



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS ASSOCIAÇÃO  
AMPLA UFSCar/UNESP**



**PAOLA PALOMBO**

**“PARTICIPAÇÃO DE PEQUENOS GRUPOS NEURAIS  
SELETIVAMENTE ATIVADOS DO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO NA  
REINSTALAÇÃO DA AUTOADMINISTRAÇÃO DE ETANOL INDUZIDA  
PELO CONTEXTO”**

**ARARAQUARA – SP  
2017**

**PAOLA PALOMBO**

**“PARTICIPAÇÃO DE PEQUENOS GRUPOS NEURAIS  
SELETIVAMENTE ATIVADOS DO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO NA  
REINSTALAÇÃO DA AUTOADMINISTRAÇÃO DE ETANOL  
INDUZIDA PELO CONTEXTO”**

Dissertação apresentada ao Programa  
Interinstitucional de Pós-Graduação em  
Ciências Fisiológicas (PIPGCF) - Associação  
ampla entre UFSCar/UNESP, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Mestre  
em Ciências Fisiológicas.

**Orientadora: Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta**

**Coorientador: Prof. Dr. Fábio Cardoso Cruz**

**ARARAQUARA – SP**

**2017**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Paola Palombo, realizada em 12/05/2017:

---

Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta  
UNESP

---

Prof. Dr. Rodrigo Molini-Leão  
UFBA

---

Profa. Dra. Carolina Demarchi Munhoz  
USP

## DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação as pessoas mais importantes da minha vida, meus pais **Jane Tito Coimbra Palombo** e **Hermínio Aparecido Luis Palombo**. Vocês são os principais responsáveis por tudo o que sou e o que tenho. Jamais desistiram de mim e estiveram sempre ao meu lado na realização de todos os meus sonhos, com total confiança e amor incondicional. Vocês são meus eternos amores.

Dedico essa dissertação também ao meu anjinho, que há cerca de quatro anos, chegou para mudar totalmente a minha vida. Minha afilhada, **Manuela de Oliveira Palombo**, você tem o dom de transformar todos os momentos em alegria, amor, afeto e esperança. É a alegria de tudo, minha eterna princesa.

Dedico essa dissertação ao meu amor **Max Willian Hammerschmidt** que me mostra diariamente o quanto sou capaz, lutadora e vencedora. Sem a menor dúvida, Deus tem um caminho de amor e felicidade para nós. Você é o meu maior presente.

E por fim, dedico essa dissertação a pessoa que foi peça fundamental e essencial nessa caminhada. Meu professor, meu coorientador, meu exemplo e meu amigo **Fábio Cardoso Cruz**. Desde o início, você confiou em mim mais do que eu mesma e independente de qualquer acontecimento jamais desistiu. Se não fosse por você, sem a menor dúvida, eu não estaria aqui hoje e nem seria quem eu sou. Como já te disse, Deus te colocou na Terra com a missão de ensinar tantas pessoas, você tem o dom e é um ser humano excepcional e iluminado. Que maravilha seria o mundo, se mais pessoas fossem como você.

***“Um sonho que se sonha só é só um sonho,  
um sonho que se sonha junto é realidade.”***

***(John Lennon)***

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** e à **Nossa Senhora** pelo milagre da defesa do TCC e do prazo da inscrição do mestrado, por todas as graças conseguidas durante essa caminhada e por toda a força e proteção durante a minha vida. “Tu és o meu escudo.”

A meus pais **Jane** e **Hermínio**, meu irmão **Alan Palombo** e minha cunhada **Vanessa Palombo**, por todo o apoio, força, amor incondicional e união durante essa jornada conhecida como vida. Minha vida se resume em vocês.

À minha afilhada **Manuela de Oliveira Palombo**, por todos os abraços, atenção, preocupação e amor que me acalentaram a alma nos momentos de estresses e dificuldades.

Ao meu namorado e companheiro de vida **Max Willian Hammerschmidt**, por ter me virado do avesso e me ensinado a viver quando eu já havia esquecido. Obrigada por me mostrar que todas as cores da vida são mais bonitas pintadas a dois. Obrigada pela pessoa que o seu amor me faz ser. O nosso futuro é a razão da minha luta. Eu te amo.

À minha avó materna **Geova Tito**, por todo amor, cuidado e orgulho em excesso. E em memória dos meus falecidos avôs **Manoel Coimbra**, **Antónia** e **Valdemar Palombo**. A saudades que sinto de vocês é grande demais.

À minha tia **Janete Tito Coimbra**, por me mostrar sempre o quão forte e o quão capaz de realizar meus sonhos eu sou.

À minha orientadora **Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta**, uma excelente profissional, competente e inteligente, que abriu as portas para que eu conhecesse o mundo da neurociência e da dependência. Cléo, obrigada por me aceitar no seu grupo

de pesquisa, por confiar no meu trabalho, por todos os ensinamentos e cautela. Você é uma pessoa da qual admiro muito.

Ao meu coorientador **Prof. Dr. Fábio Cardoso Cruz**, um ser humano e profissional fantástico, de uma índole, perseverança, determinação, fé, alegria, paciência e inteligência inquestionáveis. Chefe, você é o maior responsável dessa conquista; obrigada por todo ensinamento, paciência, ajuda e confiança. O seu amor pelo nosso trabalho me dá ânimo para continuar. Quando crescer quero ser um terço do que você é. Agradeço a Deus por ter te colocado na minha vida.

À minha dupla dinâmica **Paula Cristina Bianchi**, peça fundamental nesse trabalho. Pupu, Bino, obrigada por todo ensinamento, por toda ajuda nos experimentos, por tantas explicações, desabafo, colo, apoio, viagens, fofocas e por sempre me socorrer. Você se tornou de extrema importância na minha vida. Impossível me imaginar no laboratório sem você.

Aos neurocientistas mais malucos e amados desse mundo: **Paulo Eduardo (Paulãozinho)** e **Rodrigo Molini (Rodrighinho)**, vocês são as outras duas peças fundamentais desse trabalho todo. Dois seres humanos e amigos excepcionais. Obrigada pela companhia, por todos os ensinamentos, risadas, parceria e amor. Quero levar vocês para sempre comigo. Obrigada por terem sido meu braço direito.

Ao meu grupo de pesquisa ratentos: **Chefe, Pupu, Paulãozinho, Rozinho e Leticia Camargo Tavares (Globs)**: vocês são as melhores pessoas que pude conhecer e trabalhar. Obrigado por me mostrarem que um trabalho realizado em equipe é muito mais prazeroso e satisfatório. Obrigada por tornar os dias e noites de trabalho pura diversão, por me ensinarem a amar a neurociência, por todo respeito, amizade, confiança e companheirismo. Esse trabalho é nosso, se não fosse por vocês hoje eu não estaria aqui. Minha gratidão, meu carinho, meu amor e minhas saudades por tudo o que passamos.

À flor mais linda do meu jardim: **Anna Caroline Campos Aguiar** (Carolzinha), colo no meio da bagunça toda, o ponto de equilíbrio. Florzinha, estar perto de você me faz recarregar as energias com muita paz, tranquilidade e com muito amor. Obrigada por ter aparecido na minha vida e ser alguém de muita luz e bondade.

À amiga que ganhei durante essa jornada **Tatiane Sorregotti**. É impossível descrever em palavras o meu sentimento por você. Parece que toda essa sintonia, amor, cumplicidade, lealdade e parceria são resquícios de outra vida e rezo para que dure para toda eternidade.

À minha amiga e protetora **Andréia Oliveira**. Déia obrigada por todo o cuidado, auxílio, tratamento, amizade e carinho durante essa jornada chamada vida. Você me fez enxergar e acreditar no que sozinha não conseguia. Sou eternamente grata pelo seu amor comigo e se hoje sou quem sou, sem a menor dúvidas, devo a você.

Às minhas companheiras que me fazem acreditar que ainda existem pessoas boas no mundo de hoje. Obrigada por toda a irmandade e lealdade. Somos além da vida: **Andressa de Lima, Beatriz Lopes, Camila Barbeiro, Gabriele Viana, Juliana Rozatto, Larissa Sayuri, Luana Salla, Marina Trevisoli, Nalva Teixeira**.

Às amigas que ganhei no final desse caminho: **Sheila Engi, Giovana Macedo, Carol Zaniboni**. Agradeço a Deus por ter colocado pessoas como vocês na minha vida, vocês foram essenciais nessa etapa final. Obrigada por todo acolhimento, ajuda e risadas.

Ao amigo **Lucas Gomes**, que mesmo sem me conhecer e com o coração do tamanho do mundo, foi um dos responsáveis pelo meu ingresso no mestrado. Obrigada por todo material emprestado, dicas, ajudas e o excesso de risadas.

Aos amigos da Unesp: **Augusto, Diego** (o seu amor e todas as risadas compartilhadas), **Gabriel, Gessynger (Gessy), Johnny, Leandro** (toda a sua

amizade, carinho e infinitas piadas), **Lígia, Lucas Canto, Lucas Barreto, Lucas Gomes, Marion, Nathalia, Ricardo, Tati, Tarciso, Vanessa, Willian** muito obrigada por me acolherem, por todas as risadas e ajudas.

À secretária **Tirene Pavanelli (Ti)** pela amizade, carinho, colo amigo, conselhos sinceridade, prestações de serviços e auxílios sempre da forma mais profissional, verdadeira e competente.

Às técnicas do Laboratório, **Elizabeth Zocal Paro Lepera (Bete)** e **Rosana Finoti Pupin Silva (Rô)** pela dedicação e por sempre nos socorrer, mesmo em São Carlos.

Ao professor **Rafael Guido** e aos seus alunos **Carol, Fer, Malluf, Wood**, pelo espaço cedido, assim como auxílio nos experimentos, os cafés, fofocas e a amizade.

À **banca examinadora** pela atenção dispensada na leitura deste trabalho e pelas futuras contribuições.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza** por sua dedicação, disponibilidade, ensinamentos e boas risadas. Você é um espelho para mim.

Aos professores **Marcelo Tadeu Marin e Carlos César Crestani** pelas aulas, ensinamentos e auxílios.

Aos **sujeitos** utilizados na pesquisa, o meu agradecimento e respeito.

Ao **Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas** (PIPGCF – UFSCar/UNESP) pela oportunidade de realização do meu mestrado.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo financiamento do projeto.



À **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP** e ao **Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia (PANT)** por todo o auxílio durante as jornadas de trabalho.

Ao **Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP)** pelo espaço físico e laboratorial; equipamentos e materiais fornecidos para realização desse trabalho.

À **Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)** por todos os ensinamentos durante a graduação, conhecimento básico, espaço físico e materiais fornecidos.

***“Nada é melhor do que ouvir ou dizer obrigado. “***

***(Autor desconhecido)***

***“A única maneira de fazer um excelente trabalho é amando o que você faz. ”***

***(Steve Jobs)***

## RESUMO

Uma das principais dificuldades relacionada ao tratamento da dependência de etanol é o alto índice de reincidência ao uso dessa substância. Neste sentido, a exposição ao contexto associado ao uso de etanol é a principal causa de recaída. Evidências mostram que a recaída envolve comportamentos de aprendizado associativo. Essas associações são armazenadas por pequenos grupamentos neurais conhecidos como “*neuronal ensembles*”. A recaída induzida pelo contexto pode ser estudada através de um modelo animal conhecido como “*ABA renewal*”. Neste procedimento, ratos são treinados a autoadministrarem etanol em um determinado contexto. Após o aprendizado, os roedores são submetidos ao procedimento de extinção desse comportamento, em um ambiente com diferenças táteis, visuais e sonoras do contexto do treino. A reinstalação é avaliada através da exposição do animal ao contexto inicial. O objetivo do presente estudo foi: a) comparar o desempenho de ratos Wistar e Long-Evans no protocolo de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo ambiente; b) investigar a participação do córtex pré-frontal medial nesse comportamento; c) investigar a presença de alterações na expressão gênica em “*neuronal ensembles*” do córtex pré-límbico, relacionadas a reinstalação da autoadministração de etanol. Observamos que a exposição ao contexto previamente associado a autoadministração de etanol foi capaz de reinstalar esse comportamento em ratos Long-Evans e Wistar. Sendo que a linhagem de ratos Long-Evans apresentou melhor desempenho no teste de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto quando comparado aos ratos Wistar. Demonstramos que a reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto promoveu aumento da ativação neuronal do córtex pré-límbico. Notamos ainda, que uma pequena porcentagem de neurônios foi ativada no córtex pré-límbico durante a reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto (~7,7%). Evidenciamos que a inibição farmacológica do córtex pré-límbico atenuou a reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto. E por fim, encontramos que a reinstalação da autoadministração de etanol foi associada a redução na expressão de GluR1 e GluR2 (subunidades do receptor glutamatérgico AMPA) e ao aumento na expressão de GABA $\alpha$ 5 (subunidade do receptor GABAérgico GABA A) em neurônios seletivamente ativados no córtex pré-límbico durante o teste comportamental. Concluímos que a reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo ambiente é mediada por alterações na expressão gênica em “*neuronal ensembles*” ativados pela associação entre o efeito reforçador do etanol e o contexto em que essa substância de abuso foi administrada.

**Palavras-chave:** autoadministração, etanol, extinção, contexto, recaída, ratos.

## ABSTRACT

Context-induced reinstatement of drug seeking is an animal model for assessing the neural mechanisms underlying context-induced drug relapse, a major factor in human drug addiction. Neural activity in prelimbic cortex has been implicated in context-induced reinstatement drug seeking. Here, we report a new and feasible training procedure for context-induced reinstatement of alcohol seeking to explore the role of prelimbic cortex in context-induced relapse to alcohol seeking. Long-Evans rats were first given home-cage access to 10% ethanol. Using a saccharin fading technique, rats were first trained to self-administer 10% ethanol in one context. Next, lever pressing in the presence of the discrete cue was extinguished in a different context. Subsequently, context-induced reinstatement of drug seeking was assessed by re-exposing rats to the drug-associated or extinction context under extinction conditions. Re-exposure to the alcohol-associated context reinstated alcohol seeking and increased expression of the neural activity marker Fos in the prelimbic prefrontal cortex. The percentage of neural activation in this brain region was 3.4 % in extinction context and 7.7 % in drug associated context. Reversible inactivation of neural activity in prelimbic prefrontal cortex using GABA agonists muscimol and baclofen attenuated context-induced reinstatement. Based on previous findings of the literature that Fos-expressing neurons play a critical role in conditioned drug effects, we assessed whether context-induced reinstatement was associated with molecular alterations selectively induced within context-activated Fos-expressing neurons. We used fluorescence-activated cell sorting to isolate reinstatement-activated Fos-positive neurons from Fos-negative neurons in prelimbic cortex and used quantitative PCR to assess gene expression within these two populations of neurons. Context-induced reinstatement was associated with increased expression of the GABA $\alpha$ 5 gene and decrease in the AMPA receptor subunit genes GluR1 and GluR2 in only Fos-positive neurons. Our results demonstrate an important role of prelimbic cortex in context-induced reinstatement of alcohol seeking and that this reinstatement is associated with unique gene alterations in Fos-expressing neurons.

**Key-words:** self-administration, alcohol, extinction, context, drug relapse, rats

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Representação esquemática do sistema mesocorticolímbico no encéfalo de roedor ..... 32
- Figura 2** - Representação das ações agudas de etanol na área tegmental ventral e no núcleo accumbens .....33
- Figura 3** - Caixa operante de autoadministração de drogas (Med Associates®, St. Albans,VT, EUA) .....43
- Figura 4** - Protocolo de sessões de autoadministração operante de etanol e suas diferentes fases .....46
- Figura 5** - Desenho esquemático da citometria de fluxo .....51
- Figura 6** - Facs de neurônios do córtex pré-frontal pré-límbico de neurônios ativados durante o teste de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto.....51
- Figura 7** - Protocolo esquemático da reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto utilizada para imuno-histoquímica .....57
- Figura 8** - Protocolo esquemático da reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto para injeção central de Baclofen/Muscimol .....59
- Figura 9** - Médias  $\pm$  EPM do número de respostas nas barras ativa, inativa e reforços durante as sessões de treinamento do comportamento operante da autoadministração de etanol em ratos Wistar .....63

<b>Figura 10</b> - Médias $\pm$ EPM do número de respostas nas barras ativa, inativa e reforços durante a sessões de extinção do comportamento operante da autoadministração de etanol em ratos Wistar .....	63
<b>Figura 11</b> - Médias $\pm$ EPM do número de respostas nas barras ativa, inativa e reforços durante as sessões de treinamento do comportamento operante da autoadministração de etanol de ratos Long-Evans .....	64
<b>Figura 12</b> - Médias $\pm$ EPM do número de respostas nas barras ativa, inativa e reforços durante as sessões de extinção do comportamento operante da autoadministração de etanol de ratos Long-Evans .....	65
<b>Figura 13</b> - Histograma representativo da média $\pm$ EPM de respostas nas barras ativa e inativa no teste de reinstalação nos contextos A e B de ratos Wistar .....	66
<b>Figura 14</b> - Histograma representativo da média $\pm$ EPM de respostas nas barras ativa e inativa no teste de reinstalação nos contextos A e B de ratos Long-Evans .....	67
<b>Figura 15</b> - Histograma representativo da média $\pm$ EPM de respostas nas barras ativa no teste de reinstalação nos contextos A de ratos Wistar e Long-Evans .....	68
<b>Figura 16</b> - Médias $\pm$ EPM do número de respostas nas barras ativa, inativa e reforços durante as sessões de treinamento do comportamento operante da autoadministração de etanol de ratos Long-Evans .....	69
<b>Figura 17</b> - Médias $\pm$ EPM do número de respostas nas barras ativa, inativa e reforços durante as sessões de extinção do comportamento operante da autoadministração de etanol de ratos Long-Evans .....	70
<b>Figura 18</b> - Médias $\pm$ EPM do número de respostas nas barras ativa e inativa durante o teste de reinstalação do comportamento operante da autoadministração de etanol induzida pelo ambiente em ratos Long-Evans .....	71

**Figura 19** - Regiões do córtex pré-frontal onde foram realizadas as contagens das células positivas para Fos. Fatias coronais do córtex pré-límbico representativas da quantificação das células positivas para a proteína Fos do contexto A, contexto B e contexto C .....72

**Figura 20** - Número de Fos-IR nucleí por mm<sup>2</sup> no córtex cingulado, infralímbico e pré-límbico .....73

**Figura 21** - Média  $\pm$  EPM da porcentagem de células duplamente marcadas para as proteínas Fos e NeuN no córtex pré-frontal cingulado, infralímbico e pré-límbico após a exposição aos contextos A, B e C na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto.....75

**Figura 22** - Imagem representativa do córtex pré-frontal pré-límbico para dupla marcação das proteínas Fos e NeuN .....75

