

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

**DANIEL ALMEIDA DA SILVA E SILVA**

**GENE LRRK2 E SEU PAPEL NO CONTROLE DO CONSUMO COMPULSIVO DE  
ETANOL: DA ABORDAGEM TRANSCRITÔMICA AO ISOLAMENTO DE UM  
GENE CANDIDATO**

**Belo Horizonte**

**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

**DANIEL ALMEIDA DA SILVA E SILVA**

**GENE LRRK2 E SEU PAPEL NO CONTROLE DO CONSUMO COMPULSIVO DE  
ETANOL: DA ABORDAGEM TRANSCRITÔMICA AO ISOLAMENTO DE UM  
GENE CANDIDATO**

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: Genética Molecular e  
de Microrganismos

Orientação:

Prof. Dr. Ana Lúcia Brunialti Godard –  
Universidade Federal de Minas Gerais

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas àquelas pessoas envolvidas na execução deste projeto e, principalmente, na minha formação profissional durante meu período de doutoramento no Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais.

Ana Lúcia, obrigado por todos esses anos de convivência e aprendizado. Obrigado por sempre me incentivar e por ter contribuído e feito parte do meu crescimento profissional.

Aos demais alunos do Laboratório de Genética Animal e Humana, agradeço a cada um pela ajuda e pelos momentos compartilhados.

Corpo docente do PPG em Genética, obrigado pelos ensinamentos repassados durante todos os anos. O meu reconhecimento ao trabalho de cada um de vocês.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), um agradecimento muito especial ao suporte financeiro durante meu período doutoral, em especial ao financiamento concernente ao meu período de doutorado sanduíche.

Aos amigos do *Laboratory for Integrative Neuroscience* no NIAAA/NIH, obrigado por todo o aprendizado científico e pelo crescimento pessoal durante o ano de 2015.

Veronica Alvarez, o meu muito obrigado pela oportunidade de ter feito parte da comunidade do *National Institute of Health* (NIH) e por ter contribuído sobremaneira no meu aprendizado em neurociência. Obrigado pela disposição e pelos ensinamentos.

Aos meus pais e a minha família, pelo apoio a todo o momento.

Camila Henriques, obrigado por estar ao meu lado durante todo o tempo. Sem você nada disso seria possível.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>XI</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>XIII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Adição e alcoolismo .....	1
1.2 Neurobiologia: o substrato biológico da adição .....	2
1.2.1 O sistema de recompensa .....	3
1.2.2 Neurobiologia da adição: a progressão do consumo controlado à compulsão .....	4
1.3 Genética do alcoolismo.....	7
1.4 O uso de modelos animais para estudo do alcoolismo.....	10
1.4.1 O modelo de livre escolha.....	11
1.4.1.1 Procedência dos camundongos .....	11
1.4.1.2 Procedimentos do Modelo de Livre Escolha.....	11
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
3.1. Análise molecular e busca de genes candidatos.....	17
3.1.1. Obtenção e armazenamento do material biológico .....	17
3.1.2. Extração do RNA total.....	17
3.1.3. Procedimentos para Análise Molecular da Reação de Microarranjo.....	18
3.1.4. Normalização e análise exploratória dos dados do microarranjo.....	18

3.1.5. Procedimentos para Análise Molecular da PCR em tempo real .....	19
3.1.5.1. Desenho dos iniciadores .....	19
3.1.5.2. Confecção do DNA complementar e quantificação dos transcritos através da PCR em tempo real.....	20
3.1.5.3. Normalização dos dados da PCR em tempo real.....	21
3.2. Análise funcional do gene <i>Lrrk2</i> .....	21
3.2.1. Animais .....	21
3.2.3. Campo aberto .....	22
3.2.4. Procedimento de acesso crônico, intermitente e por livre escolha ao etanol.....	22
3.2.5. Adulteração por quinino .....	23
3.2.6. Preferência por quinino .....	24
3.2.7. Condicionamento operante: autoadministração de etanol.....	24
3.2.7.1. Caixas de condicionamento operante .....	24
3.2.7.2. Autoadministração de etanol: Cronograma de treinamento operante.....	25
3.2.7.3. Sessão de “Razão progressiva” ( <i>Progressive Ratio</i> , ou <i>Breakpoint</i> ).....	26
3.2.8. Perda do reflexo de endireitamento (LORR, <i>Loss Of Righting Reflex</i> ) .....	26
3.2.9. Análise de concentração de etanol sanguíneo.....	27
3.3. Análise estatística.....	28
4. RESULTADOS .....	29
4.1. Análise da expressão gênica em larga escala.....	29
4.1.1. Normalização .....	29
4.1.2. Análise estatística .....	30
4.1.3. Análise exploratória dos dados .....	30
4.2. Validação da via LRRK2 como candidata à perda de controle.....	33
4.2.1. Quantificação relativa dos transcritos por qPCR .....	34
4.3. Validação Funcional.....	36
4.3.1. Campo aberto .....	36

4.3.2. Procedimento de acesso crônico, intermitente e por livre escolha ao etanol.....	38
4.3.3. Adulteração por quinino .....	40
4.3.4. Preferência por quinino .....	42
4.3.5. Condicionamento operante: autoadministração de etanol.....	43
4.3.5.1. Motivação.....	48
4.3.6. Perda do reflexo de endireitamento (LORR, <i>Loss Of Righting Reflex</i> ) .....	49
5. DISCUSSÃO.....	51
5.1. Considerações gerais .....	51
5.1.1. Explicação do modelo de livre escolha .....	51
5.1.2 O estriado em foco.....	52
5.2. Análise molecular.....	52
5.2.1. Normalização dos dados do <i>array</i> .....	52
5.2.2. Análise exploratória.....	52
5.2.3. PCR em tempo real.....	54
5.3. Validação Funcional.....	55
5.3.1. Validação do gene <i>Lrrk2</i> como fator contribuinte no desenvolvimento do comportamento de consumo excessivo e compulsivo de etanol em camundongos .....	55
5.3.2. Campo aberto .....	57
5.3.3. Procedimento de acesso crônico, intermitente e por livre escolha ao etanol.....	60
5.3.4. Adulteração por quinino .....	62
5.3.5. Condicionamento operante .....	64
5.3.5.1. Conceito introdutório .....	64
5.3.5.2. Condicionamento operante: autoadministração de etanol .....	65
5.3.5.3. Autoadministração de etanol em animais LRRK2 KO .....	66
5.3.5.4. Motivação.....	68
5.3.6. Perda do reflexo de endireitamento (LORR, <i>Loss Of Righting Reflex</i> ) .....	69

6. CONCLUSÃO E SUMÁRIO DE RESULTADOS.....	71
7. REFERÊNCIAS .....	72
APÊNDICE 1 .....	85
APÊNDICE 2 .....	86
ANEXO I: CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO "INFLEXIBLE ETHANOL INTAKE: A PUTATIVE LINK WITH THE LRRK2 PATHWAY" À REVISTA BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH.....	108
ANEXO II: CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO "LOSS OF CONTROL OVER THE ETHANOL CONSUMPTION: DIFFERENTIAL TRANSCRIPTIONAL REGULATION IN PREFRONTAL CORTEX" À REVISTA JOURNAL OF NEUROGENETICS .....	109

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Substratos cerebrais diretamente envolvidos no estabelecimento das desordens do uso de substâncias. ....	4
<b>Figura 2:</b> O Modelo de livre escolha.....	12
<b>Figura 3:</b> Clusterização dos camundongos de maneira hipótese-independente.....	14
<b>Figura 4:</b> Caixa de condicionamento operante.....	25
<b>Figura 5:</b> Visão geral dos genes diferencialmente REGULADOS .....	33
<b>Figura 6:</b> Quantificação dos transcritos estriatais representativos dos genes da via LRRK2 nos diferentes grupos experimentais .....	35
<b>Figura 7:</b> Avaliação do comportamento tipo ansioso a partir do teste do campo aberto .....	37
<b>Figura 8:</b> Perfil de consumo crônico e intermitente de etanol em animais KO e selvagens. ....	38
<b>Figura 9:</b> Preferência por etanol entre camundongos KO e selvagens.....	39
<b>Figura 10:</b> Consumo total de fluido durante procedimento de livre escolha.....	40
<b>Figura 11:</b> Redução no consumo de etanol após a adulteração das soluções etílicas com quinino.....	41
<b>Figura 12:</b> Redução na preferência por etanol após a adulteração das soluções etílicas com quinino.....	42
<b>Figura 13:</b> Teste de preferência por quinino.....	43
<b>Figura 14:</b> Diferenças no comportamento operante entre camundongos LRRK2 KO e selvagens .....	44
<b>Figura 15:</b> Padrão microestrutural das respostas operante durante uma sessão de autoadministração de etanol.....	45
<b>Figura 16:</b> Análise do padrão de lambidas durante as sessões de autoadministração de etanol .....	46

<b>Figura 17:</b> Microestrutura do parâmetro lambdas ao longo das sessões de autoadminitração de etanol.....	46
<b>Figura 18:</b> Consumo de etanol durante protocolo de autoadministração operante .....	47
<b>Figura 19:</b> Fatores preditivos da quantidade de etanol consumida nas sessões de autoadministração.....	47
<b>Figura 20:</b> Quantificação do componente motivacional para busca e tomada do álcool através do teste de <i>Breakpoint</i> .....	48
<b>Figura 21:</b> LORR, perda do reflexo de endireitamento .....	49
<b>Figura 22:</b> LORR como fator preditivo para comportamentos associados ao uso do etanol	50
<b>Figura 23:</b> Hipótese biológica correlacionando o comportamento do tipo compulsivo/inflexível com distúrbios na via LRRK2.....	58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Critérios classificatórios para o diagnóstico das Desordem do uso de substâncias. .....	1
Tabela 2- Eficiência de hibridação nos <i>arrays</i> .....	29
Tabela 3- Vias candidatas diferencialmente reguladas entre animais do grupo leve e inflexível.. .....	31
Tabela 4- Domínios funcionais da via LRRK2 .....	34
Tabela 5- Parâmetros motores avaliados no aparato do campo aberto.. .....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS

5HTT – Transportador de serotonina

Actg1 - Actina gama 1

ADH - Álcool desidrogenase

ALDH - Aldeído desidrogenase

Amig – Amígdala

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

Ap2a1 - Complexo de proteínas relacionadas ao adaptador-2 subunidade alfa

APA – *American Psychiatric Association*

BEC - Concentração plasmática de etanol

cDNA – DNA complementar

Cltc - Cadeia pesada da clatrina

COGA - *Collaborative Studies on Genetics of Alcoholism*

COMT - Catecol – orto – metiltransferase

CPF – Córtex pré-frontal

Cq – *Cycle quantification*

CREB - *cAMP-response element-binding protein*

CRF - Fator de liberação de corticotropina

DRD – *Dopamine receptor*

DSM - *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*

DUA – Desordens no uso de álcool

Ezr – Ezrina

FR - *Fixed-Ratio*

GABA – Ácido gama-aminobutírico

Gapdh - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GDR – Genes diferencialmente regulados

GO – *Gene Ontology*

HIP - Hipocampo

HPA - Eixo Hipotalâmico-Pituitária-Adrenal

HVA – Ácido homovalínico

KO – *Knockout*

KS - Kolmogorov-Smirnov

LORR – *Loss of right reflex*

Lrrk2 – Quinase rica em repetições de leucina 2

MAO – Monoaminaoxidase

Mapt1 - Proteína Tau associada a microtúbulos

Msn - Moesina

NAC – Núcleo accubens

NIAAA - *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*

NMDAR - Receptores ionotrópicos do glutamato

PCA – Análise de componentes principais

PCR – Reação em cadeia da polimerase

Pfp - *Predictions of false positive*

Pka – Proteína quinase A

Ppia - Peptidilprolil isomerase A

qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa

Rdx – Radixina

RNA – Ácido ribonucleico

Snca - Sinucleína alfa

SNP – *Single-nucleotide polymorphism*

VNTR - *Variable number of tandem repeat*

VTA – Área tegmentar ventral

## RESUMO

O consumo excessivo e descontrolado do álcool apesar das consequências legais, econômicas ou sociais envolvidas, caracteriza uma condição denominada “Desordem no uso de álcool”, ou alcoolismo. O álcool é uma das poucas drogas psicotrópicas (com potencial de abuso ou dependência) que tem seu consumo admitido e até incentivado. Nos últimos 20 anos, essa desordem passou de oitavo para quinto principal fator de risco para a mortalidade precoce e incapacidade na população mundial, sendo responsável por 2,5 milhões de mortes em todo o mundo no ano de 2010. Clinicamente, o consumo ocasional e controlado de uma droga psicotrópica é distinto do seu uso escalonado e sem controle. A progressão do uso controlado à adição é influenciada por muitos fatores, entre eles, a droga por si, fatores psicológicos, influências ambientais e fatores genéticos. Com o objetivo de tentar elucidar os fatores genéticos que possam predispor ou contribuir para o desenvolvimento do comportamento de consumo compulsivo e sem controle do álcool, avaliou-se o transcriptoma estriatal de um modelo murino de consumo crônico e por livre escolha de etanol. Neste modelo, após 16 semanas de consumo crônico de etanol, os animais foram subdivididos em três grupos, de acordo com seu perfil de consumo da droga: “Grupo leve” (preferência por água em todo o experimento); “Grupo pesado” (preferência pelo etanol com redução significativa no consumo quando a droga é adulterada por quinino); “Grupo Inflexível” (preferência pelo etanol e consumo excessivo, mesmo após a adulteração da solução etílica). Através da técnica de microarranjo, foram comparados os níveis de transcritos desses animais em uma região cerebral denominada estriado, a qual é responsável pelos mecanismos de reforço positivo e formação de hábito, processos diretamente afetados durante a progressão da doença. Através das análises de expressão verificou-se que diversos genes constituintes da via *LRRK2 in neurons in Parkinson’s disease* estão desregulados entre os diferentes grupos de animais, e que, unicamente o gene *Lrrk2*, quinase reguladora desta via, se mostrou hiper-regulado apenas nos animais do grupo inflexível. Este gene é responsável por controlar processos neuronais como receptação de proteínas sinápticas, plasticidade e desenvolvimento de espinhos sinápticos. A validação funcional deste gene mostrou que animais *knockout* para o gene *Lrrk2* apresentam, em comparação com animais selvagens, uma maior preferência e um maior consumo espontâneo de etanol, uma maior motivação para buscar e consumir a droga, um consumo do tipo inflexível compulsivo, um maior estado basal de ansiedade e uma menor sensibilidade inicial aos efeitos hipnóticos do etanol. Em conjunto, esses dados corroboram o gene *Lrrk2* (ou seu produto proteico) como um importante substrato molecular responsável pela consolidação do consumo compulsivo e sem controle de etanol.

## ABSTRACT

Alcohol compulsive drinking despite serious adverse medical, social and economic consequences is a characteristic of alcohol use disorders (AUD). Alcohol is the most commonly used addictive substance, and has its admitted use and even encouraged. Over the past 20 years, this disorder has raised from eighth to fifth leading risk factor for premature death and disability in the world's population, accounting for 2.5 million deaths worldwide in 2010. Clinically, an occasional and controlled drug consumption is distinct from addiction. The progression from controlled consumption to loss of control or compulsion is influenced by many factors, including the drug itself, psychological factors and environmental and genetic factors. In order to try to elucidate the genetic factors that can drive or contribute to development of compulsive behavior and uncontrolled alcohol intake, it was evaluated the transcriptome of the striatal region in a murine model of chronic consumption and free choice ethanol. In this model, after 16 weeks of chronic ethanol intake, the animals were divided into three groups according to their drug use profile: "Light group" (preference for water throughout the experiment); "Heavy Group" (preference for ethanol, but significantly intake reduction when the drug is taste-adulterated by quinine); "Inflexible Group" (preference for ethanol and overconsumption, even after the taste-adulteration). Assessed by microarray assay, the global transcription levels of these animals were compared in a so-called striatum region of the brain, which is involved in the positive reinforcement and habit-forming mechanisms, processes directly affected during the progression of the disease. Through the expression analysis, it was found that the LRRK2 in neurons in Parkinson's disease pathway is deregulated between the different groups, and among all genes in this pathway, the *Lrrk2* gene was the only gene found hyper-regulated just in those inflexible animals. This gene is responsible for controlling neuronal processes such as reuptake of synaptic proteins, synaptic plasticity and development of dendritic spines. In comparison with the wild-type animals, the functional validation of this gene showed that knockout animals for the *Lrrk2* gene have an enhanced preference to and ethanol consumption, an increased motivation to the drug seeking and taking, an inflexible or compulsive ethanol consumption, an enhanced basal state of anxiety and a decreased sensitivity to the sedative effects of ethanol. Together, these data support the *Lrrk2* gene as an important molecular substrate responsible for the consolidation of compulsive and uncontrolled ethanol consumption.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Adição e alcoolismo

Adição é uma condição patológica crônica caracterizada pela procura incessante e compulsiva por estímulos gratificantes apesar das consequências adversas relacionadas (Hyman *et al.*, 2006). De maneira específica, adição a drogas é caracterizada por uma busca contínua e compulsiva por uma determinada droga, perda do controle sob seu consumo e surgimento de um estado emocional negativo associado à restrição do seu acesso (Koob e Le Moal, 1997). Semiologicamente, adição a drogas é classificada de acordo com um conjunto de critérios definidos no Manual diagnóstico e estatístico de desordens mentais (DSM) levando em consideração aspectos físicos, psicológicos e sociais (APA, 2013). Na sua quinta edição (DSM-V) o critério classificatório combina as extintas categorias “Abuso de substâncias” e “Uso de substâncias” em uma única desordem medida em um espectro de leve a grave, denominada “Desordem no uso de substâncias” (Tabela 1).

**Tabela 1:** Critérios classificatórios para o diagnóstico das Desordem do uso de substâncias, de acordo com o manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais (DSM-V), desenvolvido pela Associação Americana de Psiquiatria. Fonte: American Psychiatric Association, 2013.

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 ( <i>withdrawal</i> ).
3	Uso por longos períodos ou grandes quantidades.
4	Desejo persistente ou insucessos na tentativa de parar o uso.
5	Aumento de tempo gasto para obter, usar ou recuperar-se dos efeitos da droga.
6	Uso continuado apesar do conhecimento de que a droga causa ou exacerba um prejuízo em sua saúde.
7	Atividades sociais, ocupacionais ou recreacionais são evitadas ou reduzidas em função do uso da droga.
8	Uso recorrente resultando em falha no cumprimento de obrigações.
9	Uso recorrente resultando em comportamentos fisicamente perigosos (ex.: dirigir).
10	Uso continuado apesar de recorrentes problemas sociais associados ao uso.
11	Desejo incontrolável pela substância ( <i>craving</i> ).

Nesse contexto, pacientes que fazem o uso de etanol e se enquadram no perfil diagnóstico estabelecido pelo DSM-V são ditos adictos em álcool ou alcoolistas, com o quadro clínico podendo variar de leve a grave.

O álcool é uma das poucas drogas psicotrópicas (com potencial de abuso ou dependência) que tem seu consumo admitido e até incentivado. Apesar de sua ampla aceitação social o consumo de bebidas alcoólicas, quando excessivo, torna-se um problema tanto para o indivíduo quanto para a sociedade (Galduroz e Caetano, 2004). Nos últimos 20 anos, as desordens no uso de álcool (DUA) passaram de oitavo para quinto principal fator de risco para a mortalidade precoce e incapacidade na população mundial (Lim *et al.*, 2012). Estima-se que somente no ano de 2010, o uso de álcool foi responsável por mais de 2,5 milhões de mortes em todo o mundo. Além de prejuízos ao usuário, o uso abusivo de álcool também se mostra nocivo na esfera social, estando relacionado com o aumento na incidência de acidentes de trânsito e lesões corporais, muitas vezes levando ao acometimento tanto do usuário como de terceiros (Lim *et al.*, 2012).

No Brasil, estima-se que 59% da população faça uso abusivo de etanol (beber em *binge*), e que destas, aproximadamente 14% sejam alcoolistas (LENAD 2012). Ainda conforme dados epidemiológicos o alcoolismo se encontra intimamente correlacionado com a incidência de doenças psiquiátricas, hepáticas, cardíacas entre outras, sendo responsável por cerca de 10% dos problemas totais de saúde no país (Meloni e Laranjeira, 2004). Diante do exposto, torna-se evidente a necessidade de se buscar medidas que objetivem reduzir o risco associado ao uso de etanol.

## **1.2 Neurobiologia: o substrato biológico da adição**

Clinicamente, o consumo ocasional e controlado de etanol é distinto do seu uso escalonado e sem controle. Enquanto alguns indivíduos conseguem manter o consumo moderado e controlado da droga por um longo período de tempo, outros se mostram susceptíveis a perda do seu autocontrole e tornam-se incapazes de interromper o seu uso. Um importante objetivo no campo da neurobiologia é entender os mecanismos e circuitos neurais que medeiam a transição entre o consumo ocasional e controlado de uma droga para a perda do controle sob sua busca e ingestão. Essa progressão é influenciada por diversos fatores, entre eles, a substância em si, a personalidade do usuário (fatores psicológicos), influências ambientais e fatores genéticos e epigenéticos. A interação entre esses fatores é complexa e pouco entendida, e determina, em conjunto, porque alguns indivíduos apresentam comportamentos aditivos e outros não (Koob, 2013).

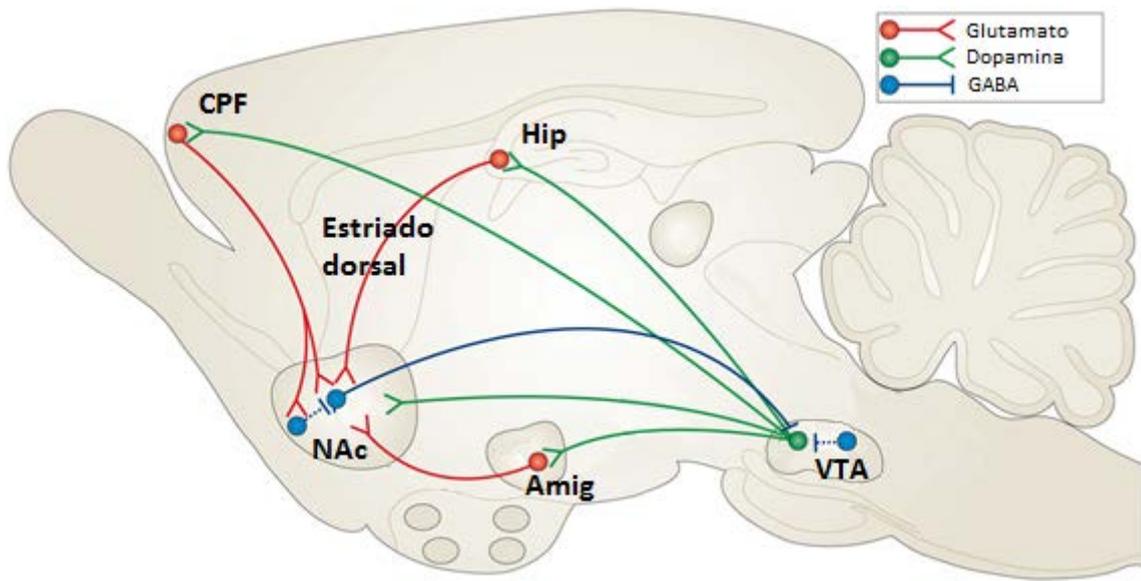
Segundo a visão contemporânea, a adição é resultado de uma disfunção do processo motivacional (Kalivas e Volkow, 2005). Sendo assim, para se entender o mecanismo de ação

das drogas psicotrópicas (exemplificadas aqui pelo etanol) devemos inicialmente entender o funcionamento natural dos sistemas cerebrais motivacionais.

### **1.2.1 O sistema de recompensa**

Um comportamento é dito como sendo motivado quando o estímulo integrado a ele é dotado de uma considerável importância (ou saliência) e direciona o sujeito a uma resposta comportamental específica (Kalivas e Volkow, 2005). Como exemplo, podemos citar a busca por alimento. Neste caso, um estado motivacional interno (fome) direciona o indivíduo a uma determinada ação (ou resposta) comportamental (busca por alimento). Esse comportamento é motivado através de uma associação de antecipação, ou seja, o conhecimento de que o consumo do alimento (comportamento consumatório) irá promover o resultado esperado (saciedade) (Hyman, 2005). O estímulo que determina essa associação entre a consequência e o comportamento é denominado reforço, o qual pode ser positivo ou negativo. Entende-se por reforço positivo o estímulo que, quando acrescentado a uma determinada situação, fortalece um determinado comportamento (geralmente ocasionando sensações prazerosas) e negativo aquele estímulo capaz de fortalecer um comportamento quando removido de uma situação específica (geralmente removendo sensações desagradáveis). Essas associações de extremo valor evolutivo são construídas através da ativação de um sistema cerebral denominado Sistema Dopaminérgico Mesolímbico, popularmente conhecido como sistema de recompensa (Figura 1). Este sistema é constituído por neurônios dopaminérgicos (produtores de dopamina) que conectam elementos do mesencéfalo e prosencéfalo basal, como Área Tegmentar Ventral (VTA) e Núcleo Accumbens (NAc) (Olds e Milner, 1954). No contexto molecular, quando da ocorrência de um comportamento motivado, neurônios dopaminérgicos originados do VTA liberam o neurotransmissor dopamina no NAc (estriado ventral), promovendo um estado geral de prazer (recompensa) o qual induz uma resposta motora adaptativa. Nesse contexto, a liberação (ou não) de dopamina em virtude de uma determinada ação estabelece a valência daquele estímulo (positivo ou negativo) enquanto o córtex pré-frontal (CPF) seleciona e determina a intensidade da resposta comportamental. O CPF também é regulado por neurônios dopaminérgicos originados na VTA através de uma via dopaminérgica denominada mesocortical. A associação das duas vias citadas acima constitui o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, o qual participa na consolidação de comportamentos com valor motivacional. Retornando ao exemplo anterior da associação entre fome-busca por comida, pode-se dizer que o comportamento motivado de busca por alimento é reforçado pela valência positiva associada à sensação de saciedade. Nessas circunstâncias, o consumo de alimento é fortalecido através do reforço negativo (através da remoção de um estímulo, a fome). No âmbito molecular, a ingestão de alimento promove a

liberação de dopamina no Nac, o qual reforça o comportamento de busca por alimento (comportamento inato selecionado pelo CPF) desencadeado originalmente. O Nac recebe também aferências de importantes regiões límbicas, como a amígdala, CPF e hipocampo. Assim, informações com diferentes conteúdos, provenientes de diversas regiões cerebrais podem ser convertidas e expressadas (através de conexões com o sistema motor) em respostas com conteúdo motivacional (Koob e Volkow, 2010).



Fonte: modificado de (Russo e Nestler, 2013)

**Figura 1:** Substratos cerebrais diretamente envolvidos no estabelecimento das desordens do uso de substâncias. A figura destaca estruturas basais e prosoencefálicas límbicas que se interconectam em diferentes sistemas, com destaque para o sistema mesolímbico dopaminérgico, ou sistema de recompensa. Neste sistema, neurônios dopaminérgicos originados da área tegmentar ventral (VTA) enviam projeções para o estriado ventral, ou núcleo accumbens (NAc), o qual retransmite a informação via neurônios gabaérgicos (*medium spiny neurons, MSN*) para outros centros cerebrais, incluindo a VTA. Como destacado na figura, o NAc é uma região altamente integrativa, recebendo aferências glutamatérgicas de diversos outros centros, como córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (Hip) e amígdala (Amig). As vias dopaminérgicas relativas ao estriado dorsal não estão representadas.

### 1.2.2 Neurobiologia da adição: a progressão do consumo controlado à compulsão

Apesar de cada droga possuir um mecanismo de ação agudo particular, a maioria dos agentes psicotrópicos compartilham um conjunto de alterações morfológicas e moleculares em regiões encefálicas específicas que respondem pelo estado final definido como adição. Durante a administração aguda, cada droga se liga a um receptor específico dependendo de suas propriedades farmacológicas e desencadeia uma variedade de comportamentos,

sensações e efeitos fisiológicos característicos. Entretanto, apesar de suas ações específicas em diversos centros cerebrais, todas as drogas de abuso convergem para a ativação do sistema de recompensa via aumento da transmissão dopaminérgica no Nac (Kornetsky e Esposito, 1979; Di Chiara e Imperato, 1988), o principal substrato para os mecanismos reforçadores agudos em todas as drogas de abuso, independentemente do seu mecanismo específico de ação (Koob e Le Moal, 2001).

Diferentemente da maioria das drogas psicotrópicas, as quais se comportam como agonistas ou antagonistas de receptores bem definidos, o etanol não executa sua ação farmacológica através da ligação específica a um subtipo ou classe de receptor. Ao contrário, ele é capaz de interagir com uma variedade de receptores, como opioides, cannabinoides, e receptores do tipo GABA<sub>A</sub> e glutamatérgicos do tipo AMPA (Nestler, 2005), desencadeando mecanismos distintos que findam também na ativação do eixo VTA-NAc (Kelley e Berridge, 2002; Tobler *et al.*, 2005). Após a exposição crônica à droga (independente da substância em questão), em uma tentativa frustrada de reestabelecer a homeostase perdida, o sistema dopaminérgico se desregula, sucedendo em uma redução nos níveis basais de dopamina. Essas alterações, que constituem os eventos iniciais na progressão para a adição, contribuem para o estado emocional negativo observado durante a abstinência da droga (Nestler, 2005).

A transição do consumo casual e controlado do álcool (ou outras drogas) para o consumo compulsivo e sem controle envolve neuroadaptações em numerosos circuitos cerebrais, cada qual responsável por características específicas. Dentro desse contexto, de acordo com Koob e Volkow (2010), as adições, (dentre as quais se inclui o alcoolismo), são conceituadas como desordens crônicas que progridem da impulsividade para a compulsividade, apresentando três estágios distintos: (1) *binge/intoxicação*; (2) *abstinência/estado negativo*; (3) *preocupação/antecipação*. Esses estágios interagem entre si, culminando em um estado patológico conhecido como *adição*. Como discutido em detalhes anteriormente, no primeiro estágio da *adição*, denominado *binge/intoxicação*, ocorre a ativação do sistema mesolímbico dopaminérgico, fortalecendo o comportamento de consumo da droga através do reforço positivo (introdução de sensações prazerosas). Apesar da conhecida importância do sistema monoaminérgico (noradrenalina e dopamina) na regulação do reforço positivo, evidências corroboram a existência de mecanismos reforçadores independentes da ação dopaminérgica, como modulações glutamatérgicas ou opioidérgicas induzida pelo consumo de álcool (Koob e Le Moal, 2005; Nestler, 2005). Além disso, Koob e Le Moal (2005) mostraram que lesões quimicamente provocadas no Nac não interrompem a autoadministração de etanol em camundongos. Em resumo, apesar de todas as drogas ativarem o sistema dopaminérgico mesolímbico, existem evidências sugerindo que outros *inputs* não-dopaminérgicos são críticos para a ativação e regulação desse circuito.

Diferentemente da etapa inicial de intoxicação em que a droga é consumida pela sensação hedônica associada a ela, no segundo estágio (abstinência/estado negativo) a droga é requisitada como um agente amenizador de sensações desconfortáveis provenientes do período de privação (reforço negativo). O estado negativo é desencadeado em parte pelo desequilíbrio do sistema dopaminérgico (e outros sistemas implicados nos efeitos reforçadores agudos) e em parte pela ativação de sistemas cerebrais envolvidos com o estresse. Após a administração crônica da droga, durante sua abstinência, o comprometimento do sistema mesolímbico provoca uma diminuição no estado de motivação por reforços naturais (não relacionados a drogas) e aumenta a sensibilidade associada às drogas, promovendo uma diminuição nos níveis basais de dopamina (Melis *et al.*, 2005). O outro componente responsável pela progressão dos sintomas relacionados à privação da droga é o recrutamento dos dois sistemas cerebrais relacionados ao estresse: o eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA) e o sistema mediado pelo fator de liberação da corticotropina (CRF) (Koob e Kreek, 2007; Koob, 2009; 2010). O principal substrato cerebral envolvido nesta etapa é uma região denominada de amígdala estendida, fortemente envolvida com medo condicionado e processamento de componentes emocionais (Koob e Volkow, 2010). O conceito subentendido nesta etapa do ciclo da adição tem sua origem na teoria do processo opoente da motivação, postulado por Solomon e Corbit em 1974. De acordo com essa teoria, estados hedônicos, afetivos ou emocionais, após serem iniciados, são automaticamente modulados de maneira oposta pelo sistema nervoso central através de mecanismos que reduzem a intensidade dessas sensações hedônicas. Essas sensações negativas balanceadoras, ao contrário da sensação positiva original, tem uma origem tardia, são duradouras e se fortificam com exposições repetitivas (Solomon e Corbit, 1974). Sendo assim, os sinais clínicos da abstinência, em termos motivacionais, fazem parte de um processo opoitor à ativação crônica e repetitiva do sistema dopaminérgico mesolímbico, o qual induz um estado emocional negativo caracterizado pela emergência de um estado de disforia, ansiedade e irritabilidade (Koob e Le Moal, 2001).

No estágio mais avançado (antecipação), a adição caracteriza-se pelo aparecimento da fissura (*craving*), um desejo incontrolável pela droga, mesmo após longos períodos de abstinência. Este fato corrobora com a ideia de que a exposição crônica ao álcool (ou outras drogas) induz o estabelecimento de modificações cerebrais permanentes que podem se manifestar mesmo na ausência total da droga por longos períodos. A fissura é um dos principais fatores responsáveis pela recaída (*relapse*), característica comum às adições, definindo-as, portanto, como desordens crônicas propensas a recaídas (*chronic relapsing disorder*) (American Psychiatric Association, 2013). Em termos neurobiológicos, a fissura é um estado complexo e de difícil entendimento, podendo estar relacionada a diversas regiões encefálicas, como amígdala estendida, córtex pré-frontal e hipocampo (Schoenbaum, 2004;

Schoenbaum *et al.*, 2004; Calu *et al.*, 2007). De forma geral, a transição do consumo controlado e ocasional de uma droga para o consumo sem controle (adição) envolve neuroplasticidades em todos esses sistemas, que podem ser evocadas através do consumo crônico da droga em pessoas geneticamente vulneráveis ou por indivíduos em períodos de desenvolvimento predisponentes, como infância ou adolescência (Koob e Volkow, 2010).

### 1.3 Genética do alcoolismo

Nem todas as pessoas que consomem álcool tornam-se alcoolistas. O comportamento de vulnerabilidade ao álcool, predisponente à adição, depende de um conjunto de fatores, como fisiologia, ambiente e genética. Ainda que a determinação da exata influência genética sobre o alcoolismo seja pouco compreendida, estima-se que sua herdabilidade corresponda a 50% (Enoch e Goldman, 2001; Goldman *et al.*, 2005), sendo duas vezes mais frequente em homens do que em mulheres (Substance Abuse and Mental Health Services Administration, 2012). Da perspectiva genética, o alcoolismo é resultado do efeito cumulativo de múltiplos genes e suas interações com o meio ambiente, provocando assim fenótipos complexos e heterogêneos. Em geral, assume-se que o risco genético para o desenvolvimento do alcoolismo seja influenciado por variantes comuns em um grande número de genes, cada um contribuindo com um efeito mínimo para o fenótipo, e também por variantes raras, responsáveis por grandes efeitos (Enoch, 2014). Nesse contexto, duas estratégias para o estudo da influência genética no alcoolismo são principalmente utilizadas: estudos de associação para múltiplos *loci* e estudos de genes únicos em modelos animais. Como resultado, estudos deste tipo demonstram achados substanciais que associam o comportamento adicto, principalmente, a genes envolvidos no metabolismo do etanol e nas neurotransmissões dopaminérgica, gabaérgica, colinérgica, glutamatérgica e serotoninérgica.

Os achados genéticos mais consistentes estão em genes que codificam enzimas do metabolismo do etanol, e se enquadram na categoria de variáveis raras com um grande efeito. A maior parte do etanol consumido é metabolizada no fígado pela enzima álcool desidrogenase (ADH) em acetaldeído, um intermediário tóxico que é prontamente convertido em acetato pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH). A taxa em que o álcool é metabolizado e a concentração dos seus metabólitos no sangue são fatores importantes que determinam o efeito fisiológico da droga. Estudos populacionais demonstram que o alcoolismo é menos comum na população leste-asiática, e que este efeito pode ser devido à presença de alelos protetores dos genes *ADH* e *ALDH* nesta população. Uma variante do gene *ADH1B* (*ADH1B\*2*; Arg47His, rs1229984), tem uma frequência de 0,75 nesta população (Wang *et al.*, 2011), e produz uma enzima ADH com uma eficiência enzimática 100 vezes maior do que as produzidas pelos demais alelos (Thomasson *et al.*, 1995; Mulligan *et al.*, 2003; Birley *et al.*,

2009; Bierut *et al.*, 2012; Hurley e Edenberg, 2012). Essa característica faz com que a conversão do etanol em acetaldeído aconteça de forma mais rápida, acentuando efeitos tóxicos e indesejáveis provocados pelo acúmulo desta substância, como rubor facial, náuseas e cefaleia, sintomas conhecidos como “Rubor Asiático” ou “Brilho Asiático” (do inglês, *Asian Glow* e *Asian Blush*, respectivamente). Sendo assim, o acúmulo anormal de acetaldeído no sangue promove a proteção contra o consumo excessivo do etanol e, conseqüentemente, dificulta a aquisição de tolerância (Chen *et al.*, 1999; Edenberg, 2007). Outro alelo muito frequente na população asiática, ALDH2\*2 (Glu504Lys, rs671), também é eficiente na proteção contra o alcoolismo. Este alelo produz uma forma totalmente inativa da enzima ALDH, e indivíduos portadores deste alelo acumulam rapidamente grandes quantidades de acetaldeído no sangue após o consumo de álcool, resultando também nos sintomas descritos acima (*Asian Blush*). Apesar do alelo ALDH2\*2 ser exclusivo de populações leste-asiáticas, polimorfismos em outras duas enzimas relacionadas, ALDH1A1 (Lind *et al.*, 2008) e ALDH1B1 (Linneberg *et al.*, 2010), têm sido associados com o consumo de álcool em populações finlandesas e dinamarquesas, respectivamente. Chen e colaboradores mostraram que portadores de ambos os alelos ADH1B\*2 e ALDH2\*2 apresentam uma resposta particularmente severa ao etanol (Chen *et al.*, 1999). Apesar do alto efeito penetrante destes alelos no fenótipo protetor contra o alcoolismo, vale ressaltar que a adição é uma desordem multifatorial, influenciada por um conjunto variado de genes que interagem de maneira complexa entre si e com o ambiente em que o indivíduo está inserido. O efeito protetor exposto acima não apresenta relação com os mecanismos neurobiológicos da adição, porém, quando esses alelos estão presentes, mesmo os indivíduos geneticamente ou neurobiologicamente propensos, serão fisiologicamente protegidos contra episódios repetitivos de consumo exagerado (*binge drinking*) e, dificilmente, desenvolverão a desordem.

No domínio neurobiológico, os genes que mais se correlacionam com a predisposição ao alcoolismo pertencem a classe dos neurotransmissores dopamina, GABA e serotonina. Acredita-se que estes genes ajam de maneira indireta através da modulação de traços psicológicos, como impulsividade e espontaneidade (Cook e Gurling, 1994). Alguns genes pertencentes a via de neurotransmissão dopaminérgica estão claramente associados à adição. Como discutido anteriormente, esse sistema tem uma associação direta com os efeitos reforçadores agudos de todas as drogas psicotrópicas via sistema de recompensa. Além das desordens no uso de substâncias, alterações no sistema dopaminérgico também estão associadas a outras patologias, como déficit de atenção, comportamento compulsivo e impulsivo, obesidade, esquizofrenia e autismo (Blum *et al.*, 1995; Chien *et al.*, 2013). Alguns estudos demonstram a associação entre a susceptibilidade à adição e a presença do SNP rs1800497, presente no gene *ANKK1* (*ankyrin repeat and kinase domain containing-1*). Inicialmente, esse polimorfismo foi descrito como integrante da região não codificadora do

gene do receptor de dopamina *DRD2*, como o alelo Taq1 A1. Posteriormente foi descoberto que esta região era parte integrante do gene *ANKK1*, adjacente à *DRD2*, e talvez, devido a um efeito epistático reduzisse a taxa de transcrição do gene *DRD2* (Garrido *et al.*, 2011). Estudos recentes demonstram que o alelo Taq1 A1 do gene *ANKK1* e o alelo C957T do gene *DRD2* são epistaticamente associados com psicopatias secundárias em indivíduos alcoolistas (Ponce *et al.*, 2008). Kimura *et al.* (2011) destaca que polimorfismos do tipo variações no número de repetições em tandem (VNTR, *variable number of tandem repeat*), presentes na região codificadora do receptor *DRD4* estão relacionados com o comportamento de procura por novidade, fator indiretamente relacionado às adições.

