. 22, n. 7, p. 367-374, 2006.
- BIBANCOS, T.; JARDIM, D.L.; ANEAS, I.; CHIAVEGATTO, S. Social isolation and expression of serotonergic neurotransmission-related genes in several brain areas of male mice. *Genes, Brain and Behavior*, v. 6, n. 6, p. 529-539, 2007.
- BICE, P.J.; LIANG, T.; ZHANG, L.; STROTHER, W.N.; CARR, L.G. *Drd2* expression in the high alcohol-preferring and low alcohol-preferring mice. *Mammalian Genome*, v. 19, n. 2, p. 69-76, 2008.
- BRAUN, A.P.; SCHULMAN, H. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annual Review of Physiology*, v. 57, n. 1, p. 417-445, 1995.

CENTRO DE INFORMAÇÕES SOBRE SAÚDE E ÁLCOOL. O que é alcoolismo? Disponível em: <<http://www.cisa.org.br/artigo/4010/-que-alcoolismo.php>>. Acesso em 18 de outubro de 2014.

CONTINI, V.; MARQUES, F.Z.; GARCIA, C.E.; HUTZ, M.H.; BAU, C.H. MAOA-uVNTR polymorphism in a Brazilian sample: further support for the association with impulsive behaviors and alcohol dependence. *American Journal of Medical Genetics Part B - Neuropsychiatric Genetics*, v. 141, n. 3, p. 305-308, 2006.

DE PINA-BENABOU, M.H.; SRINIVAS, M.; SPRAY, D.C.; SCEMES, E. Calmodulin kinase pathway mediates the K<sup>+</sup>-induced increase in gap junctional communication between mouse spinal cord astrocytes. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 21, n. 17, p. 6635-6643, 2001.

DERE, E.; ZLOMUZICA, A. The role of gap junctions in the brain in health and disease. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, v. 36, n. 1, p. 206-217, 2012.

DIETLER, M. Alcohol: Anthropological/Archaeological Perspectives. *Annual Review of Anthropology*, v. 35, p. 229-249, 2006.

DUCCI, F.; GOLDMAN, D. Genetic approaches to addiction: genes and alcohol. *Addiction*, v. 103, n. 9, p. 1414-1428, 2008.

EDENBERG, H.J.; DICK, D.M.; XUEI, X.; TIAN, H.; ALMASY, L.; BAUER, L.O.; CROWE, R.R.; GOATE, L.; HESSELBROCK, V.; JONES, K. KWON, J.; LI, T.-K.; NURNBERGER JR, J.I.; O'CONNOR, S.J.; REICH, T.; RICE, J.; SCHUCHIT, M.A.; PORJESZ, B.; FOROUD, T.; BEGLEITER, H. Variations in GABRA2, Encoding the  $\alpha 2$  Subunit of the GABAA Receptor, Are Associated with Alcohol Dependence and with Brain Oscillations. *American Journal of Human Genetics*, v. 74, n. 4, p. 705-714, 2004.

EDENBERG, H.J. Genetics of Alcohol Use Disorders. In: MILLER, P.M. (Ed.). *Biological Research on Addiction: Comprehensive Addictive Behaviors and Disorders Volume 2*. London: Elsevier Science & Technology Books/Academic Press, 2013. p. 499-508.

EHLERS, C.L.; WALTER, N.A.R.; DICK, D.M.; BUCK, K.J.; CRABBE, J.C. A comparison of selected quantitative trait loci associated with alcohol use phenotypes in humans and mouse models. *Addiction Biology*, v. 15, n. 2, p. 185-199, 2010.

ENGLEMAN, E.A.; INGRAHAM, C.M.; MCBRIDE, W.J.; LUMENG, L.; MURPHY, J.M. Extracellular dopamine levels are lower in the medial prefrontal cortex of alcohol-preferring rats compared to Wistar rats. *Alcohol*, v. 38, n. 1, p. 5-12, 2006.

ENOCH, M.-A. Genetic influences on the development of alcoholism. *Current Psychiatry Reports*, v. 15, n. 11, p. 412, 2013.

ERDOZAIN, A.M.; MORENTIN, B.; BEDFORD, L.; KING, E.; TOOTH, D.; BREWER, C.; WAYNE, D.; JOHNSON, L.; GERDES, H.K.; WIGMORE, P.; CALLADO, L.F.; CARTER, W.G. Alcohol-related brain damage in humans. *PLoS ONE*, v. 9, n. 4, 2014.

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

FENG, J.; YAN, Z.; FERREIRA, A.; TOMIZAWA, K.; LIAUW, J.A.; ZHUO, M.; ALLEN, P.B.; OUIOMET, C.C.; GREENGARD, P. Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 16, p. 9287-9292, 2000.

FINK, C.C.; MEYER, T. Molecular mechanisms of CaMKII activation in neuronal plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 12, n. 3, p. 293-299, 2002.

FRASCELLA, J.; POTENZA, M.N.; BROWN, L.L.; CHILDRESS, A.R. Shared brain vulnerabilities open the way for nonsubstance addictions: Carving addiction at a new joint? *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1187, p. 294-315, 2010.

GEORGE, O.; SANDERS, C.; FREILING, J.; GRIGORYAN, E.; VU, S.; ALLEN, C.D.; CRAWFORD, E.; MANDYAM, C.D.; KOOB, G.F. Recruitment of medial prefrontal cortex neurons during alcohol withdrawal predicts cognitive impairment and excessive alcohol drinking. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 109, n. 44, p. 18156-18161, 2012.

GONZALEZ, R.; BERNARDO, C.; CRUZ, D.; WALSS-BASS, C.; THOMPSON, P.M. The relationships between clinical characteristics, alcohol and psychotropic exposure, and circadian gene expression in human postmortem samples of affective disorder and control subjects. *Psychiatry Research*, v. 218, n. 3, p. 359-362, 2014.

GOODMAN, A. Neurobiology of addiction. An integrative review. *Biochemical Pharmacology*, v. 75, n. 1, p. 266-322, 2008.

GROSSMAN, S.D.; FUTTER, M.; SNYDER, G.L.; ALLEN, P.B.; NAIRN, A.C.; GREENGARD, P.; HSIEH-WILSON, L.C. Spinophilin is phosphorylated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II resulting in regulation of its binding to F-actin. *Journal of Neurochemistry*, v. 90, n. 2, p. 317-324, 2004.

HALL, J.E.; GUYTON, A.C. *Tratado de Fisiologia Médica*. 12<sup>a</sup> edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 1151 p.

HAN, H.; MYLLYKOSKI, M.; RUSKAMO, S.; WANG, C.; KURSULA, P. Myelin-specific proteins: A structurally diverse group of membrane-interacting molecules. *BioFactors*, v. 39, n. 3, p. 233-241, 2013.

HOWARD, S.; LANDRY, C.; FISHER, R.; BEZOUGLAIA, O.; HANDLEY, V.; CAMPAGNONI, A. Postnatal localization and morphogenesis of cells expressing the dopaminergic D2 receptor gene in rat brain: expression in non-neuronal cells. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 391, n. 1, p. 87-98, 1998.

HUANG, M.-C.; HO, C.-W.; CHEN, C.-H.; LIU, S.-C.; CHEN, C.-C.; LEU, S.-J. Reduced expression of circadian clock genes in male alcoholic patients. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 34, n. 11, p. 1899-1904, 2010.

IKEMOTO, S.; BONCI, A. Neurocircuitry of drug reward. *Neuropharmacology*, v. 76, p. 329-341, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLÓGICA PARA POLÍTICAS PÚBLICAS DO ÁLCOOL E OUTRAS DROGAS. II LENAD (Levantamento Nacional de Álcool e Drogas). Disponível em <<http://inpad.org.br/lenad/resultados/alcool/resultados-preliminares/>>. Acesso em 26 de outubro de 2014.