**Figura 23** - Efeito da inativação farmacológica do córtex pré-límbico na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto. Médias  $\pm$  EPM do número de respostas nas barras ativa, inativa e reforços durante as sessões de treinamento do comportamento operante da autoadministração de etanol de ratos Long-Evans .....76

**Figura 24** - Efeito da inativação farmacológica do córtex pré-límbico na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto. Médias  $\pm$  EPM do número de respostas nas barras ativa, inativa e reforços durante as sessões de extinção do comportamento operante da autoadministração de etanol de ratos Long-Evans .....77

**Figura 25** - Histograma representativo da média  $\pm$  EPM de respostas nas barras ativa no teste de reinstalação nos contextos A e B de ratos Long-Evans .....78

**Figura 26** - Histograma representativo da média  $\pm$  EPM de respostas nas barras inativa no teste de reinstalação nos contextos A e B de ratos Long-Evans .....78

**Figura 27-** Histograma representativo da média  $\pm$  EPM de respostas nas barras ativa, inativa e reforços no teste de autoadministração de sacarina .....79

**Figura 28** - Histograma representativo da determinação de álcool no sangue. Curvas de correlação do número de reforços alcançados durante a última sessão de treino em função do nível de álcool no sangue .....80

**Figura 29** - Posições das implantações das cânulas no córtex pré-límbico .....80

**Figura 30** - Médias  $\pm$  EPM do número de respostas nas barras ativa, inativa e reforços durante as sessões de treinamento de reinstalação da autoadministração de etanol em ratos Long-Evans .....82

**Figura 31-** Médias  $\pm$  EPM do número de respostas nas barras ativa, inativa e reforços durante as sessões de extinção de reinstalação da autoadministração de etanol em ratos Long-Evans .....82

**Figura 32** - Histograma representativo da média  $\pm$  EPM de respostas nas barras ativa e inativa no teste de reinstalação nos contextos A e B de ratos Long-Evans .....83

**Figura 33** - Média  $\pm$  EPM da expressão gênica relativa (relativa a expressão nas células Fos negativas) dos genes GluR1, GluR2, GABA $\alpha$ 2, GABA $\alpha$ 5 e CRF durante a exposição ao contexto relacionado a administração de etanol (Contexto A) .....84

**Figura 34** - Média  $\pm$  EPM da expressão gênica relativa (relativa a expressão nas células Fos negativas) dos genes GluR1, GluR2, GABA $\alpha$ 2, GABA $\alpha$ 5 e CRF durante a exposição ao contexto relacionado a extinção da autoadministração de etanol (Contexto B) .....85



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Genes escolhidos para serem analisados pelo rtPCR .....53

**Tabela 2** – Porcentagem de ativação neuronal nos diferentes contextos e regiões  
corticais .....74

## LISTA DE ABREVIÇÕES

**DSM** - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**CEP** - Comitê de Ética em Pesquisa

**CEBRID** - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas

**$\Delta^9$ -THC** - Delta-9-tetra-hidrocanabidiol

**CeA** - Amígdala central

**BNST** - Núcleo intersticial da estria terminal

**Nac** - Núcleo accumbens

**GABA** - Ácido gama-amino butírico

**NMDA** - N-metil D-aspartato

**CB1** - Receptor canabinóide, subtipo 1

**TRPV 1** - Receptor de potencial transitório vanillóide, subtipo 1

**VTA** - Área tegmental ventral

**BLA** - Amígdala basolateral

**Hipp** - Hipocampo

**FACS** - Citometria de fluxo

**AMPA** - Receptor  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico

**CRF** - Receptor específico para o fator liberador de corticotropina

**GluR1** - Receptor glutamatérgico do tipo 1

**GluR2** - Receptor glutamatérgico do tipo 2

**RT - PCR** - Reação de polimerização em cadeia em tempo real

**COBEA** - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

**RF 1** - Razão fixa 1

**I.V.** - Intervalo variável

**I. P.** - Intraperitonal

**I. M.** - Intramuscular

**AP** - Anterior-posterior

**ML** - Medial-lateral

**DV** - Dorsal-ventral

**PBS** - Tampão fosfato de sódio

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** - Fosfato monopotássico

**K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** - Fosfato dipotássico

**NaCl** - Cloreto de sódio

**NaOH** - Hidróxido de sódio

**NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** - Fosfato monossódico

**Fos** - marcação de neurônio ativado

**TBS** - Solução salina tamponada com Tris

**HCl** - Ácido clorídrico

**NeuN** - Proteína nuclear específica de neurônio

**RNA** - Ácido ribonucléico

**c-DNA** - DNA complementar

**CT** - Ciclothreshold

**B/M** - Baclofen/muscimol

**EPM** - Erro padrão da média

**Ratos P** - Ratos que possuem alta preferência por etanol

**Grin2a** - Receptor ionotrópico do glutamato tipo NMDA subunidade 2a

**c-Fos** - Gene de ativação imediata

**Arc** - Proteína associada ao citoesqueleto regulada pela atividade

**Egr1** - Gene de resposta ao crescimento precoce 1

**Egr2** - Gene de resposta ao crescimento precoce 2

**NPY** - Neuropeptídeo Y

**Map2K6** - Proteína quinase cinase 6 ativada por mitogênio

**LTP** - Potencialização de longo prazo

**LTD** - Depressão de longo prazo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
1.1 Histórico do uso do etanol .....	24
1.2 Epidemiologia e dependência de etanol .....	26
1.3 Neurobiologia da dependência .....	28
1.4 Mecanismos de ação relacionados a dependência e recaída ao uso de etanol .....	30
1.5 Participação de pequenos grupamentos neurais seletivamente ativados na recaída ao uso .....	35
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>39</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
3.1 Parecer ético .....	42
3.2 Animais .....	42
3.3 Substâncias .....	42
3.4 Caixa de autoadministração operante de etanol .....	42
3.5 Protocolo de autoadministração .....	43
3.5.1 Treino da autoadministração de etanol .....	43
3.5.2 Extinção da autoadministração de etanol .....	44
3.5.3 Teste da reinstalação da autoadministração de etanol .....	45
3.6 Cirurgia intracraniana .....	46
3.7 Injeções intracranianas e histologia .....	47
3.8 Imuno-histoquímica .....	47
3.9 Dupla marcação por Imunofluorescência .....	48
3.10 Separação de neurônios ativados por citometria de fluxo (FACS) .....	49
3.11 Extração do RNA, Síntese do c-DNA e Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real (rt-PCR) .....	52

<b>4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1</b> Padronização do protocolo de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto: comparação entre ratos Wistar e Long-Evans .....	55
<b>4.1.1</b> Objetivo .....	55
<b>4.1.2</b> Procedimento Experimental .....	55
<b>4.1.3</b> Análise estatística .....	55
<b>4.2</b> Identificação e caracterização das regiões do córtex pré-frontal medial ativadas durante o teste de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto .....	55
<b>4.2.1</b> Objetivo .....	55
<b>4.2.2</b> Procedimento Experimental .....	56
<b>4.2.3</b> Análise estatística .....	57
<b>4.3</b> Investigação funcional da participação do córtex pré-límbico na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto .....	57
<b>4.3.1</b> Objetivo .....	57
<b>4.3.2</b> Procedimento Experimental .....	58
<b>4.3.3</b> Análise estatística .....	59
<b>4.4</b> Análise das alterações na expressão gênica de neurônios ativados do córtex pré-límbico durante a reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto .....	59
<b>4.4.1</b> Objetivo .....	59
<b>4.4.2</b> Procedimento Experimental .....	60
<b>4.4.3</b> Análise estatística .....	60
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>61</b>
<b>5.1</b> Padronização do protocolo de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto: comparação entre ratos Wistar e Long-Evans .....	62
<b>5.2</b> Identificação e caracterização das regiões do córtex pré-frontal medial ativadas durante o teste de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto .....	68

5.2.1	Comportamento .....	68
5.2.2	Expressão de Fos .....	71
5.2.3	Porcentagem de ativação neuronal (dupla marcação Fos/NeuN) ..	73
5.3	Investigação funcional da participação do córtex pré-límbico na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto .....	75
5.4	Análise das alterações na expressão gênica de neurônios ativados do córtex pré-límbico durante a reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto .....	81
5.4.1	Comportamento .....	81
5.4.2	Expressão dos genes codificantes das proteínas GluR1, GluR2, GABA $\alpha$ 2, GABA $\alpha$ 5 e CRF na reinstalação da autoadministração etanol induzida pelo contexto .....	83
<b>6.</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>86</b>
<b>7.</b>	<b>Considerações Finais .....</b>	<b>98</b>
<b>8.</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>100</b>
8.1	Conclusões gerais .....	101
8.2	Conclusões específicas .....	101
<b>9.</b>	<b>Revisão bibliográfica .....</b>	<b>102</b>
<b>10.</b>	<b>Parecer da Comissão de Ética .....</b>	<b>123</b>
<b>11.</b>	<b>Prêmio Menção Honrosa .....</b>	<b>124</b>

# INTRODUÇÃO

*“Quem ensina aprende ao ensinar.  
E quem aprende ensina ao aprender.”  
(Paulo Freire)*

## 1.1 Histórico do uso do etanol

Substâncias de abuso são utilizadas desde as primícias da humanidade. Na antiguidade, o uso estava associado para fins medicinais, celebrações, meditações, magia, cultos religiosos e fins científicos (Royce, 1981; Toscano Jr., 2001). O motivo do uso variava de acordo com os aspectos sociais, culturais e de cada época (Royce, 1981; Toscano Jr., 2001).

Segundo alguns registros arqueológicos, os primeiros indícios do consumo de etanol pelo ser humano datam de aproximadamente 8000 antes de Cristo (a.C.) (Standage, 2006; Gately, 2008). Em uma passagem bíblica do Antigo Testamento (Gênesis 9.21), Noé, após o dilúvio, plantou vinha e fez o vinho. Fez uso da bebida a ponto de se embriagar. Esse foi o primeiro relato que se tem conhecimento de um caso de embriaguez.

As primeiras bebidas alcoólicas foram produzidas através do processo de fermentação de cereais por aborígenes, com um conteúdo alcoólico baixo. Os egípcios também utilizavam a fermentação e faziam o uso das bebidas para eliminar os germes e os parasitos provenientes do rio Nilo (Viala-Artigues, 2003).

Durante a Idade Média, em 800 a.C. os árabes introduziram o processo de destilação na Europa. Eles acreditavam que as bebidas obtidas por esse processo eram um remédio eficiente para combater a dor, já que promoviam analgesia imediata. Nesse mesmo período, houve aumento da comercialização e regulamentação da produção de bebidas alcoólicas (Sbarounis, 1997).

Em 700 a.C. houve um aumento drástico no consumo de vinhos entre os gregos. A bebida era considerada como divina e criaram regras sociais para o consumo da mesma. Foi estabelecido que o vinho seria apreciado em encontros denominados *symposium*, nos quais os homens discutiam sobre filosofia, ciência, arte e sobre o conceito de democracia.

Cristóvão Colombo introduziu o plantio da cana na América em 1493, onde hoje é a República Dominicana. Oficialmente foi Martim Affonso de Souza, que em 1532, trouxe a primeira muda de cana ao Brasil e iniciou seu cultivo na Capitania de São Vicente, no qual ele próprio construiu o primeiro engenho de açúcar. Mas foi no Nordeste, principalmente nas Capitanias de Pernambuco e da Bahia, que os engenhos de açúcar se multiplicaram, originando o surgimento da cachaça (Viala-Artigues, 2003).



Uma versão folclórica relata que a cachaça teria surgido quando um escravo, que trabalhava no engenho, deixou armazenado um caldo esverdeado e escuro conhecido como cagaça. Diz essa versão, que a cagaça fermentou naturalmente e, devido às mudanças de temperatura, evaporou e condensou no teto do engenho, formando pequenos pingos (originando o sinônimo “pinga”). O termo água-ardente parece ter surgido devido o ardor que essa substância produziu a ser derramada sobre as feridas de um escravo. Porém, a história oficial reporta que a cachaça surgiu graças as técnicas de destilação que fora aprendida dos árabes pelos portugueses (Fernandes, 2014).

No Brasil, com a força do cultivo da cana-de-açúcar, foi necessário aumentar a mão de obra, e assim os portugueses começaram a trocar álcool por escravos. A cana-de-açúcar era duplamente rentável, pois com seu bagaço produzia-se a cachaça sem custos adicionais. Portugal não era favorável a essa produção, devido a concorrência dessa bebida com o vinho e com a bagaceira, bebidas produzidas através do destilado de cascas de uva (Rodrigues, 2008). Assim, em 1635, houve a proibição da comercialização da bebida oriunda da cana-de-açúcar, o que gerou revolta entre os senhores de engenho. Porém, mesmo com a insatisfação da corte de Portugal, em 1661, a produção e comercialização de cachaça foram regulamentadas no Brasil (Rodrigues; Rodrigues, 2008).

Na Idade Moderna, com a chegada da Revolução Industrial, observou-se aumento no número da oferta, do consumo e de problemas relacionados com o uso excessivo do álcool. Durante o século XX, em alguns países, foi estabelecida a lei de maioridade de 18 anos para o consumo de etanol. Nesse mesmo período, os Estados Unidos da América instituíram a Lei Seca, em que se proibiu a fabricação, venda, posse e consumo das bebidas alcoólicas (Jerome, 1993). Essa lei vigorou por 13 anos e teve efeitos contrários ao que se esperava, ao invés de acabar com o consumo de álcool e com os problemas sociais, provocou aumento do tráfico, criminalidade e um aumento desenfreado de uso em bares clandestinos. Assim, em 1933, políticos americanos argumentaram que a legalização das bebidas geraria mais empregos, elevaria a economia e aumentaria a arrecadação de impostos. Dessa forma, esta argumentação fez com que o Congresso dos Estados Unidos revogasse a emenda constitucional da lei seca (Jerome, 1993).

Em 1952, devido a todos os problemas relacionados ao uso excessivo de bebidas alcoólicas, o etilismo passou a ser considerado um transtorno psiquiátrico,

sendo incluído na primeira edição do Manual de Diagnóstico e Estatística da Associação Americana de Psiquiatria (DSM) (Vaillant, 1983).

Nos dias atuais, convivemos com inúmeros problemas relacionados com o uso excessivo de etanol, capazes de acarretar danos aos usuários e a sociedade (Duailibi e Laranjeira, 2007).

## 1.2 Epidemiologia e Dependência de Etanol

Embora a prevalência do uso de etanol encontra-se estável nos últimos anos, suas consequências na vida do indivíduo e da sociedade são consideradas como um problema de saúde pública mundial (OMS, 2014).

As perdas, os custos sociais e econômicos relacionados à dependência e ao abuso de etanol são altíssimos. Nos países em desenvolvimento, o consumo de etanol é considerado o maior fator de risco de morbidade e mortalidade (Ezzati *et al.*, 2002). No mundo, aproximadamente 4% do número total de mortes (o que representa 1 a cada 20) são atribuídas ao uso de etanol. Neste contexto, aproximadamente 47% de homicídios, 25% de suicídios e 40% de acidentes automobilísticos estão relacionados ao consumo de bebidas alcoólicas (OMS, 2014). O custo mundial relacionado ao uso de bebidas alcoólicas é de aproximadamente 2% do produto interno bruto global (Thavorncharoensap *et al.*, 2009).

Em um relatório, divulgado pela Organização Mundial de Saúde, foi constatado que o etanol é a substância de abuso mais consumida no mundo (OMS, 2016). Esse relatório revelou que 12% da população mundial fazem uso de etanol diariamente (UNODC, 2016). A média de consumo de etanol puro, entre pessoas com 15 ou mais anos de vida, é de aproximadamente 6,3 litros por ano. Porém, entre etilistas, essa média de ingestão de etanol aumenta para aproximadamente 17,2 litros por ano.

Em 2010, foi reportado que 38% da população mundial haviam feito o uso de bebida alcoólica nos últimos 12 meses e 16% apresentaram episódios de uso pesado de bebidas alcoólicas. Em 2012, aproximadamente 5,9% do total do número de mortes no mundo foram atribuídas ao consumo excessivo de bebidas alcoólicas (OMS, 2016).

No Brasil, a média de ingestão de etanol puro é de aproximadamente 8,7 litros anualmente e entre etilistas essa média é de 15,1 litros (OMS, 2014). Dados do Centro Brasileiro de Investigações sobre Drogas (CEBRID) mostraram que 74,6% da

população brasileira, entre 12 e 65 anos de idade, fizeram o uso de bebidas alcoólicas ao menos uma vez na vida (CEBRID, 2005).

Um estudo realizado nas capitais brasileiras, entre alunos do ensino fundamental e médio (10 a 18 anos), apontou que 60,5% desses estudantes relataram o uso de bebidas alcoólicas pelo menos uma vez na vida e 1,6% afirmaram ter feito uso abusivo de etanol (Galduroz *et al.*, 2010).

Um estudo realizado no Brasil mostrou que entre os usuários de bebidas alcoólicas, 8,1% fazem o uso abusivo dessa substância e desses, 3,9% preenchem os critérios para dependência ao etanol (Bastos *et al.*, 2008; Wolle *et al.*, 2011).

Segundo a quinta edição do Manual de Diagnóstico e Estatística (DSM-5), da Associação Americana de Psiquiatria, a dependência é conceituada como uma síndrome comportamental na qual o uso da droga adquire prioridade na vida do indivíduo. De acordo com esse conceito, essa psicopatologia é caracterizada por um conjunto de sinais e sintomas indicativos de que o indivíduo perdeu o controle do uso da droga e o mantém o uso a despeito das suas consequências adversas (American Psychiatric Association, 2013).

Nesse sentido, o uso repetido de uma substância de abuso pode promover alterações morfológicas, funcionais e bioquímicas duradouras no encéfalo, responsáveis por ocasionar, em algumas situações, comportamentos de risco e autodestrutivos (OMS, 1993). Estas alterações ocorrem principalmente em regiões encefálicas relacionadas a inibição comportamental e a recompensa (Volkow *et al.*, 2016).

Em versões anteriores do DSM, abuso e dependência de etanol eram tratados separadamente. Abuso é caracterizado por um padrão do consumo excessivo, repetido, recorrente e que se manifestava por consequências adversas na vida da pessoa. A dependência de etanol é considerada uma doença crônica e recidivante, caracterizada pela perda do controle, uso compulsivo da substância, prejuízos na tomada de decisões e preocupações patologicamente excessivas com a busca de etanol. Essa psicopatologia é caracterizada também, pela presença de comportamentos impulsivos que levam ao consumo prejudicial, frente às consequências graves ocasionadas à vida do indivíduo (problemas no trabalho, na família e comprometimento ou agravamento de estados de saúde) (Reilly *et al.*, 2017). Outra característica da dependência de etanol é o surgimento da síndrome de abstinência, que pode ser entendida como estados emocionais e físicos negativos evidenciados quando o consumo dessa substância é interrompido (Koob, 2006). Os

sintomas negativos podem ser representados por convulsões, alterações autonômicas e distúrbios motores. Alguns sintomas podem surgir tardiamente e são evidenciados por estados emocionais negativos, como ansiedade e depressão (abstinência protraída) (Majchrowicz, 1975; Gilpin e Koob, 2008).