A dopamina é metabolizada pelas enzimas *COMT* (catecol – orto – metiltransferase) e *MAO* (monoaminaoxidase – A) em ácido homovalínico (HVA). Indivíduos homocigotos para o alelo L da *COMT*, que codifica uma enzima com atividade reduzida de três a quatro vezes, parecem ser mais propensos ao elevado consumo de etanol, enquanto determinados alelos da *MAO*, associados a VNTR, apresentam reduzida eficiência de transcrição e maior risco para a dependência (Goldman *et al.*, 2005; Kohnke *et al.*, 2006). 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 também é alvo da ação do etanol. Os genes codificadores dos canais ionotrópicos GABA<sub>A</sub> (ácido gama aminobutírico) são encontrados agrupados em *clusters* ao longo do genoma. No cromossomo 4 estão os genes *GABRA2*, *GABRA4*, *GABRB1* e *GABRG1*, no cromossomo 5 os genes *GABRA1*, *GABRA6*, *GABRB2* e *GABRG2*, e no cromossomo 15, os genes *GABRA5*, *GABRB3* e *GABRG3*. Alguns estudos demonstram a associação entre os genes codificadores de subunidades do receptor GABA<sub>A</sub> com a dependência ao etanol. Edenberg e colaboradores associaram, em 2004, que a presença de SNPs em regiões codificadoras e não codificadoras da subunidade  $\alpha 2$  do receptor *GABAA* com a dependência ao álcool (Edenberg *et al.*, 2004). Essa associação tem sido amplamente confirmada em estudos de caso-controle (Haughey *et al.*, 2008; Soyka *et al.*, 2008; Uhart *et al.*, 2013).

Em se tratando da via serotoninérgica, o polimorfismo mais bem elucidado é aquele encontrado no promotor do gene codificador do transportador de serotonina (5HTT). Este polimorfismo correspondente a uma inserção de uma sequência de 20 a 23 pares de bases, podendo estar presente em 16 cópias (variante longa) ou 14 cópias (variante curta). O alelo curto (5HTTLPR), tem uma eficiência transcricional reduzida comparada à variante longa, e pode apresentar risco para a dependência de etanol em subgrupos de pacientes com comorbidades psiquiátricas (Goldman *et al.*, 2005).

De maneira geral, estudos de genes únicos identificaram mais de 70 diferentes candidatos associados a fenótipos relacionados ao consumo de álcool (Crabbe *et al.*, 2006). Existe ainda um grupo vinculado ao NIAAA (*National Institute on Alcohol Abuse and*

*Alcoholism*) denominado COGA (*Collaborative Studies on Genetics of Alcoholism*), o qual possui uma coleção de dados genéticos de mais de 300 famílias com histórico de alcoolismo, e seu objetivo é esclarecer através de estudos de associação qual o efeito genético na vulnerabilidade ao alcoolismo.

#### **1.4 O uso de modelos animais para estudo do alcoolismo**

Uma limitação inerente aos modelos animais para estudo de transtornos mentais como a adição é a subjetividade intrínseca à avaliação comportamental e interpretação dos dados. Apesar dessa restrição, a qual está presente em qualquer modelo, a utilização de animais para estes fins tem auxiliado sobremaneira o entendimento da neurobiologia e genética do alcoolismo.

Existem diferentes modelos animais para o estudo do efeito do etanol e suas consequências no organismo. Enquanto os efeitos puramente agudos ou crônicos do etanol, como tolerância ou sensibilização, possam ser estudados através da utilização de modelos que empregam a administração forçada de etanol através da dieta, gavagem, injeção ou inalação, o delineamento experimental para se estudar as razões motivacionais para se consumir o etanol exige um maior grau de elaboração e controle. No segundo caso, tem-se como objetivo estudar no animal o seu comportamento de procura voluntária pela droga, visando mimetizar diferentes aspectos da adição, como o seu uso compulsivo (*craving*), recaída (*relapse*) e a perda de controle sob o uso (Spanagel, 2000). Neste contexto, podem ser empregadas duas abordagens para se avaliar o consumo voluntário da droga: ensaio de preferência ou comportamento operante. Na primeira abordagem, os animais possuem livre acesso à droga em suas gaiolas, podendo escolher livremente entre o consumo de água ou etanol, o qual, em geral, é apresentado em soluções com diferentes concentrações, mais comumente 5, 10 ou 20%. A proporção de solução etílica ingerida em relação ao consumo total de fluido (% do total de fluido) é utilizada para caracterizar a preferência do camundongo pela droga (Cunningham *et al.*, 2000). O modelo de preferência é amplamente utilizado para o estudo do uso de álcool, inclusive tem sido utilizado como base para seleção genética e criação de sublinhagens de animais que preferem (P - *preferring*, sP – *Sardinian preferring*) ou que não preferem etanol (NP – *non-preferring*, sNP – *Sardiniannon-preferring*) (Li, 2000). Neste modelo, a preferência pela droga não está relacionada à dependência, e sim à busca por suas propriedades reforçadoras, positivas ou negativas. Na abordagem operante (ou autoadministração operante), os animais são treinados a executar uma determinada tarefa, como pressionar uma alavanca, para obter acesso à droga. Assim, a quantidade de droga consumida está diretamente relacionada à quantidade de trabalho realizada para obtê-la. Com isso, esses estudos permitem avaliar não somente a preferência individual pela droga (ao se

utilizar uma alavanca para água e outra para etanol), mas também a motivação do animal em trabalhar para obter a droga em diferentes condições (Koob, 2000).

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

O modelo animal utilizado neste estudo foi inicialmente proposto para ratos por (Wolffgramm e Heyne, 1995) e posteriormente validado farmacologicamente para camundongos por Fachin-Scheit *et al.* (2006). Este modelo classifica em grupos distintos animais com diferentes perfis de consumo de etanol. Ao fim do modelo, pode-se distinguir claramente duas categorias de consumidores: animais sem preferência por etanol, ou consumidores “leve”, e animais com alta preferência pelo etanol. Este segundo grupo é subdividido entre aqueles animais que interrompem a ingestão da solução de etanol após sua adulteração com quinino e àqueles que mantêm o alto consumo mesmo após sua adulteração. Assim, aqueles camundongos que mantêm seu alto consumo e preferência pela droga apesar da condição “aversiva” imposta pelo quinino exibem uma “perda do controle” sob a ingestão da droga e são denominados “consumidores inflexíveis”. Por outro lado, aqueles que interrompem o consumo em virtude da aversão provocada são denominados consumidores “pesado”. Entende-se por perda de controle a incapacidade em se regular o consumo de etanol em uma determinada circunstância (Ludwig e Wikler, 1974).

##### **1.4.1.1 Procedência dos camundongos**

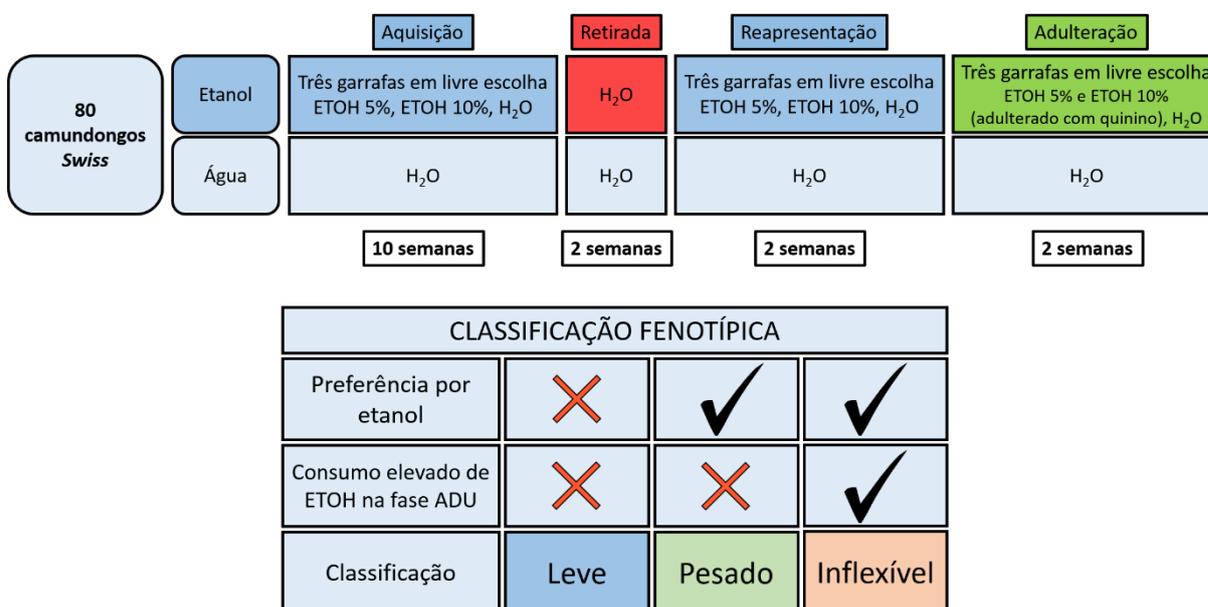
As amostras biológicas utilizadas no desenvolvimento desta tese foram advindas do trabalho desenvolvido por Ribeiro *et al.* (2012), sendo, portanto, os animais aqui descritos apenas o objeto do presente estudo. Sendo assim, o desenvolvimento do modelo não se caracterizou como um objetivo deste trabalho. Os procedimentos adotados no estabelecimento do modelo estão descritos abaixo puramente para fins de compreensão do paradigma de livre escolha.

##### **1.4.1.2 Procedimentos do Modelo de Livre Escolha**

Foram utilizados oitenta (80) camundongos Swiss machos adultos provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), com 45 dias de idade e sem experiência anterior com nenhuma droga ou procedimento adotado nesse experimento. Antes do procedimento experimental, os animais estavam alojados em grupos de 20 por gaiola e, na semana anterior ao início dos experimentos, foram alojados de forma individual em gaiolas de 20x30x20cm em um período de ambientação. Durante este período, o peso e o consumo basal de água de cada animal foram registrados e nenhuma diferença foi

detectada. Durante a fase de ambientação e durante todo o período experimental, 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) foram mantidas constantes. Os procedimentos adotados para o tratamento e cuidado dos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPR (CEEA), protocolo de número 281 e Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA) em 05/12/2007 protocolo número 159/2007.

Para o experimento de consumo crônico de álcool, foi desenvolvido um paradigma através do método de livre escolha ao qual camundongos tiveram acesso simultâneo a três garrafas distintas: água, etanol 5% (v/v) e etanol 10% (v/v). Após a fase inicial de ambientação, um grupo de 60 camundongos foi submetido ao paradigma de livre escolha, constituído por quatro etapas, descritas a seguir. (1) Aquisição (10 semanas): acesso simultâneo e por livre escolha a três garrafas distintas, contendo água, etanol 5% e etanol 10%, (v/v); (2) Retirada (2 semanas): retirada das soluções etílicas (5 e 10%); (3) Reapresentação (2 semanas): reintrodução das soluções etílicas; (4) Adulteração (2 semanas): adulteração das soluções etílicas com hidrocloreto de quinino (0,005 g/L) (Figura 2).



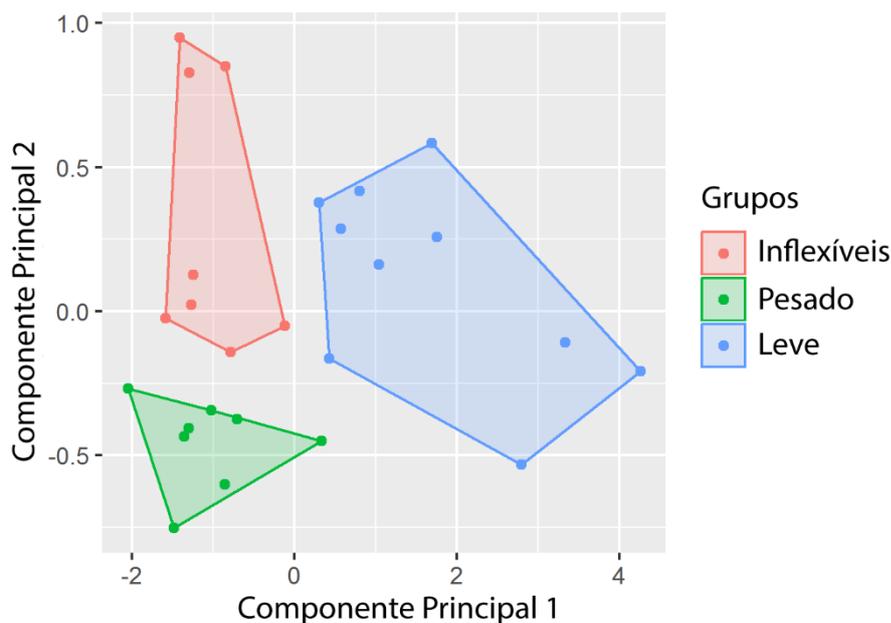
**Figura 2:** O Modelo de livre escolha. Camundongos geneticamente heterogênicos são expostos a um paradigma de livre escolha simulando as diferentes fases do suposto ciclo da adição. Após 16 semanas de livre acesso ao etanol, os camundongos são divididos em três grupos baseando-se no seu perfil individual de consumo: Leve, Pesado e Inflexível.

O quinino é uma substância altamente aversiva a camundongos e é utilizado para avaliar o consumo do álcool mesmo em uma situação aversiva, denominado aqui como perda

de controle. Em um experimento paralelo de dose-resposta, a concentração de quinino utilizada na definição do modelo (0,005 g/L) se mostrou eficiente em reduzir o consumo de água em um subgrupo de camundongos da mesma linhagem, sexo e idade (Ribeiro *et al.*, 2012). Durante todo o procedimento experimental 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 tiveram suas posições mudadas na gaiola e os fluidos eram trocados a cada medição de volume. Em cada sessão, o volume perdido por evaporação ou derramamento foi medido utilizando-se três garrafas controle (água, etanol 5% e etanol 10%) colocados em gaiolas vazias. O volume diário desperdiçado nas garrafas controle (medido através da fórmula, volume final – volume inicial) foi utilizado como fator de correção no cálculo do volume diário consumido nas garrafas teste.

Ao fim da fase de experimentação, os camundongos foram classificados em três diferentes grupos com base no perfil individual de consumo de etanol e preferência pela droga. Aqueles camundongos que preferiram água (preferência média por etanol <50%, ou seja, consumo de água maior do que o consumo de etanol) durante todas as fases experimentais foram classificados como “Bebedores Leve”, ou simplesmente “Leve” (n = 21). Dentre os que preferiram etanol, aqueles que demonstraram uma queda no consumo da droga na fase de adulteração por quinino, quando comparada à fase de aquisição, foram classificados como “Bebedores Pesado” ou simplesmente “Pesado” (n = 11), enquanto aqueles com um consumo constante de etanol, sem queda significativa de consumo na fase de adulteração foram classificados como “Bebedores Inflexíveis” (n = 13). Aqueles animais que não atenderam a nenhum dos critérios citados acima foram excluídos das análises posteriores. Um grupo Controle (n = 20) teve acesso apenas à água durante toda a duração do experimento (Ribeiro *et al.*, 2012), (Figura 2).

Uma avaliação preliminar exploratória através da análise de componentes principais (do inglês PCA) utilizando os dados de consumo nas três fases experimentais confirmou o agrupamento dos animais em três grupos distintos (Figura 3). Após as duas semanas da fase de adulteração, todos os camundongos, com exceção do grupo controle, foram expostos à mesma tarefa de livre escolha utilizada da fase de aquisição por mais uma semana. No último dia da semana extra de livre acesso, foram retiradas amostras de sangue retro-orbital de cada camundongo e a concentração de etanol no sangue (BEC) foi medida através do equipamento Analox Álcool Analyzer (Analox Instruments, Lunenburg, MA). O nível de intoxicação (conforme definido pelo National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, NIAAA) foi alcançado tanto nos bebedores inflexíveis ( $113 \pm 11.3$  mg/dl) quanto nos bebedores pesado ( $79 \pm 19,8$  mg/dl), mas não nos bebedores leve ( $48 \pm 13,3$  mg/dl) (Ribeiro *et al.*, 2012).



**Figura 3:** Clusterização dos camundongos de maneira hipótese-independente. Utilizando o consumo de etanol como critério discriminante, a análise por componentes principais distribuiu os dados em três diferentes subpopulações de camundongos.

Neste modelo, a perda de controle sob o consumo da droga é atribuída ao consumo persistente de etanol nos camundongos do grupo Inflexível, o qual se mantém elevado e estável, mesmo após a adulteração da solução etílica com quinino, um composto não palatável. Originalmente neste modelo os camundongos com um perfil de consumo sem controle foram denominados “Adictos” (Fachin-Scheit *et al.*, 2006; Correia *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2012), porém, em uma tentativa de não se humanizar o modelo animal, o termo adição tem sido evitado pela comunidade científica. De fato, adição é uma doença exclusivamente humana, complexa e com um componente psicológico e social importante. Assim, por mais informativo que um modelo animal consiga ser, ele não compreende todas as características intrínsecas a esta desordem. Com isso, neste trabalho, o termo “adicto” foi aqui substituído por “Bebedores Inflexíveis”. Esta classificação tem origem em um trabalho originalmente publicado por Lesscher *et al.* (2010), o qual demonstra que camundongos da linhagem C57BL/6J pré-expostos ao consumo de etanol por duas semanas em um paradigma de livre escolha mantêm o alto consumo da droga mesmo após a sua adulteração por quinino.

Com base no exposto acima e na tentativa de identificar genes potencialmente envolvidos na predisposição ao alcoolismo, analisou-se comparativamente o transcriptoma do estriado de animais integrantes dos grupos “Leve” e “Inflexível”, os dois grupos fenotipicamente mais distintos.

O estriado está localizado no prosencéfalo basal e é uma região cerebral de integração entre vários circuitos, recebendo *inputs* de estruturas como amígdala, VTA, substância nigra e CPF e retransmitindo as informações processadas para estruturas como tálamo e pálido ventral (Di Chiara e Imperato, 1988; Weiss *et al.*, 1993; McBride *et al.*, 1995; Robbins e Everitt, 1999; Gonzales *et al.*, 2004). Funcional e estruturalmente o estriado é subdividido em estriado ventral (ou núcleo accumbens) e estriado dorsal (constituído pelas estruturas homólogas em humanos, núcleo caudado e putâmem). De forma geral, esta região desempenha um papel central no mecanismo de reforço e recompensa (estriado ventral). Além disso, alterações morfológicas e moleculares (principalmente no estriado dorsal) são responsáveis por mediar a transformação do uso ocasional e controlado da droga em um hábito patológico (Kalivas e Volkow, 2005; Balleine *et al.*, 2007; Wickens *et al.*, 2007).

Apesar de vários estudos demonstrarem a relação entre o alto consumo de etanol e seu impacto na regulação gênica estriatal, poucos trabalhos pontuam as alterações moleculares que predispõem ou que são consequentes à perda de controle e ao consumo compulsivo do álcool, dois comportamentos fortemente associados ao alcoolismo (Saito *et al.*, 2004; Bell *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2012).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Investigar as alterações moleculares subjacentes ao consumo compulsivo e sem controle de etanol utilizando camundongos submetidos a um paradigma de consumo crônico e por livre escolha de etanol na tentativa de elucidar mecanismos e novos alvos terapêuticos.

### **Objetivos Específicos**

1. Identificar novos candidatos moleculares que possam estar relacionados ao desenvolvimento ou manutenção do consumo de etanol, através da análise do transcriptoma estriatal global.
2. Validar os genes identificados através da análise transcriptômica fazendo uso da quantificação relativa de transcritos pela técnica de PCR em tempo real.
3. Validar de maneira funcional os novos alvos utilizando uma abordagem *in vivo*, a fim de extrapolar os achados *in silico* e empíricos a dados com valor biológico.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Análise molecular e busca de genes candidatos**

##### **3.1.1. Obtenção e armazenamento do material biológico**

Todo o material biológico referente aos animais utilizados neste estudo foi obtido a partir do trabalho de doutorado da aluna Andrea Frozino Ribeiro, no ano de 2012 (Ribeiro *et al.*, 2012). Após a dissecação, todo o material foi armazenado em RNAlater<sup>®</sup> e mantido a 80°C negativos até o momento da extração do RNA total.

##### **3.1.2. Extração do RNA total**

A extração do RNA total foi realizada partir do protocolo de TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen, São Paulo, Brasil), resumido a seguir. Às amostras ainda congeladas foi adicionado o reagente TRIzol<sup>®</sup> em uma proporção de 1mL/50mg de tecido, seguido por homogeneização em rotação mínima (Polytron PT10/35-Brinkmann, Westbury, NY, USA) por um tempo máximo de 10 segundos, repetidos por no máximo 5 ciclos. Posteriormente, o homogenato permaneceu em temperatura ambiente (20-25°C) por 5 minutos, seguido pela adição de 0,2mL de clorofórmio PA, o qual foi agitado por inversão por 15 segundos e incubado por mais 2-3 minutos a temperatura ambiente. Depois, as amostras foram centrifugadas a 12000xrcf (g) por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação 0,3mL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual foi adicionado 0,5mL de isopropanol PA 100%, misturado por inversão durante 15 segundos e incubado por mais 10 minutos a temperatura ambiente. Uma nova centrifugação foi realizada também à velocidade de 12000xrcf por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado cuidadosamente e ao precipitado foi adicionado 0,8mL de etanol PA absoluto gelado e o material foi então centrifugado a 7500xrcf durante 5 minutos a 4°C. Ao término da centrifugação o sobrenadante foi desprezado cuidadosamente, enquanto o precipitado remanescente permaneceu secando por aproximadamente 30 minutos. Em seguida, o precipitado foi eluído em 20µL de água Ultra Pura<sup>®</sup> (Qiagen, São Paulo, Brasil) e homogeneizado por cerca de 30 minutos. Para o ensaio de microarranjo, o RNA total foi quantificado utilizando o equipamento Epoch<sup>®</sup> (Biotek Instruments, VT, USA), enquanto para as reações de qPCR as amostras foram quantificadas através do equipamento DeNovix<sup>®</sup> (DeNoxin Inc., Wilmington, Delaware). Todas as amostras utilizadas apresentaram razão 260/280 nm maior que 1.8. A integridade foi verificada 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). As condições da corrida foram 300mA e 90V por aproximadamente 20 minutos.

### 3.1.3. Procedimentos para Análise Molecular da Reação de Microarranjo

Para a análise transcriptômica, utilizou-se um *pool* amostral referente a 4 animais distintos em cada um dos dois grupos investigados (Leve e Inflexível). Cada *pool* foi hibridizado em triplicatas técnicas, totalizando 6 *chips* GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix, São Paulo, Brasil). Nesse arranjo, existem 45.000 conjuntos de sondas que correspondem a 39.000 transcritos de 34.000 genes murinos. O tamanho de cada sonda é de 25 bases com orientação senso. Para a etapa de hibridação e leitura dos *chips*, as amostras de RNA total foram transportadas em gelo seco para o Laboratório de Genética Molecular, na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. A reação de hibridação e o escaneamento foram realizados no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, SP. A transcrição *in vitro* do material foi realizada a partir de 200ng de RNA total e todos os passos seguintes, tanto da transcrição *in vitro*, quanto fragmentação e hibridação do aRNA foram executados de acordo com o manual do GeneChip 3'IVT Express Kit (Affymetrix, São Paulo, Brasil). Para a etapa de hibridação e escaneamento preparou-se a mistura de hibridação, a qual foi pipetada em um dos orifícios do chip (cerca de 80uL). Posteriormente, os *chips* permaneceram por aproximadamente 17 horas incubados a 45°C a 60 RPM. Em seguida, o reagente de hibridação foi retirado de todos os *chips* e substituído pelo tampão de lavagem *Wash Buffer A*. Os septos dos chips foram então vedados com adesivos e colocados na estação de escaneamento da Affymetrix para o início da captação da leitura de fluorescência. Os reagentes para hibridação (Stain Cocktail 1), lavagem (Stain Cocktail 2) e tampão (Array holding buffer) foram pipetados em três tubos de 1,5mL e colocados em suas respectivas posições dentro da estação de lavagem da Affymetrix.

### 3.1.4. Normalização e análise exploratória dos dados do microarranjo

Os dados do *array* foram normalizados conforme o método RMA (*Robust Multi-array Average*) (Irizarry *et al.*, 2003) utilizando a plataforma R, disponibilizada no endereço [www.R-project.org](http://www.R-project.org) e através do pacote “*affy*”, disponível em <http://bioconductor.org/biocLite.R>. A avaliação da expressão gênica diferencial foi realizada através do algoritmo RankProd (Breitling *et al.*, 2004) também no ambiente R e o p valor fixado em 0,01. A lista de genes recuperados nessa análise é denominada lista de Genes Diferencialmente Regulados, ou GDR. Após a aquisição da lista com os identificadores diferencialmente regulados entre os grupos, foi realizado o *data-mining*, um pós-processamento dos dados com o intuito de relacionar informações relevantes aos identificadores numéricos referentes à cada sonda, como nome do gene correspondente, *loci* cromossômico e função.

As análises de PCA (do inglês *Principal Component Analysis*), tanto para a investigação exploratória dos dados (agrupamento das réplicas técnicas em dois diferentes conjuntos) quanto para a classificação fenotípica independente de hipótese (Leve, Pesado e Inflexível) (Figura 3), foi realizada utilizando a função *prcomp* implementada em ambiente R e disponível na biblioteca do Bioconductor. Os gráficos e análises de *heatmap* e *volcano plot* foram executados utilizando, respectivamente, as funções *heatmap* e *gplot* implementadas em ambiente R.

Após a geração da lista de GDR, deu-se prosseguimento com a análise de enriquecimento dos dados, a qual tem o intuito de desvendar a interação funcional de cada um dos genes presentes na lista de genes recuperada. Para esta análise, fez-se uso do programa MetaCore® (Thomson Reuters, New York, USA), o qual contrasta a lista dos genes diferencialmente regulados e seus respectivos valores de *fold change*, *p-valor* ou *ppf* (*proportion of false positives*) com uma base de dados própria e manualmente curada, gerando assim hipóteses de interações proteicas a partir de dados de expressão gênica.

A avaliação do perfil ontológico foi realizada através do programa WebGestalt (Zhang *et al.*, 2005) e GOEAST (Zheng e Wang, 2008) e objetivou traçar o perfil ontológico (*Gene Ontology*, GO) dos GDR classificando-os de acordo com sua função celular, molecular ou processos biológicos.

### **3.1.5. Procedimentos para Análise Molecular da PCR em tempo real**

#### **3.1.5.1. Desenho dos iniciadores**

A sequência dos genes de interesse foi retirada do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e comparada com aquelas depositadas no banco *Ensembl Genome Browser* (<http://www.ensembl.org/index.html>). Todas as sequências foram coletadas no dia 20/02/14. A sequência dos iniciadores foi gerada através do programa Primer3 v0.4.0 (Untergasser *et al.*, 2012), disponível *on-line* no endereço <http://frodo.wi.mit.edu/>. Os parâmetros escolhidos foram: tamanho do produto final entre 70-150 pb; tamanho do mínimo do iniciador de 19 bases, ótimo de 20 bases e máximo 21 bases; T<sub>m</sub> mínimo de 59°C, ótimo de 60°C e máximo de 61°C; %GC mínimo de 20%, ótimo de 50% e máximo de 80%. Com o intuito de reduzir amplificação de DNA genômico, sempre que possível, os iniciadores foram desenhados com seus pares (*Forward* e *Reverse*) dispostos éxons adjacentes.

Após o estabelecimento da sequência, os pares de iniciadores foram avaliados através do programa NetPrimer ([www.premierbiosoft.com/netprimer/netplaunch/netplaunch.html](http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netplaunch/netplaunch.html)) a fim de se evitar a formação de estruturas secundárias que comprometam a eficiência da reação de qPCR, como formação de dímeros e alças ou palíndromos e repetições contíguas

de bases. As sequências dos iniciadores para a quantificação dos transcritos dos genes constitutivos (ou normalizadores) foram adquiridas em Bibancos *et al.* (2007). Aquelas sequências sem problemas estruturais detectáveis *in silico* foram testadas quanto sua especificidade através da ferramenta de alinhamento local Primer-BLAST, disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. A relação completa dos iniciadores pode ser consultada no apêndice 1. Todos os iniciadores foram sintetizados pela empresa Síntese Biotecnologia (Belo Horizonte, MG).

### **3.1.5.2. Confeção do DNA complementar e quantificação dos transcritos através da PCR em tempo real**

Para cada reação de confecção do DNA complementar (cDNA) utilizou-se 300µg de RNA total em um volume final de 20µL. As reações foram executadas utilizando a enzima Revertaid® (Fermentas, São Paulo, Brasil) e oligo(dT<sub>20</sub>) como iniciador (Prodinol Biotecnologia, Belo Horizonte, Brasil) conforme instruções do fabricante.

As reações de PCR em tempo real (qPCR) foram realizadas no equipamento CFX 96® Real Time system (BioRad, São Paulo, Brasil). Em todas as reações, excetuando a quantificação dos transcritos do gene *Lrrk2*, utilizou-se o ensaio SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil). Para tanto, adotou-se um protocolo sem etapa de extensão com três etapas (desnaturação inicial e ativação enzimática à 95°C por 10 minutos, e 40 ciclos à 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos) com a captação da fluorescência executada na última etapa de cada ciclo. Para avaliação da eficiência de cada reação, realizou-se uma curva de diluição em 5 concentrações (40ng, 20ng, 10ng, 5ng e 2,5ng) para cada gene analisado. As reações foram analisadas em triplicata para a curva de diluição e em duplicata para a reação de quantificação. Todas as reações foram padronizadas para se enquadrarem em um intervalo de eficiência entre 95-105%. Em todas as reações foi utilizado um controle negativo (NTC) e o volume da reação mantido em 20µL. As curvas de dissociação foram analisadas e não foi verificado nenhum produto espúrio nos ensaios quantitativos. A concentração utilizada nas reações de quantificação foi fixada em 10ng em virtude de uma melhor eficiência relativa, conforme verificado nas curvas de diluição.

Para a quantificação do gene *Lrrk2*, entretanto, a utilização do SYBR® Green PCR Master Mix não se mostrou eficiente, possivelmente em virtude da baixa taxa de transcrição basal deste gene nos neurônios estriatais. Sabe-se também que este agente intercalante possui um intervalo de detecção restrito e, portanto, se mostra menos sensível e menos específico do que os ensaios baseados em sondas fluorescentes. Por conseguinte, a quantificação dos transcritos do gene *Lrrk2* foi realizada através da tecnologia TaqMan® (Life Technologies, São Paulo, Brasil) utilizando os *probesets* Mm00481934\_m1 (*Lrrk2*) e

Mm99999915\_g1 (*Gapdh*). Todas as reações descritas acima foram realizadas no laboratório de Genética Animal e Humana, Departamento de Biologia Geral, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

### 3.1.5.3. Normalização dos dados da PCR em tempo real

A análise da expressão diferencial foi calculada pelo método  $\Delta\Delta C_t$  (Pfaffl, 2001) utilizando o gene *Gapdh* como referência para o ensaio Taqman<sup>®</sup> (exclusivamente para o gene *Lrrk2*) e a média geométrica dos genes *Gapdh* e *Ppia* nos ensaios SYBR<sup>®</sup> (Vandesompele *et al.*, 2002). A estabilidade dos genes de referência foi confirmada utilizando o software Genorm (Vandesompele *et al.*, 2002). Em todos os ensaios, a média aritmética das amostras do grupo controle foi utilizada como fator calibrador para o cálculo das quantidades relativas dos demais grupos. Para cada gene, um controle negativo (NTC, *non-template control*) e uma curva de *melting* (apenas nos ensaios SYBR<sup>®</sup>) foram examinados para garantir a ausência de quaisquer produtos espúrios. Na contravalidação através da qPCR, todos os quatro grupos (controle, bebedores leve, bebedores pesado e bebedores inflexíveis) foram analisados. Esta abordagem permite, por exemplo, a identificação de padrões de transcrição inerentes apenas aos bebedores inflexíveis e, portanto, potencialmente implicado na compulsividade e da perda de controle sobre o consumo do álcool. Para a análise dos bebedores leve e inflexível, foram utilizadas as mesmas amostras hibridizadas no protocolo de *microarray*, além de uma amostra adicional em cada grupo (totalizando n=5, exceto quando *outliers* foram encontrados na análise). O mesmo número de animais (n=5) foi utilizado para os grupos controle e bebedores pesado.

## 3.2. Análise funcional do gene *Lrrk2*

Todas as análises funcionais foram realizadas durante período de doutorado sanduíche no *Laboratory for Integrative Neuroscience - Section on Neuronal Structure* no *National Institute of Health*, NIAAA/NIH sob orientação da Dra. Veronica Alvarez.

### 3.2.1. Animais

Os animais *knockouts* (KO) utilizados na etapa de validação funcional do gene *Lrrk2* foram gentilmente cedidos pelo Dr. Huaibin Cai, do *Laboratory of Neurogenetics* do *National Institute of Aging* (NIA/NIH). Este camundongo KO foi gerado a partir da deleção do éxon 2 do gene *Lrrk2*, a qual produziu um *stop* códon prematuro no éxon 3. Os animais KO foram cruzados por mais de 20 gerações com camundongos C57BL/6J e são mantidos através do cruzamento entre heterozigotos (*Lrrk2*<sup>+/-</sup> x *Lrrk2*<sup>+/-</sup>) (Parisiadou *et al.*, 2009). Com o intuito de

facilitar os experimentos comportamentais realizados, todos os animais utilizados, KO e selvagens, foram mantidos em ciclo reverso de claro/escuro (ciclo escuro de 6:30 às 18:30 e ciclo claro de 18:30 às 6:30) durante todo o tempo experimental. Aqueles camundongos transferidos de outras salas com o ciclo claro/escuro convencional foram inicialmente habituados por no mínimo duas semanas no ciclo reverso antes de prosseguirem em qualquer procedimento experimental.

### **3.2.3. Campo aberto**

Oito camundongos *naïve* para etanol (4 *Lrrk2* KO e 4 selvagens) foram utilizados para a avaliação da atividade exploratória no teste de campo aberto. O aparato de campo aberto consiste em uma arena de 40x40 cm com paredes construídas em material plástico na cor preta e com o piso na cor branca. A arena foi iluminada por dois conjuntos de luzes LED localizadas no teto de cada arena. Cada um dos animais foi testado em uma única sessão de 45 minutos. Ao início da sessão, cada animal foi colocado no centro da arena e sua movimentação foi gravada com auxílio de um sistema de captação de vídeo. Os arquivos de vídeo foram analisados por meio do programa EthoVision® XT e os parâmetros coletados mediante a análise foram: distância total percorrida na arena, velocidade média, tempo total de imobilidade, número de movimentos rotativos, número de entradas na parte central da arena, tempo total gasto na parte central da arena. Durante a análise dos dados, a arena foi virtualmente subdividida em periferia e centro, sendo esta última região representativa de 50% do total da arena, ou seja, dimensionada em 20x20 cm. O traço de ansiedade é medido em função do tempo gasto de maneira a evitar a área central da arena. Sendo assim, quanto maior o tempo dispensado na periferia da arena (fora da zona central), maior o traço de ansiedade do animal.

### **3.2.4. Procedimento de acesso crônico, intermitente e por livre escolha ao etanol**

Este procedimento foi originalmente descrito por Wise (1973) e está brevemente discriminado a seguir. Quatro camundongos *Knockout para o gene Lrrk2 (Lrrk2 KO)* e quatro selvagens (controles) tiveram 24h de acesso simultâneo a 1 garrafa contendo uma solução etílica de 20% em água e 1 garrafa contendo água. O procedimento de livre escolha entre etanol e água se deu em dias alternados, às segundas, quartas e sextas-feiras, intercalados por 1 dia (terças e quintas-feiras) ou 2 dias (sábados e domingos) de privação da solução etílica. O local (direita ou esquerda) em que as garrafas eram apresentadas foram alternados em cada uma das sessões para evitar preferência por qualquer um dos lados. Todas as sessões iniciaram-se às 11:00h de um dia e terminaram às 11:00h do dia seguinte. As garrafas de água e etanol foram pesadas após 24 horas de acesso para o cálculo do consumo de

fluidos, enquanto o peso dos camundongos foi registrado uma vez por semana, sempre às segundas-feiras. Com essas medidas, foi possível calcular o consumo individual diário de água (em ml), o consumo diário de etanol em gramas de álcool consumido por kg de peso corporal (g/Kg) e a preferência pelo etanol (em porcentagem ingerida de etanol sob o total de fluido consumido). O consumo de cada um dos camundongos neste procedimento foi acompanhado por 3 semanas consecutivas (ou 9 sessões). Este procedimento foi conduzido em dois tipos distintos de gaiolas ou caixas: *Home cage* e *Drinking cage*. Nos dias de privação de etanol (terças, quintas, sábados e domingos) os animais foram mantidos de forma individualizada em suas *Home cages*, uma gaiola padrão em que todos os demais animais são mantidos, com acesso apenas a uma garrafa de água. Nos dias de livre escolha (segundas, quartas e sextas), os animais foram transferidos para outra gaiola, a *Drinking cage*, com duas aberturas na tampa, uma para a garrafa de água e outra para a garrafa de etanol. Desta maneira, a disponibilidade do álcool foi sempre pareada com um ambiente novo, e os camundongos aprendem mais rapidamente a distinguir os dias de livre acesso ao etanol daqueles em que a droga lhes é privada. Todos os animais foram mantidos individualmente em ambas as gaiolas, *Home* e *Drinking cages*. Ambas as gaiolas eram trocadas semanalmente. Ao longo de todo o experimento utilizou-se uma gaiola teste vazia, contendo apenas uma garrafa de etanol e outra de água, com o intuito de controlar a perda dos fluidos por evaporação e derramamento devido a manipulações experimentais durante as sessões.

### **3.2.5. Adulteração por quinino**

Após as 3 semanas de acesso intermitente e simultâneo à água e etanol, as soluções etílicas foram adulteradas com hidrocloreto de quinino (Sigma-Aldrich, CA, USA) em duas concentrações distintas, 0,005 g/L e 0,5mM, enquanto a água permaneceu inalterada. O quinino é uma substância aversiva para camundongos, e o único critério discriminante entre os animais do grupo Inflexível e Pesado neste modelo baseia-se na persistência apresentada pelo primeiro grupo em continuar consumindo grandes quantidades de etanol apesar da aversão provocada pelo quinino. O procedimento adotado foi o mesmo explicado na sessão 3.2.4 e foi conduzido durante 1 semana (3 sessões). Na segunda-feira (sessão 1) as soluções etílicas foram adulteradas com quinino a uma concentração final de 0,005g/L. Essa concentração foi a mesma utilizada na fase de “adulteração” no modelo de livre escolha. Na segunda e terceira sessões (quarta e sexta-feira) a concentração do quinino na solução etílica foi aumentada para 0,5mM (~0,20 g/L), concentração 40 vezes maior que aquela utilizada na definição do modelo. Essa concentração se mostrou altamente aversiva em camundongos da linhagem C57BL/6J, conhecidos por consumir grandes quantidades de etanol de forma voluntária (ou não forçada) (Lesscher *et al.*, 2010). Em cada uma das sessões, foram

registrados o volume de água e etanol consumidos em um período de 24h, assim como a preferência pela solução etílica.

