

ANDREA FROZINO RIBEIRO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E COMPORTAMENTAL DE UM MODELO
ANIMAL DE CONSUMO DE ETANOL**

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor em Genética, Curso
de Pós-Graduação em Genética, Departamento
de Biologia Geral, Universidade Federal de
Minas Gerais

Área de Concentração: Genômica e
Bioinformática

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Brunialti
Godard – Universidade Federal de Minas Gerais

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Roseli Boerngen de
Lacerda – Universidade Federal do Paraná

BELO HORIZONTE

2011

Ribeiro, Andrea Frozino

Caracterização molecular e comportamental de um modelo animal de consumo de etanol. [manuscrito] / Andrea Frozino Ribeiro. – 2011
112f. : il.; 29,5 cm

Orientadora: Ana Lúcia Brunialti Godard. Co-Orientadora: Roseli Boerngen de Lacerda.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Biologia Geral.

1. Alcoolismo – Teses. 2. Ácido ribonucléico – Teses. 3. Camundongo como animal de laboratório – Teses. 4. Genética do comportamento – Teses. 5. Modelos animais em pesquisa – Teses. 6. Genética molecular – Teses. 7. Genômica – Teses. 8. Bioinformática – Teses. I. Godard, Ana Lúcia Brunialti. II. Lacerda, Roseli Boerngen de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Biologia Geral. IV. Título.

CDU: 577.2: 575

AGRADECIMENTOS

Inúmeras foram às contribuições dadas pelos colaboradores durante a realização desse trabalho e, foram muitos, esses que colaboraram tanto no âmbito profissional como pessoal. Dessa forma, citarei aqui poucos nomes, contudo guardo a lembrança de todos em meu coração.

À minha orientadora Ana Lúcia, obrigada pela ousadia de receber uma aluna cuja formação acadêmica não contemplava integralmente às exigências vigentes na Academia, mas tenho plena convicção que sua coragem foi de encontro à necessidade de estimular a formação de novas idéias e conseqüentemente, de ajudar os alunos que buscam não só informação e sim conhecimento.

À minha orientadora Roseli, obrigada por sua paciência e dedicação, afinal a verdadeira inteligência nos dá compreensão e paciência, ambos necessários para entender os padrões dos fenômenos naturais e nossos semelhantes.

Aos companheiros de trabalho Diego, Carol, Daniel, Dri, Décio, Aninha, Mayara, Bruno, Aretta, Alessandra, Pablo, André Luiz, Laura, Catarina, Gui, Caroline, Talita e Júlia, obrigada pelo aprazível convívio.

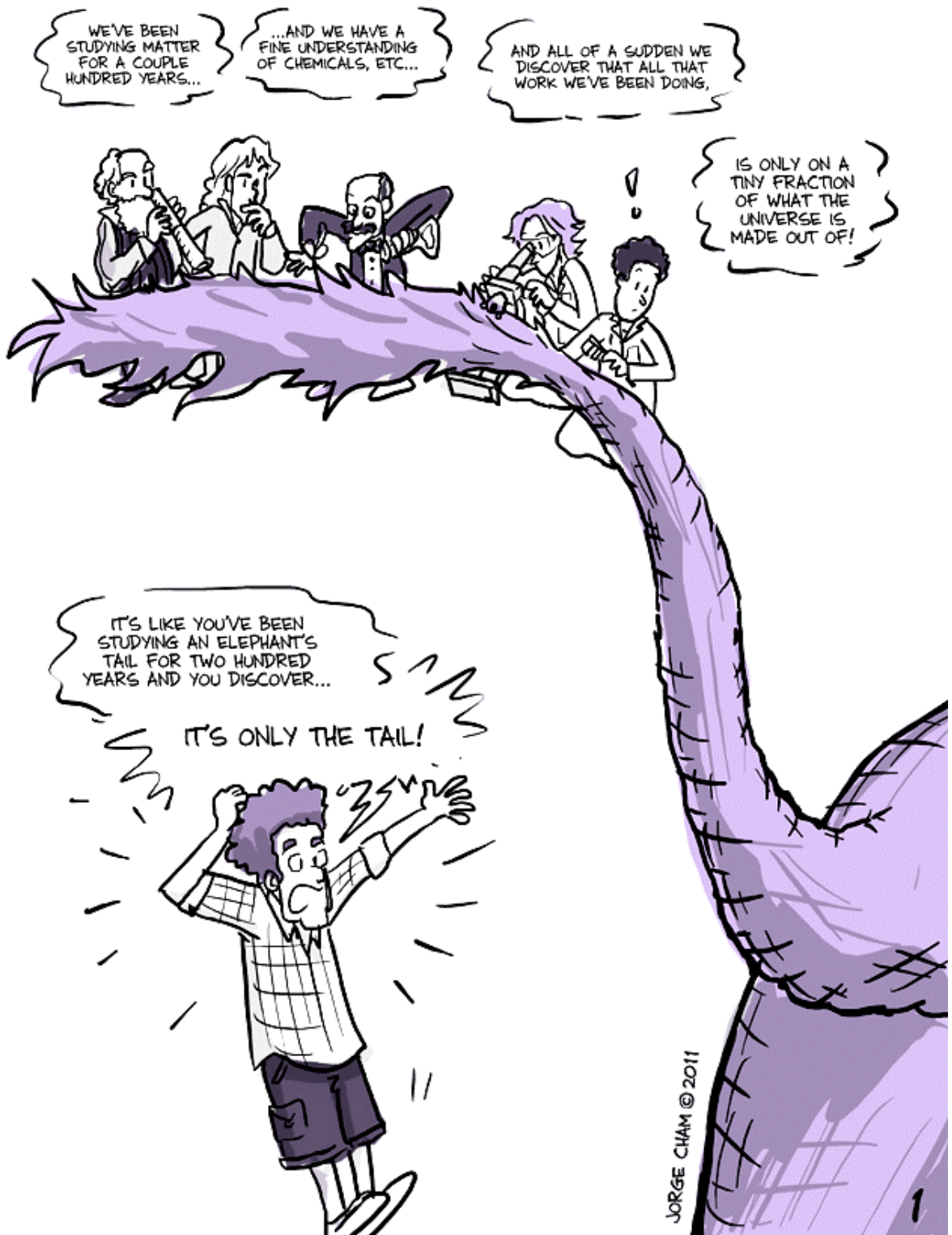
Aos Professores da banca Maria Raquel, Álvaro, Cláudia e André, obrigada por aceitarem tecer suas críticas para o aperfeiçoamento desse trabalho.

À minha querida e estimada família Lena, Alcides, Alexandre, André Luiz, Joel Lincoln, Rose, Dennize e minhas sobrinhas Helen Lumi e Giovana Akemi, obrigada pelo ensinamento de preciosos valores que permitiram e permitem o aprimoramento do meu ser.

A Deus, obrigada pelo sentido que concede à minha vida e por fim, deixo a todos uma citação de Max Planck (1858-1947) como síntese das minhas expectativas diante da ciência:

“Os cientistas têm que ter uma imaginação vívida e intuitiva, porque as novas idéias não são geradas por dedução, mas por uma imaginação artística e criativa.”

E, uma charge que nos remete ao lado cômico de nossa ciência, pois não podemos deixar de perceber o que é divertido tendo em vista o exercício da criatividade, ou no mínimo, a tentativa de exercê-la.



Fonte: <http://www.phdcomics.com/>

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vii
LISTA DE ABREVIACÕES	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL	01
1.1. BEBER: A (IN)CONFUNDÍVEL ALIENAÇÃO DO SER	01
1.2. GENÉTICA DO ALCOOLISMO	03
1.3. RELAÇÃO ENTRE ANSIEDADE E CONSUMO DE ETANOL	08
1.4. ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DA REGIÃO DOS NÚCLEOS DA AMÍGDALA CEREBRAL	10
1.5. LADO B DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: RECEPTOR GABA _B	12
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	15
3. HIPÓTESE NEUROBIOLÓGICA	16
4. OBJETIVOS	17
5. MATERIAL E MÉTODOS	18
5.1. ANIMAIS	18
5.2. DROGAS	18
5.3. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS PARA OS TESTES COMPORTAMENTAIS	18
5.4. PROCEDIMENTOS DO MODELO DE LIVRE ESCOLHA	21
5.5. PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE MOLECULAR	23
5.5.1. Extração do RNA total	23
5.6. PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE MOLECULAR DA REAÇÃO DE MICROARRANJO	24
5.6.1. Confeção do DNAc da reação	24
5.6.2. Fragmentação do DNAc fita simples	25
5.6.3. Marcação do DNAc fita simples	25
5.6.4. Hibridação e escaneamento	25
5.7. NORMALIZAÇÃO DOS DADOS DO MICROARRANJO	26
5.8. PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE MOLECULAR DA PCR EM TEMPO REAL	27
5.8.1. Desenho dos iniciadores	27
5.8.2 Confeção do DNAc	27
5.8.3. PCR em tempo real	27
5.9. NORMALIZAÇÃO DOS DADOS DA PCR EM TEMPO REAL	28

5.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
5.10.1. Análise estatística dos dados do modelo animal	29
5.10.2. Análise estatística dos dados moleculares	29
6. RESULTADOS	31
6.1. MODELO ANIMAL POR LIVRE ESCOLHA	31
6.1.1. Padrão geral do consumo	31
6.1.2. Padrão individual do consumo	32
6.1.3. Padrão do consumo em cada grupo	36
6.2. ANÁLISE COMPORTAMENTAL DURANTE A ABSTINÊNCIA	37
6.3. ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DOS NÚCLEOS DA AMIGDALA CEREBRAL	39
6.3.1. Seleção dos genes diferencialmente transcritos	41
6.3.2. Sequência dos iniciadores desenhados para análise por PCR em tempo real	42
6.3.3. Validação dos genes diferencialmente transcritos	44
6.3.4 Análise de genes da neurotransmissão GABAérgica e do metabolismo energético	45
6.4. ANÁLISE DOS NÍVEIS DE RNAm DOS GENES <i>Gabbr1</i> E <i>Gabbr2</i> PELA PCR EM TEMPO REAL	48
7. DISCUSSÃO	50
7.1. POSSÍVEL RELAÇÃO ENTRE ANSIEDADE E ABSTINÊNCIA AO ETANOL.....	52
7.2. METABOLISMO ENERGÉTICO CEREBRAL: UMA VIA PROMISSORA PARA O ESTUDO DO ALCOOLISMO?	55
7.3. POSSÍVEL RELAÇÃO ENTRE OS GENES <i>Gabbr1</i> E <i>Gabbr2</i> E CONSUMO DE ETANOL	60
8. CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	64
ANEXOS	80

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

GRÁFICO 01 – CONSUMO GERAL DE ETANOL E ÁGUA NAS FASES EXPERIMENTAIS	31
GRÁFICO 02 – PADRÕES DE CONSUMO INDIVIDUAL DE ETANOL E ÁGUA	33
GRÁFICO 03 - PREFERÊNCIA DOS FENÓTIPOS ENTRE AS SOLUÇÕES.....	36
GRÁFICO 04 – CONSUMO DE ETANOL ENTRE AS FASES EXPERIMENTAIS	37
GRÁFICO 05 – ANÁLISE DE AGRUPAMENTO	40
GRÁFICO 06 – NÍVEIS DE TRANSCRITOS EM CADA ÁREA CEREBRAL.....	49
GRÁFICO 07 – PESO CORPORAL	89
FIGURA 01 – CAMPO ABERTO	19
FIGURA 02 – LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	20
FIGURA 03 – CAIXA DE MOVIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA	20
FIGURA 04 – MODELO ANIMAL POR LIVRE ESCOLHA	21
FIGURA 05 – MODELO PARA AVALIAR A PERDA DO CONTROLE SOBRE O CONSUMO DE ETANOL	22
FIGURA 06 – RNA TOTAL	24
FIGURA 07 – ORGANOGRAMA DAS ANÁLISES DOS DADOS	26
FIGURA 08 – MAPA DE INTERAÇÃO MOLECULAR	46
FIGURA 09 – VIAS METABÓLICAS DOS ÁLCOOIS	57
TABELA 01 – CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DO ALCOOLISMO	03
TABELA 02 – PADRÃO INDIVIDUAL DO CONSUMO DE ETANOL NAS FASES EXPERIMENTAIS.....	34
TABELA 03 – PREFERÊNCIA ENTRE AS SOLUÇÕES	35
TABELA 04 – CONTRIBUIÇÃO DOS COMPORTAMENTOS PARA OS FENÓTIPOS	38
TABELA 05 – MATRIZ DE ROTAÇÃO	38
TABELA 06 –ÍNDICE DAS COMPONENTES	39
TABELA 07 – VIAS METABÓLICAS	40
TABELA 08 – ANÁLISE DISCRIMINANTE DE TODOS OS GENES	40
TABELA 09 – GENES COM 100% DE PODER DISCRIMINANTE	41
TABELA 10 – CORRELAÇÃO ENTRE OS GENES SELECIONADOS	42
TABELA 11 – SEQUÊNCIA DOS INICIADORES	43
TABELA 12 – MEDIDAS DESCRITIVAS DOS GENES	44
TABELA 13 – MATRIZ DE ROTAÇÃO	47

TABELA 14 – ÍNDICES DAS COMPONENTES DE CADA GRUPO	48
TABELA 15 – PADRÃO INDIVIDUAL DE CONSUMO DAS SOLUÇÕES DE ETANOL (G/KG) NAS FASES EXPERIMENTAIS	81
TABELA 16 – PREFERÊNCIA ENTRE AS SOLUÇÕES	82
TABELA 17 – VARIÁVEIS PARAMÉTRICAS COMPORTAMENTAIS COLETADAS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	84
TABELA 18 – VARIÁVEIS NÃO PARAMÉTRICAS COMPORTAMENTAIS COLETADAS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	85
TABELA 19 – VARIÁVEIS PARAMÉTRICAS COMPORTAMENTAIS COLETADAS NO CAMPO ABERTO	85
TABELA 20 – VARIÁVEIS NÃO PARAMÉTRICAS COMPORTAMENTAIS COLETADAS NO CAMPO ABERTO	86
TABELA 21 – AMBULAÇÃO ENTRE OS GRUPOS COLETADA NA CAIXA DE MOVIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA	86
TABELA 22 – RELAÇÃO ENTRE COMPORTAMENTO EMOCIONAL E CONSUMO DAS SOLUÇÕES	87
TABELA 23 – ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENES SELECIONADOS	91
TABELA 24 – ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENES SELECIONADOS NO GRUPO SEM CONTROLE	92
TABELA 25 – ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENES SELECIONADOS NO GRUPO PESADO	93
TABELA 26 – ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENES SELECIONADOS NO GRUPO LEVE	94
TABELA 27 – ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENES SELECIONADOS NO GRUPO CONTROLE	95
TABELA 28 – GENES DIFERENCIALMENTE TRANSCRITOS	96
TABELA 29 – GENES COM 90% DE PODER DISCRIMINANTE	103

LISTA DE ABREVIACOES

% – por cento

°C – grau celsius

DNA – ácido desoxirribonucléico

DNAc – ácido desoxirribonucléico complementar

RNA – ácido ribonucléico

RNAa – ácido ribonucléico anti-senso

RNAm – ácido ribonucléico mensageiro

cm – centímetro

cm² – centímetro quadrado

dT – deoxitimina

ep – erro padrão

g – grama

g/L – gramas por litro

GC – guanina e citosina

h – hora

kg – kilograma

m – metro

mA – miliamper

mL – mililitro

mM – milimolar

n – número de indivíduos

ng – nanograma

nm – nanômetro

PCR – reação de cadeia de polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

rcf – força relativa centrífuga

rpm – rotações por minuto

TM – temperatura de dissociação

V – volts

v/v – volume por volume

x – número de vezes de diluição

µg – micrograma

µL – microlitro

RESUMO

Pela primeira vez, foi demonstrada a relação entre genes responsáveis pelo metabolismo energético do cérebro, genes da via GABAérgica e comportamento aditivo em um modelo animal. Foram utilizados camundongos machos *Swiss*, não-isogênicos, expostos a um modelo de livre escolha entre três soluções (água, etanol 5% v/v e 10% v/v) por um período que consistia de quatro fases: aquisição (AQUI), abstinência (ABS), reapresentação (RE) e adulteração com quinina (AD). Depois, os camundongos foram classificados comportamentalmente em três grupos: consumidor sem-controle (A; preferência por etanol e alto consumo dessa droga durante todas as fases), consumidor pesado (P; preferência por etanol e alto consumo durante a fase AQUI e redução significativa na fase AD) e consumidor leve (L; preferência por água e baixo consumo de etanol em todas as fases). Análise de microarranjo usando RNA total dos núcleos da amígdala cerebral mostrou que a via do metabolismo do ácido graxo estava alterada pelo tratamento por livre escolha. Análises posteriores usando reação de cadeia de polimerase em tempo real dos genes selecionados pelos dados do microarranjo mostraram que, o gene *Acss2* estava significativamente aumentado apenas nos camundongos sem-controle. Ainda, nesse grupo foi observada uma correlação inversamente significativa entre os níveis dos transcritos do gene *Hadh* e outros genes do metabolismo energético cerebral nessa mesma área, sugerindo que talvez alterações nessa via possam contribuir para a manutenção do consumo de etanol nos camundongos sem-controle. Para avaliar o envolvimento do receptor GABAB, o RNAm dos genes *Gabbr1* e *Gabbr2* foi quantificado pela reação de cadeia de polimerase em tempo real no córtex pré-frontal, hipotálamo, hipocampo e estriado. No córtex pré-frontal dos camundongos do grupo A, foi observado um aumento dos níveis dos transcritos do *Gabbr1* e *Gabbr2*, sendo significativo para o *Gabbr1* comparado com os outros grupos. No hipocampo foi observada uma redução nos níveis desses dois genes, sendo significativo para o *Gabbr2* nos animais do grupo A comparado aos demais grupos. No estriado, foi encontrado um aumento significativo nos níveis dos transcritos do *Gabbr1* apenas no grupo A. Nenhuma diferença foi observada na região do hipotálamo. Considerando que as áreas cerebrais analisadas são relevantes para o comportamento de consumo das drogas, nossos resultados revelam que esses genes podem estar envolvidos com o consumo alto e persistente no grupo A. Além disso, o estudo do metabolismo energético cerebral e do receptor GABAB tem o potencial de produzir novas perspectivas para o delineamento da neuroplasticidade associada ao alcoolismo.

Palavras-chave: modelo animal, alcoolismo, comportamento, camundongo, RNA

ABSTRACT

For the first time, we have demonstrated the relation between genes responsible for energy metabolism of the brain, genes of GABAergic pathway and addictive behavior in an animal model. We used non-inbred, *Swiss* mice exposed to a three-bottle free-choice model (water, 5% v/v ethanol, and 10% v/v ethanol) over a long period consisting of four phases: acquisition (AC), withdrawal (W), reexposure (RE) and quinine-adulteration (AD). Later, mice were behaviorally classified into three groups: loss-of-control-drinker (A; preference for ethanol and high levels of consumption during all phases), heavy drinker (H; preference for ethanol and high levels of consumption during AC and reduction in AD), and light drinker (L; preference for water during all phases). Microarray analysis using total RNA from nucleus of the amygdala showed the fatty acid metabolism pathway affected by ethanol treatment. Further analysis using quantitative real-time polymerase chain reaction among genes differentially expressed, showed that gene *Acss2* was upregulated only in loss-of-control mice. Likewise, in these mice there was a significant inverse correlation between transcript levels of *Hadh* gene and other genes of energy metabolism in the same area, suggesting that this pathway may contribute to ethanol consumption in the loss-of-control mice. To evaluate the involvement of GABA_B receptor, the mRNA of the genes *Gabbr1* and *Gabbr2* was quantified using real-time polymerase chain reaction in the prefrontal cortex, hypothalamus, hippocampus, and striatum. In the prefrontal cortex of animals in group A, we found high *Gabbr1* and *Gabbr2* transcript levels, with significantly higher *Gabbr1* transcript levels compared with Groups C (control), L, and H. In the hippocampus of animals in Group A, *Gabbr2* mRNA levels were significantly lower compared with Groups C, L, and H. In the striatum, we found a significant increase in *Gabbr1* transcription compared with Groups C, L, and H. No differences in *Gabbr1* or *Gabbr2* transcript levels in the hypothalamus were observed among groups. Considering that brain areas analyzed are relevant to drug taking behavior, our results suggest that these genes may contribute to high and persistent ethanol consumption in group A. Moreover, the study of cerebral energy metabolism and GABA_B receptor may provide further insight into neuronal plasticity associated with alcoholism.

Keywords: animal model, alcoholism, behavior, mouse, RNA

1. Introdução Geral

1.1. Beber: a (in)confundível alienação do ser

O etanol é a droga psicotrópica mais utilizada pelos humanos em todo o mundo. Ao longo de toda história da humanidade, são encontrados registros do uso dessa droga, tendo o mais antigo ocorrido há mais de 6000 a.C. na China. Apesar dos estudos arqueológicos acerca da história do uso do etanol serem recentes, já foram encontradas evidências corroborando o consumo, produção e outras práticas relacionadas a essa droga em quase todas as grandes civilizações (Dietler, 2006).

Na Grécia antiga, o vinho não era apenas parte de um ritual, chamado simpósio, mas também estava associado ao poder divino de Dionísio (Dietler, 2006). Além de fazer parte do ritual religioso cristão, escrituras bíblicas relatam o uso de etanol por Noé:

“Noé que era agricultor, começou a cultivar a terra, e plantou vinha. E, tendo bebido, embriagou-se, e apareceu nu em sua tenda”, (Gênesis, 9-20, 21)

Na Índia, textos médicos em Sânscrito citam a utilização de bebidas alcoólicas medicinais chamadas de *Mritasanjīvanī Surā*, como bebidas (ou espíritos) para levantar os mortos. Apesar de não comentarem sobre a concentração do teor alcoólico nessa situação, fica claro o uso para obter os efeitos farmacológicos dessa droga (Allchin, 1979).

Sob contextos variados, as práticas relacionadas ao uso de etanol apresentam íntima relação com a construção de nossa estrutura social, seja na tentativa de se buscar uma identidade ou, estabelecer políticas de controle que garantam a hierarquia social. Politicamente, é possível observar que o etanol contribui como um fator de manipulação, tanto em países onde existem instituições e políticas formais, como onde não existem. Dessa forma, constitui-se em uma estratégia de manipulação do poder e construção da autoridade (Dietler, 2006).

Dessa forma, é compreensível que a escassez de políticas públicas que visem estimular a manutenção da qualidade de vida do indivíduo, pudesse ser considerada como fator social que viesse a dificultar a percepção do limite entre o beber controlado e a perda do controle sobre o consumo de etanol. Apenas nos últimos duzentos anos, passou a ser notada a existência de um comportamento que não correspondia ao beber moderado (Toscano, 2000). Ao contrário, simbolizava uma perda de controle sobre a vontade de consumir essa droga, o que veio posteriormente a ser chamado de dependência.

Inicialmente, a dependência alcoólica foi caracterizada como uma síndrome onde o indivíduo apresentava sintomas claros de tolerância e abstinência. Várias décadas se passaram até se obter um consenso sobre a sintomatologia que caracterizava um indivíduo dependente. Em 1994, foi lançada a última edição do manual diagnóstico da Associação Psiquiátrica Americana (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV*), onde pela primeira vez foi discriminada a diferença entre dependência e adição (tabela 1). Dessa forma, dependência (*dependence*) foi definida como um estado de adaptação que ocorre após a repentina retirada da droga (levando ao aparecimento da síndrome de abstinência ou da retirada) ou rápida redução dos níveis sanguíneos da droga (tolerância). Já a adição (*addiction*) foi considerada como perda do controle e desejo incontrolável pela droga (*craving*) associado ao prejuízo nas funções sociais e ocupacionais, podendo estar associada aos sintomas de tolerância e abstinência. Isso foi reflexo do entendimento de que o indivíduo que consome quantidades de etanol suficientes para promover a síndrome da retirada (anteriormente denominado como sintoma físico), poderia não estar apresentando a doença alcoolismo. Por outro lado, o indivíduo que apresentar compulsão pelo etanol (anteriormente denominado sintoma psicológico) e prejuízo em sua qualidade de vida em função do uso da droga, provavelmente estará sofrendo de alcoolismo, quebrando a visão dicotômica que preconizava a existência de uma forma mais branda do alcoolismo e outra mais severa, nomeadas anteriormente como dependência psicológica e física, respectivamente.

Atualmente, segundo o último relatório da OMS (GBD, 2008), as doenças neuropsiquiátricas representam um terço das principais causas de deficiência no mundo, representadas através de um prejuízo na qualidade de vida do indivíduo ou mortalidade precoce. E, problemas relacionados ao uso de etanol estão entre as sete principais causas de deficiência no mundo.

No Brasil, o uso de etanol de forma indevida apresenta índices maiores de prejuízos na qualidade de vida do indivíduo comparado aos países desenvolvidos, segundo o I Levantamento Nacional sobre padrões de consumo de etanol (SENAD, 2007). Em conformidade com o II Levantamento Domiciliar sobre uso de drogas envolvendo 108 cidades brasileiras, mais de 70% dos entrevistados já fizeram uso de etanol ao menos uma vez na vida e, mais de 12% poderiam ser considerados dependentes (CEBRID, 2006). Ainda conforme dados epidemiológicos, o alcoolismo apresenta correlação com a incidência de doenças psiquiátricas, hepáticas, cardíacas entre outras, representando cerca de 10% dos problemas totais de saúde no Brasil, sendo essa porcentagem maior se for considerada apenas sua incidência dentre os distúrbios psiquiátricos (Meloni; Laranjeira, 2004). Além disso, o uso abusivo de etanol também aumenta a incidência de problemas criminais, podendo

comprometer, além da vida do usuário, a vida de seus pares (Galduróz; Caetano, 2004). Deste modo, é possível entender o quão invasivas e devastadoras, são as consequências do uso indevido de etanol na vida do indivíduo.

TABELA 01 – CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DO ALCOOLISMO

Critérios	Sintomas
1	efeito diminuído com o uso continuado da mesma quantidade da droga (tolerância)
2	síndrome de abstinência ou uso de outra substância para evitar ou aliviar os sintomas da abstinência
3	desejo persistente ou insucessos na tentativa de parar o uso
4	uso por longos períodos ou grandes quantidades
5	aumento de tempo gasto para obter, usar ou recuperar-se dos efeitos da droga
6	atividades sociais, ocupacionais ou recreacionais são evitadas ou reduzidas em função do uso da droga
7	uso continuado apesar do conhecimento de que a droga causa ou exacerba um prejuízo em sua saúde

Nota: DSM-IV, APA, 1994. É necessário que o paciente apresente pelo menos 3 desses sintomas, ocorrendo ao longo de no mínimo 12 meses.

É evidente a natureza complexa do uso de etanol pelos humanos. Ao mesmo tempo em que é utilizado como facilitador da “sociabilidade” humana, constitui-se em um instrumento útil para alterar a percepção dos estímulos ao qual estamos expostos, tanto internos quanto externos, ou seja, alterar nosso “estado de consciência”. Reconhecendo que os comportamentos que resultam de nossa consciência apresentam um substrato neural capaz de traduzir uma “idéia” em processos biofísico-químicos, é possível reconhecer a importância do estudo acerca da neurobiologia do alcoolismo.

Diante desse panorama, é autêntica a necessidade de se buscar e/ou implantar medidas que visem reduzir os riscos associados ao uso de etanol. Por isso, a implantação de medidas que elucidem os mecanismos neurobiológicos subjacentes ao alcoolismo é imprescindível para a promoção da saúde do indivíduo.

1.2. Genética do alcoolismo

Estudos moleculares (p.e., análises de ligação, associação baseado em caso-controle, associação baseado em famílias, genotipagem em larga escala – *whole – genome association*, teste de desequilíbrio de transmissão ou TDT) têm produzido substanciais

evidências, associando os genes envolvidos no metabolismo do etanol, nas neurotransmissões DOPAMinérgica, GABAérgica, COLInérgica, GLUtamatérgica e SEROTOnérgica ao alcoolismo. Existem dados revelando o envolvimento de outros genes, contudo são necessárias mais replicações desses estudos, a fim de corroborarem a contribuição desses para o alcoolismo (para revisão ver Dotto Bau, 2002; Köhnke, 2008; Ducci, Goldman, 2008; Kimura, Higuchi, 2011).

Considerando o metabolismo do etanol, é conhecido que indivíduos oriundos de populações asiáticas (revisões citadas acima), portadores do alelo ALDH2*2 Lis/Glu pos 504 que codifica a enzima acetaldeído dehidrogenase com atividade reduzida, mostram menor susceptibilidade ao alcoolismo. Nesses indivíduos, após serem ingeridas bebidas etílicas ocorre o acúmulo de acetaldeído no organismo, ocasionando sintomas indesejáveis (p.e., rubor facial, náusea, cefaléia e taquicardia). Santos e colaboradores (1997) encontraram que o alelo ALDH2*2 não exerce seu efeito protetor por si só, na população brasileira e, em outros estudos foi observada ausência dessa proteção em indivíduos de outras populações (Suzuki et al., 1994; Lorenzo et al., 2006; Moore et al., 2007). Isso significa que, embora esse alelo apresente reconhecido papel para o alcoolismo, seu efeito pode ser limitado a depender da população estudada. Os alelos ADH1B*2 e ADH1B*3, que codificam a enzima álcool dehidrogenase, são relacionados com uma hipotética proteção contra o alcoolismo (Köhnke, 2008), uma vez que as enzimas codificadas apresentariam maior razão de metabolização do etanol, levando ao acúmulo de acetaldeído no organismo após a ingestão dessa droga. Curiosamente, as enzimas ADH classe 1 (ADH1A e ADH1B) apresentam comportamentos similares na presença de etanol e NAD^+ (nicotinamida aldeído dehidrogenase). E, sob as mesmas condições (p.e., presença de etanol e pH) a enzima ADH1B aumenta sua atividade em mais 30%, enquanto que, a ADH1A reduz sua atividade em mais de 60% (Bosron et al., 1983). Suas frequências alélicas também variam, sendo o ADH1B*2 comumente encontrado na população asiática e raramente em outros grupos étnicos e, o ADH1B*3 está presente em cerca de 15% da população africana (Ducci, Goldman, 2008).

Em relação à neurotransmissão DOPAMinérgica, alguns genes candidatos foram associados a dependência, como por exemplo, os receptores metabotrópicos da família D2 DRD2 e DRD4, o transportador de dopamina DAT, as enzimas metabolizadoras D β H (dopamina β – hidroxilase), COMT (catecol – orto – metiltransferase) e MAO-A (monoaminaoxidase – A). A transmissão DOPAMinérgica mesolímbica é conhecida como a via da recompensa (*reward pathway*) e um dos efeitos agudos das drogas de abuso é a estimulação desse circuito. Para o etanol não é diferente, embora ainda não seja conhecido exatamente como esse processo ocorra. Além do alcoolismo, as alterações no sistema

DOPaminérgico também estão presentes em patologias como, déficit de atenção, comportamento compulsivo e impulsivo, tabagismo, obesidade, esquizofrenia e autismo. Inicialmente, o polimorfismo de base única (rs1800497, SNP– *single nucleotide polymorphism*) no alelo Taq1 A1 foi considerado estar presente na região não codificadora do gene DRD2 e, posteriormente foi descoberto que ele estava na região codificadora de um gene adjacente ao DRD2, o ANKK1 (*ankyrin repeat and kinase domain containing-1*) e talvez, devido a um efeito epistático reduzisse a expressão do DRD2. Interessantemente, foi encontrada uma relação entre esse alelo e os endofenótipos eletrofisiológicos do alcoolismo (representados por alterações na frequência da onda β no eletroencefalograma, ou onda P300), (Jiménez-Arriero et al., 2006). No terceiro exon do receptor DRD4, tem sido descritas onze variações no número de repetições em tandem (VNTR – *variable number of tandem repeat*) de 48 pares de bases, sendo que a variante com sete repetições parece reduzir em duas vezes a potência de inibição da adenosina 3',5' – monofosfato cíclico (AMPc). A variante longa desse receptor (> 6 repetições) parece apresentar relação com a procura por novidade e com a dependência de etanol, embora, para a população brasileira não foi observada relação entre esse alelo e alcoolismo (Roman et al., 1999). Kimura (2011) em sua revisão destaca que esse polimorfismo estaria mais relacionado com o comportamento de procura por novidade do que com a dependência. A contribuição dos polimorfismos VNTR observados em alguns alelos do DAT1 para o alcoolismo, também é controversa (Ducci, Goldman, 2008; Kimura, Higuchi, 2011). Apesar de estudos de tomografia de emissão de fóton único (SPECT – *single-photon emission computed tomography*) demonstrar uma redução na densidade do DAT1 em cérebros de indivíduos que ingerem etanol, as análises de associação ainda não foram conclusivas devido ao pequeno tamanho amostral avaliado (Köhnke, 2008).

Devido a seu papel fisiológico a D β H (que catalisa a conversão da dopamina em noradrenalina) tem sido alvo de extensos estudos. Acreditava-se que, níveis baixos da atividade dessa enzima poderiam ter alguma relação com alcoolismo. Porém, estudos recentes revelaram que o polimorfismo C1021T no gene D β H, que é responsável por 35-52% da variação na atividade dessa enzima, parece não ter associação com a dependência (Freire et al., 2005; Köhnke, 2008). A dopamina é metabolizada a ácido homovalínico (HVA) pelas enzimas COMT e MAO. O alelo L da COMT codifica uma enzima com atividade reduzida de três a quatro vezes. Homens que portam o genótipo LL parecem ser mais propensos ao elevado consumo de etanol. Por outro lado, alelos da MAO com menos de quatro cópias de VNTR (um polimorfismo de 30 pares de bases localizado a 1200 pares de bases do códon de início da tradução) apresentam reduzida eficiência de transcrição comparados aos alelos mais longos (quatro ou cinco cópias) e maior risco para a dependência (Ducci, Goldman, 2008;

Köhnke, 2008). Entretanto, a influência genética dos polimorfismos em ambas as enzimas para o alcoolismo, ainda não foi elucidada.

A neurotransmissão GABAérgica é a principal via inibitória no sistema nervoso central e é alvo do etanol. Essa via medeia vários efeitos do etanol, como por exemplo, os efeitos agudos, de tolerância e auto-administração. Muitos dos genes do receptor ionotrópico GABAA (ácido gama aminobutírico) podem ser encontrados agrupados ao longo do genoma, sendo que no cromossomo 4 estão o GABRA2, GABRA4, GABRB1 e GABRG1, no cromossomo 5 o GABRA1, GABRA6, GABRB2 e GABRG2, e no cromossomo 15 o GABRA5, GABRB3 e GABRG3. É conhecido que os genes codificadores das subunidades $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\beta 1$, $\beta 3$, $\gamma 1$ e $\gamma 3$ do receptor GABAA apresentam associação com a dependência de etanol. São descritos polimorfismos (SNP) em regiões não codificadoras desses genes, mas com possível influência sobre a expressão do receptor GABAA, embora ainda não se conheça, ao certo, as implicações dessas mutações em nível funcional. Ainda, estudos baseados em famílias conduzidos pelo COGA (*Collaborative studies on genetics of alcoholism*, órgão fundado pelo *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism – NIAAA*) encontraram forte ligação entre polimorfismos (SNP) nos genes GABRB1 e GABRA2 e os endofenótipos eletrofisiológicos do alcoolismo (onda P300). Outras análises de ligação também conduzidas pelo COGA revelaram associação entre onze polimorfismos (SNP) nas regiões do quarto e quinto íntron do receptor muscarínico subtipo 2 (CHRM2) e os mesmos endofenótipos do alcoolismo (onda P300).

O etanol inibe a neurotransmissão excitatória GLUtamatérgica e essa via também participa das respostas em decorrência do uso agudo e crônico do etanol, como por exemplo, sensibilização e abstinência. Köhnke (2008) em seu trabalho de revisão mostra que, ainda é controversa a relação entre os polimorfismos nos alelos das variantes dos receptores ionotrópicos do glutamato NMDAR1 e NMDAR2B (N – metil D – aspartato) e o alcoolismo. Mesmo assim, o autor chama a atenção para o polimorfismo C677T no alelo da MTHF (metileno tetrahydrofolato redutase), que codifica uma enzima termolábil responsável por um aumento em torno de 12% nos níveis da homocisteína plasmática. A homocisteína age como um agonista nos receptores NMDA chegando a ser neurotóxica, especialmente em neurônios dopaminérgicos. O alelo T da MTHF C677T parece estar associado a convulsões durante a abstinência de etanol, dependência e, a uma redução nos níveis plasmáticos do principal metabólito da dopamina, HVA. Contudo, um prejuízo da neurotransmissão DOPAminérgica também foi observado em pacientes esquizofrênicos portadores dessa mutação sem aumento na incidência de alcoolismo entre esses. Isso sugere que talvez a incidência de alcoolismo nos

portadores do alelo T possa estar mais relacionada à diminuição da neurotransmissão DOPAMinérgica do que com fatores genéticos de predisposição a dependência *per se*.