Na 5ª edição do DSM, abuso e dependência foram reunidos em um único capítulo, intitulado “transtornos relacionados ao uso de substâncias”, com classificação de gravidade em três níveis (leve, moderada e grave) (DSM-5). Essa nova classificação possibilitou, segundo a Sociedade Americana de Psiquiatria, intervenções preventivas e curativas mais efetivas (DSM-5).

### 1.3. Neurobiologia da dependência

O número restrito de terapias efetivas para o tratamento da dependência de substâncias de abuso aponta para a necessidade de pesquisas para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Reilly *et al.*, 2017). Um paradigma bastante promissor para a descoberta de novas terapias é o entendimento da neurobiologia da dependência (Volkow *et al.*, 2016).

Neste sentido, muitos estudos foram e estão sendo realizados na tentativa de entender a neurobiologia da dependência. Estes estudos foram integralizados em uma revisão escrita por Volkow e Koob (2016), apresentada a seguir.

Segundo essa revisão, o uso inicial de uma substância de abuso é dirigido pelo reforço positivo que a substância promove, fazendo com que o indivíduo repita o consumo da substância. Os efeitos prazerosos e euforizantes são resultados da ativação de um substrato neural comum, a via dopaminérgica mesocorticolímbica (Wise e Bozarth, 1987). Neste sentido, vários estudos demonstraram que a administração de nicotina, cocaína, anfetamina, morfina, etanol ou  $\Delta^9$ -THC aumentam a liberação de dopamina no núcleo accumbens (Imperato *et al.*, 1986; Di Chiara e Imperato, 1988; Kiiianmaa *et al.*, 1995; Pontieri *et al.*, 1996; Tanda *et al.*, 1997; Schilstrom *et al.*, 1998; Cadoni e Di Chiara, 2000).

Nesse primeiro estágio de uso da substância também é observado processos de formação de hábitos relacionados com a busca e com o consumo da substância de abuso. A formação de hábito pode aumentar ainda mais a procura pela droga. A gênese deste comportamento se relaciona com a ativação do estriado dorsal (Everitt e Robbins, 2005).

De acordo ainda com essa revisão, períodos repetidos de consumo intenso da substância de abuso (binge/intoxicação) podem promover plasticidades nos circuitos cerebrais de anti-recompensa capazes de eliciar um segundo estágio do uso, que é caracterizado pela síndrome de abstinência (manifestações de sinais e sintomas físicos e emocionais negativos durante a ausência do uso da substância) (Koob e Volkow, 2010).

O sistema de anti-recompensa é formado pelas áreas do sistema límbico responsáveis pelas respostas emocionais ao estresse, como a amígdala central (CeA), o núcleo intersticial da estria terminal (BNST) e a concha do núcleo accumbens. Essas regiões formam o circuito neural chamado amígdala estendida (Koob e Le Moal, 2008b; Ulrich-Lai e Herman, 2009). Plasticidades no sistema anti-recompensa, promovidas pelo uso repetido de uma substância de abuso, promovem o surgimento dos sintomas emocionais negativos da síndrome de abstinência (ansiedade, depressão e anedonia) (Koob e Le Moal, 1997; 2008a; b.) Nesse estágio, a procura e o uso da substância seriam motivadas para aliviar os sintomas da síndrome de abstinência (Koob e Le Moal, 1997; 2008a; b).

O terceiro estágio do uso da droga é caracterizado pelo desejo compulsivo pela substância de abuso e pela perda do controle do uso (Koob e Volkow, 2010). Esses comportamentos seriam ocasionados por plasticidades no sistema mesocorticolímbico (Koob e Volkow, 2010). Estas plasticidades promoveriam tolerância do efeito reforçador positivo e o aumento da saliência motivacional ao uso da droga e aos estímulos associados ao consumo da substância (Robinson e Berridge, 2000; 2001; 2003). Neste estágio, o usuário consumiria quantidades cada vez maiores da droga para obter os mesmos efeitos iniciais. Além disso, devido ao aumento da saliência motivacional, o uso da droga se tornaria cada vez mais atrativo e desejável, desencadeando a fissura e o desejo compulsivo pela mesma (Robinson e Berridge, 2000; 2001; 2003).

O uso compulsivo seria associado também a prejuízos do controle executivo e inibitório do comportamento (Volkow, 2005). Esses prejuízos são resultantes de plasticidades corticais (córtex orbital frontal, cingulado, pré-límbico) promovidas pelo uso repetido da droga (Volkow, 2005; Koob e Volkow, 2010). Como consequência do aumento da saliência motivacional e da impulsividade, o usuário perderia o controle e faria uso compulsivo da substância de abuso (Volkow, 2005; Koob e Volkow, 2010).

Como decorrência de todas as plasticidades no sistema mesocorticolímbico e na amígdala estendida, promovidas pelo uso repetido da droga de abuso, o indivíduo apresentaria estreitamento do repertório comportamental, direcionando seu comportamento quase que exclusivamente para a busca e consumo de uma substância de abuso (Reilly *et al.*, 2017).

#### **1.4. Mecanismo de ação relacionados a dependência e a recaída ao uso de etanol**

Os mecanismos de ação do etanol são complexos e envolvem a ação dessa substância em diversos tipos de receptores como, por exemplo, proteínas efetoras, canais de íons sensíveis a ligantes ou dependentes de voltagem (Davies, 2003; Kumar *et al.*, 2009). Além disso, o etanol em concentrações sanguíneas elevadas pode promover alteração na composição lipídica das membranas citoplasmáticas (Crews *et al.*, 1996).

Dependendo da concentração no sistema nervoso central, o etanol pode promover efeitos depressores ou euforizantes (Erdozain e Callado, 2014). Esses efeitos são decorrentes de sua ação depressora em diferentes regiões encefálicas e em diferentes sistemas de neurotransmissão (Aguayo *et al.*, 2002). O mecanismo depressor do etanol no sistema nervoso central ocorre através da inibição de sistemas de neurotransmissão excitatória e potencialização da neurotransmissão inibitória (Davies, 2003; Kumar *et al.*, 2009).

Um dos mecanismos de ação descritos para o etanol, compreende sua interação alostérica positiva no receptor GABAérgico do tipo A (GABA<sub>A</sub>) (Davies, 2003; Kumar *et al.*, 2009). Os receptores GABA<sub>A</sub> são formados por 5 subunidades proteicas heteroméricas ( $\alpha, \beta, \gamma$ ), que se reúnem em torno de um poro central delimitando um canal iônico, que quando ativado, promove o influxo de íons cloreto para o interior do neurônio (Davies, 2003). Assim, o etanol liga em um sítio específico no receptor GABA<sub>A</sub> potencializando a ação de GABA, aumentando o tempo e a frequência de abertura do canal iônico (Davies, 2003; Kumar *et al.*, 2009). Polimorfismos nos receptores GABA<sub>A</sub> estão associados a predisposição para a ingestão, bem como para o desenvolvimento da dependência de etanol (Dick *et al.*, 2006).

O etanol pode agir também como agonista dos receptores glicinérgicos, que possuem características e ação similares aos receptores GABA<sub>A</sub> (Aguayo *et al.*, 2002).

Outro mecanismo de ação importante do etanol é a inibição dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e Cainato. Embora os mecanismos responsáveis por essa inibição não estejam totalmente elucidados, estudos sugerem que o etanol pode aumentar a fosforilação desses receptores, o que promoveria a dessensibilização dos mesmos (Crews *et al.*, 1996).

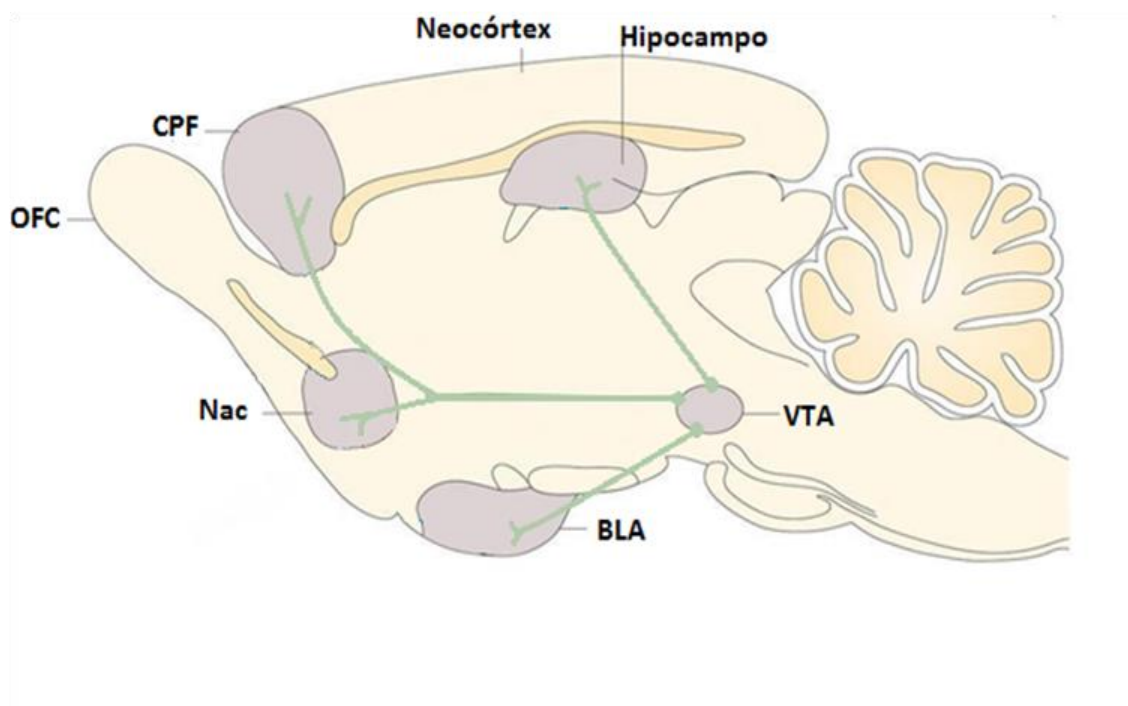
Dentre outras ações do etanol no sistema nervoso central, evidências destacam sua ação sobre os receptores canabinóides CB1 (Varodayan *et al.*, 2016), e receptores TRPV1 (Renteria *et al.*, 2014). A ativação de CB1 pelo etanol pode promover aumento na liberação de dopamina, GABA e glutamato nos circuitos centrais de recompensa (Perra *et al.*, 2008).

Os sistemas de neurotransmissão serotoninérgica e colinérgica também são sensíveis a ação do etanol. Essa substância aumenta as concentrações de acetilcolina e serotonina no sistema nervoso central (Schuckit *et al.*, 2012).

O mecanismo de ação do etanol relacionado à dependência envolve a interação dessa substância com esses diferentes sistemas de neurotransmissão no sistema mesocorticolímbico e na amígdala estendida (Gilpin e Koob, 2008; Koob e Le Moal, 2008a).

Como descrito acima, o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico é formado por corpos celulares de neurônios dopaminérgicos presentes na área tegmental ventral (VTA). Esses neurônios se projetam para o córtex pré-frontal medial, núcleo accumbens, amígdala, hipocampo e globo pálido ventral (**Figura 1**) (Koob e Le Moal, 2001). A ativação desse sistema está relacionada a muitos processos fisiológicos e comportamentais, como por exemplo: cognição, locomoção, humor, motivação e recompensa (Wise, 1998; Horschitz *et al.*, 2005; Kienast e Heinz, 2006; Volkow *et al.*, 2007; Koob e Le Moal, 2008b). Foi demonstrado que todas as drogas de abuso são capazes de ativar o sistema mesocorticolímbico e assim promover seus efeitos euforizantes e prazerosos (Wise, 1978; Wise e Bozarth, 1987).



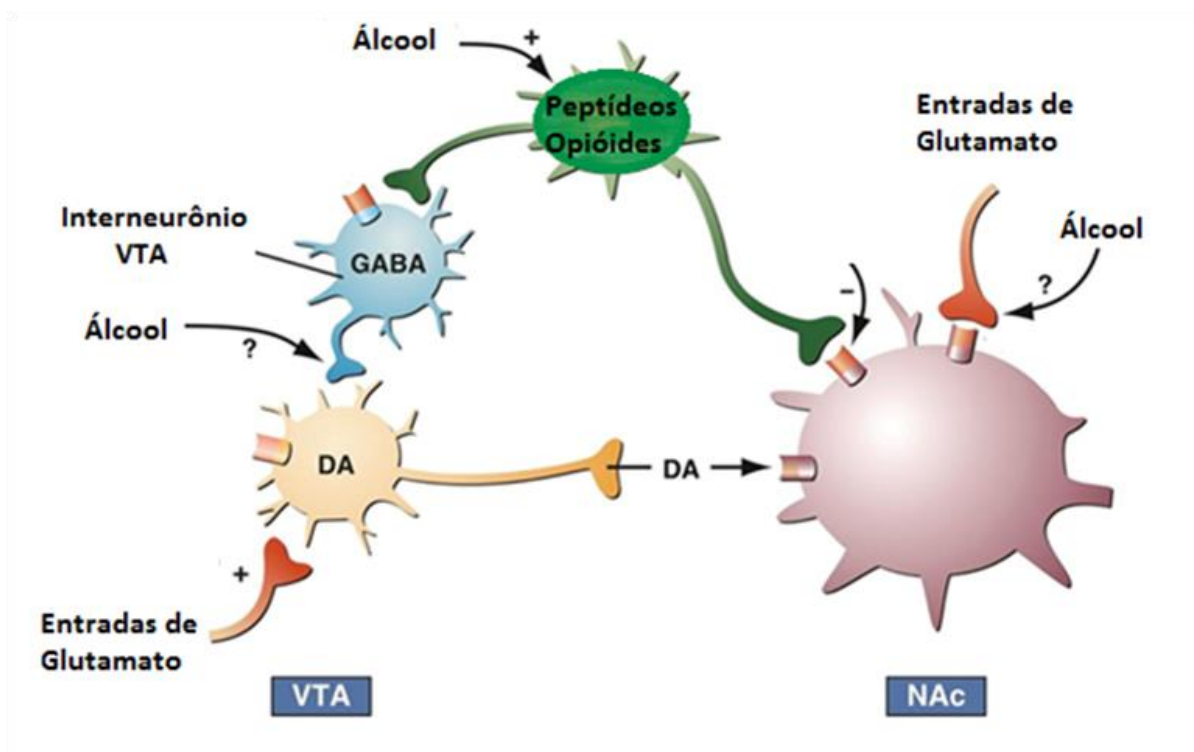


**Figura 1-** Representação esquemática do sistema mesocorticolímbico de ratos destacando as principais projeções dopaminérgicas (linhas verdes) oriundas da VTA para o NAc, BLA e Hipp. Figura adaptada de (Cruz, F. C. et al., 2013).

O etanol pode ativar o sistema mesocorticolímbico através de diferentes mecanismos. Por exemplo, devido ao bloqueio dos receptores glutamatérgicos NMDA (N-metil D-Aspartato), ou pelo aumento da ativação dos receptores GABAérgicos GABA<sub>A</sub> (ácido gama-aminobutírico), localizados nos corpos celulares de interneurônios GABAérgicos na VTA (Grace e Bunney, 1985; Mereu e Gessa, 1985; Weiner *et al.*, 1994; Fadda e Rossetti, 1998). Essas interações resultam na redução da inibição GABAérgica sobre os neurônios dopaminérgicos e conseqüentemente no aumento da liberação de dopamina no núcleo accumbens (**Figura 2**).

Estudos sugerem também que o etanol pode aumentar a ativação de neurônios opioidérgicos da VTA, responsáveis por inibir os interneurônios GABAérgicos, intensificando a transmissão dopaminérgica e aumentando a liberação de dopamina no núcleo accumbens (Gilpin e Koob, 2008) (**Figura 2**).





**Figura 2-** Ações agudas do etanol na VTA e no Nac. Figura adaptada de (Nestler, 2005).

Embora os mecanismos de ação do etanol relacionados à dependência estejam bem elucidados (Gilpin e Koob, 2008; Koob e Le Moal, 2008b), a neurobiologia da recaída ao uso de etanol não está totalmente esclarecida.

Estudos imuno-histoquímicos sugerem a participação do córtex pré-frontal medial na reinstalação da autoadministração de etanol induzida por dicas ambientais; que é caracterizada pela reexposição dos animais ao contexto em que o uso da droga foi realizado. (Zhao *et al.*, 2006; Dayas *et al.*, 2007). De fato, a reinstalação e a extinção da procura por drogas têm sido correlacionada à ativação dessas regiões corticais (Bossert *et al.*, 2013; Willcocks e McNally, 2013; Marchant *et al.*, 2015).

O córtex pré-límbico é correlacionado com a reinstalação do comportamento de busca de drogas, enquanto o infralímbico é relacionado com a extinção desse comportamento (Peters *et al.*, 2009; Van Den Oever *et al.*, 2010). Por exemplo, foi demonstrado que a inativação farmacológica do córtex pré-límbico atenuou a reinstalação da autoadministração de cocaína induzida pelo contexto (Fuchs *et al.*, 2005). Em outro estudo, Willcocks e McNally (2013) demonstram também que a inativação do córtex pré-límbico atenuou a reinstalação da autoadministração de

cervejas alcoólicas induzida pelo contexto. Por outro lado, no estudo de Muigg e colaboradores (2008), em que foi realizado a inativação farmacológica do córtex infralímbico, observou-se uma dificuldade em ocorrer a extinção da autoadministração de cocaína.

Em relação aos sistemas de neurotransmissão envolvidos na recaída ao uso de etanol, evidências sugerem a participação dos sistemas glutamatérgico, GABAérgico e CRFérgico nesse comportamento (Vengeliene *et al.*, 2008).

Neste âmbito, estudos demonstraram aumento na concentração de glutamato e o envolvimento de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) e n-metil-D aspartato (NMDA) na reinstalação da procura por etanol induzida por dicas ambientais (Backstrom e Hyytia, 2005; Sanchis-Segura *et al.*, 2006a; Knackstedt e Kalivas, 2009; Gass *et al.*, 2011). Por exemplo, foi demonstrado que a administração de antagonistas dos receptores AMPA (6-cyano-7-nitro-quinoxaline-2, 3-dione / CNQX) ou NMDA (D-2-amino-5-phosphonopentanoate / D-AP5) atenuaram a reinstalação da autoadministração de etanol induzida por dicas ambientais (Cannady *et al.*, 2013).