- IWANO, T.; MASUDA, A.; KIYONARI, H.; ENEMOTO, H.; MATSUZAKI, F. Prox1 postmitotically defines dentate gyrus cells by specifying granule cell identity over CA3 pyramidal cell fate in the hippocampus. *Development*, v. 139, n. 16, p. 3051-3062, 2012.
- JAYAPAL, M.; MELENDEZ, A.J. DNA microarray technology for target identification and validation. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 33, n. 5-6, p. 496-503, 2006.
- JEONG, J.; PARK, Y.-U.; KIM, D.-K.; LEE, S.; KWAK, Y.; LEE, S.-A.; LEE, H.; SUH, Y.-H.; GHO, Y.S.; HWANG, D.; PARK, S.K. Cdk5 phosphorylates dopamine D2 receptor and attenuates downstream signaling. *PLoS ONE*, v. 8, n. 12, p. e84482, 2013.
- JOFFE, A.H. Alcohol and Social Complexity in Ancient Western Asia. *Current Anthropology*, v. 39, n. 3, p. 297-322, 1998.
- JUNG, M.H.; PARK, B.L.; LEE, B.-C.; RO, Y.; PARK, R.; SHIN, H.D.; BAE, J.S.; KANG, T.-C.; CHOI, I.-G. Association of *CHRM2* polymorphisms with severity of alcohol dependence. *Genes, Brain and Behavior*, v. 10, n. 2, p. 253-256, 2011.
- KALIVAS, P.W.; VOLKOW, N.D. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *American Journal of Psychiatry*, v. 162, n. 8, p. 1403-1413, 2005.
- KALIVAS, P.W.; VOLKOW, N.; SEAMANS, J. Unmanageable motivation in addiction: a pathology in prefrontal-accumbens glutamate transmission. *Neuron*, v. 45, n. 5, p. 647-650, 2005.
- KARALAY, Ö.; DOBERAUER, K.; VADODARIA, K.C.; KNOBLOCH, M.; BERTI, L.; MIQUELAJAUREGUI, A.; SCHWARK, M.; JAGASIA, R.; TAKETO, M.M.; TARABYKIN, V.; LIE, D.C.; JESSBERGER, S. Prospero-related homeobox 1 gene (Prox1) is regulated by canonical Wnt signaling and has a stage-specific role in adult hippocampal neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. 14, p. 5807-5812, 2011.
- KIM, A.; ZAMORA-MARTINEZ, E.R.; EDWARDS, S.; MANDYAM, C.D. Structural reorganization of pyramidal neurons in the medial prefrontal cortex of alcohol dependent rats is associated with altered glial plasticity. *Brain Structure and Function*, v. 220, n. 3, p. 1705-1720, 2015.
- KIMURA, M.; HIGUCHI, S. Genetics of alcohol dependence. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, v. 65, n. 3, p. 213-225, 2011.
- KÖHNKE, M.D. Approach to the genetics of alcoholism: A review based on pathophysiology. *Biochemical Pharmacology*, v. 75, n. 1, p. 160-177, 2008.
- KÖHNKE, M.D.; KOLB, W.; KÖHNKE, A.M.; LUTZ, U.; SCHICK, S.; BATRA, A. D $\beta$ H\*444G/A polymorphism of the dopamine-beta-hydroxylase gene is associated with alcoholism but not with severe alcohol withdrawal symptoms. *Journal of Neural Transmission*, v. 113, n. 7, p. 869-876, 2006.
- KOOB, G.F. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends in pharmacological sciences*, v. 13, n. 5, p. 177-184, 1992.
- KOOB, G.F.; VOLKOW, N.D.; Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology*, v. 35, n.1, p. 217-238, 2010.



- KORBO, L. Glial cell loss in the hippocampus of alcoholics. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 23, n. 1, p. 164-168, 1999.
- LANGMESSER, S.; TALLONE, T.; BORDON, A.; RUSCONI, S.; ALBRECHT, U. Interaction of circadian clock proteins PER2 and CRY with BMAL1 and CLOCK. *BCM Molecular Biology*, v. 9, n. 1, p. 41-56, 2008.
- LEWOHL, J.M.; WANG, L.; MILES, M.F.; ZHANG, L.; DODD, P.R.; HARRIS, R.A. Gene expression in human alcoholism: microarray analysis of frontal cortex. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 24, n. 12, p. 1873-1882, 2000.
- LOBO, I.A.; HARRIS, R.A. GABA<sub>A</sub> receptors and alcohol. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 90, n. 1, p. 90-94, 2008.
- LU, Y.-L.; RICHARDSON, H.N. Alcohol, stress hormones, and the prefrontal cortex: a proposed pathway to the dark side of addiction. *Neuroscience*, v. 277, p. 139-151, 2014.
- MACHADO, A. *Neuroanatomia Funcional*. 2ª edição. São Paulo: Atheneu, 2000. 363 p.
- MAHADEV, K.; CHETTY, C.S.; VEMURI, M.C. Effect of prenatal and postnatal ethanol exposure on Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in rat cerebral cortex. *Alcohol*, v. 23, n. 3, p. 183-188, 2001.
- MALENKA, R.C.; KAUER, J.A.; PERKEL, D.J.; MAUK, M.D.; KELLY, P.T.; NICOLL, R.A.; WASHAM, M.N. An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature*, v. 340, p. 554-556, 1989.
- MALINOW, R.; SCHULMAN, H.; TSIEN, R.W. Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science*, v. 245, n. 4920, p. 862-865, 1989.
- MCBRIDE, W.J.; SCHULTZ, J.A.; KIMPEL, M.W.; MCCLINTICK, J.N.; WANG, M.; YOU, J.; RODD, Z.A. Differential effects of ethanol in the nucleus accumbens shell of alcohol-preferring (P), alcohol-non-preferring (NP) and Wistar rats: A proteomics study. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 92, n. 2, p. 304-313, 2009.
- MCBRIDE, W.J.; KIMPEL, M.W.; MCCLINTICK, J.N.; DING, Z.-M.; HAUSER, S.R.; EDENBERG, H.J.; BELL, R.L.; RODD, Z.A. Changes in gene expression within the ventral tegmental area following repeated excessive binge-like alcohol drinking by alcohol-preferring (P) rats. *Alcohol*, v. 47, n. 5, p. 367-380, 2013.
- MEISCH, R.A. Oral drug self-administration: an overview of laboratory animal studies. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, v. 24, n. 2, p. 117-128, 2001.
- MENET, J.S.; ROSBASH, M. When brain clocks lose track of time: cause or consequence of neuropsychiatric disorders. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 21, n. 6, p. 849-857, 2011.
- MIGUEL-HIDALGO, J.J.; WILSON, B.A.; HUSSAIN, S.; MESHAM, A.; RAJKOWSKA, G.; STOCKMEIER, C.A. Reduced connexin 43 immunolabeling in the orbitofrontal cortex in alcohol dependence and depression. *Journal of Psychiatric Research*, v. 55, n. 1, p. 101-109, 2014.
- MONTAGUE, P.; MCCALLION, A.S.; DAVIES, R.W.; GRIFFITHS, I.R. Myelin-associated oligodendrocytic basic protein: A family of abundant CNS myelin proteins in search of a function. *Developmental Neuroscience*, v. 28, n. 6, p. 479-487, 2006.

MOORE, K.B.; O'BRIEN, J. Connexins in neurons and glia: targets for intervention in disease and injury. *Neural Regeneration Research*, v. 10, n. 7, p. 1013-1017, 2015.

MOROZOVA, T.V.; GOLDMAN, D.; MACKAY, T.F.C.; ANHOLT, R.R.H. The genetic basis of alcoholism: multiple phenotypes, many genes, complex networks. *Genome Biology*, v. 13, n. 2, p. 239, 2012.

MOROZOVA, T.V.; MACKAY, T.F.C.; ANHOLT, R.R.H. Genetics and genomics of alcohol sensitivity. *Molecular Genetics and Genomics*, v. 289, n. 3, p. 253-269, 2014.

NARASIPURA, S.D.; HENDERSON, L.J.; FU, S.W.; CHEN, L.; KASHANCHI, F.; AL-HARTHI, L. Role of  $\beta$ -catenin and TCF/LEF family members in transcriptional activity of HIV in astrocytes. *Journal of Virology*, v. 86, n. 4, p. 1911-1921, 2011.

NATIONAL CENTER OF BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Gene. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=>>. Acesso em 02 de setembro de 2015.

NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE. Drugs, Brain and Behavior: The science of addiction. Disponível em: <<http://www.drugabuse.gov/publications/drugs-brains-behavior-science-addiction/preface>>. Acesso em 14 de agosto de 2015.

NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE. The Neurobiology of Drug Addiction. Section II e Section III. Disponível em: <<http://www.drugabuse.gov/publications/teaching-packets/neurobiology-drug-addiction/section-i-introduction-to-brain>>. Acesso em 22 de outubro de 2014.

NESTLER, E.J. Is there a common molecular pathway for addiction? *Nature Neuroscience*, v. 8, n. 11, p. 1445-1449, 2005.

NEVILLE, M.J.; JOHNSTONE, E.C.; WALTON, R.T. Identification and characterization of ANKK1: a novel kinase gene closely linked to DRD2 on chromosome band 11q23.1. *Human Mutation*, v. 23, n. 6, p. 540-545, 2004.

OKAMOTO, K.; BOSCH, M.; HAYASHI, Y. The roles of CaMKII and F-actin in the structural plasticity of dendritic spines: a potential molecular identity of a synaptic tag? *Physiology*, v. 24, n. 6, p. 357-366, 2009.