Em se tratando da via SEROTOnérgica, o polimorfismo mais comum descrito para o transportador de serotonina (5HTT), que pode ter relação com problemas de ansiedade ou alcoolismo, é a variação na região promotora correspondente a inserção (de uma sequência de 20 a 23 pares de bases) de 16 cópias (variante longa) ou 14 cópias (variante curta). O alelo curto do transportador de serotonina (5HTTLPR), cuja eficiência transcricional é reduzida comparada à variante longa, pode apresentar risco para a dependência de etanol em subgrupos de pacientes com co-morbidades psiquiátricas (Ducci, Goldman, 2008; Kimura, Higuchi, 2011). Também existem evidências associando polimorfismos (SNP) nos receptores metabotrópicos 5HTR2A e 5HTR1B e, o receptor ionotrópico 5HTR3 da serotonina, contudo ainda são necessários mais estudos para confirmar o potencial risco dessas alterações para a dependência.

A herdabilidade do alcoolismo é de aproximadamente 40% a 60% (McGue, 1999). Apesar desse índice se mostrar relativamente alto, o estudo genético dessa patologia vem a ser difícil em função da elevada heterogeneidade genética (diferentes mutações ao longo do mesmo gene ou do *locus* associada à doença), penetrância incompleta e expressividade variável (Cloninger, 1987; Finn et al., 1997). Ainda, em se tratando de uma doença multifatorial, o efeito aditivo dos genes, o efeito ambiental e, o efeito da interação entre genes e ambiente não podem ser menosprezados (Rose et al., 2001; Dick et al., 2002; Heath et al., 1989; Koopmans et al., 1999). Outra fonte de preocupação consiste em que parte dos estudos envolvendo humanos utiliza amostras pequenas, podendo prejudicar o reconhecimento de um real padrão biológico.

Na tentativa de superar, ao menos em parte, esses obstáculos, o uso de modelos animais ainda é necessário, uma vez que eles permitem o controle da influência ambiental sobre o efeito dos genes. Ainda, vale salientar que apenas através da abordagem multidisciplinar e adoção de diferentes estratégias experimentais é possível obter uma melhor compreensão da genética de uma doença tão complexa como o alcoolismo. Por fim, embora muita informação genômica tenha sido levantada nesses últimos anos, ainda não se conhece um grupo de marcadores biológicos com elevado potencial preditivo para o alcoolismo. Além disso, são necessários mais estudos para a elucidação da contribuição dos polimorfismos (ou mutações) no genoma identificados até hoje, para possíveis alterações funcionais (mesmo que essas sejam subliminares) e ainda, a relação entre essas alterações e o comportamento aditivo.

1.3. Relação entre ansiedade e consumo de etanol

Ainda existe grande controvérsia acerca do uso do etanol como consequência de um nível elevado de ansiedade como preconizado pela Teoria da Redução da Tensão proposta por Conger (1956). Trabalhos com amostras representativas, como os de Bolton e colaboradores (2006) e Robinson e colaboradores (2009) encontraram elevada porcentagem de indivíduos com ansiedade generalizada que fazia uso de etanol ou outras drogas para a redução da ansiedade. Koob e Volkow (2010) compilaram vários estudos que demonstram efeitos ansiogênicos após o uso de cocaína ou etanol, bem como alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), destacando a contribuição dessas estruturas para a ansiedade, desejo pela droga (*craving*) e recaídas. Apesar dessas evidências indicarem a existência de uma relação entre o uso de etanol e sintomas de ansiedade, ainda falta clareza acerca da natureza dessa relação, ou seja, se os transtornos de ansiedade desencadeariam o alcoolismo, ou então, se esses sintomas que ocorrem durante a abstinência perduram contribuindo para as recaídas.

As linhagens de animais selecionadas para preferência pelo etanol podem ter elevados níveis de ansiedade ou não. Dentre as linhagens selecionadas para preferência de etanol, os ratos Sardinian que preferem etanol (sP) mostraram elevados níveis de ansiedade, enquanto que o mesmo não foi observado nos que não preferem (sNP), (Colombo et al., 1995). Os ratos P, que preferem etanol, também mostraram maior ansiedade e conflito, comparados aos NP, que não preferem e, administração intraperitoneal de etanol (0,5-1,0g/kg) teve efeito ansiolítico e anticonflito apenas nos ratos P (Stewart et al., 1993). Já para a linhagem de ratos AA (*alcohol-preferring*, AA), que preferem etanol, foram observados baixos níveis de ansiedade comparados aos ANA (*alcohol-avoiding*, ANA), que não preferem etanol (Möller et al., 1997). Nesse trabalho os autores discutem que a relação entre ansiedade e consumo de etanol pode ser diferente, a depender dos subtipos de adição ao etanol, tais como o tipo I (caracterizado por início tardio, baixa procura por novidades, elevada dependência de recompensa, maior esquiva de danos, maior envolvimento genético, envolvimento da via DOPAMinérgica, progressão rápida para abuso intenso e maior dificuldade em abster-se) e II (caracterizado por início precoce, alta procura por novidades, baixa dependência de recompensa, menor esquiva de danos, menor envolvimento genético, envolvimento das vias DOPAMinérgica e SEROTONérgica, maior motivação para beber pela indução da euforia e maior facilidade em interromper o consumo), descritos pela tipologia de Cloninger (1987), sendo que os ratos AA refletiriam mais o tipo II.

Para essa mesma linhagem, Fahlke e colaboradores (2000) observaram que a corticosterona favorece o consumo de etanol em ratos AA adenolectomizados e não em ratos

ANA, sugerindo que o nível elevado desse hormônio não estimula por si só o consumo dessa droga. Lowery e colaboradores (2010) utilizaram camundongos C57BL/6J, que também têm alta preferência pelo etanol e, encontraram que o bloqueio dos receptores corticóides atenuava o consumo de grandes quantidades de etanol em um curto período de tempo (*binge-like ethanol intake*) em animais normais e também adrenalectomizados. Henninger e colaboradores (2002) falharam em identificar uma associação entre ansiedade e consumo de etanol através do uso de linhagens de ratos selecionadas para alto (*high anxiety-related behavior*, HAB) e baixo (*low anxiety-related behavior*, LAB) nível de ansiedade. Em outros estudos, as linhagens de ratos Floripa high (H, alto nível de ansiedade) e low (L, baixo nível de ansiedade) revelaram associação negativa e positiva com o consumo de etanol (respectivamente, Da Silva; Ramos; Takahashi, 2004; Izídio; Ramos, 2007). Möller e colaboradores (1997) encontraram relação entre redução na ansiedade e ingestão de etanol após lesão da amígdala central, mas não na basolateral em ratos heterogêneos. Esses dados sugerem que, apesar de importante para o consumo de etanol, o circuito neuroendócrino não responde sozinho pelo comportamento de consumo da droga.

Alteração na ansiedade pode comprometer os processos motivacionais e por sua vez, influenciar as escolhas do indivíduo. Contudo, a natureza heterogênea do alcoolismo e dos transtornos de ansiedade dificulta o entendimento da relação entre esses distúrbios psiquiátricos. Além disso, existem problemas em relação à análise como o apontado por Kliethermes (2005) em seu trabalho de revisão, onde relata que boa parte dos estudos que mostram um efeito ansiogênico durante a abstinência ao etanol, pode ser interpretada como uma redução na atividade locomotora e, não uma alteração nos níveis de ansiedade do animal. Aliado a isso, fatores como idade, condições de alojamento, tipos de equipamentos de avaliação comportamental, sexo, geração do animal dentre outros, devem ser ponderados, pois exercem influência sobre os dados medidos em ensaios comportamentais (Ramos et al., 2003; Bourin et al., 2007; Ramos 2008). Embora seja importante a utilização de vários modelos para o entendimento das doenças complexas (i.e., multifatoriais), esses problemas ilustram a dificuldade em se traçar inferências a partir de desenhos experimentais muito diferentes, em se tratando da área comportamental.

Apesar dos extensos esforços demonstrando alterações no estado de ansiedade durante a abstinência do etanol, pouca informação foi levantada através da utilização de camundongos heterogêneos (*outbred*) expostos a um modelo por livre escolha. Com o intuito de melhorar a compreensão acerca desse tema, foi avaliado o comportamento emocional dos camundongos expostos a um modelo animal por livre escolha entre três soluções (etanol 5% e 10% e, água), durante o período de abstinência da droga. Nesse modelo, os camundongos

foram classificados comportamentalmente em três fenótipos: consumidor com consumo persistente (que consome grandes quantidades de etanol sem redução significativa ao longo do tratamento), pesado (que consome grandes quantidades de etanol e reduz significativamente após a fase de abstinência) ou leve (que tem baixo consumo de etanol). Dessa forma, foi possível avaliar as alterações emocionais em decorrência da retirada da droga em indivíduos com consumos diferentes e, conseqüentemente promover o melhor entendimento da relação entre ansiedade e uso crônico de etanol.

1.4. Análise do transcriptoma da região dos núcleos da amígdala cerebral

Uma das mais promissoras estratégias para se elucidar os mecanismos biológicos, referentes à fisiologia normal e à patogênese de doenças monogênicas e poligênicas, consiste na avaliação do transcriptoma do organismo (ou seja, estudo envolvendo ampla gama de transcritos ou ácido ribonucléico – RNA), bem como, análises de apenas um tipo de RNA.

O consórcio público ENCODE (*Encyclopedia Of DNA Elements*), que tem a finalidade de identificar elementos funcionais no genoma, contribuiu não apenas para o levantamento de informações acerca do perfil transcricional do genoma como também para uma reflexão sobre o conceito de ‘gene’ (Gerstein et al., 2007). Com a publicação dos resultados iniciais em 2007, foi identificado que uma quantidade maior do esperado é transcrita, tanto em regiões intergênicas quanto em regiões próximas aos genes, em outras palavras, boa parte do que é transcrito não é traduzido em proteína. Além disso, o perfil de transcrição é tecido-específico evidenciando a existência de um padrão regulatório distinto a depender do tecido onde o gene está sendo transcrito (revisão Lindberg; Lundeberg, 2010).

Análises abrangendo a funcionalidade do genoma têm demonstrado que em humanos, menos de 10% do que é transcrito é considerado RNA não codificador de proteína – ncRNA – (Birney et al., 2007). Em camundongos, aproximadamente 30% é considerado ncRNA (FANTOM Consortium, 2005). Talvez, essa discrepância pode vir da dificuldade em se estabelecer critérios de identificação de ncRNAs baseados em conceitos que estejam em transição.

Os RNAs apresentam grande heterogeneidade de tamanho, diferentes mecanismos de ação e localização na célula (revisão Carninci; Yasuda; Hayashizaki, 2008). E, considerando que algumas categorias de RNAs (por exemplo, ncRNAs como micro RNAs) participam dos mecanismos regulatórios da expressão gênica (revisão Mattick, 2005), seja regulando a transcrição e/ou tradução, seu estudo pode facilitar o entendimento dos mecanismos moleculares subjacentes aos processos bioquímicos no organismo sadio ou acometido por alguma desordem.

Em humanos, mais de 90% do genoma pode ser transcrito e, no mínimo 40% dos RNAs nunca são poliadenilados (Birney et al., 2007). Aproximadamente, mais de 60% do genoma de camundongos é transcrito e a maioria dos transcritos não são codificados em proteínas (Carninci et al., 2005). O genoma do camundongo apresenta cerca de 90% das regiões conservadas comparado com o genoma humano e o efeito de polimorfismos sobre o fenótipo tende a ser similar entre essas duas espécies (Guénet, 2005). Apesar de existirem elementos regulatórios da expressão gênica espécie-específicos (microRNAs específicos para humanos, Bentwich et al., 2005), o perfil do transcriptoma de camundongos exibe elevado grau de conservação em relação ao humano (Carninci et al., 2005). Dessa forma, a similaridade entre genoma e transcriptoma de humanos e camundongos torna o camundongo um promissor modelo animal para a compreensão dos processos biológicos relacionados às doenças humanas, considerando, ao menos em parte, não só os efeitos bem como as interações entre os genes em sistemas biológicos específicos.

Outrossim, RNAs estão relacionados com o controle de mecanismos epigenéticos que interferem com a expressão gênica, sendo também importantes para pesquisas acerca da heterogeneidade fenotípica não relacionada a variabilidade genética (Yu et al., 2008; revisão Djupedal; Ekwall, 2009).

Nas células neuronais é observada uma maior complexidade do transcriptoma quando comparado com outros tecidos. Isso denota a possibilidade de existir novas formas de RNAs ou mesmo novos mecanismos (Carninci et al., 2005). Sendo assim, a análise do perfil transcricional no sistema nervoso central é de especial interesse para o delineamento dos mecanismos associados à neurotransmissão normal ou em processos patológicos.

A fim de encontrar uma via comum ao desenvolvimento da adição às drogas, foi feita uma análise *in silico* em larga escala abrangendo alterações biológicas descritas em estudos de associação, quantificação de transcritos e proteínas, em humanos e outros modelos experimentais. A partir de 2.343 evidências, restaram aproximadamente 396 genes relacionados ao uso de etanol que pareciam estar alterados com maior frequência (Li; Mao; Wei, 2008). No entanto, devido à etiologia multifatorial, sendo influenciada por fatores genéticos, ambientais e pela interação entre esses (Hesselbrock; Hesselbrock; Epstein, 1999) e sua heterogeneidade clínica, torna-se evidente as limitações clínicas e experimentais implicadas nesses estudos. Por isso, até o momento, poucos alvos primários foram encontrados para o etanol, como o receptor N-methyl-D-aspartato (NMDA), receptor ácido gama aminobutírico A (GABAA), receptor da glicina, receptor 5-hidroxitriptamina-3 (5-HT3), receptor nicotínico neuronal (nACh), canais de Ca^{2+} tipo L e de K^+ (GIRK) (Spanagel,

2009; Vengeliene et al., 2008) e, praticamente ainda não são bem compreendidos os mecanismos neurais que estejam contribuindo para o desenvolvimento do alcoolismo.

A dificuldade em se entender as vias neuroquímicas relacionadas ao alcoolismo também é acentuada devido ao perfil de transcrição e expressão gênica diferirem entre as regiões cerebrais. Isso significa que devido a mecanismos compensatórios, um dado gene pode estar alterado em um local e não em outro, confundindo sua identificação. Contudo, algumas áreas cerebrais têm sido relacionadas com o uso de etanol, sendo essas importantes para o processamento cognitivo e emocional do indivíduo e para a triagem de marcadores biológicos associados ao alcoolismo, como exemplo, as regiões frontais do córtex, hipocampo, hipotálamo, núcleos da amígdala e estriado, (Kalivas; Volkow, 2005).

Na tentativa de identificar genes envolvidos com o alcoolismo, nós analisamos o transcriptoma da região dos núcleos da amígdala cerebral em camundongos expostos a um modelo por livre escolha (etanol 5% e 10% (v/v) e, água). Os animais foram classificados comportamentalmente em três fenótipos: camundongo com consumo persistente, pesado (ambos com preferência pelo etanol) e leve (preferência pela água), a fim de permitir a triagem de genes com papel predisponente ou protetor para o desenvolvimento da adição ao etanol. Essa região cerebral é de especial interesse, pois agrega circuitos relacionados com as respostas emocionais e memória, sendo potencial candidata para o entendimento da neurobiologia do alcoolismo.

1.5. Lado B do sistema nervoso central: receptor GABA_B

A neurotransmissão central do ácido γ -aminobutírico (GABA) é sensível aos efeitos agudos e crônicos do etanol (Lovinger, 2008). Embora muitos estudos investigaram as neuroadaptações associadas com os receptores ionotrópicos GABA_A após uso de etanol (para revisão veja Enoch, 2008), as neuroadaptações dos receptores GABA_B precisam ser melhor esclarecidas.

Estudos em humanos têm revelado a eficácia do baclofen (β -paraclorofenol GABA, um agonista GABA_B) em reduzir a ingestão de etanol e o desejo compulsivo em indivíduos dependentes (Addolorato et al., 2002; Flannery et al., 2004). Num estudo utilizando ratos Sardinian que preferem etanol (sP) foi observada uma redução no consumo dessa droga após administração aguda de baclofen (Maccioni et al., 2005; Colombo et al., 2002). Baclofen também suprimiu o efeito de privação de etanol em ratos expostos a droga por oito semanas (Colombo et al., 2006). Por outro lado, foi observado um aumento no consumo de etanol em camundongos C57BL/6J após administração crônica de baclofen

(Moore et al., 2007). Tais diferenças podem ser atribuídas a variações nos protocolos ou dosagens.

Um estudo em humanos não encontrou associação entre polimorfismos no gene GABBR1 e alcoolismo (Köhnke et al., 2006), embora em outra análise observou-se uma possível associação entre polimorfismo no exon 7 (alelo Ser489) e determinados grupos de alcoolistas (Sander et al., 1999). Recentemente, uma significativa associação entre GABBR1 e GABBR2 e dependência à nicotina foi demonstrado em uma população dos Estados Unidos, sugerindo a participação desses genes e o comportamento aditivo (Li et al., 2009).

O receptor GABA_B é composto de duas unidades protéicas, GB1 e GB2, codificados pelos genes *Gabbr1* e *Gabbr2*, respectivamente. As seqüências dos genes *Gabbr1* e *Gabbr2* e suas proteínas são conservadas entre humanos e camundongos (Kaupmann et al., 1997). Embora o gene *Gabbr1* apresente várias isoformas, as principais no tecido nervoso parecem ser *Gabbr1a* e *Gabbr1b* que se distinguem pela presença de uma seqüência que codifica dois domínios *sushi* (*short consensus repeats* – SCR ou também conhecido por CPs) na proteína GB1 (Kaupmann et al., 1997; Hawrot et al., 1998). No entanto, o delineamento da função de ambas ainda merece maior estudo. O receptor GABA_B pode ser encontrado sob a forma de heterodímeros (GB1a/GB2 ou GB1b/GB2) e ambas as unidades são importantes para a plena atividade do receptor (Margeta-Mitrovic et al., 2001; revisão Misgeld et al., 1995; Bowery et al., 2002; Bettler et al., 2004; Jones et al., 1998; Chen; Van del Pol, 1998; Filippov et al., 2000). É conhecido que a ativação de receptores GABA_B pré-sinápticos reduz a liberação de neurotransmissores, como GABA, glutamato e dopamina, via inibição de canais de Ca²⁺, sendo essas vias implicadas com o comportamento adicto (for review, see Koob et al., 1998; Everitt and Robbins, 2005; Kalivas and Volkow, 2005; Le Moal and Koob, 2007). Em termo de pós-sinapse, os receptores GABA_B inibem o potencial excitatório pós-sináptico (EPSC) mediado pelo NMDA (Scholz; Miller, 1991) levando a uma hiperpolarização da célula e também está associado a uma diminuição do potencial inibitório pós-sináptico via GABA_A (Scholz; Miller, 1991; Bowery; Enna, 2000).

As regiões do córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e hipotálamo apresentam os genes *Gabbr1* e *Gabbr2* expressos em maior ou menor nível (Misgeld et al., 1995; Bettler et al., 2004). Esses genes estão envolvidos em distúrbios eletrofisiológicos nos sistema nervoso central e prejuízo na homeostasia da glicose (Buck et al., 1997; Eravci et al., 1999). Além disso, camundongos sem o gene *Gabbr1* funcional (*Knockout*) exibem anormalidades na homeostasia da glicose demonstrando o envolvimento desse gene na regulação do metabolismo dessa fonte de energia (Bonaventura et al., 2008).

O modelo animal usado no presente estudo foi inicialmente proposto para ratos por Wolffgramm e Heyne (1995) e posteriormente validado farmacologicamente para camundongos por Fachin-Scheit e colaboradores (2006). Uma importante propriedade desse modelo consiste na avaliação de diferenças biológicas responsáveis por mínimas mudanças no cérebro considerando que a classificação fenotípica aplicada permite a separação de perfis comportamentais bem próximos (como o alcoolismo é uma doença de causas múltiplas, essa estratégia parece ser útil para identificar genes de pequeno efeito). Em outras palavras, é feita a análise comportamental e dois fenótipos discriminados exibem alta preferência pelo etanol e consumo elevado do mesmo (i.e., grande similaridade comportamental). Contudo, nas últimas semanas, sob condição “aversiva”, alguns desses camundongos reduzem significativamente a ingesta de etanol. A “perda do controle” sobre a ingestão de etanol (Spanagel, 2009), pode ser examinada nesse modelo quando as soluções etílicas são acrescidas de quinino e tornam-se “menos palatáveis”. Assim, aqueles camundongos que mantêm seu alto consumo e preferência por etanol apesar dessa condição “aversiva” poderiam estar exibindo a “perda do controle” (grupo A), enquanto que os outros não (grupo P).

Para entender a participação do receptor GABA_B sobre o alcoolismo, foram avaliados os níveis de RNAm dos genes *Gabbr1* e *Gabbr2* no córtex pré-frontal, hipocampo, hipotálamo e estriado em camundongos heterogêneos expostos a um paradigma de livre escolha entre 3 soluções (água, etanol 5% e 10%), possibilitando dessa forma que o animal exiba ou não um consumo persistente dessa droga, corroborando ou não, a relação entre esses genes e o comportamento aditivo.

2. Justificativa e Relevância

Em termos de saúde pública o alcoolismo pode ser considerado uma das principais causas de problemas psiquiátricos no Brasil e no mundo, além do uso indevido de etanol apresentar elevada relação com a incidência de homicídios, entre outros crimes. Há um alto índice de recaídas, mesmo entre os pacientes que fazem uso de medicações para reduzir o desejo compulsivo pela droga (ou *craving*). Além disso, ainda não são conhecidos alvos moleculares com efetivo potencial preditivo para o diagnóstico desse distúrbio psiquiátrico. Assim, o delineamento das vias neurobiológicas relacionadas a essa doença se mostra de extremo valor, pois permite identificar marcadores moleculares úteis para fins diagnósticos e/ou terapêuticos.

3. Hipótese Neurobiológica

Se o alcoolismo é influenciado por fatores neurogenéticos, sendo esses constantes das propriedades reforçadoras (positivas e negativas) que contribuem para os aspectos motivacionais do comportamento de ingestão da droga, consideraríamos que os camundongos classificados comportamentalmente como consumidor “persistente”, após serem submetidos a um paradigma de livre escolha entre 3 soluções (água, etanol 5% e 10% v/v), apresentariam níveis alterados de transcritos corroborando o envolvimento dos respectivos genes na gênese e/ou manutenção do alcoolismo.

4. Objetivos

4.1. Geral:

Identificar marcadores moleculares e comportamentais associados com diferentes padrões de consumo de etanol, em camundongos expostos ao modelo de livre escolha.

4.2. Específicos:

1. Desenvolver um modelo animal para o alcoolismo utilizando camundongos heterogêneos expostos a um tratamento de livre escolha entre água e soluções etílicas (5% e 10% v/v), viabilizando a classificação de três fenótipos: camundongo chamado consumidor sem controle (A), ou consumidor pesado (P) ou consumidor leve (L).

2. Identificar características comportamentais que discriminassem os diferentes fenótipos A, P e L, através da análise de medidas coletadas durante a fase de abstinência ao etanol.

3. Identificar alterações em vias bioquímicas relacionadas com o desenvolvimento ou manutenção do consumo de etanol, através da análise molecular do transcriptoma na região dos núcleos da amígdala cerebral, nos fenótipos A, P e L, utilizando a técnica de microarranjo.

4. Validar os genes identificados pela técnica de microarranjo através da quantificação relativa dos níveis de transcritos pela técnica de PCR em tempo real, na região dos núcleos da amígdala nos fenótipos A, P e L.

5. Avaliar o envolvimento dos genes *Gabbr1* e *Gabbr2* nos fenótipos A, P e L, através da quantificação relativa dos níveis de transcritos pela técnica de PCR em tempo real, nas regiões cerebrais do córtex pré-frontal, hipocampo, hipotálamo, estriado e núcleos da amígdala cerebral.

6. Analisar a relação entre genes da via GABAérgica (*Gabbr1*, *Gabbr2* e *Gphn*) e os demais genes triados através da técnica de microarranjo, na região dos núcleos da amígdala cerebral, e a influência dessas alterações moleculares sobre os fenótipos A, P e L.

5. Materiais e Métodos

5.1. Animais

Foram utilizados oitenta (80) camundongos *Swiss* machos adultos, 45 dias, sem experiência anterior com nenhuma droga ou procedimento adotado nesse experimento, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Antes do procedimento experimental, os animais estavam alojados em grupos de 20 por gaiola. Os animais foram numerados de 01 a 80 correspondendo ao número da gaiola (20x30x20cm) onde foram alojados individualmente desde o período da ambientação. Foram mantidas as condições de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (ciclo de 12h claro/escuro, sendo as luzes acesas a partir das 07:00h). Os procedimentos adotados para o tratamento e cuidado dos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPR (CEEAA), protocolo de número 281 e Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA) em 05/12/2007 protocolo número 159/2007. As análises comportamentais e o modelo de livre escolha foram realizados no Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, Curitiba, PR.

5.2. Drogas

No tratamento dos camundongos por livre escolha foi utilizado álcool etílico P.A. a 95% VETEC (Taboão da Serra, São Paulo, Brasil). Durante a fase de adulteração foi utilizado cloridrato de quinina para alterar o sabor das soluções etílicas na concentração 0,005g/L (conforme curva dose-resposta, Ribeiro, 2004).

5.3. Equipamentos utilizados para os testes comportamentais

Campo aberto (CA): aparelho que mede a atividade locomotora horizontal bem como, aspectos comportamentais relacionados com ansiedade. Consiste em uma arena de madeira e paredes de aço escovado com 25 cm de altura delimitando uma área circular de 50cm de diâmetro, com o assoalho pintado de branco, subdividido com linhas pretas traçadas através de dois círculos concêntricos com várias linhas radiais formando figuras semelhante a quadrados com aproximadamente 10 cm de lado, a 1 m acima do assoalho há duas lâmpadas de 100 watts cada. Os camundongos foram colocados individualmente no centro da arena e observados por 3 minutos. Foi cronometrado o tempo que permaneceram parados ou imobilizados (*Freezing*) inicialmente no centro da arena (LAT). O tempo de auto-limpeza (AL) também foi cronometrado. Foram contadas as ambulações que consistiram no número de quadrados invadidos com as quatro patas (AMB), número de vezes que o animal se apoiou

nas patas traseiras assumindo a posição vertical correspondendo ao número de elevações (*Rearing*) (EL). O número de vezes que o animal assumia posição esticada horizontalmente e retornava a posição original (*Stretch Attend Postures*, SAPCE e SAPPE, centro e periferia, respectivamente).

FIGURA 01 – CAMPO ABERTO



Nota: camundongo sendo colocado no centro da arena do campo aberto. Foto: Diego Correia

Labirinto em cruz elevado (LCE): aparelho que mede aspectos relacionados aos efeitos ansiolíticos e ansiogênicos. Consiste em um labirinto em madeira, pintado com tinta óleo cor preta, elevado do piso 50cm, apresentando dois braços abertos e opostos medindo 20x5cm cada, cruzados perpendicularmente por outros dois braços do mesmo tamanho, porém fechados nas suas três faces externas com paredes de 20cm de altura, com área central de 10cm², a iluminação da sala de 1,5mx1,5m é feita por uma lâmpada vermelha de 40 watts colocada a 120cm acima do labirinto. O assoalho do braço aberto é pintado de branco. Os camundongos foram colocados individualmente na área central do labirinto e observados por 3 minutos, sendo cronometrada a latência para entrar em um dos braços (LAT), o tempo de permanência no braço aberto e no braço fechado (TPBA e TPBF, respectivamente). O número de entradas nos braços abertos e nos fechados foi contado (EBA e EBF, respectivamente). Foi considerada uma entrada a partir do momento em que o animal colocou as quatro patas em um dos braços do labirinto. O tempo em que o animal permaneceu na área central do aparelho não foi cronometrado. Foi contado o número de vezes que o animal posicionou sua cabeça para baixo fora do braço aberto olhando para o piso, realizando o movimento de espreita (*Head dipping*, HD) e o número de vezes que o animal assumiu uma posição esticada

horizontalmente e retornou a posição original (*Stretch Attend Postures*) em ambos os braços (SAPA e SAPF, braço aberto e fechado, respectivamente). O número de elevações sobre as patas traseiras (*Rearing*) também foi contado para o braço fechado do labirinto (EL). O tempo de auto-limpeza (AL) no braço fechado foi cronometrado.

FIGURA 02 – LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO



Nota: camundongo sendo colocado no centro do labirinto. Foto: Diego Correia.

FIGURA 03 – CAIXA DE MOVIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA



Nota: camundongo percorrendo o interior da caixa. Foto: Diego Correia.

Caixa de movimentação espontânea (CME): aparelho que mede a atividade locomotora horizontal. Apresenta uma base de aço escovado e acrílico, medindo

60x20x30cm, com três paredes em aço escovado sendo a anterior em acrílico transparente escuro, o assoalho é formado por barras de aço de 0,5cm de diâmetro separadas entre si por 1 cm, teto de aço com tampa removível, possui três células fotoelétricas que registram o número de interrupções do feixe luminoso, quando o animal se movimenta no interior da caixa. O animal foi colocado no centro da caixa e ao final de 3 minutos a ambulação foi registrada.

5.4. Procedimentos do Modelo de Livre Escolha

Foi desenvolvido um tratamento através do método de livre escolha por 10 semanas (fase de aquisição, AQUÍ) em um grupo de camundongos (n=60), o qual teve acesso simultâneo a três soluções sendo uma de água, etanol a 5% (v/v) e etanol a 10% (v/v), (Figura 04). Em outro grupo de animais (controle n=20) foi aplicado o mesmo tratamento, porém eles não tiveram acesso às soluções de etanol (Figura 05). Uma semana antes do início do tratamento, os animais passaram por um período de ambientação onde o peso e o consumo basal de água foi registrado (fase de ambientação, AMB).

FIGURA 04 – MODELO ANIMAL POR LIVRE ESCOLHA

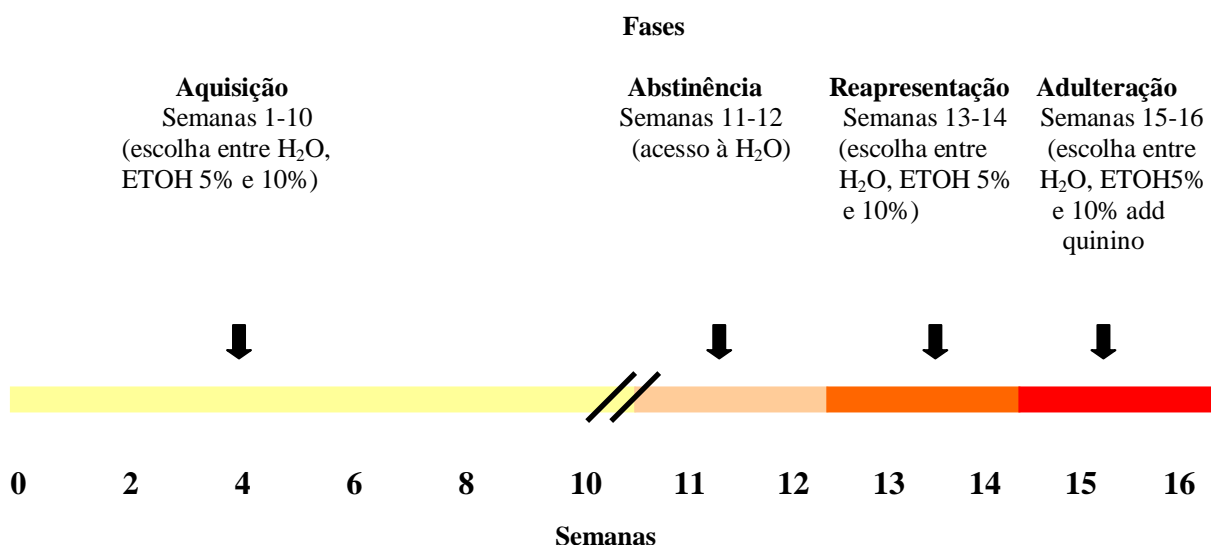


Nota: camundongo exposto a três soluções: água, etanol 5% e 10%. Foto: Francine Goeldner.

Durante todo o tratamento o volume de todas as soluções foi medido em dias alternados, os animais pesados uma vez por semana e alimentados com ração PURINA® (Chow, São Paulo, Brasil) à vontade. As garrafas tinham suas posições mudadas na gaiola a cada troca. Após as 10 semanas, as soluções étlicas foram retiradas por 2 semanas (fase de abstinência, ABS). Durante esse período, os camundongos foram testados para avaliar sua

ansiedade e atividade locomotora iniciando a avaliação mais ou menos 5 horas após a retirada das soluções etílicas. Depois desse período, foram introduzidas novamente as soluções etílicas por mais 2 semanas (fase de reapresentação, RE). Ao término desse período, as soluções etílicas sofreram adulteração do sabor através do acréscimo de quinina e foram ofertadas aos camundongos dando continuidade ao método por livre escolha por mais 2 semanas (fase de adulteração, AD). Ao término do experimento, os animais foram eutanaziados e as seguintes regiões dissecadas no gelo: córtex pré-frontal, hipotálamo, núcleos da amígdala, hipocampo e estriado, sendo as últimas 3 estruturas coletadas de ambos os lados cerebrais (veja Paxinos; Franklin, 2001) e acondicionados em 1 mL de RNAlater[®] (Ambion-Qiagen, São Paulo, Brasil). O tempo de dissecação das estruturas foi mantido entre 4-5 minutos. As amostras ficaram em temperatura ambiente (10°C – 14°C) por cerca de 1-2h sendo posteriormente congeladas a -80°C. Todos os animais tiveram livre acesso ao etanol até a hora da decapitação. Ao final do modelo por livre escolha, os animais foram classificados comportamentalmente em três fenótipos: camundongo com consumo persistente (A: preferência pelo etanol sem redução significativa no consumo ao longo do tratamento); consumo pesado (P: preferência pelo etanol com redução significativa no consumo ao longo do tratamento); consumo leve (L: preferência pela água e consumo baixo de etanol). Os procedimentos adotados para a confecção desse modelo foram similares aos utilizados em trabalho prévio (Ribeiro, 2004).

FIGURA 05 – MODELO PARA AVALIAR A PERDA DO CONTROLE SOBRE O CONSUMO DE ETANOL



Nota: água (H₂O). ETOH (etanol).

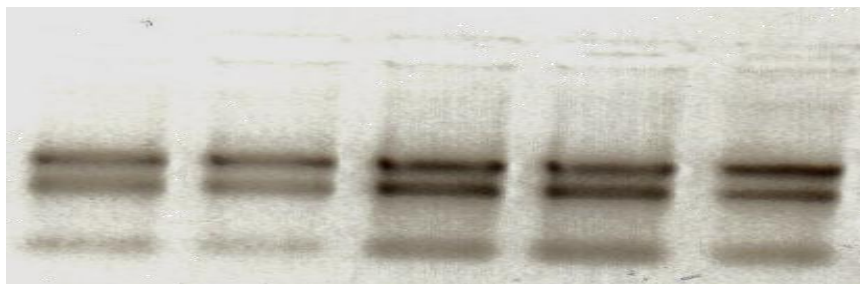
5.5. Procedimentos para Análise Molecular

As regiões dissecadas dos cérebros dos camundongos foram transportadas em gelo seco para o Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração (InCor), Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, para a realização da extração do RNA total.

5.5.1. Extração do RNA total

As amostras imersas em RNAlater[®] foram descongeladas e mantidas em gelo (4°C) até o início das extrações. Após, foram retiradas dos tubos de forma a permitir que o máximo do reagente escorresse da estrutura e posteriormente foram colocadas em um tubo de ensaio contendo 0,8mL de TRizol[®] (Invitrogen, São Paulo, Brasil). Foram homogeneizados na mínima rotação (Polytron PT10/35-Brinkmann, Westbury, NY, USA) por um tempo máximo de 10 segundos. Após, a mistura ficou em temperatura ambiente (20-25°C) por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 0,2mL de clorofórmio PA, agitado por inversão por 15 segundos e incubado por mais 2-3 minutos a temperatura ambiente. Depois, foi centrifugado a 12000xrcf (g) por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação 0,3mL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado 0,5mL de isopropanol PA 100%, misturado por inversão durante 15 segundos e incubado por mais 10 minutos a temperatura ambiente. Nova centrifugação foi feita a 12000xrcf por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado cuidadosamente, ao precipitado foi adicionado 0,8mL de etanol PA absoluto gelado, misturado por inversão e centrifugado a 7500xrcf durante 5 minutos a 4°C. Ao término da centrifugação o sobrenadante foi desprezado cuidadosamente e o precipitado ficou secando por aproximadamente 20 a 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 20µL de água ultra pura[®] (Qiagen, São Paulo, Brasil) e misturado por cerca de 30 minutos antes de ser quantificado no espectrofotômetro. O RNA total foi quantificado utilizando NanoDrop ND-1000v3 1.0[®] (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e as amostras utilizadas apresentaram razão 260/280nm maior que 1.7. A integridade foi averiguada visualmente em gel de agarose 1% corado com 25µL brometo de etídio 0,1% utilizando tampão TAE 1x (Ácido acético glacial 20mM, Tris 40mM, EDTA 1mM) onde foi possível observar a presença das bandas ribossômicas 28S e 18S (Figura 06). As condições da corrida foram 300mA, 90V aproximadamente 20 minutos.