No que se refere a transmissão GABAérgica, foi demonstrado que a administração de alopregnanolona (agonista GABA<sub>A</sub>) foi capaz de reinstalar a autoadministração de etanol (Nie e Janak, 2003). Do mesmo modo, a administração de Muscimol (agonista GABA<sub>A</sub>) nos núcleos da rafe reinstalou a procura por etanol em ratos (Le *et al.*, 2008).

Estudos também sugerem a participação da transmissão CRFérgica nesse comportamento (Le *et al.*, 2000; Gehlert *et al.*, 2007; Marinelli *et al.*, 2007). Por exemplo, a administração de antagonistas de receptores CRFérgicos do tipo 1 bloquearam a reinstalação da autoadministração de etanol induzida por dicas ambientais ou por estresse (Le *et al.*, 2000; Gehlert *et al.*, 2007; Marinelli *et al.*, 2007).

Embora os estudos supracitados sugerem a participação dos sistemas glutamatérgico, GABAérgico e CRFérgico na reinstalação da autoadministração de etanol, nenhum estudo investigou a participação desses sistemas na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo ambiente.

### 1.5 Participação de pequenos grupamentos neurais seletivamente ativados na recaída ao uso de substâncias de abuso

A dependência de etanol e de outras drogas é caracterizada por altos índices de recaída em pacientes que tentam se manter abstinentes ao uso. Sendo que a recaída é considerada um dos principais problemas para o tratamento (Stasiewicz *et al.*, 2007).

O principal fator relacionado à recaída ao uso de etanol é a exposição do indivíduo a ambientes relacionados ao consumo dessa substância (Ludwig e Stark, 1974; Ludwig e Wikler, 1974; Mccusker e Brown, 1991; Monti *et al.*, 1993; Miller e Sanchez-Craig, 1996). Neste sentido, estudos demonstram que a exposição de etilistas abstinentes a lugares, pessoas ou contextos associados ao uso prévio de etanol, frequentemente promove recaída (Staiger e White, 1991; O'brien *et al.*, 1992; Collins e Brandon, 2002).

Ao fazer o uso repetido de uma droga de abuso, o indivíduo aprende a associar o efeito da droga aos estímulos ou as dicas ambientais presentes no momento do uso (por exemplo, a parafernália, ao ambiente e a outros usuários) (Shalev *et al.*, 2002; Shaham *et al.*, 2003; Bossert *et al.*, 2013; Cruz *et al.*, 2013). Com a exposição contínua, essa associação torna-se bastante saliente e dessa forma, a simples exposição do indivíduo a essas dicas ambientais pode desencadear a fissura, levando o usuário a buscar e recair ao uso de droga (Siegel, 1999).

A influência do ambiente na recaída ao uso de etanol pode ser estudada através do modelo de reinstalação da autoadministração operante de etanol induzida pelo contexto (modelo conhecido pelo termo em inglês "*ABA renewal*") (Fuchs *et al.*, 1998; Shalev *et al.*, 2002; Shaham *et al.*, 2003; Bossert *et al.*, 2005). Nesse procedimento, os animais são treinados a autoadministrarem uma substância de abuso em um ambiente (contexto-droga), em seguida, esse comportamento é extinto em um ambiente diferente (contexto-sem droga), que é distinto do contexto-droga em termos audiovisuais, táteis, olfatório e circadiano (período do dia). Subsequentemente, a capacidade do ambiente em reinstalar a busca por uma substância é avaliada através da exposição dos animais ao contexto onde eles foram treinados a autoadministrá-la (contexto-droga) (Fuchs *et al.*, 1998; Shalev *et al.*, 2002; Shaham *et al.*, 2003; Bossert *et al.*, 2005). Este modelo já foi utilizado para investigar a influência do ambiente na recaída a diferentes drogas, como:

cocaína, metanfetamina, heroína e etanol (Cruz *et al.*, 2013; Marchant *et al.*, 2013). Por exemplo, estudos usando o procedimento “*ABA renewal*” demonstraram que a exposição ao contexto em que os animais foram treinados a autoadministrarem etanol foi capaz de reinstalar a busca por essa substância (Burattini *et al.*, 2006; Hamlin *et al.*, 2006; Zironi *et al.*, 2006; Marchant *et al.*, 2009).

Estas associações contextuais relacionadas ao uso de drogas são uma complexa combinação de diferentes estímulos (visuais, táteis, sonoros, sensoriais e interoceptivos) que são reconhecidos com alto grau de resolução. Portanto, qualquer mecanismo capaz de armazenar este tipo de aprendizado associativo deve ter, comparativamente, alto grau de resolução (Cruz *et al.*, 2013; Cruz, Javier Rubio *et al.*, 2015).

Um dos primeiros pesquisadores a investigar a neurobiologia de aprendizados associativos foi Richard Semon (1909), que propôs que o aprendizado induz mudanças persistentes em neurônios específicos, que armazenam as informações sobre as associações realizadas e que são subsequentemente reativadas em uma condição de evocação da memória. Essa teoria ficou conhecida como *Engramas da Memória* (Semon e Simon, 1921).

Essa observação foi complementada pela teoria proposta por Donald Hebb, em 1949. Segundo essa teoria, aprendizados associativos são mediados por grupos neurais específicos esparsamente distribuídos pelo encéfalo e conectados entre si através de sinapses fortes (do inglês: “*neuronal ensembles*”). Hebb propôs que estes neurônios despolarizariam ao mesmo tempo e na mesma intensidade, frente a um determinado estímulo, que promoveria a evocação da memória. De acordo com essa teoria, diferentes tipos de memórias seriam armazenadas por diferentes grupos neurais e a evocação de uma determinada memória dependeria da ativação desse conjunto neural (Hebb, 1949). Baseado na teoria de Semon e Hebb, propuseram que memória seria armazenada em engramas celulares dispersos por várias regiões encefálicas e conectados entre si através de sinapses fortes (Tonegawa *et al.*, 2015). Essas teorias tiveram um impacto transformador nas pesquisas da neurociência moderna e são consideradas um marco conceitual para inúmeros estudos sobre aprendizagem e memória (Nicolelis *et al.*, 1997; Guzowski *et al.*, 2004; Schwindel e McNaughton, 2011).

Em 2009, o grupo do Dr. Bruce Thomas Hope (National Institute on Drug Abuse, National Institute of Health, USA) introduziram essa teoria para o estudo de comportamentos associativos relacionados a dependência de substâncias de abuso

(Koya *et al.*, 2009). Estes primeiros estudos demonstraram que apenas 4% dos neurônios do núcleo accumbens eram ativados na expressão da sensibilização locomotora contexto-específica à cocaína e que a inativação específica dessa pequena população de neurônios bloqueava a expressão da sensibilização contexto-específica (Koya *et al.*, 2009). Estas observações deram início a uma nova perspectiva para o estudo de dependência e a partir de então, outros estudos foram realizados mostrando a participação dos “*neuronal ensembles*” na formação das memórias relacionadas ao uso de substâncias de abuso (Koya *et al.*, 2009; Bossert *et al.*, 2011; Fanous *et al.*, 2012; Koya *et al.*, 2012; Cruz *et al.*, 2013; Cruz, Babin, *et al.*, 2014; Cruz *et al.*, 2015; Leao *et al.*, 2015; Pfarr *et al.*, 2015; Rubio *et al.*, 2015; Whitaker *et al.*, 2015).

Por exemplo, Cruz, Babin *et al.* (2014) demonstraram que apenas 3,4% dos neurônios do núcleo accumbens foram ativados durante a reinstalação da autoadministração de cocaína induzida pelo ambiente, e que a inibição seletiva desses neurônios atenuou a reinstalação desse comportamento.

Também foi demonstrado a participação dos “*neuronal ensembles*” em comportamentos relacionados a dependência de etanol (Leao *et al.*, 2015; Pfarr *et al.*, 2015). Neste sentido, Leao *et al.* (2015) observaram a ativação de pequenos grupos neurais específicos na facilitação do consumo excessivo de etanol promovido pela administração concomitante de nicotina. Pfarr *et al.* (2015) demonstraram que a ablação de *engramas celulares* da região infralímbica diminuiu o consumo excessivo de etanol induzido por dicas ambientais. Interessante que nenhum efeito foi observado quando a inibição foi realizada sobre todos os neurônios (ativados e não ativados) desta área (Pfarr *et al.*, 2015).

Neste contexto, estudos demonstram que os processos de aprendizado associativos relacionados a dependência a substâncias de abuso promovem plasticidades singulares apenas nesses “*neuronal ensembles*” (Guez-Barber *et al.*, 2011; Guez-Barber *et al.*, 2012; Koya *et al.*, 2012; Fanous *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Rubio *et al.*, 2015). Por exemplo, foi demonstrado que a sensibilização contexto-específica à cocaína foi relacionada a formação de sinapses silenciosas apenas em neurônios ativados durante esse comportamento (em 4% de neurônios do núcleo accumbens) (Koya *et al.*, 2012; Whitaker *et al.*, 2015). No mesmo sentido foi demonstrado que comportamentos como a sensibilização contexto-específica à cocaína, a incubação da fissura de morfina, metanfetamina e a reinstalação da autoadministração de metanfetamina produziram aumento na

expressão gênica apenas em células ativadas durante a expressão desses comportamentos (Guez-Barber *et al.*, 2011; Guez-Barber *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015; Rubio *et al.*, 2015).

Embora a hipótese sobre “*neuronal ensembles*” causou um grande impacto nas pesquisas de dependência, os estudos baseados nesta hipótese ainda representam uma pequena proporção na área da dependência de drogas.

# OBJETIVOS

*“O aprendizado nunca termina. Não existe parte da vida que não contenha lições.*

*Se você está vivo há lições para aprender. “*

*(Autor desconhecido)*

As observações anteriormente citadas apontam para a participação de pequenos grupos neurais seletivamente ativados, bem como a participação dos sistemas GABAérgico, glutamatérgico e CRFérgico na reinstalação da autoadministração de etanol. Assim, seria relevante estudar as alterações nestes sistemas em regiões corticais durante o teste de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo ambiente.

O objetivo geral dessa dissertação foi demonstrar a participação de pequenos grupos neurais seletivamente ativados no córtex pré-límbico na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo ambiente. Bem como, investigar as alterações moleculares presentes nestes “*neuronal ensembles*”.

Para tanto realizamos os seguintes experimentos:

- Avaliação do desempenho de duas linhagens de animais (ratos Wistar e Long-Evans) no protocolo de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto;
- Identificação das regiões do córtex pré-frontal envolvidas na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pela exposição ao contexto, através de técnicas imuno-histoquímica;
- Quantificação da porcentagem dos pequenos grupamentos neurais seletivamente ativados no córtex pré-frontal envolvidos na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pela exposição ao contexto;
- Identificação funcional das regiões do córtex pré-frontal envolvidas na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pela exposição ao contexto, através da inativação farmacológica reversível com Baclofen/Muscimol (agonista GABA<sub>a</sub> e GABA<sub>B</sub>, respectivamente);
- Identificação de alterações na expressão gênica nos grupos neurais seletivamente ativados no córtex pré-límbico durante a reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto, através da técnica de separação de neurônios ativados por citometria de fluxo (FACS) e realização da Reação de Polimerização em Cadeia em tempo Real (RT-PCR).



# MATERIAIS E MÉTODOS

*“Cada avanço da ciência depende de uma nova ousadia da imaginação.”*

*(Walther Waeny)*

### 3.1 Parecer ético

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo-IFSC-USP (CEP/IFSC nº 01/2015). Os experimentos foram conduzidos seguindo os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### 3.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar e Long-Evans machos (250-300g) provenientes do Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP do Campus de Araraquara. Os animais foram transferidos para o biotério do laboratório de Química Medicinal e Computacional do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC-USP) no mínimo 7 dias antes do início dos experimentos. Os animais foram mantidos em condições controladas de umidade e temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ), com ciclo claro-escuro invertido (ciclo 12/12 horas, luzes acesas às 19h) e com acesso livre a alimento e água.

### 3.3 Substâncias

- Etanol 96% (Synth) - 10%;
- Flunexina Meglumina (Schering-Plough) - 0.025 mg/kg, i.m;
- Pentabiótico (Fort Dodge) - 0.027 mg/kg, i.m;
- Tribromoetanol (Sigma-Aldrich) - 250 mg/kg, i.p;
- Baclofen (Tocris Biosciência) - 0.03 nmol/0.5 µl/lado;
- Muscimol (Tocris Bioscience) - 0.03 nmol/0.5 µl/lado;
- Sacarina (Sigma) - 0,2% e 0,05%.

### 3.4 Caixa de autoadministração operante de etanol

Foram utilizadas caixas operantes de autoadministração (Med Associates®, St. Albans, VT, EUA), com duas barras retráteis localizadas 4 cm do chão e lateralmente distantes 4,5 cm do bebedouro central. As caixas possuíam um bebedouro que permitia o acesso a solução após a barra ativa ser pressionada. O bebedouro estava conectado a uma seringa conectada a uma bomba de infusão

(Razel, Stamford®, CT, EUA). O registro das respostas operantes e subsequente disponibilidade da solução foram controlados por um programa (MED\_PC\_IV) instalado a um computador que estava conectado às bombas de infusão e às caixas operantes. As caixas estavam individualmente alocadas em uma caixa de madeira com ventilação e isolamento acústico para minimizar possíveis distúrbios ambientais (**Figura 3**).



**Figura 3-** Caixa operante de autoadministração de drogas (Med Associates®, St. Albans, VT, EUA).

### 3. 5 Protocolo de autoadministração

O procedimento experimental consistiu em três etapas: Treino (24 dias), Extinção (8 dias) e teste de reinstalação da autoadministração operante de etanol (1 dia). O protocolo experimental foi adaptado de Marchant *et al.*, (2013) (**Figura 4**).

#### 3.5.1 Treino da autoadministração de etanol

Para a adaptação ao sabor de etanol e facilitação do aprendizado do comportamento operante, os ratos tiveram acesso, em suas gaiolas moradia, a duas garrafas, uma contendo etanol 20% e outra contendo água, durante 5 dias.

A primeira parte do treino, para a aquisição da autoadministração, consistiu de 1 sessão diária de 60 minutos em esquema de reforço de razão fixa 1 (RF1). Durante esta etapa de treino, cada resposta na barra ativa resultava na ativação da bomba de infusão com rotação de 15 rpm que disponibilizava 0,1 ml de uma solução reforçadora em 3,5 segundos, com um período de inativação de 10 segundos (*time out*). Durante essa inativação as pressões nas barras eram registradas, porém não havia liberação da solução reforçadora. Cada reforço foi pareado com dicas: som (900 Hz; 20 dB) e luz (7.5 W) por 2,3 s. A iluminação da caixa de autoadministração e a inserção da alavanca ativa na caixa foram usadas para sinalizar o início das sessões. Durante as sessões, uma barra inativa também era apresentada, porém, a pressão nessa barra não resultava na liberação de um reforço (as pressões na barra inativa também foram registradas e utilizadas como critério de aprendizado). O treino foi iniciado com quatro sessões em que as respostas eram reforçadas com uma solução de 0,2% de sacarina. Seguido por 2 sessões em que as respostas eram reforçadas com uma solução mista de 0,2% de sacarina e etanol 10%, e outras 2 sessões com reforços de uma solução mista de 0,05% de sacarina e etanol 10%. Por fim, foram realizadas 6 sessões de 60 minutos em que cada pressão na barra ativa foi reforçada com uma solução contendo apenas 10% de etanol.

Na segunda parte do treino, os animais foram submetidos a dez sessões de intervalo variável (IV) de reforço de etanol 10%, com o tempo de inativação da barra ativa variando de 0 a 30 segundos de maneira aleatória. Imediatamente, após o final da última sessão de intervalo variável, amostras de sangue (50 µl) foram recolhidas da cauda dos diferentes animais. Os níveis sanguíneos de álcool foram analisados pelo sistema enzimático [Analisador AM1 (Analox Instruments Ltd, Londres, Reino Unido)] com base em medição do consumo de oxigênio na reação etanol-acetaldeído a fim de observar a quantidade de etanol sanguínea em cada animal. O treino foi realizado em um ambiente (caixa de autoadministração) que denominamos de “Contexto A”.

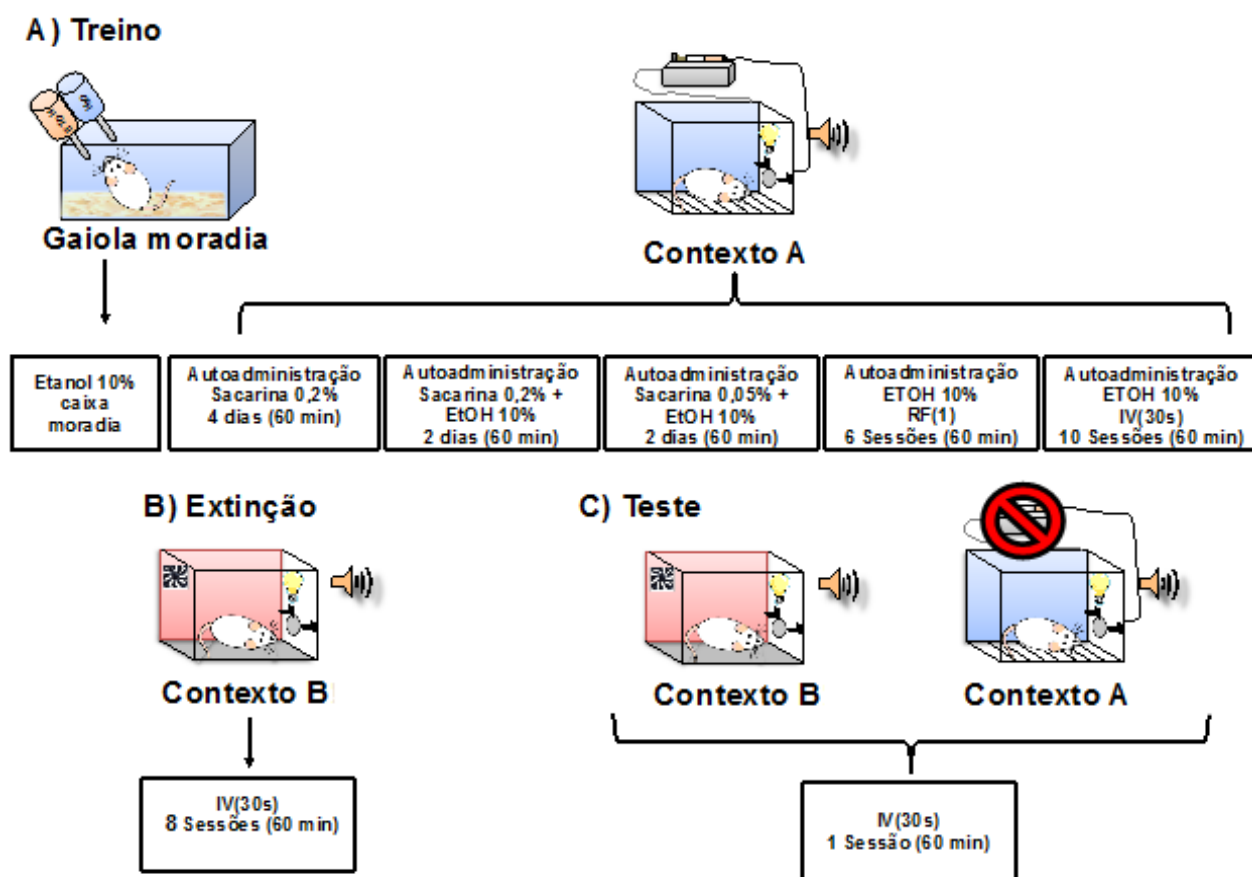
### 3.5.2 Extinção

Após o treino da autoadministração de etanol, os animais foram submetidos ao processo de extinção do comportamento. A extinção consistiu de 1 sessão diária de 60 minutos por no mínimo 8 dias consecutivos nos mesmos parâmetros do treino no intervalo variável. Entretanto, durante a fase de extinção, cada pressão na barra

ativa continuou sendo registrada, porém não foi mais reforçada pela liberação de etanol. As dicas discriminativas (luz, som da bomba e sinal sonoro que sinalizava a liberação do reforço) continuaram a serem apresentadas. Essa fase foi realizada em um ambiente (caixa de autoadministração) com diferenças táteis, visuais, sonoras e circadianas do ambiente da fase de treino, e foi denominado de “Contexto B”. A autoadministração foi considerada extinta quando os ratos pressionaram a barra menos de 20% em relação à média da fase de intervalo variado e quando as pressões nas barras ativas foram similares ao número de pressões na barra inativa.