### **3.2.6. Preferência por quinino**

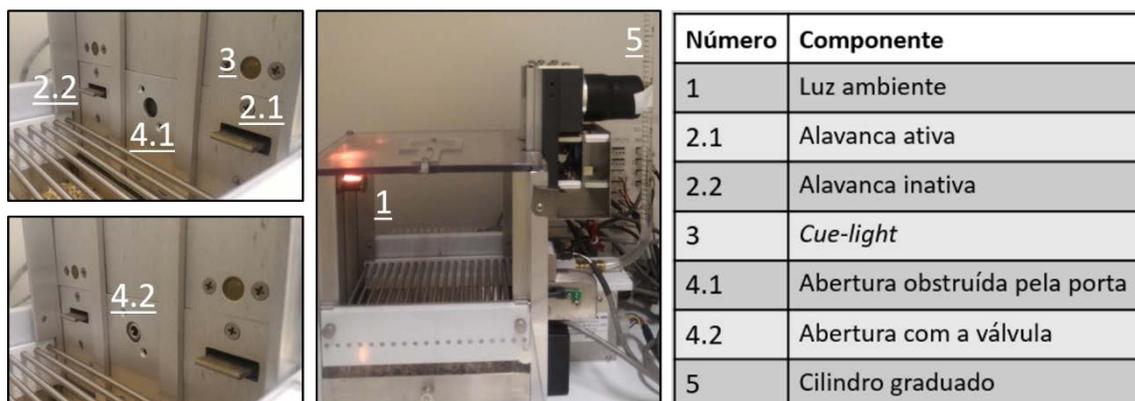
Um subgrupo distinto de 6 camundongos naive para etanol (3 *Lrrk2* KO e 3 selvagens) foram utilizados neste teste. O esquema de treinamento é o mesmo descrito na sessão 3.2.5, tendo como única diferença a qualidade das garrafas apresentadas nos dias de livre escolha. Aqui, a preferência foi testada entre uma garrafa contendo água e outra contendo solução aquosa de quinino (água adulterada com quinino). As concentrações de quinino utilizadas seguiram o esquema apresentado anteriormente: 0,005 g/Kg no dia 1 e 0,5mM nos dias 2 e 3.

### **3.2.7. Condicionamento operante: autoadministração de etanol**

#### **3.2.7.1. Caixas de condicionamento operante**

Foram utilizadas caixas de condicionamento operante (Med Associates Inc.<sup>®</sup>, Vermont, EUA) de metal e acrílico transparente, de dimensões 15.9 cm x 14.0 cm x 12.7 cm (comprimento x largura x altura), separadas por caixas de isolamento acústico equipadas com ventiladores para amenizar odores e ruídos externos. Todas as caixas eram modulares e continham os seguintes itens: (1) uma luz ambiente vermelha, a qual acendia apenas ao fim das sessões; (2) duas alavancas fixadas na parede do aparato (uma ativa (2.1), à direita e outra inativa (2.2), à esquerda); (3) uma *cue-light* (localizada acima da alavanca ativa); (4) uma abertura por onde a droga era apresentada (localizada entre as duas alavancas); e uma porta que desobstruía a abertura toda vez que a droga era entregue (Figura 4). Quando a alavanca ativa era pressionada pelo animal, o álcool era apresentado na abertura através de uma mangueira plástica dobrável acoplada a uma válvula na sua extremidade. O conjunto válvula/mangueira era por sua vez anexado a uma pipeta de vidro graduada (5ml) preenchida com uma solução etílica de 20% (v/v). Enquanto a pipeta de vidro era fixa à parede externa da caixa, a válvula, anexada à extremidade da mangueira, era livre para ser apresentada dentro da caixa durante o período de acesso à droga (através da abertura) e retraída ao fim do período de apresentação. A válvula, além de evitar o derramamento do etanol, era associada a um “*lickômetro*”, dispositivo capaz de medir o número de contatos (ou lambidas, do inglês *licks*) executados pelo camundongo durante o consumo do etanol. A *cue-light* (luz verde localizada acima da alavanca ativa) era utilizada para representar a disponibilidade da droga durante as sessões, ou seja, quando a luz acesa, sinalizava ao animal que o acionamento da alavanca ativa resultaria na apresentação da droga. Esse tipo de associação

é moldado através de condicionamento clássico ou Pavloviano e auxilia no estabelecimento do aprendizado da tarefa. A alavanca inativa não produzia nenhuma resposta quando pressionada, mas, assim como na alavanca ativa, o número de acionamentos executados ao longo das sessões era registrado. Em resumo, o aparato fornecia como dados de saída o número total de acionamentos na alavanca ativa, o número total de acionamentos na alavanca inativa, o tempo total de acesso à droga, o número total de lambidas (ou *licks*) e o consumo total de etanol (registrado com base no volume final da pipeta graduada).



**Figura 4:** Caixa de condicionamento operante. Os animais foram alojados individualmente e treinados para associarem o acionamento de uma alavanca com a entrega de uma solução alcoólica de 20% (v/v). As sessões de treinamento possuíam duração de 3,5h e eram executadas cinco dias por semana.

### 3.2.7.2. Autoadministração de etanol: Cronograma de treinamento operante

Para esta tarefa foram utilizados 24 camundongos machos (12 *Lrrk2* KO e 12 selvagens), divididos em duas coortes de 12 animais cada. Cada coorte foi subdividida em 2 blocos de 6 animais. Os treinamentos foram conduzidos durante 5 dias por semana, iniciando-se sempre com o bloco 1 às 9:30h (3 horas após o início do ciclo escuro) seguida pelo bloco 2 (após o término do bloco 1, às 13:00h). Esse esquema foi utilizado nas duas coortes. O treinamento operante foi constituído por uma parte inicial (ou de aprendizado), dividida em dois cronogramas distintos de treinamento, e uma fase tardia, com um cronograma único. Durante a fase inicial ou de aprendizagem, constituída de dois cronogramas distintos, os camundongos aprendem a associar a entrega do etanol ao acionamento da alavanca ativa. No primeiro cronograma da parte inicial de treinamento, as sessões possuíam duração de 6h e cada acionamento da alavanca ativa liberava o acesso ao etanol durante 60 segundos, ou seja, cada resposta (acionamento da alavanca ativa) corresponde a um acesso de 60 segundos. Essa relação direta de 1:1 (1 resposta, 1 acesso) é denominada de forma simplificada como FR1, do inglês *Fixed-Ratio 1*. Exclusivamente neste cronograma inicial, os

camundongos do bloco 1 e 2 foram treinados em dias alternados (um dia de treinamento seguido por um dia de descanso) durante 8 sessões, ou seja, bloco 1 nos dias 1, 3, 5 e 7 e bloco 2 nos dias 2, 4, 6 e 8. No segundo cronograma, ainda da fase inicial, as sessões tiveram duração de 3,5 h (e não mais 6h), enquanto os outros parâmetros foram mantidos, ou seja, FR1 e tempo de acesso de 60 segundos. Os camundongos foram treinados todos os dias (bloco 1 começando às 9:30h e bloco 2 começando às 13:00h) por 5 sessões. No cronograma seguinte, já na fase tardia, as sessões continuaram com a duração de 3,5h, mas o *Fixed-Ratio* foi alterado para 3 (FR3), ou seja, cada 3 respostas (acionamento da alavanca ativa) corresponde a um acesso, também de 60 segundos (relação de 3:1). Esse cronograma teve a duração de 10 sessões, constituindo ao todo 5 semanas de treinamento. A partir do nono dia de treinamento, duas vezes por semana (às quartas e sextas) e ao final de cada sessão, foram coletadas amostras de sangue da cauda de todos os camundongos com a finalidade de quantificar a concentração de álcool sanguínea (BEC).

### **3.2.7.3. Sessão de “Razão progressiva” (*Progressive Ratio*, ou *Breakpoint*)**

Após a quinta semana de treinamento nas caixas de condicionamento operante, os camundongos foram privados de etanol por 1 dia, permanecendo em suas gaiolas convencionais com acesso apenas à água. No dia seguinte, os animais foram submetidos a uma sessão de *Progressive Ratio*, em que a razão Resposta/Acesso (ou *Fixed-Ratio*, FR) aumenta progressivamente ao longo da sessão. Este treinamento tem uma duração máxima de 5h, iniciando-se com FR3 e 60 segundos de tempo de acesso. Enquanto o tempo de acesso é mantido o mesmo por toda a sessão (60s), o FR aumenta progressivamente a cada acesso conquistado. Em outras palavras, inicialmente, para receber acesso à droga, o animal deve pressionar a alavanca ativa por 3 vezes (FR3). Contudo, para conquistar o próximo acesso de 60s, o animal deverá agora pressionar a alavanca ativa não mais 3, mas 4 vezes (FR4), e assim consecutivamente. A frequência de incremento no FR a cada acesso conquistado obedece a seguinte sequência linear pré-estabelecida: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, e assim por diante. A sessão é encerrada caso o animal não conquiste um próximo acesso em um período máximo de 1 hora, ou caso a sessão atinja 5 horas de duração. A última *Fixed-Ratio* (ou FR) conquistada pelo animal na sessão de *Progressive Ratio* é denominada *Breakpoint* e pode ser utilizada como uma medida quantitativa da motivação do animal pela procura da droga (Richardson e Roberts, 1996).

### **3.2.8. Perda do reflexo de endireitamento (LORR, *Loss Of Righting Reflex*)**

Este teste foi utilizado com a finalidade de determinar a sensibilidade inicial de cada camundongo ao etanol e avaliar se esse fator correlaciona-se com o perfil de consumo

individual em uma exposição futura à droga. Vinte e quatro camundongos *naïve* para etanol foram injetados intraperitonealmente com uma solução de etanol em salina (18% v/v) a uma dose de 3,5 g/Kg. Logo após a injeção, cada camundongo foi colocado em posição de supino (com as 4 patas voltada para cima) em uma câmara em formato de “V” (12,5 x 25,5 cm) e testados quanto a perda do reflexo de indireitamento (LORR). Este estado é definido como a incapacidade do camundongo em endireitar sua postura (reposicionar-se com as quatro patas voltadas para baixo) por três vezes durante um período de 30 segundos (contados a partir da primeira tentativa bem-sucedida). O tempo decorrido entre a injeção da droga até a ausência de reflexo (incapacidade de se endireitar, de acordo com o critério explicado acima) é denominado “latência”. Após um período variável de tempo, o animal começa a retomar o reflexo então perdido. Caso o camundongo consiga executar com sucesso 3 tentativas de reendireitamento em um período de 30 segundos, o teste termina. O tempo decorrido entre a latência e a recuperação do reflexo é denominado “duração da perda do reflexo, ou duração da LORR”. A latência e duração da LORR foram registradas para todos os animais testados, 12 LRRK2 KO e 12 controles. Amostras de sangue da cauda de cada animal foi coletada para análise do BEC (*Blood ethanol concentration*, do inglês concentração de etanol sanguíneo) imediatamente após a recuperação do reflexo de endireitamento. Além da sensibilidade, definida como o valor dos parâmetros latência e/ou duração da LORR no primeiro teste, avaliou-se também a tolerância adquirida após as 5 semanas de consumo de etanol no protocolo de autoadministração operante (item 3.2.7.2). Para isso, um dia após o término da autoadministração de etanol, os animais foram testados novamente utilizando o mesmo protocolo de LORR definido acima. O segundo teste, por motivos técnicos, foi realizado somente com a coorte 1 (6 animais KO e 6 animais controle), portanto os dados de tolerância estão disponíveis apenas para 12 animais, enquanto para a avaliação da sensibilidade, todos os 24 animais foram testados. Tolerância foi aqui definida como uma diminuição individual na latência ou duração da LORR no segundo teste em comparação ao primeiro. Por sua vez, um aumento na relação entre o segundo e o primeiro teste foi definido como sensibilização.

### **3.2.9. Análise de concentração de etanol sanguíneo**

Todas as análises de BEC foram realizadas através do equipamento Analox-GM7 Analyser (Analox Instruments Ltda., Reino Unido). Foram coletados em tubos capilares cerca de 25uL de sangue provenientes da cauda dos camundongos imediatamente após o término de cada um dos protocolos de consumo de etanol (Itens 3.2.7.2 e 3.2.8). As amostras foram centrifugadas a 1000g por três minutos e apenas o plasma sanguíneo (5uL) foi utilizado para a medição do BEC, a qual foi realizada em duplicata. O ensaio utiliza o processo de oxidação do etanol pela enzima álcool oxidase, na qual a quantidade de oxigênio consumida é

diretamente proporcional à concentração inicial de etanol na reação. (Equação 1). A concentração de álcool no sangue é medida em mg de etanol a cada decilitro de plasma sanguíneo (mg/dl).

Equação 1:



### 3.3. Análise estatística

Para todas as análises, a distribuição da normalidade foi testada através do teste de *Shapiro Wilk*. Para a comparação entre grupos de genes diferencialmente transcritos via qPCR, foi utilizado o teste ANOVA de 1-via (1-ANOVA) seguida pelo pós teste *de Tukey*. Correlações de *Pearson* foram usadas para averiguar a relação entre os genes diferencialmente transcritos ou entre diferentes fatores avaliados no condicionamento operante.

Nas análises funcionais, as análises multivariadas com dois fatores foram avaliadas através do teste ANOVA de duas vias (2-ANOVA) com ou sem medidas repetidas, dependendo do desenho experimental. Nos casos em que a análise paramétrica não foi possível, utilizou-se da análise não paramétrica através do teste de Kolmogorov-Smirnov (KS) para o fator grupo (genótipo) e 1-ANOVA para o fator tempo.

As análises foram realizadas com o programa GraphPad Prism 6, versão 6.01 (GraphPad Software, Inc.). O nível de significância foi mantido  $p < 0,05$ . Os gráficos foram construídos utilizando o programa GraphPad Prism 6 e Igor Pro (versão 6.3.7.2) (WaveMetrics, Inc.).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise da expressão gênica em larga escala

#### 4.1.1. Normalização

A primeira etapa em uma análise global de expressão gênica é a normalização. Este pré-processamento de dados consiste em efetuar correções nas variações de caráter não biológico encontradas nos dados brutos a fim de homogeneizar as intensidades de fluorescência encontradas nas triplicatas técnicas de cada grupo. A tabela 2 apresenta o total de transcritos filtrados após todas as etapas de normalização dos dados e exclusão das sondas não hibridizadas ou não detectadas pelo algoritmo de normalização.

**Tabela 2:** Eficiência de hibridação nos *arrays*. Representação do total de transcritos detectados nos grupos Leve e Inflexível em suas respectivas réplicas técnicas após as etapas iniciais de normalização. Todas as réplicas apresentaram eficiência de hibridação superior a 50%.

	Número de sondas detectadas		
Grupo	Réplica #1	Réplica #2	Réplica #3
Leve	15072	24047	23400
Inflexível	16122	23052	17136

Todas as réplicas técnicas apresentaram, em média, uma eficiência de hibridação acima de 50%, índice considerado eficiente de acordo com dados da literatura (Breitling *et al.*, 2004). Com o objetivo de investigar o grau de integridade das amostras testadas, realizou-se também uma análise global de degradação de RNA. Nenhuma amostra apresentou um grau de degradação que compromettesse a análise dos dados (dados não mostrados).

Após a normalização inicial, todos os seis *chips* foram submetidos a uma análise de clusterização por meio da Análise de Componentes Principais, PCA (do inglês, *Principal Component Analysis*). Esta análise tem por finalidade agrupar todos os dados semelhantes entre os *arrays* tendo como base os dados de expressão gênica global. Sendo assim, é de se esperar que todos os conjuntos de dados (*chips*) representantes de um mesmo grupo experimental se associem formando um único *cluster*. Como esperado, foi verificada uma associação das réplicas dentro de cada grupo e uma dissociação entre grupos (dados não mostrados).

#### 4.1.2. Análise estatística

Os valores de da quantidade de transcritos de cada gene gerado após normalização foram analisados utilizando o teste não-paramétrico *RankProduct* (RankProd), o qual possui um algoritmo para identificar genes diferencialmente regulados através do ranqueamento dos genes. Esta abordagem tem se mostrado consistente e confiável, mesmo em casos com altos ruídos de fundo e é considerada uma ferramenta poderosa para identificar mudanças de expressão em microarranjos (Breitling *et al.*, 2004). Na análise comparativa entre animais do grupo Leve e Inflexível, estabelecendo-se um pfp (do inglês *predictions of false positive*)  $\leq 0,05$ , apenas 22 genes apresentaram um perfil transcricional significativamente diferente entre os grupos estudados (Apêndice 2). Apesar dos índices pfp e Benjamini and Hochberg's (BH) serem as medidas para o ajuste do valor p para múltiplos testes mais utilizados em análises de expressão gênica em larga escala, neste caso, esses fatores de correção se mostraram muito restritivos. Essa limitação provavelmente reside no fato do desenho experimental aplicado utilizar um *pool* de animais distribuídos igualmente em três réplicas técnicas. Se por um lado esta abordagem reduz drasticamente as variações não biológicas nas hibridações, por outro lado, perde-se também muita variação biológica, essencial para se ganhar poder estatístico nas análises. A análise desses 22 genes diferencialmente transcritos não resultou em nenhuma hipótese viável que pudesse distinguir os fenótipos estudados. Com isso, optou-se por proceder com uma análise menos conservadora, utilizando como fator discriminante o valor p não corrigido, com um índice de corte  $\leq 1\%$ . Considerando que as correções do valor p são muito restritivas e que a análise de microarranjo se baseia em metodologias heurísticas que necessitam de uma contra validação subsequente, o risco de erro tipo alfa assumido ao se considerar um valor p não corrigido para as análises futuras não configura um problema em potencial, uma vez que todos os dados gerados serão posteriormente contra validados. Ao se fixar o valor p em 1%, 1.127 genes se mostraram diferencialmente transcritos na comparação entre grupo leve e inflexível, dentre os quais 615 foram hiper-regulados e 512 hiporregulados (Apêndice 2). A lista de genes diferencialmente transcritos utilizada neste estudo foi então estabelecida com o critério de um p-valor  $\leq 1\%$ .

#### 4.1.3. Análise exploratória dos dados

Com a lista de genes diferencialmente regulados estabelecida, foram realizadas duas análises exploratórias iniciais. A primeira delas objetivou traçar o perfil ontológico dos genes em questão, classificando-os de acordo com sua função celular, molecular ou processos biológicos. A ontologia genética (ou *Gene Ontology*, GO) representa um sistema de padronização no qual se utiliza um conjunto de terminologias específicas que descrevem genes ou produtos gênicos e suas respectivas relações funcionais. Esta iniciativa permite

adquirir uma maior eficiência na troca de informações entre diferentes experimentações, modelos animais e grupos de pesquisas, por exemplo. A ontologia cobre três domínios: componentes celulares, funções moleculares e processos biológicos. A partir desta análise, verificou-se que a maioria dos GDR codifica proteínas integrantes de membrana que interagem com íons (GO:0015075) ou proteínas (GO:0005515). A classificação em subdomínios constatou a presença de um conjunto considerável de genes envolvidos no desenvolvimento do telencéfalo, globo pálido e estriado (GO:0021537; GO:0021544; GO:0021756, respectivamente) (dados não mostrados).

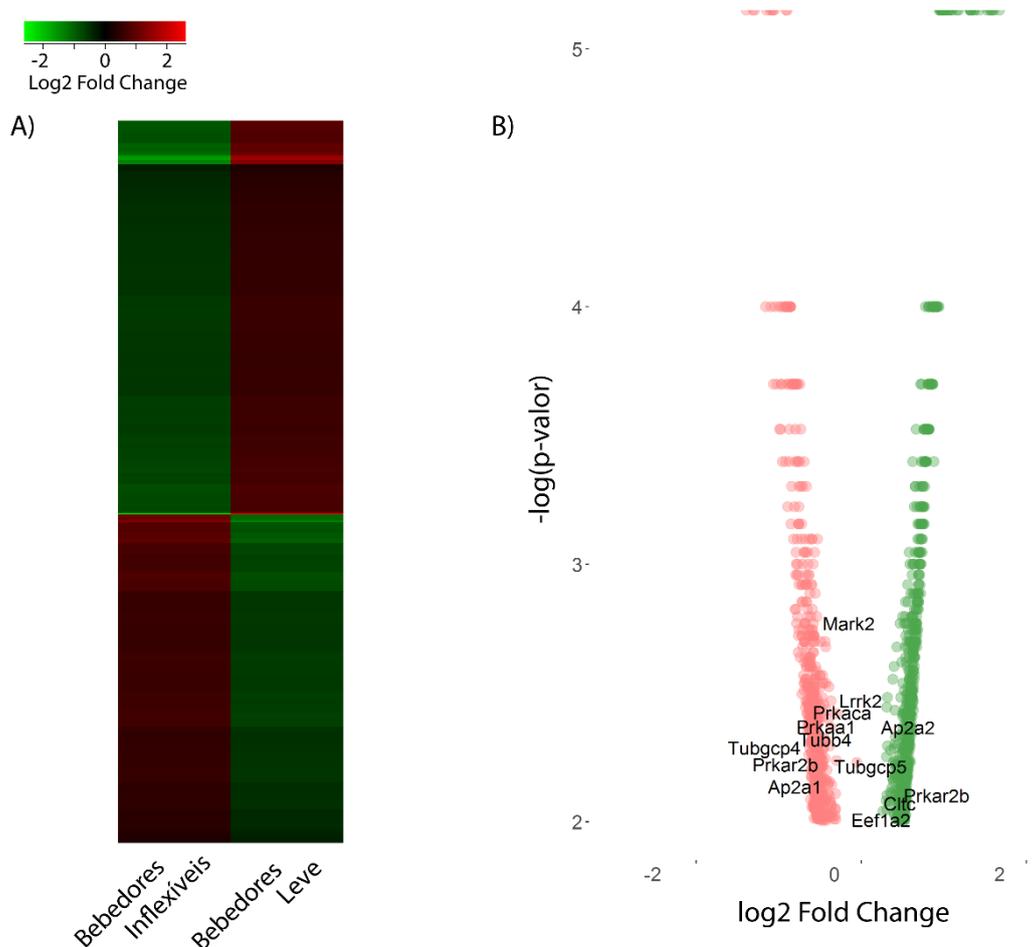
A segunda análise exploratória avaliou as possíveis vias bioquímicas diferencialmente reguladas entre os dois grupos fenotípicos, tendo como base a lista de GDR. Como resultado, foram encontradas alterações relevantes em diferentes vias conhecidamente envolvidas com o fenótipo alcoolismo, como processos de sinalização mediada por dopamina, glutamato, opioides e proteína quinase A. Além dos genes e processos biológicos clássicos e já bem fundamentados no estudo do alcoolismo, essa análise discriminante identificou também a desregulação em uma via até então nunca antes relacionada ao alcoolismo, a qual possui um papel central na condução de diversos processos neuronais como endocitose, plasticidade e formação de espinhos sinápticos (Macleod *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2008; Parisiadou *et al.*, 2009; Heo *et al.*, 2010; Cirnar *et al.*, 2014; Beccano-Kelly *et al.*, 2015) (Tabela 3).

**Tabela 3:** Vias candidatas diferencialmente reguladas entre animais do grupo leve e inflexível. A análise foi baseada no p-valor de cada GDR e o resultado aqui mostrado representa apenas as 5 vias mais significativas. **Via candidata:** Nome: Nome identificador da via candidata de acordo com o software MetaCore; Razão: proporção entre os genes enriquecidos na análise e o total de genes presentes na via; p valor: probabilidade de erro associada ao enriquecimento aleatório. **Genes encontrados:** Gene: símbolo do gene analisado; p valor: valor p não corrigido relativo à análise do array.

Via Candidata			Genes encontrados	
Nome	Razão	p-valor	Gene	p valor
LRRK2 in neurons in Parkinson's disease	13/33	1.534e-8	<i>Prkaca</i>	0.0039
			<i>Prkar2b</i>	0.0066
			<i>Prkaa1</i>	0.0050
			<i>Ywhaz</i>	0.0083
			<i>Lrrk2</i>	0.0034
			<i>Cltc</i>	0.0085
			<i>Ap2a1</i>	0.0061
			<i>Ap2a2</i>	0.0043
			<i>Mark2</i>	0.0016
			<i>Eef1a2</i>	0.0082
			<i>Tubgcp4</i>	0.0061
			<i>Tubgcp5</i>	0.0061
			<i>Tubb4</i>	0.0048

Signal transduction PKA signaling	7/51	1.405e-7	<i>Gna13</i>	0.0039
			<i>Ppp1r1b</i>	0.0007
			<i>Prkaca</i>	0.0039
			<i>Pde4a</i>	0.0076
			<i>Anapc11</i>	0.0006
			<i>Cdk16</i>	0.0027
			<i>Gabrb3</i>	0.0001
Neurophysiological process Glutamate regulation of Dopamine D1A receptor signaling	8/45	3.869e-6	<i>Drd1a</i>	0.0099
			<i>Grial</i>	0.0008
			<i>Cdk5r1</i>	0.0068
			<i>Ppp1r1b</i>	0.0007
			<i>Ppp2r1a</i>	0.0048
			<i>Pdyn</i>	0.0025
			<i>Gabrb3</i>	0.0001
			<i>Prkaca</i>	0.0039
Development Regulation of CDK5 in CNS	4/28	1.033e-3	<i>Drd1a</i>	0.0099
			<i>Bdnf</i>	0.0002
			<i>Cdk5r1</i>	0.0068
			<i>Prkaca</i>	0.0039
Development_Delta- and kappa-type opioid receptors signaling via beta-arrestin	9/23	6.183e-9	<i>Cltc</i>	0.0085
			<i>Dyn1</i>	0.0020
			<i>Dyn2</i>	0.0071
			<i>Grk5</i>	0.0075
			<i>Adrbk2</i>	0.0072
			<i>Prkce</i>	0.0033
			<i>Prkch</i>	0.0013
			<i>Gnb4</i>	0.0022
			<i>Penk</i>	0.0032

Essa via, denominada *LRRK2 in neurons in Parkinson's disease*, é centrada em um gene denominado *Leucine-Rich-Repeat Kinase II (Lrrk2)*, o qual está associado a aproximadamente 10% dos casos familiares de doença de Parkinson com padrão de herança dominante (Di Fonzo *et al.*, 2006). Essa via é constituída por 33 genes, entre os quais 13 deles (40%) foram diferencialmente regulados entre os animais do grupo Leve e Inflexível (Tabela 3; Figura 5). Devido ao seu potencial inovador no estudo do alcoolismo e ciente de que muitas das funções orquestradas pela proteína *LRRK2* estão também desreguladas em indivíduos adictos, decidiu-se por investigar a fundo a participação da via em questão no comportamento da perda de controle sob o álcool neste modelo de livre escolha.



**Figura 5:** Visão geral dos genes diferencialmente regulados. (A) *Heatmap* destacando os 512 genes hiporregulados e os 615 hiper-regulados na comparação entre bebedores do grupo Leve e Inflexível. (B) Volcano plot dos GDR hipo (verde) e hiperregulados (vermelho) na comparação entre os bebedores leves e inflexíveis. Os genes da via de LRRK2 levantados na análise de enriquecimento estão destacados nas suas respectivas coordenadas.

#### 4.2. Validação da via LRRK2 como candidata à perda de controle

Para proporcionar uma validação independente dos GDR identificados na via LRRK2, foi realizada uma contra validação destes genes através da técnica de PCR em tempo real (qPCR). Como descrito anteriormente, neste ponto, todos os quatro grupos (controle, bebedores leve, bebedores pesado e bebedores inflexíveis) foram analisados. Esta abordagem permite, por exemplo, a identificação de padrões de transcrição inerentes apenas aos bebedores inflexíveis e, portanto, potencialmente implicados na compulsividade e da perda de controle sobre o consumo do álcool.

A via LRRK2 está envolvida em vários mecanismos de sinalização celular e, portanto, controla várias funções celulares. No presente estudo, considerou-se, com base em

um levantamento bibliográfico, que essa via controla três domínios funcionais distintos (discutidos em detalhes posteriormente): (1) formação de espinhos dendríticos, (2) plasticidade sináptica e (3) recaptção de componentes sinápticos. Uma vez que a maioria dos genes recuperados durante a análise de enriquecimento se enquadra no domínio funcional de recaptção de componentes sinápticos (Tabela 4), optou-se também por selecionar outros genes não identificados como GDR pela análise transcriptômica, mas que desempenham uma função importante nos demais domínios não cobertos (isto é, a formação de espinhos dendríticos e plasticidade sináptica). Para este fim, um total de nove genes pertencentes à via LRRK2 foram contravalidados: três presentes na lista GDR (*Lrrk2*, *Cltc* e *Mapt*) e seis ausentes (*Snca*, *Msn*, *Ezr*, *Rdx*, *Actg1* e *Picalm*) (Tabela 4). Tendo definida a lista de genes para a contravalidação através da qPCR, deu-se prosseguimento ao desenho e síntese dos iniciadores (Apêndice 1) e posteriormente à quantificação dos transcritos.

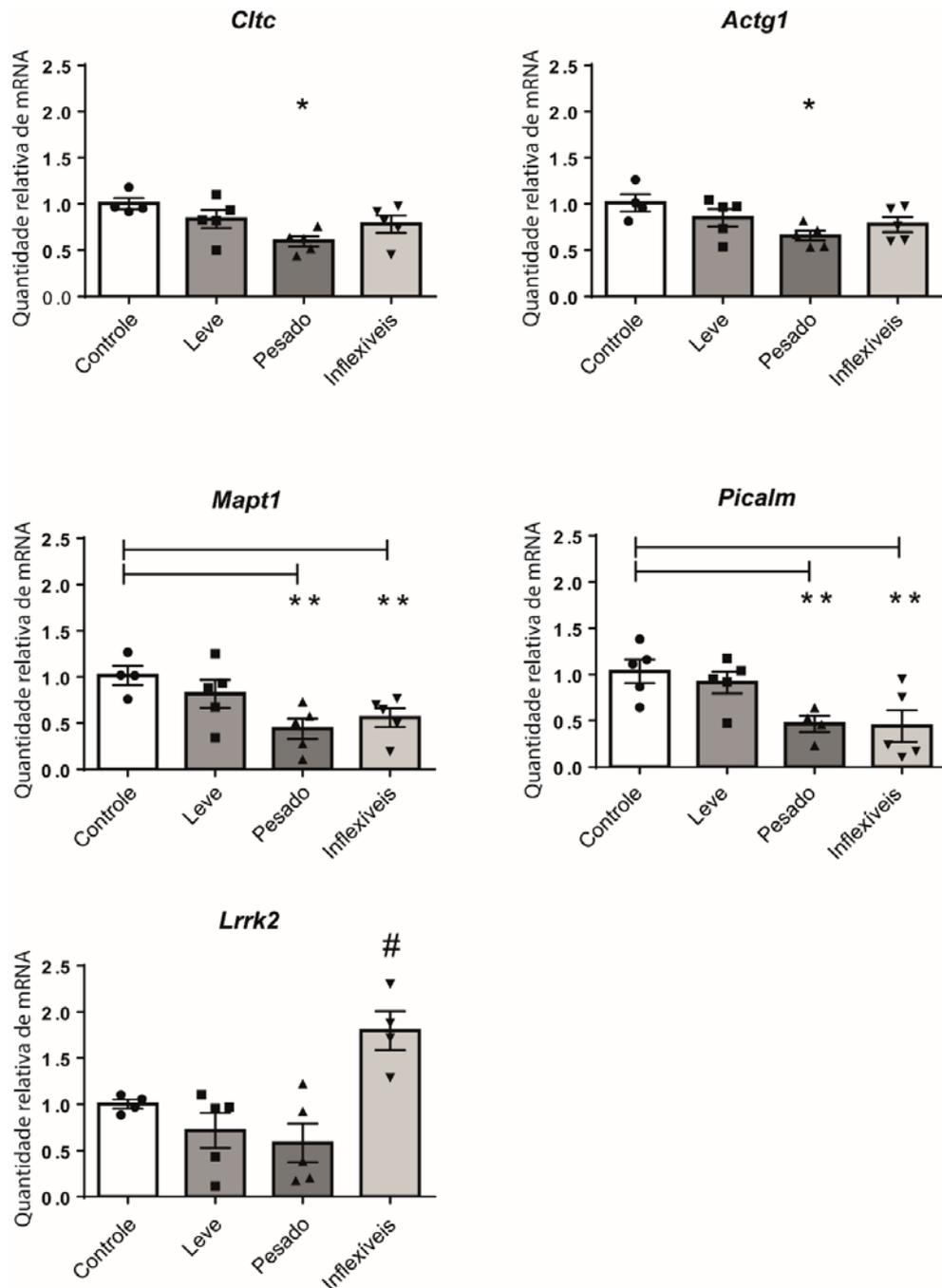
**Tabela 4:** Domínios funcionais da via LRRK2

Domínios funcionais	Genes candidatos
Recaptção de componentes sinápticos	<i>Cltc</i> , <i>Mapt</i> , <i>Picalm</i> , <i>Actg1</i>
Formação de espinhos dendríticos	<i>Erz</i> , <i>Rdx</i> , <i>Msn</i> , <i>Actg1</i>
Plasticidade neural/Liberação de neurotransmissores	<i>Lrrk2</i> , <i>Snca</i>

#### 4.2.1. Quantificação relativa dos transcritos por qPCR

ANOVA de uma via revelou um efeito principal no fator genótipo para os genes *Cltc* e *Actg1* ( $F [3,15] = 4,132$ ;  $p < 0,05$  e  $F [3,15] = 3,876$ ;  $p < 0,05$ , respectivamente) e a análise por pós-teste mostrou uma diminuição nos níveis de mRNA destes genes apenas nos animais do grupo Pesado, quando comparados ao grupo controle (Figura 6A-B). Com relação aos genes *Mapt1* ( $F [3,15] = 4,370$ ,  $p < 0,05$ ) e *Picalm* ( $F [3,15] = 4,866$ ,  $p < 0,05$ ), ambos apresentaram redução de seus transcritos nos grupos Pesado e Inflexível (Figura 6C-D), indicando uma provável influência do consumo de etanol em *binge* na regulação destes genes. Não houve diferença significativa nos níveis de mRNA dos genes *Msn* ( $F [3, 15] = 0,54$ ;  $p = 0,66$ ), *Snca* ( $F [3, 15] = 1,64$ ;  $p = 0,22$ ), *Rdx* ( $F [3, 15] = 0,29$ ;  $p = 0,83$ ) e *Ezr* ( $F [3, 15] = 2,07$ ;  $p = 0,14$ ) entre os grupos estudados (dados não mostrados). Por sua vez, o gene *Lrrk2*, quinase reguladora de todos os processos executados por esta via, apresentou um padrão peculiar de regulação. ANOVA de uma via mostrou um efeito principal no fator Grupo [ $F (3,13) = 5,166$ ,  $p < 0,01$ ] e teste de comparações múltiplas de Tukey revelou aumento nos níveis de

mRNA deste gene no grupo de Bebedores Inflexíveis, quando comparado a todos os demais grupos. Vale também ressaltar a ausência de diferença significativa nos transcritos deste gene na comparação entre animais do grupo Leve e Pesado com o grupo controle. Esse perfil habilita o padrão de hiper-regulação do gene *Lrrk2* como característica particular ou discriminante dos animais com um perfil de consumo de etanol do tipo inflexível (Figura 6E).



**Figura 6:** Quantificação dos transcritos estriatais representativos dos genes da via LRRK2 nos diferentes grupos experimentais. A-B: Genes hiporregulados somente no grupo bebedores pesado, \* $p < 0,05$ ; C-D: Genes hiporregulados em ambos os grupos Pesado e Inflexível, \*\* $p < 0,05$ ; E: Gene hiper-

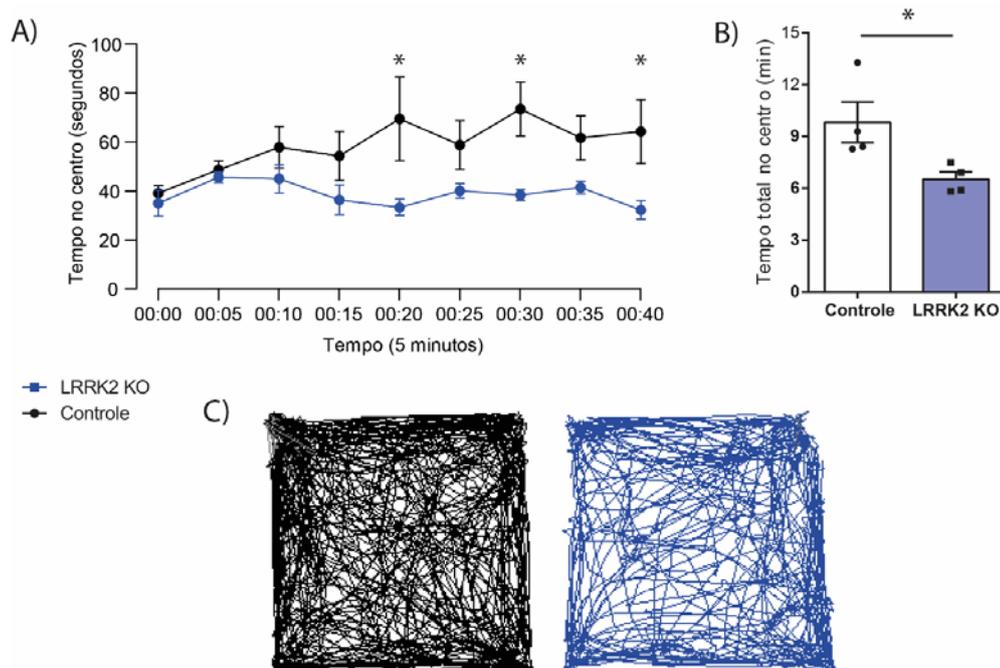
regulado somente no grupo de bebedores inflexíveis, #p<0,05 . Os dados são representados como média e erro padrão da média. ANOVA de uma via seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. A quantidade relativa de mRNA foi comparada utilizando o grupo controle como referência e utilizando o gene *Gapdh* como fator normalizador. *Actg1*, Actin Gamma 1; *Cltc*, Clathrin Heavy Chain; *Mapt1*, Microtubule-Associated Protein Tau; *Picalm*, Phosphatidylinositol Binding Clathrin Assembly Protein; *Lrrk2*, Leucine-rich repeat kinase 2

Os dados de regulação gênica foram também analisados através de uma matriz de correlação, comparando-se cada um dos nove genes descritos acima entre si em cada um dos grupos experimentais. Nenhuma correlação foi evidenciada (dados não mostrados).

### 4.3. Validação Funcional

#### 4.3.1. Campo aberto

Com a premissa de avaliar a existência de comportamentos do tipo-ansioso e simultaneamente acessar possíveis prejuízos de ordem motora nos animais KO, avaliou-se a performance de 4 animais KO e 4 animais controle, todos naive para etanol, no aparato de campo aberto. Nesta tarefa, o comportamento do tipo-ansiedade é medido em função do tempo dispensado por cada animal longe da área central da arena. Ou seja, quanto maior o tempo gasto na periferia da arena (próximo às paredes) e, conseqüentemente, fora de sua área central, maior o traço de ansiedade (para detalhes experimentais, veja tópico 3.2.3). A figura 7A mostra a média de tempo gasto por cada grupo na parte central do aparato dividido em intervalos de 5 minutos. ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou um efeito principal no fator Grupo (genótipo) ( $F[1,6]=6,575$   $p=0,0427$ ) e o teste de comparações múltiplas de Sidak indicou que os animais KO dedicaram menos tempo na área central da arena nos intervalos de 20-25, 30-35 e 40-45 minutos quando comparados aos animais selvagens (Figura 7A). Quando os dados foram compilados ao longo dos 45 minutos de sessão, o mesmo padrão foi observado, ou seja, os camundongos KO evitaram a região central da arena em maior proporção do que sua contraparte selvagem ( $p=0,02$ ) (Figura 7B). Na figura 7C é mostrada a trajetória percorrida por um animal representante do grupo selvagem (rastros preto) e por um animal representante do grupo KO (rastros azul). Visualmente nota-se que os animais KO percorrem a região central da arena em menor frequência do que os camundongos selvagens. Uma vez que os camundongos *Lrrk2* KO apresentam danos sutis em neurônios dopaminérgicos (Parisiadou *et al.*, 2014), as diferenças descritas acima poderiam estar relacionadas simplesmente a possíveis déficits motores destes animais. Posto isto, decidiu-se também avaliar comparativamente alguns parâmetros indicativos de prejuízos de ordem locomotora ao longo dos 45 minutos de sessão no campo aberto.