FIGURA 06 – RNA TOTAL



Nota: bandas 28S e 18S de RNA total extraído de tecido cerebral de camundongo (córtex pré-frontal, núcleos da amígdala, hipotálamo, hipocampo e estriado, da esquerda para direita). Agarose 1% corado com brometo de etídeo 1%.

5.6. Procedimentos para Análise Molecular da Reação de Microarranjo

Para cada camundongo foi utilizado um chip, totalizando 10 chips GeneChip[®] Mouse Gene 1.0 ST WT (Affymetrix, São Paulo, Brasil). Nesse arranjo, há 770.317 sondas que correspondem a 28.853 transcritos (praticamente todo o genoma murino codificador, conhecido até o presente momento). O tamanho das sondas é de 25 bases com orientação senso, sendo as sequências retiradas dos bancos de dados entre os anos de 2006 e 2007. As amostras de RNA total da região dos núcleos da amígdala cerebral dos camundongos foram transportadas em gelo seco para o Laboratório de Genética Molecular, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas, Campinas, SP, para a realização das análises moleculares para o microarranjo. A reação de hibridação e o escaneamento foram realizados no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, SP.

5.6.1. Confeção do DNAc da reação

Foi utilizado 10 µL de cada amostra de RNA total extraído a partir dos núcleos da amígdala para posterior purificação através das colunas RNeasy[®] Mini conforme protocolo do fabricante (Qiagen, São Paulo, Brasil). Todos os reagentes de uso extemporâneo foram preparados previamente à reação.

Foram utilizadas 10 amostras para a hibridação no microarranjo, sendo 3 do grupo A, 2 do grupo P, 2 do grupo L e 3 do grupo C. O protocolo adotado para as reações de polimerização foi para 100ng de RNA total conforme instruções do fabricante. Os controles positivos, Poly-A RNA, foram feitos para uma quantidade inicial de 1 µg de RNA total. Foi preparada uma diluição seriada (1:20, 1:50, 1:50) partindo de um volume inicial de 2 µL. O número de cópias final esperado com essa diluição para esses controles são: *lys* (1:100,000),

phe (1:50,000), *thr* (1:25,000), *dap* (1:6,667). Esses RNAs correspondem aos transcritos dos genes do *B. subtilis*, que são ausentes em células eucarióticas.

Em seguida, o iniciador T7-oligo(dT)₆ foi diluído e os controles positivos foram acrescentados a essa solução. Posteriormente, foram realizadas as reações de síntese da primeira fita de DNAc e, logo após a reação de síntese da segunda fita de DNAc utilizando o kit GeneChip[®] Whole Transcript cDNA Synthesis and Amplification (Affymetrix, São Paulo, Brasil) de acordo com instruções do fabricante. O produto dessa reação foi utilizado para a confecção de RNAA utilizando o kit citado acima. Quando o tampão 10x IVT apresentava precipitado, era aquecido a aproximadamente 36°C no máximo por 1 minuto antes de ser acrescentado à amostra. Ao término dessa reação, o produto foi purificado através das colunas GeneChip[®] Sample Cleanup Module (Qiagen, São Paulo, Brasil) e quantificado, sendo utilizado 10µg de RNAA de cada amostra para a etapa posterior. Por fim, foi sintetizada nova fita de DNAc simples seguida de reação de hidrólise do RNAA. O produto foi purificado e quantificado. Foi feito gel de agarose 1% para a visualização de bandas com aproximadamente 350 bases, sendo que todas as amostras apresentaram essa banda.

5.6.2. Fragmentação do DNAc fita simples

Foi utilizado 5,5 µg de DNAc fita simples da reação anterior de cada amostra para a reação de fragmentação. Para a reação foi usado GeneChip[®] Whole Transcript Terminal Labeling (Affymetrix, São Paulo, Brasil). Em seguida, foi feito gel de agarose 1% para a visualização da fragmentação do DNAc. Todas as amostras apresentaram perfil similar de fragmentação conforme especificação do fabricante.

5.6.3. Marcação do DNAc fita simples

Para a reação de marcação do DNAc foi empregado protocolo do GeneChip[®] Whole Transcript Terminal Labeling (Affymetrix, São Paulo, Brasil) segundo normas do fabricante.

5.6.4. Hibridação e escaneamento

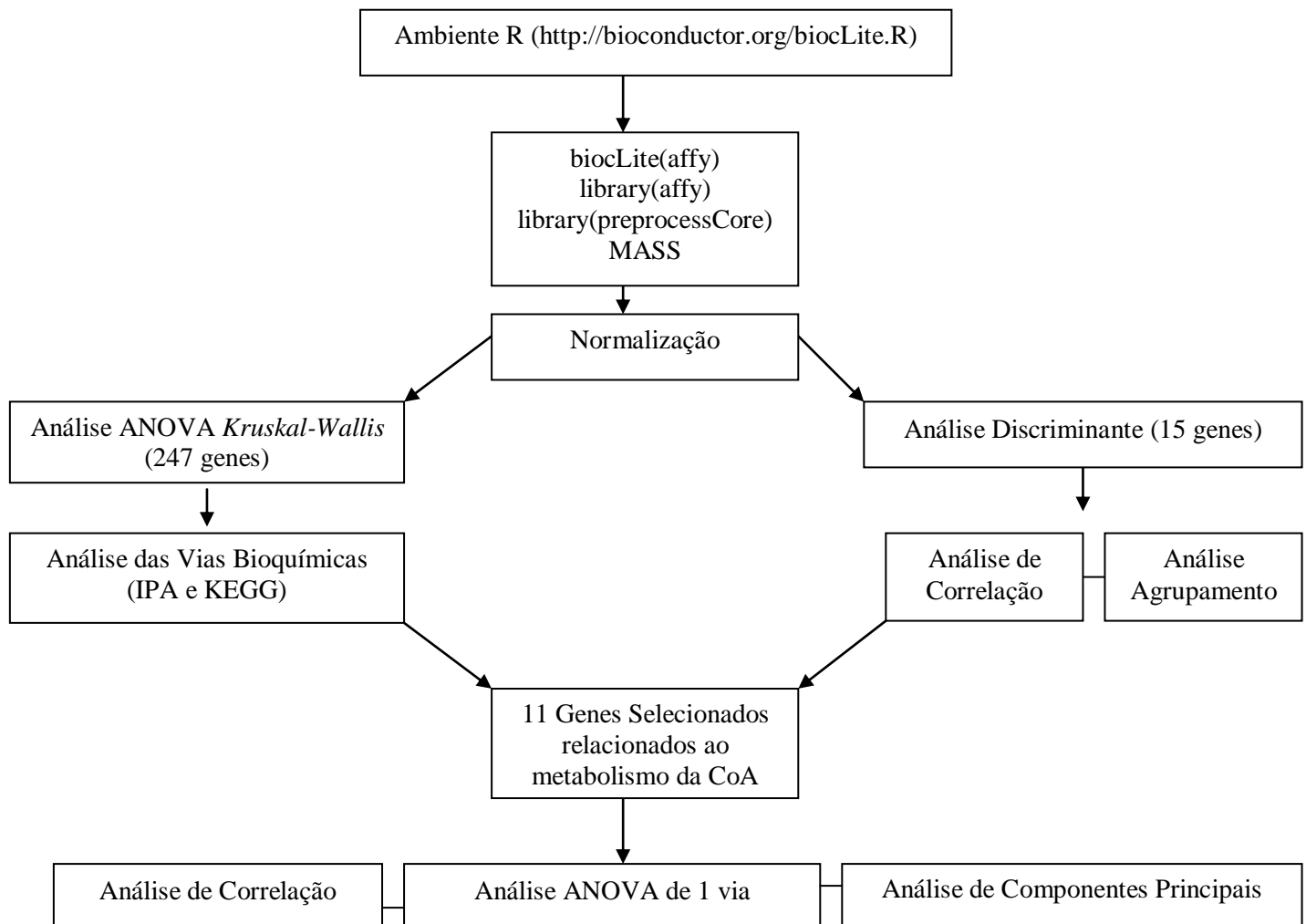
Foi preparada a mistura de hibridação para o formato do microarranjo 169 conforme protocolo do fabricante GeneChip[®] Mouse Gene 1.0 Sense Target (Affymetrix, São Paulo, Brasil). Cerca de 80 µL dessa mistura foi pipetada em um dos orifícios do chip. Após, os *chips* ficaram aproximadamente 16 horas incubados a 45°C a 60 RPM. Em seguida, o reagente de hibridação foi retirado de todos os *chips* e foi acrescentado o tampão de lavagem *Wash Buffer A* em cada chip. Após, os septos dos chips foram vedados com adesivos e

colocados na estação de escaneamento da Affymetrix para o início da captação da leitura de fluorescência. Em três tubos de 1,5mL foram pipetados os reagentes para hibridação (Stain Cocktail 1), lavagem (Stain Cocktail 2) e tampão (Array holding buffer) e colocados em suas respectivas posições dentro da estação de lavagem da Affymetrix. A leitura de cada chip durou aproximadamente 10 a 20 minutos.

5.7. Normalização dos dados do microarranjo

Os dados foram normalizados conforme o método *Quantile Normalization* (Bolstad, 2002) utilizando o programa R disponibilizado no endereço www.R-project.org e os pacotes “affy” e “preprocesscore” (Figura 07).

FIGURA 07 – ORGANORAMA DAS ANÁLISES DOS DADOS



5.8. Procedimentos para Análise Molecular da PCR em tempo real

5.8.1. Desenho dos iniciadores

A sequência dos *exons* dos genes de interesse foi retirada dos bancos de dados *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e comparadas com as depositadas no *Ensembl Genome Browser* (<http://www.ensembl.org/index.html>). Foram selecionados os *exons* adjacentes mais próximos a extremidade 3' do gene. A sequência foi colocada no programa Primer3 v0.4.0 (Rozen; Skaletsky, 2000) disponível *on-line* no endereço <http://frodo.wi.mit.edu/> restringindo o tamanho do produto (70-150 bases), tamanho do iniciador (mínimo 19 bases, ótimo 20 bases e máximo 21 bases), TM (mínimo 59°C, ótimo 60°C e máximo 61°C), %GC (mínimo 20%, ótimo 50% e máximo 80%) e os demais parâmetros não foram alterados. Em seguida os pares de iniciadores foram avaliados através do programa NetPrimer (www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html) a fim de se evitar pares com maior formação de dímeros, alças, palíndromos etc. Os iniciadores dos genes constitutivos foram desenhados previamente (Bibancos et al., 2007). Após, foi verificada a especificidade das sequências escolhidas (Tabela 11) através da análise por alinhamento (Primer-BLAST) disponível no endereço http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome.

5.8.2. Confeção do DNAc

A partir do RNA total extraído conforme descrito no item 5.5.1, foi utilizado 2µg de amostra em um volume final de 20µL para a reação de confecção do DNAc. Foi utilizado oligo(dT₂₀) como iniciador (Prodinol Biotecnologia, Belo Horizonte, Brasil). Foi usada a enzima SuperScriptIII[®] (Invitrogen, São Paulo, Brasil) conforme instruções do fabricante.

5.8.3. PCR em tempo real

As reações a partir das amostras extraídas do córtex pré-frontal, hipotálamo, hipocampo e estriado, foram feitas no Rotor-Gene[®] 3000 (Corbett Research, Concord, Austrália). Já as reações a partir das amostras extraídas dos núcleos da amígdala foram feitas no Step-One[®] (Applied Biosystems, Belo Horizonte, Brasil). Em todas as reações foi utilizado SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil). Foi adotado protocolo sem etapa de extensão (95°C por 10 minutos, 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos por 40 ciclos) sendo a captação da fluorescência feita na temperatura de 60°C. No termociclador Rotor-Gene[®], antes do início de cada reação foi programado para identificar a melhor faixa (1-10) de captação da fluorescência a 60°C. Foi feita uma curva de diluição em 5

concentrações (50ng, 25ng, 12,5ng, 6,25ng e 3,125ng) para cada gene analisado e para cada área dissecada do cérebro, sendo as reações pipetadas em triplicata para a curva e em duplicata para os demais procedimentos. A eficiência das reações feitas no Rotor-Gene[®] foi analisada pelo programa RG-3000 (Corbett Research). Para as reações feitas no Step-One[®], a eficiência foi analisada pelo programa StepOne v2.0 (Applied Biosystems) e, em ambos os casos foi estipulado um coeficiente de correlação mínimo de 0,90. Em todas as reações foi feito um controle negativo, i.e., sem amostra (NTC) e o volume da reação mantido em 20 μ L. As curvas de dissociação foram analisadas e não foi verificado nenhum produto espúrio nem dímeros de *primer*. A concentração escolhida foi de 12,5ng de acordo com a melhor eficiência relativa. Todas as reações foram feitas agrupando os animais dos quatro grupos para uma determinada área do cérebro, quando utilizado o Rotor-Gene[®] e, agrupando os animais de dois grupos para a mesma área cerebral ao ser utilizado o Step-One[®]. As análises feitas no Rotor-Gene[®] 3000 foram realizadas no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração (InCor), Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. Já as reações feitas no Step-One[®] foram realizadas no Laboratório de Agentes Recombinantes do Departamento de Microbiologia no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

5.9. Normalização dos dados da PCR em tempo real

Foram utilizados 3 genes constitutivos ou de referência (*Gapdh* – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, *B-act* – β -actina, *Cyclo* ou *Ppia* – peptidilprolil isomerase A) para normalizar os níveis de RNAm dos genes selecionados (Tabela 02). Esses genes foram escolhidos com base na estabilidade (i.e., menor variabilidade) e no nível de transcrição que apresentam no sistema nervoso central. Os ciclos limite ou *quantification cycle* (*Cq*) foram colocados em uma planilha do *Excel* e a quantidade relativa dos transcritos foi calculada conforme Vandesompele e colaboradores (2002). Segundo esse cálculo, a média aritmética das réplicas é transformada em quantidade relativa da amostra considerando a eficiência da curva de diluição para cada gene. A amostra com o menor *Cq* é considerada como o valor máximo (igual a 1) e é tida como referência para o cálculo das quantidades relativas das demais amostras. Depois essas quantidades relativas foram normalizadas dividindo-as pela média geométrica dos 3 genes de referência (fator de normalização). Esse procedimento foi feito para cada gene de interesse e cada área cerebral separadamente.

5.10. Análise Estatística

A distribuição da normalidade foi testada através do teste de *Shapiro Wilk* e a homocedasticidade da variância pelo teste de *Bartlett*. Na análise de componentes principais foi utilizado o critério de Kaiser, i.e., $\hat{\lambda}_i \geq 1$ para determinar o número de componentes. Os dados foram analisados conforme matriz de rotação varimax. Para comparar as médias dos índices de cada grupo gerados para cada componente foi usado ANOVA de 1 via seguida pelo teste *post-hoc Newman-Keuls*. As medidas atípicas das amostras foram excluídas (valores > média + 3 desvios padrão). As análises foram realizadas ou com o programa STATISTICA 6.1 (Stasoft, São Caetano do Sul, Brazil) ou no ambiente R disponibilizado no endereço www.r-project.org e o pacote “mass”. O nível de significância foi mantido $p < 0,05$.

5.10.1 Análise estatística dos dados do modelo animal

Peso corporal em gramas e o etanol ingerido em mL foram usados para calcular as gramas de etanol ingeridas por kg de peso corporal por dia (g/kg/dia). ANOVA com medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc Newman-Keuls* foi feita para comparar o consumo de cada camundongo através das fases experimentais considerando o consumo diário das últimas 2 semanas de cada fase (i.e., 14 medidas na fase AQUI, 14 medidas na fase RE e, 14 medidas na fase AD). Teste t para amostras independentes foram feitas para comparar o volume (mL) de água e etanol ingerido durante as fases experimentais de cada animal para detectar a preferência entre essas soluções. Essas análises foram feitas para classificar os animais em consumidor sem controle (A), pesado (P) e leve (L), (para detalhes ver item 6.1.2). O consumo de etanol foi expresso como média da ingesta diária (g/kg ou mL) e erro padrão da média. Correlações de *Spearman* foram usadas para averiguar a relação entre o consumo das soluções (água ou etanol) e os comportamentos medidos durante a fase de abstinência. Para comparações entre os grupos dos dados comportamentais com distribuição não paramétrica foram analisados pelo teste *Kruskall-Wallis* seguido pelo teste de comparações múltiplas de Siegel e Castellan, para dados com distribuição paramétrica foi utilizado ANOVA de 1 via seguida pelo teste *post-hoc Newman-Keuls*.

5.10.2. Análise estatística dos dados moleculares

Para comparações entre os grupos dos genes diferencialmente transcritos, os dados com distribuição não paramétrica foi utilizado o teste *Kruskall-Wallis* seguido pelo teste de comparações múltiplas *Nemenyi* (dados do microarranjo) e, para dados com distribuição paramétrica foi utilizado ANOVA de 1-via seguida pelo teste *post-hoc Newman-Keuls* (dados do PCR em tempo real). Para a discriminação dos grupos foi utilizada a análise discriminante

seguida por validação cruzada de *Jackknife*. Análise por agrupamento hierárquico pelo método de *Ward* foi realizada para verificar a homogeneidade da discriminação de cada grupo. Correlações de *Pearson* foram usadas para averiguar a relação entre os genes diferencialmente transcritos e entre o consumo nas diferentes fases experimentais. A quantidade relativa de RNAm normalizada para cada gene candidato foi comparada usando ANOVA de 1-via seguido pelo teste *post hoc Newman-Keuls*. Análise funcional dos genes diferencialmente transcritos foi feita usando o programa *Ingenuty Pathways Analyses IPA*[®] versão 8.7 para teste (acessado no endereço www.ingenuity.com em 11.10.2010) e o banco de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG, disponível no endereço <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Análise de interação molecular foi feita utilizando *GeneMania* (acessado no endereço <http://genemania.org/link?o=<tid>&g=<genes>> em fevereiro de 2011).

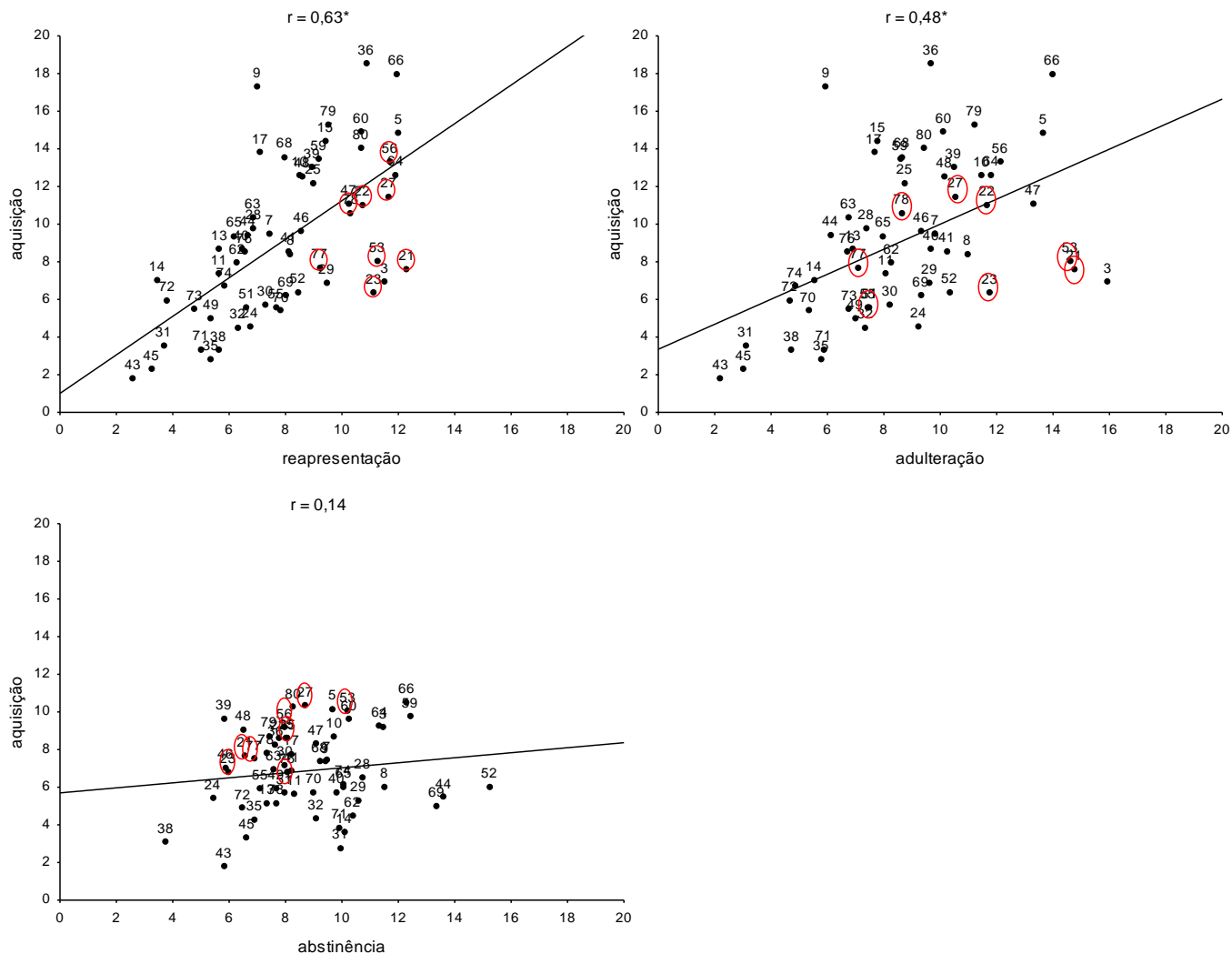
6. Resultados

6.1. Modelo Animal por Livre Escolha

6.1.1. Padrão geral do consumo

Houve correlação do consumo de etanol (g/kg) dos camundongos entre as diferentes fases experimentais (Gráfico 1). Entretanto, não foi observada relação entre o consumo de etanol (mL) medido na fase de aquisição e o de água (mL) medido durante a fase de abstinência (Gráfico 1).

GRÁFICO 01 – CONSUMO GERAL DE ETANOL E ÁGUA NAS FASES EXPERIMENTAIS



NOTA: correlações entre a média do consumo diário de etanol (g/kg) medido na fase de aquisição (2 últimas semanas) e o da fase de reapresentação (2 semanas), (superior à esquerda); e o da fase de adulteração (2 semanas) (superior a direita). Correlação entre a média do consumo diário de etanol (mL) medido na fase de aquisição e o de água (mL) medido na abstinência (inferior à esquerda). Os números circulosados de vermelho representam os camundongos classificados comportamentalmente como grupo sem controle (A). * $p < 0,05$.

6.1.2. Padrão individual do consumo

Ao término do modelo por livre escolha os animais foram classificados comportamentalmente em três fenótipos: camundongo sem controle (A, $n=13$), pesado (P, $n=11$) e leve (L, $n=21$), conforme os critérios descritos abaixo. Onze animais foram excluídos das análises comportamentais e moleculares, pois não preencheram os critérios de classificação. Um animal veio a óbito no transcorrer do tratamento e por fim, cinco foram excluídos dos procedimentos de dissecação. Os camundongos com comportamento mais característico e cujas amostras teciduais estavam em melhor condição foram selecionados para as análises moleculares (Tabela 3 e 4). O perfil individual de consumo das soluções etílicas (5% e 10%) e água de um camundongo de cada grupo ao longo de todo procedimento de livre escolha pode ser visualizado no gráfico 02. As amostras do grupo controle foram escolhidas aleatoriamente. As medidas descritivas dos animais que não foram selecionados para as análises estão no Apêndice 1 (Tabelas 14 e 15).

Grupo A:

- preferência significativa pelo etanol durante as três fases experimentais;
- sem queda significativa no consumo diário de etanol (g/kg) durante a fase de adulteração comparado ao consumo de etanol da fase de reapresentação e/ou aquisição;
- consumo de etanol relativamente elevado.

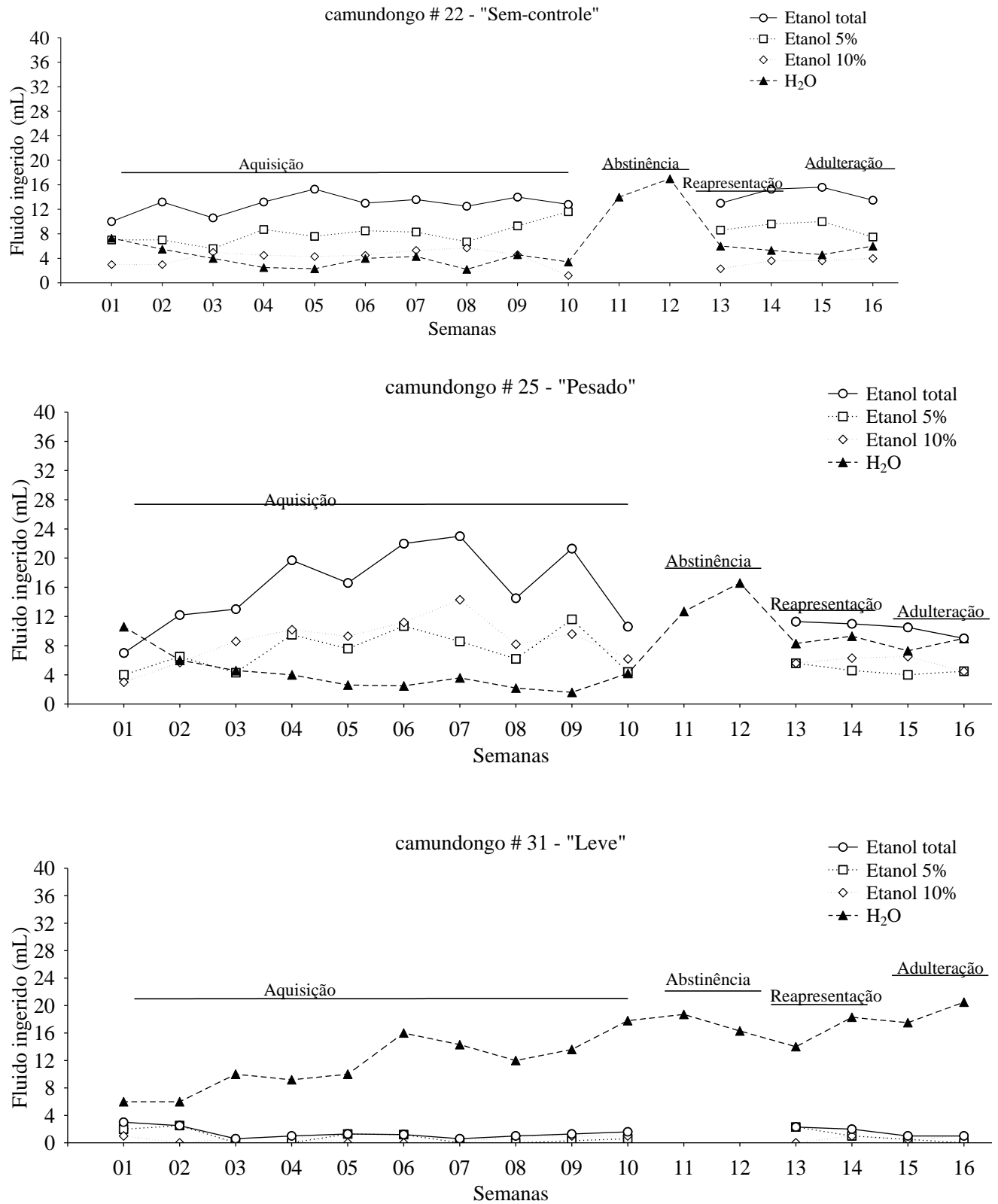
Grupo P:

- preferência significativa pelo etanol durante as três fases experimentais;
- queda significativa no consumo diário de etanol (g/kg) após a fase de abstinência;
- consumo de etanol relativamente elevado.

Grupo L:

- preferência significativa pela água durante as três fases experimentais;
- com ou sem queda significativa do consumo diário de etanol (g/kg) ao longo das três fases experimentais;
- consumo de etanol relativamente baixo.

GRÁFICO 02 – PADRÕES DE CONSUMO INDIVIDUAL DE ETANOL E ÁGUA



NOTA: Símbolos representam a média e ep do consumo diário em mL na respectiva semana. O camundongo #22 (grupo A) cujo padrão indica algum grau de perda de controle sobre o consumo do etanol, elevada preferência e ingestão de etanol durante a fase de aquisição, sem redução nesses parâmetros após a fase de abstinência e quando a droga torna-se menos palatável devido à adição de quinina (fase de adulteração). O camundongo #25 (grupo P) mostra preferência pelo etanol em quase todas as semanas de tratamento. Contudo, reduz a ingestão de etanol e preferência quando as soluções etílicas são adulteradas com quinina. O camundongo #31 (grupo L) exibe preferência pela água durante todas as semanas de tratamento. A ingestão de etanol permanece baixa ao longo de todo procedimento de livre escolha.

TABELA 02 – PADRÃO INDIVIDUAL DO CONSUMO DE ETANOL NAS FASES EXPERIMENTAIS

Grupo	Animal	Aquisição (2se)	Reapresentação (2se)	Adulteração (2se)	ANOVA	
		ETOH	ETOH	ETOH	F(2,22)	p
A	21	7,37 ^T e 0,72	11,69 ^T e 0,90	14,75 ^T e 0,88	18,75	0,0001
	22	10,71 e 0,52	10,04 e 0,36	11,66 e 0,79	2,44	0,11
	23	6,27 ^T e 0,37	10,50 e 0,80	11,75 e 0,88	13,40	0,001
	27	11,12 e 0,45	10,86 e 0,46	10,53 e 0,59	0,91	0,42
	53	7,64 e 0,96	10,56 e 0,80	14,60 ^T e 1,46	6,72	0,005
	56	12,99 e 0,64	10,94 e 0,53	12,12 e 0,99	1,47	0,25
	77	7,55 e 0,47	8,50 e 0,72	7,09 e 0,81	1,24	0,31
	78	10,12 e 0,62	9,65 e 0,41	8,62 e 0,73	1,97	0,16
P	25	11,41 ^T e 0,97	8,36 e 0,47	8,73 e 0,77	5,63	0,01
	36	18,22 ^T e 0,63	10,00 e 0,87	9,66 e 0,75	33,96	0,0001
	39	12,90 ^T e 0,48	8,33 ^T e 0,31	10,46 ^T e 0,86	11,70	0,001
	59	13,55 ^T e 0,91	8,50 e 0,71	8,58 e 0,74	8,09	0,002
	60	14,78 ^T e 0,83	10,01 e 0,76	10,13 e 1,19	6,29	0,01
	66	17,78 ^T e 1,20	11,08 e 1,05	13,97 e 1,77	7,14	0,004
	76	8,31 ^R e 0,57	6,06 e 0,46	6,70 e 0,76	5,93	0,009
	79	14,71 ^T e 0,80	8,81 ^T e 0,42	11,20 ^T e 0,91	15,402	0,0001
L	11	7,20 e 0,61	5,25 ^T e 0,30	8,08 e 0,82	4,03	0,03
	30	5,45 e 0,42	6,80 e 0,39	8,22 ^A e 0,71	4,63	0,02
	31	3,55 e 0,60	3,43 e 0,16	3,10 e 0,36	0,17	0,85
	32	4,49 ^T e 0,31	5,91 ^{AD} e 0,32	7,34 e 0,64	8,4094	0,002
	35	2,97 ^T e 0,50	4,97 e 0,24	5,77 e 0,59	11,317	0,0004
	38	3,34 ^T e 0,37	5,25 e 0,30	4,72 e 0,52	6,00	0,008
	43	1,77 e 0,34	2,48 e 0,50	2,20 e 0,43	0,29	0,75
	45	2,36 e 0,33	3,05 e 0,31	3,03 e 0,57	0,87	0,43
	49	4,82 e 0,50	4,96 e 0,47	6,98 e 1,11	1,98	0,16
	51	5,19 e 0,60	6,22 e 0,40	7,50 e 1,00	1,57	0,23

NOTA: média do consumo diário de etanol (g/kg) e erro padrão nas diferentes fases (2 últimas semanas da fase de aquisição, 2 semanas da fase de reapresentação e 2 semanas da fase de adulteração). ANOVA com medidas repetidas seguida pelo teste *Newman-Keuls*, $p < 0,05$; ^T diferente das demais fases experimentais; ^A diferente da fase de aquisição. ^{AD} diferente da fase de adulteração. ^R diferente da fase de reapresentação. ETOH= etanol. Grupos: A, sem controle; P, pesado; L, leve.

TABELA 03 – PREFERÊNCIA ENTRE AS SOLUÇÕES

Grupo	Animal	Consumo		Teste-t	
		H ₂ O	ETOH	t	p
A	21	4,74 e 0,27	7,27 e 0,40	-5,25	0,0001
	22	3,40 e 0,20	8,38 e 0,23	-16,10	0,0001
	23	4,00 e 0,20	6,45 e 0,36	-5,92	0,0001
	27	2,83 e 0,32	10,09 e 0,27	-17,49	0,0001
	53	5,89 e 0,40	9,46 e 0,63	-4,77	0,0001
	56	2,50 e 0,21	8,98 e 0,32	-17,05	0,0001
	77	3,77 e 0,16	7,26 e 0,37	-8,61	0,0001
	78	3,59 e 0,31	7,64 e 0,25	-10,17	0,0001
P	25	4,33 e 0,28	8,25 e 0,44	-7,49	0,0001
	36	4,08 e 0,59	8,26 e 0,43	-5,71	0,0001
	39	2,33 e 0,27	9,44 e 0,38	-15,28	0,0001
	59	5,45 e 0,44	9,87 e 0,58	-6,03	0,0001
	60	5,19 e 0,32	9,50 e 0,49	-7,41	0,0001
	66	5,73 e 0,48	10,28 e 0,57	-6,13	0,0001
	76	4,71 e 0,26	6,62 e 0,30	-4,83	0,0001
	79	2,49 e 0,17	8,51 e 0,35	-15,44	0,0001
L	11	8,17 e 0,17	5,49 e 0,33	7,15	0,0001
	30	7,74 e 0,19	6,77 e 0,36	2,35	0,05
	31	9,42 e 0,32	2,73 e 0,22	17,06	0,0001
	32	8,87 e 0,38	4,18 e 0,22	-10,74	0,0000
	35	8,31 e 0,26	4,08 e 0,28	-11,17	0,0000
	38	3,79 e 0,28	3,00 e 0,20	2,26	0,05
	43	6,06 e 0,16	1,73 e 0,20	16,96	0,0001
	45	6,33 e 0,16	3,23 e 0,27	9,91	0,0001
	49	7,80 e 0,20	5,58 e 0,44	4,59	0,0001
	51	7,71 e 0,25	5,36 e 0,36	5,37	0,0001

NOTA: média do consumo diário e erro padrão ao longo do experimento das soluções (mL) (2 últimas semanas da fase de aquisição, 2 semanas da fase de reapresentação e 2 semanas da fase de adulteração) para os grupos. Teste-t independente. ETOH= etanol; H₂O=água. Grupos: A, sem controle; P, pesado; L, leve; e C, controle.

6.1.3. Padrão do consumo em cada grupo

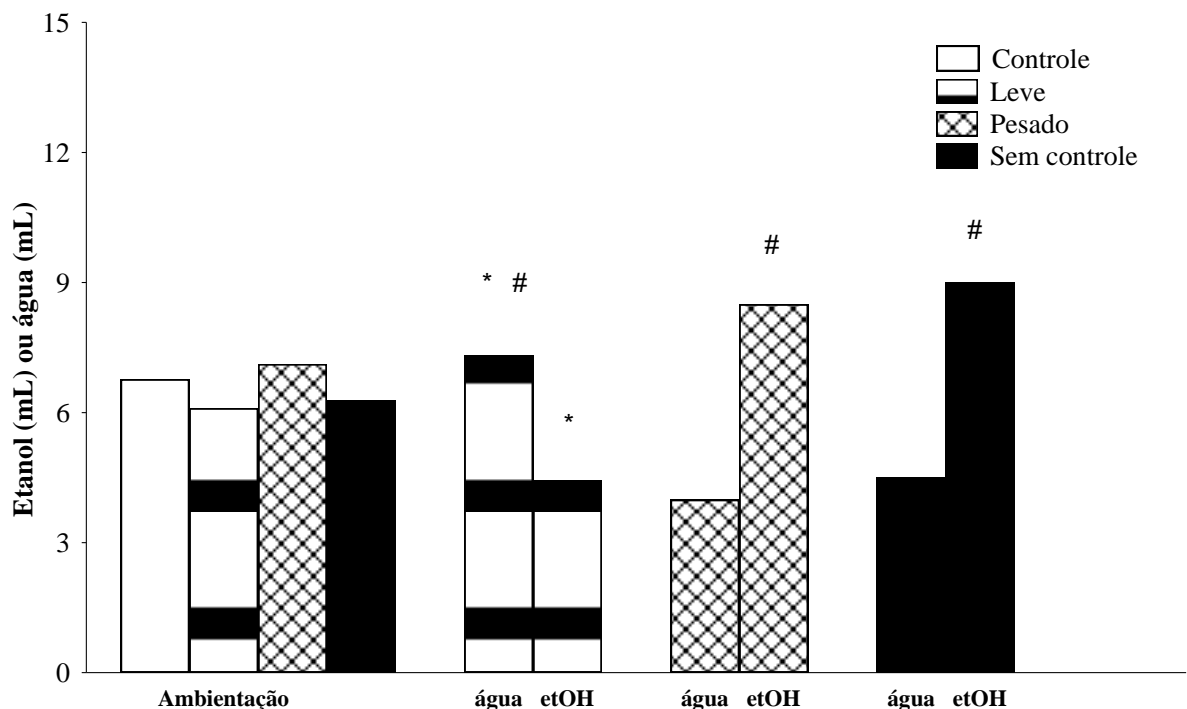
Após a classificação individual os animais foram agrupados e o consumo de água e etanol foi avaliado. Não foi observada nenhuma diferença para o consumo basal de água entre os diferentes grupos ($F_{(3, 28)}=0,72943$, $p> 0,05$), (Gráfico 03).