### **3.5.3 Teste**

O teste foi realizado 24 horas após a última sessão de extinção do comportamento de autoadministração e constituiu na exposição de parte dos animais ao contexto B (grupo controle) e parte ao contexto A (grupo experimental) nos mesmos parâmetros da fase do treino, no intervalo variável, por 30 minutos. As pressões nas barras ativas foram registradas pelo programa, porém não resultaram na liberação de etanol.



**Figura 4-** Protocolo de autoadministração operante de etanol e suas diferentes fases: A) Treino; B) Extinção; C) Teste. Figura elaborada pela própria autora.

### 3.6 Cirurgia intracraniana

Os ratos foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg, i.p.) e colocados em um estereotáxico. Cânulas guia (23 gauge Master One, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) foram implantadas bilateralmente 1 mm acima do córtex pré-límbico e fixadas com parafusos e um capacete de acrílico. Utilizamos coordenadas estereotáxicas baseadas no Atlas Paxinos e Watson (2005) e no artigo Willcocks e McNally (2013), com as medidas: AP + 3,0 mm, ML  $\pm$  1,5mm (ângulo 10°), DV - 3,0 mm. Após a cirurgia, para evitar infecção e promover analgesia, os ratos foram tratados com uma formulação de poli-antibiótico estreptomicina e penicilina (0,027 mg/kg, i.m, Pentabiotico, Fort Dodge, Campinas, SP) e com anti-inflamatório não-esteroidal flunixinina/meglumina (0,025 mg/kg, i.m, Banamina, Schering-Plough, Cotia, SP, Brasil). Os animais permaneceram em repouso durante 5 dias para sua recuperação e assim retornaram a autoadministração. Realizamos mais uma sessão de etanol 10% no intervalo variável para certificar de que a cirurgia não causou prejuízos motores.

### 3.7 Injeções intracranianas e histologia

Quinze minutos antes do teste de reinstalação os animais receberam injeções bilaterais de uma mistura de Baclofen (0,3 nmol) e Muscimol (0,03 nmol) ou veículo com uma taxa de infusão de 0,5ul/min em cada hemisfério. Para administração utilizamos tubos de polipropileno (10mm diâmetro) conectados a seringas Hamilton de 2ul anexadas a uma bomba de infusão de drogas. As agulhas injetoras penetraram 1mm abaixo da cânula guia e foram injetadas e mantidas ao longo de 1 minuto. As doses foram baseadas em estudos anteriores (Mcfarland e Kalivas, 2001; Bossert *et al.*, 2011; Cruz, Babin, *et al.*, 2014).

Para mostrar que a mistura de Baclofen/Muscimol não causou prejuízos motores, os animais foram submetidos a um treino de autoadministração operante em que o reforço recebido foi de sacarina 0,2% (FR1 com 20s, 1 h/dia) por 5 dias. No sexto dia, administramos Baclofen/Muscimol ou veículo (como descrito acima), quinze minutos antes da última sessão de autoadministração de sacarina. Avaliamos o número de pressões na barra ativa e na barra inativa.

Após o teste comportamental, os ratos receberam uma supra dosagem de tribromoetanol (500 mg/kg, i.p.) e os encéfalos foram perfundidos (como descrito no experimento anterior), removidos, congelados e seccionados coronariamente a 40µm de espessura utilizando um criostato (Leica). Todas as secções contendo cânulas foram colocadas em lâminas de vidro, corados com cresil-violeta e cobertos com uma lamínula com auxílio de Permount (Sigma). As secções foram examinadas em microscopia óptica para determinar a localização das cânulas.

### 3.8 Imuno-histoquímica

Após o teste comportamental, os animais foram anestesiados profundamente com tribromoetanol (250 mg/kg, i.p.) e perfundidos com 100 mL de tampão fosfato de sódio (PBS) (3,2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 7,1 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 9,1 g de NaCl em 100 mL de água destilada) seguido de 400 mL de paraformaldeído 4% (4 g de NaOH; 4 g de paraformaldeído; 16,58 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Os encéfalos foram pós-fixados em paraformaldeído 4% por duas horas, transferidos para solução de sacarose 30% e armazenados a 4°C por 2 dias. Então, foram congelados em gelo seco por 1 hora e mantidos à -80°C até serem fatiados. Os encéfalos foram fatiados em fatias coronais

de 40 µm de espessura seguindo as coordenadas de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2005).

As fatias coronais contendo as regiões cerebrais de interesse (córtex pré-frontal pré-límbico, infralímbico e cingulado) foram lavadas 3 vezes com PBS e em seguida incubadas com solução bloqueadora (soro de cabra 3%; Triton X-100 0,25% dissolvidos em PBS) por uma hora à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as fatias foram incubadas com anticorpo primário, diluído 1:4000 (c-Fos; número do catálogo: sc-52; coelho; Santa Cruz biotechnology), em solução bloqueadora por 24 horas a 4°C. Após essa incubação, as fatias foram lavadas com PBS, por 3 vezes, e incubadas com um anticorpo secundário anti-coelho biotinilado diluído 1:600 (BA 1000; Vector Labs) em PBSTx (Triton X-100 0,25% e soro de cabra 3%), por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, elas foram lavadas com PBS por 3 vezes e incubadas por 1 hora em solução de avidina-biotina- peroxidase, preparada em PBS contendo Triton X-100; 0,5%. Finalmente, as fatias foram lavadas por 3 vezes e incubadas em 3,3'-diaminobenzidina por aproximadamente 8 minutos. Na sequência, foram lavadas 5 vezes e transferidas para solução de PBS e montadas em lâminas gelatinizadas com gelatina e alumínio crômico. Quando secas as lâminas foram desidratadas, utilizando um gradiente seriado de titulações crescentes de etanol (água destilada; etanol: 30%, 60%, 90%, 95% e 100%) e Xilol. Foram cobertas com *Permount* e lamínulas. A imuno-marcação de Fos, que é considerada um marcador de ativação neural (Hope *et al.*, 2006; Mattson *et al.*, 2007), foi capturada através de uma câmera acoplada a um microscópio (Zeiss Axio Imager D2®) e quantificada através do programa Ivision Eval (Biovision).

### 3.9 Dupla marcação por Imunofluorescência

Para este ensaio, nós utilizamos uma parte dos cortes que foram utilizados para os ensaios de Fos descritos acima (4 ratos de cada grupo - A,B e C). Os ratos foram perfundidos e seus encéfalos processados como descrito anteriormente. Os encéfalos foram mantidos a -80°C até serem fatiados. As regiões de interesse foram obtidas segundo as coordenadas obtidas de acordo com Paxinos e Watson (2005).

As fatias coronais com as regiões encefálicas das sub-regiões do córtex pré-frontal medial foram lavadas três vezes com tampão tris-NaCl (TBS) (29 g de NaCl; 50 mL de Tris-HCl pH 8,0 1M em 1 L de água destilada) e em seguida permeabilizadas com Triton X-100 0,2% (dissolvido em TBS). Foram realizadas mais



três lavagens com TBS e então as fatias foram incubadas com os anticorpos primários anti-Fos (c-Fos; número do catálogo: sc-52; coelho; Santa Cruz biotechnology) e anti-NeuN (1:2000, catálogo: MAB37, EMD Millipore), diluídos em TBS com Triton X-100 0,3%, por 24 horas a 4°C. Posteriormente, as fatias foram lavadas três vezes com TBS e incubadas com os anticorpos secundários, diluídos em TBS, por 1 hora a temperatura ambiente. Foram utilizados os anticorpos secundários Alexa Fluor 488, anti-coelho, produzido em macaco, (diluição 1:200, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e Alexa Fluor 568, anti- camundongo, produzido em cabra (diluição 1:200, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Finalmente, as fatias foram lavadas três vezes com TBS e as lâminas foram montadas em lâminas gelatinizadas com gelatina e alumíni-crômico e cobertas com lamínulas com auxílio de *VectaShield hard-set mounting media* (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, EUA). A fluorescência foi detectada através de uma câmera acoplada a um microscópio (Zeiss Axio Imager D2®) e quantificada através do programa Ivision Eval (Biovision).

### 3.10 Separação de neurônios ativados por citometria de fluxo (FACS)

Esse procedimento foi adaptado de Guez-Barber *et al.*(2011); Guez-Barber *et al.*(2012a); Fanous *et al.* (2013); Rubio *et al.* (2015).

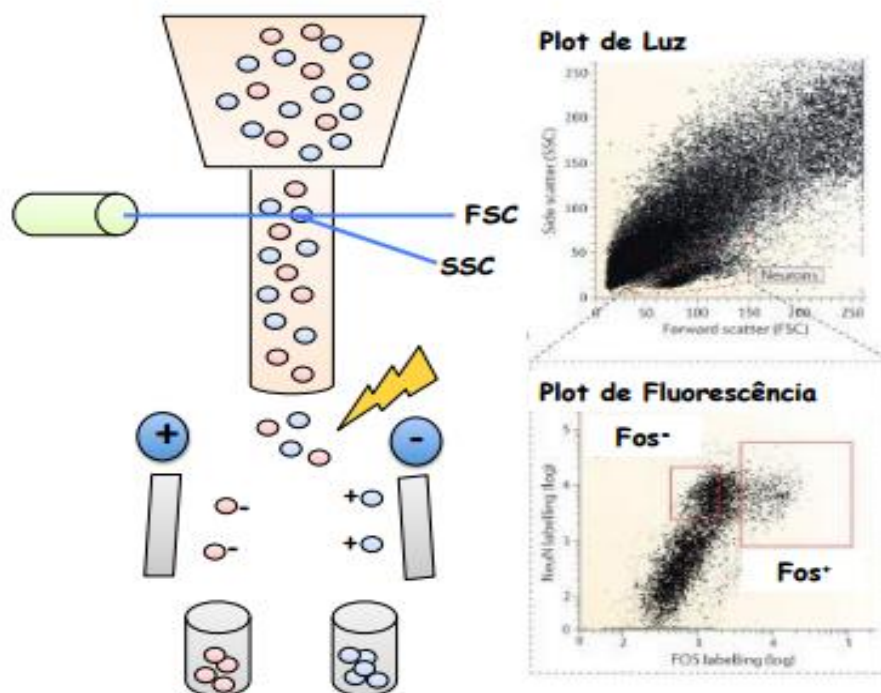
Imediatamente após o teste comportamental, os animais foram transferidos individualmente para uma sala com temperatura controlada entre 20 e 24°C para decapitação. A decapitação foi realizada com auxílio de uma guilhotina. Os cérebros foram colocados em nitrogênio líquido e depositados em gelo seco. Então foram armazenados a -80 °C até serem fatiados. Os encéfalos foram fatiados no criostato sob temperatura de -15 a -20°C, seguindo-se as coordenadas estereotáxicas para ratos do atlas de Paxinos e Watson (2005). O córtex pré-frontal foi dissecado por meio de agulhas de ponta chata de 14-16 gauge (**Figura 6**), e colocado em tubos criogênicos. Os tubos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C, para posterior análise da expressão gênica por RT-PCR.

As amostras foram descongeladas em um tampão de hibernação celular (Hibernate A-Thermo Fisher Scientific-A12475-01). Em seguida, as amostras foram transferidas para uma placa de vidro, pré-resfriada em gelo e 2 gotas do tampão de hibernação foram depositadas sobre o tecido celular. A região de interesse foi lacerada 100 vezes em cada posição ortogonal com o auxílio de uma lâmina de aço

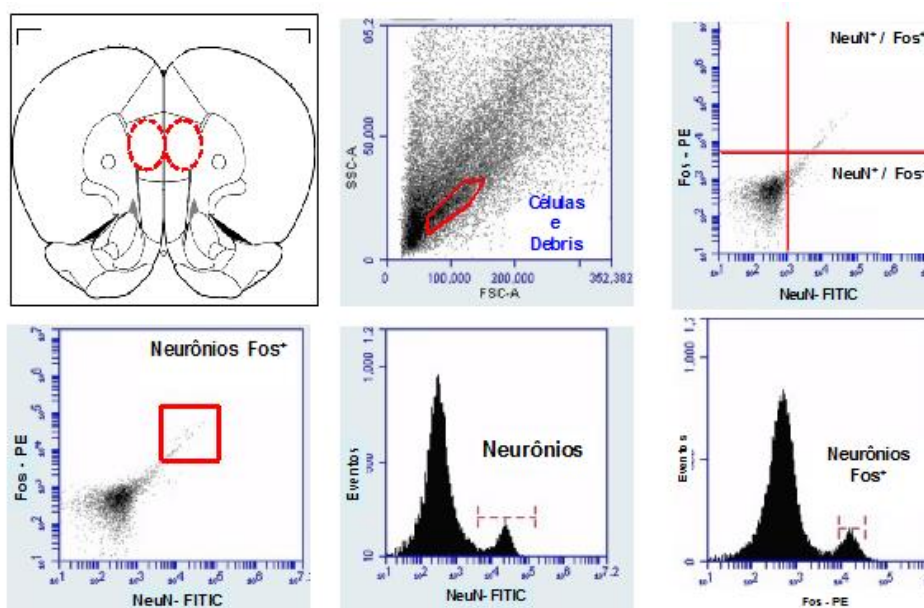
(pré-resfriada em gelo). O tecido lacerado foi transferido para um tubo contendo 1ml do tampão de hibernação. As amostras foram centrifugadas a 1.000 rpm por 2 min à 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi removido e 1 ml de uma solução resfriada (4°C) de *accutase* (Sigma-Aldrich-A6964) foi adicionado a amostra. Com auxílio de uma micropipeta de 1000ul, o pellet foi homogeneizado e a amostra foi incubada a 4°C sob rotação de 360°. Então, os tubos foram centrifugados a 3.000 rpm por 2 min a 4°C. O sobrenadante foi removido e o pellet resuspendido em 0,6ml do tampão de hibernação. As células foram trituradas 3 vezes sucessivamente com pipetas de *Pauster* com diâmetros diferentes (1,3; 0,8 e 0,4 mm), nessa etapa as células foram dissociadas. Após a dissociação, as células foram fixadas e permeabilizadas com etanol 50% (resfriado a -20°C), por 15 minutos em rotação de 360°. As amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 2 min a 4°C, o sobrenadante removido e o pellet foi resuspendido em 500ul de tampão de fosfato sódico. Em seguida, as amostras foram filtradas em filtros de 100um e 40um, sucessivamente. Após a filtração, as células foram incubadas com anticorpos conjugados a fluoróforos, anti-NeuN-PE (1:500; Millipore) e anti-Fos-647 (1:100; Santa Cruz) por 30 minutos a 4°C em rotação de 360°. As células foram lavadas com tampão de fosfato de sódio e centrifugadas a 3.000 rpm por 3 min a 4°C. O sobrenadante foi removido e o pellet foi resuspendido em tampão fosfato de sódio. As amostras foram mantidas em gelo até a separação no citometro de fluxo (**Figura 5**). Foram coletadas no máximo 5000 eventos Neun-positivos e todos os eventos Fos-positivo.

Os seguintes parâmetros foram utilizados:

- PMT: Foward Scatter: 370V
- PMT: Side Scatter: 440V
- PMT: FITIC:455V
- PMT: PE:430V
- Foward Scatter linear: 5.000
- Máximo de neurônios coletados: 5.000



**Figura 5** - Desenho esquemático da citometria de fluxo. Nessa técnica, neurônios passam individualmente por um capilar e ao passar pelo ponto de interrogação são excitadas por lasers e a característica de dispersão lateral da luz, assim como o grau de marcação de cada marcador fluorescente são detectados por filtros e então quantificados por um programa específico. Ao chegar no final do capilar uma carga é conferida as células de acordo com sua fluorescência e assim as células, conforme sua carga, são atraídas e separadas por placas carregadas positivamente ou negativamente e coletadas em um tubo. Figura elaborada pela própria autora.



**Figura 6**- FACS de neurônios do córtex pré-frontal pré-límbico. Separação de neurônios ativados durante o teste de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto.