**Figura 7:** Avaliação do comportamento tipo ansioso a partir do teste do campo aberto. (A) Gráfico de progressão demonstrando que a partir do minuto 20 os animais controle passam a gastar mais tempo na arena central do aparato quando comparados aos animais KO. O comportamento do tipo ansiedade é medido de forma inversamente proporcional ao tempo gasto no centro da arena. (B) Média e erro padrão da média referente dos 45 minutos totais de sessão. Novamente, camundongos controle demonstraram uma maior presença no centro da arena. (C) Traços representativos do percurso percorrido por um representante do grupo controle e um do grupo KO. Visualmente é possível observar que o animal KO permanece menos tempo na região central da arena.

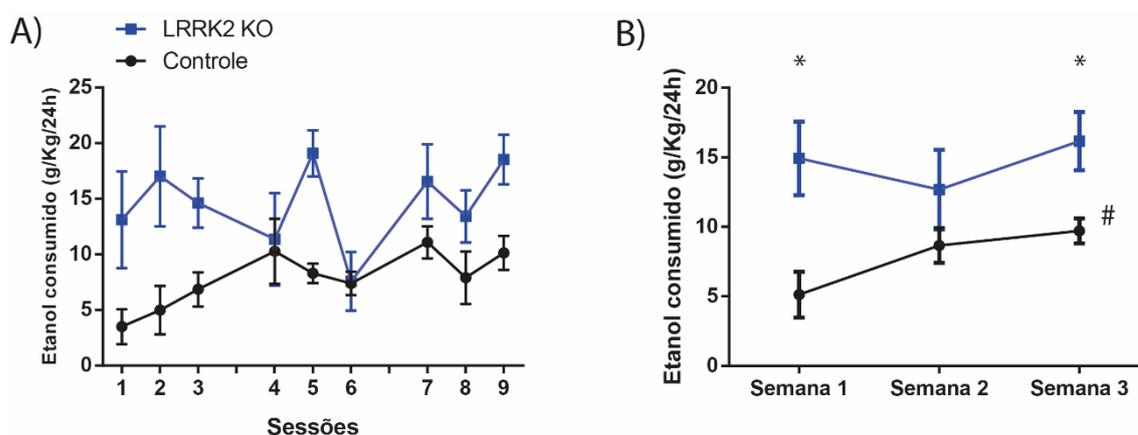
Para a avaliação da performance motora, os critérios analisados foram distância total percorrida, velocidade média, tempo total de imobilidade e quantidade de movimentos rotativos. Nenhuma diferença foi encontrada considerando os critérios analisados (Tabela 5). Apesar de não ter sido quantitativamente registrado, visualmente os animais KO defecaram mais durante os 45 min de teste do que sua contraparte selvagem.

**Tabela 5:** Parâmetros motores avaliados no aparato do campo aberto. A similaridade entre os grupos nos critérios avaliados demonstra a ausência de déficit motor entre os animais.

Parâmetro	Controle	LRRK2 KO	p valor
Distância total percorrida (m)	185,25 ± 10,72	183,42 ± 9,47	>0,99
Velocidade média (cm/s)	6,86 ± ,040	6,79 ± 0,35	>0,99
Tempo de imobilidade (min)	29,84 ± 1,80	30,16 ± 0,62	0,66
Número de rotações	60,5 ± 10,85	52,25 ± 8,68	0,65

#### 4.3.2. Procedimento de acesso crônico, intermitente e por livre escolha ao etanol

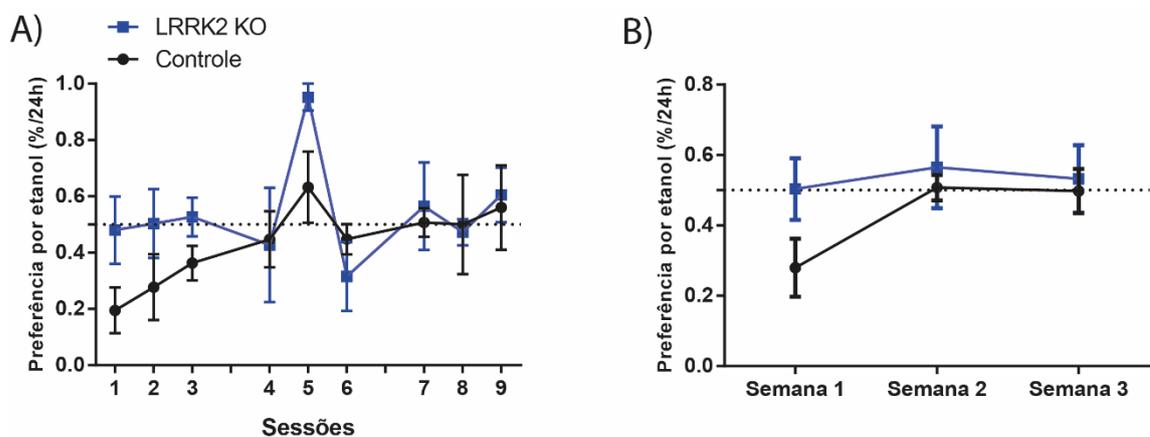
Para avaliar a influência do gene *Lrrk2* sob a preferência e o consumo de etanol, 4 camundongos selvagens e 4 camundongos KO foram expostos a um paradigma de livre acesso simultâneo à água e etanol 20% (v/v) em dias alternados durante 3 semanas. A análise longitudinal do consumo (Teste de Friedman seguido pelo teste de comparação múltiplas de Dunn) mostrou que os camundongos do grupo controle apresentaram um perfil de consumo escalonado de etanol, iniciando a primeira semana com uma média de ingestão etílica relativamente baixa ( $5,12 \pm 1,65$  g/kg/24h) e aumentando significativamente seu consumo para  $9,71 \pm 0,9$  g/kg/24h na terceira e última semana ( $p < 0,05$ ) (Figura 8 A e B). Por outro lado, os animais LRRK2 KO não apresentaram tal escalonamento de consumo, visto que desde a primeira até a terceira semana o consumo da droga foi mantido constantemente alto (Figura 8 A e B). Quando o consumo de etanol foi comparado semanalmente entre os dois grupos, observou-se uma ingestão significativamente maior da droga nos animais *knockout* nas semanas 1 e 3 (KS,  $p < 0,05$ ), e um consumo semelhante entre os grupos na semana 2 ( $p > 0,05$ ) (Figura 8 B).



**Figura 8:** Perfil de consumo crônico e intermitente de etanol em animais KO e selvagens. (A) O acesso à droga foi realizado em dias alternados utilizando duas garrafas, uma de água e outra de etanol 20%, durante 3 semanas. Camundongos KO consumiram maior quantidade de etanol desde o primeiro dia de acesso. (B) No compilado semanal, camundongos KO consumiram maior quantidade de etanol do que os animais selvagens nas semanas 1 e 3. \* $p < 0,05$ .

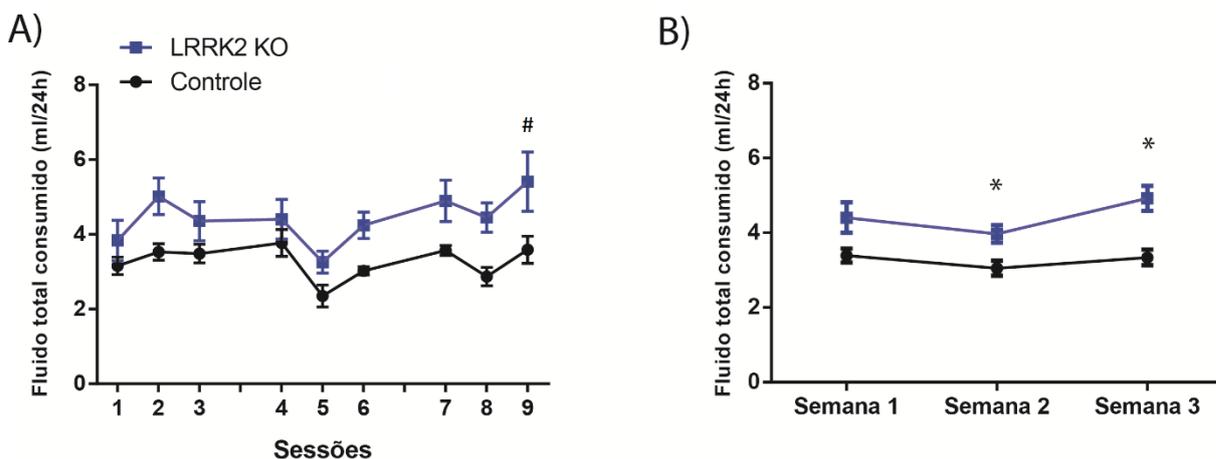
Na avaliação da preferência por etanol em função da quantidade total de fluido ingerida, assim como nos dados de consumo, notou-se também um escalonamento na preferência por etanol nos animais do grupo controle na primeira semana. Ainda que sem relevância estatística, a preferência aumentou de  $16,3 \pm 8,1\%$  no primeiro dia para  $36,2 \pm 6,1\%$  no terceiro ( $p > 0,05$ ) (Figura 9 A). A partir da segunda semana, o índice se estabilizou e

mostrou níveis semelhantes à terceira semana de acesso ( $50,7 \pm 3,6\%$  e  $49,7 \pm 6,2\%$ , respectivamente) (Figura 9 B). Diferentemente dos animais do grupo controle, os camundongos KO não escalonaram sua preferência, visto que, assim como os dados de consumo, os índices se mostraram estáveis e próximos a 50% desde a primeira até a terceira semana de livre escolha (Figura 9 B). Apesar da diferença visual entre os grupos controle e KO na primeira semana de treinamento, nenhuma diferença estatística foi observada ( $p>0,05$ ). No quinto dia de treinamento, é possível notar um salto tanto no consumo de etanol (Figura 8 A) quanto na preferência pela droga (Figura 9 A) nos animais do grupo KO, a qual atinge valores próximos a 100%. Essa variação provavelmente não está relacionada a fatores externos, uma vez que foi observada em apenas um dos grupos, e todos os animais são testados ao mesmo tempo em um mesmo ambiente experimental altamente controlado.



**Figura 9:** Preferência por etanol entre camundongos KO e selvagens. (A) Camundongos KO iniciam o teste apresentando uma maior, porém não significativa, preferência por etanol quando comparados a sua contraparte selvagem. A diferença desaparece nos dias consecutivos. (B) O compilado semanal dos dados aponta que camundongos KO mostram níveis de preferência acima de 50% desde a primeira semana. Por outro lado, camundongos selvagens alcançam este índice apenas a partir da segunda semana de teste, o qual também é mantido na terceira semana.

Comparando o consumo total de fluido ingerido (água + etanol 20%), foi encontrado um efeito principal no fator Grupos (genótipos) [ $F(1,6)=19,27$ ]. Teste de comparações múltiplas de Sidak mostrou que o consumo médio entre os grupos é semelhante ao longo dos dias, se mostrando significativamente diferente apenas no dia 9 ( $p<0,05$ ) (Figura 10 A). Na análise semanal (Figura 10 B), teste de Kolmogorov-Smirnov evidenciou um consumo elevado nos animais KO nas semanas 2 e 3 ( $p<0,05$ ). A divergência apresentada pelos dados diários e semanais tem origem na menor restrição imposta pelos testes não paramétricos, como o Kolmogorov-Smirnov em comparação ao teste multivariado com dois fatores (ANOVA de duas vias).

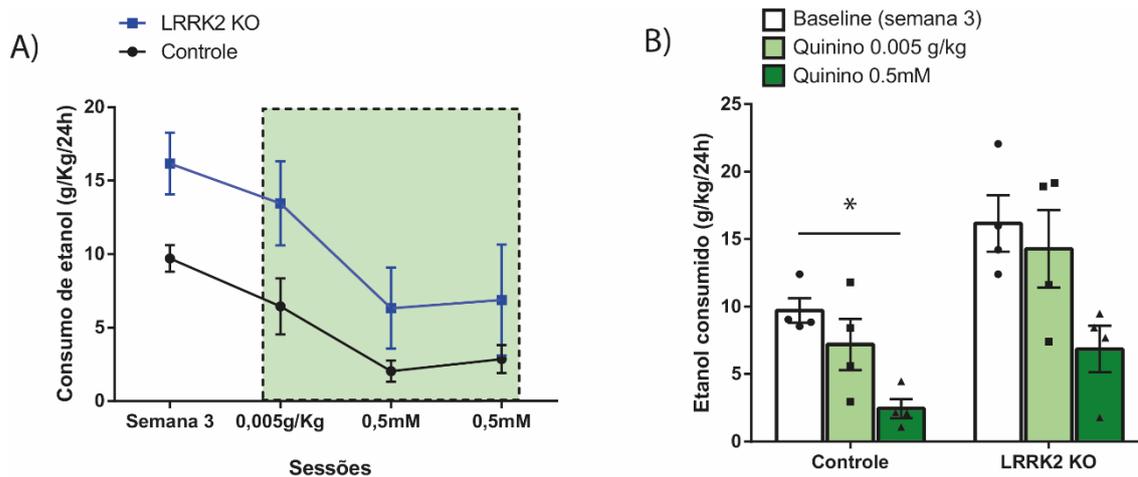


**Figura 10:** Consumo total de fluido durante procedimento de livre escolha. Camundongos KO possuem uma maior necessidade hídrica do que camundongos selvagens e tendem a consumir uma maior quantidade de fluido diária. # $p < 0,05$ , 2-ANOVA; \* $p < 0,05$ , KS

De forma geral, estes dados mostram que o aumento no consumo de etanol nos animais KO é acompanhado também por um aumento no consumo diário de água. Ainda que de forma não definitiva, os resultados mostrados levantam a hipótese de que o consumo elevado de etanol nos animais KO para o gene *Lrrk2* pode ser um mero reflexo da sua maior necessidade hídrica diária, e não uma consequência direta do aumento na sua motivação pelo consumo da droga. Essa questão, levantada inicialmente aqui, será explorada e discutida detalhadamente em outros tópicos.

#### 4.3.3. Adulteração por quinino

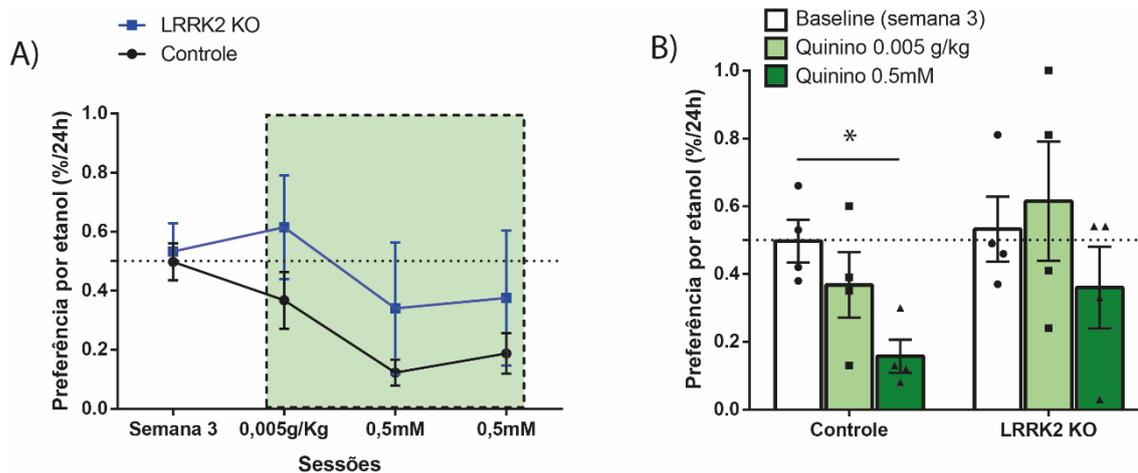
Na quarta semana do paradigma de livre escolha, as soluções etílicas foram adulteradas com hidrocloreto de quinino em duas diferentes concentrações. No dia 1, a dose utilizada foi de 0,005 g/L, mesma concentração utilizada na definição do modelo, e nos dias 2 e 3, 0,5mM, concentração altamente aversiva para camundongos. Visando analisar o grau de inibição na ingestão de etanol provocado pela adulteração da droga com quinino (definido aqui como perda de controle), comparou-se o consumo médio de etanol na terceira semana de livre escolha (consumo basal) com o seu respectivo consumo na fase de adulteração. Como exposto na Figura 11 A, a adulteração por quinino provocou em ambos os grupos um efeito levemente aversivo (e não significativo) na sua menor concentração (0,005g/Kg), seguida por uma aversão mais pronunciada na dose de 0,5mM. Analisando detalhadamente os dados (Figura 11 B), o teste de Friedman seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn mostrou que, para os animais do grupo controle, apenas a dose de 0,5mM foi capaz de reduzir significativamente o consumo basal de etanol ( $p < 0,05$ ).



**Figura 11:** Redução no consumo de etanol após a adulteração das soluções etílicas com quinino. (A) Progressão do consumo basal de etanol pré e pós adulteração entre os dois grupos. (B) A adulteração da droga com quinino em sua maior concentração é eficiente em reduzir o consumo de etanol apenas em animais selvagens, mas não em KO. \* $p < 0,05$ , teste de Friedman.

Nos animais KO, apesar da dose de 0,5mM também provocar uma redução parcial no consumo de etanol, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Há de se notar também que o consumo de etanol dos animais KO na dose de 0,5mM ( $6,85 \pm 1,7$  g/Kg/24h) é extraordinariamente similar ao consumo dos animais do grupo controle na dose mínima de 0,005g/Kg ( $7,20 \pm 1,9$  g/kg/24h). Em virtude do pequeno número amostral, os dados foram fortemente influenciados pela presença de um *outlier* no grupo KO na etapa de adulteração com quinino na dose de 0,5mM.

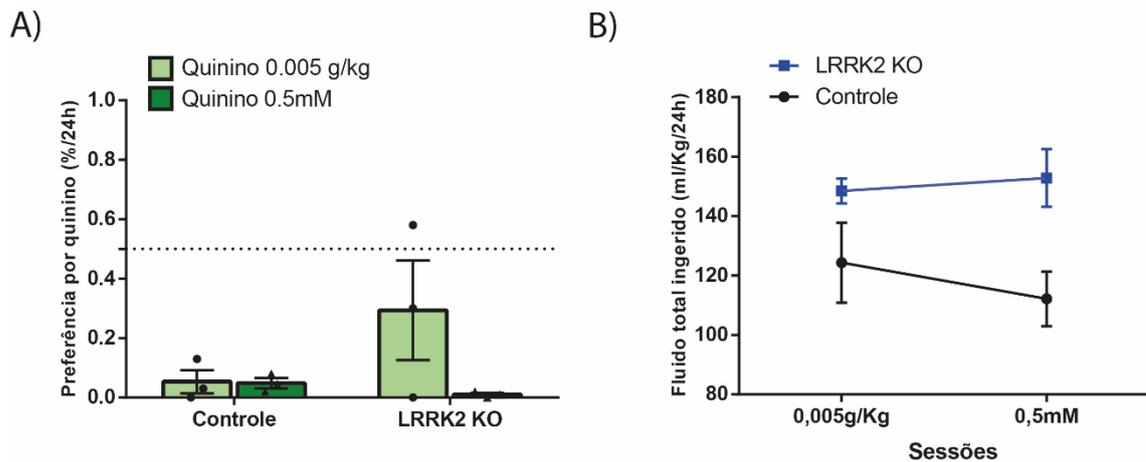
A avaliação da preferência entre as soluções na fase de adulteração mostra o mesmo padrão observado anteriormente para o consumo da droga. A adulteração na menor dose provocou uma leve aversão nos animais controle, a qual promoveu-lhes uma sutil diminuição na preferência pelo álcool. Já na dose de 0,5mM, esses animais reduziram ainda mais sua preferência pela droga, alcançando um nível abaixo de 20%, estatisticamente diferente daquele apresentado na semana de referência (*baseline*) (Figura 12 A e B). Vale ressaltar que a preferência média nos camundongos do grupo controle na dosagem de 0,5mM é semelhante àquela apresentada no primeiro dia de consumo (dia 1), ainda na fase de aquisição da droga (Figura 9A e 12 B). Também como reflexo do seu padrão de consumo, os animais KO não demonstraram uma mudança significativa na preferência pelo etanol. Ao contrário disso, na dosagem de 0,005g/Kg observou-se um sutil, porém não significativo, aumento na preferência pela solução etílica (Figura 12 B). Mais uma vez, o mesmo *outlier* discutido acima, em virtude de uma resposta altamente negativa à adulteração na dose de 0,5mM, tendenciou fortemente (mas não suficiente para provocar uma relação significativa) os dados de preferência nos animais KO.



**Figura 12:** Redução na preferência por etanol após a adulteração das soluções etílicas com quinino. (A) Comparativo da progressão do quociente de preferência por etanol pré e pós adulteração com quinino. (B) A adulteração da droga com quinino em sua maior concentração é eficiente em reduzir a preferência por etanol apenas em animais selvagens, mas não em KO. \* $p < 0,05$ , teste de Friedman.

#### 4.3.4. Preferência por quinino

Para avaliar se a permanência do alto consumo e preferência por etanol nos animais KO se deu em virtude de uma real inflexibilidade no consumo de etanol ou meramente por uma simples insensibilidade ou preferência pelo sabor do quinino, comparou-se, utilizando um diferente conjunto de animais KO e controles, a preferência entre água e soluções aquosas de quinino nas doses de 0,005g/Kg e 0,5mM, obedecendo ao mesmo paradigma de livre escolha utilizado no item 3.2.5. Observando a figura 13A nota-se que o quinino é preterido pela água nas duas concentrações e pelos dois grupos. Ainda que os animais KO tenham apresentado uma alta variabilidade quanto à preferência pelo quinino na concentração de 0,005g/Kg, em média, a preferência se mostrou muito abaixo de 50% ( $29,3 \pm 16,7\%$ ) (Figura 13A). Analisando a ingestão total de fluido, novamente verifica-se uma tendência, ainda que não significativa, entre os animais KO em apresentarem uma maior necessidade de ingestão de fluidos diária quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 13B) (KS,  $p > 0,05$ ). Aqui, porém, apenas 1% do consumo de fluido diário dos camundongos KO foi proveniente da solução alterada com quinino na concentração de 0,5mM, evidenciando o alto teor aversivo dessa solução. Como apresentado anteriormente, quando as soluções etílicas são alteradas utilizando essa mesma concentração de quinino, apesar do forte teor aversivo, a preferência pela droga entre os animais KO manteve-se alta e próxima a 40% (Figura 12B).

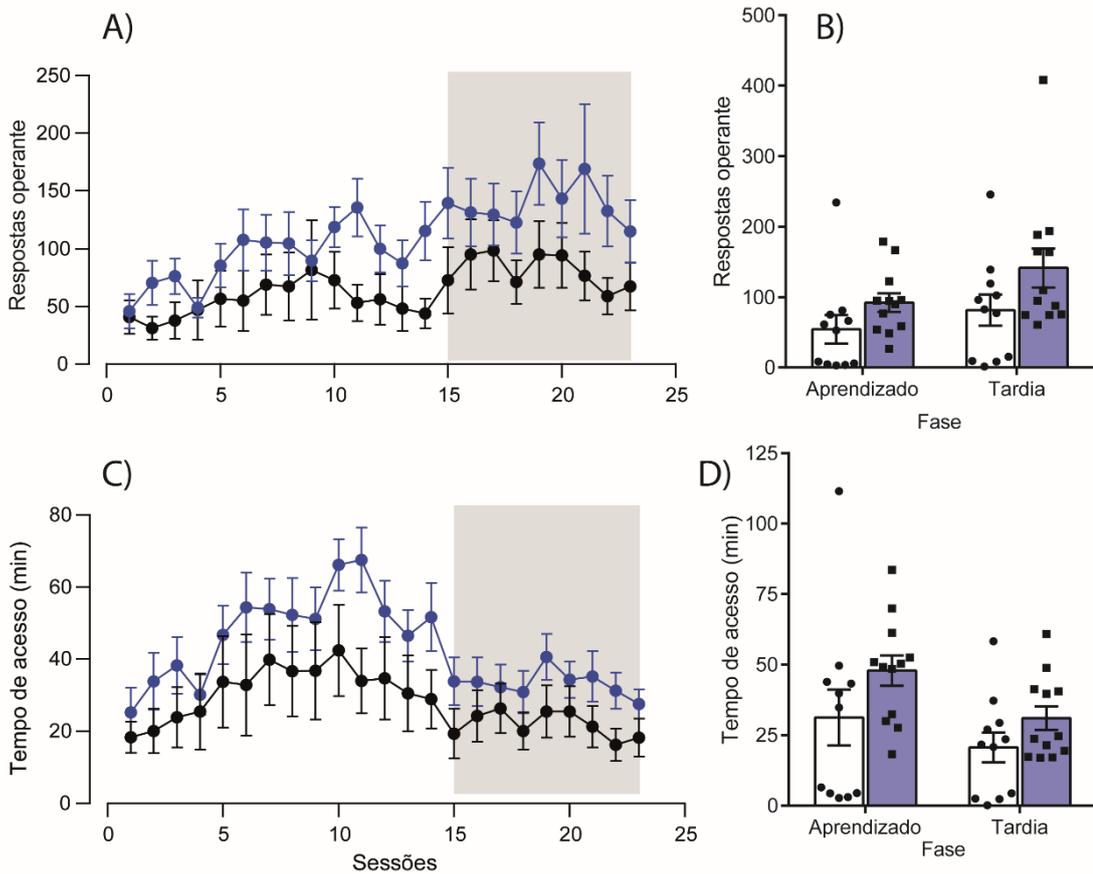


**Figura 13:** Teste de preferência por quinino. (A) Ambos os grupos de camundongos preterem a solução aversiva do quinino em qualquer uma das concentrações testadas. (B) Apesar da rejeição à solução de quinino, a quantidade de fluido total ingerida não varia durante os testes.

#### 4.3.5. Condicionamento operante: autoadministração de etanol

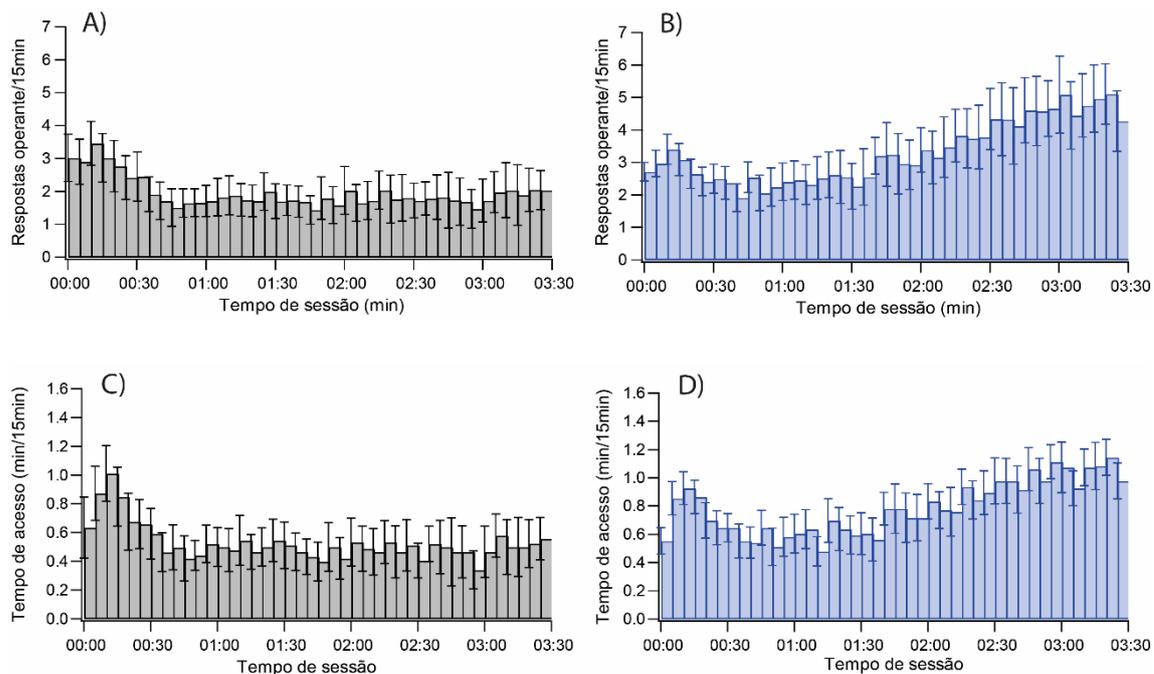
Com o objetivo de comparar o comportamento de procura pelo álcool, conhecido como *drug-seeking*, nos camundongos KO e controle, analisou-se de forma comparativa nesses animais a autoadministração de etanol a partir do processo de aprendizado conhecido como condicionamento operante. Nesse processo de treinamento, o animal pressiona uma alavanca para conquistar um determinado tempo de acesso à droga obedecendo a uma escala temporal de treinamento, como definido na sessão 3.2.7.2. Sendo assim, como uma medida indireta da busca pelo álcool, pode-se comparar de forma conjunta o número de respostas operante (número de acionamentos da alavanca ativa) e o tempo total de acesso entre os grupos (Figura 14). O treinamento consiste de duas etapas, uma de *aprendizagem* (executada em FR1) e outra *tardia* (executada em FR3), fase a qual assume-se que todos os camundongos aprenderam a tarefa. Observando os animais de ambos os grupos, nota-se em uma primeira análise um escalonamento no número de respostas ao longo da fase de aprendizagem e tardia (Figura 14A e B). ANOVA de duas vias com medidas repetidas evidenciou um efeito principal no tempo [ $F(23,483)=4,140$ ;  $p=0,0001$ ], mas não no genótipo [ $F(1,21)=2,942$ ;  $p=0,1010$ ] ou na interação entre os dois fatores [ $F(23,483)=1,001$ ;  $p=0,4623$ ]. Nenhuma diferença foi observada ao comparar-se a média de respostas operantes entre as fases de aprendizado e tardia (Figura 14B). Ao comparar-se o tempo de acesso (Figura 14C e D), nota-se o mesmo escalonamento progressivo em ambos os grupos. De forma concordante com os dados de resposta operante, ANOVA de duas vias com medidas repetidas evidenciou um efeito principal no tempo [ $F(23,483)=8,149$ ;  $p<0,0001$ ], mas não nos genótipos [ $F(1,21)=2,456$ ;  $p=0,1320$ ] ou na interação entre os fatores [ $F(23,483)=0,7898$ ;

$p=0,7456$ ]. Como o número de respostas operantes não aumentou proporcionalmente na transição entre FR1 e FR3, o tempo de acesso na fase tardia (FR3) tendeu a diminuir em comparação com a fase de aprendizado, mas ainda assim sem significância estatística (Figura 14D).



**Figura 14:** Diferenças no comportamento operante entre camundongos LRRK2 KO e selvagens. Nenhuma diferença foi detectada nas respostas operante entre os grupos durante a fase de treinamento (A), seja na fase de aprendizado ou tardia (B). Como reflexo do padrão observado nos dados de respostas operantes, nenhuma diferença foi detectada no parâmetro tempo de acesso conquistado (C-D). A faixa cinza nos gráficos A e C demarcam a fase tardia (FR3) do treinamento.

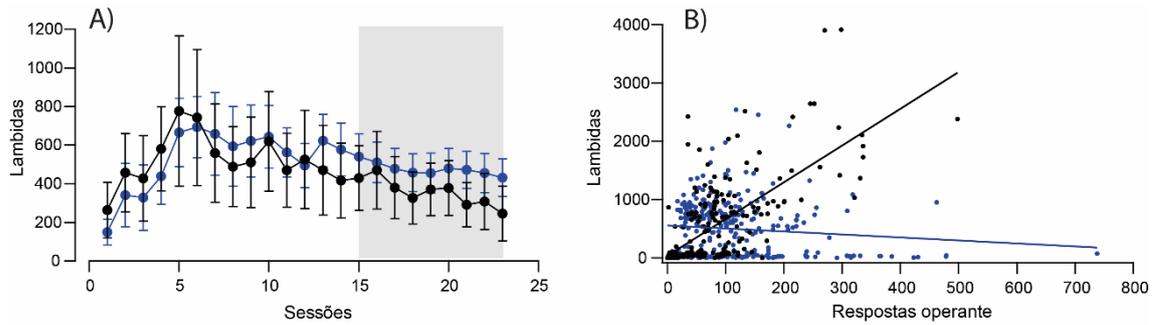
Quando as respostas e o tempo de acesso ao álcool foram plotados em histogramas ao longo de cada sessão, observou-se uma tendência nos animais KO a terem em média uma resposta mais tardia, presente em maior frequência na segunda metade de cada sessão (comportamento conhecido como *end-loading*), enquanto os animais selvagens apresentaram uma distribuição de resposta e acesso homogeneamente distribuídos durante as 3,5h (Figura 15, A-D).



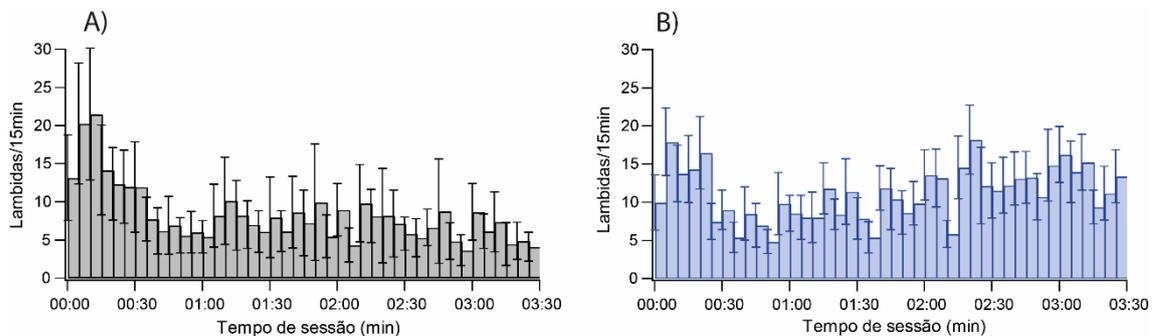
**Figura 15:** Padrão microestrutural das respostas operante durante uma sessão de autoadministração de etanol. Enquanto camundongos selvagens mostram um padrão microestrutural homogêneo durante toda a sessão (A e C), camundongos KO apresentam um padrão de resposta tardio, conhecido como *end-loading* (C e D).

O *lickômetro* instalado na válvula de acesso à solução etílica permite a medição de forma temporal da quantidade de lambidas de cada camundongo ao longo de cada sessão. Senso assim, pode-se estimar, além da quantidade total de lambidas, qual padrão o de consumo em cada um dos animais. A análise ao longo das sessões revelou um padrão semelhante entre os grupos, com uma curva ascendente nas 5 primeiras sessões seguida por uma estabilização e então uma ligeira queda na fase tardia. Análise multivariada encontrou um efeito principal no tempo [ $F(23,483)=2,760$ ;  $p<0,0001$ ] e nenhum efeito no genótipo [ $F(1,21)=0,07029$ ;  $p=0,79$ ] (Figura 16A). Ao correlacionar os dados de resposta operante e lambidas, verificou-se uma correlação positiva nos grupos controle ( $r^2=0,67$ ;  $p<0,0001$ ) e KO ( $r^2=0,15$ ;  $p=0,0231$ ) (Figura 16B).

Diferentemente do padrão evidenciado nas respostas operantes, a média do número de lambidas ao longo das sessões não mostrou grandes variações em nenhum dos dois grupos (Figura 17 A e B). Também foram analisados a porcentagem de eventos (tempo de acesso) sem nenhuma lambida (controle =  $25 \pm 5,5\%$ ; KO =  $32,9 \pm 6,4\%$ ) e a latência média para a primeira lambida (controle =  $5,39 \pm 0,98$  seg; KO =  $6,04 \pm 0,88$  seg) e nenhuma diferença foi encontrada ( $p=0,12$  e  $p=0,63$ , respectivamente).



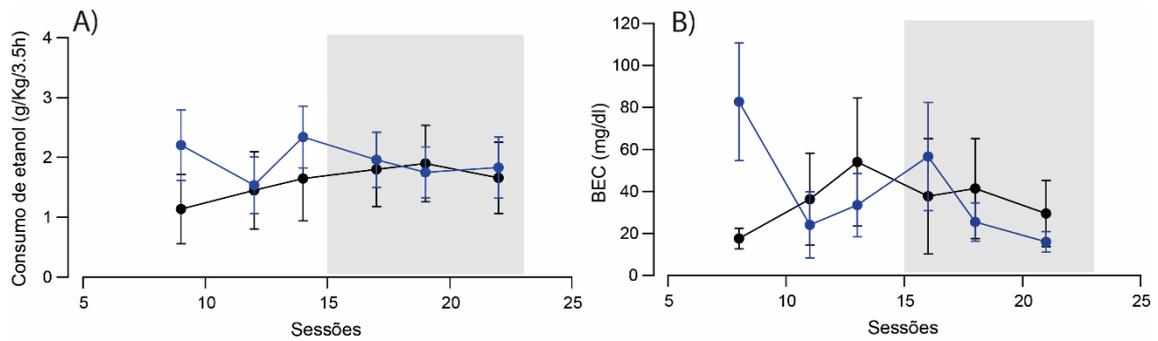
**Figura 16:** Análise do padrão de lambidas durante as sessões de autoadministração de etanol. (A) Nenhuma diferença detectada no perfil de lambidas durante todo o treinamento entre os dois grupos testados. (B) A correlação entre a busca pela droga (resposta operante) e a ação consumatória (lambida) são mais evidentes nos camundongos selvagens do que nos camundongos KO. A faixa cinza nos gráficos A e C demarcam a fase tardia (FR3) do treinamento.



**Figura 17:** Microestrutura do parâmetro lambidas ao longo das sessões de autoadministração de etanol. Nenhuma diferença microestrutural foi encontrada entre camundongos selvagens (A) ou KO (B). Ambos apresentaram um perfil uniforme de resposta.

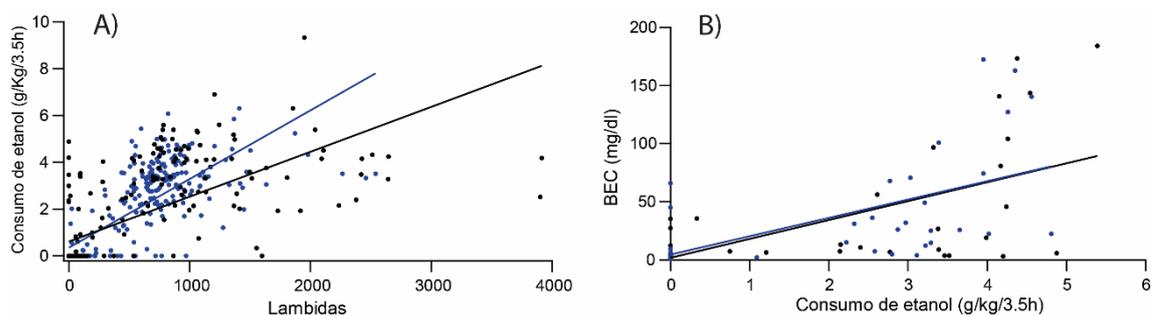
O consumo médio total de etanol durante os procedimentos operante foi similar entre os camundongos controle e KO ( $1,6 \pm 0,49$  g/Kg/3,5h e  $1,89 \pm 0,42$  g/Kg/3,5h, respectivamente;  $p > 0,05$ ) (Figura 18 A). O consumo manteve-se constante ao longo de todas as sessões (Figura 18 A). Além do consumo médio, também não foi evidenciada nenhuma diferença entre a concentração de etanol no sangue (BEC) entre os camundongos testados. A média total alcançada foi de  $36,06 \pm 13,01$  mg/dl nos animais selvagens e de  $39,43 \pm 12,62$  mg/dl nos animais KO ( $p > 0,05$ ) (Figura 18 B).