Os grupos, Sem-controle e Leve, não apresentaram alterações significativas no consumo de etanol (g/kg) ao longo das fases experimentais ($F_{A(2,14)}= 1,9563$, $p> 0,05$ e $F_{L(2,14)}=4,20$ $p< 0,05$). O grupo Pesado apresentou um consumo maior durante a fase de aquisição em relação às fases subseqüentes ($F_{P(2,14)}= 35,437$, $p< 0,0001$), (Gráfico 04).

O grupo Leve consumiu mais água quando comparado aos grupos Sem-controle e Pesado, sendo que não foi observada diferença em relação ao grupo Controle ($F_{(3, 28)}=21,232$, $p<0,0001$). Os grupos Sem-controle e Pesado consumiram mais as soluções etílicas quando comparados com o grupo Leve ($F_{(2, 21)}=22,733$, $p<0,0001$), (Gráfico 03).

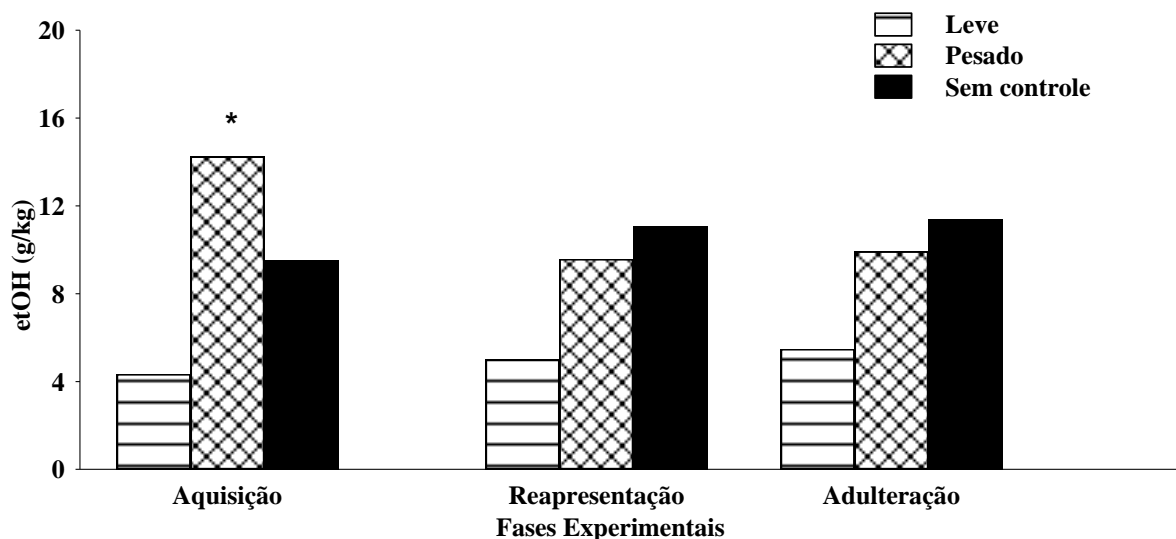
Comparações dentro do grupo indicaram que o consumo de água foi maior do que o das soluções etílicas para o grupo Leve ($t= 3,16$, $p<0,01$) sendo o contrário observado para os grupos Sem-controle ($t= -7,84$, $p< 0,0001$) e Pesado ($t= -7,27$, $p<0,0001$) (Gráfico 03).

GRÁFICO 03 – PREFERÊNCIA DOS FENÓTIPOS ENTRE AS SOLUÇÕES



NOTA: as primeiras 4 barras representam a média semanal e erro padrão do consumo diário de água durante o período basal para cada grupo. As demais barras representam a média e ep do consumo diário das soluções (água ou etanol) durante o tratamento (2 últimas semanas da fase de aquisição, 2 semanas da fase de reapresentação, 2 semanas da fase de adulteração). ANOVA de 1 via seguido por *Newman-Keuls* * $p<0,05$ no mínimo, diferença no consumo da mesma solução entre os grupos. Teste-t independente # $p<0,01$ no mínimo, diferença no consumo das soluções (água ou etanol) no mesmo grupo. etOH=soluções etílicas (5% e 10%). $n=8$ em cada grupo.

GRÁFICO 04 – CONSUMO DE ETANOL ENTRE AS FASES EXPERIMENTAIS



NOTA: média semanal e erro padrão do consumo diário de etanol (g/kg) durante o tratamento. ANOVA com medidas repetidas seguido por Newman-Keuls * $p < 0,05$ diferença no consumo dentro do mesmo grupo. etOH= etanol. $n=8$ em cada grupo.

6.2. Análise comportamental durante a abstinência ao etanol

Para as análises foram consideradas as medidas de 61 camundongos expostos ao modelo de livre escolha e classificados comportamentalmente conforme descrito na metodologia, além do grupo controle. Foram excluídas das análises as medidas dos camundongos que não puderam ser classificados em grupo algum ($n=11$). Foram considerados apenas 09 parâmetros comportamentais medidos após 5h de abstinência nos equipamentos LCE de acordo com o princípio da parcimônia. As medidas descritivas dos comportamentos observados nos equipamentos LCE, CA e CME, coletados na fase de abstinência e a relação entre esses com o comportamento de consumo das soluções (etanol ou água) se encontram no Apêndice 2 (Tabela 21).

De acordo com a validação cruzada, aproximadamente 51% das classificações foram corretas (Tabela 04). Foi encontrada a seguinte taxa de classificação correta para cada grupo: C= 63%, L= 48%, P= 67% e A= 25%.

Análise de componentes principais foi feita via matriz de correlação e para interpretação foram considerados os autovetores (Tabela 05) e as médias dos índices de cada componente por grupo (Tabela 06). A soma das 3 primeiras componentes explicaram 72% da variabilidade total dos 09 comportamentos analisados. Os autovetores com valores próximos a zero não foram considerados para a análise. Os índices da matriz de rotação cujos *loadings* foram acima de 0,40 estão em negrito e, os que apresentaram *loadings* entre 0,25 e 0,40 estão em vermelho.

Para a análise foram considerados apenas os autovetores com valores cima de 0,25. Assim, a primeira componente (CP1) foi gerada através da comparação entre os comportamentos TPBF, SAPF e LAT com os comportamentos EBA, EBF, TPBA e HD.

TABELA 04 – CONTRIBUIÇÃO DOS COMPORTAMENTOS PARA OS FENÓTIPOS

Taxa	Comportamentos
46	Ambulação vertical no braço fechado do LCE (ELF)
39	Espreitas no braço aberto do LCE (HD)
38	Postura esticada no braço aberto do LCE (SAPA)
38	%Tempo de permanência no braço fechado do LCE (TPBF)
38	%Tempo de permanência no braço aberto do LCE (TPBA)
36	%Tempo de latência no LCE (LAT)
36	Entradas no Braço Aberto do LCE (EBA)
34	Postura esticada no braço fechado do LCE (SAPF)
31	Entradas no Braço Fechado do LCE (EBF)

Nota: valor representa porcentagem em predição correta para discriminar os grupos Sem controle (A), Pesado (P) e Leve (L), e grupo Controle (C), considerando os comportamentos medidos após 5h de abstinência ao etanol ($n= 61$). Equipamentos: LCE= labirinto em cruz elevado

TABELA 05 – MATRIZ DE ROTAÇÃO

Comportamentos	CP1 (45%)	CP2 (20%)	CP3 (12%)
Entradas no braço aberto do LCE (EBA)	-0,453	-0,086	0,146
Entradas no braço fechado do LCE (EBF)	-0,232	-0,432	-0,268
%Tempo de permanência no braço aberto do LCE (TPBA)	-0,452	0,138	0,078
%Tempo de permanência no braço fechado do LCE (TPBF)	0,428	-0,286	0,109
%Tempo de latência no LCE (LAT)	0,158	0,447	0,349
Espreitas no braço aberto do LCE (HD)	-0,405	0,109	-0,060
Postura esticada no braço aberto do LCE (SAPA)	0,033	0,253	-0,862
Ambulação vertical no braço fechado do LCE (ELF)	-0,037	-0,654	-0,029
Postura esticada no braço fechado do LCE (SAPF)	0,402	-0,035	-0,142

Nota: valor representa os escores das componentes ($n= 61$). Equipamentos: LCE= labirinto em cruz elevado.

A segunda componente (CP2) comparou os comportamentos EBF, TPBF e ELF com os LAT e SAPA. E, na terceira componente (CP3) foi observada uma relação inversa entre os comportamentos LAT e, os EBF, SAPA e ELF (Tabela 05). Foi possível observar uma diferença significativa entre os grupos para a CP1, indicando uma possível alteração no comportamento emocional no grupo pesado em resposta à retirada do etanol (Tabela 06). Embora a CP2 não tenha separado os grupos de forma significativa, houve uma tendência do grupo A em exibir comportamentos de forma distinta dos demais fenótipos consumidores de etanol ($p=0,09$).

TABELA 06 – ÍNDICES DAS COMPONENTES

Componente	Grupos				F(3,57)	p
	C	L	P	A		
CP1	0,16 e 0,21	0,18 e 0,24	-0,86* e 0,30	0,07 e 0,22	2,90	0,04
CP2	0,28 e 0,23	-0,29 e 0,20	-0,40 e 0,34	0,36 e 0,26	2,21	0,09
CP3	-0,04 e 0,29	-0,02 e 0,19	0,31 e 0,26	-0,13 e 0,27	0,36	0,78

Nota: média dos índices e erro padrão das 3 primeiras componentes extraídas da análise dos comportamentos medidos durante a fase de abstinência. * $p<0,05$ diferença entre os grupos, ANOVA 1-via seguida pelo teste *post-hoc* Newman-Keuls. Controle (C) $n=19$; Leve (L) $n=21$; Pesado (P) $n=09$; Sem controle (A) $n=12$.

6.3. Análise do transcriptoma dos núcleos da amígdala cerebral

Foram utilizados 10 chips de microarranjo para análise da transcrição diferencial da região cerebral dos núcleos da amígdala dos camundongos (Grupos: A, $n=3$; P, $n=2$; C, $n=3$; L, $n=2$). Após a normalização dos dados foi realizada a análise utilizando o teste *Kruskall-Wallis*, sendo identificados 247 genes com a transcrição alterada. Contudo, devido ao tamanho da amostra não foi possível identificar entre quais grupos a diferença era significativa após o teste de comparações múltiplas. A partir desses genes diferencialmente transcritos foram feitas análise das vias metabólicas utilizando o programa *Ingenuty Pathways Analyses*, revelando que a via do metabolismo de ácido graxo foi a mais representada (Tabela 07).

Paralelamente, foi feita a classificação dos genes conforme o poder discriminante para cada fenótipo (Tabela 07). Apenas 15 genes apresentaram 100% de poder para discriminar os quatro grupos (Tabela 08).

TABELA 07 – VIAS METABÓLICAS

Via bioquímica	Razão	p valor
Metabolismo de ácido graxo	3/61 (0,049)	2,02E-02
Diferenciação de células T Helper	2/42 (0,048)	6,05E-02
Sinalização do câncer	2/51 (0,039)	8,48E-02
Metabolismo do piruvato	2/51 (0,039)	8,48E-02
Sinalização do TGF- β	2/58 (0,034)	1,05E-01

Nota: análise dos genes diferencialmente transcritos comparando os dados de todos os grupos. TGF- β , fator de crescimento transformante beta.

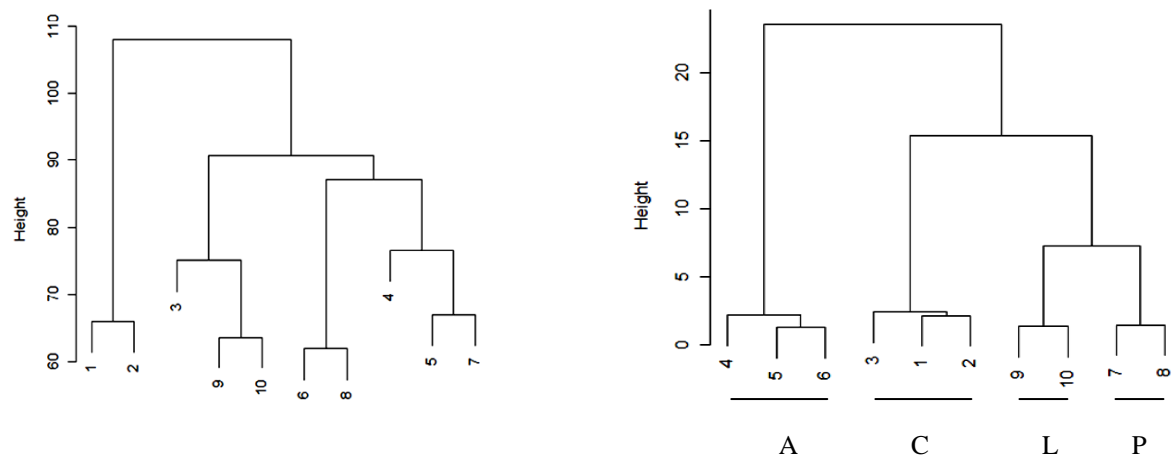
TABELA 08 – ANÁLISE DISCRIMINANTE DE TODOS OS GENES

Poder	100	90	80	70	60	50	40	30	20	0-10
<i>n</i>	15	81	398	1311	3748	8157	8943	4692	1459	190
FR	0,10	0,30	1,40	4,50	12,90	28,10	30,80	16,20	5,00	0,60

Nota: FR: frequência relativa. *n*: número de genes.

Considerando os genes com poder discriminante entre 100% a 90% (Tabelas 09 no texto e 29 no apêndice 04, respectivamente) foi possível visualizar a separação dos grupos após análise de agrupamento hierárquico. O mesmo não foi observado após a análise utilizando todos os genes do microarranjo (Gráfico 05).

GRÁFICO 05 – ANÁLISE DE AGRUPAMENTO



Nota: agrupamento considerando todos os genes (à esquerda) e apenas os que apresentaram entre 100% a 90% de poder discriminante (à direita). Grupos: A, sem controle; P, pesado; L, leve; e C, controle.

6.3.1. Seleção dos genes diferencialmente transcritos

Juntos, os resultados das análises discriminante, análise de variância *Kruskall-Wallis* (247 genes) e funcional, possibilitaram a identificação de onze genes para posterior validação através da técnica da PCR em tempo real. Cerca de 54% desses genes apresentou relação com os demais genes (Tabela 10) ou tinha entre elevado a médio poder discriminante (*Kcnj13*, 100%; *Acs11*, 80%; *Kcnn3*, 80%; *Hadh*, 80%; *Slc27a2*, 70%; *Acaa2*, 60%; *Hadhb*, 60%; *Acsbg2*, 60%; *Acat1*, 50%; *Acss3*, 50%; *Acss2*, 40%).

TABELA 09 – GENES COM 100% DE PODER DISCRIMINANTE

ID	Gene	Descrição	NM
10356403	<i>Kcnj13</i>	<i>potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 13</i>	1110227
10350173	<i>Tnnt2</i>	<i>troponin T2, cardiac</i>	1130174
10353127	<i>Prdm14</i>	<i>PR domain containing 14</i>	1081209
10371466	<i>Syn3</i>	<i>synapsin III</i>	13722
10379075	-	<i>Mus musculus RIKEN cDNA 1700093K21 gene (1700093K21Rik), transcript variant 1, mRNA</i>	26105
10404407	<i>Foxc1</i>	<i>forkhead box C1</i>	8592
10405063	<i>Ogn</i>	<i>osteoglycin</i>	8760
10406530	<i>Tmem167</i>	<i>transmembrane protein 167</i>	25335
10442288	<i>Vmn2r113</i>	<i>vomer nasal 2, receptor 113</i>	1104578
10448016	<i>Tcte3</i>	<i>t-complex-associated testis expressed 3</i>	11560
10456405	<i>Slmo1</i>	<i>slowmo homolog 1 (Drosophila)</i>	144867
10459730	<i>Me2</i>	<i>malic enzyme 2, NAD(+)-dependent, mitochondrial</i>	145494
10469571	<i>Otud1</i>	<i>OTU domain containing 1</i>	ENSMUST00 000052168
10532907	<i>Hnf1a</i>	<i>HNF1 homeobox A</i>	9327
10541002	<i>D6Wsu116e</i>	<i>DNA segment, Chr 6, Wayne State University 116, expressed</i>	AK122320

Nota: genes identificados após análise discriminante. NM corresponde ao número de acesso da sequência de referência do RNAm. ID: identificador no microarranjo.

TABELA 10 – CORRELAÇÃO ENTRE OS GENES SELECIONADOS

	<i>Kcnj13</i>	<i>Acs11</i>	<i>Hadhb</i>	<i>Slc27a2</i>	<i>Acat1</i>	<i>Kcnn3</i>	<i>Acaa2</i>	<i>Hadh</i>	<i>Acss2</i>	<i>Acss3</i>	<i>Acsbg2</i>
<i>Kcnj13</i>	1,00	0,63*	-0,07	-0,63	-0,13	-0,00	0,20	0,42	-0,31	0,04	-0,44
<i>Acs11</i>		1,00	0,19	-0,78*	0,28	-0,59	0,59	0,19	0,06	0,57	-0,15
<i>Hadhb</i>			1,00	-0,13	0,69*	-0,59	0,16	0,46	0,42	0,30	0,24
<i>Slc27a2</i>				1,00	-0,24	0,43	-0,33	-0,78*	-0,12	-0,41	0,39
<i>Acat1</i>					1,00	-0,84*	0,27	0,72*	0,45	0,50	0,10
<i>Kcnn3</i>						1,00	-0,32	-0,74*	-0,14	-0,58	-0,16
<i>Acaa2</i>							1,00	0,43	0,50	0,84*	0,38
<i>Hadh</i>								1,00	0,37	0,57	-0,33
<i>Acss2</i>									1,00	0,30	0,03
<i>Acss3</i>										1,00	0,26
<i>Acsbg2</i>											1,00

Nota: níveis de RNAm dos genes selecionados baseado nos dados do microarranjo ($n=10$). *Hadh*, hidroxil-CoA dehidrogenase cadeia curta; *Acaa2*, acetil-Coenzima A aciltransferase 2; *Acat1*, acetil-Coenzima A acetiltransferase 1; *Hadhb*, hidroxil-Coenzima A dehidrogenase subunidade beta; *Kcnn3*, canal de condutância intermediária/pequena de potássio ativado por cálcio, subfamília N, membro 3; *Slc27a2*, carreador de soluto família 27, membro 2; *Kcnj13*, canal de entrada de potássio, subfamília J, membro 13; *Acs11*, acil-CoA sintetase cadeia longa família membro 1. *Acss2*, acil-CoA sintetase cadeia curta família membro 2. *Acss3*, acil-CoA sintetase cadeia curta família membro 3. *Acsbg2*, acil-CoA sintetase *bubblegum* família membro 2. Correlação de Pearson * $p<0,05$.

6.3.2. Sequência dos iniciadores desenhados para análise molecular por PCR em tempo real

Antes das reações de PCR em tempo real com as amostras dos camundongos expostos ao modelo por livre escolha, os iniciadores (Tabela 11 acima) foram testados através de uma reação de PCR convencional e o produto foi visualizado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Os resultados do gel de agarose e da curva de dissociação (da reação de PCR em tempo real) revelaram que os iniciadores desenhados (conforme descrição no item 5.8.1) não amplificaram produtos espúrios.

TABELA 11 – SEQUÊNCIA DOS INICIADORES

Gene	5'– Sequência – 3'	Cromossomo		NM
		Camundongo	Humano	
<i>Gadph</i>		6	7	008084.2
S	5'–AGGAGCGAGACCCCACTAAC– 3'			
A	5'–GTGGTTCACACCCATCACAA– 3'			
<i>B-act</i>		5	7	007393.3
S	5'–GTGGGAATGGGTCAGAAGG– 3'			
A	5'–GGTCATCTTTTCACGGTTGG– 3'			
<i>Cyclo</i>		11	1	008907.1
S	5'–AATGCTGGACCAAACACAAA– 3'			
A	5'–CCTTCTTTCACCTTCCCAA– 3'			
<i>Acaa2</i>		18	18	177470.3
S	5'–CTCCAGAATCACCGCACAC– 3'			
A	5'–AGCTGATCCCCTGCGTACT– 3'			
<i>Acat1</i>		9	11	144784.3
S	5'–CCCCATTGATTTTCCACTTG– 3'			
A	5'–GCACAACCACACTGAATGCT– 3'			
<i>Acs11</i>		8	4	7981.3
S	5'–GTTGAGAGCCTACCGTCTCTG– 3'			
A	5'–GCTTCCTTCCCAAGTTTCAA– 3'			
<i>Hadh</i>		3	4	8212.3
S	5'–GGTCCGTTTGAGCTTCTTGA– 3'			
A	5'–GGTTCTCTGGCTCCATTTCA– 3'			
<i>Hadhb</i>		5	2	145558.1
S	5'–GGAAGGATGGAGGCCAGTAT– 3'			
A	5'–CCAGTGCAAGTGCTGAAGAG– 3'			
<i>Kcnj13</i>		1	2	110227.1
S	5'–CAATCGCCTTACTTGCCATAC– 3'			
A	5'–GTGCAATCTTCGCCACAAA– 3'			
<i>Kcnc3</i>		3	1	80466.2
S	5'–TTCCAAGATGCAGAACGTCA– 3'			
A	5'–TTGAAACTGGCTGTGAGGTG– 3'			
<i>Slc27a2</i>		2	15	11978.2
S	5'–TTTCAACACATCGCGGAGTA– 3'			
A	5'–TCTTCCATCAGGGTCACTTTG– 3'			
<i>Acsbg2</i>		17	19	1039114.1
S	5'–CTCATGCCTCCAACAGATCA– 3'			
A	5'–ACTTCCACTTACGCCTGGA– 3'			
<i>Gabbr1</i>		17	6	019439.3
S	5'–TCCACCAACAACAATGAGGA– 3'			
A	5'–GATGGCGCAGTTCAGAGAC– 3'			
<i>Gabbr2</i>		4	9	001081141.1
S	5'–GAGGACATCAACTCCCCAGA– 3'			
A	5'–CTGGCTGTAGGGCTGACAC– 3'			
<i>Acss2</i>		2	20	19811.3
S	5'–GGGAGTTTTGGGGAAACATT– 3'			
A	5'–CCAGCACGTTGTAGCAGATG– 3'			
<i>Acss3</i>		10	12	1142804.1
S	5'–CAGGTCTGGCAAATTCAC– 3'			
A	5'–GTCCTCAATCGTAGGGGTCA– 3'			
<i>Gphn</i>		12	14	172952.2
S	5'– TGGCATCACCAAGAACCAC – 3'			
A	5'– GCTCTGTCTTTGGAGGTAGCA – 3'			

NOTA: sequência dos iniciadores para os genes de referência (*Gadph*, *B-act* e *cyclo*) e de interesse (*Acaa2*, acetil-Coenzima A aciltransferase 2; *Acat1*, acetil-Coenzima A acetiltransferase 1; *Acs11*, acil-CoA sintetase cadeia longa família membro 1; *Hadh*, hidroxiacil-CoA dehidrogenase cadeia curta; *Hadhb*, hidroxiacil-Coenzima A dehidrogenase subunidade beta; *Kcnj13*, canal de entrada de potássio, subfamília J, membro 13; *Kcnc3*, canal de condutância intermediária/pequena de potássio ativado por cálcio, subfamília N, membro 3; *Slc27a2*, carreador de soluto família 27, membro 2; *Acsbg2*, acil-CoA sintetase *bubblegum* família membro 2; *Acss2*, acil-CoA sintetase cadeia curta família membro 2; *Acss3*, acil-CoA sintetase cadeia curta família membro 3; *Gabbr1*, receptor GABBR1 do ácido gamma-aminobutírico; *Gabbr2*, receptor GABBR2 do ácido gamma-aminobutírico e *Gphn*, gefirina). S: senso. A: antisenso. NM corresponde ao número de acesso da sequência de referência do RNAm.

6.3.3. Validação dos genes diferencialmente transcritos

Para as análises através da PCR em tempo real dos genes selecionados foram utilizadas amostras da região dos núcleos da amígdala de um número maior de indivíduos (A, $n=6$; P, $n=7$; C, $n=8$; L, $n=10$).

Ao serem comparados, todos os genes escolhidos mostraram alguma relação linear significativa, independente da classificação fenotípica (Apêndice 4, Tabela 23). As medidas descritivas de cada gene pode ser visualizada na Tabela 12.

No grupo A, foi observada uma correlação significativa entre o gene *Hadh* e outros cinco genes, porém com sentido oposto ao encontrado para os demais grupos (Apêndice 4, Tabela 24). Foi também o único grupo a apresentar uma associação positiva e significativa entre o gene *Acs11* e o gene *Hadh* (Apêndice 4, Tabela 24). O grupo A também apresentou maior nível de transcrição dos genes *Acss2* e *Acss3* comparado aos demais grupos, sendo significativo para o primeiro gene (Tabela 12). O grupo C apresentou as maiores médias de transcrição para os genes *Acaa2*, *Slc27a2*, *Acat1*, *Hadh*, *Hadhb* e *Kcnn3*, sendo a diferença significativa quando comparado com alguns grupos considerando os últimos quatro genes (Tabela 12). O grupo P teve maior nível de RNAm para o gene *Acsbg2* comparado com a média dos demais grupos ($p<0,10$), (Tabela 12). Não foi encontrada diferença significativa entre as médias dos níveis de transcritos do gene *Kcnj13* de cada grupo (Tabela 12).

TABELA 12 – MEDIDAS DESCRITIVAS DOS GENES

Gene	Grupos	RNAm	ANOVA	
			F(3,27)	p
<i>Acaa2</i>	A	0,82 ^C e 0,22	3,52	0,03
	P	1,63 e 0,38		
	L	0,64 ^C e 0,12		
	C	1,93 e 0,53		
<i>Acat1</i>	A	0,93 [#] e 0,17	5,39	0,005
	P	1,33 ^C e 0,26		
	L	0,66 [#] e 0,12		
	C	2,00 e 0,41		
<i>Acs11</i>	A	1,35 e 0,21	1,10	0,37
	P	1,03 e 0,09		
	L	1,22 e 0,08		
	C	1,18 e 0,11		

NOTA: média e ep dos níveis de RNAm da região dos núcleos da amígdala cerebral. * comparado aos demais grupos ($p<0,05$, ANOVA 1-via, *Newmann-Keuls*). C ou L $p<0,10$ comparado com o grupo C ou L, respectivamente. # $p<0,05$ comparado com o grupo controle. \$ $p<0,05$ comparado com o grupo P. Grupos: C, $n=8$; L, $n=10$; P, $n=7$; A, $n=6$. *Hadh*, hidroxiacil-CoA dehidrogenase cadeia curta; *Acaa2*, acetil-Coenzima A aciltransferase 2; *Acat1*, acetil-Coenzima A acetiltransferase 1; *Hadhb*, hidroxiacil-Coenzima A dehidrogenase subunidade beta; *Kcnn3*, canal de condutância intermediária/pequena de potássio ativado por cálcio, subfamília N, membro 3; *Slc27a2*, carreador de soluto família 27, membro 2; *Kcnj13*, canal de entrada de potássio, subfamília J, membro 13; *Acs11*, acil-CoA sintetase cadeia longa família membro 1; *Acss2*, acil-CoA sintetase cadeia curta família membro 2; *Acss3*, acil-CoA sintetase cadeia curta família membro 3. *Acsbg2*, acil-CoA sintetase *bubblegum* família membro 2; *Gabbr1*, receptor GABBR1 do ácido gamma-aminobutírico; *Gabbr2*, receptor GABBR2 do ácido gamma-aminobutírico e *Gphn*, gefirina.

TABELA 12 – MEDIDAS DESCRITIVAS DOS GENES

Gene	Grupos	RNAm	ANOVA	
			F(3,27)	p
<i>Hadh</i>	A	0,89 [#] e 0,15	6,00	0,003
	P	1,68 ^C e 0,47		
	L	1,00 [#] e 0,09		
	C	2,41 e 0,34		
<i>Hadhb</i>	A	1,17 e 0,33	3,61	0,03
	P	1,56 e 0,37		
	L	0,64 [#] e 0,12		
	C	2,04 e 0,48		
<i>Kcnj13</i>	A	0,60 e 0,22	1,94	0,15
	P	0,85 e 0,27		
	L	0,18 e 0,06		
	C	0,85 e 0,37		
<i>Kcnn3</i>	A	1,21 ^C e 0,41	4,03	0,02
	P	1,29 [#] e 0,40		
	L	0,76 [#] e 0,12		
	C	2,58 e 0,63		
<i>Acss2</i>	A	0,95* e 0,25	4,72	0,009
	P	0,20 e 0,04		
	L	0,41 e 0,15		
	C	0,30 e 0,04		
<i>Acss3</i>	A	1,07 ^{CSL} e 0,25	4,40	0,01
	P	0,34 e 0,10		
	L	0,69 e 0,07		
	C	0,71 e 0,11		
<i>Slc27a2</i>	A	1,10 e 0,23	2,45	0,08
	P	1,22 e 0,55		
	L	0,72 e 0,11		
	C	2,13 e 0,57		

NOTA: média e ep dos níveis de RNAm da região dos núcleos da amígdala cerebral. * comparado aos demais grupos ($p < 0,05$, ANOVA 1-via, *Newmann-Keuls*). C ou L $p < 0,10$ comparado com o grupo C ou L, respectivamente. # $p < 0,05$ comparado com o grupo controle. \$ $p < 0,05$ comparado com o grupo P. Grupos: C, $n=08$; L, $n= 10$; P, $n= 07$; A, $n= 06$. *Hadh*, hidroxiaçil-CoA dehidrogenase cadeia curta; *Acaa2*, acetil-Coenzima A aciltransferase 2; *Acat1*, acetil-Coenzima A acetiltransferase 1; *Hadhb*, hidroxiaçil-Coenzima A dehidrogenase subunidade beta; *Kcnn3*, canal de condutância intermediária/pequena de potássio ativado por cálcio, subfamília N, membro 3; *Slc27a2*, carreador de soluto família 27, membro 2; *Kcnj13*, canal de entrada de potássio, subfamília J, membro 13; *Acs11*, acil-CoA sintetase cadeia longa família membro 1; *Acss2*, acil-CoA sintetase cadeia curta família membro 2; *Acss3*, acil-CoA sintetase cadeia curta família membro 3. *Acsbg2*, acil-CoA sintetase *bubblegum* família membro 2; *Gabbr1*, receptor GABBR1 do ácido gamma-aminobutírico; *Gabbr2*, receptor GABBR2 do ácido gamma-aminobutírico e *Gphn*, gefirina.

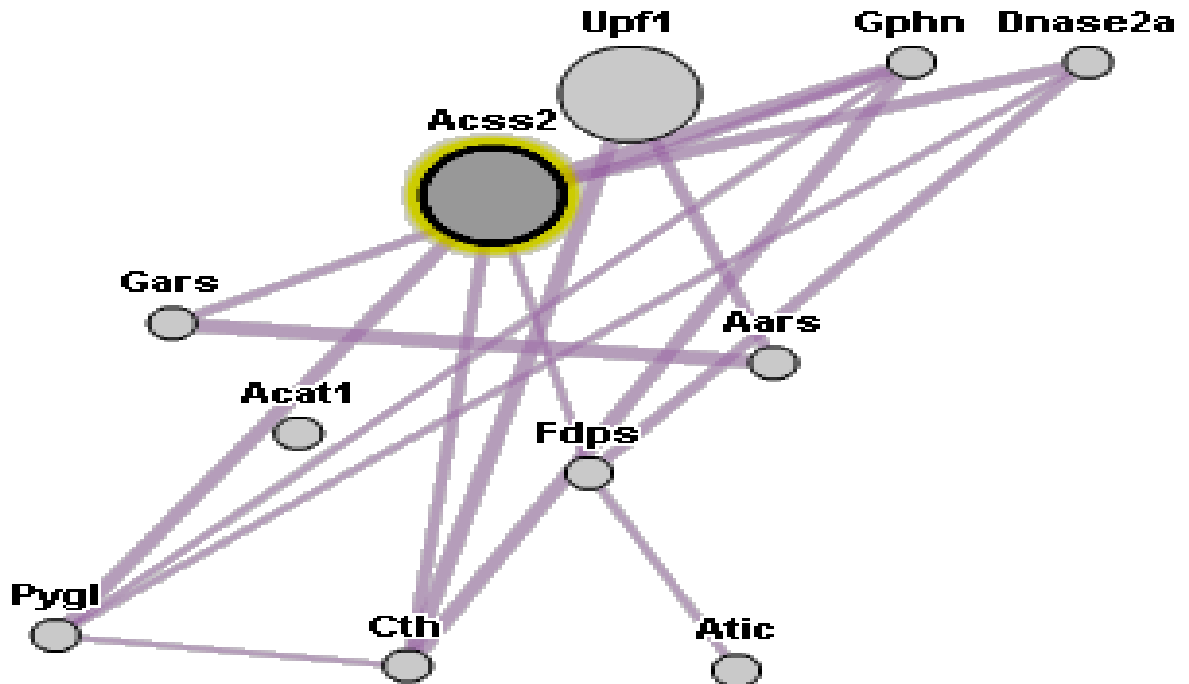
6.3.4. Análise de genes da neurotransmissão GABAérgica e do metabolismo energético

Foram analisados genes da via GABAérgica, i.e., *Gabbr1*, *Gabbr2* e *Gphn*, na área dos núcleos da amígdala cerebral, a fim de identificar uma possível comunicação entre essa via com a do metabolismo de ácido graxo. As medidas descritivas dos genes se encontram na Tabela 12.

Apenas no grupo A foi evidenciada uma relação entre o gene *Acss2* e os da via GABAérgica (*Gabbr1*, $r=0,93$; *Gabbr2*, $r= 0,95$ e *Gphn*, $r= 0,84$, $p < 0,05$). Análises de

interação molecular utilizando o programa GeneMania disponível no endereço <http://genemania.org>, revelaram uma possível interação entre o gene *Gphn* e *Acss2*, mas não entre *Gphn* e os demais genes da via GABAérgica (Figura 08).

FIGURA 08 – MAPA DE INTERAÇÃO MOLECULAR



Nota: esquema de genes co-expressos gerado pelo programa GeneMania. Destaque para os genes *Acss2* e *Gphn* em *mus musculus*. *Upf1*: homólogo (fungo) regulador de transcrito prematuro (*nonsense*); *Dnase2a*: deoxirribonuclease alfa 2; *Aars*: alanil-tRNA sintetase; *Cth*: cistationina gama liase; *Fdps*: farnesuil difosfato sintetase; *Pygl*: glicogênio fosforilase hepático; *Acat1*: acetil-Coenzima A acetiltransferase 1; *Gars*: glicil-tRNA sintetase; *Gphn*: gefirina; *Acss2*: acil-CoA sintetase cadeia curta família membro 2; *Atic*: 5-aminoimidazole-4-carboxamida ribonucleotideo formiltransferase/IMP ciclohidrolase.

Enquanto que para os demais grupos os genes *Acat1* e *Slc27a2* apresentaram associação com o gene *Gphn* (P, $r_{Gphn \times Acat1} = 0,89^*$, $r_{Gphn \times Slc27a2} = 0,93^*$; L, $r_{Gphn \times Acat1} = 0,59$, $r_{Gphn \times Slc27a2} = 0,65^*$; e C, $r_{Gphn \times Acat1} = 0,74^*$, $r_{Gphn \times Slc27a2} = 0,71^*$, * $p < 0,05$), para o grupo A o mesmo não foi observado. Também foi observada relação entre o gene da *Gphn* e os que codificam o receptor GABA_B no grupo A (*Gabbr1*, $r = 0,93$ e *Gabbr2*, $r = 0,92$, $p < 0,05$).