### 3.11 Extração do RNA e Síntese do c-DNA e Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real (rt-PCR)

Utilizamos a pré-amplificação multiplex com estratégia previamente descrito por Liu *et al.* (2014). As células separadas por FACS foram coletadas diretamente em 50ul de tampão de extração do PicoPure RNA isolation kit (Arcturus Bioscience) e foram lisadas com auxílio de micropipetas de 10ul. Em seguida, foi realizada uma incubação a 42°C por 30 minutos. A suspensão foi centrifugada a 1000xg a 4°C por 2 minutos e o sobrenadante foi coletado para o isolamento do RNA. O RNA foi filtrado em colunas, lavado e eluído conforme recomendação do Kit (PicoPure RNA isolation). Fitas simples de c-DNA foram sintetizadas com o Kit Superscript III first strand cDNA synthesis (Invitrogen, Life Technologies), de acordo com o fabricante do kit. O Kit TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies) foi utilizado para a pré-amplificação do c-DNA. Utilizamos 80nM de primers customizados (tabela 1). E então, 2 microlitros de cada c-DNA foi misturado com 5,5 ul de primers e 7,5 uL da solução de TaqMan PreAmp Master Mix 2x concentrada. Os c-DNAs foram pré-amplificados em um termociclador utilizando a seguinte programação: 95°C por 10 min; 14 ciclos de desnaturação a 90°C por 15 s; ciclo de anelamento e extensão a 60°C por 4 min. Os produtos de PCR foram diluídos 5 vezes com água de padrão de biologia molecular e armazenada a -20°C. qPCR duplex ensaio foi realizado em duplicata utilizando uma sonda marcada com Fm para cada gene alvo e uma outra marcada com Vic para o gene controle (*Pde10a*). Para esse ensaio foi utilizado o kit TaqMan Advanced Fast PCR Master Mix (Life Technologies). *Pde10a* foi utilizado, pois esse gene é relativamente abundante e não foi alterado em experimentos de reinstalação da autoadministração de drogas induzida pelo contexto (Rubio *et al.*, 2015). O programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) foi utilizado para selecionar os primers e sondas utilizados na pré-amplificação e qPCR (os primers codificavam junções exon-exon de cada gene alvo). qPCR foi realizado utilizando a seguinte programação: 95°C por 20s, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 3s, anelamento e extensão a 60°C por 30s. A expressão relativa obtida dos valores de Ct foi calculada utilizando a seguinte fórmula:  $\Delta Ct = Ct (\text{gene alvo}) - Ct (Pde10a)$ . Para obter os valores que refletem a expressão relativa dos genes, dividimos o valor da expressão gênica de cada animal pela média da expressão gênica da amostra Fos-negativa obtendo os valores em porcentagem (Guez-Barber *et al.*, 2011).

**Tabela 1-** Genes escolhidos para serem analisados pelo rtPCR.

<b>Genes</b>
<b>Pde10A</b>
<b>GluR1</b>
<b>GluR2</b>
<b>Gaba<math>\alpha</math>2</b>
<b>Gaba<math>\alpha</math>5</b>
<b>CRF</b>

# DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

*“Todo conhecimento é uma resposta a uma pergunta.”*

*(Gaston Bachelard)*

## **4.1 Padronização do protocolo de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto: comparação entre ratos Wistar e Long-Evans**

### **4.1.1 Objetivo:**

Padronização do protocolo de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto. Para tanto, avaliamos o desempenho de duas linhagens distintas de animais (ratos Wistar *versus* Long-Evans).

### **4.1.2 Procedimento Experimental:**

Utilizamos o protocolo experimental da autoadministração de etanol induzida pelo contexto descrito no item 3.5. Foram utilizados 34 ratos, sendo 17 da linhagem Wistar e 17 da linhagem Long-Evans. Brevemente, os diferentes grupos foram treinados para administrar etanol (1h/dia) no contexto A. Então o comportamento da autoadministração foi extinto no contexto B (1h/dia). A reinstalação foi avaliada expondo metade do número de animais no contexto A e a outra metade no contexto B. Após o procedimento, os animais foram eutanasiados.

### **4.1.3 Análise estatística:**

Os valores foram representados pela a média  $\pm$  o erro padrão da média. Os dados comportamentais do Teste foram analisados por ANOVA (bifatorial), considerando os fatores linhagens (Wistar x Long-Evans) e contexto (Contexto B x Contexto A), seguida pelo teste de Newman-Keuls.

## **4.2 Identificação e caracterização das regiões do córtex pré-frontal-medial ativadas durante o teste de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto**

### **4.2.1 Objetivo:**

Caracterizar as regiões do córtex pré-frontal envolvidas na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto. Além disso, nós determinamos a proporção de neurônios ativados durante o teste de reinstalação da autoadministração de etanol. Para tanto, utilizamos a dupla marcação para a proteína Fos (marcador de ativação neuronal) e uma proteína expressa especificamente em neurônios chamada de proteína nuclear específica de neurônios (NeuN) (Mullen *et al.*, 1992; Mattson *et al.*, 2007).

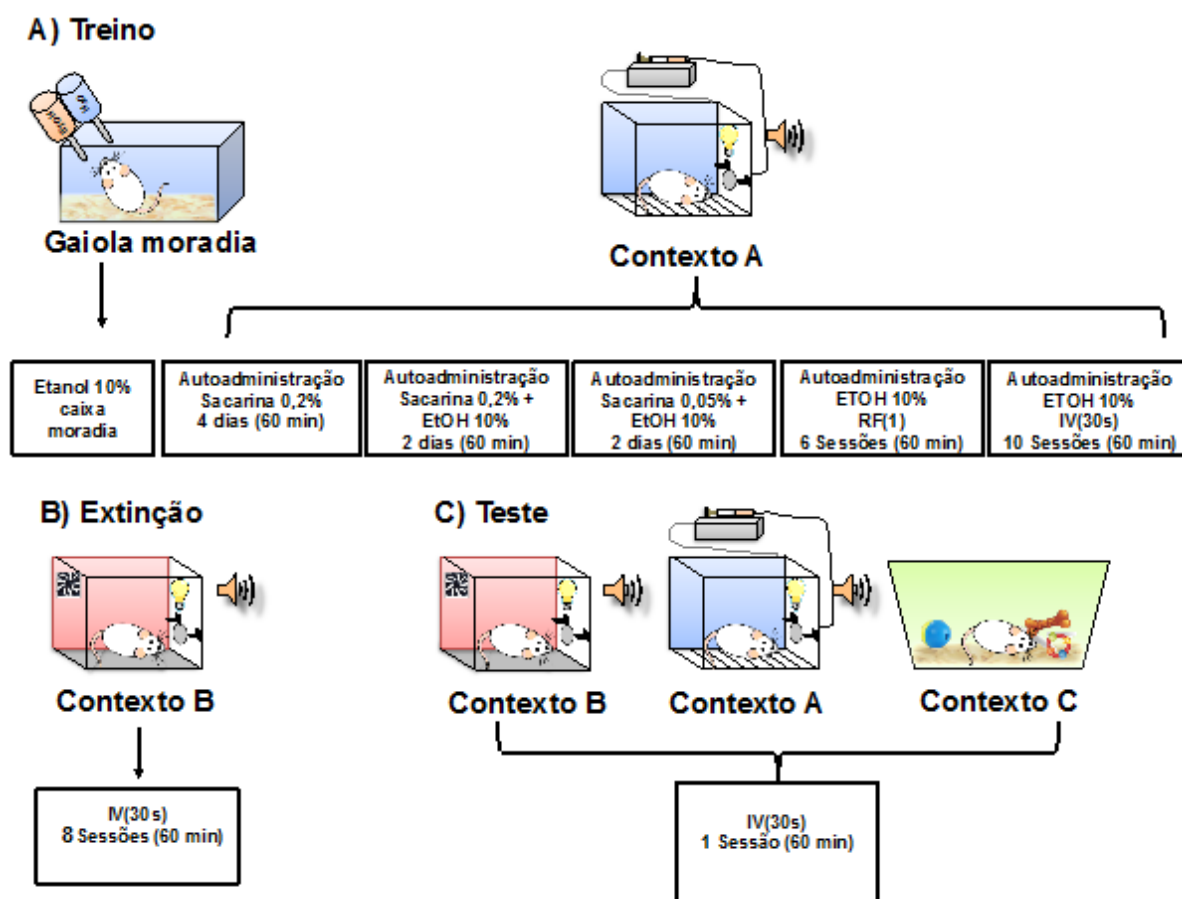
#### **4.2.2 Procedimento Experimental:**

O procedimento experimental consistiu em três etapas: treino, extinção e teste de reinstalação da autoadministração operante de etanol como descrito no item 3.5. Utilizamos 43 ratos Long-Evans machos (14 animais para o grupo A, 14 para o grupo B e 9 animais para o grupo C).

O teste foi realizado 24 horas após a última sessão de extinção do comportamento de autoadministração e consistiu na exposição de parte dos animais ao contexto B (grupo controle) ou ao contexto A (grupo experimental) e um terceiro grupo foi exposto a um contexto totalmente novo (caixa diferente da de autoadministração de etanol) o qual denominamos de “Contexto C” (**Figura 7**). Este contexto foi utilizado como grupo controle de ativação inespecífica de Fos.

Após a análise comportamental, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg, i.p.). Em seguida os animais foram perfundidos conforme descrito no item 3.8. Os encéfalos foram fatiados e as fatias coronais contendo córtex pré-frontal foram processadas para as técnicas de imuno-histoquímica e dupla marcação conforme descrito nos itens 3.8 e 3.9.





**Figura 7-** Protocolo esquemático do (A) treino de aquisição, (B) extinção e (C) contexto novo no teste de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto. Figura elaborada pela própria autora.

#### 4.2.3 Análise estatística:

Os valores foram representados pela a média  $\pm$  o erro padrão da média. Os dados comportamentais do Teste foram analisados por ANOVA (bifatorial), considerando os fatores barra (Inativa x Ativa) e contexto (Contexto B x Contexto A), seguida pelo teste de Newman-Keuls. Os dados moleculares foram analisados por ANOVA bifatorial, considerando os fatores região (Cingulado x Pré-Límbico x Infralímbico) e contexto (Contexto B x Contexto A), seguida pelo teste de Newman-Keuls.

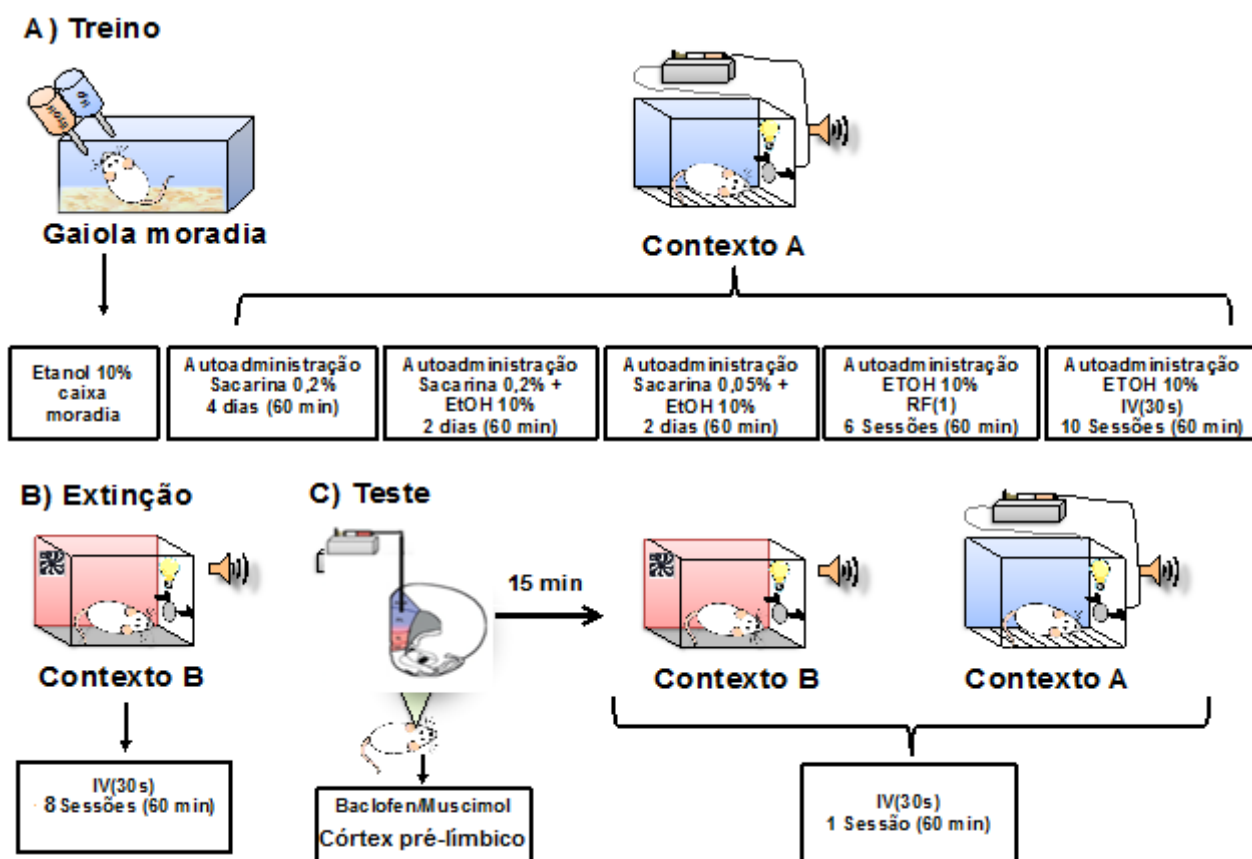
### **4.3 Investigação funcional da participação do córtex pré-límbico na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto**

#### **4.3.1 Objetivo:**

O objetivo desse experimento foi investigar a participação funcional do córtex pré-límbico na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto. Utilizamos a técnica de inibição farmacológica reversível promovida pelos fármacos Muscimol/Baclofen (antagonista GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub>, respectivamente) descrita previamente por Mcfarland e Kalivas (2001).

#### **4.3.2 Procedimento experimental:**

Neste experimento foram utilizados 31 ratos Long-Evans machos (N=6-9 ratos por grupo). O procedimento experimental consistiu em três etapas: treino, extinção e teste de reinstalação da autoadministração operante de etanol conforme descrito anteriormente no item 3.5. Entretanto, após seis sessões de intervalo variável, os animais foram submetidos ao processo cirúrgico para a implantação de cânulas bilaterais no córtex pré-frontal (conforme descrito no item 3.6). Após a cirurgia, os animais foram mantidos em repouso durante 5 dias para sua recuperação. Ao término desse período retornaram para as sessões de treino da autoadministração. Foram realizadas 2 sessões de etanol 10% de intervalo variável seguidas de 8 sessões de extinção. Quinze minutos antes do teste de reinstalação, os animais receberam injeções de Baclofen/Muscimol no córtex pré-límbico como descrito no item 3.7.



**Figura 8** - Protocolo esquemático do (A) treino de aquisição, (B) extinção e (C) Injeção de Baclofen/Muscimol e teste de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto. Figura elaborada pela própria autora.

#### 4.3.3 Análise estatística:

Os valores foram representados pela a média  $\pm$  o erro padrão da média. Os dados comportamentais do Teste foram analisados por ANOVA (bifatorial), considerando os fatores fármaco (Muscimol/Baclofen x Veículo) e contexto (Contexto B x Contexto A), seguida pelo teste de Newman-Keuls.

#### 4.4 Análise das alterações na expressão gênica de neurônios ativados do córtex pré-límbico durante a reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto

##### 4.4.1 Objetivos:

Análise de alterações na expressão gênica em “neuronal ensembles” relacionados a reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto.

A análise foi realizada através da metodologia de separação de neurônios ativados por citometria de fluxo (FACS) e da Reação de Polimerização em Cadeia em tempo Real (RT-PCR).

#### **4.4.2 Procedimento Experimental:**

Vinte e cinco animais (n=12-13 animais por grupo) foram submetidos as etapas de treino, extinção e teste de reinstalação da autoadministração operante de etanol, como descrito no item 3.5. Imediatamente após o teste de reinstalação, os encéfalos foram removidos e congelados em nitrogênio líquido/ gelo seco e armazenados em freezer -80°C. Com auxílio de um criostato as regiões encefálicas de interesse foram removidas e armazenadas a -80°C até a análise das amostras por FACS e RT-PCR como descrito nos itens 3.10 e 3.11.

Os genes analisados foram: GluR1, Glur2, GABA $\alpha$ 2, GABA $\alpha$ 5 e CRF.

#### **4.4.3 Análise estatística:**

Os valores foram representados pela a média  $\pm$  o erro padrão da média. Os dados comportamentais do Teste foram analisados por ANOVA (bifatorial), considerando os fatores barra (Inativa x Ativa) e contexto (Contexto B x Contexto A), seguida pelo teste de Newman-Keuls. Os dados moleculares foram analisados por ANOVA bifatorial, considerando os fatores estado de ativação (Fos negativo x Fos positivo) e contexto (Contexto B x Contexto A), seguida pelo teste de Newman-Keuls.