OSTERNDORFF-KAHANEK, E.; PONOMAREV, I.; BLEDNOV, Y.A.; HARRIS, R.A. Gene expression in brain and liver produced by three different regimens of alcohol consumption in mice: comparison with immune activation. *PLoS ONE*, v. 8, n. 3, p. e59870, 2013.

OZBURN, A.R.; FALCON, E.; MUKHERJEE, S.; GILLMAN, A.; AREY, R.; SPENCER, S.; MCCLUNG, C.A. The role of *Clock* in ethanol-related behaviors. *Neuropsychopharmacology*, v. 38, n. 12, p. 2393-2400, 2013.

O'BRIEN, C.P. Substance-Related and Addictive Disorders. Alcohol-Related Disorders. In: AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders, fifth edition*. Arlington: Artmed, 2013. p. 490-503.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G.J.; FITZPATRICK, D.; HALL, W.C.; LAMANTIA, A.-S.; MCNAMARA, J.O.; WILLIAMS, S.M. *Neuroscience*. 3ª edição. Massachusetts: Sinauer Associates, 2004. 773 p.

RIBEIRO, A.F. Caracterização molecular e comportamental de um modelo animal de consumo de etanol. 2011. 116 f. Tese (Doutorado em Genética). Instituto de Ciências

Biológicas, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2011.

RIBEIRO, A.F.; CORREIA, D.; TORRES, A.A.; BOAS, G.R.V.; RUEDA, A.V.L.; CAMARINI, R.; CHIAVEGATTO, S.; BOERNGEN-LACERDA, R.; BRUNIALTI-GODARD, A.L. A transcriptional study in mice with different ethanol-drinking profiles: Possible involvement of the GABA(B) receptor. *Pharmacology, biochemistry and behavior*, v. 102, n. 2, p. 224-232, 2012.

ROMERO, A.M.; RENAU-PIQUERAS, J.; MARIN, M.P.; TIMONEDA, J.; BERCIANO, M.T.; LAFARGA, M.; ESTEBAN-PRETEL, G. Chronic alcohol alters dendritic spine development in neurons in primary culture. *Neurotoxicity Research*, v. 24, n. 4, p. 532-548, 2013.

RUSSO, S.J.; DIETZ, D.M.; DUMITRIU, D.; MORRISON, J.H.; MALENKA, R.C.; NESTLER, E.J. The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. *Trends in Neurosciences*, v. 33, n. 6, p. 267-276, 2010.

SALLING, M.C.; FACCIDOMO, S.P.; LI, C.; PSILOS, K.; GALUNAS, C.; SPANOS, M.; AGOGLIA, A.E.; KASH, T.L.; HODGE, C.W. Moderate alcohol drinking and the amygdala proteome: identification and validation of calcium/calmodulin dependent kinase II and AMPA receptor activity as novel molecular mechanisms of the positive reinforcing effects of alcohol. *Biological Psychiatry*, 2014.

SAMOCHOWIEC, J.; KUCHARSKA-MAZUR, J.; GRZYWACZ, A.; JABLONSKI, M.; ROMMELSPACHER, H.; SAMOCHOWIEC, A.; SZNABOWICZ, M.; HORODNICKI, J.; SAGAN, L.; PELKA-WYSIECHA, J. Family-based and case-control study of DRD2, DAT, 5HTT, COMT genes polymorphisms in alcohol dependence. *Neuroscience Letters*, v. 410, n. 1, p. 1-5, 2006.

SANTHAKUMAR, V.; WALLNER, M.; OTIS, T.S. Ethanol acts directly on extrasynaptic subtypes of GABA<sub>A</sub> receptors to increase tonic inhibition. *Alcohol*, v. 41, n. 3, p. 211-221, 2007.

SATO, P.Y.; COOMBS, W.; LIN, X.; NEKRASOVA, O.; GREEN, K.J.; ISOM, L.L.; TAFFET, S.M.; DELMAR, M. Interactions between ankyrin-G, plakophilin-2, and connexin43 at the cardiac intercalated disc. *Circulation research*, v. 109, n. 2, p. 193-201, 2011.

SCHMIDT, A.; JÄGER, S. Plakophilins – hard work in the desmosome, recreation in the nucleus? *European Journal of Cell Biology*, v. 84, n. 2, p. 189-204, 2005.

SCHULTZ, W. Potential Vulnerabilities of Neuronal Reward, Risk, and Decision Mechanisms to Addictive Drugs. *Neuron*, v. 69, n. 4, p. 603-617, 2011.

SONG, J.; KOLLER, D.L.; FOROUD, T.; CARR, K.; ZHAO, J.H.; RICE, J.; NURNBERGER, J.I.; BEGLEITER, H.; PORJESZ, B.; SMITH, T.L.; SCHUCKIT, M.A.; EDENBERG, H.J. Association of GABA(A) receptors and alcohol dependence and the effects of genetic imprinting. *American Journal Of Medical Genetics Part B - neuropsychiatric Genetics*, v. 117, n. 1, p. 39-45, 2003.

SOYKA, M.; PREUSS, U.W.; KOLLER, G.; ZILL, P.; BONDY, B. Dopamine D4 receptor gene polymorphism and extraversion revisited: results from the Munich gene bank project for alcoholism. *Journal of Psychiatric research*, v. 36, n. 6, p. 429-435, 2002.

TABAKOFF, B.; HOFFMAN, P.L. Alcohol Addiction: An Enigma among Us. *Neuron*, v. 16, n. 15, p. 909-912, 1996.

TAKEDA, Y.; JETTEN, A.M.; Prospero-related homeobox 1 (Prox1) functions as a novel modulator of retinoic acid-related orphan receptors  $\alpha$ - and  $\gamma$ -mediated transactivation. *Nucleic Acid Research*, v. 41, n. 14, p. 6992-7008, 2013.

TOSCANO JR, A. Um Breve Histórico Sobre o Uso de Drogas. In: SEIBEL, S.D.; TOSCANO JR, A. *Dependência de Drogas*. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 7-23.

TSURUGIZAWA, T.; UEMATSU, A.; UNEYAMA, H.; TORII, K. The role of the GABAergic and dopaminergic systems in the brain response to an intragastric load of alcohol in conscious rats. *Neuroscience*, v. 171, n. 2, p. 451-460, 2010.

TZSCHENTKE, T.M.; SCHMIDT, W.J. Glutamatergic mechanisms in addiction. *Molecular Psychiatry*, v. 8, n. 4, p. 373-382, 2003.

VANDESOMPELE, J.; PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; ROY, N.V.; PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, v. 3, n. 7, p. 1-12, 2002.

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

VERHULST, B.; NEALE, M.C.; KENDLER, K.S. The heritability of alcohol use disorders: a meta-analysis of twin and adoption studies. *Psychological Medicine*, 2014.

VOLKOW, N.D.; WANG, G.J.; FOWLER, J.S.; TOMASI, D.; TELANG, F. Addiction: Beyond dopamine reward circuitry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. 37, p. 15037-15042, 2011.

WANG, C.; LI, N.; LIU, X.; ZHENG, Y.; CAO, X. A novel endogenous human CaMKII inhibitory protein suppresses tumor growth by inducing cell cycle arrest via p27 stabilization. *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 17, p. 11565-11574, 2008a.

WANG, J.C.; GRUCZA, R.; CRUCHAGA, C.; HINRICHS, A.L.; BERTELSEN, S.; BUDDE, J.P.; FOX, L.; GOLDSTEIN, E.; REYES, O.; SACCONI, N.; SACCONI, S.; XUEI, X.; BUCHOLZ, K.; KUPERMAN, S.; NURNBERGER JR, J.; RICE, J.P.; SCHUCKIT, M.; TISCHFIELD, J.; HESSELBROCK, V.; PORJESZ, B.; EDENBERG, H.J.; BIERUT, L.J.; GOATE, A.M. Genetic variation in the *CHRNA5* gene affects mRNA levels and is associated with risk for alcohol dependence. *Molecular Psychiatry*, v. 14, n. 5, p. 501-510, 2008b.

WEITLAUF, C.; WOODWARD, J.J. Ethanol selectively attenuates NMDAR-mediated synaptic transmission in the prefrontal cortex. *Alcoholism: clinical and experimental research*, v. 32, n. 4, p. 690-698, 2008.

WERNICKE, C.; SAMOCHOWIEC, J.; SCHMIDT, L.G.; WINTERER, G.; SMOLKA, M.; KUCHARSKA-MAZUR, J.; HORODNICKI, J.; GALLINAT, J.; ROMMELSPACHER, H. Polymorphisms in the N-methyl-D-aspartate receptor 1 and 2B subunits are associated with alcoholism-related traits. *Biological Psychiatry*, v. 54, n. 9, p. 922-928, 2003.