O grupo A apresentou maior nível de RNAm do gene *Gabbr1* nessa região cerebral comparado aos demais grupos (Tabela 12). Não foram encontradas diferenças significativas para as médias dos níveis de transcritos dos genes *Gabbr2* e *Gphn*.

Análise de componentes principais foi feita via matriz de correlação e para interpretação foram considerados os autovetores (Tabela 13) e as médias dos índices de cada componente por grupo (Tabela 14). A soma das 3 primeiras componentes explicaram 65% da variabilidade total dos 09 genes analisados. Os autovetores com valores próximos a zero não

foram considerados para a análise. Os índices da matriz de rotação cujos *loadings* foram acima de 0,40 estão em negrito e, os que apresentaram *loadings* entre 0,25 e 0,40 estão em vermelho (Tabela 13). Foram excluídos das análises os camundongos que não apresentaram valores moleculares para todos os genes. Conforme o princípio da parcimônia os genes altamente correlacionados (*Acaa2*, *Hadhb*, *Acss3* e *Gabbr2*) ou sem alteração significativa (*Kcnj13*) foram excluídos da análise.

TABELA 13 – MATRIZ DE ROTAÇÃO

Genes	CP1 (30%)	CP2 (20%)	CP3 (15%)
<i>Acat1</i>	0,447	-0,083	0,115
<i>Acs11</i>	-0,227	-0,446	-0,324
<i>Hadh</i>	0,383	-0,167	-0,373
<i>Kcnn3</i>	0,437	-0,086	0,039
<i>Slc27a2</i>	0,429	-0,180	-0,123
<i>Acss2</i>	-0,128	-0,599	0,232
<i>Acsbg2</i>	0,232	0,150	0,726
<i>Gabbr1</i>	-0,140	-0,552	0,370
<i>Gphn</i>	0,369	-0,199	-0,089

Nota: valor representa os escores dos genes para cada componente principal (CP). *Hadh*, hidroxiacil-CoA desidrogenase cadeia curta; *Acat1*, acetil-Coenzima A acetiltransferase 1; *Kcnn3*, canal de condutância intermediária/pequena de potássio ativado por cálcio, subfamília N, membro 3; *Slc27a2*, carreador de soluto família 27, membro 2; *Acs11*, acil-CoA sintetase cadeia longa família membro 1; *Acss2*, acil-CoA sintetase cadeia curta família membro 2; *Acsbg2*, acil-CoA sintetase *bubblegum* família membro 2; *Gabbr1*, receptor GABBR1 do ácido gamma-aminobutírico; e *Gphn*, gefirina.

As componentes são geradas a partir da comparação entre genes cujos índices apresentam sinais opostos. Dessa forma a CP1 gerou um índice comparando os genes *Acat1*, *Hadh*, *Kcnn3*, *Slc27a2*, *Acsbg2* e *Gphn* com *Acs11*, *Acss2* e *Gabbr1*. A segunda componente foi gerada pela comparação entre o gene *Acsbg2* e demais. Na terceira componente foram comparados os genes *Acs11*, *Hadh* e *Slc272* versus *Acss2*, *Acsbg2* e *Gabbr1* (Tabela 13).

As médias dos índices gerados de cada componente conseguiram separar os grupos. Para a primeira componente a média do índice do grupo C foi superior a dos demais grupos, atingindo significância em relação aos grupos L e A. A média do índice da segunda componente do grupo A foi significativamente menor comparado aos demais grupos. A terceira componente possibilitou a separação entre fenótipos com alto ou baixo consumo de etanol, ou seja, grupos C e L versus P e A (Tabela 14).

TABELA 14 – ÍNDICES DAS COMPONENTES DE CADA GRUPO

Componente	Grupos				F (3,27)	p
	C	L	P	A		
CP1	1,82 ^{\$#} e 0,94	-1,15 e 0,23	0,55 e 0,75	-1,16 e 0,52	5,19	0,006
CP2	0,07 e 0,27	0,39 e 0,33	0,55 e 0,40	-1,38* e 0,92	2,96	0,04
CP3	-0,42 e 0,33	-0,34 e 0,09	0,44 e 0,63	0,61 e 0,36	2,03	0,13

Nota: média e erro padrão dos índices das componentes. * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos. # $p < 0,10$ em relação ao grupo P. \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo L e A. ANOVA seguida pelo teste *post-hoc Newman-Keuls*. A, $n = 6$; P, $n = 7$; C, $n = 8$; L, $n = 10$.

6.4. Análise dos níveis de RNAm dos genes *Gabbr1* e *Gabbr2* pela PCR em tempo real

Córtex Pré-Frontal

Nessa área os animais do grupo A apresentaram um aumento nos níveis de RNAm para os genes *Gabbr1* ($F_{(3,24)} = 5,67$, $p < 0,01$) e *Gabbr2* ($F_{(3,24)} = 3,70$, $p < 0,01$) em relação aos demais grupos sendo significativo para o primeiro gene (Gráfico 4). Não houve diferença entre os níveis dos transcritos dos genes *Gabbr1* e *Gabbr2* no mesmo grupo.

Hipocampo

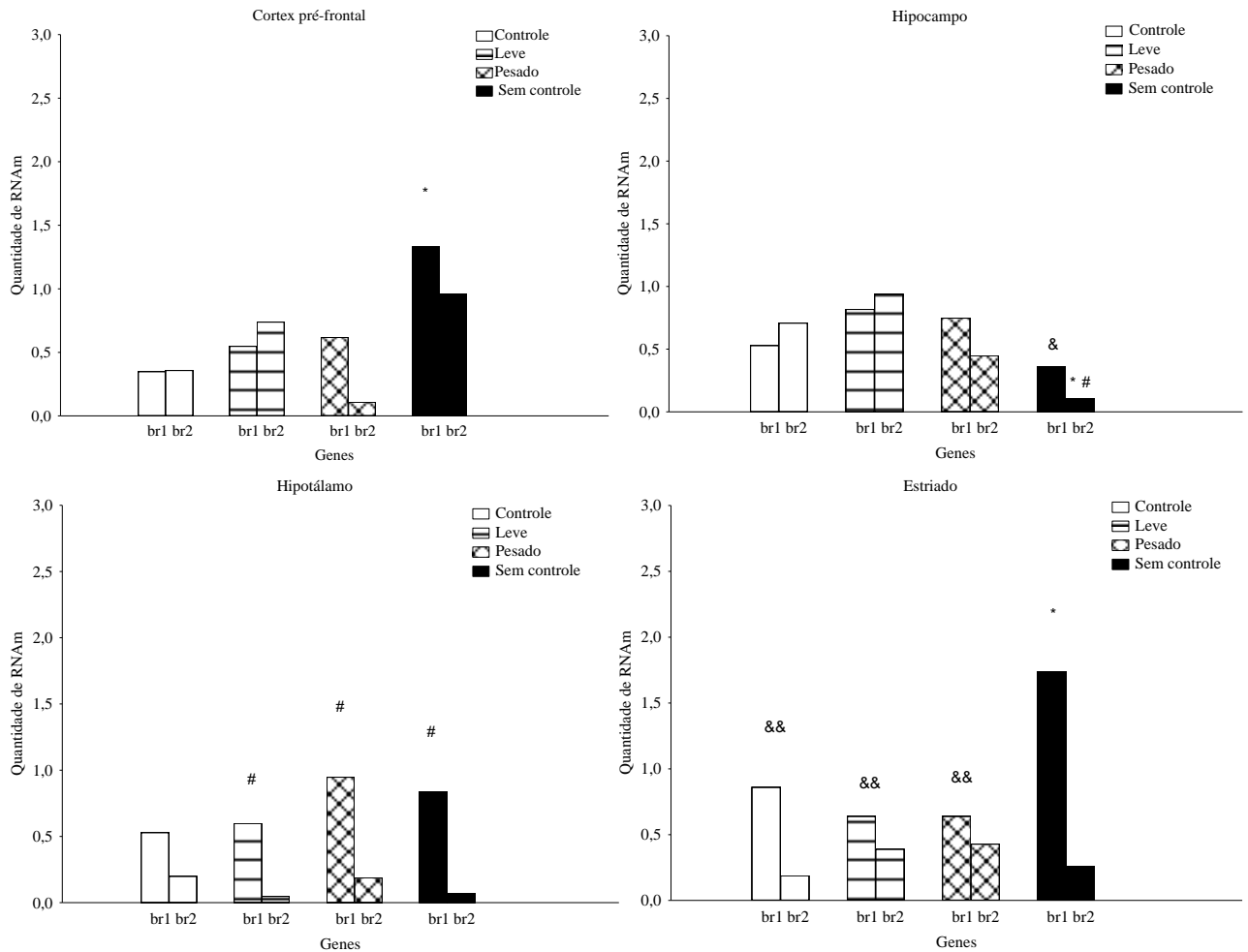
Nessa região, os animais dos grupos A apresentaram uma redução nos níveis de RNAm para o gene *Gabbr2* ($F_{(3,23)} = 3,8755$, $p < 0,05$) quando comparado aos demais grupos. Em relação ao grupo controle, o grupo A apresentou uma redução de 84% nos níveis desse RNAm. Embora não tenha atingido significância, o grupo A também apresentou menor quantidade de RNAm para o gene *Gabbr1* em relação aos demais ($F_{(3,23)} = 3,1596$, $p < 0,05$) e em relação ao grupo C a redução foi de 32%.

Apenas para o grupo A foi encontrada uma diferença significativa entre os níveis de transcritos do *Gabbr1* e *Gabbr2* ($t_A = 2,93$, $p < 0,05$) nessa região.

Hipotálamo

Não foi observada diferença em relação a quantidade relativa normalizada dos RNAm dos genes *Gabbr1* ($F_{(3,26)} = 0,6988$, $p > 0,05$) e *Gabbr2* ($F_{(3,23)} = 1,1846$, $p > 0,05$) entre os grupos. Todos os grupos apresentaram o mesmo perfil transcricional sendo mais expresso o *Gabbr1* em relação ao *Gabbr2* atingindo significância para todos os grupos exceto o controle ($t_L = 4,00$, $p < 0,05$; $t_P = 2,12$, $p < 0,05$; $t_A = 2,57$, $p < 0,05$).

GRÁFICO 06 – NÍVEIS DE TRANSCRITOS EM CADA ÁREA CEREBRAL



NOTA: média da quantidade relativa de RNAm normalizada e ep dos genes *Gabbr₁* (br1) e *Gabbr₂* (br2) nos diferentes grupos. Córtex Pré-Frontal (C, n= 8; L, n= 7; P, n= 6; A, n= 7). Hipocampo (C, n= 6; L, n= 8; P, n= 6; A, n= 7). Hipotálamo (C, n= 8; L, n= 8; P, n= 6; A, n= 5). Estriado (C, n= 7; L, n= 8; P, n= 7; A, n= 5). Grupos: Controle (C), Leve (L), Pesado (P) e Sem-controle (A). ANOVA 1 via seguida por *Newman-Keuls*, *p<0,05 em relação aos demais grupos para o mesmo gene; teste-t independente #p<0,05 diferença entre *Gabbr₁* e *Gabbr₂* no mesmo grupo. &p<0,10 em relação aos demais grupos; &&p<0,10 em relação ao gene *Gabbr₂* no mesmo grupo.

Estriado

Foi observado um aumento nos níveis de RNAm do gene *Gabbr₁* no grupo A comparado aos outros grupos ($F_{(3,23)} = 4,3986$, $p < 0,05$), sem diferença nos níveis de RNAm do gene *Gabbr₂* ($F_{(3,23)} = 1,0523$, $p > 0,05$). Foi observada a mesma relação entre os níveis de transcritos dos *Gabbr₁* e *Gabbr₂* em todos os grupos, no entanto, apenas para o grupo A foi significativo ($t_A = 4,00$, $p < 0,05$).

7. Discussão

Foi possível observar diferenças moleculares entre camundongos classificados comportamentalmente a despeito do seu padrão individual de consumo de etanol e água. Ou seja, os camundongos que exibiam alta preferência por etanol e consumo persistente dessa droga mesmo após adulteração do seu sabor com quinina (i.e., grupo A) apresentaram alterações na quantidade relativa de RNAm para os genes da via GABAérgica (i.e., *Gabbr1* e *Gabbr2*) e do metabolismo energético (i.e., *Acss2*) em áreas cerebrais importantes para a manutenção do comportamento de ingestão da droga (*drug-taking*). Por outro lado, não foi observada alteração na quantidade de RNAm desses genes para os camundongos que mostraram alta preferência e consumo elevado de etanol, ao menos durante grande parte do tratamento, e posteriormente reduziram significativamente o consumo do mesmo após a adulteração do seu sabor (grupo P). Ausência de alterações transcricionais também foi evidenciada para os camundongos com consumo baixo de etanol, porém sem preferência significativa pelo mesmo (grupo L), sugerindo que os mecanismos de neuroplasticidade biológica, responsáveis pela manifestação desses fenótipos, podem ser distintos.

Através do uso de uma linhagem não isogênica de camundongos foi possível estudar os genes considerando as relações inter –gênicas ou –alélicas presentes no organismo (p.e., epistasia ou efeito aditivo), embora de uma forma limitada. Quando o efeito da variabilidade genética individual sobre a manifestação da doença é considerado, a probabilidade de identificar genes aumenta, especialmente quando a identificação é baseada apenas nas características fenotípicas (Guénet e Bonhomme, 2003).

Apesar das limitações inerentes às análises em um modelo animal em função da dificuldade de se estabelecer critérios para identificar os sintomas, o presente modelo serve como uma ferramenta útil, pois viabiliza o “desenvolvimento natural” do consumo de etanol (Wolffgramm e Heyne, 1995), permitindo que sejam produzidos critérios estáveis de classificação baseado na análise individual do consumo de etanol e água, conferindo reprodutibilidade aos resultados comportamentais (Ribeiro et al., 2008; Correia et al., 2009; Fachin-Scheit et al., 2006). Adicionalmente, permite distinguir três padrões de consumo de etanol (i.e., grupos sem controle, pesado ou leve) possibilitando a identificação de adaptações neuronais relacionadas com os aspectos motivacionais do consumo voluntário de etanol nos camundongos com “perda do controle” (grupo A) sobre a ingestão do etanol. Tais adaptações promovem um novo estado de equilíbrio no organismo (Koob e Le Moal, 1997). Contudo, a evolução dessas adaptações como consequência aos efeitos da droga e suas inter-relações com outros sistemas neurais ainda são pouco compreendidos.

Wolffgramm e Heyne (1995) sugerem que a exposição do animal às fases aversivas (i.e., abstinência e adulteração) permite avaliar a ingestão voluntária após e sob condições desagradáveis. Ao contrário das observações em estudos com ratos (Spanagel e Hölter, 1999; Wolffgramm e Heyne, 1995) nossos camundongos com consumo persistente (grupo A) não exibiram aumento da ingestão dessa droga após a abstinência (efeito de privação de etanol). Além disso, esse grupo não mostrou preferência entre as duas soluções etílicas, embora quando avaliado individualmente, alguns camundongos preferiram entre uma ou outra solução durante todas as fases. Talvez características da linhagem utilizada no presente estudo influenciaram na manifestação desses comportamentos. Não obstante, a preferência e os altos níveis de etanol ingerido não variaram entre as fases, indicando uma neuroadaptação persistente relacionada a esses parâmetros comportamentais nos animais com prejuízo no controle em resposta ao consumo de etanol (grupo A). Ainda, o modelo admite a progressão “natural” do consumo de etanol (do primeiro contato à cronicidade) mesmo sob efeito do sabor amargo, a exemplo do comportamento aditivo em humanos.

Os animais classificados como consumidores pesados (P) exibiram alto consumo de etanol e preferência pela mesma, durante a fase de aquisição com posterior redução do consumo de etanol e preferência na fase de adulteração, sugerindo que as adaptações adquiridas durante as fases anteriores não induziram a “perda do controle” sobre o consumo de etanol.

Vale ressaltar que a diferença entre os grupos A e P é a “perda do controle” durante a adulteração das soluções de etanol por quinina. Em nosso modelo, as concentrações sanguíneas de etanol não foram determinadas, mas a quantidade ingerida pelos camundongos A alcançaram valores de 9,5 e 0,8 g/kg/dia (média e erro padrão) e 11,4 e 0,9, enquanto que os camundongos L exibiram 4,3 e 0,7g/kg/dia e 5,5 e 0,9, na fase AQUI e na fase AD, respectivamente. Keilig e Koob (2007) mencionaram que roedores de laboratório não consomem voluntariamente etanol até a intoxicação, mesmo mascarando o sabor da solução etílica com edulcorante. Além disso, ratos que não foram selecionados para alta preferência de etanol raramente consomem mais do que 2g/kg/dia e as concentrações sanguíneas dessa droga, necessárias para manifestação da dependência, raramente são alcançadas. Assim, mesmo considerando as diferenças na razão do metabolismo entre ratos, humanos e camundongos, os níveis consumidos observados nos camundongos A são indubitavelmente elevados no presente modelo.

Para os camundongos classificados como L, não foram observadas mudanças na ingestão de etanol durante as fases experimentais. Esses camundongos exibiram alta preferência pela água e baixo consumo de etanol. De fato, mesmo sob situações estressantes

(p.e., isolamento e exposição ao etanol), esses animais não desenvolveram preferência pelo etanol, em contraste com o grupo P. Assim, fatores comportamentais e biológicos podem prevenir ou facilitar a manifestação desses comportamentos, ou seja, levar a evitação ou ao consumo da droga.

7.1. Possível relação entre ansiedade e abstinência ao etanol

Baseado nos dados do presente trabalho foi possível avaliar a relação entre os comportamentos medidos no labirinto em cruz elevado (LCE), bem como, a relação desses com os fenótipos consumidores de etanol (i.e., grupos A, P e L). A primeira componente separou significativamente o grupo P dos demais, indicando que nesses camundongos houve maior atividade locomotora (e exploratória) e menor efeito ansiogênico durante a abstinência do etanol. Interessantemente, o grupo A, que apresentou consumo equivalente de etanol na fase anterior à abstinência (fase de aquisição, AQU), não teve o mesmo comportamento do que o grupo P. Isso sugere que os processos responsáveis pelas respostas comportamentais durante a abstinência, possam ser diferentes nesses dois grupos. Em outras palavras, as respostas frente à retirada da droga, seriam distintas entre os camundongos com consumo pesado (grupo P) e os com consumo persistente (grupo A). Por outro lado, não foi possível identificar um marcador comportamental que discriminasse significativamente os diferentes fenótipos estudados no presente trabalho.

Considerando a primeira componente (CP1), o grupo P manifestou maiores índices para os comportamentos exploratórios (EBA, EBF, TPBA e HD) e menores para os comportamentos de ansiedade e conflito (TPBF, LAT e SAPF) no LCE, permanecendo assim, mais tempo no braço aberto do labirinto, que é reconhecido como o local aversivo desse instrumento. Para nossos animais, as medidas de locomoção caracterizadas pelo número de entradas no braço fechado (EBF) e aberto (EBA) do LCE foram agrupadas ao tempo de permanência no braço aberto (TPBA) indicando que talvez as primeiras não reflitam puramente a atividade locomotora. Wall e Messier (2001) mencionam que no LCE nem o total de entradas nem o número de entradas no braço fechado podem ser consideradas medidas puras de locomoção. Embora no estudo do Rodgers e Johnson (1995) o número de espreitas no braço aberto (HD) tenha sido agrupado em um único fator que refletia a atividade exploratória, em nosso trabalho essa medida ficou associada a outras, como o TPBA (que indica menor ansiedade), revelando que talvez o HD também não seja uma medida pura de locomoção nos camundongos expostos a esse modelo. Nesse mesmo trabalho, o autor comenta que nesse fator também foi agrupado o SAP (*stretched attend posture*) que é uma

medida relacionada aos processos de esquivar/conflito, contudo ele despreza uma possível relação entre elas, uma vez que o SAP apresentava menor escore ou *loading*.

Em outro sentido, foram agrupadas as medidas do tempo inicial que o animal gasta para sair do centro do aparelho (LAT), porcentagem do tempo de permanência no braço fechado (TPBF) e SAP, sugerindo que os comportamentos de tomada de decisão, ansiedade e conflito, respectivamente, possam ter alguma relação nesses animais. Nos camundongos do grupo P houve menor expressão desses comportamentos, o que também revela um menor nível de ansiedade. Apesar dos camundongos P ingerirem quantidades elevadas de etanol nas últimas duas semanas da fase AQUI, pareceram não estar sob influência do efeito ansiogênico do etanol (ou seja, exibiram menor nível de ansiedade durante a abstinência). Os ratos AA, que preferem etanol, quando comparados aos ratos ANA, que não preferem etanol, também exibiram um comportamento similar aos nossos camundongos P, permanecendo mais tempo no braço aberto do LCE e maior número de entradas (Möller et al., 1997). Contudo, nesse trabalho, os ratos ANA é que apresentaram níveis aumentados de ansiedade, quando comparados com um terceiro grupo de ratos *Wistar* heterogêneos, indicando co-segregação de características herdáveis que interferiram tanto na preferência quanto na ansiedade dos ratos ANA. Isso não anula o fato de que os ratos AA exibem preferência pelo etanol, mesmo apresentando níveis normais de ansiedade. Por outro lado, nossos dados mostraram que os camundongos P foram mais exploradores e desinibidos na ausência do etanol ao contrário dos demais grupos. Considerando também que nesse grupo, houve uma redução significativa do consumo de etanol após a abstinência, talvez, os processos motivacionais que levem os animais P a consumirem etanol sejam relacionados a aspectos distintos dos animais A.

Seria de se esperar que os animais do grupo A exibissem o mesmo perfil do grupo P uma vez que o consumo de etanol foi similar entre eles na fase AQUI, contudo manifestaram mais comportamentos de conflito e ansiedade (ou seja, exibiram maior nível de ansiedade) durante a abstinência do etanol e, o mesmo foi identificado para os grupos controle (C) e leve (L). Mesmo reconhecendo que o índice da primeira componente para o grupo A foi mais próxima à dos grupos C (que não teve acesso ao etanol) e L (que tinha preferência pela água e baixo consumo de etanol na fase AQUI), não se pode perder de vista que esses grupos tinham perfis bastante diferentes. Além disso, os camundongos do grupo A apresentaram maior variabilidade em suas respostas, uma vez que a média do seu índice para a PC1 ficou próxima a zero. Dessa forma, é difícil dizer que os animais do grupo A exibiram o mesmo padrão comportamental do que os grupos C e L. A variabilidade nos camundongos A, ainda deixa dúvidas quanto à similaridade dos processos motivacionais associados aos comportamentos medidos durante a abstinência, nesses três grupos. A resposta

comportamental é reflexo do estado emocional do indivíduo e, esse é influenciado pelos estímulos interoceptivos e proprioceptivos somados aos exteroceptivos. Sendo assim, é evidente que os estímulos não foram iguais entre os grupos A, C e L. Nossos resultados moleculares corroboram uma possível alteração envolvendo o receptor GABAB nas regiões cerebrais dos núcleos da amígdala, córtex pré-frontal, hipocampo e estriado, apenas nos camundongos com “perda do controle” sobre o consumo de etanol (i.e., grupo A). As áreas cerebrais que envolvem a amígdala, hipotálamo, hipocampo, núcleo accumbens e algumas regiões pré-frontais, são muito importantes para as funções relacionadas ao desenvolvimento da adição às drogas, além de estresse, medo e ansiedade (para revisão veja Everitt e Robbins, 2005; Shin e Liberzon, 2010). Além disso, drogas ansiolíticas e o etanol interferem com a transmissão GABAérgica e influenciam na expressão de várias medidas coletadas no LCE (Kaesermann, 1986; Albrechet-Souza et al., 2007).

Correia e colaboradores (2009) não encontraram relação entre altos níveis de ansiedade basal e consumo persistente de etanol, após selecionar animais através da porcentagem de tempo de permanência no braço aberto do LCE e expô-los ao modelo de livre escolha. Em geral, devido à heterogeneidade clínica das doenças multifatoriais (i.e., transtornos psiquiátricos) torna-se difícil estabelecer critérios para seleção baseando-se apenas em uma medida comportamental. Talvez, uma alternativa para se averiguar a influencia da ansiedade-traço (*trace-anxiety*) sobre o desencadeamento do comportamento de consumo de etanol, seria utilizar a medida de vários comportamentos associados a vários aspectos do comportamento aditivo, como por exemplo, tomada de decisão, ansiedade e conflito. As medidas de conflito e tomada de decisão coletadas no LCE parecem ser promissoras para o aprofundamento do conhecimento acerca dos mecanismos motivacionais relacionados ao consumo persistente do etanol. Os comportamentos, como o SAP e F-SAP (*foward stretched attend posture*) são consideradas medidas úteis para o entendimento dos processos relacionados ao aprendizado, memória, motivação e punição (Van der Poel *apud* Kaesermann, 1986). Rodgers e colaboradores (1999) encontraram uma correlação positiva entre os níveis plasmáticos de corticosterona e a medida SAP no LCE em ratos e camundongos. Além disso, foi encontrada uma redução nessa medida após administração de um inibidor da síntese de corticosterona (Albrechet-Souza et al., 2007). Embora sejam controversos os efeitos da corticosterona sobre o consumo de etanol, o eixo HPA (hipotálamo-hipófise-adrenal) participa na modulação neuroendócrina de nossas emoções e, conseqüentemente, tem o potencial de influenciar nas respostas comportamentais envolvidas com o consumo de etanol (Funk et al., 2007; Buck et al., 2011).

Durante a abstinência ao etanol, pode ser visualizado depressão ou aumento na ambulação, sendo que a redução na atividade locomotora pode ser confundida com algum efeito ansiogênico (para revisão veja Kliethermes, 2005). No presente trabalho, não foi encontrada diferença significativa na locomoção horizontal entre os grupos (i.e., A, P, L e C) mesmo considerando todos os aparelhos utilizados. Isso indica que as diferenças comportamentais observadas entre os grupos estejam mais próximas de uma possível alteração no estado de ansiedade *per se*. Assim, baseado em nossos resultados foi possível observar diferenças comportamentais em resposta a retirada do etanol, entre camundongos não isogênicos, expostos a uma modelo animal por livre escolha. Além disso, foi demonstrado que as respostas comportamentais dos grupos A e P foram diferentes (mesmo ambos apresentando consumo crônico e elevado de etanol na fase AQUI), indicando que talvez, as alterações biológicas decorrentes do uso crônico do etanol envolvam neuroadaptações distintas entre o fenótipo A (cujo consumo foi persistente após a fase de abstinência) e o fenótipo P (cujo consumo reduziu significativamente após a fase de abstinência). O que não surpreenderia, tendo em vista as alterações moleculares encontradas apenas nos camundongos do grupo A. Todavia, são imprescindíveis mais estudos para esclarecer as inter-relações dos diferentes comportamentos medidos durante a abstinência e, o potencial preditivo dos mesmos sobre o desenvolvimento da “perda do controle” sobre o consumo de etanol.

7.2. Metabolismo energético cerebral: uma via promissora para o estudo do alcoolismo?

Apesar do reduzido conjunto amostral foi possível validar 54% dos genes selecionados a partir dos resultados da plataforma de microarranjo e, considerando as comparações cujos resultados mostraram tendência ($p < 0,10$), esse valor aumenta para 73% o número de genes identificados com possível papel para ao menos um dos fenótipos consumidores de etanol.

Vale lembrar que o modelo utilizado no presente estudo, onde camundongos são expostos a um paradigma de livre escolha entre três soluções (água, etanol 5% e 10%), a classificação dos fenótipos consumidores de etanol (A, P e L) é feita estritamente pela análise do consumo individual de etanol e água. Outrossim, apenas os camundongos do grupo A continuam a ingerir etanol sem redução significativa, a despeito do sabor amargo (devido a adição de quinina), indicando uma possível “perda de controle” sobre o consumo dessa droga, o aproximando ao comportamento adicto em humanos. Os camundongos do grupo P, apesar da preferência pelo etanol, reduzem seu consumo após adulteração do sabor das soluções etílicas, indicando à existência de alguma adaptabilidade que confere resistência a manutenção do consumo em condições desagradáveis (i.e., sabor adulterado). Já os

camundongos do grupo L exibem preferência pela água e baixo consumo de etanol durante todo o tratamento, indicando a ocorrência natural de fatores (biológicos) preventivos contra o desenvolvimento do comportamento de alta preferência e consumo elevado de etanol.

Juntamente com outras estruturas cerebrais, a região dos núcleos da amígdala tem participação na contextualização dos estímulos e agrega circuitos como o GLUamatérgico, GABAérgico e DOPAminérgico. Essa região está envolvida com os mecanismos de escolha e reforço condicionado, cujos processos revelam importância para o desenvolvimento do comportamento de consumo da droga (para revisão veja Everitt e Robbins, 2005).

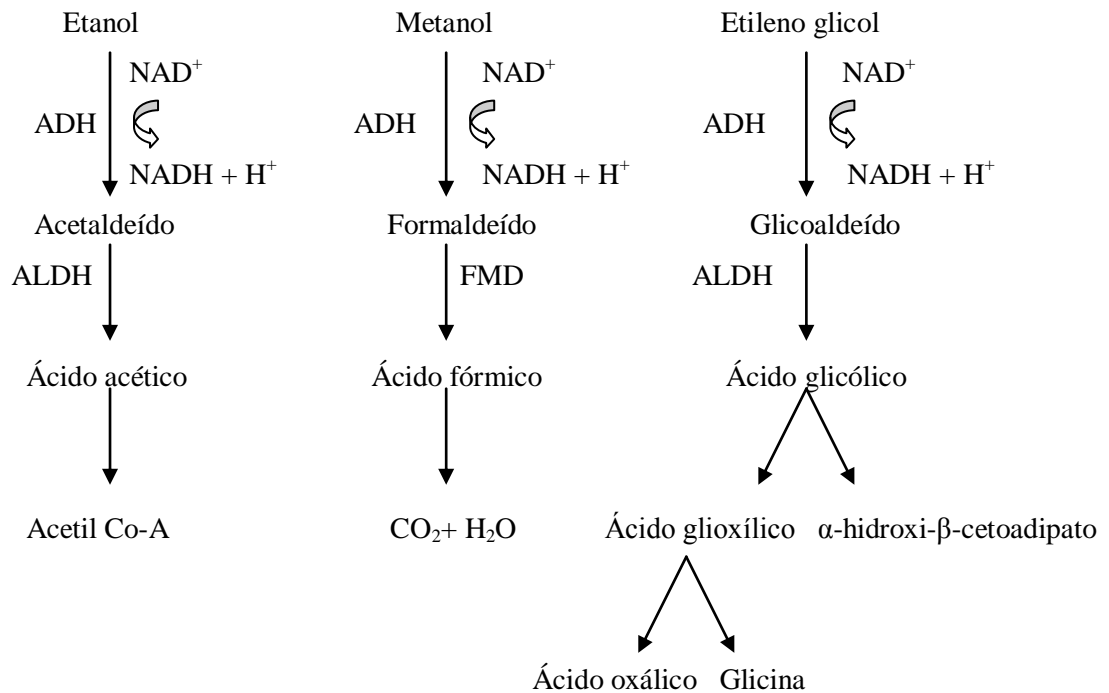
Interessantemente, análises dos níveis de RNAm na região dos núcleos da amígdala cerebral apresentaram uma relação inversamente significativa entre o gene *Hadh* e, outros genes relacionados ao metabolismo cerebral apenas nos camundongos do grupo A. Esse efeito não foi observado para um gene da família kir (i.e., relacionado à condutância ao potássio) e uma enzima que cataliza uma reação etapa limitante na síntese de ácido graxo, respectivamente, *Kcnj13* e *Acs11*. Adicionalmente, o índice de correlação entre *Hadh* e *Acs11* foi significativo apenas para o grupo A.

Outro achado foi que ambos os genes codificadores das enzimas acil-CoA sintetase cadeia curta membro 2 e 3, *Acss2* e *Acss3*, respectivamente, apresentaram maiores níveis de transcritos nos camundongos do grupo A quando comparado aos demais grupos, sendo significativo para o primeiro gene. Além disso, análise de componentes principais indicou que o gene *Acss2* tem estreita relação com os genes da *Gabbr1*, *Gphn* e *Acs11*, nesse grupo. Tais resultados sugerem que talvez alterações na via de conversão do acetato a acetil-CoA (representadas por sintetases de cadeia curta e longa, relacionadas à geração de energia e processos oxidativos na célula) aliadas às alterações da via GABAérgica (i.e., receptor GABA_B), apresente maior impacto no desenvolvimento de um novo equilíbrio (i.e. plasticidade) associado ao consumo persistente de etanol observado nos animais A.

No sistema nervoso central, há um equilíbrio dinâmico entre as moléculas que servem de substrato para a geração de energia. Embora, a glucose seja a principal fonte de energia no cérebro, é conhecido que a ingestão crônica de etanol, diferentemente de outros álcoois, gera uma fonte alternativa de substrato mais utilizado do que a glicose, i.e., o acetato (Figura 09). O acetato é metabolizado em acetil-CoA cujo papel revela importância na homeostasia bioenergética do organismo. Além disso, muitas proteínas e enzimas, que agem na fosforilação oxidativa e transporte de elétrons, mostram funções regulatórias que interferem na transdução de sinais e neuroplasticidade (p.e., resposta aos estímulos a glicocorticóide, atividade da proteína quinase, sinalização mediada por hormônio, regulação da condutância ao potássio, interação com o fator neurotrófico derivado do cérebro – BDNF).

Isso significa que as moléculas envolvidas nessa via de geração de energia são essenciais para manter o equilíbrio da célula, neurotransmissão e, conseqüentemente, o equilíbrio dos processos cognitivos mentais.

FIGURA 09 – VIAS METABÓLICAS DOS ÁLCOOIS



Nota: FMD, formaldeído dehidrogenase. ALDH, aldeído dehidrogenase. NAD, nicotinamida aldeído dehidrogenase. Adaptado de Kraut e Kurtz (2008).

Alguns dos genes que participam dos processos de geração de energia, encontrados no presente estudo (p.e., *Acss2* e *Acss3*), também participam da via de degradação do etanol no organismo. Há prevalência do catabolismo oxidativo após uso agudo de etanol, no entanto, com o uso continuado as vias não oxidativas passam a ter marcada influência sobre a eliminação do mesmo. Isso significa que o abuso do etanol levaria ao acometimento de ambos os sistemas enzimáticos de degradação, e por fim, não seria possível separar com clareza quais enzimas teriam papel restrito em uma ou outra via do metabolismo do etanol. Além disso, existem isoenzimas com propriedades cinéticas distintas o que pode conferir grande variabilidade em termos de metabolização do etanol e que, não estão associadas ao alcoolismo *per se*. Em nosso estudo, considerando a média de consumo de etanol em todas as fases experimentais, não seria possível distinguir entre os camundongos dos grupos A e P, tendo em vista que ambos os grupos apresentam consumo elevado de etanol. Isso produz evidência de que o alto consumo não consegue por si só, servir como critério de identificação de indivíduos com predisposição ao alcoolismo (a exemplo do que

ocorre em humanos). Sendo assim, fica claro que os distúrbios nos níveis de RNAm observados nos genes na região dos núcleos da amígdala dos animais do grupo A, estão mais próximos de serem consequência de irregularidades no metabolismo energético (que contribui para alguma neuroadaptação persistente) do que no metabolismo do etanol.

Os alelos *Aldh* [i.e., *Aldh2*(1) e (3), acetaldeído dehidrogenase] que codificam enzimas com alta afinidade pelo NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleotídeo) conferem maior tolerância ao etanol, no entanto, é controversa a razão de metabolização do etanol entre as linhagens de animais com alta preferência ao etanol, que portam esses alelos (i.e., inconsistências entre os níveis de acetaldeído ou NAD⁺). O metabolismo do etanol depende dos níveis de NADH e sutis alterações no metabolismo energético (p.e., disponibilidade de cofatores, presença de metabólitos em excesso, equilíbrio osmótico etc) ocasionariam distúrbios na razão NADH/NAD⁺. Talvez, a divergência na relação da razão do metabolismo do etanol aconteça devido à existência de algum mecanismo associado aos processos de fosforilação oxidativa.

Curiosamente, as proteínas codificadas pelos genes *Hadh*, *Hadhb*, *Acat1*, *Acaa2*, *Acss2* e *Acss3*, são expressas na mitocôndria indicando sua relevância para o equilíbrio emocional do indivíduo. Embora o carreador *SLC27A2* não seja expresso na mitocôndria, ele contribui para o transporte de determinados ácidos graxos e tem o potencial de interagir fisicamente com a enzima *ACAT1* (Mering et al., 2002).