# RESULTADOS

*“O mais importante de tudo é nunca deixar de se perguntar.  
A curiosidade tem sua própria razão de existir.”*

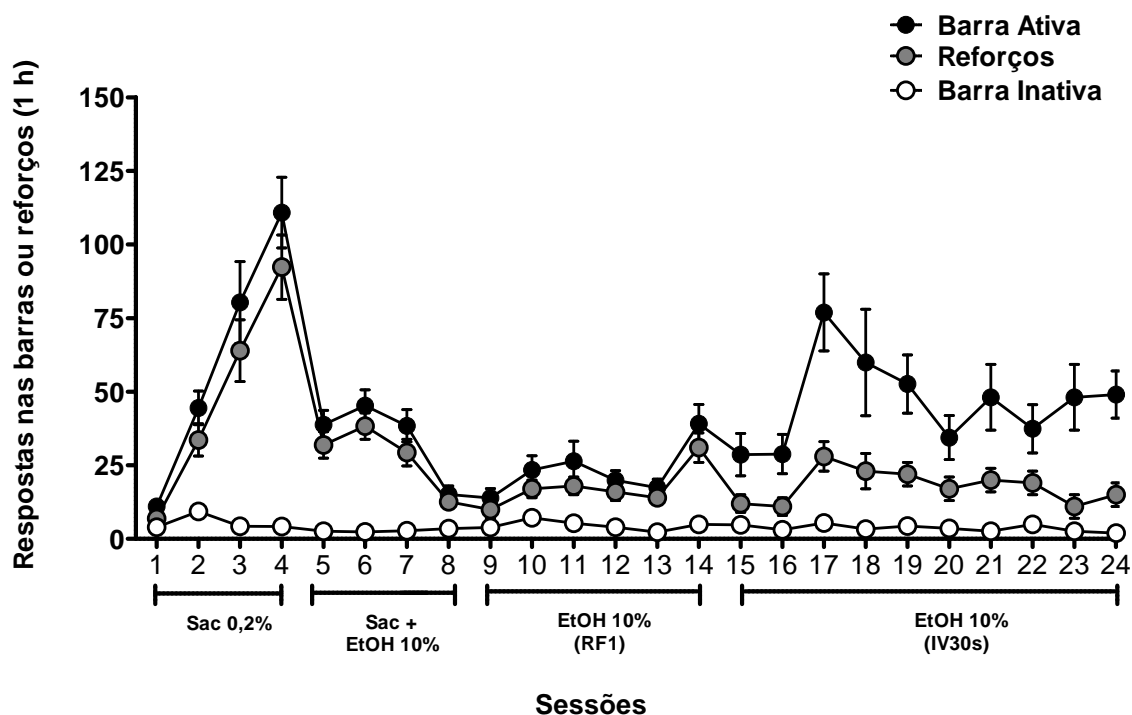
*(Albert Einstein)*

### 5.1 Padronização do protocolo de reinstalação da autoadministração etanol induzida pelo contexto: comparação entre ratos Wistar e Long-Evans

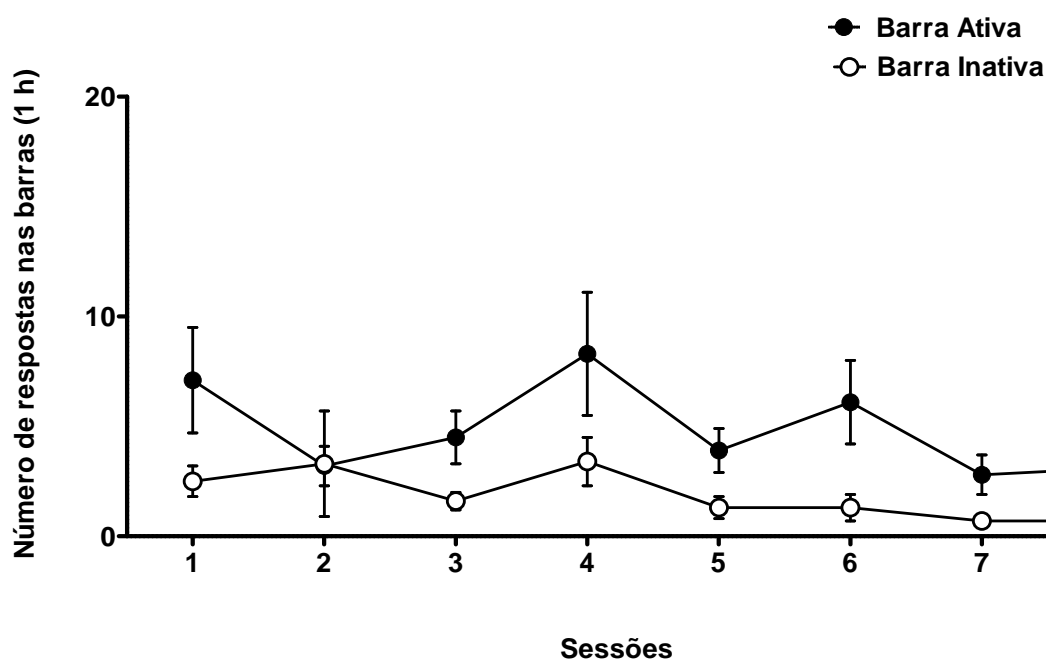
A **figura 9** representa as médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de respostas nas barras ativa e inativa, bem como dos reforços durante a fase de treinamento da autoadministração operante de etanol de ratos Wistar. Nossos resultados demonstraram que o número de respostas na barra ativa foi superior ao número de respostas na barra inativa durante todo o treino, indicando que a aquisição do comportamento operante de autoadministração de etanol foi bem-sucedida ( $p < 0,05$ ).

Observamos comportamento ascendente do número de respostas na barra ativa e do número de reforços nas sessões de autoadministração de sacarina 0,2%, seguido de queda nas sessões em que etanol foi adicionado. Já nas sessões de RF1 e IV, o número de respostas e reforços aumentaram progressivamente. Comparado ao esquema RF1, a introdução do intervalo variado promoveu aumento no número de respostas na barra ativa, sem aumentar o número de reforços.

A **figura 10** mostra as médias  $\pm$  EPM de respostas nas barras ativa e inativa durante a extinção do comportamento da autoadministração de etanol em ratos Wistar. Nossos resultados demonstraram que o número de respostas na barra ativa diminuiu ao longo da extinção igualando-se as respostas nas barras inativas no final dessa etapa, demonstrando assim que o comportamento operante foi extinto. O número de respostas na barra inativa permaneceu constante durante todo o protocolo mostrando que os animais associaram o recebimento da recompensa com a emissão da resposta apenas da barra ativa.



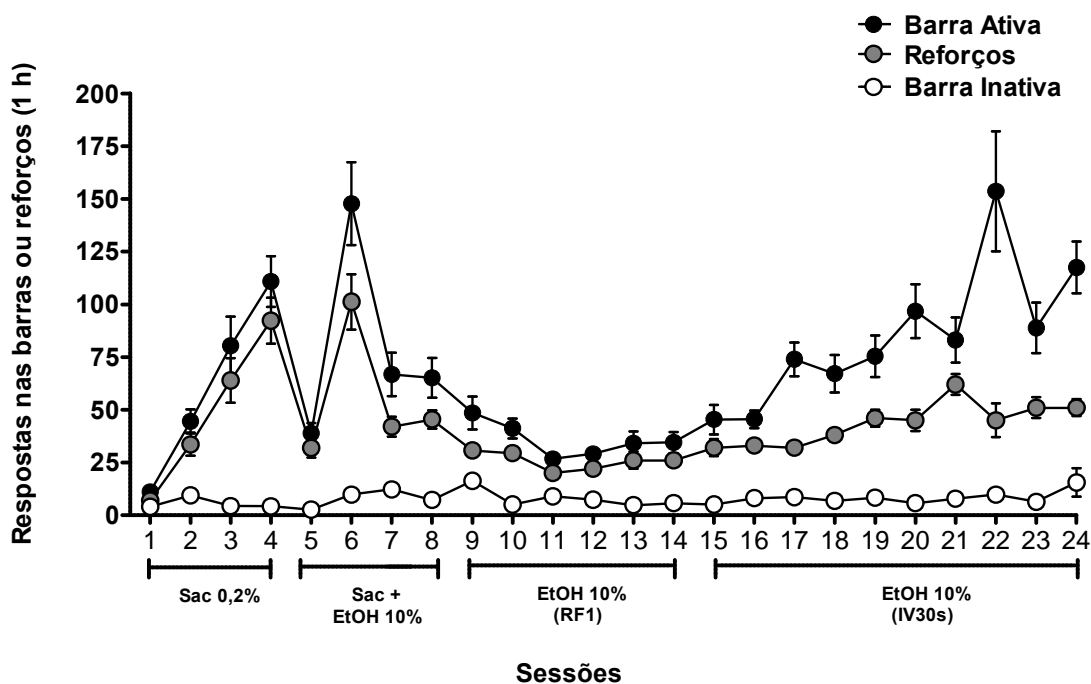
**Figura 9-** Médias  $\pm$  EPM do número de respostas nas barras ativa, inativa e reforços durante as sessões de treinamento do comportamento operante da autoadministração de etanol em ratos Wistar adultos ( $n=17$ ).



**Figura 10-** Médias  $\pm$  EPM do número de respostas nas barras ativa, inativa e reforços durante as sessões de extinção do comportamento operante da autoadministração de etanol em ratos Wistar adultos ( $n=17$ ).

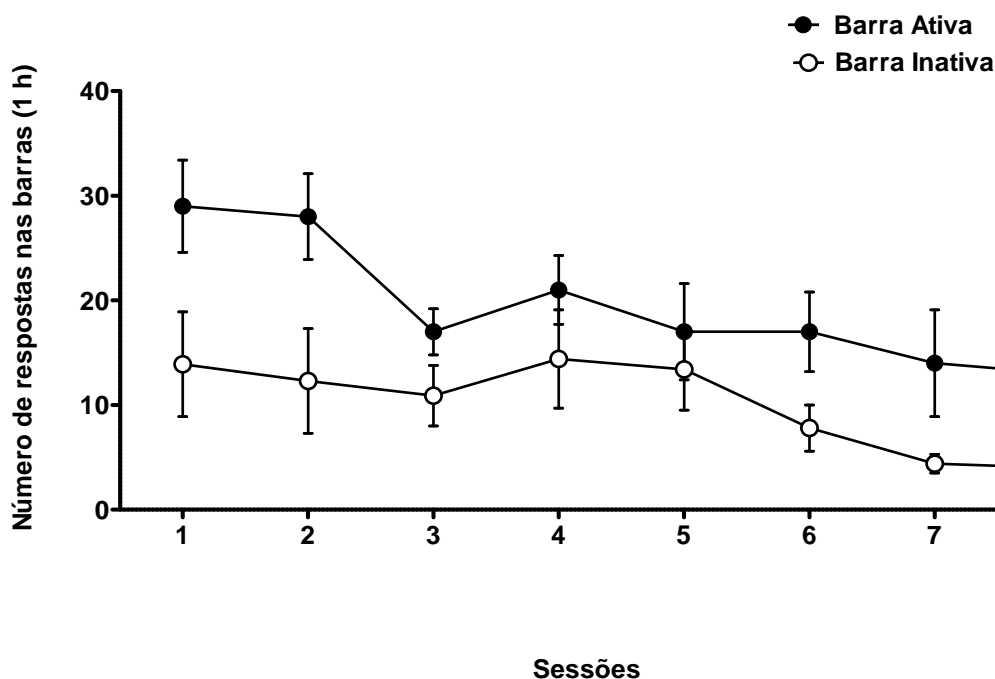
A **figura 11** representa as médias  $\pm$  EPM de respostas nas barras ativa e inativa, bem como a de reforços durante a fase de treinamento da aquisição da

autoadministração operante de etanol de ratos Long-Evans. Como observado para os ratos Wistar, o número de respostas na barra ativa foi superior ao número de respostas na barra inativa durante todo o treino, indicando que há aquisição do comportamento operante de autoadministração de etanol ( $p < 0,05$ ). A **figura 12** mostra que as médias  $\pm$  EPM de respostas nas barras ativa e inativa durante extinção do comportamento da autoadministração de etanol diminuíram ao decorrer das sessões até igualar-se as respostas nas barras inativas, demonstrando que o comportamento operante foi extinto ( $p < 0,05$ ).



**Figura 11-** Médias  $\pm$  EPM do número de respostas nas barras ativa, inativa e reforços durante as sessões de treinamento do comportamento operante da autoadministração de etanol de ratos Long-Evans adultos ( $n=17$ ).

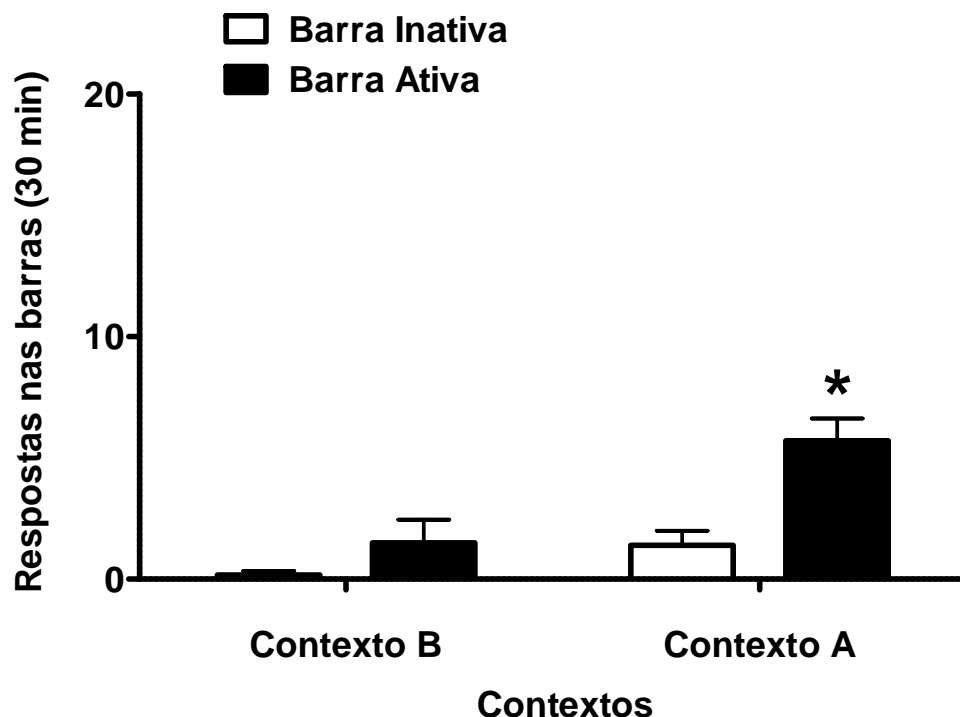




**Figura 12-** Médias  $\pm$  EPM do número de respostas nas barras ativa, inativa e reforços durante as sessões de extinção do comportamento operante da autoadministração de etanol de ratos Long-Evans ( $n= 17$ ).

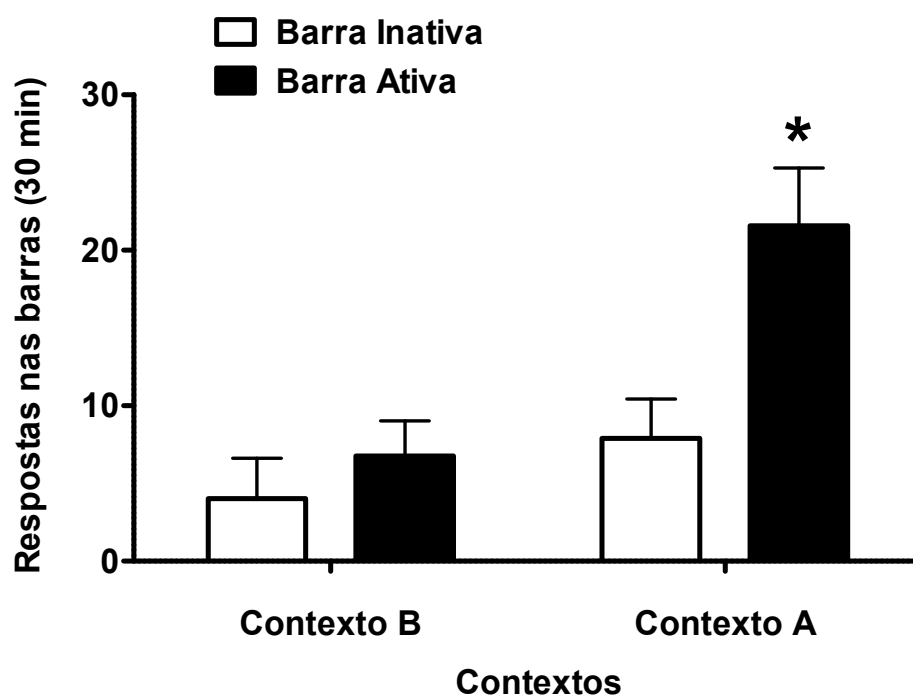
Os histogramas das **figuras 13 e 14** mostram as médias  $\pm$  EPM de respostas nas barras ativa e inativa nos contextos A e B durante o teste da reinstalação da autoadministração operante de etanol das linhagens de ratos Wistar e Long-Evans respectivamente, assim como a comparação do número de respostas na barra ativa entre as duas linhagens (**gráfico 15**).

Para ratos Wistar, ANOVA revelou diferenças significativas para o fator barras ( $F_{1,28}= 55,35$ ;  $p<0,05$ ), bem como para contexto ( $F_{1,28}= 59,50$ ;  $p< 0,05$ ). Porém não foi observado interação entre os fatores ( $F_{1, 28}= 6,5$ ;  $p>0,05$ ). O teste de Newman-Keuls revelou que o número de respostas na barra ativa, no contexto A, foi superior ao da barra ativa no contexto B e as respostas nas barras inativas nos Contextos A e B. Esses resultados sugerem que a exposição ao contexto previamente associado a administração de etanol foi capaz de reinstalar a autoadministração operante dessa substância em ratos Wistar.



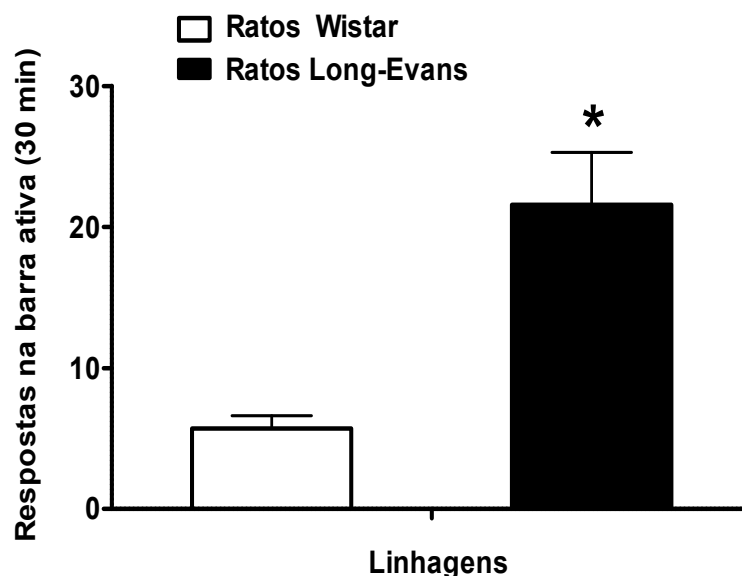
**Figura 13-** O histograma representa a média  $\pm$  EPM ( $n = 17$ ) de respostas nas barras ativa e inativa no teste de reinstalação nos contextos A e B de ratos Wistar. \* $p < 0,05$ ; quando comparada às outras médias.

Para ratos Long-Evans, ANOVA revelou diferenças significativas para o fator barras ( $F_{1,29} = 9,3$ ;  $p < 0,05$ ), bem como para contexto ( $F_{1,28} = 7,61$ ;  $p < 0,05$ ). Porém, não foi observado interação entre os fatores ( $F_{1,28} = 6,5$ ;  $p > 0,05$ ). Assim como foi visto para ratos Wistar, o número de respostas na barra ativa, quando o teste foi realizado no Contexto A, mostrou-se superior tanto em relação as respostas na barra ativa no contexto B, como nas barras inativas nos Contextos A e B. Esses resultados demonstram que a exposição ao contexto previamente associado a administração de etanol foi capaz de reinstalar a autoadministração operante dessa substância em ratos Long-Evans.



**Figura 14-** O histograma representa a média  $\pm$  EPM ( $n = 17$ ) de respostas nas barras ativa e inativa no teste de reinstalação nos contextos A e B de ratos Long-Evans. \* $p < 0,05$ ; quando comparada às outras médias.

Ao comparar a reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto entre essas duas diferentes linhagens de ratos (Barra Ativa Contexto A: Wistar vs Long-Evans: 21,55 x 5,7; respectivamente), observamos que as respostas na barra ativa foram maiores em ratos Long-Evans quando comparado a ratos Wistar (figura 13) ( $p < 0,05$ ).



**Figura 15-** O histograma representa a média  $\pm$  EPM de respostas nas barras ativas no teste de reinstalação nos contextos A de ratos Wistar e Long-Evans ( $n = 17$ ).  $*p < 0,05$ ; quando comparada às outras médias.

Nesse experimento observamos que ratos Long-Evans apresentaram melhor desempenho no teste de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto. Assim adotamos essa linhagem como modelo animal para os próximos experimentos.