WHITFIELD, J.B.; NIGHTINGALE, B.N.; BUCHOLZ, K.K.; MADDEN, P.A.; HEATH, A.C.; MARTIN, N.G. ADH genotypes and alcohol use and dependence in Europeans. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 22, n. 7, p. 1463-1469, 1998.

WILLCOCKS, A.L.; MCNALLY, G.P. The role of medial prefrontal cortex in extinction and reinstatement of alcohol-seeking in rats. *European Journal of Neuroscience*, v. 37, n. 2, p. 259-268, 2013.

WISE, R.A. The role of reward pathways in the development of drug dependence. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 35, n. 1-2, p. 227-263, 1987.

WISE, R.A. Neurobiology of addiction. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 6, n. 2, p. 243-251, 1996.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International guide for monitoring alcohol consumption and related harm. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/who\\_msd\\_msb\\_00.4.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/who_msd_msb_00.4.pdf)>. Acesso em 17 de outubro de 2014.

YAMAMOTO, Y.; MIZUNO, R.; NISHIMURA, T.; OGAWA, Y.; YOSHIKAWA, H.; FUJIMURA, H.; ADACHI, E.; KISHIMOTO, T.; YANAGIHARA, T.; SAKODA, S. Cloning and expression of myelin-associated oligodendrocytic basic protein. A novel basic protein constituting the central nervous system myelin. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n. 50, p. 31725-31730, 1994.

YAMAUCHI, T.; FUJISAWA, H. Evidence for three distinct forms of calmodulin-dependent protein kinases from rat brain. *FEBS Letters*, v. 116, n. 2, p. 141-144, 1980.

YOOL, D.; MONTAGUE, P.; MCLAUGHLIN, M.; MCCULLOCH, M.C.; EDGAR, J.M.; NAVE, K.-A.; DAVIES, R.W.; GRIFFITHS, I.R.; MCCALLION, A.S. Phenotypic analysis of mice deficient in the major myelin protein MOBP, and evidence for a novel *Mobp* isoform. *Glia*, v. 39, n. 3, p. 256-267, 2002.

YOSHIMOTO, K.; MCBRIDE, W.J.; LUMENG, L.; LI, T.-K. Alcohol stimulates the release of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens. *Alcohol*, v. 9, n. 1, p. 17-22, 1991.

YUJNOVSKY, I.; HIRAYAMA, J.; DOI, M.; BORRELLI, E.; SASSONE-CORSI, P. Signaling mediated by the dopamine D2 receptor potentiates circadian regulation by CLOCK:BMAL1. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 103, n. 16, p. 6386-6391, 2006.

ZAHR, N.M.; KAUFMAN, K.L.; HARPER, C.G. Clinical and pathological features of alcohol-related brain damage. *Nature Reviews Neurology*, v. 7, n. 5, p. 284-294, 2011.

ZAKHARI, S. Overview: How is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Research & Health*, v. 29, n. 4, p. 245-254, 2006.

2014 GLOBAL DRUG SURVEY. Reflections on the results of the world's biggest ever drug survey by Dr Adam Winstock. Disponível em: <<http://www.globaldrugsurvey.com/facts-figures/the-global-drug-survey-2014-findings/>>. Acesso em 15 de outubro de 2014.

## ANEXO A – Consumo e concentração plasmática de etanol (BEC) nos diferentes grupos

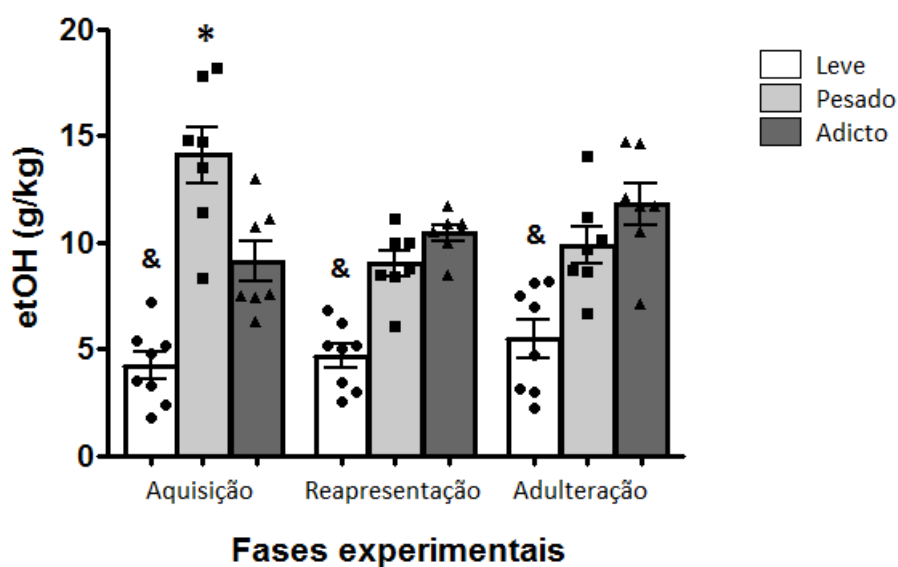
A média do consumo está representando a média do consumo diário e o erro padrão das duas últimas semanas de cada fase experimental. A concentração sanguínea de etanol (BEC) está representando a média e o erro padrão dos valores obtidos uma semana após o término do experimento.

| Grupo  | Média de consumo (g/kg/dia) | BEC (mg/mL) |
|--------|-----------------------------|-------------|
| Leve   | 4.21 ± 0.49                 | 0.48 ± 0.42 |
| Pesado | 8.84 ± 0.41                 | 0.79 ± 0.56 |
| Adicto | 8.19 ± 0.44                 | 1.13 ± 0.32 |

Fonte: (Ribeiro et. al., 2012), modificado

Média semanal e erro padrão do consumo diário de etanol (g/kg) durante o tratamento. ANOVA com medidas repetidas seguido por Newman-Keuls. Os símbolos \* e & representam diferença estatisticamente significativa no consumo dentro de cada fase experimental com  $p < 0,05$ . etOH, etanol.

### CONSUMO DE ETANOL ENTRE AS FASES EXPERIMENTAIS



Fonte: (Ribeiro et. al., 2012)

O consumo individual de etanol nas fases experimentais foi medido considerando as duas últimas semanas da fase de aquisição e as fases de reapresentação e adulteração. Os valores representam a média e erro padrão do consumo de etanol (g/kg/dia) e consumo de água (mL/dia). Os símbolos representam diferença significativa para cada animal: \*p < 0,05, diferente das outras fases; <sup>&</sup>p <0,05, diferente da fase de aquisição; <sup>+</sup>p < 0,05, diferença entre consumo de etanol e água. EtOH, etanol; H<sub>2</sub>O, água; Grupos: A, Adicto; P, Pesado; L, Leve.

Consumo individual de etanol nas fases experimentais:

|       |        | Fases experimentais    |                        |                            | Análises          |        |                        |        |
|-------|--------|------------------------|------------------------|----------------------------|-------------------|--------|------------------------|--------|
| Grupo | Animal | Aquisição<br>EtOH      | Reapresentação<br>EtOH | Adulteração<br>EtOH        | ANOVA             |        | teste t                |        |
|       |        |                        |                        |                            | F <sub>2,22</sub> | p      | H <sub>2</sub> O       | t      |
| A     | #21    | 7.4* - 0.7             | 11.7* - 0.9            | 14.7* - 0.9                | 18.75             | 0.0001 | 4.7 <sup>+</sup> - 0.3 | -5.25  |
|       | #22    | 10.7 - 0.5             | 10.0 - 0.4             | 11.7 - 0.8                 | 2.44              | 0.11   | 3.4 <sup>+</sup> - 0.2 | -16.10 |
|       | #23    | 6.3* - 0.4             | 10.5 - 0.8             | 11.7 - 0.9                 | 13.40             | 0.001  | 4.0 <sup>+</sup> - 0.2 | -5.92  |
|       | #27    | 11.1 - 0.4             | 10.9 - 0.5             | 10.5 - 0.6                 | 0.91              | 0.42   | 2.8 <sup>+</sup> - 0.3 | -17.49 |
|       | #53    | 7.6 - 1.0              | 10.6 - 0.8             | 14.6* - 1.5                | 6.72              | 0.005  | 5.9 <sup>+</sup> - 0.4 | -4.77  |
|       | #56    | 13.0 - 0.6             | 10.9 - 0.5             | 12.1 - 1.0                 | 1.47              | 0.25   | 2.5 <sup>+</sup> - 0.2 | -17.05 |
|       | #77    | 7.5 - 0.5              | 8.5 - 0.7              | 7.1 - 0.8                  | 1.24              | 0.31   | 3.8 <sup>+</sup> - 0.2 | -8.61  |
| P     | #25    | 11.4* - 1.0            | 8.4 - 0.5              | 8.7 - 0.8                  | 5.63              | 0.01   | 4.3 <sup>+</sup> - 0.3 | -7.49  |
|       | #36    | 18.2* - 0.6            | 10.0 - 0.9             | 9.7 - 0.7                  | 33.96             | 0.0001 | 4.1 <sup>+</sup> - 0.6 | -5.71  |
|       | #59    | 13.5* - 0.9            | 8.5 - 0.7              | 8.6 - 0.7                  | 8.09              | 0.002  | 5.4 <sup>+</sup> - 0.4 | -6.03  |
|       | #60    | 14.8* - 0.8            | 10.0 - 0.8             | 10.1 - 1.2                 | 6.29              | 0.01   | 5.2 <sup>+</sup> - 0.3 | -7.41  |
|       | #66    | 17.8* - 1.2            | 11.1 - 1.0             | 14.0 - 1.8                 | 7.14              | 0.004  | 5.7 <sup>+</sup> - 0.5 | -6.13  |
|       | #76    | 8.3 <sup>+</sup> - 0.6 | 6.1 - 0.5              | 6.7 - 0.8                  | 5.93              | 0.009  | 4.7 <sup>+</sup> - 0.3 | -4.83  |
|       | #79    | 14.7* - 0.8            | 8.8* - 0.4             | 11.2* - 0.9                | 15.40             | 0.0001 | 2.5 <sup>+</sup> - 0.2 | -15.44 |
| L     | #11    | 7.2 - 0.6              | 5.2* - 0.3             | 8.1 - 0.8                  | 4.03              | 0.03   | 8.2 <sup>+</sup> - 0.2 | 7.15   |
|       | #30    | 5.4 - 0.4              | 6.8 - 0.4              | 8.2 <sup>&amp;</sup> - 0.7 | 4.63              | 0.02   | 7.7 <sup>+</sup> - 0.2 | 2.35   |
|       | #31    | 3.5 - 0.6              | 3.4 - 0.2              | 3.1 - 0.4                  | 0.17              | 0.85   | 9.4 <sup>+</sup> - 0.3 | 17.06  |
|       | #38    | 3.3* - 0.4             | 5.2 - 0.3              | 4.7 - 0.5                  | 6.00              | 0.008  | 3.8 <sup>+</sup> - 0.3 | 2.26   |
|       | #43    | 1.8 - 0.3              | 2.5 - 0.5              | 2.2 - 0.4                  | 0.29              | 0.75   | 6.1 <sup>+</sup> - 0.2 | 16.96  |
|       | #45    | 2.4 - 0.3              | 3.0 - 0.3              | 3.0 - 0.6                  | 0.87              | 0.43   | 6.3 <sup>+</sup> - 0.2 | 9.91   |
|       | #49    | 4.8 - 0.5              | 5.0 - 0.5              | 7.0 - 1.1                  | 1.98              | 0.16   | 7.8 <sup>+</sup> - 0.2 | 4.59   |
|       | #51    | 5.2 - 0.6              | 6.2 - 0.4              | 7.5 - 1.0                  | 1.57              | 0.23   | 7.7 <sup>+</sup> - 0.2 | 5.37   |

Fonte: (Ribeiro et. al., 2012)

## ANEXO B – Total de transcritos detectados após a normalização dos dados do microarranjo

A eficiência de hibridação está representada abaixo. A área do hipocampo apresentou uma baixa eficiência de hibridação.

| Grupos | Área cerebral      | Número de sondas presentes |            |            |
|--------|--------------------|----------------------------|------------|------------|
|        |                    | Réplica #1                 | Réplica #2 | Réplica #3 |
| Adicto | Córtex pré-frontal | 23251                      | 13612      | 22028      |
|        | Estriado           | 16122                      | 23052      | 17136      |
|        | Hipocampo          | 95                         | 116        | 177        |
| Leve   | Córtex pré-frontal | 13631                      | 22858      | 23777      |
|        | Estriado           | 15072                      | 24047      | 23400      |
|        | Hipocampo          | 22166                      | 22641      | 19170      |

Fonte: (Qualificação de doutorado Silva e Silva, 2014)



## ANEXO C – Genes diferencialmente transcritos no córtex pré-frontal

O Identificador RefSeq indica o registro de identificação gênica no banco de dados de sequências não redundantes RefSeq; Log FC indica a transformação logarítmica dos transcritos comparativa entre os grupos leve e adicto (Log FC >0: transcrito superexpresso no grupo leve; Log FC <0: transcrito subexpresso no grupo leve); PFP (do inglês *proportion of false positive*) indica a correção do valor p para múltiplos testes; P valor indica valor p sem correção.

| Símbolo | Identificador RefSeq          | Log FC   | PFP    | P valor  |
|---------|-------------------------------|----------|--------|----------|
| Ttr     | NM_013697                     | -5,94014 | 0      | 0        |
| Dsp     | NM_023842                     | -3,52948 | 0      | 0        |
| Gpr6    | NM_199058                     | -3,26443 | 0      | 0        |
| Cabp7   | NM_138948 /// XR_105432       | -3,1333  | 0      | 0        |
| St18    | NM_173868                     | -3,12012 | 0      | 0        |
| Camk2n1 | NM_025451                     | 3,240333 | 0      | 0        |
| Igj     | NM_152839                     | 2,277924 | 0,0012 | 2,22E-07 |
| Calml4  | NM_001102468 /// NM_138304    | -2,65114 | 0,0014 | 4,43E-07 |
| Dcx     | NM_001110222 /// NM_001110223 | 2,397987 | 0,0014 | 2,22E-07 |
| Cdhr1   | NM_130878                     | 1,971041 | 0,0014 | 4,43E-07 |
| Shisa6  | NM_001034874                  | -2,72293 | 0,0015 | 4,43E-07 |
| H2-D1   | NM_010380                     | 2,059467 | 0,0015 | 4,43E-07 |
| Spink8  | NM_183136                     | -2,84124 | 0,0017 | 4,43E-07 |
| Gm3579  | XM_001477842                  | 1,997118 | 0,0017 | 4,43E-07 |
| Npy2r   | NM_008731                     | -2,76376 | 0,0018 | 4,43E-07 |
| Ipw     | NR_015351                     | 1,760355 | 0,0018 | 6,65E-07 |
| Gdpd3   | NM_024228                     | 1,764595 | 0,0019 | 6,65E-07 |
| Clic6   | NM_172469                     | -2,94503 | 0,002  | 4,43E-07 |
| Gh      | NM_008117                     | -2,28916 | 0,0028 | 1,11E-06 |
| Pkp2    | NM_026163                     | -2,33387 | 0,0031 | 1,11E-06 |
| Drd2    | NM_010077                     | -2,34168 | 0,0032 | 1,33E-06 |
| Prox1   | NM_008937                     | -2,32646 | 0,0033 | 1,11E-06 |
| Lztf1   | NM_033322                     | 2,988411 | 0,0033 | 2,22E-07 |
| Drd1a   | NM_010076                     | -2,20768 | 0,0035 | 1,55E-06 |
| Pkp2    | NM_026163                     | -2,15052 | 0,0036 | 1,77E-06 |
| C1ql2   | NM_207233                     | -2,16988 | 0,0038 | 1,77E-06 |
| Scd2    | NM_009128                     | -2,07209 | 0,0038 | 2,00E-06 |
| Rem2    | NM_080726                     | -2,09938 | 0,0039 | 2,00E-06 |
| Gh      | NM_008117                     | -2,02362 | 0,0041 | 2,66E-06 |
| Pcdh20  | NM_178685                     | -2,0264  | 0,0042 | 2,44E-06 |
| Gpr88   | NM_022427                     | -2,02746 | 0,0043 | 2,88E-06 |
| Tanc1   | NM_198294                     | -2,08716 | 0,0044 | 2,44E-06 |
| Mobb    | NM_001039364 /// NM_001039365 | -2,02947 | 0,0044 | 2,66E-06 |
| Rasd1   | NM_009026                     | -1,96838 | 0,0047 | 3,33E-06 |
| Gh      | NM_008117                     | -1,93603 | 0,0059 | 4,43E-06 |
| Ido1    | NM_008324                     | -1,92351 | 0,0059 | 4,88E-06 |
| Tgfb2   | NM_009367                     | -1,93734 | 0,0061 | 4,43E-06 |
| Mobb    | NM_001039364 /// NM_001039365 | -1,92332 | 0,0061 | 4,88E-06 |
| Pcdh20  | NM_178685                     | -1,86309 | 0,0062 | 5,54E-06 |
| Olfml2b | NM_177068                     | -1,9501  | 0,0063 | 4,88E-06 |