Alterações no metabolismo mitocondrial cerebral em decorrência da presença de alguns metabólitos de ácidos graxos podem estar relacionadas com processos neuropatológicos (Tonin et al., 2010; para revisão veja Cheng et al., 2010). Tonin e colaboradores (2010) demonstraram que a presença de certos tipos de metabólitos de ácidos graxos pode prejudicar o conteúdo de NAD⁺ sugerindo a existência de um efeito desacoplador da fosforilação oxidativa. Cronicamente, o metabolismo do etanol leva a produção de etil ésteres de ácido graxo cuja toxicidade, dentre outras causas, pode ser devido ao efeito desacoplador sobre os processos oxidativos mitocondriais (Laposata, 1998).

O canal SK3, codificado pelo gene *Kcnn3*, é expresso em neurônios e microglia, e parece interferir com a neurotransmissão serotoninérgica e DOPAMinérgica modulando as respostas emocionais a depender do contexto (Jacobsen et al., 2008). Ele apresenta em sua região promotora um sítio para ligação ao fator de transcrição NFAT (*Nuclear Factor of Activated T-cells* ou Fator Nuclear de Células T Ativadas), cuja função é facilitada pelo fluxo de cálcio mitocondrial (Kim e Usachev, 2009). Além disso, a ativação dos canais SK pode sofrer influência de moduladores dos processos fosforilativos oxidativos mitocondriais (Fay et

al., 2006) e sua atividade parece ser modulada pelo etanol e pelo conteúdo proteolípídico presente na célula (para revisão veja Mulholland et al. 2009).

A *Drosophila melanogaster*, utilizada como modelo para o estudo do alcoolismo, tem mostrado interessantes resultados, talvez por ser uma espécie que exiba o comportamento natural de se alimentar de frutas fermentadas. Análises por microarranjo da mosca da fruta (*fruit flies*) expostas ao etanol evidenciaram que genes relacionados com transporte lipídico e metabolismo de ácidos graxo estavam alterados (Morozova et al., 2006). Outra análise utilizando ratos adolescentes *Wistar* revelou alterações em genes relacionados ao metabolismo e/ou transporte de ácidos graxos no cérebro após o uso crônico de etanol (Hargreaves et al., 2009). Uma meta-análise encontrou alguns genes candidatos associados com consumo de etanol no cromossomo nove de camundongos, entre eles *Acad11* (acil-Coenzima A família dehidrogenase membro 11) e *Ascbg1* (acil-CoA sintetase família *bubblegum* membro 1), (Mulligan et al., 2006).

No presente estudo também foi identificado um aumento significativo na transcrição do gene *Gabbr1* na região dos núcleos da amígdala apenas nos camundongos do grupo A. Juntas, as alterações encontradas no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado, promovem substanciais evidências da participação dos genes codificadores do receptor GABA_B na manutenção da “perda do controle” sobre o consumo de etanol.

Não podemos afirmar que as alterações, em nível de transcrição gênica, encontradas nos camundongos A em nosso estudo, eram prévias à exposição ao etanol ou interferem com a quantidade de proteína expressa na célula. Porém, tal perturbação indica que a homeostasia do metabolismo energético e a transmissão GABAérgica no cérebro, são importantes para a neuroplasticidade associada ao comportamento de adição ao etanol. Ainda, a existência da possibilidade de comunicação entre as vias GABAérgica e de produção de energia na célula, talvez via interação entre *Gabbr1* (ou *Gphn*) e *Acss2*, e sua relação com o consumo de etanol, merece maiores estudos.

Baseado em nossos resultados, podemos considerar o alcoolismo de uma forma até então não realizada. Ou seja, o metabolismo bioenergético cerebral pode estar contribuindo para o estabelecimento de uma neuroadaptação importante para a alta preferência e perda do controle sobre consumo do etanol. Talvez, o equilíbrio bioenergético no sistema nervoso central esteja mais próximo da manutenção de nosso estado emocional do que imaginávamos. Apesar dos processos metabólicos no sistema nervoso central revelarem nova importância para o estudo do alcoolismo, mais estudos precisam ser feitos para o esclarecimento dos mecanismos subjacentes que estejam influenciando a manifestação desse comportamento.

7.3. Possível relação entre os genes *Gabbr1* e *Gabbr2* e consumo de etanol

Nossos resultados demonstraram que o perfil transcricional dos genes do receptor GABA_B foram diferentes, a depender da área cerebral analisada. Cada área tem um papel diferente quanto às funções relacionadas ao comportamento aditivo (para revisão veja Kalivas e Volkow, 2005; Everitt e Robbins, 2005), com diferentes perfis de transcrição e de proteína. Baseado nisso, a sensibilidade química tende a ser distinta entre as diferentes áreas cerebrais. Considerando o que foi exposto acima juntamente com nossos resultados, o córtex pré-frontal e estriado poderiam ser considerados menos sensíveis se comparado às outras regiões estudadas. Contudo, não pode ser excluída a possibilidade de que mais tardiamente os níveis dos transcritos dos genes *Gabbr1* e *Gabbr2* diminuíssem nessas áreas, em resposta ao estímulo contínuo, similar ao encontrado no hipocampo. A área hipocampal se mostrou relativamente mais sensível aos efeitos do etanol (i.e., baixos níveis de transcrição), possivelmente devido à neurogênese e citoarquitetura peculiar a essa região.

As discrepâncias entre os níveis de RNAm dos genes *Gabbr1* e *Gabbr2* nas regiões do hipotálamo e estriado e a linearidade entre as quantidades desses dois transcritos observadas no córtex pré-frontal e hipocampo, são consistentes com outras observações em ratos e humanos (Jones et al., 1998; Clark et al., 2000; Berthele et al., 2001; Martin et al., 2004). Entretanto, nossos resultados demonstram uma diferença mais pronunciada entre as quantidades de RNAm dos genes *Gabbr1* e *Gabbr2* no hipocampo e estriado, o que pode refletir uma possível alteração na homeostasia transcricional (i.e., desequilíbrio) desses genes no grupo A.

Na região do córtex pré-frontal, apenas no grupo A, foi observado um aumento nas quantidades relativas dos RNAm sendo significativo para o *Gabbr1*. Uma análise do cérebro de humanos alcoolistas revelou um aumento nos níveis de transcritos do GABBR1 comparado com indivíduos controle (Flatscher-Bader et al., 2005). O córtex pré-frontal está envolvido com a tomada de decisão (Bush et al., 2002) e tem importante papel na transição das ações voluntárias para a compulsão da adição às drogas (para revisão veja Everitt e Robbins, 2005). Além disso, o córtex pré-frontal está associado com a resposta à previsibilidade do estímulo recompensador (Berns et al., 2001). Portanto, essa área cerebral parece estar substancialmente envolvida nos comportamentos de procura (*drug-seeking*) e tomada da droga (*drug-taking*) e, um aumento nos transcritos do receptor GABA_B no córtex pré-frontal pode contribuir para a “perda do controle” sobre o consumo de etanol observado no grupo A.

O hipocampo está associado com a contextualização de estímulos relacionados à procura da droga (para revisão veja Everitt e Robbins, 2005). Vias aferentes GLUamatérgicas do hipocampo para o núcleo accumbens modulam o aumento de liberação de dopamina e,

portanto podem influenciar nas respostas que são mediadas pelas estruturas límbicas (Floresço et al., 2001). Ao contrário das observações do córtex pré-frontal no presente estudo, houve uma redução nos níveis de transcritos do *Gabbr1* e *Gabbr2* na região do hipocampo, alcançando significância para o último gene no grupo A. Em um estudo que utilizou ratos após um tratamento crônico de etanol foi observada redução na liberação de GABA, um efeito possivelmente modulado por receptores pré-sinápticos GABA_B no hipocampo (Peris et al., 1997). Outros estudos demonstraram que o etanol facilita a função dos receptores pré-sinápticos GABA_B na área CA1 no hipocampo (Frye e Fincher, 1996; Wan et al., 1996; Ariwodola e Weiner, 2004). Contudo, em um estudo usando ratos expostos a tratamento crônico com cocaína, foi encontrada dessensibilização do receptor GABA_B após três semanas sem a droga. Ainda, houve um aumento no tono GABAérgico sugerindo uma possível perda da atividade do receptor GABA_B pré-sináptico (Xi et al., 2003). Embora não esteja claro o papel dos receptores GABA_B no comportamento aditivo, a alterada atividade desse receptor pode interferir com os circuitos GLUTamatérgicos e DOPaminérgicos nessa região cerebral, o que por sua vez, pode contribuir para a manutenção do comportamento de consumo da droga observado nos camundongos que exibiram a “perda de controle” em resposta ao consumo de etanol.

No estriado, o grupo A apresentou maior quantidade relativa de transcrito apenas para o gene *Gabbr1* comparado aos outros grupos. Estudos anteriores demonstraram que um aumento de dopamina no estriado em humanos está associado com os efeitos reforçadores de estimulantes (para revisão veja Kalivas e Bolkow, 2005), sugerindo que essa alteração pode estar mais relacionada à motivação de obter a droga do que com o prazer em resposta à droga. Camundongos sem o *Gabbr1* funcional (*knockout*) apresentam aumento nos níveis de dopamina extracelular no estriado e, a liberação desse neurotransmissor foi menor em camundongos *knockout* do que em normais (i.e., da mesma linhagem, porém sem alteração funcional no gene) após a administração de D-anfetamina (Vacher et al., 2006). Esses resultados sugerem que o tônus GABAérgico, via receptores GABA_B, é essencial para manter a homeostasia dos circuitos DOPaminérgicos envolvidos no comportamento de consumo da droga.

Apesar da região do hipotálamo ter considerável concentração de transcritos para os genes *Gabbr1* e *Gabbr2*, não foram observadas diferenças entre os grupos. Essa região cerebral regula o comportamento relacionado ao consumo e tem projeções para as estruturas límbicas.

Embora a via GABAérgica influencie o metabolismo de glicose, não foram encontradas diferenças nos níveis de RNAm do gliceraldeído 3-fosfato-dehidrogenase (gene

de referência) em qualquer área analisada, o que está de acordo com o relatado por Eravci e colaboradores (1999). Todavia, outros estudos encontraram alterada expressão de genes relacionados ao metabolismo de glicose no hipocampo de humanos alcoolistas (Matsuda-Matsumoto et al., 2007) e alterada transcrição em hipocampo de animais após consumo crônico de etanol (Hargreaves et al., 2009). Assim, mais estudos são necessários para esclarecer a comunicação entre esses sistemas e sua relação com a adição ao etanol.

Interessantemente, os camundongos do grupo L não demonstraram alterações nos níveis de RNAm dos genes *Gabbr1* e *Gabbr2* e, seu perfil transcricional foi similar ao do grupo C. Sendo assim, esse fenótipo, pode produzir informação útil para o estudo de genes protetores nos ajudando a entender os mecanismos neurobiológicos subliminares a prevenção da adição ao etanol.

Vale ressaltar que é difícil estabelecer uma direta associação entre o que é transcrito e o que é expresso no organismo. Isso significa que um simples aumento ou redução de um dado RNAm pode não representar o efeito direto de um gene sobre a manifestação do fenótipo. Estímulos contínuos que alteram os níveis de transcritos ou a direção do sentido de transcrição de uma isoforma específica (i.e., *alternative splicing* ou combinação alternativa de exons) podem influenciar os mecanismos regulatórios da expressão do gene (p.e., através de RNA não codificador que altera o *alternative splicing*) e conseqüentemente interferem com a plasticidade sináptica (Huang et al., 2005; Li et al., 2007). Entender esses mecanismos modulatórios ajudará a melhorar a compreensão do controle neural da adição.

Baseado nos achados desse trabalho podemos concluir que os genes *Gabbr1* e *Gabbr2* têm participação na manifestação do comportamento de consumo persistente de etanol. Os níveis dos transcritos desses genes estavam alterados em áreas cerebrais cruciais para o comportamento de tomada da droga apenas nos camundongos classificados com consumo persistente. Ainda assim, estudos adicionais são necessários para esclarecer os mecanismos regulatórios que podem interferir com a transcrição desses genes e conseqüentemente na conservação do fenótipo A.

8. Conclusões

1. Foi possível classificar comportamentalmente os camundongos expostos ao modelo de livre escolha, considerando apenas o consumo das soluções de água etílicas (5% e 10% v/v), em três grupos: sem controle (A), pesado (P) e leve (L).

2. Baseado nos comportamentos coletados durante a fase de abstinência foi possível observar que, os grupos A e P, ambos com consumo crônico e elevado de etanol (ao menos durante a fase de aquisição), exibiram respostas emocionais contrárias. Sugerindo que talvez as vias neurobiológicas associadas à resposta emocional em decorrência da retirada do etanol, possam ser distintas nesses dois fenótipos, ou seja, entre indivíduos com consumo persistente (grupo A) e consumo abusivo (grupo P).

3. Foi possível identificar que genes relacionados ao metabolismo da CoA estavam diferencialmente transcritos, nos camundongos expostos ao modelo de livre escolha, através da análise molecular do transcriptoma pela técnica de microarranjo na região dos núcleos da amígdala cerebral.

4. Embora não tenha sido possível identificar diferenças estatísticas transcricionais entre os grupos (A, P, L e C) utilizando os dados do microarranjo, foi possível selecionar genes candidatos para posterior validação. Desses genes selecionados, seis apresentaram diferentes níveis de RNAm entre os grupos, sugerindo que a via do metabolismo da CoA possa participar dos mecanismos neuroadaptativos relacionados à gênese ou manutenção do consumo crônico de etanol.

5. As diferenças encontradas nos níveis de RNAm dos genes *Gabbr1* e *Gabbr2* nos camundongos do grupo A em áreas cerebrais associadas ao comportamento aditivo (i.e., córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e núcleos da amígdala), sugere a participação do receptor GABAB na plasticidade neuronal que contribui para o consumo persistente do etanol.

6. É possível que haja alguma relação entre os genes da via GABAérgica (*Gphn*, *Gabbr1* e *Gabbr2*) e da via do metabolismo da CoA (*Acss2*), e essa interação possa ser importante para o desenvolvimento ou manutenção do consumo de etanol nos camundongos do grupo A. Contudo, a natureza dessa relação ainda permanece a ser elucidada.

Referências

- Addolorato G, Caputo F, Capristo E, Domenicali M, Bernardi M, Janiri L, Agabio R, Colombo G, Gessa GL, Gasbarrini G (2002) Baclofen efficacy in reducing alcohol craving and intake: a preliminary double-blind randomized controlled study. *Alcohol Alcohol* 37:504-508.
- Albrechet-Souza, L. Carvalho, M.C. Franci, C.R. Brandão (2007) Increases in plasma corticosterone and stretched-attend postures in rats naïve and previously exposed to the elevated plus-maze are sensitive to the anxiolytic-like effects of midazolam. *Hormones and Behavior* 52: 267-273.
- Allchin FR (1979) India: The Ancient Home of Distillation? *Man (N.S.)*, v. 14, n°1, p. 55-63.
- American Psychiatric Association. (1994) Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th ed. Washington DC: American Psychiatric Press.
- Ariwodola OJ, Weiner JL (2004) Ethanol potentiation of GABAergic synaptic transmission may be self-limiting: role of presynaptic GABA_B receptors. *J Neurosci* 24:10679-10686.
- Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E, Sharon E, Spector Y, Bentwich Z (2005) Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet* 37:766-770.
- Berns GS, McClure SM, Pagnoni G, Montague PR (2001) Predictability modulates human brain response to reward. *J Neurosci* 21:2793-2798.
- Berthele A, Platzer S, Weis S, Conrad B, Tölle TR (2001) Expression of GABA_{B1} and GABA_{B2} mRNA in the human brain. *Neuroreport* 12:3269-3275.
- Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M (2004) Molecular structure and physiological functions of GABA_B receptors. *Physiol Rev* 84:835-867.
- Bibancos T, Jardim DL, Aneas I, Chiavegatto S (2007) Social isolation and expression of serotonergic neurotransmission-related genes in several brain areas of male mice. *Genes Brain Behav* 6:529-539.

Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigo R, Gingeras TR, Margulies EH, Weng Z, Snyder M, Dermitzakis ET, Thurman RE et al. (2007) Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447:799-816.

Boerngen-Lacerda R, Souza-Formigoni ML (2000) Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties? *Pharmacol Biochem Behav*; 67:225-32.

Bolton J, Cox B, Clara I, Sareen J (2006) Use of alcohol and drugs to self-medicate anxiety disorders in a nationally representative sample. *The Journal of Nervous and Mental Disease* 194(11): 818-825.

Bonaventura MM, Catalano PN, Chamson-Reig A, Arany E, Hill D, Bettler B, Saravia F, Libertun C, Lux-Lantos VA (2008) GABA_B receptors and glucose homeostasis: evaluation in GABA_B receptor knockout mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:E157-E167.

Bosron WF, Magnes LJ, Li TK (1983) Kinetic and electrophoretic properties of native and recombined isoenzymes of human liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* 22: 1852-1857.

Bourin M, Petit-Demoulière B, Dhonnchadha BN, Hascöet M (2007) Animal models of anxiety in mice. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 21: 567-574.

Bowery NG, Enna SJ (2000) γ -Aminobutyric acid_B receptors: first of the functional metabotropic heterodimers. *Perspectives in Pharmacology*; 292(1):2-7.

Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, Bonner TI, Enna SJ (2002) International Union of Pharmacology: XXXIII. Mammalian γ -aminobutyric acid_B receptors: structure and function. *Pharmacol Rev* 54:247-264.

Buck KJ, Metten P, Belknap JK, Crabbe JC (1997) Quantitative trait loci involved in genetic predisposition to acute alcohol withdrawal in mice. *J Neurosci* 17:3946-3955.

Buck HM, Hueston CM, Bishop C, Deak T (2011) Enhancement of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis but not cytokine responses to stress challenges imposed during withdrawal from acute alcohol exposure in Sprague-Dawley rats. *Psychopharmacology* 1-13.

Bush G, Vogt BA, Holmes J, Dale AM, Greve D, Jenike MA, Rose BR (2002) Dorsal anterior cingulate cortex: a role in reward-based decision making. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:523-528.

Carlini EA, Galduróz JCF, Noto AR, Nappo AS (2006) I Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil: Estudo Envolvendo a 108 maiores Cidades do País – 2005. CEBRID – Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo.

Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, Oyama R, Ravasi T, Lenhard B, Wells C, Kodzius R, Shimokawa K, Bajic VB, Brenner SE, Batalov S, Forrest AR, Zavolan M, Davis MJ, Wilming LG, Aidinis V, Allen JE, Ambesi-Impiombato A, Apweiler R, Aturaliya RN, Bailey TL, Bansal M, Baxter L, Beisel KW, Bersano T, Bono H, Chalk AM, Chiu KP, Choudhary V, Christoffels A, Clutterbuck DR, Crowe ML, Dalla E, Dalrymple BP, de Bono B, Della Gatta G, di Bernardo D, Down T, Engstrom P, Fagiolini M, Faulkner G, Fletcher CF, Fukushima T, Furuno M, Futaki S, Gariboldi M, Georgii-Hemming P, Gingeras TR, Gojobori T, Green RE, Gustincich S, Harbers M, Hayashi Y, Hensch TK, Hirokawa N, Hill D, Huminiecki L, Iacono M, Ikeo K, Iwama A, Ishikawa T, Jakt M, Kanapin A, Katoh M, Kawasawa Y, Kelso J, Kitamura H, Kitano H, Kollias G, Krishnan SP, Kruger A, Kummerfeld SK, Kurochkin IV, Lareau LF, Lazarevic D, Lipovich L, Liu J, Liuni S, McWilliam S, Madan Babu M, Madera M, Marchionni L, Matsuda H, Matsuzawa S, Miki H, Mignone F, Miyake S, Morris K, Mottagui-Tabar S, Mulder N, Nakano N, Nakauchi H, Ng P, Nilsson R, Nishiguchi S, Nishikawa S, Nori F, Ohara O, Okazaki Y, Orlando V, Pang KC, Pavan WJ, Pavesi G, Pesole G, Petrovsky N, Piazza S, Reed J, Reid JF, Ring BZ, Ringwald M, Rost B, Ruan Y, Salzberg SL, Sandelin A, Schneider C, Schönbach C, Sekiguchi K, Semple CA, Seno S, Sessa L, Sheng Y, Shibata Y, Shimada H, Shimada K, Silva D, Sinclair B, Sperling S, Stupka E, Sugiura K, Sultana R, Takenaka Y, Taki K, Tammoja K, Tan SL, Tang S, Taylor MS, Tegner J, Teichmann SA, Ueda HR, van Nimwegen E, Verardo R, Wei CL, Yagi K, Yamanishi H, Zabarovsky E, Zhu S, Zimmer A, Hide W, Bult C, Grimmond SM, Teasdale RD, Liu ET, Brusic V, Quackenbush J, Wahlestedt C, Mattick JS, Hume DA, Kai C, Sasaki D, Tomaru Y, Fukuda S, Kanamori-Katayama M,

Suzuki M, Aoki J, Arakawa T, Iida J, Imamura K, Itoh M, Kato T, Kawaji H, Kawagashira N, Kawashima T, Kojima M, Kondo S, Konno H, Nakano K, Ninomiya N, Nishio T, Okada M, Plessy C, Shibata K, Shiraki T, Suzuki S, Tagami M, Waki K, Watahiki A, Okamura-Oho Y, Suzuki H, Kawai J, Hayashizaki Y (2005) The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309:1559-1563.

Chen G, van den Pol AN (1998) Presynaptic GABA_B autoreceptor modulation of P/Q-type calcium channels and GABA release in rat suprachiasmatic nucleus neurons. *J Neurosci* 18:1913-1922.

Cheng A, Hou Y, Mattson MP (2010) Mitochondria and neuroplasticity. *ASN Neuro* 2(5): 243-256.

Clark JA, Mezey E, Lam AS, Bonner TI (2000) Distribution of the GABA_B receptor subunit gb2 in rat CNS. *Brain Res* 860:41-52.

Cloninger CR (1987) Neurogenetic adaptive mechanisms in alcoholism. *Science* 236:410-416.

Colombo G, Agabio R, Lobina C, Reali R, Zocchi A, Fadda F, Gessa GL (1995) Sardinian alcohol-preferring rats: a genetic animal model of anxiety. *Physiology & Behavior* 57(6): 1181-1185.

Colombo G, Serra S, Brunetti G, Atzori G, Pani M, Vacca G, Addolorato G, Froestl W, Carai MA, Gessa GL (2002) The GABA_B receptor agonists baclofen and CGP 44532 prevent acquisition of alcohol drinking behaviour in alcohol-preferring rats. *Alcohol Alcohol* 37:499-503.

Colombo G, Serra S, Brunetti G, Vacca G, Carai MA, Gessa GL (2003) Suppression by baclofen of alcohol deprivation effect in Sardinian alcohol-preferring (sP) rats. *Drug Alcohol Depend* 70:105-108.

Correia D, Ribeiro AF, Brunialti Godard A, Boerngen-Lacerda R (2009) Trait anxiety and ethanol: anxiolysis in high-anxiety mice and no relation to intake behavior in an addiction model. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33:880-888.

Cloninger CR (1987) Neurogenetic adaptive mechanisms in alcoholism. *Science* 236:410-416.

Cloninger CR, Sigvardsson S, Bohman M (1988) Childhood personality predicts alcohol abuse in young adults. *Alcohol Clin Exp Res* 12:494-505.

Da Silva GE, Ramos A, Takahashi RN (2004) Comparison of voluntary ethanol intake by two pairs of rat lines used as genetic models of anxiety. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37:1511-1517.

Dick DM, Nurnberger JIJr, Edenberg HJ, Goate A, Crowe R, Rice J, Hesselbrock V, Bucholz KK, Kramer JR, Porjesz B, Begleiter H, Foroud T (2002) Suggestive linkage on chromosome 1 for a quantitative alcohol/personality phenotype. *Alcohol. Clin. Exp. Res* 26:1453-1460.

Dietler M (2006). *Alcohol: Anthropological/Archaeological Perspectives*. *Annual Review of Anthropology*, v.35, p. 229-49.

Djupedal I, Ekwall K (2009) Epigenetics: heterochromatin meets RNAi. *Cell Research* 19: 282-295.

Dotto Bau CH (2002) Estado atual e perspectivas da genética e epidemiologia do alcoolismo. *Temas Livres* 183-190.

Ducci F, Goldman D (2008) Genetic approaches to addiction: genes and alcohol. *Addiction* 103: 1414-1428.

Enoch MA (2008) The role of GABA_A receptors in the development of alcoholism. *Pharmacol Biochem Behav* 90:95-104.

Eravci M, Kley S, Pinna G, Prengel H, Brödel O, Hiedra L, Meinhold H, Baumgartner A (1999) Gene expression of glucose transporters and glycolytic enzymes in the CNS of rats behaviorally dependent on ethanol. *Mol Brain Res* 65:103-111.

Everitt BJ, Robbins TW (2005) Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 8:1481-1489 [erratum: 9:979].

Fachin-Scheit DJ, Ribeiro AF, Pigatto G, Goeldner FO, Boerngen de Lacerda R (2006) Development of a mouse model of ethanol addiction: naltrexone efficacy in reducing consumption but not craving. *J Neural Transm* 113:1305-1321.

Fahlke C, Eriksson CJP (2000) Effect of adrenalectomy and exposure to corticosterone on alcohol intake in alcohol-preferring and alcohol-avoiding rat lines. *Alcohol & Alcoholism* 35(2): 139-144.

Fay AJ, Qian X, Jan YN, Jan LY (2006) SK channels mediate NADPH oxidase-independent reactive oxygen species production and apoptosis in granulocytes. *PNAS* 103 (46):17548-17553.

Filippov AK, Couve A, Pangalos MN, Walsh FS, Brown DA, Moss SJ (2000) Heteromeric assembly of GABA_BR1 and GABA_BR2 receptor subunits inhibits Ca²⁺ current in sympathetic neurons. *J Neurosci* 20:2867-2874.

Finn PR, Sharkansky EJ, Viken R, West TL, Sandy J, Bufferd GM (1997) Heterogeneity in the families of sons of alcoholics: The impact of familial vulnerability type on offspring characteristics. *J Abnorm Psychol* 106:26-36.

Flannery BA, Garbutt JJ, Cody MW, Renn W, Grace K, Osborne M, Crosby K, Morreale M, Trivette A (2004) Baclofen for alcohol dependence: a preliminary open-label study. *Alcohol Clin Exp Res* 28:1517-1523.

Flatscher-Bader T, van der Brug M, Hwang JW, Gochee PA, Matsumoto I, Niwa S, Wilce PA (2005) Alcohol-responsive genes in the frontal cortex and nucleus accumbens of human alcoholics. *J Neurochem* 93:359-370.

Floresco SB, Blaha CD, Yang CR, Phillips AG (2001) Modulation of hippocampal and amygdalar-evoked activity of nucleus accumbens neurons by dopamine: cellular mechanisms of input selection. *J Neurosci* 21:2851-2860.

Freire MT, Hutz MH, Bau CH (2005) The DBH -1021C/T polymorphism is not associated with alcoholism but possibly with patients' exposure to life events. *J Neural Transm* 112: 1269-1274.

Frye GD, Fincher A (1996) Sensitivity of postsynaptic GABA_B receptors on hippocampal CA1 and CA3 pyramidal neurons to ethanol. *Brain Res* 735:239-248.

Funk CK, Zorrilla EP, Lee MJ, Rice KC, Koob GF (2007) Corticotropin-releasing factor 1 antagonists selectively reduce ethanol self-administration in ethanol-dependent rats. *Biol Psychiatry* 61(1):78-86.

Galduróz JC, Caetano R (2004) Epidemiology of alcohol use. *Rev Bras Psiquiatr* 26:3-6.

Gerstein MB, Bruce C, Rozowsky JS, Zheng D, Du J, Korbel JO, Emanuelsson O, Zhang ZD, Weissman S, Snyder M (2007) What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. *Genome Research* 17: 669-681.

Green AS, Grahame NJ (2008) Ethanol drinking in rodents: is free-choice drinking related to the reinforcing effects of ethanol? *Alcohol* 42:1-11.

Guénet JL (2005) The mouse genome. *Genome Res* 15:1729-1740.

Guénet JL, Bonhomme F (2003) Wild mice: an ever-increasing contribution to a popular mammalian model. *Trends Genet* 19:24-31.

Hargreaves GA, Quinn H, Kashem MA, Matsumoto I, McGregor IS (2009) Proteomic analysis demonstrates adolescent vulnerability to lasting hippocampal changes following chronic alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res* 33:86-94.

Hawrot E, Xiao Y, Shi QL, Norman D, Kirkitadze M, Barlow PN (1998) Demonstration of a tandem pair of complement protein modules in GABA_B receptor 1a. *FEBS Lett* 432:103-108.

Heath AC, Jardine R., Martin NG (1989) Interactive effects of genotype and social environment on alcohol consumption in female twins. *J Stud Alcohol* 50:38-48.

Henninger MSH, Spanagel R, Wigger A, Landgraf R, Höltter SM (2002) Alcohol self-administration in two rat lines selectively bred for extremes in anxiety-related behavior. *Neuropsychopharmacology* 26(6):729-736.

Heyman GM (2000) An economic approach to animal models of alcoholism. *Alcohol Res Health* 24:132-139.

Heilig M, Koob GF (2007) A key role for corticotropin-releasing factor in alcohol dependence. *Trends Neurosci* 30(8):399-406.

Hesselbrock MN, Hesselbrock VM, Epstein EE (1999) Theories of Etiology of Alcohol and Other Drug Use Disorders. *Addictions: a comprehensive guidebook*. Barbara S. McCrady & Elizabeth E. Epstein, ed.; Oxford University Press, New York, p. 50-72.

Huang CS, Shi SH, Ule J, Ruggiu M, Barker LA, Darnell RB, Jan YN, Jan LY (2005) Common molecular pathways mediate long-term potentiation of synaptic excitation and slow synaptic inhibition. *Cell* 123:105-118.

Ingenuity. Ingenuity Pathway Analysis Software. Disponível em: <http://www.ingenuity.com>. Acesso em novembro 2010.

Izídio GS, Ramos A (2007) Positive association between ethanol consumption and anxiety-related behaviors in two selected rat lines. *Alcohol* 41: 517-524.

Jacobsen JPR, Weikop P, Hansen HH, Mikkelsen JD, Redrobe JP, Holst D, Bond CT, Adelman JP, Christophersen P, Mirza NR (2008) SK3 K⁺ channel-deficient mice have enhanced dopamine and serotonin release and altered emotional behaviors. *Genes, Brain and Behavior* 7:836-848.

Jiménez-Arriero MA, Ponde G, Rodríguez-Jiménez R, Aragués M, Galvan A, Rublo G, Hoenicka J, Palomo T (2006) *TaqI*-A polymorphism linked to the *DRD2* gene and P300 in alcoholic patients. *Eur. J. Psychiat.* 20(1): 45-53.

Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, Yao WJ, Johnson M, Gunwaldsen C, Huang LY, Tang C, Shen Q, Salon JA, Morse K, Laz T, Smith KE,

Nagarathnam D, Noble SA, Branchek TA, Gerald C (1998) GABA_B receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA_BR1 and GABA_BR2. *Nature* 396:674-679.

Kaesermann, HP (1986) Stretched attend posture, a non-social form of ambivalence, is sensitive to a conflict-reducing drug action. *Psychopharmacology* 89:31-37.

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

Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor PJ, Bischoff S, Mickel SJ, McMaster G, Angst C, Bittiger H, Froestl W, Bettler B (1997) Expression cloning of GABA_B receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386:239-246.

Kim MS, Usachev YM (2009) Mitochondrial Ca²⁺ cycling facilitates activation of the transcription factor NFAT in sensory neurons. *J Neurosci* 29(39):12101-12114.

Kimura M, Higuchi S (2011) Genetics of alcohol dependence. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 65: 213-225.

Kliethermes CL (2005) Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 28: 837-850.

Köhnke M, Schick S, Lutz U, Köhnke A, Vonthein R, Kolb W, Batra A (2006) The polymorphism *GABA_BR1 T1974C*[rs29230] of the GABA_B receptor gene is not associated with the diagnosis of alcoholism or alcohol withdrawal seizures. *Addict Biol* 11:152-156.

Köhnke MD (2008) Approach to the genetics of alcoholism: a review based on pathophysiology. *Biochemical Pharmacology* 75: 160-177.

Koob GF, Le Moal M (1997) Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278:52-58.

Koob GF, Sanna PP, Bloom FE (1998) Neuroscience of addiction. *Neuron* 21:467-476.

Koob GF, Volkow ND (2010) Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology Reviews* 35: 217-238

Koopmans JR, Slutske WS, Van Baal GCM, Boomsma DI (1999) The influence of religion on alcohol use initiation: Evidence for genotype x environment interaction. *Behav Genet* 29:445-453.

Kraut JA, Kurtz I (2008) Toxic alcohol ingestions: clinical features, diagnosis and management. *Clin J Am Soc Nephrol* 3:208-225.

Laposata M (1998) Fatty acid ethyl esters: ethanol metabolites which mediate ethanol-induced organ damage and serve as markers of ethanol intake. *Prog. Lipid Res.* 37(5): 307-316.

Le Moal M, Koob GF (2007) Drug addiction: pathways to the disease and pathophysiological perspectives. *Eur Neuropsychopharmacol* 17:377-393.

Li MD, Mangold JE, Seneviratne C, Chen GB, Ma JZ, Lou XY, Payne TJ (2009) Association and interaction analyses of *GABBR1* and *GABBR2* with nicotine dependence in European- and African-American populations. *PLoS One* 4:e7055.

Li CY, Mao X, Wei, L (2008) Genes and (common) pathways underlying drug addiction. *PLoS Comput Biol*, v. 4, n°1, p. 28-34.

Li Q, Lee JA, Black DL (2007) Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Nat Rev Neurosci* 8:819-831.

Lindberg J, Lundeberg J (2010) The plasticity of the mammalian transcriptome. *Genomics* 95: 1-6.

Lorenzo A, Auguet T, Vidal F, Broch M, Olana M, Gutiérrez C, López-Dupla M, Sirvent JJ, Quer JC, Santos M, Richart C (2006) Polymorphisms of alcohol-metabolizing enzymes and the risk for alcoholism and alcoholic liver disease in Caucasian Spanish women. *Drug and Alcohol Dependence* 84(2): 195-200.

Lovinger DM (2008) Communication networks in the brain: neurons, receptors, neurotransmitters, and alcohol. *Alcohol Res Health* 31:196-214.

Lowery EG, Spanos M, Navarro M, Lyons AM, Hodge CW, Thiele TE (2010) CRF-1 antagonist and CRF-2 agonist decrease binge-like ethanol drinking in C57BL/6J mice independent of the HPA axis. *Neuropsychopharmacology* 35(6): 1241-1252.

Maccioni P, Serra S, Vacca G, Orrù A, Pes D, Agabio R, Addolorato G, Carai MA, Gessa GL, Colombo G (2005) Baclofen-induced reduction of alcohol reinforcement in alcohol-preferring rats. *Alcohol* 36:161-168.

Margeta-Mitrovic M, Jan YN, Jan LY (2001) Function of GB1 and GB2 subunits in G protein coupling of GABA_B receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14649-14654.

Martin SC, Steiger JL, Gravielle MC, Lyons HR, Russek SJ, Farb DH (2004) Differential expression of γ -aminobutyric acid type B receptor subunit mRNAs in the developing nervous system and receptor coupling to adenylyl cyclase in embryonic neurons. *J Comp Neurol* 473:16-29.

Matsuda-Matsumoto H, Iwazaki T, Kashem MA, Harper C, Matsumoto I (2007) Differential protein expression profiles in the hippocampus of human alcoholics. *Neurochem Int* 51:370-376.

McGue M (1999) Behavioral genetic models of alcoholism and drinking. In K.E. Leonard & H.T. Blane (eds.). *Psychological theories of drinking and alcoholism*. New York: Guilford Publications pp.372-421.

Meek LR, Myren K, Sturm J, Bureau D (2007) Acute paternal alcohol use affects offspring development and adult behavior. *Physiology & behavior* 154-160.

Meloni JN, Laranjeira R (2004) Custo social e de saúde do consumo do álcool. *Rev. Bras. Psiquiatria*, v. 26 (suppl. 1), p. 7-10.

Mering CV, Krause R, Snel B, Cornell M, Oliver SG, Fields S, Bork P (2002) Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions. *Nature* 417: 399-403.

Misgeld U, Bijak M, Jarolimek W (1995) A physiological role for GABA_B receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 46:423-462.

Möller C, Wiklund L, Sommer W, Thorsell A, Heilig M (1997) Decreased experimental anxiety and voluntary ethanol consumption in rats following central but not basolateral amygdala lesions. *Brain Research* 760:94-101.

Moore EM, Serio KM, Goldfarb KJ, Stepanovska S, Linsenbardt DN, Boehm SL Jr (2007) GABAergic modulation of binge-like ethanol intake in C57BL/6J mice. *Pharmacol Biochem Behav* 88:105-113.

Moore S, Montane-Jaime LK, Carr LG, Ehlers CL (2007) Variations in alcohol-metabolizing enzymes in people of East Indian and African descent from Trinidad and Tobago. *Alcohol Res Health* 30(1): 28-30.