Ao correlacionar os dados do número de lambidas aos de consumo médio de etanol durante as 3,5h, verificou-se uma correlação positiva entre ambos tanto para o grupo controle ( $r^2 = 0,45$ ;  $p < 0,0001$ ) quanto para o grupo KO ( $r^2 = 0,68$ ;  $p < 0,0001$ ), comprovando a validade da medida de número de lambidas como fator preditivo do consumo total de etanol (Figura 19 A).



**Figura 18:** Consumo de etanol durante protocolo de autoadministração operante. Os gráficos comparam ambos os grupos quanto a quantidade de etanol consumida (A) e BEC (B) ao longo das semanas de teste. Nenhuma diferença foi encontrada em nenhum dos parâmetros.

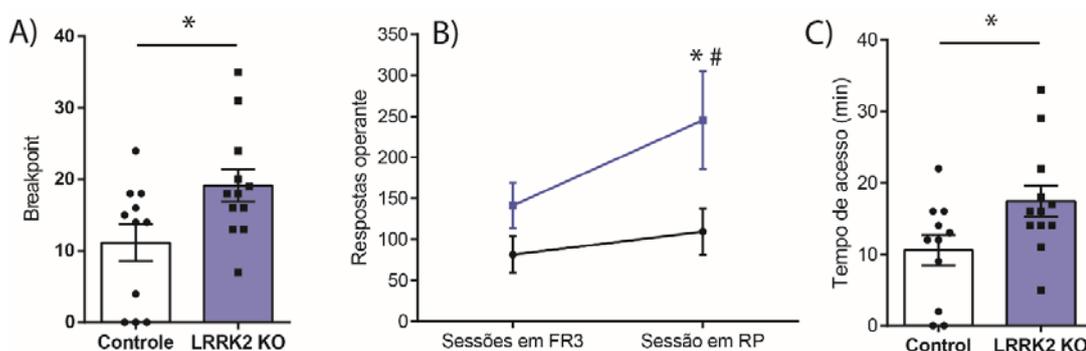
Analisando detalhadamente o gráfico, observa-se alguns pontos distantes da correlação, como aqueles demonstrando um alto consumo de etanol associado a poucas lambidas, ou muitas lambidas sem nenhum consumo de etanol. Enquanto o primeiro caso possivelmente está associado ao fato de existir alguns animais (provavelmente os maiores) que desenvolvem uma maior eficiência em consumir uma grande quantidade de etanol a cada lambida, o segundo provavelmente está associado a possíveis vazamentos na válvula (Figura 19 A). A correlação entre o consumo de etanol e a concentração de álcool sanguíneo também se mostrou significativa para os animais selvagens ( $r^2=0,35$ ;  $p<0,0001$ ) e para os animais KO ( $r^2=0,31$ ;  $p<0,0005$ ) (Figura 19 B). Aqui, é possível observar uma longa faixa de consumo (entre 1 e 5g/Kg/3,5h) correspondendo a medidas de BEC menores que 40mg/dl. Essa discrepância pode ser também explicada seguindo o mesmo raciocínio exposto anteriormente.



**Figura 19:** Fatores preditivos da quantidade de etanol consumida nas sessões de autoadministração. (A) As medições de lambida e de BEC (B) foram positivamente correlacionado com a quantidade de etanol consumida, podendo, portanto, serem utilizados como fatores preditivos de consumo.

#### 4.3.5.1. Motivação

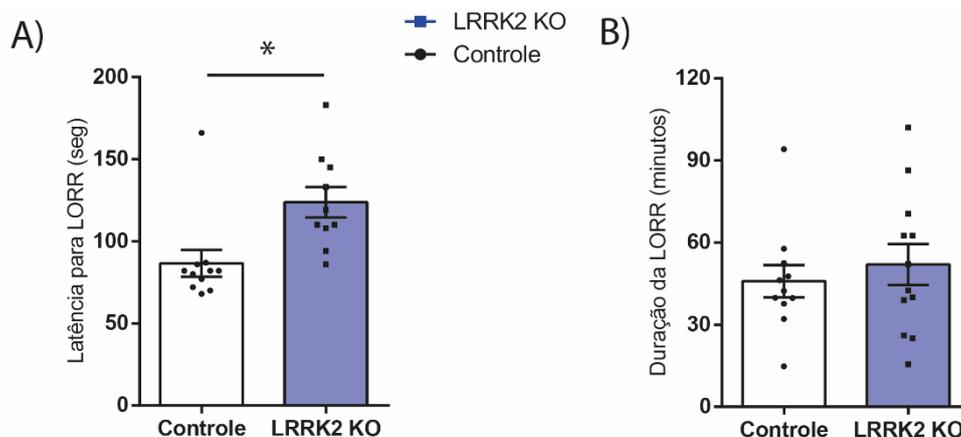
Após as 6 semanas de treinamento na tarefa de autoadministração de etanol, os camundongos foram desafiados em uma sessão única de *Razão Progressiva* (ou *Progressive Ratio*). Este teste tem como objetivo testar a real motivação dos animais pelo álcool. Quanto maior o *breakpoint* alcançado, maior o empenho dispensado para se ter acesso à droga e, conseqüentemente, maior o grau de motivação. Os dados mostraram que os camundongos KO apresentaram uma maior busca pela droga, alcançando, em média, um *breakpoint* de  $19,2 \pm 2,24$ , comparado a apenas  $11,2 \pm 2,6$  nos animais controle ( $p=0,029$ ) (Figura 20 A). Vale lembrar que na sessão de Razão Progressiva, o número de respostas necessárias para que o animal receba um acesso de 60s da droga aumenta progressivamente conforme seu desempenho. Sendo assim, mesmo que a diferença no *breakpoint* entre os grupos pareça sutil, quando se vale como medida comparativa o número real de respostas operante executadas por cada animal nessa sessão, a diferença torna-se muito mais evidente (Figura 20 B). ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou um efeito principal no fator Sessão [ $F(1,21)=10,93$ ;  $p=0,003$ ] e uma tendência no fator genótipo [ $F(1,21)=3,784$ ;  $p=0,065$ ]. O pós teste revelou diferença significativa entre as sessões FR3 e RP nos animais KO e diferença entre os grupos na sessão RP, corroborando os dados de *breakpoint* e ratificando o fato de que os animais KO são mais motivados a procurar pelo álcool do que sua contraparte selvagem (Figura 20 B). O maior número de respostas operante nos animais KO proporcionou-lhes conseqüentemente um maior tempo de acesso à droga (Figura 20 C) e uma maior ingestão de etanol. Enquanto os animais controle ingeriram em média  $0,78 \pm 0,42$  g/Kg de etanol, os KO consumiram em média  $2,55 \pm 0,65$  g/Kg ( $t=2,234$ ;  $p=0,036$ ).



**Figura 20:** Quantificação do componente motivacional para busca e tomada do álcool através do teste de *Breakpoint*. (A) Camundongos KO alcançam um maior breakpoint em um teste de razão progressiva indicando a existência de um componente motivacional mais forte do que em sua contraparte selvagem. (B) Comparação entre a média de respostas operantes na sessão de razão progressiva e a média de respostas na fase tardia (FR3). (C) O maior número de respostas operantes nos animais KO é acompanhado pelo aumento no tempo de acesso conquistado. #  $p<0,05$ , 2-ANOVA; \*  $p<0,05$ , teste T-student.

#### 4.3.6. Perda do reflexo de endireitamento (LORR, *Loss Of Righting Reflex*)

Com o objetivo de avaliar a sensibilidade inicial dos camundongos ao etanol, testou-se em cada um deles a latência para a perda do reflexo de endireitamento e a duração dessa perda em decorrência da injeção de uma alta dose de etanol (3,5g/Kg) intraperitonealmente. Ao comparar-se o tempo de latência entre os grupos, ou seja, o tempo decorrido entre a injeção e a perda do reflexo de endireitamento, observou-se que os animais KO tendem a ser menos sensíveis à perda do reflexo do que sua contraparte selvagem ( $p < 0,01$ ), uma vez que demonstraram uma maior latência para perderem o reflexo de endireitamento (Figura 21A). Quando a comparação foi realizada com base na duração da perda de reflexos, isto é, o tempo decorrido entre a perda e a recuperação do mesmo, nenhuma diferença foi detectada ( $p > 0,05$ ) (Figura 21B). Além disso, a concentração de álcool no sangue dos camundongos também foi medida no momento em que os animais recuperaram o reflexo de endireitamento. Estes dados correlacionaram-se de forma negativa com a duração da LORR ( $r^2 = 0,53$ ;  $p = 0,01$ ), mas não foram significativos quando correlacionados à latência ( $r^2 = 0,22$ ;  $p = 0,16$ ) (dados não mostrados). O BEC no momento da perda do reflexo não foi avaliado, o qual possivelmente correlacionaria aos dados de latência. Não houve correlação entre a latência e a duração da perda de reflexo (dados não mostrados).

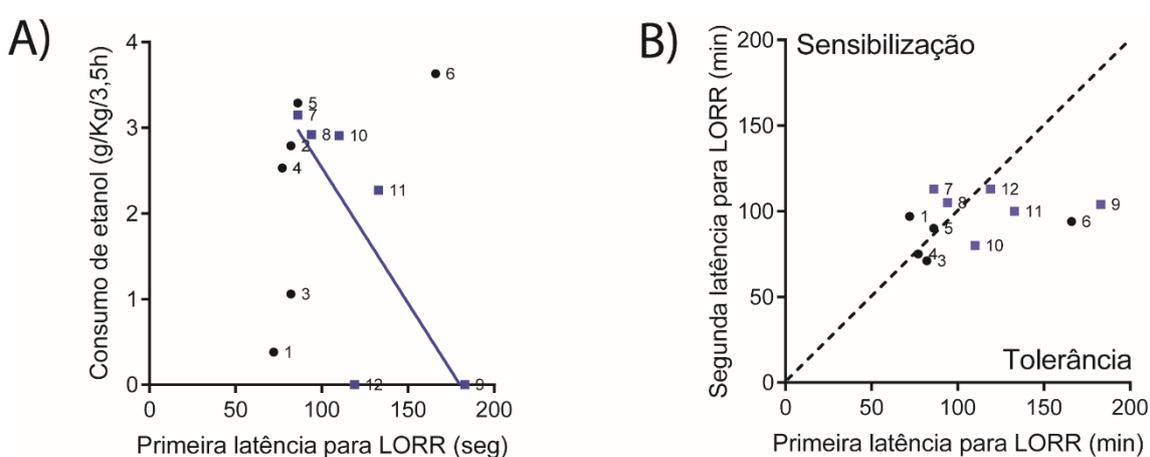


**Figura 21:** LORR, perda do reflexo de endireitamento. (A) Animais KO demoram em média um maior tempo para perderem o reflexo de endireitamento e são, portanto, mais resistentes aos efeitos hipnóticos do etanol do que animais selvagens. (B) Nenhuma diferença no tempo médio de duração da LORR foi encontrada entre os animais.

Quando os parâmetros latência e duração da LORR foram correlacionados à média de consumo de etanol ao longo das 5 semanas de autoadministração, observou-se uma tendência de correlação negativa entre a latência para a LORR e a média de consumo nos animais do grupo KO ( $r^2 = 0,55$ ;  $p = 0,08$ ) (Figura 22 A). Essa correlação não foi verdadeira para

o grupo controle ( $r^2=0,35$ ;  $p=0,21$ ) nem tampouco quando o fator duração do LORR foi utilizado na correlação (dados não mostrados).

Ao se plotar a correlação dos dados entre primeiro e o segundo teste de LORR, se faz possível acompanhar o desenvolvimento de tolerância ou sensibilização de maneira individualizada entre os diferentes grupos e diferentes animais. De forma geral, uma maior parcela de camundongos KO (3/6=50%) tornou-se tolerante em comparação aos camundongos controle (1/5=20%) (Figura 22 B) após a autoadministração de etanol. Um animal integrante do grupo controle não perdeu o reflexo de endireitamento no segundo teste, mesmo após o transcorrer de 2h de ensaio, impossibilitando assim seu uso na análise de tolerância.



**Figura 22:** LORR como fator preditivo para comportamentos associados ao uso do etanol. (A) Camundongos KO mostraram uma correlação negativa entre sensibilidade inicial aos efeitos hipnóticos do etanol e a quantidade de etanol consumida durante o procedimento de livre escolha. (B) desenvolvimento de dependência após exposição ao etanol no paradigma de livre escolha.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Considerações gerais

#### 5.1.1. Explicação do modelo de livre escolha

Esse modelo avaliou de forma comportamental camundongos geneticamente heterogêneos sujeitos a um protocolo de consumo crônico não forçado de etanol simulando as diferentes fases do ciclo de adição, como definido por (Koob e Volkow, 2010). Inicialmente, o comportamento de ingestão de álcool é exploratório e durante esse período, denominado fase de aquisição, observam-se dias de alto consumo intercalados com dias de baixo consumo ou até mesmo abstinência. Nessa fase, os camundongos experimentam os efeitos psicotrópicos do álcool e ajustam seu padrão de ingestão. Na fase de Retirada os animais experimentam os efeitos negativos associados à privação da droga. Nesta etapa ocorre a transição do consumo motivado inicialmente pelas propriedades reforçadoras positivas do álcool para um consumo agora guiado por suas propriedades reforçadoras negativas. Essas duas fases preliminares (Aquisição e Retirada) são essenciais para que o camundongo progrida “naturalmente” de um consumo inicial equilibrado da droga para o seu uso compulsivo e sem controle (Wolffgramm e Heyne, 1995). Uma vez que as alterações neuronais plásticas promoventes do “comportamento aditivo” são fixadas nas fases preliminares, as etapas seguintes de Reapresentação e Adulteração são importantes unicamente para a categorização e separação dos camundongos bebedores entre consumidores Pesados e Inflexíveis. Assim, o consumo constante de etanol sem redução na fase de Adulteração indica um nível de consumo persistente, definido aqui como inflexível. A estabilidade dos perfis de consumo ocorre também entre as diferentes réplicas deste modelo, o qual foi replicado 10 vezes, nas quais as mesmas proporções de camundongos nos três diferentes grupos foram sempre observadas (18-25% de consumidores inflexíveis; 18-30% de consumidores pesados e 28-35% de consumidores leves) (Fachin-Scheit *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2008; Correia *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2012). O modelo foi também validado farmacologicamente com a droga naltrexona, antagonista opioide com ação anti-*craving* em pacientes alcoolistas. Os resultados obtidos com a naltrexona mostraram uma diminuição do consumo de etanol apenas nos camundongos com padrão de consumo não compulsivo (bebedores pesado e leve), enquanto que os camundongos inflexíveis continuaram com seu padrão convencional de consumo (Fachin-Scheit *et al.*, 2006).

### 5.1.2 O estriado em foco

O estriado está localizado no prosencéfalo basal e desempenha um papel central no reforço e recompensa, mecanismo responsável por mediar a transformação do uso ocasional da droga em um hábito patológico (Koob e Volkow, 2010). Considerando a importância dos mecanismos reforçadores nos primeiros estágios do ciclo da adição e o seu papel integrador entre os diversos circuitos cerebrais, o estriado foi estabelecido como foco principal do presente estudo. Sendo assim, na tentativa de identificar genes potencialmente envolvidos na predisposição ou contribuição para o consumo compulsivo de álcool, analisou-se comparativamente o transcriptoma estriatal de animais integrantes dos grupos “Leve” e “Inflexível”.

## 5.2. Análise molecular

### 5.2.1. Normalização dos dados do *array*

A normalização dos dados do microarranjo apresentou reprodutibilidade satisfatória entre as réplicas técnicas, indicando que as variações não biológicas dos dados puderam ser controladas através da metodologia aplicada e não afetaram as análises futuras. Através da normalização dos dados, foram encontrados 1.127 genes diferencialmente transcritos na comparação entre os grupos Leve e Inflexível, dentre os quais 615 se mostraram hiper-regulados e 512 hiporregulados. Dentro dessa lista, encontram-se genes amplamente validados e conhecidamente associados ao fenótipo de adição, como o complexo Pka (proteína quinase A), as enzimas *Adh6b* (álcool desidrogenase 6B) e *Alde1a2* (aldeído desidrogenase, família 1), os receptores *Drd2* (receptor de dopamina tipo D2), *Gabrb3* (receptor GABA b3) e *Grin2b* (receptor ionotrópico de glutamato, NMDA2B), *Cyp26b1* (citocromo P450), *Slc26a4* (carreador de soluto família 26, membro 4), *Gad2* (glutamato descarboxilase 2) (ENOCH, 2013). Na tentativa de se encontrar novos genes e vias de sinalização potencialmente contribuintes para o fenótipo “perda de controle”, e tendo em mente que nenhum gene contribui de forma isolada no estabelecimento de um fenótipo complexo como a adição, foi realizada uma análise exploratória geral dos dados globais em duas etapas: classificação ontológica dos GDR visando o seu agrupamento em virtude de sua função biológica e celular; e enriquecimento dos dados agrupando-os em vias biológicas de interesse.

### 5.2.2. Análise exploratória

A classificação ontológica diferencial dos GDR mostrou que a maioria dos genes se enquadram na classe que codifica proteínas específicas de membrana, as quais estão super-

representadas em funções relacionadas à ligação a íons e proteínas (aproximadamente 40%). Este resultado corrobora o conhecimento de que a maioria das diferenças genéticas existentes entre indivíduos adictos e não adictos se encontra dentro do domínio de receptores e canais iônicos, base da comunicação e integração neuronal (Vengeliene *et al.*, 2008). De fato, os efeitos intoxicantes agudos do álcool estão provavelmente relacionados com a inibição de determinados subtipos de receptores do tipo NMDA e potenciação de certos tipos de receptores GABA<sub>A</sub>. Reforçando esses dados, Ribeiro *et al.* (2012) demonstraram que os genes que codificam as subunidades br1 e br2 do receptor GABA<sub>B</sub> estão desregulados no estriado, hipocampo e CPF nos animais inflexíveis neste modelo de livre escolha. Possivelmente o desbalanço entre as duas subunidades do receptor provoca como resultado final uma desregulação em outros sistemas de neurotransmissão, como o dopaminérgico (Ribeiro *et al.*, 2012). Efeitos nesses canais, bem como em outros, como canais serotoninérgicos e colinérgicos, provavelmente contribuem para os efeitos de euforia e sedação do álcool (Trudell *et al.*, 2014). Por outro lado, alterações na composição das subunidades, densidades e propriedades desses canais podem contribuir com o efeito de tolerância, dependência e abstinência. Estudos associam também o envolvimento de receptores NMDA, GABA e alguns canais de cálcio dependente de voltagem em alterações adaptativas no cérebro durante a exposição crônica ao etanol (Narahashi *et al.*, 2001; Trudell *et al.*, 2014). O desmembramento dos domínios ontológicos principais em subgrupos mais específicos notabilizou alguns achados interessantes. De acordo com essa análise, evidenciou-se que alguns processos, como aqueles relacionados ao desenvolvimento do estriado, estão notoriamente alterados entre os grupos estudados. O estriado, como já citado, é um substrato central em comportamentos aditivos e sua disfunção pode, indubitavelmente, estar relacionado a modificações predisponentes ao comportamento compulsivo (Kleiber *et al.*, 2013).

De forma a refinar e convergir os estudos para uma determinação mais central e molecular da relação entre a disfunção desses genes e o alcoolismo, foi realizado o estudo de enriquecimento gênico. Como resultado, foram encontradas entre as vias mais significativas aquelas envolvidas em processos historicamente já bem relacionadas ao alcoolismo, como transdução de sinal via Pka, regulação de *inputs* glutamatérgicos via dopamina e sinalização via delta e kappa opioides. Além da identificação de genes e processos biológicos classicamente já bem fundamentados, essa análise identificou também, com o menor p valor dentre todas as outras, a desregulação em uma via até então nunca antes relacionada ao alcoolismo, denominada *LRRK2 in neurons in Parkinson's disease*. Esta via é constituída por 33 genes, e tem como componente central o gene *Lrrk2*. Este gene codifica a proteína *LRRK2* ou dardarina, a qual possui múltiplos domínios de interação proteína-proteína e enzimáticos. Sua função primordial é desempenhada através de sua atividade quinase, a

qual é capaz de orquestrar via fosforilação diversas atividades neuronais, como neuroplasticidade (Parisiadou *et al.*, 2014; Beccano-Kelly *et al.*, 2015), tráfego de vesículas sinápticas (Shin *et al.*, 2008; Cinaru *et al.*, 2014) e crescimento de dendritos e axônios (Macleod *et al.*, 2006; Parisiadou *et al.*, 2009; Heo *et al.*, 2010). Variações genéticas no gene LRRK2 em humanos estão diretamente relacionadas ao risco aumentado para o desenvolvimento de Doença de Parkinson, familiar ou esporádico, provavelmente devido à morte de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais (Singleton *et al.*, 2013). Em cérebro de camundongos, o mRNA deste gene é encontrado em altos níveis no estriado (Biskup *et al.*, 2006; Galter *et al.*, 2006; Melrose *et al.*, 2006; Simon-Sanchez *et al.*, 2006) e exclusivamente em células neuronais (comunicação pessoal)<sup>1</sup>. Contudo, outras regiões prosencefálicas como *substancia nigra*, hipocampo, tálamo, cerebelo e córtex, apresentam de forma ubíqua a proteína, sugerindo que ela possa estar envolvida em múltiplas funções superiores como memória, cognição e emoção, e não apenas com o controle motor (Melrose *et al.*, 2007).

### 5.2.3. PCR em tempo real

Na validação cruzada via PCR em tempo real, dois genes, *Mapt* e *Picalm*, foram hiporregulados tanto nos bebedores pesado quanto nos bebedores inflexíveis. Ambos os grupos apresentam preferência e consomem grandes quantidades de etanol, levantando assim a hipótese de que esses genes podem ser regulados negativamente pelo consumo exagerado de álcool ou até mesmo predispor ao consumo em *binge*. Por outro lado, os genes *Actg1* e *Cltc* foram hiporregulados apenas nos animais do grupo Pesado, na comparação com o grupo controle. A proteína *CLTC* faz parte do complexo da clatrina e, em conjunto com outras proteínas, tais como filamentos de actina (ou seja, *ACTG1*), proteína de montagem (*PICALM*), proteínas microtubulares (isto é, *MAPT*) e o complexo de proteína Adaptador 2 (*AP2*), conduz a formação de vesículas endocíticas mediadas por Clatrina, responsável pelo processo de recaptção de vesículas e componentes sinápticos. Deve também notar-se que dois dos quatro genes integrantes do ramo recaptção da via LRRK2 (*Cltc* e *Actg1*) foram reprimidos apenas no grupo bebedores pesados. Embora os animais do grupo bebedores pesado tenham exibido uma forte preferência por etanol durante a fase de aquisição (assim como os bebedores inflexíveis), esses animais experimentaram uma redução no consumo de etanol durante a fase de reapresentação e retirada, um comportamento não observado no grupo inflexível. Portanto, a regulação da transcrição diferencial de genes relacionados à reabsorção mediada por clatrina pode ser um resultado da interrupção ou descontinuação do consumo exagerado de etanol durante estes estágios. Os níveis de transcrição dos genes

---

<sup>1</sup> Informação fornecida por Dr. Goldman, D. em Rockville, MD, EUA, em 2015

parálogos *Ezr*, *Rdx* e *Msn* apresentou um perfil de expressão semelhante em todos os grupos. Estes genes pertencem às proteínas da família do ERM que, em conjunto com os filamentos de actina, desempenham papéis importantes na determinação da morfologia celular e o crescimento de dendritos e axônios (Mangeat *et al.*, 1999; Parisiadou *et al.*, 2009). Parisiadou *et al.* (2009) também mostraram que essas proteínas são moduladas através da fosforilação mediada por LRRK2 e camundongos transgênicos com superexpressão da proteína LRRK2 humana não desenvolvem efeitos significativos na diferenciação de processos neuronais. Não se pode comentar sobre o estado pós traducional dessas proteínas através da análise feita no presente estudo. O gene *Lrrk2* é localizado à montante da via em questão e direciona mecanismos celulares através da fosforilação de diversos alvos moleculares. De maneira interessante, este gene foi diferencialmente regulado apenas nos animais do grupo Inflexível, se mostrando hiper-regulado em relação a todos os demais grupos. Este perfil se mostra instigante uma vez que não se pode atribuí-lo ao resultado da ingestão do etanol por si só, dado que os animais do grupo Pesado (camundongos que consomem álcool de maneira exacerbada, mas não compulsiva) e do grupo Leve (os quais consomem notoriamente baixas quantidades de etanol) apresentaram níveis semelhantes deste mRNA ao grupo controle. Até o momento, nenhum trabalho correlacionou o gene *Lrrk2* a distúrbios relacionados ao uso álcool ou mesmo a outros comportamentos compulsivos ou aditivos. Assim, pela primeira vez, estes dados sugerem que o gene *Lrrk2* pode estar envolvido nos perfis neuromoduladores observados em tais desordens.

Levando em consideração o perfil transcricional único apresentado pelo gene *Lrrk2* exclusivamente nos animais do grupo Inflexível, juntamente com a diversidade de funções primordiais desempenhadas pela sua proteína em diversos processos regulatórios e funcionais nos *Medium Spiny Neurons* (MSN), classe neuronal mais abundante no estriado, este gene se mostrou como um forte candidato para futuras investigações.

### **5.3. Validação Funcional**

#### **5.3.1. Validação do gene *Lrrk2* como fator contribuinte no desenvolvimento do comportamento de consumo excessivo e compulsivo de etanol em camundongos**

No ano de 2014, Parisiadou e colaboradores desvendaram uma função pré-sináptica para a proteína LRRK2 até então desconhecida. Neste trabalho, eles comprovaram através de uma série de experimentos que, além da função de quinase, LRRK2 pode também desempenhar a função de uma proteína AKAP-like, de maneira quinase-independente. AKAP é o acrônimo para *A-kinase anchoring protein 1* e representa uma família heterogênea de proteínas definidas pela capacidade de se ligarem à proteína quinase A (PKA), regulando assim sua atividade. PKA é uma holoenzima a qual, no seu estado inativo, é constituída por

duas subunidades regulatórias ligadas a duas subunidades catalíticas. A ativação de PKA é promovida a partir da ligação da molécula de AMP cíclico (cAMP) à sua subunidade regulatória, causando assim a dissociação de suas subunidades catalíticas, às quais tornam-se livres para fosforilar alvos intracelulares específicos (Seif *et al.*, 2013). Ao se ligarem às subunidades regulatórias de PKA, as proteínas AKAP controlam a distribuição e disponibilidade desta quinase em compartimentos subcelulares específicos, permitindo assim a fosforilação de alvos de maneira localizada, ou até mesmo, impedindo a fosforilação de moléculas em outros subcompartimentos celulares (Dema *et al.*, 2015). PKA é uma quinase com centenas de diferentes alvos celulares e, portanto, participa na regulação de uma enormidade de processos. No estriado (mais precisamente nos MSN), PKA está envolvida na fosforilação de moléculas como DARP-32 (Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein with molecular weight 32 kD) (Oliveira *et al.*, 2012), Cofilina e a subunidade GluR1 dos receptores AMPA (Parisiadou *et al.*, 2014), eventos estes que culminam em adaptações sinápticas envolvidas na regulação de processos de aprendizagem (Roberts *et al.*, 2000). Considerando o exposto acima, presumiu-se então a hipótese de que animais com o fenótipo do tipo Inflexível possuem uma disfunção na modulação sináptica dependente de PKA nos *Medium Spiny Neurons*, a qual provoca modificações pós-sinápticas nesses neurônios, resultando em uma resposta mal adaptativa à exposição ao etanol e à perda de controle sobre a tomada da droga.

Sendo assim, decidiu-se testar comportamentos associados ao consumo excessivo e sem controle de etanol em camundongos *knockout* para o gene *Lrrk2*. Vale ressaltar que, apesar dos transcritos deste gene serem hiper-regulados nos animais do grupo Inflexível, as validações foram realizadas utilizando animais KO para este gene, ou seja, animais com níveis nulos ou insignificantes de produtos do gene *Lrrk2*. Essa escolha baseia-se em dois pontos fundamentais, explicados a seguir. Apesar de ter sido escolhido por desempenhar um papel central nos processos regulados pela via *Lrrk2*, este gene não causa nenhuma alteração funcional de forma isolada. Ao contrário, a hipótese vigente é de que a desregulação da via *Lrrk2* como um todo (incluindo diversos dos seus componentes moleculares), provocada pela alteração transcricional do gene *Lrrk2* está relacionada à emergência do comportamento adicto evidenciado nesses camundongos. Sendo assim, animais com níveis nulos ou desprezíveis da proteína LRRK2 também apresentariam uma perturbação nesta via e, possivelmente, alterações nos comportamentos relacionados ao consumo de etanol. Além disso, a única linhagem de camundongo disponível comercialmente que hiperexpressa o gene *Lrrk2* (FVB/N-Tg(LRRK2)1Cjli/J) possui como transgene o gene LRRK2 humano, regulado pelo seu próprio promotor/*enhancer* e que possui um perfil variado de expressão entre diferentes indivíduos (variando entre 5 a 10 vezes mais quando comparado ao animal selvagem). Sendo assim, objetivando eliminar o máximo de variáveis possíveis neste primeiro

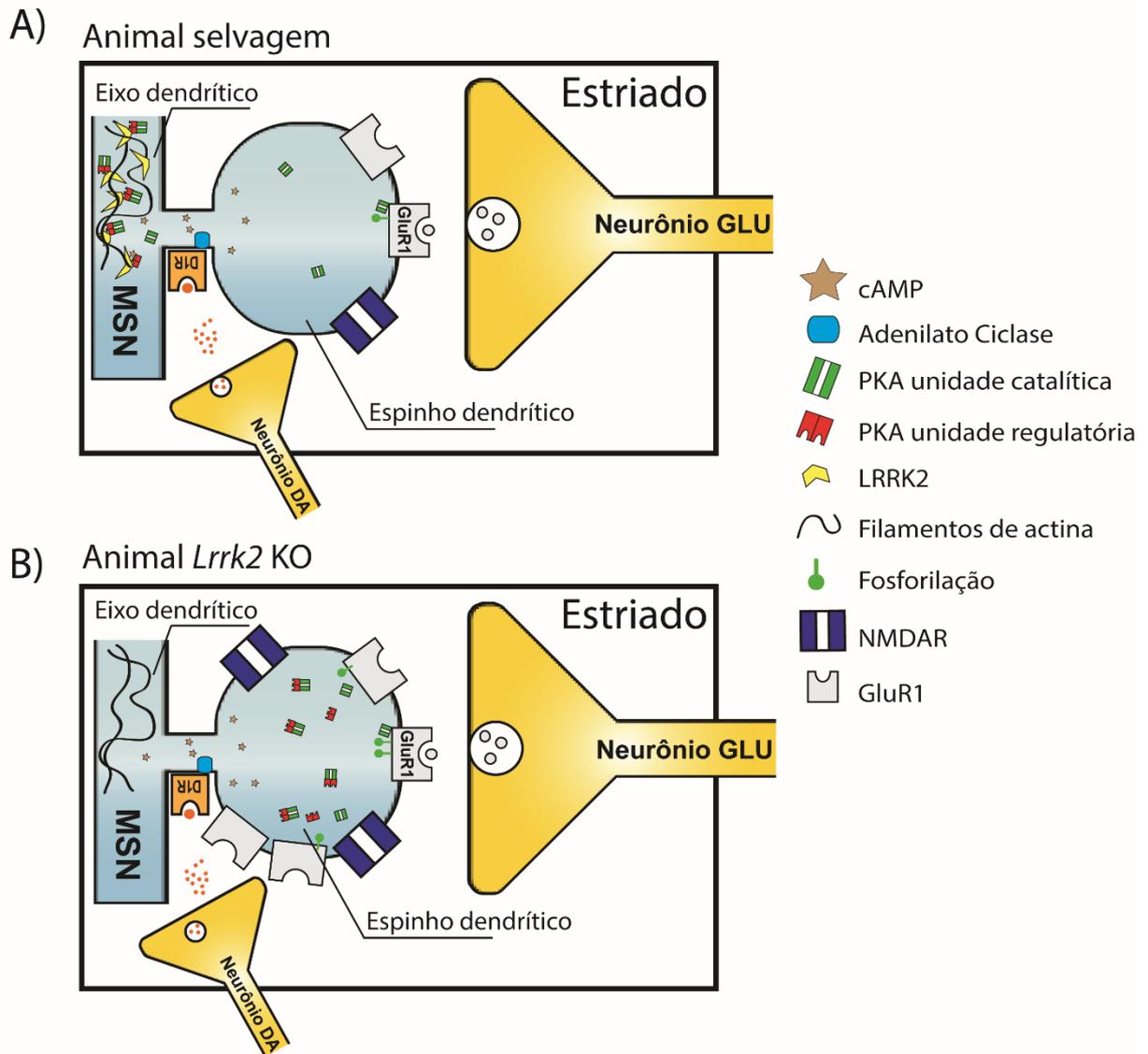
momento, decidiu-se investigar inicialmente animais KO para o gene *Lrrk2* nos quais, em termos de expressão gênica, a regra do tudo ou nada é observada: expressão equiparável em animais selvagens e ausente em animais *knockouts*. Diante do exposto, e considerando que a perturbação da via LRRK2 nos animais KO é promovida por intermédio da deleção do gene *Lrrk2*, teve-se como hipótese que, por ser uma proteína AKAP-like, LRRK2 é um modulador negativo da holoenzima PKA, capaz de regular sua distribuição em diferentes subcompartimentos neuronais. A redistribuição de PKA nos MSN promove mudanças morfológicas e moleculares que culminam em processos plásticos predisponentes ao consumo compulsivo de etanol.

De acordo com Parisiadou *et al.* (2014), a proteína LRRK2 é abundantemente presente no eixo principal dos dendritos (*dendritic shaft*) e, através de uma ligação cruzada entre os filamentos de actina e a subunidade regulatória de PKA (especificamente PKARII $\beta$ ), LRRK2 restringe a disponibilidade da proteína quinase apenas a este subcompartimento neuronal, evitando assim sua difusão para os espinhos dendríticos (*dendritic spines*), local abundante em receptores glutamatérgicos do tipo AMPA e NMDA (Figura 23A). A ausência da proteína LRRK2 nos animais KO promove a difusão de PKA do eixo central dos dendritos para o espinho dendríticos, aproximando fisicamente a quinase dos seus alvos neuronais GluR1 (subunidade dos receptores AMPA) e cofilina (proteína reguladora de actina), culminando em um aumento nas suas formas fosforiladas. Essa hiperfosforilação mediada por PKA promove anormalidades no desenvolvimento dos espinhos sinápticos acompanhados por prejuízos na transmissão glutamatérgica estriatal (Figura 23B). Além disso, a hiperativação de PKA aumenta a fosforilação do seu principal alvo molecular nos neurônios, CREB (cAMP-response element-binding protein), um fator de transcrição amplamente associado a modulação de comportamentos subjacentes ao alcoolismo (Graybiel *et al.*, 1990; Lanahan e Worley, 1998; Nestler *et al.*, 2001). De forma geral, esse desbalanceamento estrutural e fisiológico provocado pela desregulação da via LRRK2 pode estar relacionado às alterações no comportamento aditivo encontrado nos animais do grupo inflexível.

### 5.3.2. Campo aberto

O teste de campo aberto utiliza a resposta ao medo a lugares abertos e luminosos, inato em camundongos, como medida quantitativa do comportamento do tipo ansioso (ou emocionalidade, como definido originalmente por Hall, em 1934). Neste aparato, o animal é colocado no centro da arena, por um período de tempo determinado (aqui 45min), e o seu comportamento ambulatorio é registrado. Um animal dito ansioso apresenta baixa atividade motora principalmente na região central da arena em virtude do comportamento de *freezing*,

associado ao medo, e defecação aumentada, este último decorrente da ativação do sistema nervoso autônomo.



**Figura 23:** Hipótese biológica correlacionando o comportamento do tipo compulsivo/inflexível com distúrbios na via LRRK2. (A) Mecanismo normal de funcionamento da proteína LRRK2 na regulação da proteína quinase A através de sua atividade AKAP. (B) Receptores glutamatérgicos em seu estado hiperfosforilado em função da ausência de regulação da proteína quinase A em camundongos LRRK2 KO. Para mais detalhes do mecanismo biológico, veja item 5.3.1.

Agentes ansiolíticos como benzodiazepínicos, pentobarbital e drogas de abuso como etanol aumentam a ambulação e a permanência de animais não familiarizados com o teste na área central da arena (Britton e Britton, 1981; Rex *et al.*, 1998; Prut e Belzung, 2003). Na comparação entre animais naive para etanol, os animais KO se mostraram menos presentes

na região central da arena durante os 45 minutos do que sua contraparte selvagem. Como discutido anteriormente, esse efeito está relacionado a um maior grau de ansiedade basal nestes animais (*Lrrk2* KO).

Entretanto, como em geral os testes utilizados para avaliar o perfil ansiogênico fazem uso de abordagens de avaliação de desempenho motor, na conjectura dos animais *LRRK2* KO possuírem algum déficit de locomoção, os resultados obtidos nesta tarefa poderiam não refletir de fato um componente comportamental. Assim, com o propósito de se evitar conclusões equivocadas, paralelamente à análise comportamental, comparou-se também a performance motora destes animais no aparato. Como nenhuma discrepância foi detectada, conclui-se que, baseado no teste de campo aberto, a origem da discrepância entre os grupos é, possivelmente, um reflexo de déficits comportamentais, ou seja, camundongos KO para o gene *Lrrk2* são mais ansiosos do que animais selvagens.

Apesar deste trabalho ser o primeiro a relacionar uma possível influência do gene *Lrrk2* com aspectos motivacionais do alcoolismo, outros estudos já haviam investigado a relação entre ansiedade e o gene em questão. Em uma abordagem semelhante, Hinkle *et al.* (2012) também mostraram que animais KO para o gene *Lrrk2* passam a maior parte do tempo próximos às paredes do aparato de campo aberto, demonstrando um comportamento do tipo ansioso. De forma contraditória, Beccano-Kelly *et al.* (2015), também utilizando o aparato de campo aberto, não encontraram diferenças detectáveis nos parâmetros de atividade locomotora e tempo gasto na área central entre animais KO e selvagens. Uma provável explicação para esta discrepância reside no fato deste grupo ter utilizado um protocolo com duração total de apenas 5 minutos. No presente trabalho, as diferenças entre os dois grupos surgem apenas a partir do minuto 20 (Figura 7A). Ainda neste trabalho (Beccano-Kelly *et al.*, 2015) os autores compararam, utilizando a mesma abordagem, camundongos que superexpressam o gene *Lrrk2* de maneira global, e, novamente, nenhuma evidência relativa à ansiedade foi detectada nesses animais transgênicos.

Lewis (1996) sugeriu que os efeitos ansiolíticos do etanol funcionem como um reforço negativo, podendo assim servir como um gatilho para o seu uso abusivo e talvez a adição. De fato, Smail *et al.* (1984) demonstraram que transtornos de ansiedade são comorbidades comuns entre alcoolistas, estando presentes em 25-45% dos pacientes. Por outro lado, as taxas de prevalência de alcoolismo em populações com transtornos de ansiedade variam de 15 a 40% (Massion *et al.*, 1993). Em outro estudo, Farber *et al.* (1980) verificaram que 93% dos indivíduos em uma amostra de alcoolistas justificavam o consumo do álcool em decorrência da redução do estresse e da tensão, enquanto a maioria daqueles indivíduos que beberam socialmente relatava razões de sociabilidade e celebração. Além disso, estudos utilizando modelos animais mostram que ratos geneticamente selecionados para consumirem grandes quantidades de etanol (P rats e HAD rats) apresentam um altíssimo grau de

ansiedade quando comparados a sua contraparte genética não bebedora (NP rats e LAD rats) (Stewart *et al.*, 1993; Hwang *et al.*, 2004). Apesar da ação ansiolítica do etanol nos camundongos KO não ter sido testada, é plausível assumir que o comportamento do tipo ansioso observado aqui possa contribuir para o alto consumo de etanol característico destes animais.