(continuação)

| Símbolo  | Identificador RefSeq          | Log FC   | PFP    | P valor  |
|----------|-------------------------------|----------|--------|----------|
| Lpl      | NM_008509                     | -1,88855 | 0,0063 | 5,32E-06 |
| Kl       | NM_013823                     | -1,89219 | 0,0064 | 5,54E-06 |
| Myoc     | NM_010865                     | 1,603643 | 0,0064 | 3,10E-06 |
| Drd1a    | NM_010076                     | -1,86675 | 0,0068 | 6,21E-06 |
| Myo5b    | NM_201600                     | -1,78055 | 0,0068 | 7,10E-06 |
| Rerg     | NM_001164212 /// NM_001164214 | -1,85076 | 0,0069 | 6,43E-06 |
| Penk     | NM_001002927                  | -1,81765 | 0,0069 | 6,87E-06 |
| Sostdc1  | NM_025312                     | -1,84444 | 0,007  | 6,65E-06 |
| H2-Aa    | NM_010378                     | 1,585451 | 0,0071 | 3,77E-06 |
| Gjb2     | NM_008125                     | 1,565933 | 0,0074 | 3,77E-06 |
| Col11a1  | NM_007729                     | -1,71137 | 0,0086 | 9,76E-06 |
| Abca8a   | NM_153145                     | -1,67328 | 0,0086 | 1,06E-05 |
| Lpl      | NM_008509                     | -1,6874  | 0,0086 | 1,09E-05 |
| Scn4b    | NM_001013390                  | -1,69257 | 0,0086 | 1,11E-05 |
| Phgdh    | NM_016966                     | 1,530676 | 0,0086 | 5,32E-06 |
| Tgfb2    | NM_009367                     | -1,77165 | 0,0087 | 9,31E-06 |
| Spata13  | NM_001033272                  | -1,67229 | 0,0087 | 1,06E-05 |
| Rgs9     | NM_001165934 /// NM_011268    | -1,77274 | 0,0088 | 9,53E-06 |
| H2-Aa    | NM_010378                     | 1,54745  | 0,0089 | 5,32E-06 |
| Tgfb2    | NM_009367                     | -1,72146 | 0,009  | 1,04E-05 |
| Prg4     | NM_001110146 /// NM_021400    | 1,530578 | 0,0092 | 5,32E-06 |
| H2-D1    | NM_010380                     | 1,520689 | 0,0093 | 5,99E-06 |
| Six3     | NM_011381                     | -1,65961 | 0,0105 | 1,42E-05 |
| Myo5b    | NM_201600                     | -1,59854 | 0,0107 | 1,42E-05 |
| Drd2     | NM_010077                     | -2,34168 | 0,0032 | 1,33E-06 |
| Anln     | NM_028390                     | -1,58347 | 0,013  | 1,82E-05 |
| Rnf182   | NM_183204                     | -1,55966 | 0,013  | 1,84E-05 |
| St18     | NM_173868                     | -1,55613 | 0,0133 | 1,95E-05 |
| Lct      | NM_001081078                  | -1,58744 | 0,0133 | 1,97E-05 |
| Otx2     | NM_144841                     | -1,5576  | 0,0134 | 1,93E-05 |
| Rem2     | NM_080726                     | -1,5713  | 0,0134 | 2,02E-05 |
| Aldh1a2  | NM_009022                     | 1,417873 | 0,0142 | 9,76E-06 |
| H2-D1    | NM_010380                     | 1,397023 | 0,015  | 1,06E-05 |
| Islr     | NM_001195431 /// NM_012043    | 1,410017 | 0,0155 | 1,13E-05 |
| Col11a1  | NM_007729                     | -1,49414 | 0,0159 | 2,46E-05 |
| Mal      | NM_001171187 /// NM_010762    | -1,47981 | 0,0161 | 2,57E-05 |
| Sema3e   | NM_011348                     | -1,51611 | 0,0163 | 2,57E-05 |
| Mobp     | NM_001039364 /// NM_001039365 | -1,52526 | 0,0163 | 2,71E-05 |
| Ernm     | NM_029972                     | -1,46604 | 0,0164 | 2,68E-05 |
| Lmo3     | NM_207222                     | -1,45603 | 0,0164 | 2,79E-05 |
| Mog      | NM_010814                     | -1,48048 | 0,0164 | 2,84E-05 |
| Hs3st4   | XM_003086663 /// XM_893564    | -1,43767 | 0,0174 | 3,08E-05 |
| Slc35d3  | NM_029529                     | -1,43756 | 0,0177 | 3,26E-05 |
| B3galt1  | NM_020283                     | 1,357134 | 0,018  | 1,40E-05 |
| Camk1    | NM_133926                     | 1,422161 | 0,0184 | 1,51E-05 |
| Retsat   | NM_026159                     | 1,348512 | 0,019  | 1,69E-05 |
| Eomes    | NM_001164789 /// NM_010136    | 1,366917 | 0,0195 | 1,69E-05 |
| Adrbk2   | NM_001035531 /// NM_177078    | 1,340738 | 0,0198 | 1,80E-05 |
| Tnfaip6  | NM_009398                     | -1,4064  | 0,0201 | 3,75E-05 |
| Cebpd    | NM_007679                     | -1,42139 | 0,0202 | 3,81E-05 |
| BC003331 | NM_001077237 /// NM_145511    | 1,327725 | 0,0202 | 1,93E-05 |
| Spred2   | NM_033523                     | 1,349478 | 0,0205 | 1,91E-05 |
| Sema5a   | NM_009154                     | -1,39777 | 0,0209 | 4,04E-05 |
| Ryr3     | NM_177652                     | -1,38948 | 0,021  | 4,01E-05 |
| Mtm1     | NM_001164190 /// NM_001164191 | 1,289212 | 0,0215 | 2,48E-05 |

(continuação)