Morozova TV, Anholt RRH, Mackay TFC (2006) Transcriptional response to alcohol exposure in *Drosophila melanogaster*. *Genome Biology* 7(10):R95.1-95.10.

Mulholland PJ, Hopf FW, Bukiya AN, Martin GE, Liu J, Dopico AM, Bonci A, Treisman ST, Chandler LJ (2009) Sizing up ethanol-induced plasticity: the role of small and large conductance calcium-activated potassium channels. *Alcohol Clin Exp Res* 33(7): 1125-1135.

Mulligan MK, Ponomarev I, Hitzemann RJ, Belknap JK, Tabakoff B, Harris RA, Crabbe JC, Blednov YA, Grahame NJ, Phillips TJ, Finn DA, Hoffman PL, Iyer VR, Koob GF, Bergeson SE (2006) Toward understanding the genetics of alcohol drinking through transcriptome meta-analysis. *PNAS* 103(16): 6368–6373.

Pautassi RM, Nizhnikov ME, Spear NE (2009) Assessing appetitive, aversive, and negative ethanol-mediated reinforcement through an immature rat model. *Neurosci Biobehav Rev* 33:953-974.

Paxinos G, Franklin KBJ (2001) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, 2nd ed. San Diego: Academic Press.

Peris J, Eppler B, Hu M, Walker DW, Hunter BE, Mason K, Anderson KJ (1997) Effects of chronic ethanol exposure on GABA receptors and GABA_B receptor modulation of ³H-GABA release in the hippocampus. *Alcohol Clin Exp Res* 21:1047-1052.

Phillips T (2002) Animal models for the genetic study of human alcohol phenotypes. *Alcohol Res Health* 26:202-207.

Pohorecky LA (1991) Stress and alcohol interaction: an update of human research. *Alcohol Clin Exp Res* 15:438-459.

R Development Core Team (2010). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

Ramos A, Correia EC, Izídio GS, Brüske GR (2003) Genetic selection of two new rat lines displaying different levels of anxiety-related behaviors. *Behavior Genetics* 33(6):657-668.

Ramos A (2008) Animal models of anxiety: do I need multiple tests? *Trends in Pharmacological Sciences* 29(10):493-498.

Ribeiro AF (2004) Relação entre o desenvolvimento de dependência de etanol e sensibilização psicomotora em um modelo animal. 123 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia): versão impressa – Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Ribeiro AF, Pigatto G, Goeldner FO, Lopes JF, de Lacerda RB (2008) Lack of relation between drug-seeking behavior in an addiction model and the expression of behavioral sensitization in response to ethanol challenge in mice. *J Neural Transm* 115:43-54.

Robinson J, Sareen J, Cox B, Bolton J (2009) Self-medication of anxiety disorders with alcohol and drugs: results from a nationally representative sample. *Journal of Anxiety Disorders* 23:38-45.

Rodgers RJ, Johnson NJT (1995) Ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 52(2): 297-303.

Rodgers RJ, Haller J, Holmes A, Halasz J, Walton TJ, Brain PF (1999) Corticosterone response to the plus-maze: High correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiology & Behavior* 68: 47-53.

Roman T, Bau CH, Almeida S, Hutz MH (1999) Lack of association of the dopamine D4 receptor gene polymorphism with alcoholism in a Brazilian population. *Addict Biol* 4(2): 203-207.

Rose RJ, Dick DM, Viken RJ, Kaprio J (2001) Gene-environment interaction in patterns of adolescent drinking: Regional residency moderates longitudinal influences on alcohol use. *Alcohol Clin Exp Res* 25:637-643.

Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365-386.

Sander T, Samochowiec J, Ladehoff M, Smolka M, Peters C, Riess O, Rommelspacher H, Schmidt LG (1999) Association analysis of exonic variants of the gene encoding the GABA_B receptor and alcohol dependence. *Psychiatr Genet* 9:69-73.

Santos BR, Monteiro MG, Thomasson HR (1997) Allele frequency of ADH2 and ALDH2 among Brazilians of different ethnic groups. *Alcohol* 14(3): 205-207.

Scholz KP, Miller RJ (1991) GABA_B receptor-mediated inhibition of Ca²⁺ currents and synaptic transmission in cultured rat hippocampal neurons. *Journal of Physiology*; 444:669-686.

Shippenberg TS, Koob GF (2002) Recent advances in animal models of drug addiction and alcoholism. In *Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress*. Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C (eds) Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. pp. 1381-1397.

Spanagel R (2009) Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiol Rev* 89:649-705.

Spanagel R (2003) Alcohol addiction research: from animal models to clinics. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17:507-518.

Spanagel R, Höltner SM (1999) Long-term alcohol self-administration with repeated alcohol deprivation phases: an animal model of alcoholism? *Alcohol Alcohol* 34:231-243.

Stewart RB, Gatto GJ, Lumeng L, Li TK, Murphy JM (1993) Comparison of alcohol-preferring (P) and nonpreferring (NP) rats on tests of anxiety and for the anxiolytic effects of ethanol. *Alcohol* 10(1):1-10.

Suzuki K, Uchida A, Mizoi Y, Fukunaga T (1994) A study on ADH2 and ALDH2 genotyping by PCR-RFLP and SSCP analyses with description of allele and genotype frequencies in Japanese, Finn and Lapp populations. *Alcohol* 29(1): 21-27.

Tonin AM, Ferreira GC, Grings M, Viegas CM, Busanello EN, Amaral AU, Zanatta A, Schuck PF, Wajner M (2010) Disturbance of mitochondrial energy homeostasis caused by the metabolites accumulating in LCHAD and MTP deficiencies in rat brain. *Life Sciences* 86: 825-831.

Toscano JR (2000) A. Um Breve Histórico Sobre o Uso de Drogas. *Dependência de Drogas, SEIBEL, S.D. e TOSCANO JR., A., São Paulo Editora Atheneu, 1ª ed., cap. 2, p. 7-23.*

Vacher CM, Gassmann M, Desrayaud S, Challet E, Bradaia A, Hoyert D, Waldmeier P, Kaupmann K, Pévet P, Bettler B (2006) Hyperdopaminergia and altered locomotor activity in GABA_{B1}-deficient mice. *J Neurochem* 97:979-991.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:RESEARCH0034.

Venables WN, Ripley BD (2002) *Modern Applied Statistics with S. Fourth Edition.* Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0

Vengeliene V, Bilbao A, Molander A, Spanagel R (2008) Neuropharmacology of alcohol addiction. *British Journal of Pharmacology*, v. 154, p. 299-315.

Wall PM, Messier C (2001) Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 25:275-286.

Wan FJ, Berton F, Madamba SG, Francesconi W, Siggins GR (1996) Low ethanol concentrations enhance GABAergic inhibitory postsynaptic potentials in hippocampal pyramidal neurons only after block of GABA_B receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5049-5054.

Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, Chao P, Franz M, Grouios C, Kazi F, Lopes CT, Maitland A, Mostafavi S, Montojo J, Shao Q, Wright G, Bader GD, Morris Q (1995) The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res* 38:W214-W220. Acesso em fevereiro de 2011.

Wolffgramm J, Heyne A (1995) From controlled drug intake to loss of control: the irreversible development of drug addiction in the rat. *Behav Brain Res* 70:77-94.

Yu W, Gius D, Onyango P, Muldoon-Jacobs K, Karp J, Feinberg AP, Cui H (2008) Epigenetic silencing of tumor suppressor gene p15 by its antisense RNA. *Nature* 451: 202-207

Xi Z, Ramamoorthy S, Shen H, Lake R, Samuvel D, Kalivas PW (2003) GABA transmission in the nucleus accumbens is altered after withdrawal from repeated cocaine. *J Neurosci* 23:3498-3505.

APÊNDICE 1 – PADRÃO DO CONSUMO DAS SOLUÇÕES DOS CAMUNDONGOS
NÃO UTILIZADOS NAS ANÁLISES MOLECULARES

TABELA 15 – PADRÃO INDIVIDUAL DE CONSUMO DAS SOLUÇÕES DE ETANOL (G/KG) NAS FASES EXPERIMENTAIS

Grupo	Animal	Aquisição (2se)	Reapresentação (2se)	Adulteração (2se)	ANOVA	
		ETOH	ETOH	ETOH	F(2,22)	p
A	05	15,38 ^{R,ad} e 0,73	11,19 e 0,67	13,65 e 0,86	4,9163	0,017
	10	12,29 e 1,11	7,88 ^T e 0,50	11,46 e 0,88	4,2952	0,03
	41	8,88 e 0,72	7,53 e 0,50	10,22 e 1,12	2,2416	0,13
	47	10,93 e 1,26	9,61 e 0,64	13,29 e 1,60	2,3094	0,12
	64	13,18 e 1,34	11,12 e 0,66	11,80 e 1,90	0,14943	0,86
P	48	12,37 ^T e 0,51	7,98 ^T e 0,26	10,14 ^T e 0,95	10,474	0,0006
	74	6,80 e 0,37	5,41 e 0,45	4,84 ^A e 0,47	5,0457	0,016
	80	13,84 ^T e 0,75	9,91 e 0,45	9,43 e 0,81	11,213	0,0004
L	03	6,94 ^T e 0,15	10,85 ^T e 0,63	15,94 ^T e 1,44	26,205	0,0000
	13	8,54 ^T e 0,29	5,29 ^T e 0,37	6,90 ^T e 0,54	10,309	0,0007
	29	6,83 ^T e 0,41	8,81 e 0,66	9,61 e 0,68	4,4114	0,02
	40	8,82 e 0,76	6,04 ^T e 0,36	9,67 e 0,75	6,6004	0,006
	44	9,29 ^T e 1,33	6,33 e 0,65	6,10 e 1,17	4,2650	0,027
	52	6,23 e 0,43	7,91 e 0,42	10,32 ^T e 0,94	9,2840	0,001
	55	5,48 e 0,43	7,25 e 0,99	7,43 e 0,70	1,6740	0,21
	62	7,65 e 0,74	5,84 e 0,55	8,27 e 1,24	2,0792	0,15
	65	8,99 e 1,06	5,77 e 0,28	7,98 e 0,90	2,9476	0,07
	69	5,80 e 0,73	7,44 e 0,55	9,31 ^A e 0,98	3,9507	0,03
	71	3,06 ^r e 0,38	4,63 e 0,39	5,86 ^A e 0,82	5,2141	0,014
I	07	9,93 e 0,59	6,94 ^T e 0,33	9,82 e 0,88	4,6115	0,02
	08	8,77 e 1,22	7,63 e 0,40	10,95 e 0,90	2,8080	0,08
	09	16,78 ^T e 1,04	6,45 e 0,71	5,94 e 0,57	37,793	0,0000
	15	13,41 ^T e 1,66	8,80 e 1,01	7,77 e 0,76	5,2645	0,01
	17	13,11 ^T e 2,37	6,63 e 0,26	7,65 e 0,39	4,2641	0,03
	24	4,39 ^r e 0,47	6,35 e 0,39	9,22 ^T e 0,91	12,890	0,0002
	63	10,47 ^T e 0,47	6,39 e 0,82	6,74 e 1,57	5,6724	0,01
	68	13,13 ^T e 1,83	7,43 e 0,25	8,63 e 0,87	4,4317	0,02
	70	5,29 ^R e 0,41	7,29 ^{ad} e 0,50	5,32 e 0,78	3,7542	0,04
	72	5,73 e 0,68	3,57 e 0,27	4,66 e 0,92	2,7175	0,09
	73	5,38 e 0,55	4,40 e 0,49	6,77 ^R e 0,63	4,9351	0,02

NOTA: média do consumo diário e ep nas diferentes fases para os grupos. A fase de aquisição abrange apenas o consumo das últimas 2 semanas (2se). O consumo das demais fases abrange as 2 semanas de duração de cada uma. ANOVA com repetições seguida por Newman-Keuls, $p < 0,05$ no mínimo; ^T diferente das demais fases experimentais; ^A diferente da fase de aquisição. ^R diferente da fase de reapresentação. ^{ad} $p < 0,10$ em relação a fase de adulteração. ^r $p < 0,10$ em relação a fase de reapresentação. ETOH= etanol; A: sem controle; P: pesado; L: leve; I: indefinido.

TABELA 16 – PREFERÊNCIA ENTRE AS SOLUÇÕES

Grupo	Animal	Consumo		Teste-t	
		H ₂ O	ETOH	t	p
A	05	5,83 e 0,38	10,06 e 0,35	8,22	0,0000
	10	5,71 e 0,28	8,5 e 0,49	4,94	0,0000
	41	5,77 e 0,26	6,70 e 0,33	2,20	0,03
	47	6,51 e 0,26	8,06 e 0,48	2,83	0,006
	64	7,71 e 0,42	9,23 e 0,56	2,14	0,03
P	48	2,86 e 0,30	8,81 e 0,33	13,41	0,0000
	74	5,09 e 0,36	6,09 e 0,23	2,32	0,02
	80	2,09 e 0,19	10,06 e 0,35	20,09	0,00
L	03	10,27 e 0,40	8,63 e 0,59	-2,28	0,03
	13	6,90 e 0,20	5,08 e 0,23	-5,85	0,0000
	29	10,57 e 0,40	5,11 e 0,24	-11,71	0,0000
	40	10,03 e 0,26	5,67 e 0,28	-11,34	0,0000
	44	10,49 e 0,68	5,48 e 0,50	-5,93	0,0000
	52	10,25 e 0,73	5,69 e 0,31	-10,80	0,0000
	55	6,68 e 0,22	5,71 e 0,35	-2,31	0,02
	62	5,84 e 0,21	4,30 e 0,32	-4,05	0,0001
	65	8,03 e 0,24	5,81 e 0,40	-4,75	0,0000
	69	12,25 e 0,31	4,69 e 0,31	-17,31	0,0000
I	71	8,79 e 0,34	3,62 e 0,25	-12,30	0,0000
	07	6,90 e 0,20	7,39 e 0,35	1,20	0,23
	08	5,75 e 0,22	5,90 e 0,38	0,35	0,73
	09	6,29 e 0,26	7,38 e 0,57	1,76	0,08
	15	7,21 e 0,30	8,49 e 0,66	1,75	0,08
	17	7,13 e 0,34	7,62 e 0,81	0,56	0,58
	24	4,55 e 0,18	5,07 e 0,34	1,36	0,18
	63	4,87 e 0,26	6,93 e 0,51	3,60	0,0005
	68	7,46 e 0,26	7,25 e 0,57	-0,34	0,73
	70	6,26 e 0,44	5,56 e 0,30	-1,30	0,20
72	4,73 e 0,21	4,76 e 0,33	0,09	0,93	
73	5,07 e 0,24	4,93 e 0,27	-0,39	0,69	

NOTA: média do consumo diário e erro padrão ao longo do experimento das soluções (mL) (2 últimas semanas da fase de aquisição, fase de reapresentação e fase de adulteração) para os grupos. Teste-t independente. ETOH= etanol; H₂O=água. A: sem controle; P: pesado; L: leve; I: indefinido.

APÊNDICE 2 – ANÁLISE COMPORTAMENTAL DURANTE A FASE DE
ABSTINÊNCIA

TABELA 17 – VARIÁVEIS PARAMÉTRICAS COMPORTAMENTAIS COLETADAS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Variável	Grupos	Fase	ANOVA	
		Abstinência	F(3,57)	p
% Tempo de latência inicial	A	5,9 e 1,4	1,60	0,20
	P	6,1 e 3,4		
	L	4,2 e 1,0		
	C	7,4 e 1,6		
N° de entradas no braço aberto	A	5 e 0,8	3,00	0,04
	P	9* e 1,3		
	L	5 e 0,9		
	C	5 e 0,9		
% Tempo gasto no braço aberto	A	26,0 e 3,9	2,49	0,07
	P	39,3* e 5,3		
	L	22,8 e 3,8		
	C	21,9 e 4,2		
N° de entradas no braço fechado	A	6 e 0,6	0,56	0,64
	P	7 e 0,8		
	L	6 e 0,7		
	C	6 e 0,6		
% Tempo no braço fechado	A	44,2 e 4,8	1,91	0,14
	P	37,1 e 6,3		
	L	55,9 e 4,8		
	C	50,2 e 5,3		
% Tempo de permanência no meio	A	23,6 e 3,7	0,85	0,47
	P	20,8 e 3,3		
	L	17,1 e 2,1		
	C	21,1 e 3,3		
N° de elevações no braço fechado	A	7 e 1,2	2,27	0,09
	P	11 e 1,8		
	L	9 e 1,2		
	C	7 e 1,3		

NOTA: média e ep das variáveis comportamentais medidas durante a fase de abstinência. *diferença entre os grupos ($p < 0,05$, ANOVA 1-via seguido de teste *post-hoc* *Newmann-Keuls*). Grupos: C, $n=19$; L, $n= 21$; P, $n= 09$; A, $n= 12$.

TABELA 18 – VARIÁVEIS NÃO PARAMÉTRICAS COMPORTAMENTAIS COLETADAS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Variável	Grupos	Fase	MANOVA	
		Abstinência	H(3,61)	p
N° de espreitas no braço aberto	A	6,0 (4,0-11,0)	4,72	0,19
	P	15,0 (7,0-17,0)		
	L	5,0 (3,0-10,0)		
	C	6,0 (3,0-10,0)		
N° de posição esticada no braço aberto	A	4,0 (2,0-6,0)	3,66	0,30
	P	0,0 (0-1,0)		
	L	3,0 (0-4,0)		
	C	3,0 (0-7,0)		
Tempo de auto-limpeza no braço fechado	A	0 (0-0)	3,89	0,27
	P	0 (0-3,0)		
	L	0 (0-0)		
	C	0 (0,0-5,0)		
N° de posição esticada no braço fechado	A	4,0 (3,0-7,0)	6,70	0,08
	P	0,0 (0-2,0)		
	L	5,0 (2,0-8,0)		
	C	4,0 (2,0-5,0)		

NOTA: mediana (quartil inferior – quartil superior) das variáveis comportamentais medidas durante a fase de abstinência. *diferença entre os grupos ($p < 0,05$, *Kruskal-Wallis* seguido por comparações múltiplas). Grupos: C, $n=19$; L, $n= 21$; P, $n= 09$; A, $n= 12$.

TABELA 19 – VARIÁVEIS PARAMÉTRICAS COMPORTAMENTAIS COLETADAS NO CAMPO ABERTO

Variável	Grupos	Fase	ANOVA	
		Abstinência	F(3,57)	P
Ambulação	A	129 e 9,3	1,12	0,35
	P	164 e 16,6		
	L	130 e 10,4		
	C	143 e 14,7		
N° de elevações	A	26 e 4,1	4,77	0,005
	P	31* e 3,8		
	L	17 e 2,3		
	C	17 e 2,6		

NOTA: média e ep das variáveis comportamentais medidas durante a fase de abstinência. *diferença entre o grupo P em relação aos grupos L e C ($p < 0,05$, ANOVA 1-via seguido de teste *post-hoc Newman-Keuls*). Grupos: C, $n=19$; L, $n= 21$; P, $n= 09$; A, $n= 12$.

TABELA 20 – VARIÁVEIS NÃO PARAMÉTRICAS COMPORTAMENTAIS COLETADAS NO CAMPO ABERTO

Variável	Grupos	Fase	MANOVA	
		Abstinência	H(3,61)	P
Tempo de latência	A	0 (0-1,0)	8,61	0,03
	P	0 (0-1,0)		
	L	2,0 (0-4,0)		
	C	1,0 (0-2,0)		
Tempo de auto-limpeza	A	3,0 (0,0-5,0)	0,45	0,92
	P	3,0 (0-5,0)		
	L	3,0 (0-7,0)		
	C	4,0 (0-7,0)		
Nº de posição esticada no centro	A	0 (0-0)	5,40	0,14
	P	0 (0-0)		
	L	0 (0-0)		
	C	0 (0-0)		
Nº de posição esticada na periferia	A	0 (0-1,0)	9,45	0,02
	P	0 (0-0)		
	L	1 (0-3,0)		
	C	0 (0-1,0)		

NOTA: mediana (quartil inferior – quartil superior) das variáveis comportamentais medidas durante a fase de abstinência. *diferença entre os grupos ($p < 0,05$, *Kruskal-Wallis* seguido de comparações múltiplas). Grupos: C, $n=19$; L, $n= 21$; P, $n= 09$; A, $n= 12$.

TABELA 21 – AMBULAÇÃO ENTRE OS GRUPOS COLETADA NA CAIXA DE MOVIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA

Variável	Grupos	Fase	ANOVA	
		Abstinência	F(3,57)	p
Ambulação	A	93 e 8,2	0,70	0,57
	P	103 e 7,7		
	L	108 e 5,8		
	C	101 e 8,1		

NOTA: média e ep da ambulação medida durante a fase de abstinência. *diferença entre os grupos ($p < 0,05$, ANOVA 1-via seguido de teste *post-hoc Newman-Keuls*). Grupos: C, $n=19$; L, $n= 21$; P, $n= 09$; A, $n= 12$.

TABELA 22 – RELAÇÃO ENTRE COMPORTAMENTO EMOCIONAL E CONSUMO DAS SOLUÇÕES

Equipamentos	ETOH			Consumo			
				H ₂ O			
CA	AQUI	REAP	AD	Fases			
	AQUI	REAP	AD	AQUI	ABS	REAP	AD
LAT	-0,09	-0,25	-0,27*	0,18	0,02	0,11	0,12
AMB	0,12	-0,00	-0,06	-0,10	0,01	-0,10	-0,10
EL	0,28*	0,18	0,13	-0,26	-0,06	-0,24	-0,19
AL	0,00	0,02	0,10	0,20	0,27*	0,32*	0,39*
SAPCE	0,00	-0,30*	-0,30*	0,24*	-0,05	0,17	0,12
SAPPE	-0,13	-0,22	-0,18	0,08	0,07	0,03	0,03
CME							
AMB	-0,13	-0,22	-0,15	0,00	-0,13	0,04	0,09
LCE							
EA	0,09	0,02	0,06	-0,19	0,03	-0,03	-0,10
HD	0,08	-0,01	0,05	-0,17	-0,08	-0,04	-0,15
SAPA	-0,04	-0,02	0,07	0,06	0,00	0,09	0,02
EF	-0,00	-0,05	-0,09	-0,01	0,18	0,03	0,07
ALF	-0,00	-0,15	-0,24	-0,01	-0,18	-0,07	-0,04
ELF	0,10	0,09	-0,08	-0,00	0,34*	0,02	0,14
SAPF	-0,16	0,01	0,09	0,24*	-0,03	-0,00	0,11
%TM	0,15	0,12	0,09	0,00	0,12	0,06	0,01
%TA	0,12	0,07	0,17	-0,20	-0,07	-0,06	-0,12
%TF	-0,18	-0,10	-0,15	0,16	0,03	0,02	0,13
%LAT	-0,02	0,12	0,13	0,03	-0,12	-0,01	-0,05

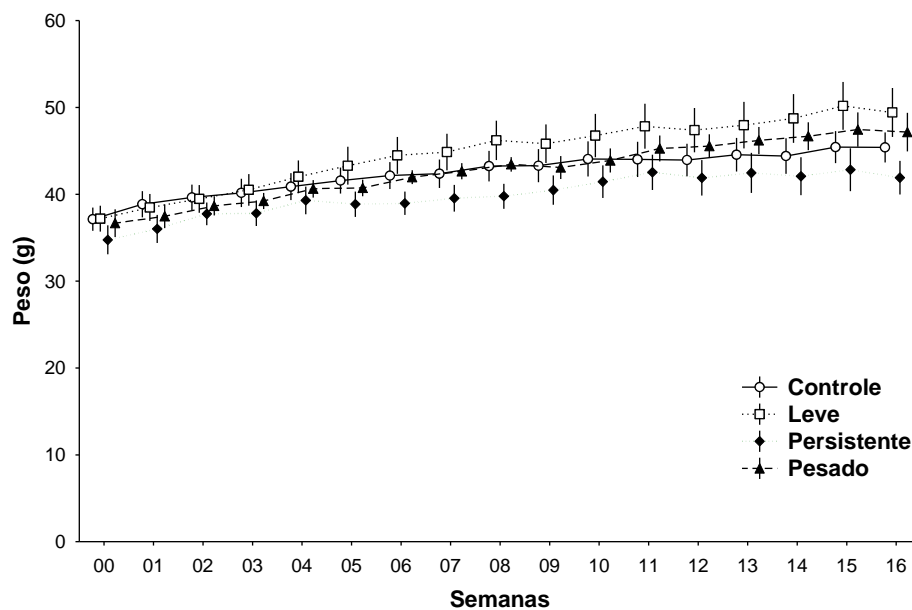
Nota: comparações entre o consumo de etanol (g/kg) ou água (mL) em cada fase experimental (AQUI, aquisição; ABS, abstinência; REAP, reapresentação; AD, adulteração) com os comportamentos coletados durante a fase de abstinência ($n= 42$). Equipamentos: CA, campo aberto; CME, caixa de movimentação espontânea; LCE, labirinto em cruz elevado. LAT, tempo de latência inicial. AMB, ambulação. EL, ambulação vertical, AL, auto-limpeza. SAPCE, postura esticada horizontal no centro, SAPPE, postura horizontal na periferia. EA, número de entradas no braço aberto. EF, número de entradas no braço fechado. HD, número de espreitas no braço aberto. SAPA, número de posição esticada horizontal no braço aberto. ALF, auto-limpeza no braço fechado. ELF, ambulação vertical no braço fechado. SAPF, número de posição esticada horizontal no braço fechado. %TM, porcentagem de tempo na área central. %TA, porcentagem de tempo no braço aberto. %TF, porcentagem de tempo no braço fechado. %LAT, porcentagem de tempo inicial na área central. * $p<0,05$, Correlações de *Spearman*.

APÊNDICE 3 – ANÁLISE DO PESO CORPÓREO

Peso Corporal

Não foi observada diferença significativa de peso entre os grupos em nenhuma semana de tratamento ($F_{(17,51)} = 1,53$, $p > 0,05$). Ao se comparar o peso dos animais dentro do mesmo grupo ao longo das semanas foi observado que para todos os grupos houve um ganho de peso significativo durante o experimento ($F_{C(16,112)} = 23,239$, $p < 0,0001$); $F_{L(16,112)} = 25,113$, $p < 0,001$; $F_{A(16,112)} = 9,7858$, $p < 0,0001$; $F_{P(16,112)} = 17,575$, $p < 0,0001$; ANOVA com repetições seguida pelo teste *post-hoc Newman-Keuls*). Foi observada uma interação entre tempo de tratamento e peso ($F_{(48,448)} = 1,5401$, $p < 0,05$), (Gráfico 06).

GRÁFICO 07 – Peso Corporal



NOTA: média e ep dos pesos dos camundongos em cada semana do tratamento (semana 00 corresponde a medida basal). * $p < 0,05$ diferença entre os grupos na mesma semana de tratamento (ANOVA de 1 via seguida por *Newman-Keuls*). $n=8$ em cada grupo.

APÊNDICE 4 – ANÁLISE MOLECULAR DOS GENES SELECIONADOS NA REGIÃO
DOS NÚCLEOS DA AMÍGDALA CEREBRAL

TABELA 23 – ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENES SELECIONADOS

	<i>Acaa2</i>	<i>Acat1</i>	<i>Acs11</i>	<i>Hadh</i>	<i>Hadhb</i>	<i>Kcnj13</i>	<i>Kcnn3</i>	<i>Slc27a2</i>	<i>Acss2</i>	<i>Acss3</i>	<i>Acsbg2</i>
<i>Acaa2</i>	1,00	0,88*	-0,52*	0,54*	0,93*	0,47*	0,78*	0,64*	-0,18	-0,26	0,83*
<i>Acat1</i>		1,00	-0,34	0,77*	0,91*	0,37*	0,90*	0,85*	-0,14	-0,14	0,58*
<i>Acs11</i>			1,00	-0,09	-0,43*	-0,02	-0,43*	-0,33	0,53*	0,59*	-0,48*
<i>Hadh</i>				1,00	0,59*	0,13	0,75*	0,82*	-0,11	0,12	0,10
<i>Hadhb</i>					1,00	0,47*	0,82*	0,69*	-0,13	-0,21	0,74*
<i>Kcnj13</i>						1,00	0,11	-0,05	-0,14	-0,17	0,53*
<i>Kcnn3</i>							1,00	0,92*	-0,11	-0,05	0,40
<i>Slc27a2</i>								1,00	-0,04	0,08	0,22
<i>Acss2</i>									1,00	0,62*	-0,16
<i>Acss3</i>										1,00	-0,44*
<i>Acsbg2</i>											1,00

Nota: níveis de ARNm da região dos núcleos da amígdala dos genes escolhidos a partir dos resultados do microarranjo ($n=31$). *Hadh*, hidroxiacil-CoA dehidrogenase cadeia curta; *Acaa2*, acetil-Coenzima A aciltransferase 2; *Acat1*, acetil-Coenzima A acetiltransferase 1; *Hadhb*, hidroxiacil-Coenzima A dehidrogenase subunidade beta; *Kcnn3*, canal de condutância intermediária/pequena de potássio ativado por cálcio, subfamília N, membro 3; *Slc27a2*, carreador de soluto família 27, membro 2; *Kcnj13*, canal de entrada de potássio, subfamília J, membro 13; *Acs11*, acil-CoA sintetase cadeia longa família membro 1. *Acss2*, acil-CoA sintetase cadeia curta família membro 2. *Acss3*, acil-CoA sintetase cadeia curta família membro 3. *Acsbg2*, acil-CoA sintetase *bubblegum* família membro 2. Correlação de Pearson * $p<0,05$.

TABELA 24 – ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENES SELECIONADOS NO GRUPO SEM CONTROLE

	<i>Acaa2</i>	<i>Acat1</i>	<i>Acs11</i>	<i>Hadh</i>	<i>Hadhb</i>	<i>Kcnj13</i>	<i>Kcnn3</i>	<i>Slc27a2</i>	<i>Acss2</i>	<i>Acsbg2</i>	<i>Acss3</i>
<i>Acaa2</i>	1,00	0,97*	-0,93*	-0,93*	0,99*	-0,23	0,99*	0,96*	-0,57	0,97*	-0,77
<i>Acat1</i>		1,00	-0,83*	-0,86*	0,96*	-0,31	0,98*	0,98*	-0,44	0,94*	-0,68
<i>Acs11</i>			1,00	0,96*	-0,92*	0,18	-0,89*	-0,84*	0,68	-0,91*	0,89*
<i>Hadh</i>				1,00	-0,92*	0,41	-0,91*	-0,88*	0,54	-0,93*	0,93*
<i>Hadhb</i>					1,00	-0,27	0,99*	0,96*	-0,55	0,98*	-0,73
<i>Kcnj13</i>						1,00	-0,30	-0,43	-0,49	-0,41	0,33
<i>Kcnn3</i>							1,00	0,97*	-0,52	0,97*	-0,72
<i>Slc27a2</i>								1,00	-0,33	0,98*	-0,68
<i>Acss2</i>									1,00	-0,42	0,58
<i>Acsbg2</i>										1,00	-0,74
<i>Acss3</i>											1,00

Nota: níveis de ARNm da região dos núcleos da amígdala cerebral ($n=06$). *Hadh*, hidroxiacil-CoA dehidrogenase cadeia curta; *Acaa2*, acetil-Coenzima A aciltransferase 2; *Acat1*, acetil-Coenzima A acetiltransferase 1; *Hadhb*, hidroxiacil-Coenzima A dehidrogenase subunidade beta; *Kcnn3*, canal de condutância intermediária/pequena de potássio ativado por cálcio, subfamília N, membro 3; *Slc27a2*, carreador de soluto família 27, membro 2; *Kcnj13*, canal de entrada de potássio, subfamília J, membro 13; *Acs11*, acil-CoA sintetase cadeia longa família membro 1. *Acss2*, acil-CoA sintetase cadeia curta família membro 2. *Acss3*, acil-CoA sintetase cadeia curta família membro 3. *Acsbg2*, acil-CoA sintetase *bubblegum* família membro 2. Correlação de Pearson * $p<0,05$.

TABELA 25 – ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENES SELECIONADOS NO GRUPO PESADO

	<i>Acaa2</i>	<i>Acat1</i>	<i>Acs11</i>	<i>Hadh</i>	<i>Hadhb</i>	<i>Kcnj13</i>	<i>Kcnn3</i>	<i>Slc27a2</i>	<i>Acss2</i>	<i>Acsbg2</i>	<i>Acss3</i>
<i>Acaa2</i>	1,00	0,54	-0,84*	-0,06	0,79*	0,23	0,37	0,26	0,32	0,88*	-0,02
<i>Acat1</i>		1,00	-0,24	0,77*	0,93*	-0,25	0,89*	0,94*	0,58	0,13	0,66
<i>Acs11</i>			1,00	0,36	-0,51	-0,46	-0,12	0,09	0,10	-0,86*	0,42
<i>Hadh</i>				1,00	0,52	-0,47	0,74	0,89*	0,43	-0,48	0,78*
<i>Hadhb</i>					1,00	-0,15	0,84*	0,78*	0,53	0,45	0,41
<i>Kcnj13</i>						1,00	-0,52	-0,45	-0,58	0,27	-0,46
<i>Kcnn3</i>							1,00	0,90*	0,49	0,00	0,49
<i>Slc27a2</i>								1,00	0,65	-0,15	0,80*
<i>Acss2</i>									1,00	0,21	0,80*
<i>Acsbg2</i>										1,00	-0,29
<i>Acss3</i>											1,00

Nota: níveis de ARNm da região dos núcleos da amígdala cerebral (n=07). *Hadh*, hidroxiacil-CoA dehidrogenase cadeia curta; *Acaa2*, acetil-Coenzima A aciltransferase 2; *Acat1*, acetil-Coenzima A acetiltransferase 1; *Hadhb*, hidroxiacil-Coenzima A dehidrogenase subunidade beta; *Kcnn3*, canal de condutância intermediária/pequena de potássio ativado por cálcio, subfamília N, membro 3; *Slc27a2*, carreador de soluto família 27, membro 2; *Kcnj13*, canal de entrada de potássio, subfamília J, membro 13; *Acs11*, acil-CoA sintetase cadeia longa família membro 1. *Acss2*, acil-CoA sintetase cadeia curta família membro 2. *Acss3*, acil-CoA sintetase cadeia curta família membro 3. *Acsbg2*, acil-CoA sintetase *bubblegum* família membro 2. Correlação de Pearson *p<0,05.

TABELA 26 – ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENES SELECIONADOS NO GRUPO LEVE

	<i>Acaa2</i>	<i>Acat1</i>	<i>Acs11</i>	<i>Hadh</i>	<i>Hadhb</i>	<i>Kcnj13</i>	<i>Kcnn3</i>	<i>Slc27a2</i>	<i>Acss2</i>	<i>Acsbg2</i>	<i>Acss3</i>
<i>Acaa2</i>	1,00	0,98*	0,16	0,90*	0,97*	-0,31	0,92*	0,98*	-0,20	0,71*	-0,49
<i>Acat1</i>		1,00	0,16	0,92*	0,93*	-0,40	0,91*	0,96*	-0,22	0,76*	-0,48
<i>Acs11</i>			1,00	0,13	0,22	-0,03	0,34	0,12	0,61	0,19	0,73*
<i>Hadh</i>				1,00	0,86*	-0,31	0,83*	0,91*	-0,11	0,80*	-0,47
<i>Hadhb</i>					1,00	-0,29	0,95*	0,96*	-0,13	0,66*	-0,46
<i>Kcnj13</i>						1,00	-0,20	-0,38	-0,16	-0,78*	0,28
<i>Kcnn3</i>							1,00	0,87*	-0,10	0,59	-0,33
<i>Slc27a2</i>								1,00	-0,25	0,75*	-0,50
<i>Acss2</i>									1,00	0,21	0,50
<i>Acsbg2</i>										1,00	-0,37
<i>Acss3</i>											1,00

Nota: níveis de ARNm da região dos núcleos da amígdala cerebral (n=10). *Hadh*, hidroxiacil-CoA dehidrogenase cadeia curta; *Acaa2*, acetil-Coenzima A aciltransferase 2; *Acat1*, acetil-Coenzima A acetiltransferase 1; *Hadhb*, hidroxiacil-Coenzima A dehidrogenase subunidade beta; *Kcnn3*, canal de condutância intermediária/pequena de potássio ativado por cálcio, subfamília N, membro 3; *Slc27a2*, carreador de soluto família 27, membro 2; *Kcnj13*, canal de entrada de potássio, subfamília J, membro 13; *Acs11*, acil-CoA sintetase cadeia longa família membro 1. *Acss2*, acil-CoA sintetase cadeia curta família membro 2. *Acss3*, acil-CoA sintetase cadeia curta família membro 3. *Acsbg2*, acil-CoA sintetase *bubblegum* família membro 2. Correlação de Pearson *p<0,05.