No presente trabalho, o comportamento do tipo ansiedade foi unicamente avaliado através do teste de campo aberto. Apesar de ser amplamente validado, este teste pode apresentar algumas discrepâncias quanto a análise dos dados. Como exemplo, alguns medicamentos utilizados no tratamento de desordens de ansiedade, como transtorno do pânico, ansiedade generalizada e distúrbio obsessivo-compulsivo são ineficientes em reduzir traços de ansiedade em testes de campo aberto (Prut e Belzung, 2003). Sendo assim, a caracterização de comportamentos psicológicos complexos não deve ser baseada em apenas uma abordagem comportamental, a fim de evitar resultados imprecisos. Um levantamento realizado por Griebel e Holmes (2013), mostrou que os testes e aparatos mais utilizados pela comunidade científica na triagem de novas drogas com potencial ansiolítico são o labirinto em cruz elevado (35%), seguido pelo campo claro-escuro (11,5%) e campo aberto (7,4%). Além de terem sido altamente padronizados ao longo dos anos, esses testes possuem medidas intuitivas e de fácil interpretação, possuem um baixo custo e são fáceis de serem executados. Futuramente os dados adquiridos a partir abordagem do campo aberto serão contra validados com o auxílio dos testes de labirinto em cruz elevado e campo claro-escuro.

### **5.3.3. Procedimento de acesso crônico, intermitente e por livre escolha ao etanol**

Esse protocolo foi inicialmente estabelecido para ratos por Wise (1973) e amplamente utilizado em camundongos (Hwa *et al.*, 2011; Philibin *et al.*, 2012; Darcq *et al.*, 2014). Por utilizar duas garrafas em um esquema de livre escolha, esse protocolo permite acessar simultaneamente a preferência de cada animal pelo álcool e, devido aos repetidos ciclos de consumo excessivo e abstinência, promove o estabelecimento de um consumo estável de etanol e em grandes quantidades em um curto período de tempo. Nesse teste, 8 animais (4 KO e 4 selvagens) tiveram seu consumo diário de água e etanol acompanhados por 3 semanas, ou 9 sessões intermitentes. Enquanto os animais selvagens iniciaram a primeira semana de livre acesso consumindo baixas quantidades de etanol, seguido por um escalonamento nas semanas seguintes, os animais KO, já no primeiro dia de livre escolha, consumiram grandes quantidades da droga, o qual manteve-se estável neste nível de consumo durante as semanas seguintes. Apesar da nítida diferença entre os grupos ao longo dos dias, a aplicação do teste multivariado com dois fatores principais foi impossibilitado devido ao pequeno número amostral. Sendo assim, a medição do consumo foi compilada

semanalmente e comparada de forma pareada entre os grupos através do teste KS, enquanto a diferença semanal dentro de um mesmo grupo foi realizada através do teste de Friedman e pós teste de Dunn. De forma geral, os camundongos KO consumiram durante todo o experimento maiores quantidades de etanol do que sua contraparte selvagem, sendo a diferença estatisticamente significativa apenas nas semanas 1 e 3. Ao comparar os dados semanais de preferência por etanol com os de consumo total da droga, observou-se uma correlação atípica. Apesar dos camundongos KO consumirem uma maior quantidade da solução etílica nas semanas 1 e 3, a preferência pela droga nesses animais foi maior do que aquela vista nos animais controle apenas na primeira semana do teste. Sendo assim, se na terceira semana de exposição a preferência entre água e etanol entre os grupos foi similar, mas a quantidade de etanol consumida pelos animais KO foi maior, a diferença de consumo etílico aqui observada pode ser explicada simplesmente por um aumento na ingestão diária de fluido (tanto água quanto solução etílica) nesses camundongos, e não um reflexo direto de uma maior propensão desses animais em consumir a droga por si. Ao analisar a ingestão de fluido diário (água + solução etílica) ao longo das semanas, nota-se um maior consumo de fluido total nos animais KO nas semanas 2 e 3, corroborando assim o fato de que o aumento no consumo de etanol nesses animais não é uma virtude apenas da diferença de motivação pela droga, mas sim uma influência do maior aporte de fluido diário, condição denominada polidipsia. Por outro lado, vale lembrar que na primeira semana de livre escolha, a diferença de consumo entre os grupos foi devida exclusivamente à maior preferência pela solução etílica nos animais KO, e que neste ponto não houve diferença no consumo total de fluido ingerido entre os diferentes camundongos (Figuras 8, 9 e 10). Sendo assim, valendo-se apenas deste teste, não há evidências suficientes para afirmar que o maior consumo de etanol nos animais KO é estritamente devido a uma maior exigência hídrica intrínseca desses camundongos, ou se, devido ao alto consumo etílico, a demanda diária por água também aumenta de forma sinérgica e compensatória nesses animais. O consumo basal de água nos camundongos KO não foi registrado na ausência do etanol e, portanto, não se pode arguir de forma convicta se animais KO naive (não expostos ao álcool) possuem de fato uma maior necessidade hídrica. Apesar da incerteza quanto ao consumo geral de fluido destes animais, um fator que merece destaque é que a preferência por etanol nos animais KO se manteve acima de 50% desde a primeira semana de experimentação. Sendo assim, mesmo assumindo a possibilidade de uma maior exigência hídrica, esses animais preferem etanol mesmo tendo a livre escolha para consumirem água. Como será apresentado na sessão 5.3.4, os dados experimentais de adulteração da solução etílica por quinino complementam as ideias apresentadas aqui.

#### 5.3.4. Adulteração por quinino

O modelo experimental utilizado neste trabalho define como perda de controle, característica esta exclusiva dos animais do grupo inflexível, a persistência no consumo e preferência pela solução etílica mesmo após sua adulteração por hidrocloreto de quinino. Sendo assim, para testar a hipótese de que a via LRRK2 controla, além do consumo e preferência pela droga, o traço de consumo inflexível (ou perda de controle), animais KO e controle foram expostos a um protocolo de adulteração semelhante aquele definido no modelo original (Ribeiro *et al.*, 2012). No primeiro dia de exposição, a solução etílica foi adulterada a uma concentração final de quinino de 0,005 g/L, mesma concentração utilizada na definição do modelo. Nesta dose, o quinino se mostrou levemente aversivo, já que ambos os grupos apresentaram uma redução modesta e não significativa no consumo basal de etanol. De acordo com a definição do modelo e a hipótese vigente, a adulteração por quinino a uma concentração de 0,005g/L deveria ser aversiva para os animais controle e tolerada pelos animais KO. A tolerância ao quinino apresentada pelos animais controle pode ter origem na diferença entre as linhagens de camundongos utilizadas. Enquanto Ribeiro *et al.* (2012) utilizaram camundongos heterogênicos da linhagem Swiss para a construção do modelo, a validação apresentada neste trabalho fez uso de camundongos com o *background* estabelecido na linhagem isogênica C57BL/6J, a qual sabidamente apresenta uma alta preferência por etanol e consome grandes quantidades da droga (Crabbe, Phillips, *et al.*, 2010). Portanto, é possível especular que esses camundongos demonstrem uma maior persistência pela droga e que a adulteração por quinino a uma dose de 0,005g/L não produza a aversão necessária para reduzir o consumo da droga nesses camundongos. Sendo assim, para continuar investigando a persistência no consumo do etanol em virtude da aversão, nos dois dias seguintes de teste, a concentração final de quinino na solução etílica foi aumentada para 0,5mM (~0,2g/L), dosagem altamente repulsiva em camundongos. Nesta concentração, ambos os grupos reduziram o consumo de etanol em comparação ao seu consumo basal, sendo, porém, significativa a redução apenas no grupo controle. De maneira interessante, além pequena redução no consumo (não significativa), a quantidade de etanol consumida pelos animais KO na concentração de 0,5mM foi semelhante àquela consumida pelos animais controle na concentração de 0,005g/Kg (Figura 11). Ou seja, apesar da situação altamente repulsiva, os camundongos KO mantiveram um consumo considerável de etanol, comparável aos níveis basais (ou em situação pouco aversiva na dose de 0,005g/L de quinino) de sua contraparte controle. Apesar do quinino ser sabidamente um agente capaz de produzir uma forte aversão em camundongos (Aravich e Sclafani, 1980), neste modelo de livre escolha não se pode afirmar que a permanência do alto consumo nos animais Inflexíveis na fase de adulteração está relacionada de fato à perda de controle sobre a droga ou se essa persistência

reside no simples fato desses animais serem resistentes à propriedade aversiva do quinino. Posto isto, com o objetivo de validar a etapa de adulteração por quinino como fator preditivo da perda de controle nesses animais, foi utilizado um subgrupo de camundongos (3 controles e 3 KO) em um teste de preferência por quinino. O esquema experimental foi mantido o mesmo daquele utilizado na etapa de adulteração supracitado, porém utilizando-se soluções aquosas de quinino ao invés de soluções etílicas. No primeiro dia de adulteração (0,005g/L de quinino em água), os camundongos consumiram baixíssimas quantidades da solução adulterada, resultando em um coeficiente de preferência próximo a 5% nos animais controle e 29% nos animais KO (Figura 13 A). Apesar da aparente diferença entre os dois grupos, o grupo KO apresentou uma grande variação interindividual que, aliado ao pequeno número amostral (n=3) tornou a diferença não significativa. Ainda assim, em média, ambos os grupos preferiram o quinino em relação à água. Quando a dose foi aumentada para 0,5mM (dias 2 e 3), ambos os grupos demonstraram um fortíssimo grau de aversão, atingindo um coeficiente de preferência insignificante. Aliado aos dados da fase de adulteração, esses resultados comprovam que o quinino por si, na concentração de 0,5mM, é um agente altamente aversivo para ambos os grupos, e que, apesar de tamanha aversão, essa dose é incapaz de reduzir o consumo de etanol em animais (e apenas nestes) deficientes do gene *Lrrk2*.

A análise dos dados de ingestão total de fluido provenientes do teste de preferência por quinino (Figura 13 B) orientaram de forma mais clara a relação até então imprecisa entre a quantidade de etanol ingerida pelos animais KO e sua provável maior exigência hídrica. De fato, os animais deficientes do gene *Lrrk2* possuem uma maior exigência de fluidos diária (polidipsia) do que sua contraparte selvagem. Entretanto, ao contrário do que se observou na adulteração das soluções etílicas, quando se foi oferecido aos animais KO uma solução aquosa de quinino a 0,5mM ou água, apesar desses camundongos terem mantido o seu nível diário de ingestão de fluido, apenas 1% do total do fluido ingerido foi proveniente da solução aquosa de quinino.

Como conclusão deste conjunto preliminar de experimentos pode-se inferir que a desregulação da via LRRK2 (simulada aqui através dos animais KO) está relacionada de alguma forma com o traço “perda de controle”, da maneira qual definida neste modelo. Além disso, animais deficientes do gene *Lrrk2* consomem maiores quantidades de etanol do que seus pares selvagens, e este consumo exacerbado pode ter origem conjunta na maior exigência hídrica intrínseca destes animais, a uma maior resistência aos efeitos aversivos do álcool e possivelmente a uma maior motivação para a tomada da droga.

Ainda que as propriedades reforçadoras das drogas de abuso empenhem uma parcela importante na ação de procura e ingestão de determinada substância, esse comportamento é o resultado do balanço entre seus efeitos reforçadores e aversivos, o qual irá definir a probabilidade do seu consumo pelo indivíduo. De acordo com Riley (2011), uma miríade de

fatores pode impactar o potencial aversivo de uma droga, entre eles pode-se destacar a dose, rota de administração, histórico progresso de uso, sexo, ciclo circadiano, espécie, idade, e fatores genéticos. Considerando que todos os fatores acima descritos foram controlados experimentalmente, pode-se assumir que o único fator governando a aversão ao sabor do etanol é o fator genético. De forma interessante, estudos tem demonstrado que a aversão ao etanol é fator mais impactante na definição do perfil de consumo de álcool em diversas linhagens de ratos (Cannon *et al.*, 1994) e camundongos (Broadbent *et al.*, 2002), em que o consumo da droga é limitado pelas reações adversas provocadas pelo seu consumo.

Se por um lado a constatação da maior ingestão de etanol nos animais KO indica um desequilíbrio entre as propriedades reforçadoras e aversivas da droga, a priori, ainda não se pode afirmar qual a sua origem. Uma maneira de se inferir a direção a qual este balanço está pendente, ou seja, se o etanol é mais reforçador ou menos aversivo aos animais KO, é através do teste de Preferência Condicionada por Lugar (PCL), o qual será executado futuramente.

Apesar dos modelos de livre escolha serem altamente informativos em responder perguntas como consumo geral e preferência por etanol, uma limitação inerente a este método é a impossibilidade em mensurar a motivação do animal em obter a droga (Tabakoff e Hoffman, 2000). Entretanto, este estado pode ser acessado através de modelos operantes, os quais o animal deve executar uma determinada tarefa para receber acesso à droga. Portanto, o passo seguinte na investigação dos efeitos da desregulação da via LRRK2 no comportamento de consumo inflexível de etanol foi avaliar e comparar a performance de camundongos selvagens e KO em um modelo operante de autoadministração de etanol.

### **5.3.5. Condicionamento operante**

#### **5.3.5.1. Conceito introdutório**

Chamamos de operante o processo pelo qual certa classe de comportamentos fica sob o controle de suas consequências, ou seja, a motivação para a execução de um determinado comportamento está associada à consequência trazida por aquela ação. Assim, diferentemente do comportamento respondente (o qual a resposta é originada imediatamente após a apresentação do estímulo, ou seja, causado por um estímulo que antecede a sua ocorrência), o comportamento operante é causado pelas consequências que ele produz, pelas alterações que ele provoca no ambiente. O condicionamento operante, por sua vez, é o processo de estabelecimento da associação entre um determinado comportamento e a consequência final relacionada ele. Essa associação consequência-comportamento é modelada a partir de um estímulo, denominado reforço, o qual possui a capacidade de aumentar a probabilidade de ocorrência de uma mesma resposta em uma relação de dependência denominada contingência. Dizer que existe uma contingência entre um evento

comportamental (resposta) e um evento ambiental (consequência), implica-se que a presença de um aumenta a possibilidade de ocorrência do outro, ou seja, existe uma relação de dependência entre estes eventos. O reforço por sua vez pode ser positivo, quando o comportamento é fortalecido por um estímulo que é acrescentado à situação, ou negativo, quando um comportamento é fortalecido pela remoção de um estímulo. Trazendo o conceito de condicionamento operante à adição, podemos dizer que em seu mecanismo agudo, o ato de consumir a droga é fortalecido pela sensação prazerosa gozada pelo indivíduo. Aqui, a resposta ou comportamento (procurar ou consumir a droga) é controlado pela consequência desta ação, sensação prazerosa. Assim, podemos dizer que existe uma contingência estabelecida entre os eventos, já que a ocorrência da sensação prazerosa aumenta a probabilidade de ocorrência do comportamento inicial (procura ou tomada da droga). Por último, sabemos que essa relação de contingência foi estabelecida através da apresentação de um reforço positivo, pois o comportamento inicial foi fortalecido através da apresentação de um estímulo novo, a sensação de prazer. No estágio crônico da adição, também se estabelece uma relação de contingência, porém agora através do reforço negativo. Na ausência da droga, o indivíduo experimenta sensações negativas de desprazer associados à abstinência. Quando da tomada da droga, o estímulo inicial (sensação desagradável) é extinto (ou retirado), comportando-se, portanto, como um reforço negativo.

#### **5.3.5.2. Condicionamento operante: autoadministração de etanol**

Nesse modelo um animal é treinado a pressionar uma alavanca com o objetivo final de receber acesso ao etanol, em um comportamento moldado através do condicionamento operante. Aqui, a ação de pressionar a barra é executada com o objetivo final de receber acesso ao álcool em uma relação de contingência (interdependência) fortalecida através do reforço positivo (sensação de prazer associada ao consumo).

Os primeiros trabalhos a utilizarem a autoadministração de etanol em animais de laboratório datam da década de 70, demonstrando a propriedade reforçadora do etanol tanto em roedores (Meisch e Thompson, 1972) quanto em primatas (Meisch *et al.*, 1975; Meisch e Henningfield, 1977; Carroll e Meisch, 1978; 1980). Na maioria dos procedimentos operantes em camundongos, o álcool é administrado por via oral e pode ser entregue de duas maneiras distintas: (1) através de um cilindro ou pipeta apresentado em uma pequena abertura da caixa operante (Czachowski *et al.*, 2002; Simms *et al.*, 2010; Lopez e Becker, 2014); (2) ou através da liberação da droga em um pequeno recipiente ou receptáculo (Toalston *et al.*, 2015). No primeiro caso, a droga é oferecida em uma quantidade virtualmente ilimitada a cada resposta operante, mas apenas por um determinado período de tempo. No segundo, a quantidade de droga disponível é restrita a um volume específico (determinado pelo investigador) e oferecida

por um tempo indeterminado. Apesar de ser a rota de administração natural da droga, o consumo oral de etanol apresenta alguns problemas em estabelecer em um curto prazo a contingência operante, ou seja, a dependência necessária entre a resposta operante e a consequência atrelada a ela (entrega da droga). Os principais fatores limitadores no estabelecimento desta correlação são: (1) sabor aversivo do etanol, o qual pode inicialmente prevenir o consumo da droga; (2) atraso no início dos efeitos da droga no sistema nervoso central (algumas vezes mais de 5 minutos após a ingestão); (3) consumo de pequenos volumes da solução etílica, privando o aparecimento dos efeitos farmacológicos associados à droga (MEISCH, 2001). Algumas estratégias foram elaboradas para superar essas barreiras e estabelecer a entrega oral do etanol como um agente reforçador efetivo. Dentre estas, destaca-se um protocolo que utiliza a adição de sacarose à solução etílica proporcionando altos níveis de consumo de etanol e uma resposta operante estável em um curto período de tempo. Essa medida tem como objetivo mitigar o sabor aversivo do álcool e estimular o consumo da droga (SIMMS et al., 2010). Esse procedimento é vantajoso pelo fato de se adquirir uma resposta operante estável em um curto período de tempo (semanas) e gerar níveis farmacologicamente significativos de etanol no sangue. Outros protocolos também utilizam animais parcialmente privados de água ou comida para estimularem o consumo de etanol (Middaugh e Kelley, 1999). Apesar da maioria dos protocolos utilizarem a administração do etanol por via oral, em algumas circunstâncias a droga é oferecida por outras vias, como intragástrica (Griffin et al., 2009; Fidler et al., 2011), intraventricular ou até mesmo em regiões cerebrais específicas (Rodd-Henricks et al., 2000; Rodd, Bell, et al., 2004; Rodd, Melendez, et al., 2004). Esses métodos possuem a vantagem de anular a influência do efeito aversivo do etanol ou evitar fatores de imprecisão, como diferentes taxas metabólicas e disponibilidade da droga no sangue. Apesar de facilitar o estabelecimento do condicionamento operante, as vias de administração não-oral de etanol estão afastadas da realidade no contexto natural de aquisição da droga. O modelo utilizado neste estudo fez uso de animais em seu estado natural (não privados de água ou comida) em que o etanol é oferecido também em seu estado natural (sem adição de sacarose) por via oral. Apesar de demandar um maior tempo para se estabelecer a contingência, esse paradigma aborda várias questões fundamentais na progressão natural do uso do álcool, no qual a droga é consumida em virtude de suas propriedades reforçadoras (ao invés de fatores relacionados a reforços secundários ou sede) e através da sua via de administração usual.

### **5.3.5.3. Autoadministração de etanol em animais LRRK2 KO**

Como explicado nos tópicos anteriores, a autoadministração de etanol tem por objetivo estudar as alterações comportamentais de busca pela droga promovidas pela exposição do

animal a repetidos ciclos de acesso e abstinência ao etanol por um longo período de tempo. Para isso, fez-se uso de 12 animais KO e 12 animais controle, naive para etanol, submetidos a um protocolo de treinamento conforme estabelecido no tópico 3.2.7.2. Ao fim do protocolo de autoadministração, não foi observada nenhuma diferença na taxa de aprendizado entre os dois grupos, uma vez que a proporção de camundongos respondentes (aqueles que aprenderam a relação entre pressionar a alavanca e receber o acesso à droga) foi semelhante. Esse resultado valida duas premissas importantes para o prosseguimento da análise comparativa entre os animais KO e controle: (1) o etanol mantém suas propriedades reforçadoras nos animais KO, uma vez que a contingência (ou seja, o estabelecimento entre a resposta e a consequência) foi estabelecida em proporções semelhantes entre os grupos; (2) os animais KO para o gene LRRK2 não possuem déficit nos mecanismos neurais envolvidos no estabelecimento do aprendizado operante.

De maneira geral, não houve diferença entre os grupos em nenhum dos comportamentos operantes testados ao longo de todo o protocolo de autoadministração de etanol. Como mostrado nas figuras 14, 16A e 18 A, respectivamente, ambos os grupos respondem (acionam a alavanca) e lambem de maneira semelhante, e consomem quantidades similares de etanol durante todo o protocolo, seja na fase de aprendizagem ou tardia. Além disso, quando se correlacionou as respostas operante e as lambidas em cada animal, observou-se uma correlação positiva e significativa em ambos os grupos (Figura 16 B). Esse quadro mostra que a relação entre o comportamento de procura pela droga (resposta operante) e o objetivo final (consumo do álcool), está ajustado e presente de maneira semelhante entre os diferentes camundongos.

A microestrutura de cada um dos comportamentos foi verificada através da distribuição média de cada resposta (resposta operante, tempo de acesso e lambidas) ao longo do tempo total das sessões apenas na fase tardia do treinamento (FR3). Observou-se que os animais KO tendem a apresentar uma resposta operante (e consequentemente um tempo de acesso) mais presente na segunda metade da sessão, enquanto os animais controle tendem a apresentar uma taxa constante de resposta durante toda a sessão (Figura 15). Barkley-Levenson e Crabbe (2012) mostraram que animais geneticamente selecionados para consumir grandes quantidades de etanol em um paradigma conhecido como *drinking in the dark* (HDID-1), quando comparado à sua linhagem progenitora (HS/Npt), também apresentam uma microestrutura de consumo de etanol do tipo *end-loading*, em que grande parte do consumo total de etanol é executado nos 30 minutos finais de um protocolo de consumo de 2h. Ao contrário da resposta de procura pela droga (respostas operantes), o consumo da droga (lambidas) mostrou um perfil constante durante toda a sessão, não obedecendo ao padrão *end-loading*. Isso mostra que, apesar da requisição da droga aumentar na parte final do treino, o consumo obedece a uma taxa constante durante toda a sessão. Importante

também se notar que o número de lambidas e o consumo total de etanol se correlacionam forte e positivamente ( $p < 0,0001$ ), demonstrando que o número de lambidas pode ser utilizado como uma medida preditiva do consumo e que, obedecendo algumas ressalvas, as conclusões levantadas para um parâmetro podem ser extrapoladas ao outro (Figura 19A). Da mesma forma, os dados de consumo e de concentração sanguínea de etanol também mostraram valor preditivo, seguindo o mesmo padrão discutido acima (Figura 19B).

#### 5.3.5.4. Motivação

Animais que consomem álcool compulsivamente possuem uma maior motivação para a procura da droga e uma maior tendência em apresentar recaídas (Kalivas e Volkow, 2005; Ron e Jurd, 2005). Sendo assim, 24h após a última sessão de autoadministração de etanol, a motivação de cada animal para obter a droga foi medida através de um cronograma de Razão Progressiva ou *Breakpoint*. Nesse cronograma, a razão de resposta requerida para receber o acesso ao etanol é incrementada a cada acesso conquistado pelo animal. Ao ajustar o número de respostas operantes necessárias para receber o acesso ao etanol (ou recompensa) pode-se medir quão árduo um animal irá trabalhar para receber acesso à droga (Tabakoff e Hoffman, 2000). O ponto no qual o camundongo cessa a resposta para receber acesso ao etanol é chamado de *breakpoint* e é considerado um indicador quantitativo da motivação do animal para receber acesso à droga (Richardson e Roberts, 1996).

Aqui, os resultados mostraram que, apesar de ambos os grupos consumirem e buscarem o etanol de forma semelhante durante o período de autoadministração, camundongos KO possuem uma maior motivação para conseguir a droga do que sua contraparte selvagem, alcançando em média um maior *breakpoint* na sessão de Razão Progressiva. Além disso, ao se comparar a média de repostas operantes executadas na sessão de RP com a média das repostas executadas na fase tardia de treinamento (FR3), observa-se um aumento significativo nas repostas apenas nos animais do grupo KO. Em conjunto, esses dados corroboram o fato de que o aumento na preferência e no consumo de etanol em camundongos deficientes do gene *Lrrk2* possui um componente motivacional intrínseco.

Um comportamento é dito como sendo motivado quando o estímulo integrado a ele é dotado de uma considerável importância (ou saliência) e direciona o sujeito a uma resposta comportamental específica (KALIVAS; VOLKOW, 2005). Mudanças na motivação para se obter drogas e agentes reforçadores naturais é um dos componentes chave na adição. Indivíduos afligidos por essas desordens se mostram inaptos em suprimirem a procura pela droga, superestimando a motivação para consegui-la e diminuindo a habilidade em controlar o desejo de obtê-la (Wikler, 1952; Kalivas e Volkow, 2005). De acordo com Berridge e

Robinson (1998) em sua teoria da Saliência do Incentivo (*Incentive salience*), na adição o “gostar” (prazer ou valor hedônico ligado à droga) se torna dissociado do “querer” (desejo) em um processo em que a procura pela droga se torna patologicamente aumentada, e os indivíduos passam a “querer” mais a droga enquanto o “gostar” se torna menos preponderante (uma vez que a tolerância diminui os efeitos prazerosos associados ao consumo). As alterações neurais subjacentes a esse descontrole constituem o estágio final do ciclo de adição conhecido como “Antecipação” (Kalivas e Volkow, 2005) e recrutam sistemas particularmente críticos para a fissura e busca compulsiva e descontrolada pela da droga, predispondo o sujeito a recaídas, mesmo após anos em abstinência.

### **5.3.6. Perda do reflexo de endireitamento (LORR, *Loss Of Righting Reflex*)**

Respostas subjetivas ao etanol, como sensibilidade e tolerância, refletem diferenças individuais aos seus efeitos farmacológicos e podem ser importantes endofenótipos no entendimento das influências genéticas que predisõem às DUA (Morean e Corbin, 2010). Newlin e Thomson (1990) propuseram no seu “Modelo Diferenciador” (do inglês *Differentiator Model*), que indivíduos com uma predisposição aumentada ao desenvolvimento das DUA possuem uma maior sensibilidade aos efeitos estimulantes e eufóricos do etanol e uma menor sensibilidade aos seus efeitos depressivos. Pensando na utilização destes endofenótipos como um fator preditivo e discriminante do alto consumo de etanol nos animais KO para o gene *Lrrk2*, avaliou-se a resposta destes animais aos efeitos hipnóticos depressivos da droga através do teste de perda do reflexo de endireitamento (LORR). Neste teste, a sensibilidade inicial ao etanol foi avaliada através da medição da latência e duração da LORR em animais naive para etanol, enquanto a tolerância foi medida após as 5 semanas de autoadministração da droga, utilizando os mesmos parâmetros acima. Analisando o parâmetro latência, os animais KO se mostraram menos sensíveis aos efeitos hipnóticos do etanol do que sua contraparte selvagem, indo assim de acordo com a ideia do modelo diferenciador de Newlin e Thomson. Consistente com esses achados, diversos autores demonstraram que ratos e camundongos geneticamente selecionados em virtude do seu alto consumo e preferência pelo etanol demonstram uma menor sensibilidade aos efeitos depressivos do álcool do que suas contrapartes genéticas “não bebedoras” (Kurtz *et al.*, 1996; Froehlich e Wand, 1997; Zimatkin *et al.*, 2001; Crabbe, Bell, *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012; Fritz *et al.*, 2014; Savarese *et al.*, 2014). Quando esses parâmetros foram correlacionados à média de consumo individual de etanol durante a autoadministração, observou-se uma tendência de correlação negativa entre a latência para a LORR e a média total de consumo nos animais do grupo KO, fortalecendo assim a hipótese de que a sensibilidade inicial aos efeitos negativos da droga influencia

negativamente o seu consumo. Essa correlação não foi verdadeira para o grupo controle nem tampouco quando o fator duração do LORR foi utilizado na correlação.

Ademais aos achados acima, observou-se também uma correlação negativa entre a duração da LORR e a concentração sanguínea de álcool no momento da recuperação do reflexo. Sendo assim, pode-se especular que, possivelmente, o efeito agudo inicial provocado pela injeção da superdose de álcool seja mais importante na determinação da perda e duração da perda do reflexo do que propriamente concentração sanguínea de etanol no momento da recuperação da consciência.

Com base no ensaio de tolerância, medido através do segundo teste de LORR, observou-se que uma maior proporção de animais KO (50%) se tornou tolerante aos efeitos hipnóticos do etanol após as 5 semanas de consumo da droga, quando comparados aos animais controle (20%). Além disso, observou-se também que, independente do genótipo, quanto maior a sensibilidade inicial do animal, maior o grau de tolerância desenvolvido (Figura 22B), novamente em acordo com os demais dados da literatura (Nikander e Pekkanen, 1977; Moore e Kakihana, 1978; Khanna *et al.*, 1985). Vale também ressaltar que a análise de tolerância sofreu uma grande influência associada ao pequeno número amostral utilizado nesse ensaio (6 animais controle e 6 animais KO).

## 6. CONCLUSÃO E SUMÁRIO DE RESULTADOS

Este trabalho avaliou as diferenças transcricionais globais de camundongos que desenvolveram um comportamento inflexível compulsivo de consumo de etanol com animais que preferiram água à droga. Nesta comparação, a análise global identificou um conjunto de genes diferencialmente regulados, os quais, em conjunto, constituem uma via denominada *LRRK2* in neurons in Parkinson's disease, nunca antes associada ao alcoolismo. O gene central desta via, o qual produz uma quinase denominada *Lrrk2*, apareceu hiper-regulado apenas no grupo de animais com consumo compulsivo de etanol. A validação funcional deste gene mostrou que animais *LRRK2 Knockouts* apresentam, em comparação com animais selvagens, uma maior preferência e um maior consumo de etanol, um consumo do tipo inflexível compulsivo, uma maior motivação para buscar e consumir a droga, um maior estado basal de ansiedade e uma menor sensibilidade inicial aos efeitos hipnóticos do etanol. Os dados funcionais aliados ao dado molecular corroboram que alterações no perfil transcricional do gene *Lrrk2* (e conseqüentemente a desregulação dos mecanismos celulares regulados por ele) como um forte candidato molecular responsável pela consolidação do consumo compulsivo e sem controle de etanol, comportamento característicos de indivíduos acometidos por desordens no uso do álcool. Apesar de ainda preliminar, a identificação funcional deste gene pode abrir novos caminhos para o entendimento do componente genético relacionado à compulsão e perda de controle sob o consumo da droga.

## 7. REFERÊNCIAS

American Psychiatric Association. (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5. Washington, D.C: **American Psychiatric Association**.

ARAVICH, P. F.; SCLAFANI, A. Dietary preference behavior in rats fed bitter tasting quinine and sucrose octa acetate adulterated diets. **Physiol Behav**, v. 25, n. 2, p. 157-60, Aug 1980. ISSN 0031-9384 (Print)

BALLEINE, B. W.; DELGADO, M. R.; HIKOSAKA, O. The role of the dorsal striatum in reward and decision-making. **J Neurosci**, v. 27, n. 31, p. 8161-5, Aug 1 2007. ISSN 1529-2401 (Electronic)

BARKLEY-LEVENSON, A. M.; CRABBE, J. C. Ethanol drinking microstructure of a high drinking in the dark selected mouse line. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 36, n. 8, p. 1330-9, Aug 2012. ISSN 1530-0277 (Electronic)

BECCANO-KELLY, D. A. et al. LRRK2 overexpression alters glutamatergic presynaptic plasticity, striatal dopamine tone, postsynaptic signal transduction, motor activity and memory. **Hum Mol Genet**, v. 24, n. 5, p. 1336-49, Mar 1 2015. ISSN 1460-2083 (Electronic)

BELL, R. L. et al. Gene expression changes in the nucleus accumbens of alcohol-preferring rats following chronic ethanol consumption. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 94, n. 1, p. 131-47, Nov 2009. ISSN 1873-5177 (Electronic)

BERRIDGE, K. C.; ROBINSON, T. E. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? **Brain Res Brain Res Rev**, v. 28, n. 3, p. 309-69, Dec 1998.

BIBANCOS, T. et al. Social isolation and expression of serotonergic neurotransmission-related genes in several brain areas of male mice. **Genes Brain Behav**, v. 6, n. 6, p. 529-39, Aug 2007. ISSN 1601-1848 (Print)

BIERUT, L. J. et al. ADH1B is associated with alcohol dependence and alcohol consumption in populations of European and African ancestry. **Mol Psychiatry**, v. 17, n. 4, p. 445-50, Apr 2012. ISSN 1476-5578 (Electronic)

BIRLEY, A. J. et al. ADH single nucleotide polymorphism associations with alcohol metabolism in vivo. **Hum Mol Genet**, v. 18, n. 8, p. 1533-42, Apr 15 2009. ISSN 1460-2083 (Electronic)

BISKUP, S. et al. Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain. **Ann Neurol**, v. 60, n. 5, p. 557-69, Nov 2006. ISSN 0364-5134 (Print)

BLUM, K. et al. Dopamine D2 receptor gene variants: association and linkage studies in impulsive-addictive-compulsive behaviour. **Pharmacogenetics**, v. 5, n. 3, p. 121-41, Jun 1995. ISSN 0960-314X (Print)

BREITLING, R. et al. Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. **FEBS Lett**, v. 573, n. 1-3, p. 83-92, Aug 27 2004. ISSN 0014-5793 (Print)

BRITTON, D. R.; BRITTON, K. T. A sensitive open field measure of anxiolytic drug activity. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 15, n. 4, p. 577-82, Oct 1981. ISSN 0091-3057 (Print)

BROADBENT, J.; MUCCINO, K. J.; CUNNINGHAM, C. L. Ethanol-induced conditioned taste aversion in 15 inbred mouse strains. **Behav Neurosci**, v. 116, n. 1, p. 138-48, Feb 2002. ISSN 0735-7044 (Print)

CALU, D. J. et al. Withdrawal from cocaine self-administration produces long-lasting deficits in orbitofrontal-dependent reversal learning in rats. **Learn Mem**, v. 14, n. 5, p. 325-8, May 2007. ISSN 1549-5485 (Electronic)

CANNON, D. S.; LEEKA, J. K.; BLOCK, A. K. Ethanol self-administration patterns and taste aversion learning across inbred rat strains. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 47, n. 4, p. 795-802, Apr 1994. ISSN 0091-3057 (Print)

CARROLL, M. E.; MEISCH, R. A. Etonitazene as a reinforcer: oral intake of etonitazene by rhesus monkeys. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 59, n. 3, p. 225-9, Dec 8 1978. ISSN 0033-3158 (Print)

CARROLL, M. E.; MEISCH, R. A. Oral phencyclidine (PCP) self-administration in rhesus monkeys: effects of feeding conditions. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 214, n. 2, p. 339-46, Aug 1980. ISSN 0022-3565 (Print)

CHEN, C. C. et al. Interaction between the functional polymorphisms of the alcohol-metabolism genes in protection against alcoholism. **Am J Hum Genet**, v. 65, n. 3, p. 795-807, Sep 1999. ISSN 0002-9297 (Print)

CHIEN, Y. L. et al. DRD2 haplotype associated with negative symptoms and sustained attention deficits in Han Chinese with schizophrenia in Taiwan. **J Hum Genet**, v. 58, n. 4, p. 229-32, Apr 2013. ISSN 1435-232X (Electronic)

CIRNARU, M. D. et al. LRRK2 kinase activity regulates synaptic vesicle trafficking and neurotransmitter release through modulation of LRRK2 macro-molecular complex. **Front Mol Neurosci**, v. 7, p. 49, 2014. ISSN 1662-5099 (Electronic)

COOK, C. C.; GURLING, H. M. The D2 dopamine receptor gene and alcoholism: a genetic effect in the liability for alcoholism. **J R Soc Med**, v. 87, n. 7, p. 400-2, Jul 1994. ISSN 0141-0768 (Print)

CORREIA, D. et al. Trait anxiety and ethanol: anxiolysis in high-anxiety mice and no relation to intake behavior in an addiction model. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 5, p. 880-8, Aug 1 2009. ISSN 1878-4216 (Electronic)

CRABBE, J. C.; BELL, R. L.; EHLERS, C. L. Human and laboratory rodent low response to alcohol: is better consilience possible? **Addict Biol**, v. 15, n. 2, p. 125-44, Apr 2010. ISSN 1369-1600 (Electronic)

CRABBE, J. C.; PHILLIPS, T. J.; BELKNAP, J. K. The complexity of alcohol drinking: studies in rodent genetic models. **Behav Genet**, v. 40, n. 6, p. 737-50, Nov 2010. ISSN 1573-3297 (Electronic)

CRABBE, J. C. et al. Alcohol-related genes: contributions from studies with genetically engineered mice. **Addict Biol**, v. 11, n. 3-4, p. 195-269, Sep 2006. ISSN 1355-6215 (Print)

CUNNINGHAM, C. L.; FIDLER, T. L.; HILL, K. G. Animal models of alcohol's motivational effects. **Alcohol Res Health**, v. 24, n. 2, p. 85-92, 2000. ISSN 1535-7414 (Print)

CZACHOWSKI, C. L. et al. Separate measures of ethanol seeking and drinking in the rat: effects of remoxipride. **Alcohol**, v. 28, n. 1, p. 39-46, Aug 2002. ISSN 0741-8329 (Print)

DARCO, E. et al. Inhibition of striatal-enriched tyrosine phosphatase 61 in the dorsomedial striatum is sufficient to increased ethanol consumption. **J Neurochem**, v. 129, n. 6, p. 1024-34, Jun 2014. ISSN 1471-4159 (Electronic)

DEMA, A. et al. Pharmacological targeting of AKAP-directed compartmentalized cAMP signalling. **Cell Signal**, v. 27, n. 12, p. 2474-87, Dec 2015. ISSN 1873-3913 (Electronic)

DI CHIARA, G.; IMPERATO, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 14, p. 5274-8, Jul 1988. ISSN 0027-8424 (Print)

DI FONZO, A. et al. Comprehensive analysis of the LRRK2 gene in sixty families with Parkinson's disease. **Eur J Hum Genet**, v. 14, n. 3, p. 322-31, Mar 2006. ISSN 1018-4813 (Print)

EDENBERG, H. J. The genetics of alcohol metabolism: role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants. **Alcohol Res Health**, v. 30, n. 1, p. 5-13, 2007. ISSN 1535-7414 (Print)

EDENBERG, H. J. et al. Variations in GABRA2, encoding the alpha 2 subunit of the GABA(A) receptor, are associated with alcohol dependence and with brain oscillations. **Am J Hum Genet**, v. 74, n. 4, p. 705-14, Apr 2004. ISSN 0002-9297 (Print)

ENOCH, M. A. Genetic influences on response to alcohol and response to pharmacotherapies for alcoholism. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 123, p. 17-24, Aug 2014. ISSN 1873-5177 (Electronic)

ENOCH, M. A.; GOLDMAN, D. The genetics of alcoholism and alcohol abuse. **Curr Psychiatry Rep**, v. 3, n. 2, p. 144-51, Apr 2001. ISSN 1523-3812 (Print)

FACHIN-SCHEIT, D. J. et al. Development of a mouse model of ethanol addiction: naltrexone efficacy in reducing consumption but not craving. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 113, n. 9, p. 1305-21, Sep 2006. ISSN 0300-9564 (Print)

FARBER, P. D.; KHAVARI, K. A.; DOUGLASS, F. M. T. A factor analytic study of reasons for drinking: empirical validation of positive and negative reinforcement dimensions. **J Consult Clin Psychol**, v. 48, n. 6, p. 780-1, Dec 1980. ISSN 0022-006X (Print)

FIDLER, T. L. et al. Intragastric self-infusion of ethanol in high- and low-drinking mouse genotypes after passive ethanol exposure. **Genes Brain Behav**, v. 10, n. 3, p. 264-75, Apr 2011. ISSN 1601-183X (Electronic)

FRITZ, B. M. et al. Genetic relationship between predisposition for binge alcohol consumption and blunted sensitivity to adverse effects of alcohol in mice. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 38, n. 5, p. 1284-92, May 2014. ISSN 1530-0277 (Electronic)

FROEHLICH, J. C.; WAND, G. S. Adenylyl cyclase signal transduction and alcohol-induced sedation. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 58, n. 4, p. 1021-30, Dec 1997. ISSN 0091-3057 (Print)

GALDUROZ, J. C.; CAETANO, R. [Epidemiology of alcohol use in Brazil]. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 26 Suppl 1, p. S3-6, May 2004. ISSN 1516-4446 (Print)

GALTER, D. et al. LRRK2 expression linked to dopamine-innervated areas. **Ann Neurol**, v. 59, n. 4, p. 714-9, Apr 2006. ISSN 0364-5134 (Print)

GARRIDO, E. et al. The ANKK1 protein associated with addictions has nuclear and cytoplasmic localization and shows a differential response of Ala239Thr to apomorphine. **Neurotox Res**, v. 20, n. 1, p. 32-9, Jul 2011. ISSN 1476-3524 (Electronic)

GOLDMAN, D.; OROSZI, G.; DUCCI, F. The genetics of addictions: uncovering the genes. **Nat Rev Genet**, v. 6, n. 7, p. 521-32, Jul 2005. ISSN 1471-0056 (Print)

GONZALES, R. A.; JOB, M. O.; DOYON, W. M. The role of mesolimbic dopamine in the development and maintenance of ethanol reinforcement. **Pharmacol Ther**, v. 103, n. 2, p. 121-46, Aug 2004. ISSN 0163-7258 (Print)

GRAYBIEL, A. M.; MORATALLA, R.; ROBERTSON, H. A. Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 17, p. 6912-6, Sep 1990. ISSN 0027-8424 (Print)

GRIEBEL, G.; HOLMES, A. 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 12, n. 9, p. 667-87, Sep 2013. ISSN 1474-1784 (Electronic)

GRIFFIN, W. C., 3RD; LOPEZ, M. F.; BECKER, H. C. Intensity and duration of chronic ethanol exposure is critical for subsequent escalation of voluntary ethanol drinking in mice. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 33, n. 11, p. 1893-900, Nov 2009. ISSN 1530-0277 (Electronic)

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I Defaecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **J. comp. Psychol.** .v.18, p.385-403, 1934.