| Símbolo  | Identificador RefSeq          | Log FC   | PFP    | P valor  |
|----------|-------------------------------|----------|--------|----------|
| Slc47a1  | NM_026183                     | 1,323387 | 0,0216 | 2,35E-05 |
| Spag5    | NM_017407                     | 1,308472 | 0,0217 | 2,26E-05 |
| Adrbk2   | NM_001035531 /// NM_177078    | 1,257624 | 0,0218 | 2,61E-05 |
| Tmem121  | NM_153776                     | 1,2836   | 0,022  | 2,20E-05 |
| Pbx1     | NM_008783 /// NM_183355       | 1,28301  | 0,0222 | 2,26E-05 |
| H2-D1    | NM_010380                     | 1,244119 | 0,024  | 3,04E-05 |
| Gm2590   | XM_001474060                  | 1,241131 | 0,0242 | 3,22E-05 |
| Stx1a    | NM_016801                     | 1,317901 | 0,0245 | 3,04E-05 |
| Pink1    | NM_026880                     | 1,445413 | 0,0245 | 3,15E-05 |
| Nav2     | NM_001111016 /// NM_175272    | 1,232673 | 0,0247 | 3,39E-05 |
| Phgdh    | NM_016966                     | 1,211151 | 0,0248 | 3,46E-05 |
| Nrcam    | NM_001146031 /// NM_176930    | 1,221749 | 0,0248 | 3,53E-05 |
| Thbd     | NM_009378                     | 1,236175 | 0,0251 | 3,39E-05 |
| Serpinh1 | NM_001111043 /// NM_001111044 | 1,188291 | 0,0252 | 3,75E-05 |
| Plp1     | NM_011123                     | -1,34816 | 0,0253 | 4,99E-05 |
| Plp1     | NM_011123                     | -1,37065 | 0,0253 | 5,06E-05 |
| Sp8      | NM_177082                     | 1,190256 | 0,0256 | 3,97E-05 |
| Ptgds    | NM_008963                     | 1,201374 | 0,0257 | 3,70E-05 |
| Camk1    | NM_133926                     | 1,185667 | 0,0258 | 3,95E-05 |
| Chrd11   | NM_001114385 /// NM_031258    | 1,205147 | 0,0259 | 3,90E-05 |
| Mbp      | NM_001025245 /// NM_001025251 | -1,32679 | 0,0261 | 5,57E-05 |
| Zfpm2    | NM_011766                     | -1,33742 | 0,0263 | 5,54E-05 |
| Pde10a   | NM_011866                     | -1,31452 | 0,0264 | 5,68E-05 |
| Glo1     | NM_001113560 /// NM_025374    | -1,32981 | 0,0266 | 5,37E-05 |
| Arsg     | NM_001166177 /// NM_028710    | -1,32645 | 0,0266 | 5,54E-05 |
| Pnpt1    | NM_027869                     | -1,3331  | 0,0268 | 5,52E-05 |
| Shisa6   | NM_001034874                  | -1,32297 | 0,027  | 5,50E-05 |
| Nr3c2    | NM_001083906                  | -1,31647 | 0,027  | 5,92E-05 |
| Spock3   | NM_023689                     | -1,30626 | 0,027  | 6,16E-05 |
| Isl1     | NM_021459                     | -1,31739 | 0,0271 | 6,08E-05 |
| Fibcd1   | NM_178887                     | -1,29853 | 0,0271 | 6,72E-05 |
| Cux2     | NM_007804                     | 1,151307 | 0,0271 | 4,63E-05 |
| Folr1    | NM_008034                     | -1,34708 | 0,0272 | 6,14E-05 |
| Lrrtm4   | NM_178731 /// NR_027323       | -1,26439 | 0,0272 | 6,81E-05 |
| Mobp     | NM_001039364 /// NM_001039365 | -1,26691 | 0,0272 | 6,87E-05 |
| Tspan2   | NM_027533                     | -1,28545 | 0,0273 | 6,72E-05 |
| Pdlim5   | NM_001190852 /// NM_001190853 | -1,30103 | 0,0274 | 6,50E-05 |
| Klk8     | NM_008940                     | -1,28912 | 0,0275 | 6,65E-05 |
| Tmem88b  | NM_001033394                  | -1,2958  | 0,0275 | 6,72E-05 |
| Klf6     | NM_011803                     | 1,157138 | 0,0275 | 4,57E-05 |
| Dock10   | NM_175291                     | -1,30507 | 0,0276 | 6,50E-05 |
| Gdpd1    | NM_025638                     | -1,29144 | 0,0276 | 6,61E-05 |
| Tmem212  | NM_001164437                  | -1,25765 | 0,0276 | 7,23E-05 |
| Nexn     | NM_199465                     | -1,26928 | 0,0276 | 7,29E-05 |
| Mal      | NM_001171187 /// NM_010762    | -1,26748 | 0,0276 | 7,41E-05 |
| Crlf1    | NM_018827                     | -1,3159  | 0,0277 | 6,45E-05 |
| Foxd1    | NM_008242                     | 1,162034 | 0,0277 | 4,55E-05 |
| Ernm     | NM_029972                     | -1,29907 | 0,0278 | 6,41E-05 |
| Tgfb2    | NM_009367                     | -1,26623 | 0,0278 | 7,21E-05 |
| Mbp      | NM_001025245 /// NM_001025251 | -1,27253 | 0,0278 | 7,38E-05 |
| Bcas1    | NM_001164369 /// NM_029815    | -1,26674 | 0,0279 | 7,18E-05 |
| Rnf182   | NM_183204                     | -1,26659 | 0,028  | 7,58E-05 |
| Lghg     | XM_001472541                  | 1,188088 | 0,0281 | 4,55E-05 |
| AI506816 | NR_015554                     | -1,24839 | 0,0282 | 7,83E-05 |
| Prdm5    | NM_027547                     | -1,27237 | 0,0283 | 7,89E-05 |

(continuação)

| Símbolo      | Identificador RefSeq          | Log FC   | PFP    | P valor  |
|--------------|-------------------------------|----------|--------|----------|
| Zbtb20       | NM_019778 /// NM_181058       | -1,25058 | 0,0284 | 7,80E-05 |
| Pacsin1      | NM_011861 /// NM_178365       | 1,238056 | 0,0294 | 5,14E-05 |
| Rasgrp2      | NM_011242                     | -1,23691 | 0,0296 | 8,34E-05 |
| Pde10a       | NM_011866                     | -1,25464 | 0,0299 | 8,49E-05 |
| Dgkg         | NM_138650                     | -1,22595 | 0,0304 | 8,89E-05 |
| Nrip3        | NM_020610                     | -1,22827 | 0,0306 | 8,76E-05 |
| Leprot       | NM_175036                     | -1,24605 | 0,0306 | 8,89E-05 |
| Mbp          | NM_001025245 /// NM_001025251 | -1,22693 | 0,0308 | 8,87E-05 |
| Plekhh1      | NM_181073                     | -1,21025 | 0,0312 | 9,42E-05 |
| Mbp          | NM_001025245 /// NM_001025251 | -1,27458 | 0,0313 | 9,51E-05 |
| LOC100504619 | XR_104633 /// XR_107309       | -1,23021 | 0,0313 | 9,65E-05 |
| Zbtb20       | NM_019778 /// NM_181058       | -1,2062  | 0,0314 | 9,33E-05 |
| Filip1       | NM_001081243                  | -1,2202  | 0,0316 | 9,31E-05 |
| Wdr48        | NM_026236                     | 1,117293 | 0,0319 | 5,65E-05 |
| Ppp1r14a     | NM_026731                     | -1,21612 | 0,0323 | 0,0001   |
| Pkp2         | NM_026163                     | -1,18928 | 0,0327 | 0,000103 |
| Evi2a        | NM_001033711 /// NM_010161    | -1,19218 | 0,0327 | 0,000104 |
| Mycl1        | NM_008506                     | -1,1825  | 0,0329 | 0,000105 |
| Zbtb20       | NM_019778 /// NM_181058       | -1,17525 | 0,0332 | 0,000107 |
| Prkcd        | NM_011103                     | -1,18533 | 0,0332 | 0,000108 |
| B3galt5      | NM_001122993 /// NM_033149    | -1,17565 | 0,0339 | 0,00011  |
| Sema3e       | NM_011348                     | -1,16269 | 0,034  | 0,000112 |
| Ctxn1        | NM_183315                     | 1,114211 | 0,0341 | 6,12E-05 |
| Manea        | NM_172865                     | -1,16569 | 0,0343 | 0,000113 |
| Rarb         | NM_011243                     | -1,15955 | 0,0348 | 0,000116 |
| Doc2b        | NM_007873                     | -1,16859 | 0,0348 | 0,000117 |
| Arhgap33     | NM_178252                     | 1,103619 | 0,035  | 6,36E-05 |
| Col12a1      | NM_007730                     | 1,12555  | 0,0352 | 6,47E-05 |
| Tnnc1        | NM_009393                     | 1,072055 | 0,0352 | 7,34E-05 |
| Fcgr2b       | NM_001077189 /// NM_010187    | 1,099714 | 0,0352 | 7,41E-05 |
| Fxyd5        | NM_001111073 /// NM_008761    | 1,079496 | 0,0357 | 7,27E-05 |
| Cdh1         | NM_009864                     | 1,076022 | 0,0358 | 7,63E-05 |
| Vwa5b2       | NM_001144953 /// NM_182636    | 1,109326 | 0,0359 | 6,76E-05 |
| Rbp1         | NM_011254                     | 1,096172 | 0,0359 | 7,01E-05 |
| Pwwp2b       | NM_001033206 /// NM_001098636 | -1,1383  | 0,036  | 0,000123 |
| Plcx2        | NM_001134480                  | 1,075427 | 0,036  | 7,18E-05 |
| Neu1         | NM_010893                     | 1,088247 | 0,036  | 7,27E-05 |
| Fmod         | NM_021355                     | 1,08338  | 0,0361 | 6,96E-05 |
| Zmiz1        | NM_183208                     | 1,06506  | 0,0361 | 8,09E-05 |
| Tbc1d8b      | NM_001081499                  | -1,14928 | 0,0362 | 0,000123 |
| Arc          | NM_018790                     | 1,079514 | 0,0362 | 7,14E-05 |
| Onecut2      | NM_194268                     | -1,16174 | 0,0364 | 0,000126 |
| Iqgap2       | NM_027711                     | -1,14408 | 0,0365 | 0,000125 |
| Eomes        | NM_001164789 /// NM_010136    | 1,08398  | 0,0369 | 7,94E-05 |
| Cidea        | NM_007702                     | -1,13784 | 0,0371 | 0,000129 |
| Hpca         | NM_001130419 /// NM_010471    | -1,15204 | 0,0372 | 0,00013  |
| Tspan2       | NM_027533                     | -1,12725 | 0,0375 | 0,000132 |
| Sh3rf2       | NM_001146299 /// NM_172966    | -1,13095 | 0,0378 | 0,000134 |
| Cd38         | NM_007646                     | -1,12096 | 0,039  | 0,00014  |
| Zbtb20       | NM_019778 /// NM_181058       | -1,11384 | 0,0391 | 0,000142 |
| Sema3e       | NM_011348                     | -1,11174 | 0,0394 | 0,000142 |
| S1pr5        | NM_053190                     | -1,1513  | 0,0404 | 0,00015  |
| Aspa         | NM_023113                     | -1,12596 | 0,0405 | 0,000149 |
| Myeov2       | NM_001163425 /// NR_028108    | -1,10522 | 0,0405 | 0,000151 |
| Nts          | NM_024435                     | -1,1127  | 0,0405 | 0,000152 |