TABELA 27 – ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENES SELECIONADOS NO GRUPO CONTROLE

	<i>Acaa2</i>	<i>Acat1</i>	<i>Acs11</i>	<i>Hadh</i>	<i>Hadhb</i>	<i>Kcnj13</i>	<i>Kcnn3</i>	<i>Slc27a2</i>	<i>Acss2</i>	<i>Acsbg2</i>	<i>Acss3</i>
<i>Acaa2</i>	1,00	0,94*	-0,62	0,72*	0,96*	0,51	0,84*	0,66	0,79*	0,83*	0,01
<i>Acat1</i>		1,00	-0,49	0,76*	0,87*	0,48	0,87*	0,77*	0,81*	0,77*	-0,08
<i>Acs11</i>			1,00	-0,69	-0,43	0,23	-0,75*	-0,72*	-0,47	-0,16	-0,34
<i>Hadh</i>				1,00	0,59	0,10	0,93*	0,89*	0,87*	0,26	0,38
<i>Hadhb</i>					1,00	0,72*	0,68	0,45	0,78*	0,91*	-0,12
<i>Kcnj13</i>						1,00	0,11	-0,13	0,52	0,79*	-0,44
<i>Kcnn3</i>							1,00	0,93*	0,77*	0,45	0,22
<i>Slc27a2</i>								1,00	0,66	0,22	0,26
<i>Acss2</i>									1,00	0,52	0,25
<i>Acsbg2</i>										1,00	-0,40
<i>Acss3</i>											1,00

Nota: níveis de ARNm escolhidos da região dos núcleos da amígdala cerebral ($n=08$). *Hadh*, hidroxiacil-CoA dehidrogenase cadeia curta; *Acaa2*, acetil-Coenzima A aciltransferase 2; *Acat1*, acetil-Coenzima A acetiltransferase 1; *Hadhb*, hidroxiacil-Coenzima A dehidrogenase subunidade beta; *Kcnn3*, canal de condutância intermediária/pequena de potássio ativado por cálcio, subfamília N, membro 3; *Slc27a2*, carreador de soluto família 27, membro 2; *Kcnj13*, canal de entrada de potássio, subfamília J, membro 13; *Acs11*, acil-CoA sintetase cadeia longa família membro 1. *Acss2*, acil-CoA sintetase cadeia curta família membro 2. *Acss3*, acil-CoA sintetase cadeia curta família membro 3. *Acsbg2*, acil-CoA sintetase *bubblegum* família membro 2. Correlação de Pearson * $p<0,05$

TABELA 28 – GENES DIFERENCIALMENTE TRANSCRITOS

ID	pvalor	Descrição ARNm
10345666	0,037	Mus musculus phosducin-like 3 (Pdc13), mRNA.
10348451	0,046	Mus musculus chemokine (C-X-C motif) receptor 7 (Cxcr7), mRNA. Mus musculus phosphoinositide-3-kinase, class 2, beta polypeptide, mRNA
10349834	0,046	(cDNA clone MGC:163772 IMAGE:40130418), complete cds.
10350128	0,046	Mus musculus neuron navigator 1 (Nav1), mRNA.
10350173	0,037	Mus musculus troponin T2, cardiac (Tnnt2), transcript variant 1, mRNA.
10352916	0,037	MI0000712 Mus musculus miR-29b-2 stem-loop
10353127	0,037	Mus musculus PR domain containing 14 (Prdm14), mRNA. ncrna:snoRNA chromosome:NCBIM37:1:51995818:51995939:-1
10354468	0,037	gene:ENSMUSG00000065285 Mus musculus postmeiotic segregation increased 1 (<i>S. cerevisiae</i>) (Pms1), mRNA.
10354542	0,037	mRNA.
10355225	0,037	Putative uncharacterized protein gene:ENSMUSG00000073656 Mus musculus potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 13
10356403	0,037	(Kcnj13), mRNA.
10356780	0,037	Mus musculus PAS domain containing serine/threonine kinase (Pask), mRNA.
10359929	0,037	Mus musculus discoidin domain receptor family, member 2 (Ddr2), mRNA.
10361152	0,046	Mus musculus glutathione S-transferase, pi 2 (Gstp2), mRNA.
10365230	0,046	Mus musculus thymine DNA glycosylase (Tdg), transcript variant 2, mRNA.
10365471	0,046	Mus musculus F-box protein 7 (Fbxo7), mRNA.
10369661	0,046	Mus musculus cell division cycle and apoptosis regulator 1 (Ccar1), mRNA.
10371466	0,037	Mus musculus synapsin III (Syn3), mRNA. cdna:pseudogene chromosome:NCBIM37:10:105244678:105245071:-1
10372204	0,046	gene:ENSMUSG00000058859
10373684	0,046	Mus musculus vomeronasal 2, receptor 86 (Vmn2r86), mRNA.
10374020	0,037	Mus musculus rhomboid domain containing 3 (Rhbdd3), mRNA.
10375574	0,043	Mus musculus olfactory receptor 1373 (Olfr1373), mRNA.
10376813	0,037	Mus musculus cytospin B (Cytsb), mRNA.
10377673	0,043	Mus musculus claudin 7 (Cldn7), mRNA. Mus musculus 2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase (Cnp), transcript variant 2, mRNA.
10381154	0,046	variant 2, mRNA.
10381474	0,046	Mus musculus ADP-ribosylation factor-like 4D (Arl4d), mRNA.
10384044	0,049	Mus musculus myosin, light polypeptide 7, regulatory (Myl7), mRNA. Mus musculus RIKEN cDNA 1700093K21 gene (1700093K21Rik), transcript variant 1, mRNA.
10384685	0,037	variant 1, mRNA.
10385153	0,046	Mus musculus coiled-coil domain containing 99 (Ccdc99), mRNA.
10385768	0,046	Mus musculus olfactory receptor 1373 (Olfr1373), mRNA.
10386189	0,046	Mus musculus olfactory receptor 330 (Olfr330), mRNA.
10386683	0,037	Mus musculus solute carrier family 47, member 1 (Slc47a1), mRNA.
10387648	0,046	Mus musculus transmembrane protein 102 (Tmem102), mRNA. Mus musculus NLR family, pyrin domain containing 1C (Nlrp1c), non-coding RNA.
10388086	0,043	RNA.
10390075	0,037	Mus musculus predicted gene 11545 (Gm11545), mRNA.
10391066	0,046	Mus musculus keratin 17 (Krt17), mRNA.
10393569	0,037	Mus musculus differential display clone 8 (Ddc8), mRNA. Mus musculus RIKEN cDNA 6030426L16 gene, mRNA (cDNA clone
10394837	0,046	MGC:117729 IMAGE:30937101), complete cds.
10397912	0,046	Mus musculus unc-79 homolog (<i>C. elegans</i>) (Unc79), mRNA.
10398380	0,046	ncrna:snoRNA chromosome:NCBIM37:12:110925008:110925079:1

Nota: genes diferencialmente expressos com significância após ANOVA *Kruskal Wallis*. ID, identificador no microarranjo. Análise *post-hoc* para cada gene não revelou diferença significativa entre os grupos A, H, L e C.

gene:ENSMUSG00000064726

10399061	0,046	Mus musculus family with sequence similarity 62 (C2 domain containing), member B (Fam62b), mRNA.
10399648	0,046	Predicted gene:ENSMUSG00000073166
10403911	0,037	Mus musculus glutathione peroxidase 6 (Gpx6), mRNA.
10404294	0,046	Mus musculus prolactin family 3, subfamily b, member 1 (Pr13b1), mRNA.
10404407	0,037	Mus musculus forkhead box C1 (Foxc1), mRNA.
10405063	0,037	Mus musculus osteoglycin (Ogn), mRNA.
10405804	0,046	Mus musculus RIKEN cDNA 0610007P08 gene (0610007P08Rik), transcript variant 1, mRNA.
10406536	0,037	Mus musculus transmembrane protein 167 (Tmem167), mRNA.
10407049	0,037	Putative uncharacterized protein gene:ENSMUSG00000071181
10408227	0,037	Mus musculus hemochromatosis (Hfe), mRNA.
10408684	0,042	Mus musculus transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast) (Tmed10), mRNA.
10410408	0,046	Mus musculus adenylate cyclase 2 (Adcy2), mRNA.
10414433	0,037	Mus musculus RIKEN cDNA 6720456H20 gene (6720456H20Rik), mRNA.
10414612	0,043	Mus musculus solute carrier family 39 (zinc transporter), member 2 (Slc39a2), mRNA.
10415081	0,037	Mus musculus endogenous virus Friend spleen focus-forming virus (SFFVp) cell-line DS19-sc9 envelope glycoprotein 52 mRNA, complete cds.
10416485	0,037	Mus musculus seven in absentia homolog 3 (Drosophila) (Siah3), mRNA.
10417371	0,037	Mus musculus 12 days embryo spinal cord cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:C530005E17 product:hypothetical protein, full insert sequence.
10417485	0,046	Mus musculus RIKEN cDNA D830030K20 gene (D830030K20Rik), mRNA.
10417912	0,046	Mus musculus ubiquitin specific peptidase 54 (Usp54), mRNA.
10419261	0,037	Mus musculus bone morphogenetic protein 4 (Bmp4), mRNA.
10420596	0,046	Mus musculus tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19 (Tnfrsf19), mRNA.
10422946	0,037	Mus musculus RAN binding protein 3-like (Ranbp3l), mRNA.
10427496	0,046	Mus musculus EGF-like, fibronectin type III and laminin G domains (Egflam), mRNA.
10429564	0,046	Mus musculus lymphocyte antigen 6 complex, locus A (Ly6a), mRNA.
10429691	0,043	Mus musculus family with sequence similarity 83, member H (Fam83h), mRNA.
10430006	0,043	Mus musculus solute carrier family 39 (zinc transporter), member 4 (Slc39a4), mRNA.
10430066	0,037	Mus musculus forkhead box H1 (Foxh1), mRNA.
10433027	0,049	Mus musculus neuropeptide FF-amide peptide precursor (Npff), mRNA.
10435043	0,037	Mus musculus transmembrane 4 L six family member 19 (Tm4sf19), mRNA.
10436169	0,046	Mus musculus intraflagellar transport 57 homolog (Chlamydomonas) (Ift57), mRNA.
10436746	0,046	Mus musculus keratin associated protein 13-1 (Krtap13-1), mRNA.
10436841	0,046	Mus musculus interleukin 10 receptor, beta (Il10rb), mRNA.
10437575	0,037	Mus musculus transmembrane protein 114 (Tmem114), mRNA.
10437735	0,046	ncrna:snRNA chromosome:NCBIM37:16:11167198:11167360:-1 gene:ENSMUSG00000064565
10438478	0,037	Mus musculus ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5 (Abcc5), transcript variant 1, mRNA.
10438681	0,046	Mus musculus kininogen 2 (Kng2), transcript variant 1, mRNA.
10438822	0,049	Mus musculus ATPase type 13A5 (Atp13a5), mRNA.
10442172	0,046	Mus musculus zinc finger protein 160 (Zfp160), mRNA.
10442752	0,046	Mus musculus RIKEN cDNA 0610007P22 gene, mRNA (cDNA clone

Nota: genes diferencialmente expressos com significância após ANOVA *Kruskal Wallis*. ID, identificador no microarranjo. Análise *post-hoc* para cada gene não revelou diferença significativa entre os grupos A, H, L e C.

		MGC:29196 IMAGE:5011894), complete cds.
10445376	0,046	Mus musculus predicted gene 9104 (Gm9104), mRNA.
10446071	0,037	Mus musculus feminization 1 homolog a (C. elegans) (Fem1a), mRNA. Mus musculus t-complex-associated testis expressed 3 (Tcte3), transcript variant 1, mRNA.
10448016	0,037	Mus musculus t-complex-associated testis expressed 3 (Tcte3), transcript variant 1, mRNA.
10448023	0,037	Mus musculus t-complex-associated testis expressed 3 (Tcte3), transcript variant 1, mRNA.
10448180	0,046	Mus musculus vomeronasal 1 receptor, F5 (V1rf5), mRNA.
10448186	0,046	Mus musculus zinc finger protein 820 (Zfp820), mRNA.
10448527	0,046	Mus musculus ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 17 (Abca17), mRNA.
10450145	0,046	Mus musculus proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 9 (large multifunctional peptidase 2) (Psm9), mRNA.
10450206	0,037	Mus musculus ring finger protein 5 (Rnf5), mRNA.
10451413	0,046	Mus musculus cDNA sequence BC011248, mRNA (cDNA clone MGC:19067 IMAGE:4192711), complete cds. Mus musculus mannose-6-phosphate receptor binding protein 1 (M6prbp1), mRNA.
10452030	0,046	Mus musculus ring finger protein 125 (Rnf125), mRNA.
10454198	0,046	Mus musculus multiple EGF-like-domains 10 (Megf10), mRNA.
10455826	0,037	Mus musculus N-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment protein gamma (Napg), mRNA.
10456194	0,046	Mus musculus slowmo homolog 1 (Drosophila) (Slmo1), mRNA.
10457038	0,046	Putative uncharacterized protein (Fragment) gene:ENSMUSG00000073519
10457948	0,049	Mus musculus solute carrier family 25, member 46 (Slc25a46), mRNA.
10458016	0,043	Mus musculus protein C (Proc), transcript variant 3, mRNA.
10458560	0,043	Mus musculus fibroblast growth factor 1 (Fgf1), mRNA.
10458870	0,037	PREDICTED: Mus musculus similar to ribosomal protein L6 (LOC628477), misc RNA. Mus musculus malic enzyme 2, NAD(+)-dependent, mitochondrial (Me2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
10459730	0,037	Mus musculus SET binding protein 1 (Setbp1), mRNA.
10459905	0,046	Mus musculus glutathione S-transferase, pi 2 (Gstp2), mRNA.
10464586	0,046	Mus musculus dihydroxyacetone kinase 2 homolog (yeast) (Dak), mRNA.
10466008	0,046	Mus musculus COMM domain containing 3 (Commd3), mRNA.
10469505	0,046	OTU domain-containing protein 1 gene:ENSMUSG00000043415
10469571	0,037	Mus musculus interleukin 1 family, member 5 (delta) (Il1f5), transcript variant 1, mRNA.
10469801	0,046	ncrna:snoRNA chromosome:NCBIM37:2:32687509:32687636:1 gene:ENSMUSG00000064652
10471533	0,046	Mus musculus proteoglycan 2, bone marrow (Prg2), mRNA.
10473399	0,037	Mus musculus purine-selective Na ⁺ nucleoside cotransporter (Cnt2) mRNA, complete cds.
10475502	0,037	Mus musculus polymerase (RNA) I polypeptide B (Polr1b), mRNA.
10475965	0,046	Putative uncharacterized protein gene:ENSMUSG00000067745
10478281	0,046	Mus musculus hepatic nuclear factor 4, alpha (Hnf4a), mRNA.
10478389	0,043	Mus musculus endothelin 3 (Edn3), mRNA.
10479165	0,046	MCG147224 gene:ENSMUSG00000054057
10480321	0,043	Mus musculus complement component 8, gamma polypeptide (C8g), mRNA.
10480751	0,046	Mus musculus olfactory receptor 1163 (Olfr1163), mRNA.
10484714	0,043	cdna:pseudogene chromosome:NCBIM37:2:90870935:90871279:-1 gene:ENSMUSG00000075055
10484925	0,043	

Nota: genes diferencialmente expressos com significância após ANOVA *Kruskal Wallis*. ID, identificador no microarranjo. Análise *post-hoc* para cada gene não revelou diferença significativa entre os grupos A, H, L e C.

10485711	0,046	Mus musculus fin bud initiation factor homolog (zebrafish) (Fibin), mRNA. ncrna:snRNA chromosome:NCBIM37:2:116793776:116793918:-1
10486059	0,046	gene:ENSMUSG00000065794
10489562	0,049	Mus musculus RIKEN cDNA 1700020C07 gene, mRNA (cDNA clone MGC:144223 IMAGE:40099912), complete cds.
10489701	0,037	Mus musculus RIKEN cDNA 4833422F24 gene, mRNA (cDNA clone MGC:28100 IMAGE:3966086), complete cds.
10489723	0,046	Mus musculus zinc finger, MYND-type containing 8 (Zmynd8), mRNA.
10490129	0,049	Mus musculus bone morphogenetic protein 7 (Bmp7), mRNA.
10491848	0,046	Mus musculus La ribonucleoprotein domain family, member 2, mRNA (cDNA clone IMAGE:30935384), complete cds.
10492049	0,046	Mus musculus family with sequence similarity 48, member A (Fam48a), mRNA. PREDICTED: Mus musculus similar to cadherin protein (LOC633371), misc RNA.
10492774	0,046	
10493394	0,046	Mus musculus CDC-like kinase 2 (Clk2), mRNA.
10494271	0,046	Mus musculus cathepsin S (Ctss), mRNA.
10495712	0,046	Mus musculus ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 4 (Abca4), mRNA.
10496580	0,046	Mus musculus guanylate binding protein 3 (Gbp3), mRNA.
10497086	0,046	Putative uncharacterized protein (Fragment) gene:ENSMUSG00000028177
10497337	0,046	Mus musculus carbonic anhydrase 1 (Car1), transcript variant 1, mRNA.
10497358	0,037	Mus musculus signal-regulatory protein beta 1 (Sirpb1), transcript variant 3, mRNA.
10498763	0,046	Mus musculus 7 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A730018D18 product:unclassifiable, full insert sequence.
10498972	0,046	Mus musculus RNA binding motif protein 46 (Rbm46), mRNA.
10498978	0,049	Mus musculus lecithin-retinol acyltransferase (phosphatidylcholine-retinol-O- acyltransferase) (Lrat), mRNA.
10498998	0,046	Mus musculus RIKEN cDNA D930015E06 gene, mRNA (cDNA clone MGC:86126 IMAGE:6842400), complete cds.
10499329	0,046	Mus musculus Rhesus blood group-associated B glycoprotein (Rhbgb), mRNA.
10499696	0,049	cdna:Genscan chromosome:NCBIM37:3:89745075:89769864:-1
10500529	0,046	Mus musculus 3-phosphoglycerate dehydrogenase (Phgdh), mRNA.
10503947	0,037	Mus musculus glycoprotein hormones, alpha subunit (Cga), mRNA.
10506150	0,045	Mus musculus forkhead box D3 (Foxd3), mRNA.
10506583	0,048	Mus musculus tetratricopeptide repeat domain 22 (Ttc22), mRNA.
10511631	0,049	Mus musculus solute carrier family 26, member 7 (Slc26a7), mRNA.
10512334	0,046	Mus musculus predicted gene 13305 (Gm13305), mRNA.
10512356	0,046	Mus musculus predicted gene 13305 (Gm13305), mRNA.
10512757	0,046	Mus musculus hemogen (Hemgn), mRNA.
10513472	0,046	Mus musculus major urinary protein 2 (Mup2), transcript variant 1, mRNA.
10513869	0,046	Mus musculus multiple EGF-like-domains 9 (Megf9), mRNA.
10515378	0,043	Mus musculus 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase-like (Hpd1), mRNA.
10518366	0,046	Mus musculus RIKEN cDNA 2810408P10 gene (2810408P10Rik), mRNA.
10518812	0,037	Mus musculus calmodulin binding transcription activator 1 (Camta1), transcript variant 1, mRNA.
10519644	0,040	Mus musculus predicted gene 6455 (Gm6455), non-coding RNA.
10519677	0,046	Mus musculus predicted gene 6455 (Gm6455), non-coding RNA.
10519998	0,037	Mus musculus leucine rich repeat containing 17 (Lrrc17), mRNA.
10520121	0,037	Mus musculus endogenous virus Friend spleen focus-forming virus (SFFVp) cell-line DS19-sc9 envelope glycoprotein 52 mRNA, complete cds.
10521261	0,049	Mus musculus huntingtin (Htt), mRNA.

Nota: genes diferencialmente expressos com significância após ANOVA *Kruskal Wallis*. ID, identificador no microarranjo. Análise *post-hoc* para cada gene não revelou diferença significativa entre os grupos A, H, L e C.

10523255	0,046	Mus musculus starch binding domain 1 (Stbd1), mRNA. Mus musculus zinc finger and SCAN domain containing 21 (Zscan21), transcript variant 1, mRNA.
10526735	0,046	
10527538	0,037	Mus musculus RAS-like, family 11, member A (Rasl11a), mRNA.
10528821	0,046	Mus musculus predicted gene 10220 (Gm10220), mRNA.
10529264	0,046	Mus musculus spondin 2, extracellular matrix protein (Spon2), mRNA.
10529457	0,037	Mus musculus carboxypeptidase Z (Cpz), mRNA.
10530130	0,049	Mus musculus RELT-like 1 (Rel1), mRNA.
10532407	0,046	Mus musculus E1A binding protein p400 (Ep400), transcript variant 1, mRNA.
10533725	0,037	Mus musculus G protein-coupled receptor 81 (Gpr81), mRNA.
10534935	0,046	Mus musculus paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta 1 (Pilrb1), mRNA. Mus musculus amiloride binding protein 1 (amine oxidase, copper-containing)
10538163	0,046	(Abp1), transcript variant 3, mRNA.
10539008	0,037	Mus musculus vacuolar protein sorting 24 (yeast) (Vps24), mRNA. Mus musculus tubulin tyrosine ligase-like family, member 3 (Ttl3), transcript variant 1, mRNA.
10540659	0,049	
10541002	0,037	Mus musculus DNA segment, Chr 6, Wayne State University 116, expressed, mRNA (cDNA clone MGC:66612 IMAGE:6827177), complete cds.
10541049	0,049	Mus musculus membrane-associated ring finger (C3HC4) 8 (March8), mRNA.
10542714	0,046	Mus musculus LYR motif containing 5 (Lym5), mRNA.
10543494	0,037	Mus musculus glutamate receptor, metabotropic 8 (Grm8), mRNA.
10543785	0,046	Mus musculus brain cDNA, clone MNCb-1768.
10544438	0,046	Mus musculus olfactory receptor 456 (Olfr456), mRNA.
10545881	0,037	Mus musculus camello-like 2 (Cml2), mRNA. Mus musculus RNA pseudouridylate synthase domain containing 3 (Rpusd3), mRNA.
10546919	0,046	
10547153	0,049	Mus musculus arachidonate 5-lipoxygenase (Alox5), mRNA.
10548086	0,049	Mus musculus RAD51 associated protein 1 (Rad51ap1), mRNA.
10548692	0,046	Mus musculus kidney androgen regulated protein (Kap), mRNA. Mus musculus carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 14
10550453	0,046	(Ceacam14), mRNA.
10553197	0,043	MCG147776 gene:ENSMUSG00000051803
10553256	0,046	Mus musculus myogenic differentiation 1 (Myod1), mRNA.
10555834	0,046	Mus musculus olfactory receptor 633 (Olfr633), mRNA.
10556297	0,046	Mus musculus adrenomedullin (Adm), mRNA.
10558403	0,046	Putative uncharacterized protein gene:ENSMUSG00000073803 Mus musculus reticulocalbin 3, EF-hand calcium binding domain (Rcn3), mRNA.
10563077	0,037	
10563441	0,046	Mus musculus epithelial membrane protein 3 (Emp3), transcript variant 1, mRNA.
10564539	0,046	Mus musculus multiple C2 domains, transmembrane 2 (Mctp2), mRNA.
10565383	0,046	Mus musculus olfactory receptor 309 (Olfr309), mRNA.
10565858	0,046	Mus musculus predicted gene 5115 (Gm5115), mRNA.
10565962	0,046	Mus musculus purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 2 (P2ry2), mRNA. Mus musculus tripartite motif-containing 21 (Trim21), transcript variant 1, mRNA.
10566144	0,046	
10566292	0,049	Mus musculus olfactory receptor 639 (Olfr639), mRNA.
10568131	0,046	Mus musculus RIKEN cDNA 2900092E17 gene (2900092E17Rik), mRNA.
10570693	0,046	Mus musculus defensin, alpha, 5 (Defa5), mRNA.
10571233	0,046	Mus musculus fucosyltransferase 10 (Fut10), mRNA.
10571657	0,037	Mus musculus acyl-CoA synthetase long-chain family member 1 (Acs11),

Nota: genes diferencialmente expressos com significância após ANOVA *Kruskal Wallis*. ID, identificador no microarranjo. Análise *post-hoc* para cada gene não revelou diferença significativa entre os grupos A, H, L e C.

		mRNA.
10571774	0,046	Mus musculus aspartylglucosaminidase (Aga), mRNA.
10571840	0,046	Mus musculus hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15 (NAD) (Hpgd), mRNA. Mus musculus adult male olfactory brain cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:6430601O08 product:similar to Pol protein (Fragment) [Mus
10572739	0,037	musculus], full insert sequence. Mus musculus adaptor-related protein complex AP-1, mu subunit 1 (Ap1m1),
10572786	0,037	mRNA.
10575833	0,046	Mus musculus hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2 (Hsd17b2), mRNA.
10576942	0,046	ncrna:rRNA chromosome:NCBIM37:8:9568132:9568249:-1 gene:ENSMUSG00000064618 Mus musculus endogenous virus Friend spleen focus-forming virus (SFFVp)
10578405	0,037	cell-line DS19-sc9 envelope glycoprotein 52 mRNA, complete cds. Mus musculus solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 1
10579023	0,046	(Slc18a1), mRNA.
10583365	0,046	Mus musculus methyl-CpG binding domain protein 3-like 2 (Mbd3l2), mRNA.
10584576	0,037	Mouse 4.5S RNA able to hybridize to mRNA and 18S rRNA.
10584578	0,037	Mouse 4.5S RNA able to hybridize to mRNA and 18S rRNA.
10584580	0,046	ncrna:snoRNA chromosome:NCBIM37:9:40612831:40612920:1 gene:ENSMUSG00000064791 Mus musculus C1q and tumor necrosis factor related protein 5 (C1qtnf5),
10584653	0,043	transcript variant 1, mRNA.
10585555	0,046	Mus musculus proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1 (Pstpip1), mRNA.
10586076	0,037	Mus musculus endogenous virus Friend spleen focus-forming virus (SFFVp)
10586140	0,037	cell-line DS19-sc9 envelope glycoprotein 52 mRNA, complete cds.
10588219	0,046	Mus musculus lactase-like (Lct1), mRNA.
10588419	0,046	cdna:Genscan chromosome:NCBIM37:9:102450544:102472960:1 Mus musculus asteroid homolog 1 (Drosophila) (Aste1), mRNA.
10590269	0,046	Mus musculus myelin-associated oligodendrocytic basic protein (Mobp), transcript variant 1, mRNA.
10590892	0,049	Mus musculus centrosomal protein 57 (Cep57), mRNA.
10593032	0,046	Mus musculus adhesion molecule, interacts with CXADR antigen 1 (Amica1), mRNA.
10593159	0,037	Mus musculus platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, subunit 2 (Pafah1b2), mRNA.
10593332	0,046	Mus musculus beta-carotene oxygenase 2 (Bco2), mRNA.
10594044	0,049	Mus musculus coiled-coil domain containing 33 (Ccdc33), mRNA.
10595050	0,046	ncrna:snRNA chromosome:NCBIM37:9:75818700:75818834:-1 gene:ENSMUSG00000084656
10595695	0,043	Mus musculus TBC1 domain family, member 2B (Tbc1d2b), mRNA.
10596680	0,049	Mus musculus cDNA sequence BY080835 (BY080835), mRNA.
10597775	0,046	ncrna:misc_RNA chromosome:NCBIM37:9:120700576:120700903:-1 gene:ENSMUSG00000064397
10598081	0,046	gi 34538597 ref NC_005089.1 :c5257-5192, tRNA-Cys Mus musculus RIKEN cDNA 4930408F14 gene, mRNA (cDNA clone
10598229	0,046	MGC:143459 IMAGE:40089629), complete cds.
10598573	0,046	Putative uncharacterized protein gene:ENSMUSG00000045797 Mus musculus RIKEN cDNA 4930408F14 gene, mRNA (cDNA clone
10599092	0,046	MGC:143459 IMAGE:40089629), complete cds.
10600031	0,049	Mus musculus ribosomal protein L30 (Rpl30), mRNA.
10600471	0,046	Mus musculus inhibitor of kappaB kinase gamma (Ikbkg), transcript variant 4, mRNA.

Nota: genes diferencialmente expressos com significância após ANOVA *Kruskal Wallis*. ID, identificador no microarranjo. Análise *post-hoc* para cada gene não revelou diferença significativa entre os grupos A, H, L e C.

10603228	0,046	Mus musculus midline 1 (Mid1), transcript variant 1, mRNA.
10604576	0,037	Mus musculus glypican 4 (Gpc4), mRNA.
10606924	0,037	Mus musculus extraembryonic, spermatogenesis, homeobox 1 (Esx1), mRNA. Mus musculus TSR2, 20S rRNA accumulation, homolog (S. cerevisiae) (Tsr2), mRNA.
10607324	0,046	---
10354414	0,046	---
10397602	0,046	---
10404937	0,046	---
10568731	0,037	---
10608649	0,049	Mus musculus retinoic acid early transcript beta (Raet1b), mRNA
10608716	0,046	Mus musculus RIKEN cDNA 2310042D19 gene (2310042D19Rik), mRNA
10599086	0,046	-

Nota: genes diferencialmente expressos com significância após ANOVA *Kruskal Wallis*. ID, identificador no microarranjo. Análise *post-hoc* para cada gene não revelou diferença significativa entre os grupos A, H, L e C.

TABELA 29 – GENES COM 90% DE PODER DISCRIMINANTE

ID	Locus ou Símbolo	Descrição
10346168	Stat4	signal transducer and activator of transcription 4
10348451	Cxcr7	chemokine (C-X-C motif) receptor 7
10350853	ENSMUST00000046743	cDNA sequence BC026585
10352916	BC058715	RIKEN cDNA C030002C11 gene miRBase Micro RNA Database
10354203	ENSMUST00000083002	ncrna:snoRNA chromosome:NCBIM37:1:39630591:39630720:-1 gene:ENSMUSG00000064936
10361152	Gstp2	glutathione S-transferase, pi 2
10363512	Sar1a	SAR1 gene homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)
10372204	ENSMUST00000072136 // AK038374	dna:pseudogene chromosome:NCBIM37:10:105244678:105245071:-1 gene:ENSMUSG00000058859 // Mus musculus 16 days neonate thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A130099L09 product:hypothetical protein, full insert sequence.
10373684	Vmn2r86	vomeronasal 2, receptor 86
10381548	BC030867	cDNA sequence BC030867
10385768	Olf137	olfactory receptor 1373
10387029	Dnahc9	dynein, axonemal, heavy chain 9
10390075	Gm11545	predicted gene 11545
10393569	RP23-394O9.3	differential display clone 8
10394080	ENSMUST00000119569	cdna:pseudogene chromosome:NCBIM37:11:121026785:121027239:-1 gene:ENSMUSG00000081835 // cdna:Genscan chromosome:NCBIM37:11:121026773:121028707:-1
10399407	Vsnl1	visinin-like 1
10399584	AK144596	RIKEN cDNA G730007D18 gene
10405063	Ogn	osteoglycin
10406845	Foxd1	forkhead box D1
10410124	Ctsl	cathepsin L
10414489	Olf1745	olfactory receptor 745
10417485	D830030K20Rik	RIKEN cDNA D830030K20 gene // predicted gene 5458 // RIKEN cDNA D830030K20 gene // predicted gene, ENSMUSG00000072735
10419261	Bmp4	bone morphogenetic protein 4
10420596	Tnfrsf19	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19
10422013	Klf12	Kruppel-like factor 12
10422946	Ranbp3l	RAN binding protein 3-like
10429691	Fam83h	family with sequence similarity 83, member H
10436841	Il10rb	interleukin 10 receptor, beta
10442211	Zfp53	zinc finger protein 53
10445376	Gm9104	Mus musculus predicted gene 9104 (Gm9104), mRNA. // Mus musculus ribosomal protein L21 (Rpl21), mRNA.
10442752	ENSMUST00000063574	RIKEN cDNA 0610007P22 gene BAI1-associated protein 3
10448180	V1rf5	vomeronasal 1 receptor, F5
10452427	BC016608	Mus musculus cDNA clone MGC:27981 IMAGE:3596365, complete cds.
10455826	Megf10	multiple EGF-like-domains 10
10457038	ENSMUST00000097503	Putative uncharacterized protein (Fragment) gene:ENSMUSG00000073519
10461979	Aldh1a1	Aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A1

Nota: genes diferencialmente expressos com significância após ANOVA *Kruskal Wallis*. ID, identificador no microarranjo. Análise *post-hoc* para cada gene não revelou diferença significativa entre os grupos A, H, L e C.

10464586	Gstp2	glutathione S-transferase, pi 2
10473399	Prg2	proteoglycan 2, bone marrow
10475502	Slc28a2	solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 2
10476614	ENSMUST00000122220	cdna:pseudogene chromosome:NCBIM37:2:142396244:142396682:1 gene:ENSMUSG00000081125
10477439	Gm5840	Mus musculus predicted gene 5840 (Gm5840), mRNA.
10484559	Olfir1040	olfactory receptor 1040
10485388	Ldlrad3	low density lipoprotein receptor class A domain containing 3
10492774	LOC633371	similar to dachsous 2 isoform 2
10495712	Abca4	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 4
10495976	Pitx2	paired-like homeodomain transcription factor 2
10498978	Lrat	lecithin-retinol acyltransferase (phosphatidylcholine-retinol-O-acyltransferase)
10503947	Cga	glycoprotein hormones, alpha subunit
10507152	Cyp4a12b	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 12B
10511679	Decr1	2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial
10512757	Hemgn	hemogen
10514275	Ptplad2	protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 2
10514323	ENSMUSG00000073810	Mus musculus lung RCB-0558 LLC cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:G730031P11 product:hypothetical EGF-like domain containing protein, full insert sequence. // PREDICTED: Mus musculus predicted gene, ENSMUSG00000073810 (ENSMUSG00000073810), mRNA.
10517883	Necap2	NECAP endocytosis associated 2
10518812	Camta1	calmodulin binding transcription activator 1
10522391	Zar1	zygote arrest 1
10529264	Spon2	spondin 2, extracellular matrix protein
10530130	Rell1	RELT-like 1
10542714	Lyrn5	LYR motif containing 5
10543494	Grm8	glutamate receptor, metabotropic 8 // glutamate receptor, metabotropic 8 // glutamate receptor, metabotropic 8
10544417	Epha1	Eph receptor A1
10545881	Cml2	camello-like 2
10553197	ENSMUST00000063311	MCG147776 gene:ENSMUSG00000051803
10553256	Myod1	myogenic differentiation 1
10563441	Emp3	epithelial membrane protein 3
10568131	2900092E17Rik	Mus musculus RIKEN cDNA 2900092E17 gene (2900092E17Rik), mRNA. // PAXIP1-associated protein 1 gene:ENSMUSG00000030680 // Mus musculus RIKEN cDNA 2900092E17 gene, mRNA (cDNA clone IMAGE:6835446).
10570738	ENSMUST00000119719	cdna:pseudogene chromosome:NCBIM37:8:22859647:22860472:1 gene:ENSMUSG00000084254 // cdna:Genscan chromosome:NCBIM37:8:22845009:22873341:1
10571233	Fut10	fucosyltransferase 10
10579860	Smad1	MAD homolog 1 (Drosophila)
10583316	Taf1d	TATA box binding protein (Tbp)-associated factor, RNA polymerase I, D
10584576	Hspa8	heat shock protein 8
10584580	ENSMUST00000082857	ncrna:snoRNA chromosome:NCBIM37:9:40612831:40612920:1 gene:ENSMUSG00000064791

Nota: genes diferencialmente expressos com significância após ANOVA *Kruskal Wallis*. ID, identificador no microarranjo. Análise *post-hoc* para cada gene não revelou diferença significativa entre os grupos A, H, L e C.

10586865	Aldh1a2	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A2
10594188	Nr2e3	nuclear receptor subfamily 2, group E, member 3
10596958	ENSMUST00000083740	ncrna:snRNA chromosome:NCBIM37:9:108641083:108641189:-1 gene:ENSMUSG00000065674
10600031	ENSMUST00000101496	Isoform 2 of Vacuolar ATPase assembly integral membrane protein VMA21 gene:ENSMUSG00000073131
10604576	Gpc3	glypican 3 cdna:pseudogene chromosome:NCBIM37:X:64222398:64223834:-1
10604879	Gm6783	gene:ENSMUSG00000080795 // PREDICTED: Mus musculus similar to checkpoint suppressor 1 (LOC627734), misc RNA. // cdna:Genscan chromosome:NCBIM37:X:64215655:64223672:-1
10606333	Fndc3c1	fibronectin type III domain containing 3C1 cdna:pseudogene chromosome:NCBIM37:X:133738154:133741302:-1
10606924	ENSMUST00000118089	gene:ENSMUSG00000082955 // cdna:Genscan chromosome:NCBIM37:X:133732917:133739117:-1
10558403	ENSMUST00000097982	Putative uncharacterized protein gene:ENSMUSG00000073803

Nota: genes diferencialmente expressos com significância após ANOVA *Kruskal Wallis*. ID, identificador no microarranjo. Análise *post-hoc* para cada gene não revelou diferença significativa entre os grupos A, H, L e C.