HAUGHEY, H. M. et al. Human gamma-aminobutyric acid A receptor alpha2 gene moderates the acute effects of alcohol and brain mRNA expression. **Genes Brain Behav**, v. 7, n. 4, p. 447-54, Jun 2008. ISSN 1601-183X (Electronic)

HEO, H. Y.; KIM, K. S.; SEOL, W. Coordinate Regulation of Neurite Outgrowth by LRRK2 and Its Interactor, Rab5. **Exp Neurobiol**, v. 19, n. 2, p. 97-105, Sep 2010. ISSN 2093-8144 (Electronic)

HINKLE, K. M. et al. LRRK2 knockout mice have an intact dopaminergic system but display alterations in exploratory and motor co-ordination behaviors. **Mol Neurodegener**, v. 7, p. 25, 2012. ISSN 1750-1326 (Electronic)

HURLEY, T. D.; EDENBERG, H. J. Genes encoding enzymes involved in ethanol metabolism. **Alcohol Res**, v. 34, n. 3, p. 339-44, 2012. ISSN 2168-3492 (Print)

HWA, L. S. et al. Persistent escalation of alcohol drinking in C57BL/6J mice with intermittent access to 20% ethanol. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 35, n. 11, p. 1938-47, Nov 2011. ISSN 1530-0277 (Electronic)

HWANG, B. H. et al. Corticotropin-releasing factor gene expression is down-regulated in the central nucleus of the amygdala of alcohol-preferring rats which exhibit high anxiety: a comparison between rat lines selectively bred for high and low alcohol preference. **Brain Res**, v. 1026, n. 1, p. 143-50, Nov 5 2004. ISSN 0006-8993 (Print)

HYMAN, S. E. Addiction: a disease of learning and memory. **Am J Psychiatry**, v. 162, n. 8, p. 1414-22, Aug 2005. ISSN 0002-953X (Print)

HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C.; NESTLER, E. J. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. **Annu Rev Neurosci**, v. 29, p. 565-98, 2006. ISSN 0147-006X (Print)

INPAD. II Levantamento nacional de álcool e drogas (LENAD). São Paulo: UNIFESP; 2012

IRIZARRY, R. A. et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. **Biostatistics**, v. 4, n. 2, p. 249-64, Apr 2003. ISSN 1465-4644 (Print)

KALIVAS, P. W.; VOLKOW, N. D. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. **Am J Psychiatry**, v. 162, n. 8, p. 1403-13, Aug 2005. ISSN 0002-953X (Print)

KELLEY, A. E.; BERRIDGE, K. C. The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. **J Neurosci**, v. 22, n. 9, p. 3306-11, May 1 2002. ISSN 1529-2401 (Electronic)

KHANNA, J. M. et al. Initial sensitivity versus acquired tolerance to ethanol in rats selectively bred for ethanol sensitivity. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 86, n. 3, p. 302-6, 1985. ISSN 0033-3158 (Print)

KIM, K. S. et al. The dorsal striatum expressing adenylyl cyclase-5 controls behavioral sensitivity of the righting reflex to high-dose ethanol. **Brain Res**, v. 1489, p. 27-36, Dec 13 2012. ISSN 1872-6240 (Electronic)

KIMURA, M. et al. Gender differences in the effects of ADH1B and ALDH2 polymorphisms on alcoholism. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 35, n. 11, p. 1923-7, Nov 2011. ISSN 1530-0277 (Electronic)

KLEIBER, M. L. et al. Neurodevelopmental alcohol exposure elicits long-term changes to gene expression that alter distinct molecular pathways dependent on timing of exposure. **J Neurodev Disord**, v. 5, n. 1, p. 6, 2013. ISSN 1866-1947 (Print)

KOHNKE, M. D. et al. DBH\*444G/A polymorphism of the dopamine-beta-hydroxylase gene is associated with alcoholism but not with severe alcohol withdrawal symptoms. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 113, n. 7, p. 869-76, Jul 2006. ISSN 0300-9564 (Print)

KOOB, G.; KREEK, M. J. Stress, dysregulation of drug reward pathways, and the transition to drug dependence. **Am J Psychiatry**, v. 164, n. 8, p. 1149-59, Aug 2007. ISSN 0002-953X (Print)

KOOB, G. F. Animal models of craving for ethanol. **Addiction**, v. 95 Suppl 2, p. S73-81, Aug 2000. ISSN 0965-2140 (Print)

KOOB, G.F. Brain stress systems in the amygdala and addiction. **Brain Res**, v. 1293, p. 61-75, Oct 13 2009. ISSN 1872-6240 (Electronic)

KOOB, G.F. The role of CRF and CRF-related peptides in the dark side of addiction. **Brain Res**, v. 1314, p. 3-14, Feb 16 2010. ISSN 1872-6240 (Electronic)

KOOB, G.F. Addiction is a Reward Deficit and Stress Surfeit Disorder. **Front Psychiatry**, v. 4, p. 72, 2013. ISSN 1664-0640 (Electronic)

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. **Science**, v. 278, n. 5335, p. 52-8, Oct 3 1997. ISSN 0036-8075 (Print)

KOOB, G.F.; LE MOAL, M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 2, p. 97-129, Feb 2001. ISSN 0893-133X (Print)

KOOB, G.F.; LE MOAL, M.. Plasticity of reward neurocircuitry and the 'dark side' of drug addiction. **Nat Neurosci**, v. 8, n. 11, p. 1442-4, Nov 2005. ISSN 1097-6256 (Print)

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurocircuitry of addiction. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 217-38, Jan 2010. ISSN 1740-634X (Electronic)

KORNETSKY, C.; ESPOSITO, R. U. Euphorigenic drugs: effects on the reward pathways of the brain. **Fed Proc**, v. 38, n. 11, p. 2473-6, Oct 1979. ISSN 0014-9446 (Print)

KURTZ, D. L. et al. Genetic differences in tolerance and sensitization to the sedative/hypnotic effects of alcohol. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 53, n. 3, p. 585-91, Mar 1996. ISSN 0091-3057 (Print)

LANAHAN, A.; WORLEY, P. Immediate-early genes and synaptic function. **Neurobiol Learn Mem**, v. 70, n. 1-2, p. 37-43, Jul-Sep 1998. ISSN 1074-7427 (Print)

LESSCHER, H. M.; VAN KERKHOFF, L. W.; VANDERSCHUREN, L. J. Inflexible and indifferent alcohol drinking in male mice. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 34, n. 7, p. 1219-25, Jul 2010. ISSN 1530-0277 (Electronic)

LEWIS, M. J. Alcohol reinforcement and neuropharmacological therapeutics. **Alcohol Alcohol Suppl**, v. 31, n. 1, p. 17-25, Mar 1996. ISSN 1358-6173 (Print)

LI, T. K. Clinical perspectives for the study of craving and relapse in animal models. **Addiction**, v. 95 Suppl 2, p. S55-60, Aug 2000. ISSN 0965-2140 (Print)

LIM, S. S. et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2224-60, Dec 15 2012. ISSN 1474-547X (Electronic)

LIND, P. A.; ERIKSSON, C. J.; WILHELMSSEN, K. C. The role of aldehyde dehydrogenase-1 (ALDH1A1) polymorphisms in harmful alcohol consumption in a Finnish population. **Hum Genomics**, v. 3, n. 1, p. 24-35, Sep 2008. ISSN 1479-7364 (Electronic)

LINNEBERG, A. et al. Genetic determinants of both ethanol and acetaldehyde metabolism influence alcohol hypersensitivity and drinking behaviour among Scandinavians. **Clin Exp Allergy**, v. 40, n. 1, p. 123-30, Jan 2010. ISSN 1365-2222 (Electronic)

LOPEZ, M. F.; BECKER, H. C. Operant ethanol self-administration in ethanol dependent mice. **Alcohol**, v. 48, n. 3, p. 295-9, May 2014. ISSN 1873-6823 (Electronic)

LUDWIG, A. M.; WIKLER, A. "Craving" and relapse to drink. **Q J Stud Alcohol**, v. 35, n. 1, p. 108-30, Mar 1974. ISSN 0033-5649 (Print)

MACLEOD, D. et al. The familial Parkinsonism gene LRRK2 regulates neurite process morphology. **Neuron**, v. 52, n. 4, p. 587-93, Nov 22 2006. ISSN 0896-6273 (Print)

MANGEAT, P.; ROY, C.; MARTIN, M. ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. **Trends Cell Biol**, v. 9, n. 5, p. 187-92, May 1999. ISSN 0962-8924 (Print)

MASSION, A. O.; WARSHAW, M. G.; KELLER, M. B. Quality of life and psychiatric morbidity in panic disorder and generalized anxiety disorder. **Am J Psychiatry**, v. 150, n. 4, p. 600-7, Apr 1993. ISSN 0002-953X (Print)

MCBRIDE, W. J. et al. Association between low contents of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens and high alcohol preference. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 19, n. 6, p. 1420-2, Dec 1995. ISSN 0145-6008 (Print)

MEISCH, R. A.; HENNINGFIELD, J. E. Drinking of ethanol by rhesus monkeys: experimental strategies for establishing ethanol as a reinforcer. **Adv Exp Med Biol**, v. 85B, p. 443-63, 1977. ISSN 0065-2598 (Print)

MEISCH, R. A.; HENNINGFIELD, J. E.; THOMPSON, T. Establishment of ethanol as a reinforcer for rhesus monkeys via the oral route: initial results. **Adv Exp Med Biol**, v. 59, p. 323-42, 1975. ISSN 0065-2598 (Print)

MEISCH, R. A.; THOMPSON, T. Ethanol intake during schedule-induced polydipsia. **Physiol Behav**, v. 8, n. 3, p. 471-5, Mar 1972. ISSN 0031-9384 (Print)

MELIS, M.; SPIGA, S.; DIANA, M. The dopamine hypothesis of drug addiction: hypodopaminergic state. **Int Rev Neurobiol**, v. 63, p. 101-54, 2005. ISSN 0074-7742 (Print)

MELONI, J. N.; LARANJEIRA, R. [The social and health burden of alcohol abuse]. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 26 Suppl 1, p. S7-10, May 2004. ISSN 1516-4446 (Print)

MELROSE, H. L. et al. A comparative analysis of leucine-rich repeat kinase 2 (Lrrk2) expression in mouse brain and Lewy body disease. **Neuroscience**, v. 147, n. 4, p. 1047-58, Jul 29 2007. ISSN 0306-4522 (Print)

MELROSE, H. L. et al. Parkinson's disease: a rethink of rodent models. **Exp Brain Res**, v. 173, n. 2, p. 196-204, Aug 2006. ISSN 0014-4819 (Print)

MIDDAUGH, L. D.; KELLEY, B. M. Operant ethanol reward in C57BL/6 mice: influence of gender and procedural variables. **Alcohol**, v. 17, n. 3, p. 185-94, Apr 1999. ISSN 0741-8329 (Print)

MOORE, J. A.; KAKIHANA, R. Ethanol-induced hypothermia in mice: influence of genotype on development of tolerance. **Life Sci**, v. 23, n. 23, p. 2331-7, Dec 4 1978. ISSN 0024-3205 (Print)

MOREAN, M. E.; CORBIN, W. R. Subjective response to alcohol: a critical review of the literature. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 34, n. 3, p. 385-95, Mar 1 2010. ISSN 1530-0277 (Electronic)

MULLIGAN, C. J. et al. Allelic variation at alcohol metabolism genes ( ADH1B, ADH1C, ALDH2) and alcohol dependence in an American Indian population. **Hum Genet**, v. 113, n. 4, p. 325-36, Sep 2003. ISSN 0340-6717 (Print)

NARAHASHI, T. et al. Neuroreceptors and ion channels as targets of alcohol. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 25, n. 5 Suppl ISBRA, p. 182S-188S, May 2001. ISSN 0145-6008 (Print)

NESTLER, E. J. Is there a common molecular pathway for addiction? **Nat Neurosci**, v. 8, n. 11, p. 1445-9, Nov 2005. ISSN 1097-6256 (Print)

NESTLER, E. J.; BARROT, M.; SELF, D. W. DeltaFosB: a sustained molecular switch for addiction. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 20, p. 11042-6, Sep 25 2001. ISSN 0027-8424 (Print)

NEWLIN, D. B.; THOMSON, J. B. Alcohol challenge with sons of alcoholics: a critical review and analysis. **Psychol Bull**, v. 108, n. 3, p. 383-402, Nov 1990. ISSN 0033-2909 (Print)

NIKANDER, P.; PEKKANEN, L. An inborn alcohol tolerance in alcohol-preferring rats. The lack of relationship between tolerance to ethanol and the brain microsomal (Na+K+) ATPase activity. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 51, n. 3, p. 219-23, Mar 16 1977. ISSN 0033-3158 (Print)

OLDS, J.; MILNER, P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. **J Comp Physiol Psychol**, v. 47, n. 6, p. 419-27, Dec 1954. ISSN 0021-9940 (Print)

OLIVEIRA, R. F.; KIM, M.; BLACKWELL, K. T. Subcellular location of PKA controls striatal plasticity: stochastic simulations in spiny dendrites. **PLoS Comput Biol**, v. 8, n. 2, p. e1002383, Feb 2012. ISSN 1553-7358 (Electronic)

PARISIADOU, L. et al. Phosphorylation of ezrin/radixin/moesin proteins by LRRK2 promotes the rearrangement of actin cytoskeleton in neuronal morphogenesis. **J Neurosci**, v. 29, n. 44, p. 13971-80, Nov 4 2009. ISSN 1529-2401 (Electronic)

PARISIADOU, L. et al. LRRK2 regulates synaptogenesis and dopamine receptor activation through modulation of PKA activity. **Nat Neurosci**, v. 17, n. 3, p. 367-76, Mar 2014. ISSN 1546-1726 (Electronic)

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 9, p. e45, May 1 2001. ISSN 1362-4962 (Electronic)

PHILIBIN, S. D. et al. Ethanol withdrawal-induced motor impairment in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 220, n. 2, p. 367-78, Mar 2012. ISSN 1432-2072 (Electronic)

PONCE, G. et al. DRD2 and ANKK1 genotype in alcohol-dependent patients with psychopathic traits: association and interaction study. **Br J Psychiatry**, v. 193, n. 2, p. 121-5, Aug 2008. ISSN 0007-1250 (Print)

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, Feb 28 2003. ISSN 0014-2999 (Print)

REX, A. et al. Pharmacological evaluation of a modified open-field test sensitive to anxiolytic drugs. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 59, n. 3, p. 677-83, Mar 1998. ISSN 0091-3057 (Print)

RIBEIRO, A. F. et al. A transcriptional study in mice with different ethanol-drinking profiles: possible involvement of the GABA(B) receptor. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 102, n. 2, p. 224-32, Aug 2012. ISSN 1873-5177 (Electronic)

RIBEIRO, A. F. et al. 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 (Vienna)**, v. 115, n. 1, p. 43-54, 2008. ISSN 0300-9564 (Print)

RICHARDSON, N. R.; ROBERTS, D. C. Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. **J Neurosci Methods**, v. 66, n. 1, p. 1-11, May 1996. ISSN 0165-0270 (Print)

RILEY, A. L. The paradox of drug taking: the role of the aversive effects of drugs. **Physiol Behav**, v. 103, n. 1, p. 69-78, Apr 18 2011. ISSN 1873-507X (Electronic)

ROBBINS, T. W.; EVERITT, B. J. Drug addiction: bad habits add up. **Nature**, v. 398, n. 6728, p. 567-70, Apr 15 1999. ISSN 0028-0836 (Print)

ROBERTS, A. J. et al. Excessive ethanol drinking following a history of dependence: animal model of allostasis. **Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 6, p. 581-94, Jun 2000. ISSN 0893-133X (Print)

RODD-HENRICKS, Z. A. et al. Regional heterogeneity for the intracranial self-administration of ethanol within the ventral tegmental area of female Wistar rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 149, n. 3, p. 217-24, Apr 2000. ISSN 0033-3158 (Print)

RODD, Z. A. et al. Comparison of intracranial self-administration of ethanol within the posterior ventral tegmental area between alcohol-preferring and Wistar rats. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 28, n. 8, p. 1212-9, Aug 2004. ISSN 0145-6008 (Print)

RODD, Z. A. et al. Intracranial self-administration of ethanol within the ventral tegmental area of male Wistar rats: evidence for involvement of dopamine neurons. **J Neurosci**, v. 24, n. 5, p. 1050-7, Feb 4 2004. ISSN 1529-2401 (Electronic)

RON, D.; JURD, R. The "ups and downs" of signaling cascades in addiction. **Sci STKE**, v. 2005, n. 309, p. re14, Nov 8 2005. ISSN 1525-8882 (Electronic)

RUSSO, S. J.; NESTLER, E. J. The brain reward circuitry in mood disorders. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 9, p. 609-25, Sep 2013. ISSN 1471-0048 (Electronic)

SAITO, M. et al. Mouse striatal transcriptome analysis: effects of oral self-administration of alcohol. **Alcohol**, v. 32, n. 3, p. 223-41, Apr 2004. ISSN 0741-8329 (Print)

SAVARESE, A. et al. Increased behavioral responses to ethanol in Lmo3 knockout mice. **Genes Brain Behav**, v. 13, n. 8, p. 777-83, Nov 2014. ISSN 1601-183X (Electronic)

SCHOENBAUM, G. Affect, action, and ambiguity and the amygdala-orbitofrontal circuit. Focus on "combined unilateral lesions of the amygdala and orbital prefrontal cortex impair affective processing in rhesus monkeys". **J Neurophysiol**, v. 91, n. 5, p. 1938-9, May 2004. ISSN 0022-3077 (Print)

SCHOENBAUM, G. et al. Cocaine-experienced rats exhibit learning deficits in a task sensitive to orbitofrontal cortex lesions. **Eur J Neurosci**, v. 19, n. 7, p. 1997-2002, Apr 2004. ISSN 0953-816X (Print)

SEIF, T. et al. Cortical activation of accumbens hyperpolarization-active NMDARs mediates aversion-resistant alcohol intake. **Nat Neurosci**, v. 16, n. 8, p. 1094-100, Aug 2013. ISSN 1546-1726 (Electronic)

SHIN, N. et al. LRRK2 regulates synaptic vesicle endocytosis. **Exp Cell Res**, v. 314, n. 10, p. 2055-65, Jun 10 2008. ISSN 1090-2422 (Electronic)

SIMMS, J. A. et al. Long-Evans rats acquire operant self-administration of 20% ethanol without sucrose fading. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 7, p. 1453-63, Jun 2010. ISSN 1740-634X (Electronic)

SIMON-SANCHEZ, J. et al. LRRK2 is expressed in areas affected by Parkinson's disease in the adult mouse brain. **Eur J Neurosci**, v. 23, n. 3, p. 659-66, Feb 2006. ISSN 0953-816X (Print)

SINGLETON, A. B.; FARRER, M. J.; BONIFATI, V. The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications. **Mov Disord**, v. 28, n. 1, p. 14-23, Jan 2013. ISSN 1531-8257 (Electronic)

SMAIL, P. et al. Alcohol dependence and phobic anxiety states. I. A prevalence study. **Br J Psychiatry**, v. 144, p. 53-7, Jan 1984. ISSN 0007-1250 (Print)

SOLOMON, R. L.; CORBIT, J. D. An opponent-process theory of motivation. I. Temporal dynamics of affect. **Psychol Rev**, v. 81, n. 2, p. 119-45, Mar 1974. ISSN 0033-295X (Print)

SOYKA, M. et al. GABA-A2 receptor subunit gene (GABRA2) polymorphisms and risk for alcohol dependence. **J Psychiatr Res**, v. 42, n. 3, p. 184-91, Feb 2008. ISSN 0022-3956 (Print)

SPANAGEL, R. Recent animal models of alcoholism. **Alcohol Res Health**, v. 24, n. 2, p. 124-31, 2000. ISSN 1535-7414 (Print)

STEWART, R. B. et al. Comparison of alcohol-preferring (P) and nonpreferring (NP) rats on tests of anxiety and for the anxiolytic effects of ethanol. **Alcohol**, v. 10, n. 1, p. 1-10, Jan-Feb 1993. ISSN 0741-8329 (Print)

Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA). 2011. Results from the 2010 National Survey on Drug Use and Health: Volume I. Summary of National Findings. Rockville, MD: Office of Applied Studies, **SAMHSA**.

TABAKOFF, B.; HOFFMAN, P. L. Animal models in alcohol research. **Alcohol Res Health**, v. 24, n. 2, p. 77-84, 2000. ISSN 1535-7414 (Print)

THOMASSON, H. R.; BEARD, J. D.; LI, T. K. ADH2 gene polymorphisms are determinants of alcohol pharmacokinetics. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 19, n. 6, p. 1494-9, Dec 1995. ISSN 0145-6008 (Print)

TOALSTON, J. E. et al. The reinforcing properties of ethanol are quantitatively enhanced in adulthood by peri-adolescent ethanol, but not saccharin, consumption in female alcohol-preferring (P) rats. **Alcohol**, v. 49, n. 5, p. 513-8, Aug 2015. ISSN 1873-6823 (Electronic)

TOBLER, P. N.; FIORILLO, C. D.; SCHULTZ, W. Adaptive coding of reward value by dopamine neurons. **Science**, v. 307, n. 5715, p. 1642-5, Mar 11 2005. ISSN 1095-9203 (Electronic)

TRUDELL, J. R. et al. Alcohol dependence: molecular and behavioral evidence. **Trends Pharmacol Sci**, v. 35, n. 7, p. 317-23, Jul 2014. ISSN 1873-3735 (Electronic)

UHART, M. et al. GABRA2 markers moderate the subjective effects of alcohol. **Addict Biol**, v. 18, n. 2, p. 357-69, Mar 2013. ISSN 1369-1600 (Electronic)

UNTERGASSER, A. et al. Primer3--new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. 15, p. e115, Aug 2012. ISSN 1362-4962 (Electronic)

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, Jun 18 2002. ISSN 1474-760X (Electronic)

VENGELIENE, V. et al. Neuropharmacology of alcohol addiction. **Br J Pharmacol**, v. 154, n. 2, p. 299-315, May 2008. ISSN 0007-1188 (Print)

WANG, K. S. et al. A meta-analysis of two genome-wide association studies identifies 3 new loci for alcohol dependence. **J Psychiatr Res**, v. 45, n. 11, p. 1419-25, Nov 2011. ISSN 1879-1379 (Electronic)

WEISS, F. et al. Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus accumbens: genetic and motivational determinants. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 267, n. 1, p. 250-8, Oct 1993. ISSN 0022-3565 (Print)

WICKENS, J. R. et al. Dopaminergic mechanisms in actions and habits. **J Neurosci**, v. 27, n. 31, p. 8181-3, Aug 1 2007. ISSN 1529-2401 (Electronic)

WIKLER, A. Mechanisms of action of drugs that modify personality function. **Am J Psychiatry**, v. 108, n. 8, p. 590-9, Feb 1952. ISSN 0002-953X (Print)

WISE, R. A. Voluntary ethanol intake in rats following exposure to ethanol on various schedules. **Psychopharmacologia**, v. 29, n. 3, p. 203-10, 1973. D

WOLFFGRAMM, J.; HEYNE, A. From controlled drug intake to loss of control: the irreversible development of drug addiction in the rat. **Behav Brain Res**, v. 70, n. 1, p. 77-94, Sep 1995. ISSN 0166-4328 (Print)

ZHANG, B.; KIROV, S.; SNODDY, J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. **Nucleic Acids Res**, v. 33, n. Web Server issue, p. W741-8, Jul 1 2005. ISSN 1362-4962 (Electronic)

ZHENG, Q.; WANG, X. J. GOEAST: a web-based software toolkit for Gene Ontology enrichment analysis. **Nucleic Acids Res**, v. 36, n. Web Server issue, p. W358-63, Jul 1 2008. ISSN 1362-4962 (Electronic)

ZIMATKIN, S. M. et al. Relationship of brain ethanol metabolism to the hypnotic effect of ethanol. I: Studies in outbred animals. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 25, n. 7, p. 976-81, Jul 2001. ISSN 0145-6008 (Print)

**APÊNDICE 1** - Tabela de iniciadores utilizados na validação quantitativa

<b>Gene</b>	<b>Sequência Forward (5'&gt;3')</b>	<b>Sequência Reverse (5'&gt;3')</b>
<i>Actg1</i>	TGTCCACCTTCCAGCAGATGT	GCCAGGGCAAATTGATACTTCA
<i>Cltc</i>	CACATTCCGCATCATTAGACC	GCAAATCAGGTTCTTCACAATAG
<i>Ezr</i>	CACATTCCGCATCATTAGACC	GCAAATCAGGTTCTTCACAATAG
<i>Mapt1</i>	CTCTCCAACCTCAGAGCCAATG	ACAACGCAAGCAATCTCAAAT
<i>Msn</i>	ATACCCTCGGGCAAACAAAT	AGGTTGAATGAGTGTGACAAAGAA
<i>Picalm</i>	CTCAGTCTCTCTGGGATGTAGGG	GCCAAGCACAAAGCAGTAAAG
<i>Snca</i>	AAATGTTGGAGGAGCAGTGG	TCCTTCTTGACAAAGCCAGTG
<i>Rdx</i>	CATGTCTGTCACCCATACGC	CAAATCAGAGCCCCACAGTT

## APÊNDICE 2 – Lista de genes diferencialmente regulados entre Grupo Leve e Grupo Inflexível

ID	Gene
1446090_at	RIKEN cDNA 6530409C15 gene
1456080_a_at	serine incorporator 3
1424959_at	annexin A13
1419093_at	tryptophan 2,3-dioxygenase
1452414_s_at	coiled-coil domain containing 86
1421683_at	predicted gene 3448
1428414_at	cyclin Y; similar to cyclin fold protein 1
1422564_at	actin-like 6B
1448018_at	arginine glutamic acid dipeptide (RE) repeats
1449979_a_at	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 3
1460235_at	scavenger receptor class B, member 2
1433847_at	family with sequence similarity 40, member B
1422609_at	cAMP-regulated phosphoprotein 19
1422608_at	cAMP-regulated phosphoprotein 19
1454784_at	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 2
1454906_at	retinoic acid receptor, beta
1459101_at	expressed sequence C78760
1431428_a_at	nitric oxide synthase interacting protein
1432394_a_at	apoptosis antagonizing transcription factor
1447668_x_at	epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2
1440931_at	scratch homolog 2, zinc finger protein (Drosophila)
1434025_at	Kruppel-like factor 5
1447949_at	predicted gene 3217
1447653_x_at	ribosomal protein L24; predicted gene 9385; predicted gene 7380
1451331_at	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1B
1441702_at	regulatory factor X, 3 (influences HLA class II expression)
1428698_at	dipeptidylpeptidase 8
1453093_at	RasGEF domain family, member 1C
1456312_x_at	gelsolin
1427038_at	preproenkephalin
1448250_at	RIKEN cDNA 9030425E11 gene
1452729_at	dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 3
1435991_at	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2
1443905_at	splicing factor, arginine/serine-rich 8
1454904_at	X-linked myotubular myopathy gene 1
1435984_at	zinc finger protein 40
1443620_at	glypican 4; similar to Glypican 4
1459537_at	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 2
1419975_at	sterol carrier protein 2, liver
1422513_at	cyclin F
1428986_at	solute carrier family 17
1455607_at	R-spondin 3 homolog (Xenopus laevis)

1441769_at	ADP-ribosylation factor-like 15
1442427_at	RIKEN cDNA 9630026M06 gene
1436733_at	RIKEN cDNA E130309F12 gene; predicted gene 12451
1439895_at	expressed sequence AU021025
1423920_at	non-SMC condensin I complex, subunit H
1443544_at	DNA segment, Chr 18, ERATO Doi 653, expressed
1417177_at	galactokinase 1
1436462_at	predicted gene 2007
1416769_s_at	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit B
1459483_at	family with sequence similarity 155, member A
1433413_at	neurexin I
1417714_x_at	hemoglobin alpha, adult chain 2; hemoglobin alpha, adult chain 1
1440990_at	kinesin family member 26B
1438249_at	ubiquitin specific peptidase 7
1436021_at	major facilitator superfamily domain containing 4
1437579_at	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 2
1457456_at	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 10
1417914_at	RAP2B, member of RAS oncogene family
1457605_at	ataxin 1
1445695_at	ataxin 1
1421955_a_at	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4
1425940_a_at	single-stranded DNA binding protein 3
1442609_at	RIKEN cDNA 9630025F12 gene; protein kinase C, epsilon
1449853_at	similar to Sideroflexin-2; sideroflexin 2
1430096_at	RIKEN cDNA 2900017F05 gene
1444687_at	complement component 1, q subcomponent-like 2
1420462_at	interleukin 1 receptor accessory protein-like 2
1450498_at	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase
1423484_at	RIKEN cDNA 4930533K18 gene
1428336_at	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 4
1416301_a_at	early B-cell factor 1
1427905_at	RIKEN cDNA 1810063B07 gene
1420720_at	hypothetical protein LOC100044234
1452730_at	predicted gene 6816; ribosomal protein S4, Y-linked 2
1448411_at	Wolfram syndrome 1 homolog (human)
1436780_at	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase
1438575_a_at	RIKEN cDNA 2900056M20 gene
1434297_at	RIKEN cDNA E130304F04 gene
1452106_at	nephronectin
1427079_at	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 3
1420926_at	similar to Arx homeoprotein
1420575_at	metallothionein 3
1429870_at	TRAF2 and NCK interacting kinase
1439660_at	hypothetical protein LOC100045240
1444671_at	RAS protein activator like 2
1423446_at	death-associated protein kinase 3

1440771_at	zinc finger with KRAB and SCAN domains 1
1431007_at	RIKEN cDNA 9030025P20 gene
1452922_at	protein phosphatase 1, regulatory subunit 3D
1434931_at	neogenin
1440020_at	rearranged L-myc fusion sequence
1441362_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, G
1416266_at	prodynorphin
1434048_at	RIKEN cDNA 4930471M23 gene
1435494_s_at	desmoplakin
1435493_at	desmoplakin
1443304_at	metallothionein-like 5, testis-specific (tesmin)
1445393_at	solute carrier family 24
1440014_at	phosphofurin acidic cluster sorting protein 1
1430252_at	RIKEN cDNA 3110027N22 gene
1424150_at	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 5
1437128_a_at	RIKEN cDNA A630033E08 gene
1425118_at	spire homolog 2 (Drosophila)
1453083_at	vomer nasal 2, receptor, pseudogene 44;
1450519_a_at	protein kinase, cAMP dependent, catalytic, alpha
1436532_at	doublecortin-like kinase 3
1423506_a_at	neuronatin
1418382_at	adenomatosis polyposis coli down-regulated 1
1454401_at	RIKEN cDNA 5730488B01 gene
1452246_at	osteoclast stimulating factor 1
1442695_at	RIKEN cDNA C030007I01 gene
1419179_at	thioredoxin-like 4A
1457188_at	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 11
1444422_at	protocadherin 19
1455701_at	sorting nexin 26
1453504_at	TAF15 RNA polymerase II
1428921_at	predicted gene 7102; RIKEN cDNA 2810021B07 gene
1421569_at	glutamate receptor, ionotropic, delta 1
1433600_at	adrenergic receptor, alpha 2a
1449676_at	predicted gene 5865; RAB2A, member RAS oncogene family
1419169_at	similar to Mitogen-activated protein kinase 6
1455215_at	RIKEN cDNA C530028O21 gene
1439569_at	G protein-coupled receptor 83
1423505_at	transgelin
1424606_at	complexin 3
1440302_at	similar to Solute carrier family 25, member 3
1440148_at	G protein-coupled receptor 6
1443250_at	regulator of G-protein signaling 2
1447830_s_at	regulator of G-protein signaling 2
1447705_at	NSL1, MIND kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)
1457557_at	RIKEN cDNA A330076H08 gene
1416357_a_at	melanoma cell adhesion molecule

1437478\_s\_at similar to EF hand domain containing 2; EF hand domain containing 2  
1442724\_at delta-like 1 homolog (Drosophila)  
1440147\_at leucine-rich repeat LGI family, member 2  
1428719\_at immunoglobulin lambda chain, constant region 2  
1451527\_at procollagen C-endopeptidase enhancer 2  
1415925\_a\_at nucleoporin 62  
1435391\_at proline rich 8  
1428513\_at calcium binding and coiled coil domain 1  
1454700\_at leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 4  
1415819\_a\_at protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), alpha isoform  
1449552\_at zinc finger RNA binding protein  
1423325\_at pinin  
1445786\_at Braf transforming gene  
1428010\_at translocase of inner mitochondrial membrane 9 homolog (yeast)  
1435514\_at leucine zipper transcription factor-like 1; predicted gene 6776  
1449383\_at adenylosuccinate synthetase like 1  
1436087\_at similar to Dipeptidylpeptidase 10  
1458383\_at isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial  
1429900\_at RIKEN cDNA 5330406M23 gene  
1445537\_at RIKEN cDNA 2310039F13 gene  
1431502\_a\_at exosome component 3  
1460034\_at sterile alpha motif domain containing 4B  
1420175\_at Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 1  
1448796\_s\_at transforming growth factor beta regulated gene 4  
1459289\_at RIKEN cDNA C530030K21 gene  
1433615\_at transmembrane protein 117  
1437183\_at leucine rich repeat containing 4B; similar to Leucine rich repeat containing 4B  
1436662\_at VPS10 domain receptor protein SORCS 1  
1426821\_at component of oligomeric golgi complex 8  
1450576\_a\_at splicing factor 3a, subunit 2  
1428642\_at solute carrier family 35, member D3  
1450903\_at RAD23b homolog (S. cerevisiae)  
1438165\_x\_at vesicle amine transport protein 1 homolog (T californica)  
1442126\_at PPPDE peptidase domain containing 1  
1458469\_at Casitas B-lineage lymphoma b  
1460147\_at RIKEN cDNA A730009E18 gene  
1453172\_at heat shock protein 70 family, member 13  
1460205\_at dephospho-CoA kinase domain containing  
1457449\_at LAG1 homolog, ceramide synthase 6  
1425493\_at bone morphogenetic protein receptor, type 1A  
1423560\_at NEL-like 2 (chicken)  
1433338\_at RIKEN cDNA 6720460K10 gene  
1455230\_at calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 4  
1441535\_at myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)  
1456685\_at neuron specific gene family member 2  
1436257\_at similar to Ss18 protein; synovial sarcoma translocation, Chromosome 18

1416612_at	cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1
1442570_at	zinc finger, MYM domain containing 1
1428052_a_at	zinc finger, MYM domain containing 1
1418738_at	sodium channel, voltage-gated, type I, beta
1427488_a_at	baculoviral IAP repeat-containing 6
1441090_at	nuclear mitotic apparatus protein 1
1443388_at	RIKEN cDNA 1300018I05 gene; ring finger protein 8
1423233_at	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta
1427481_a_at	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, alpha 3 polypeptide
1426027_a_at	Rho GTPase activating protein 10
1440347_at	Rho GTPase activating protein 10
1417215_at	RAB27b, member RAS oncogene family
1449110_at	ras homolog gene family, member B
1425281_a_at	TSC22 domain family, member 3
1441172_at	AF4/FMR2 family, member 3
1441187_at	RIKEN cDNA E330037M01 gene
1442145_at	ATPase type 13A3
1427343_at	RASD family, member 2
1427344_s_at	RASD family, member 2
1425315_at	dedicator of cytokinesis 7
1437018_at	paraneoplastic antigen MA2
1460476_s_at	family with sequence similarity 13, member C
1428343_at	REST corepressor 3
1426225_at	retinol binding protein 4, plasma
1430680_a_at	RIKEN cDNA 5830417I10 gene
1460011_at	cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1
1443147_at	acyl-CoA thioesterase 3
1416521_at	selenoprotein W, muscle 1
1421933_at	chromobox homolog 5 (Drosophila HP1a)
1427183_at	epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1
1457288_at	ankyrin 3, epithelial
1443430_at	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain
1440553_at	mitochondrial trans-2-enoyl-CoA reductase
1447477_at	RIKEN cDNA 3110006E14 gene
1431864_at	F-box protein 24
1459894_at	IQ motif containing GTPase activating protein 2
1423322_at	lin-7 homolog C (C. elegans)
1437828_s_at	WD repeat domain 46
1439650_at	reticulin 4
1438864_at	EFR3 homolog A (S. cerevisiae)
1416132_at	EFR3 homolog A (S. cerevisiae)
1431033_x_at	amylo-1,6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase
1421149_a_at	atrophin 1; predicted gene 608
1422637_at	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 5
1423747_a_at	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1
1422073_a_at	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 2 (flamingo homolog, Drosophila)