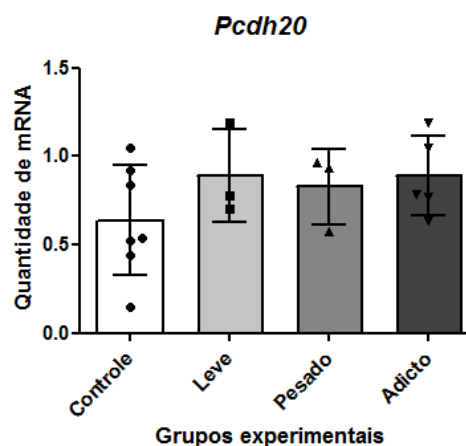
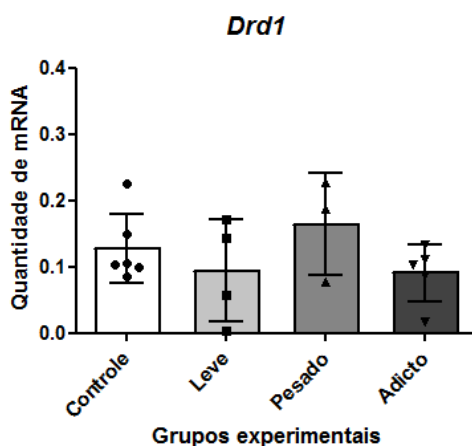
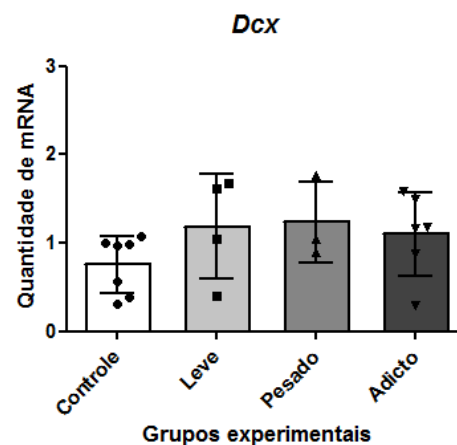
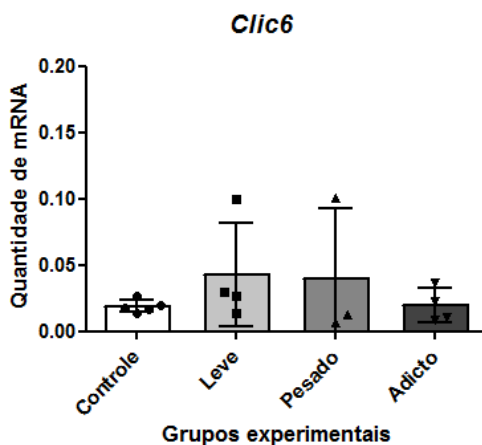
(continuação)

| <b>Símbolo</b> | <b>Identificador RefSeq</b>   | <b>Log FC</b> | <b>PFP</b> | <b>P valor</b> |
|----------------|-------------------------------|---------------|------------|----------------|
| Tac1           | NM_009311                     | -1,09761      | 0,0405     | 0,000155       |
| Ntf3           | NM_001164034 /// NM_001164035 | -1,12245      | 0,0406     | 0,000149       |
| Tmx4           | NM_029148                     | -1,08698      | 0,0407     | 0,000158       |
| Opalin         | NM_153520                     | -1,09738      | 0,0408     | 0,000155       |
| Kcnab1         | NM_010597                     | -1,09303      | 0,0408     | 0,000157       |
| Bcl11b         | NM_001079883 /// NM_021399    | -1,08363      | 0,0412     | 0,000161       |
| Car12          | NM_178396                     | -1,06931      | 0,0412     | 0,000172       |
| Prox1          | NM_008937                     | -1,0909       | 0,0413     | 0,000162       |
| Gpr37          | NM_010338                     | -1,07661      | 0,0414     | 0,000169       |
| Rps9           | NM_029767                     | -1,07558      | 0,0414     | 0,000172       |
| Gng7           | NM_001038655 /// NM_010319    | -1,09561      | 0,0415     | 0,000168       |
| Epha7          | NM_001122889 /// NM_010141    | -1,08774      | 0,0416     | 0,000168       |
| Zfp189         | NM_145547                     | -1,07604      | 0,0416     | 0,000172       |
| Cdh9           | NM_009869                     | -1,0778       | 0,0416     | 0,000174       |
| Tia1           | NM_001164078 /// NM_001164079 | -1,05545      | 0,0416     | 0,000175       |
| Cpm            | NM_027468                     | -1,06402      | 0,0416     | 0,000176       |
| Kcnab1         | NM_010597                     | -1,0845       | 0,0417     | 0,000165       |
| Slc26a4        | NM_011867                     | -1,08498      | 0,0417     | 0,000167       |
| Cyp7b1         | NM_007825                     | -1,0778       | 0,0417     | 0,000171       |
| Dsg2           | NM_007883                     | -1,08517      | 0,0418     | 0,000166       |
| Zbtb20         | NM_019778 /// NM_181058       | -1,08559      | 0,0418     | 0,000168       |
| Sdr39u1        | NM_001082975                  | -1,05829      | 0,042      | 0,000179       |
| Adamts4        | NM_172845                     | -1,07722      | 0,042      | 0,00018        |
| Adora2a        | NM_009630                     | -1,11444      | 0,042      | 0,000181       |
| Foxc1          | NM_008592                     | 1,038534      | 0,0425     | 9,71E-05       |
| Zbtb20         | NM_019778 /// NM_181058       | -1,04327      | 0,0428     | 0,000188       |
| Bcl11b         | NM_001079883 /// NM_021399    | -1,04868      | 0,0429     | 0,000186       |
| Thsd7b         | NM_172485                     | -1,09581      | 0,043      | 0,000188       |
| Cldn11         | NM_008770                     | -1,04103      | 0,0432     | 0,000192       |
| Gng4           | NM_010317                     | 1,046871      | 0,0432     | 0,000101       |
| Ttc9b          | NM_028417                     | 1,060702      | 0,0436     | 0,000104       |
| Lats2          | NM_015771 /// NM_153382       | -1,03552      | 0,0447     | 0,000199       |
| Cabp1          | NM_013879                     | 1,049382      | 0,045      | 0,000109       |
| Ppp1r1b        | NM_144828                     | -1,0796       | 0,0451     | 0,000202       |
| Dgkg           | NM_138650                     | -1,02637      | 0,0453     | 0,000207       |
| Fam84b         | NM_001162926                  | -1,0348       | 0,0456     | 0,000207       |
| Dgkg           | NM_138650                     | -1,03         | 0,0458     | 0,000207       |
| Tgfa           | NM_031199                     | -1,01572      | 0,0471     | 0,000216       |
| Il16           | NM_010551                     | -1,08305      | 0,0476     | 0,00022        |
| Glo1           | NM_001113560 /// NM_025374    | -1,03248      | 0,0482     | 0,000225       |
| Lsm14a         | NM_025948                     | -1,01333      | 0,0483     | 0,000224       |
| Gsn            | NM_146120                     | 1,02535       | 0,0491     | 0,000121       |
| D4Bwg0951e     | NM_026821                     | -1,0206       | 0,0494     | 0,000231       |
| Olfml3         | NM_133859                     | 1,014789      | 0,0494     | 0,000123       |

Fonte: (Qualificação de doutorado Silva e Silva, 2014)

## ANEXO D – Genes quantificados pela técnica de q-PCR que não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos

Gráficos representando a quantidade relativa de mRNA dos genes sem diferença estatística significativa no córtex pré-frontal entre os grupos experimentais expressas como média e desvio padrão. Ordenada: Quantidade de mRNA em unidades arbitrárias; Abscissa: Grupos experimentais. Todos os genes foram analisados pelo teste estatístico não paramétrico *Kruskal-Wallis* seguida pelo teste *post-hoc Dunns* comparando todos os pares de colunas e pelo teste estatístico paramétrico ANOVA 1-via seguida pelo teste *post-hoc Newman-Keuls*. *Clic6*, *chloride intracellular channel 6*; *Dcx*, *doublecortin*; *Drd1*, *dopamine receptor D1*; *Pcdh20*, *protocadherin 20*; *Rem2*, *rad and gem related GTP binding protein 2*; *Ttr*, *transthyretin*.



(continuação)