1454905_at	inhibitor of Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase
1423794_at	DNA segment, Chr 2, ERATO Doi 391, expressed
1458562_at	nuclear factor, erythroid derived 2,-like 1
1455484_at	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 3 (Hu antigen C)
1418581_a_at	LIM motif-containing protein kinase 2
1419742_at	RIKEN cDNA 1700037H04 gene
1435083_at	cortexin 1
1427523_at	sine oculis-related homeobox 3 homolog (Drosophila)
1440871_at	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 1
1434755_at	coronin, actin binding protein, 2B
1419725_at	solute carrier family 26, member 4
1421505_at	Mix1 homeobox-like 1 (Xenopus laevis)
1439630_x_at	suprabasin
1458512_at	transducin-like enhancer of split 3, homolog of Drosophila E(spl)
1416853_at	neurochondrin
1445217_at	RIKEN cDNA A730073F16 gene
1417440_at	similar to AT rich interactive domain 1A isoform a
1444355_at	ATPase, aminophospholipid transporter (APLT), class I, type 8A, member 1
1457888_at	similar to polycomb group ring finger 5; polycomb group ring finger 5
1456509_at	RIKEN cDNA 1110032F04 gene
1441634_at	netrin G1
1439479_at	lactase
1438245_at	nuclear factor I/B
1436981_a_at	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein
1419074_at	ChaC, cation transport regulator homolog 2 (E. coli)
1438852_x_at	minichromosome maintenance deficient 6
1423452_at	serine/threonine kinase 17b (apoptosis-inducing)
1452218_at	coiled-coil domain containing 117
1439178_at	adrenergic receptor kinase, beta 2
1455902_x_at	ras homolog gene family, member f
1431060_at	pellino 1
1419280_at	phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II, alpha
1438106_at	protocadherin beta 22
1424336_at	phosphopantothencycysteine decarboxylase
1436672_at	G protein-coupled receptor kinase 5
1422165_at	POU domain, class 3, transcription factor 4
1433586_at	RGM domain family, member B
1426417_at	Yip1 domain family, member 4
1439923_at	tubulin, gamma complex associated protein 5
AFFX-r2-Bs-phe-M_at	Sporulation initiation phosphotransferase B
1415935_at	SPARC related modular calcium binding 2
1421653_a_at	predicted gene 5353; immunoglobulin heavy chain (J558 family)
1429694_at	RIKEN cDNA 4930402H24 gene
1452463_x_at	predicted gene 10883
1424156_at	retinoblastoma-like 1 (p107)

1446892_at	leucine rich repeat containing 16A
1440573_at	predicted gene 2590
1415685_at	mitochondrial translational initiation factor 2
1427054_s_at	ABI gene family, member 3 (NESH) binding protein
1416714_at	interferon regulatory factor 8
1455942_at	lysine (K)-specific demethylase 2A
1459266_at	ARP3 actin-related protein 3 homolog (yeast)
1454596_at	RIKEN cDNA 2810489J07 gene
1443225_at	activin A receptor, type IC
1460511_at	plakophilin 2
1447519_x_at	TPX2, microtubule-associated protein homolog
1446991_at	similar to GCN1 general control of amino-acid synthesis 1-like 1
1455262_at	thrombospondin, type I, domain containing 4
1441212_at	family with sequence similarity 92, member A
1428118_at	leucine rich repeat and Ig domain containing 1
1423287_at	cerebellin 1 precursor protein; similar to precerebellin-1
1448110_at	sema domain, immunoglobulin domain (Ig)
1452427_s_at	protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 1
1459224_at	zinc finger, FYVE domain containing 21
1441843_s_at	RIKEN cDNA 5230400M03 gene
1454198_a_at	EF hand calcium binding domain 1
1426243_at	cystathionase (cystathionine gamma-lyase)
1426043_a_at	calpain 3
1456296_at	similar to KIAA1731 protein; RIKEN cDNA 5830418K08 gene
1422769_at	synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein
1434169_at	RIKEN cDNA 9030409G11 gene
1436305_at	ring finger protein 217
1443516_at	ataxin 2
1430089_at	RIKEN cDNA 5830469G19 gene
1457832_at	predicted gene 5909; zinc finger CCCH-type containing 15
1418062_at	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2
1446157_at	retinaldehyde binding protein 1-like 2
1427669_a_at	citron
1452731_x_at	hypothetical LOC100036568
1428301_at	hypothetical LOC100036568
1425684_at	RIKEN cDNA 2310005E10 gene
1421267_a_at	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2
1446036_at	expressed sequence AU018728
1435993_at	predicted gene 11272
1438664_at	protein kinase, cAMP dependent regulatory, type II beta
1424179_at	pleckstrin homology domain containing, family J member 1
1434921_at	nuclear receptor subfamily 2, group E, member 1
1436084_at	scratch homolog 1, zinc finger protein (Drosophila)
1438338_at	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)
1416779_at	serum deprivation response
1449526_a_at	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 3

1455574_at	Smg-7 homolog, nonsense mediated mRNA decay factor ( <i>C. elegans</i> )
1446265_at	dynamain 3
1451428_x_at	EGF-like domain 7
1434912_at	resistance to inhibitors of cholinesterase 3 homolog ( <i>C. elegans</i> )
1442992_at	hypothetical LOC403343
1456498_at	integrin alpha 4
1427754_a_at	dynamain 1
1424305_at	immunoglobulin joining chain
1419682_a_at	RIKEN cDNA 2810408M09 gene
1433199_at	RIKEN cDNA B230114A03 gene
1419130_at	adenosine deaminase, tRNA-specific 2, TAD2 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
1429509_at	LSM12 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
1424631_a_at	immunoglobulin heavy chain 3 (serum IgG2b)
1419916_at	ring finger protein 20
1457458_at	zinc finger CCCH-type containing 4
1457759_at	RIKEN cDNA A630081D01 gene
1457802_at	RIKEN cDNA B930012P20 gene
1436737_a_at	sorbin and SH3 domain containing 1
1441137_at	bicaudal C homolog 1 ( <i>Drosophila</i> )
1453473_a_at	predicted gene, ENSMUSG00000056252; dynein light chain Tctex-type 1D;
1431946_a_at	N-terminal EF-hand calcium binding protein 3
1457343_at	adaptor-related protein complex AP-4, sigma 1
1439940_at	RIKEN cDNA 2900019G14 gene
1427214_at	agmatine ureohydrolase (agmatinase)
1424953_at	cDNA sequence BC021614
1436937_at	RNA binding motif, single stranded interacting protein
1429523_a_at	solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 5
1434585_at	similar to mKIAA1397 protein; tubby like protein 4
1440404_at	similar to mKIAA1397 protein; tubby like protein 4
1420491_at	similar to Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1
1453429_at	predicted gene, EG665756
1427099_at	MYC-associated zinc finger protein (purine-binding transcription factor)
1459488_at	zinc finger CCCH type containing 13
1430568_at	zinc finger CCCH type containing 13
1415798_at	discoidin domain receptor family, member 1
1442754_at	RIKEN cDNA C030013G03 gene
1420037_at	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1
1420641_a_at	sulfide quinone reductase-like (yeast)
1433577_at	RIKEN cDNA A730017C20 gene
1419757_at	phosphatidylinositol transfer protein, membrane-associated 2
1423557_at	interferon gamma receptor 2
1439041_at	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 10
1424956_at	AT hook, DNA binding motif, containing 1
1446159_at	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 7
1447195_at	elongation protein 4 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
1428462_at	protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), epsilon isoform

1425522_at	RNA binding motif protein 25
1447279_at	RIKEN cDNA E130308A19 gene
1454014_a_at	McKusick-Kaufman syndrome protein
1457366_at	cell division cycle 40 homolog (yeast)
1442667_at	cell division cycle 40 homolog (yeast)
1449875_s_at	histocompatibility 2, T region locus 9;
1458033_at	ubiquitin protein ligase E3 component n-recogin 1
1446461_at	SRY-box containing gene 5
1444046_at	RIKEN cDNA D430041B17 gene
1442437_at	PTK2 protein tyrosine kinase 2 beta
1435473_at	predicted gene 347
1436251_at	phosphodiesterase 1C
1452279_at	complement factor properdin
1421173_at	interferon regulatory factor 4
1439120_at	family with sequence similarity 120, member A
1415824_at	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2
1457021_x_at	anti-Mullerian hormone type 2 receptor
1425927_a_at	activating transcription factor 5
1458292_at	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 1
1453956_a_at	PFTAIRE protein kinase 1
1424105_a_at	pituitary tumor-transforming gene 1
1438390_s_at	pituitary tumor-transforming gene 1
1441396_at	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 1
1418228_at	NFU1 iron-sulfur cluster scaffold homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
1416856_at	RIKEN cDNA 3230401D17 gene
1443954_at	RAD18 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
1448754_at	retinol binding protein 1, cellular
1439664_at	WD repeat domain 68
1418876_at	forkhead box D1
1431367_at	membrane-associated ring finger (C3HC4) 1
1451507_at	myocyte enhancer factor 2C
1456108_x_at	ring finger protein 112
1439300_at	cysteine-rich hydrophobic domain 1
1443694_at	regulator of G-protein signaling 20
1417326_a_at	anaphase promoting complex subunit 11
1429184_at	predicted gene 4070
1436459_at	G protein-coupled receptor 161
1438037_at	hect domain and RLD 5
1444639_at	nephronophthisis 4 (juvenile) homolog (human)
1451484_a_at	synapsin I
1446304_at	leucine rich repeat containing 8D
1420411_a_at	phosphatidylinositol 4-kinase type 2 beta
1429555_at	claudin domain containing 1
1450260_at	gastrin releasing peptide receptor
1421124_at	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)
1456544_at	transmembrane protein 38B

1421301_at	zinc finger protein of the cerebellum 2
1429215_at	RIKEN cDNA 2310058N22 gene
1441756_at	transcription factor 7-like 2, T-cell specific, HMG-box
1455298_at	inhibitor of DNA binding 4
1419442_at	matrilin 2
1441312_at	cyclin M1
1416240_at	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 7
1436222_at	growth arrest specific 5
1423119_at	similar to Unknown (protein for MGC:117841)
1416783_at	tachykinin 1
1420969_at	nucleus accumbens associated 1, BEN and BTB (POZ) domain containing
1442109_at	far upstream element (FUSE) binding protein 1
1448590_at	collagen, type VI, alpha 1
1450568_at	galanin receptor 1
1422168_a_at	brain derived neurotrophic factor
1422885_at	small nuclear ribonucleoprotein D3
1430062_at	hedgehog interacting protein-like 1
1438326_at	tRNA methyltransferase 6 homolog (S. cerevisiae)
1423967_at	paralemmin
1449621_s_at	thrombospondin, type I, domain 1
1445178_at	SH3 domain containing ring finger 1
1433517_at	myeloma overexpressed 2
1431394_a_at	leucine-rich repeat kinase 2
1444806_at	RIKEN cDNA 6720456B07 gene
1436236_x_at	coactosin-like 1 (Dictyostelium)
1420328_at	RAB15 effector protein
1439097_at	DNA segment, Chr 10, Wayne State University 52, expressed
1422437_at	collagen, type V, alpha 2
1457555_at	G protein-coupled receptor 151
1435959_at	Rho GTPase activating protein 15
1455707_at	RAN binding protein 3-like
1445356_at	similar to glucocorticoid induced transcript 1
1418836_at	quinolinate phosphoribosyltransferase
1448550_at	lipopolysaccharide binding protein
1450405_at	mitochondrial ribosomal protein L19
1436387_at	RIKEN cDNA C330006P03 gene
1433266_at	RIKEN cDNA 2810416A17 gene
1434791_at	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit A2
1441558_at	RIKEN cDNA D230044B12 gene
1452935_at	predicted gene 5918
1426259_at	pantothenate kinase 3
1438355_at	transmembrane protein 90a
1431248_at	RIKEN cDNA 5031426D15 gene
1425176_at	C1q-like 3
1428377_at	BTB (POZ) domain containing 11
1423140_at	lysosomal acid lipase A

1439665_at	lysophosphatidic acid receptor 4
1424553_at	hedgehog acyltransferase-like
1427470_s_at	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment protein beta
1424433_at	methionine sulfoxide reductase B2
1452955_at	general transcription factor IIH, polypeptide 5
1460099_at	ATPase, class II, type 9B
1431182_at	similar to heat shock protein 8; heat shock protein 8
1424208_at	prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)
1421193_a_at	similar to PBX3a; pre B-cell leukemia transcription factor 3
1420367_at	density-regulated protein
1421036_at	neuronal PAS domain protein 2
1421962_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 5
1417625_s_at	chemokine (C-X-C motif) receptor 7
1452714_at	tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil containing 1
1444433_at	AU RNA binding protein/enoyl-coenzyme A hydratase
1435657_at	stonin 2
1425680_a_at	beta-transducin repeat containing protein
1417708_at	synaptotagmin III
1437539_at	protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit
1451147_x_at	cold shock domain containing C2, RNA binding
1433258_at	RIKEN cDNA A330102K18 gene
1436902_x_at	predicted gene 3787
1458285_at	glutamate receptor, ionotropic, AMPA1 (alpha 1)
1453028_at	PWWP domain containing 2A
1450227_at	ankyrin repeat domain 6
1440901_at	diacylglycerol kinase, beta
1439892_at	BR serine/threonine kinase 1
1421535_a_at	phosphodiesterase 4A, cAMP specific
1459328_at	DIS3 mitotic control homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )-like 2
1420419_a_at	otoferlin
1430791_at	RIKEN cDNA 6330415B21 gene
1420184_at	loricrin
1437142_a_at	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class O
1422473_at	phosphodiesterase 4B, cAMP specific
1453524_at	kinesin family member 5B
1441979_at	cDNA sequence BC060267
1434531_at	mannoside acetylglucosaminyltransferase 5, isoenzyme B
1439094_at	clathrin, heavy polypeptide (Hc)
1442111_at	RIKEN cDNA D430033H22 gene
1422705_at	prostate transmembrane protein, androgen induced 1
1449602_at	kelch-like 5 ( <i>Drosophila</i> )
1452632_at	AP2 associated kinase 1
1423331_a_at	similar to cell adhesion molecule nectin-3 beta
1426263_at	cell adhesion molecule 4
1441728_at	sodium channel, voltage-gated, type I, alpha
1430646_at	RIKEN cDNA 5830407P18 gene

1441867_x_at	RIKEN cDNA 4930534B04 gene
1442740_at	PR domain containing 5
1437355_at	zinc finger, CCHC domain containing 5
1440779_s_at	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 9
1418726_a_at	troponin T2, cardiac
1428909_at	RIKEN cDNA A130040M12 gene
1435790_at	olfactomedin 2
1438908_at	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 12
1455610_at	synemin, intermediate filament protein
1425991_a_at	KN motif and ankyrin repeat domains 2
1427455_x_at	immunoglobulin kappa chain variable 21 (V21)-1;
1426493_a_at	kinesin family member C2
1457235_at	low density lipoprotein-related protein 1B (deleted in tumors)
1434040_at	amyloid beta precursor protein (cytoplasmic tail) binding protein 2
1451884_a_at	LSM2 homolog, U6 small nuclear RNA associated ( <i>S. cerevisiae</i> )
1417194_at	superoxide dismutase 2, mitochondrial
1445555_at	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 3
1459909_at	nuclear factor I/X
1438700_at	formin binding protein 4
1442587_at	neuron-glia-CAM-related cell adhesion molecule
1423962_at	WD repeat domain 26
1458438_at	coiled-coil domain containing 122
1429715_at	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), alpha isoform
1441467_at	tetraspanin 5
1424178_at	transmembrane protein 38A
1440331_at	3-ketodihydrosphingosine reductase
1424857_a_at	similar to tripartite motif protein TRIM34 alpha
1418784_at	glutamate receptor, ionotropic, kainate 5 (gamma 2)
1441094_at	alcohol dehydrogenase 6B (class V)
1458235_at	F-box and leucine-rich repeat protein 17
1415818_at	annexin A6
1419608_a_at	melanoma inhibitory activity 1
AFFX-r2-Ec-bioB-M_at	Biotin synthase
1444645_at	SERTA domain containing 2
1436341_at	homeobox containing 1
1418950_at	dopamine receptor 2
1428781_at	dermokine
1433416_at	regulatory factor X, 2 (influences HLA class II expression)
1450308_a_at	5'-3' exoribonuclease 1
1426655_a_at	family with sequence similarity 63, member A
1426596_a_at	survival motor neuron 1
1419940_at	RIKEN cDNA C030018P15 gene
1440642_at	RIKEN cDNA D630042P16 gene
1438818_at	NMD3 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
1420619_a_at	amino-terminal enhancer of split

1440046_at	cDNA sequence BC031748
1455182_at	kinesin family member 1B
1449418_s_at	F-box protein 36
1435889_at	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2
1439083_at	Abelson helper integration site 1
1460364_at	predicted gene 3864
1444488_at	Ca <sup>2+</sup> -dependent secretion activator
1458318_at	RIKEN cDNA 3110047M12 gene
1429783_at	PDZ and LIM domain 5
1428695_at	short chain dehydrogenase/reductase family 39U, member 1
1442393_at	zinc finger E-box binding homeobox 2
1427987_at	scaffold attachment factor B2
1451794_at	transmembrane and coiled coil domains 3
1422615_at	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4
1437372_at	cleavage and polyadenylation specific factor 6
1435026_at	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 2
1434045_at	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
1416118_at	similar to mouse RING finger 1; tripartite motif-containing 59
1418805_at	secretin
1418104_at	nuclear receptor interacting protein 3
1434917_at	cordon-bleu
1458328_x_at	SH3-domain GRB2-like (endophilin) interacting protein 1
1418304_at	protocadherin 21
1437342_x_at	pituitary tumor-transforming 1 interacting protein
1428449_at	general transcription factor IIIC, polypeptide 2, beta
1447870_x_at	RIKEN cDNA 1110002E22 gene
1432432_a_at	similar to RAB3C, member RAS oncogene family
1419722_at	kallikrein related-peptidase 8
1429148_at	nuclear factor I/C
1429166_s_at	calmin
1434183_at	similar to sterile alpha motif domain containing 1
1434421_at	immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat 2
1438824_at	solute carrier family 20, member 1
1425136_x_at	dynammin 2
1423087_a_at	translocase of outer mitochondrial membrane 6 homolog (yeast)
1444890_at	myosin phosphatase Rho interacting protein;
1455638_at	zinc finger protein 319
1430969_at	mitochondrial carrier homolog 2 (C. elegans)
1422041_at	paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta 1
1418865_at	zinc finger protein 385A
1435162_at	protein kinase, cGMP-dependent, type II
1458150_at	autophagy/beclin 1 regulator 1
1420534_at	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3
1436381_at	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 3
1458772_at	latrophilin 3
1426921_at	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1

1450700_at	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3
AFFX-r2-Bs-dap-5_at	Bifunctional protein birA
1437794_at	calcineurin binding protein 1
1446235_at	cDNA sequence BC002199; hypothetical protein LOC100047363
1440604_at	Riken cDNA 8030494B02 gene
1450723_at	ISL1 transcription factor, LIM/homeodomain
1442341_at	kalirin, RhoGEF kinase
1453424_at	FYVE and coiled-coil domain containing 1
1458043_at	BTB (POZ) domain containing 9
1441679_at	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit
1428799_at	Leber congenital amaurosis 5 (human)
1421112_at	NK2 transcription factor related, locus 2 (Drosophila)
1430302_at	cannabinoid receptor interacting protein 1
1418450_at	immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat
1424526_a_at	TDP-glucose 4,6-dehydratase
1420876_a_at	septin 6
1419313_at	similar to cyclin T1
1437403_at	sterile alpha motif domain containing 5
1443536_at	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 11
1416808_at	similar to Nidogen precursor (Entactin); nidogen 1; similar to Nid1 protein
1446595_at	intersectin 2
1446164_at	predicted gene 5117; trimethylguanosine synthase homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
1418078_at	proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, 3
1438415_s_at	Yip1 domain family, member 2
1423853_at	RIKEN cDNA 6330527O06 gene
1452378_at	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)
1430043_at	tetratricopeptide repeat domain 19
1444506_at	translocating chain-associating membrane protein 1
1457656_s_at	RIKEN cDNA C230085N15 gene
1442077_at	RIKEN cDNA 2310076G05 gene
1432096_at	small nuclear ribonucleoprotein N
1417826_at	aldo-keto reductase family 1, member E1
1451568_at	family with sequence similarity 116, member A
1449319_at	R-spondin homolog ( <i>Xenopus laevis</i> )
1449368_at	decorin
1425974_a_at	tripartite motif-containing 25
1417680_at	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 5
1449431_at	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6
1416134_at	amyloid beta (A4) precursor-like protein 1
1427600_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19
1456091_at	SEC22 vesicle trafficking protein homolog C ( <i>S. cerevisiae</i> )
1447929_at	slingshot homolog 3 ( <i>Drosophila</i> )
1449863_a_at	distal-less homeobox 5
1420342_at	ganglioside-induced differentiation-associated-protein 10
1449773_s_at	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta

1430573_s_at	ethanol decreased 2
1459749_s_at	FAT tumor suppressor homolog 4 (Drosophila)
1421923_at	SH3-domain binding protein 5 (BTK-associated)
1448780_at	similar to solute carrier family 12, member 2; solute carrier family 12, member 2
1458112_at	adenosine deaminase, RNA-specific, B2
1427931_s_at	pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase
1455170_at	RIKEN cDNA 2810001G20 gene
1426534_a_at	similar to ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 3
1426508_at	glial fibrillary acidic protein
1439656_at	platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, subunit 1
1460650_at	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal V0 subunit A1
1417632_at	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal V0 subunit A1
1442903_at	RIKEN cDNA 4732423E21 gene
1435802_at	zinc finger and BTB domain containing 45
1426680_at	selenoprotein N, 1
1445037_at	RIKEN cDNA 6430510B20 gene
1442645_at	ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, plasma membrane 3
1444406_at	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 3
1442707_at	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha
1419616_at	bone morphogenic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)
1451610_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 17
1422010_at	toll-like receptor 7
1427013_at	carbonic anhydrase 9
1423271_at	gap junction protein, beta 2
1423495_at	2-4-dienoyl-Coenzyme A reductase 2, peroxisomal
1438871_at	Son DNA binding protein
1432901_at	enhancer trap locus 4
1457426_at	RIKEN cDNA 1700048O20 gene
1444763_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, K
1437776_at	transmembrane and coiled coil domains 1
1457926_at	arginyl aminopeptidase (aminopeptidase B)-like 1
1459107_at	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 3
1426980_s_at	RIKEN cDNA E130012A19 gene
1417341_a_at	predicted gene 5490; protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2;
1455049_at	immunoglobulin superfamily, member 3
1417956_at	cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A
1456369_at	protection of telomeres 1A
1416113_at	FK506 binding protein 8
1428879_at	phosphatidylinositol transfer protein, cytoplasmic 1
1445534_at	filamin, beta
1435950_at	hairless
1418279_a_at	A kinase (PRKA) anchor protein 1
1457936_at	mitogen-activated protein kinase 8
1446014_at	mitogen-activated protein kinase 8
1434118_at	mitochondrial ubiquitin ligase activator of NFKB 1
1454685_at	G protein-coupled receptor 146

1443018_at	neural cell adhesion molecule 1
1431412_at	RIKEN cDNA 2810455B08 gene
1422556_at	guanine nucleotide binding protein, alpha 13
1419137_at	SH3/ankyrin domain gene 3
1448860_at	rad and gem related GTP binding protein 2
1426667_a_at	unc-84 homolog A (C. elegans)
1452954_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2C; predicted gene 8956
1455680_at	RIKEN cDNA 9630025H16 gene
1439465_x_at	ATP/GTP binding protein-like 5
1459157_at	storkhead box 2
1457092_at	family with sequence similarity 19, member A1
1425545_x_at	histocompatibility 2, D region; histocompatibility 2, D region locus 1
1433659_at	tubulin, gamma complex associated protein 4
1443160_at	SET binding factor 2
1446181_at	expressed sequence C85699
1455463_at	phytanoyl-CoA hydroxylase interacting protein
1455512_at	predicted gene 879
1423145_a_at	titin-cap
1450631_x_at	defensin, alpha, 15;
1418350_at	heparin-binding EGF-like growth factor
1433485_x_at	G protein-coupled receptor 56
1458809_at	tumor suppressor candidate 3
1417607_at	cytochrome c oxidase, subunit VI a, polypeptide 2
1440807_at	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 2
1455310_at	RNA binding motif protein 16
1452677_at	similar to polynucleotide phosphorylase-like protein
1457758_at	enhancer of yellow 2 homolog (Drosophila); predicted gene 16373
1456881_at	neurobeachin-like 2
1445727_at	ubiquitin protein ligase E3A
1453428_at	RIKEN cDNA 2700045P11 gene
1458359_at	phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 2
1435182_at	coiled-coil domain containing 61
1434248_at	protein kinase C, eta
1442149_at	TBC1 domain family, member 16
1442320_at	hypothetical LOC553096
1439073_at	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)
1420982_at	RNA binding motif protein 39
1455663_at	olfactomedin-like 1
1443625_at	N-acetyltransferase 11
1438816_at	AT hook containing transcription factor 1
1455714_at	similar to orthologue of H. sapiens chromosome 21 open reading frame 102
1433758_at	nischarin
1449705_x_at	similar to DNA replication licensing factor MCM3
1431228_s_at	RIKEN cDNA 4930526I15 gene
1437935_at	RIKEN cDNA 4930486G11 gene
1422526_at	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1

1457712_at	chromodomain helicase DNA binding protein 8
1433652_at	immunoglobulin superfamily, member 1
1444199_at	ELK4, member of ETS oncogene family
1454814_s_at	mirror-image polydactyly gene 1 homolog (human)
1443037_at	neuroplastin
1447426_at	adaptor protein, phosphotyrosine interaction
1459098_at	dystonin; hypothetical protein LOC100047109
1431703_at	RIKEN cDNA 2900027M19 gene
1435682_at	leucyl-tRNA synthetase, mitochondrial
1427159_at	cleavage and polyadenylation factor subunit homolog (S. cerevisiae)
1439194_at	RIKEN cDNA C030048H21 gene
1444109_at	RIKEN cDNA C130009A20 gene
1420092_at	microrchidia 3
1460724_at	adaptor protein complex AP-2, alpha 1 subunit
1437120_at	sorting nexin family member 30
1434070_at	jagged 1
1434032_at	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 3
1451561_at	proline rich 12
1446279_at	neuronal growth regulator 1
1423619_at	RAS, dexamethasone-induced 1
1457636_x_at	transmembrane protein 209
1436648_at	similar to Nanos1-pending protein; nanos homolog 1 (Drosophila)
1425648_at	tripartite motif-containing 60
1427039_at	epsin 1
1448797_at	ELK3, member of ETS oncogene family
1451478_at	angiopoietin-like 7
1456774_at	similar to NFkB interacting protein 1
1447500_at	cut-like homeobox 2
1449173_at	membrane protein, palmitoylated 2
1438391_x_at	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10
1452826_s_at	F-box and leucine-rich repeat protein 20
1416239_at	argininosuccinate synthetase 1
1449859_at	golgi transport 1 homolog B (S. cerevisiae)
1456851_at	forkhead box P1
1460106_at	hydrocephalus inducing
1436082_at	solute carrier family 24, member 5
1453457_at	sorcin
1429589_at	glutamic acid decarboxylase 2
1457628_at	coiled-coil domain containing 53
1456864_at	cDNA sequence BC002059
1438095_x_at	nucleolar complex associated 4 homolog (S. cerevisiae)
1454532_at	RIKEN cDNA C030043A13 gene
1443287_at	predicted gene 1337
1453807_at	RIKEN cDNA 6330563C09 gene
1449381_a_at	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1
1436032_at	cell division cycle and apoptosis regulator 1

1446364_at	predicted gene 13416
1418260_at	similar to putative serine/threonine protein kinase MAK-V
1432472_a_at	methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase 2 (beta)
1459679_s_at	myosin IB
1458920_at	syntaxin 6
1455190_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 7
1419469_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 4
1433837_at	RIKEN cDNA 8430408G22 gene
1452911_at	sprouty protein with EVH-1 domain 1, related sequence
1439673_at	RIKEN cDNA E230008O15 gene
1423859_a_at	prostaglandin D2 synthase (brain)
1439926_at	HEG homolog 1 (zebrafish)
1447939_a_at	predicted gene 2172
1447937_a_at	predicted gene 2172
1431893_a_at	prenyl (solanesyl) diphosphate synthase, subunit 1
1454404_at	RIKEN cDNA 2610011E03 gene
1427982_s_at	synaptic nuclear envelope 2
1417986_at	Notch-regulated ankyrin repeat protein
1421255_a_at	calcium binding protein 1
1442752_at	opioid binding protein/cell adhesion molecule-like
1441768_at	RIKEN cDNA 9430051O21 gene
1423221_at	tubulin, beta 4
1452754_at	cysteine-rich with EGF-like domains 2
1444564_at	similar to apolipoprotein D
1445866_at	microtubule associated serine/threonine kinase family member 4
1445434_at	snurportin 1
1440437_at	hect (homologous to the E6-AP (UBE3A) carboxyl terminus) domain
1428524_at	cysteinyl-tRNA synthetase 2 (mitochondrial)(putative)
1435417_at	expressed sequence AI464131
1429702_at	RIKEN cDNA 2900072G11 gene
1451531_at	COBW domain containing 1
1420901_a_at	hexokinase 1
1446417_at	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 6a
1444147_at	proprotein convertase subtilisin/kexin type 2
1434784_s_at	transmembrane protein 106C
1453841_at	RIKEN cDNA 2310050P20 gene
1419310_s_at	regulatory factor X-associated ankyrin-containing protein
1418141_at	doublecortin
1456712_at	ligand dependent nuclear receptor corepressor-like
1417963_at	phospholipid transfer protein
1445781_at	SH3 domain protein D19
1445881_at	RIKEN cDNA 2310035P21 gene
1423916_s_at	similar to Myeloid leukemia factor 2; myeloid leukemia factor 2
1453752_at	predicted gene 8081;
1439350_s_at	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class U
1445638_at	Meis homeobox 2

1447861_x_at	Meis homeobox 2
1457632_s_at	Meis homeobox 2
1455923_at	potassium channel tetramerisation domain containing 8
1443296_at	PCTAIRE-motif protein kinase 1
1456429_at	mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1
1447360_at	TSC22 domain family, member 1
1439111_at	TSC22 domain family, member 1
1441243_at	zinc finger protein 532
1428066_at	coiled-coil domain containing 120
1434277_a_at	yippee-like 2 (Drosophila)
1442051_at	histone cluster 2, H3b; histone cluster 1
1448913_at	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin
1419066_at	immediate early response 5-like
1456084_x_at	fibromodulin
1437685_x_at	fibromodulin
1444992_at	expressed sequence AI120166
1439412_at	cyclic AMP-regulated phosphoprotein, 21
1435868_at	ankyrin repeat domain 13c
1454799_at	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 9
1444268_at	cDNA sequence BC004004
1432007_s_at	adaptor protein complex AP-2, alpha 2 subunit
1436519_a_at	RIKEN cDNA 1110057K04 gene
1431213_a_at	hypothetical gene LOC433762
1421353_at	phosphodiesterase 7B
1434776_at	sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like)
1427385_s_at	actinin, alpha 1
1446670_at	CUG triplet repeat, RNA binding protein 2
1422919_at	HRAS-like suppressor
1422014_at	forkhead box P2
1426983_at	formin binding protein 1
1426824_at	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 4
1425861_x_at	calcium channel, voltage-dependent, alpha2/delta subunit 1
1433379_at	RIKEN cDNA 9430019H13 gene
1440954_at	pre B-cell leukemia transcription factor 1
1422196_at	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5B
1437632_at	mediator complex subunit 14
1416454_s_at	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta
1431551_at	RIKEN cDNA 2610028D06 gene
1443212_at	like-glycosyltransferase
1424415_s_at	spondin 1, (f-spondin) extracellular matrix protein
1427925_at	syntaxin 17
1420908_at	CD2-associated protein
1431114_at	dedicator of cytokinesis 4
1457304_at	DNA segment, Chr 13, ERATO Doi 787, expressed
1439627_at	similar to Zic protein; zinc finger protein of the cerebellum 1
1443214_at	G protein-coupled receptor 155

1455355_at	G2/M-phase specific E3 ubiquitin ligase
1432807_at	RIKEN cDNA 5830426K05 gene
1423311_s_at	trophoblast glycoprotein
1446421_at	schwannomin interacting protein 1
1456122_at	DIP2 disco-interacting protein 2 homolog C (Drosophila)
1428114_at	solute carrier family 14 (urea transporter), member 1
1448416_at	matrix Gla protein
1457018_at	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1
1425788_a_at	enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 2
1430268_at	RIKEN cDNA 9630005C17 gene
1429832_at	similar to peptidyl prolyl isomerase H; predicted gene 7879
1425660_at	BTB (POZ) domain containing 3; predicted gene 7712
1442418_at	RIKEN cDNA B930096F20 gene
1456056_a_at	DNA segment, Chr 6, Wayne State University 116, expressed
1455499_at	neurexin II
1456413_at	phosphodiesterase 4D interacting protein (myomegalin)
1445291_at	arylsulfatase A
1423053_at	ADP-ribosylation factor 4
1441081_a_at	RIKEN cDNA 1110038B12 gene
1423821_at	transmembrane protein 168
1438679_at	tripartite motif protein 8
1453371_at	regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 2
1424117_at	predicted gene 2573; cDNA sequence BC056474; predicted gene 13770
1459214_at	odd Oz/ten-m homolog 2 (Drosophila)
1448346_at	cofilin 1, non-muscle; similar to Cofilin-1
1458296_at	exostoses (multiple) 1
1441704_at	pleckstrin homology domain containing, family A member 5
1454845_x_at	melanin-concentrating hormone receptor 1
1457529_x_at	predicted gene 2049; RIKEN cDNA C330013J21 gene
1420690_at	fibroblast growth factor 10
1450269_a_at	phosphofructokinase, liver, B-type
1451340_at	AT rich interactive domain 5A (MRF1-like)
1419702_at	TATA box binding protein (Tbp)-associated factor, RNA polymerase I, A
1416242_at	kelch-like 13 (Drosophila)
1435199_at	adenomatosis polyposis coli 2
1455231_s_at	adenomatosis polyposis coli 2
1439321_at	AT rich interactive domain 1B (SWI-like)
1430979_a_at	peroxiredoxin 2
1437322_at	RNA binding motif protein 4
1423607_at	lumican
1430145_at	leucine rich repeat containing 28
1460293_at	frequenin homolog (Drosophila)
1445897_s_at	interferon-induced protein 35
1437675_at	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1
1425082_s_at	PDS5, regulator of cohesion maintenance, homolog A ( <i>S. cerevisiae</i> )
1428657_at	ras responsive element binding protein 1

1418456\_a\_at chemokine (C-X-C motif) ligand 14  
1417524\_at similar to cornichon homolog 2 (Drosophila)  
1447930\_at similar to Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1A (Cbp146)  
1445340\_at MYC binding protein 2  
1418021\_at similar to Complement C4 precursor; complement component 4A  
1425530\_a\_at syntaxin 3  
1438208\_at TAO kinase 2  
1456051\_at dopamine receptor D1A  
1422272\_at per-hexamer repeat gene 4  
1446286\_at kin of IRRE like 3 (Drosophila)  
1436646\_at sodium channel, voltage-gated, type II, alpha 1  
1456960\_at adenosine kinase  
1430966\_at predicted gene 4477; camello-like 3  
1424768\_at caldesmon 1  
1447880\_x\_at sphingosine-1-phosphate receptor 2  
1421365\_at Follistatin  
1418011\_a\_at SH3-domain GRB2-like B1 (endophilin)  
1442166\_at copine V; similar to Copine V  
1454384\_at RIKEN cDNA 2900057C01 gene  
1426873\_s\_at junction plakoglobin  
1425706\_a\_at damage specific DNA binding protein 2  
1425707\_a\_at potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 6  
1450389\_s\_at phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type 1 beta  
1423039\_a\_at basic leucine zipper and W2 domains 1  
1457075\_at RIKEN cDNA A830031M15 gene  
1440557\_at imprinted gene in the Prader-Willi syndrome region  
1430575\_a\_at tripeptidyl peptidase II  
1439531\_at RIKEN cDNA E130311K13 gene  
1442295\_at predicted gene 5492; actin related protein 2/3 complex, subunit 2  
1442445\_at RIKEN cDNA 2610027H17 gene  
1446156\_at dystrophin, muscular dystrophy  
1442917\_at predicted gene 11627  
1459150\_at leucine-rich repeats and calponin homology (CH) domain containing 1  
1440413\_at RIKEN cDNA A830006F12 gene  
1443438\_at similar to Nuclear receptor coactivator 1 (NCoA-1)  
1448738\_at calbindin 1  
1449018\_at profilin 1  
1432870\_at RIKEN cDNA 4932429P19 gene  
1425713\_a\_at ring finger protein 146  
1437184\_at GUF1 GTPase homolog (*S. cerevisiae*)  
1456353\_at predicted gene 3258; suppressor of Ty 4 homolog 1 (*S. cerevisiae*)  
1446144\_at peroxisomal biogenesis factor 5-like; peroxisomal membrane protein 3  
1448965\_at INO80 homolog (*S. cerevisiae*); similar to yeast INO80-like protein  
1430362\_at RIKEN cDNA 5730409N24 gene  
1455760\_at solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 5  
1421190\_at gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit beta 3

1419394_s_at	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)
1429810_at	RPTOR independent companion of MTOR, complex 2
1444507_at	ubiquitin specific peptidase 53
1434760_at	leucine rich repeat transmembrane neuronal 3
1437733_at	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2
1434944_at	dystrophia myotonica-protein kinase
1436100_at	SH2 domain containing 5
1427528_a_at	Eph receptor A7
1424367_a_at	homer homolog 2 (Drosophila)
1436996_x_at	lysozyme 1
1419542_at	deleted in azoospermia-like
1428812_at	RIKEN cDNA 1700040L02 gene
1447025_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 2 (UBC4/5 homolog, yeast)
1424414_at	opioid growth factor receptor-like 1
1434908_at	SR-related CTD-associated factor 1
1440225_at	G protein-coupled receptor 116

**ANEXO I: CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO “INFLEXIBLE ETHANOL INTAKE: A PUTATIVE LINK WITH THE LRRK2 PATHWAY” À REVISTA BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH**

Dear Dr. Daniel da Silva e Silva,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Behavioural Brain Research  
Corresponding Author: Ana Lúcia Brunialti Godard

Co-Authors:

Daniel A da Silva e Silva, Msc; Andrea F Ribeiro, PhD; Samara Damasceno, Msc; Cristiane S Rocha, PhD; Alexandre H Berenguer de Matos, Msc; Roseli Boerngen-Lacerda, PhD; Diego Correia, PhD;

Title: Inflexible ethanol intake: a putative link with the Lrrk2 pathway

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at [brunialt@ufmg.br](mailto:brunialt@ufmg.br); [anagodard@hotmail.com](mailto:anagodard@hotmail.com); do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

Thank you,

Behavioural Brain Research

**ANEXO II: CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO "LOSS OF CONTROL OVER THE ETHANOL CONSUMPTION: DIFFERENTIAL TRANSCRIPTIONAL REGULATION IN PREFRONTAL CORTEX" À REVISTA JOURNAL OF NEUROGENETICS**

22-Jun-2016

Dear de Paiva Lima, Carolina; da Silva e Silva, Daniela Almeida; Damasceno, Samara; Ribeiro, Andrea Frozino; Rocha, Cristiane; Berenguer de Matos, Alexandre; Correia, Diego; Boerngen-Lacerda, Roseli; Brunialti Godard, Ana Lúcia

Your manuscript entitled "Loss of control over the ethanol consumption: differential transcriptional regulation in prefrontal cortex" has been successfully submitted and is presently being considered for publication in the Journal of Neurogenetics.

Your manuscript ID is GNEG-2016-0048.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence with the Reviewing Editor or the Journal Office.

If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/gneg> and edit your user information as appropriate.

If you were not aware of this submission or do not agree to being listed as an author please contact the Editor and Managing Editor as soon as possible.

You can view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/gneg>.

Please note that your paper may be sent to CrossCheck for a plagiarism check. Please visit this website for more information: <http://informahealthcare.com/page/CrossCheck>

Thank you for submitting your manuscript to Journal of Neurogenetics.

Sincerely,  
Journal of Neurogenetics Editorial Office