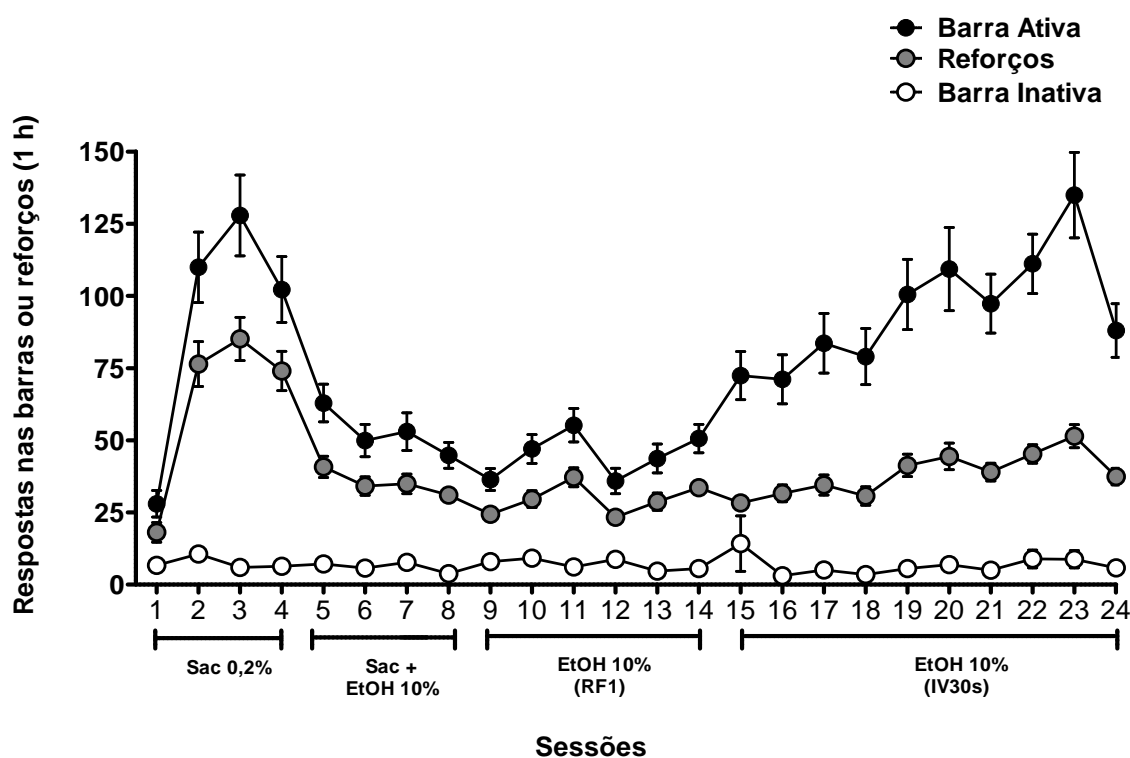
## 5.2 Identificação e caracterização das regiões do córtex pré-frontal medial ativadas durante o teste de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto

### 5.2.1 Comportamento

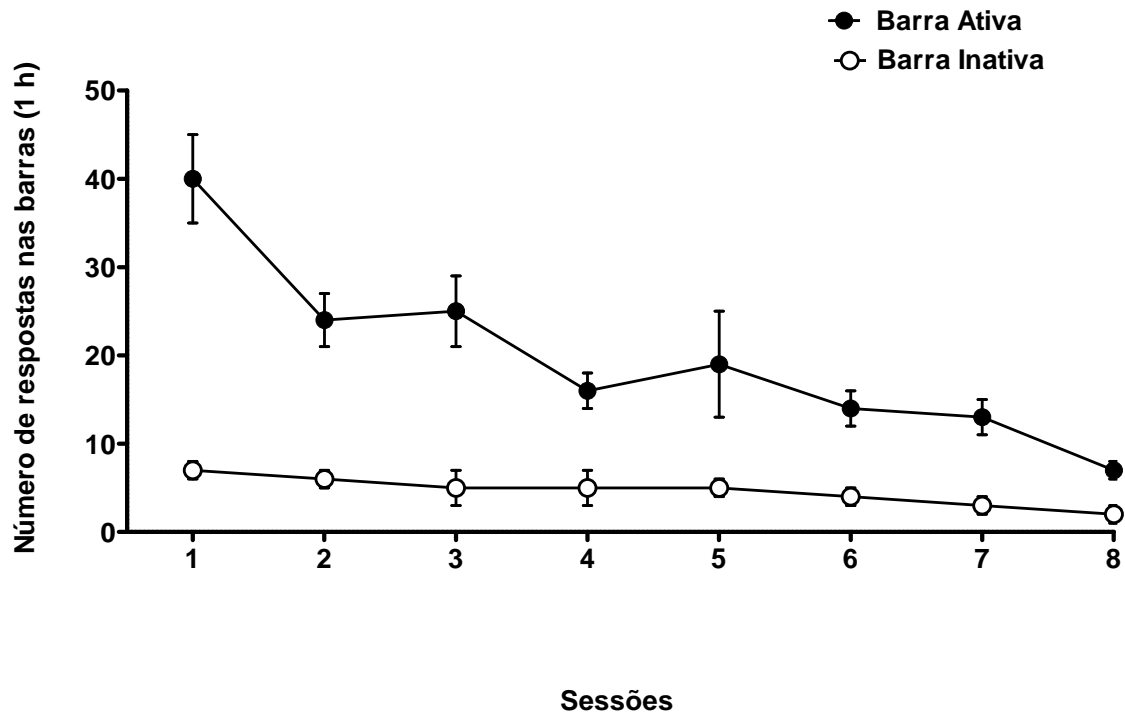
A figura 16 mostra as médias  $\pm$  EPM de respostas nas barras ativa e inativa, bem como número de reforços durante a fase de treinamento da aquisição da autoadministração operante de etanol.

Observou-se que o número de respostas na barra ativa e o número de reforços oscilaram ao longo do treino. Eles aumentaram durante a autoadministração de sacarina 0,2% e diminuíram conforme a sacarina foi removida

da solução, devido ao gosto aversivo do etanol. Entretanto, aumentaram novamente com o início do esquema de razão variável. O número de respostas na barra ativa foi superior ao da barra inativa durante todo o treino, caracterizando o desenvolvimento do comportamento de autoadministração de etanol ( $p < 0,05$ ) (**figura 16**). Na etapa de extinção do comportamento operante observou-se diminuição no número de respostas na barra ativa, e no final da etapa de extinção esse número se igualou ao de respostas na barra inativa, evidenciando a extinção do comportamento, assim como pode ser observado na **figura 17**.

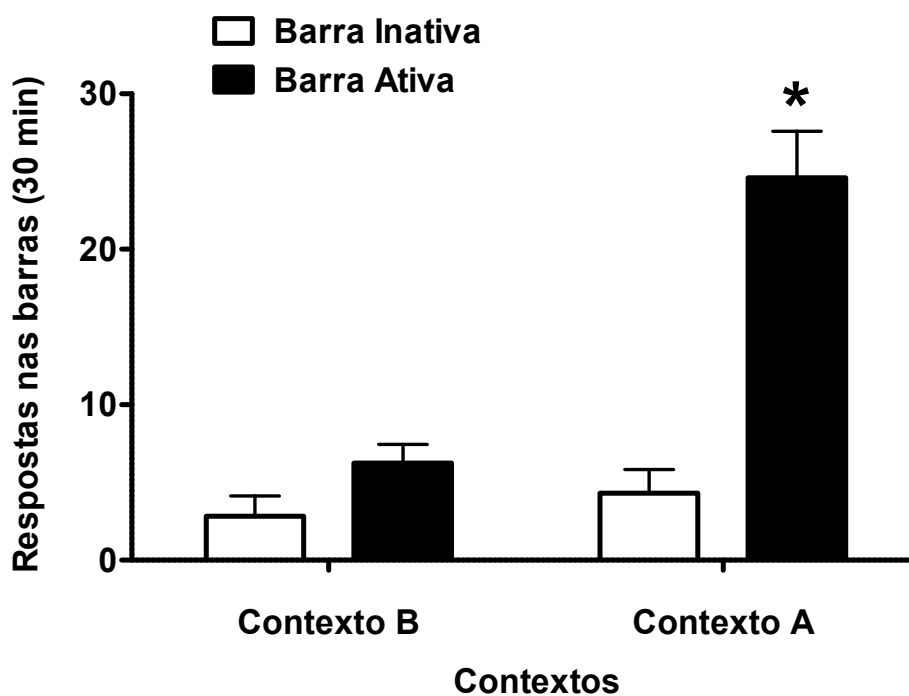


**Figura 16-** Médias  $\pm$  EPM do número de respostas nas barras ativa, inativa e reforços durante as sessões de treinamento do comportamento operante da autoadministração de etanol de ratos Long-Evans ( $n = 17$  por contexto).



**Figura 17-** Médias  $\pm$  EPM do número de respostas nas barras ativa, inativa e reforços durante as sessões de extinção do comportamento operante da autoadministração de etanol de ratos Long-Evans ( $n= 17$  por contexto).

Para o teste, a análise estatística por ANOVA bifatorial (Contexto; Barras), mostrou interação significativa entre os fatores ( $F_{1,46}=17,17$ ;  $p<0,01$ ). O teste de Newmam-Keuls revelou que o número de respostas na barra ativa, no contexto A, foi maior do que no contexto B ( $p<0,05$ ) e nenhuma diferença foi demonstrada em relação as respostas nas barras inativas entre os contextos, conforme ilustrado na **figura 18**.

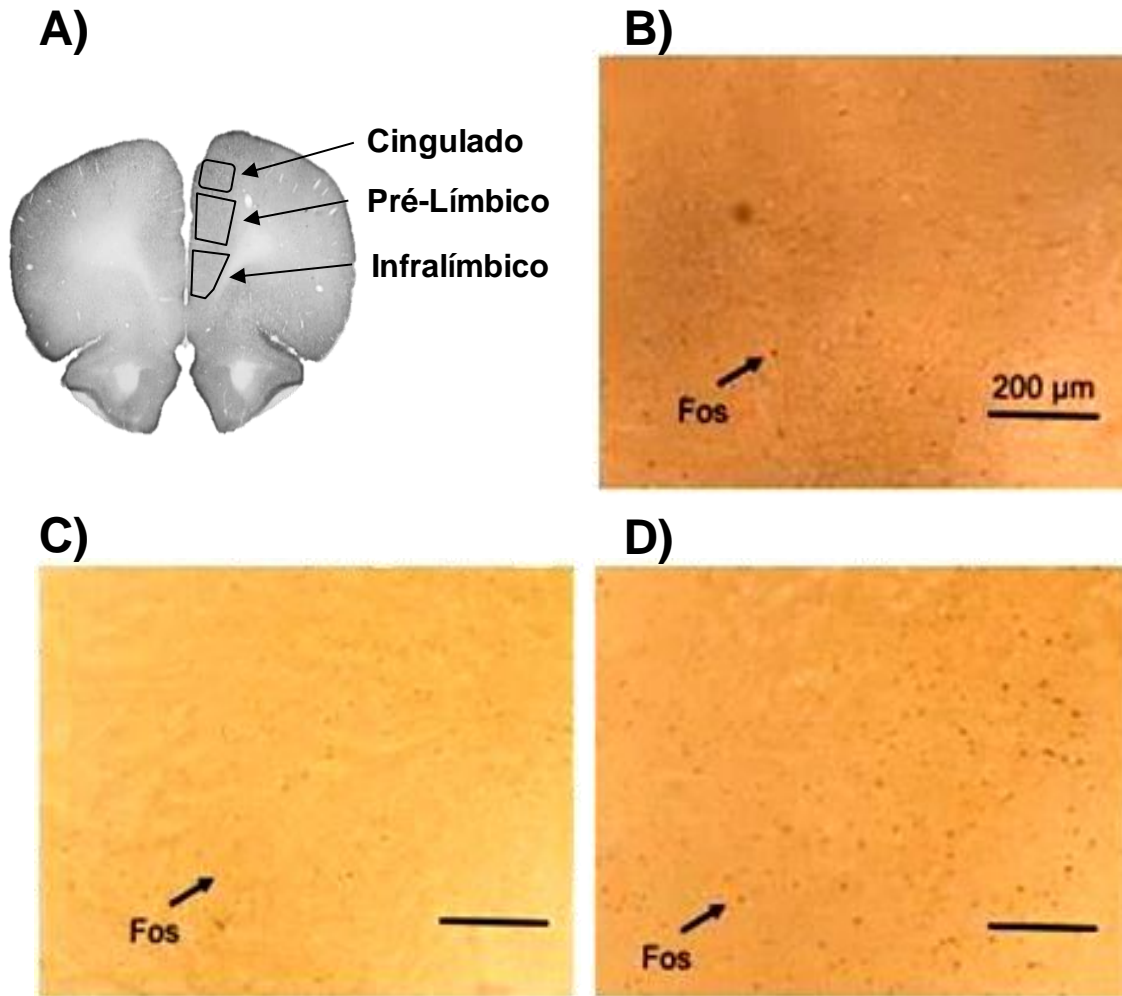


**Figura 18-** Médias  $\pm$  EPM do número de respostas nas barras ativa e inativa durante o teste de reinstalação do comportamento operante da autoadministração de etanol induzida pelo ambiente em ratos Long-Evans ( $n= 17$  por contexto). \* $p<0,05$ ; quando comparada às outras médias.

### 5.2.2 Expressão de Fos

Utilizamos a técnica de imuno-histoquímica para a proteína Fos para identificar as regiões do córtex pré-frontal ativadas durante o teste de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto.

A **figura 19** apresenta as subregiões do córtex pré-frontal medial analisadas e também cortes da região do córtex pré-límbico nos diferentes contextos (etanol, extinção e novidade) mostrando as marcações dos núcleos positivos para Fos.



**Figura 19-** Regiões do córtex pré-frontal onde foram realizadas as contagens das células positivas para Fos (A). Fatias coronais do córtex pré-límbico representativas da quantificação das células positivas para a proteína Fos do contexto B (B), contexto A (C), e contexto C (D).

A **figura 20** ilustra a média do número de células positivas para a proteína Fos por mm<sup>2</sup> (Fos-IR) nas subregiões do córtex pré-frontal medial (pré-límbico, infralímbico e cingulado).

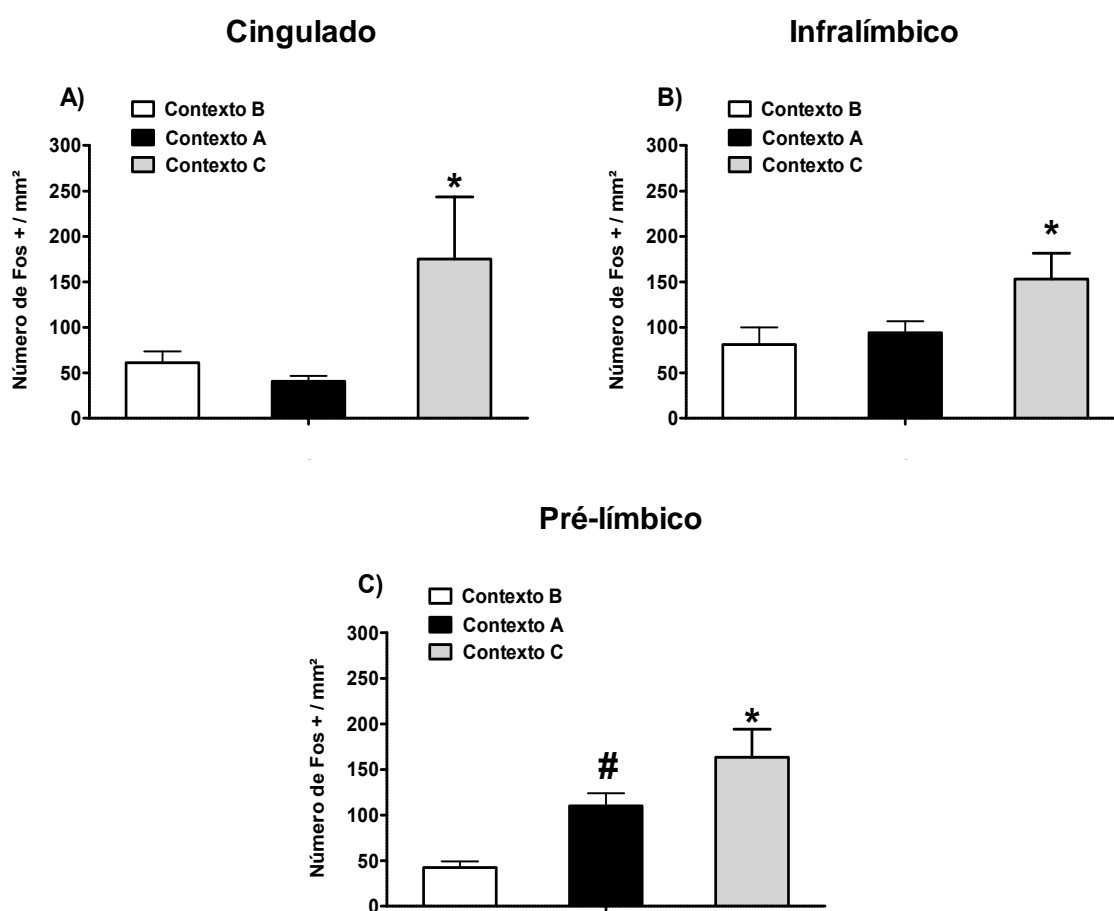
No córtex pré-límbico foi observado que a exposição ao contexto A aumentou o número de marcação Fos em relação a exposição ao contexto B, mas não nas outras subregiões corticais (**figura 20**).

Análise estatística para o córtex pré-límbico demonstrou efeito significativo do contexto ( $F_{1,21} = 10,86$ ;  $p < 0,05$ ). A marcação de Fos foi maior no contexto C comparado aos contextos A e B ( $p < 0,05$ ). Foi observado também que o número de células positivas para Fos foi maior no contexto A quando comparado ao contexto B ( $p < 0,05$ ).



Para o córtex infralímbico houve diferença significativa do fator contexto ( $F_{1,22}= 3,46$ ;  $p<0,05$ ), o número de células positivas para Fos foi maior no contexto C quando comparado aos contextos A e B ( $p<0,05$ ). Porém, não houveram diferenças significativas no número de marcação para Fos entre os contextos A e B.

Para o córtex cingulado, houve diferença significativa para o fator contexto ( $F_{1,21}= 4,87$ ;  $p<0,05$ ). A marcação de Fos foi maior no contexto C comparada aos contextos A e B ( $p<0,05$ ). Porém, não houveram diferenças significativas entre os contextos A e B.



**Figura 20-** Número de Fos-IR núclei por  $\text{mm}^2$  no córtex (A) cingulado, (B) infralímbico e (C) pré-límbico. Os histogramas representam as médias  $\pm$  EPM ( $n = 7-10$  animais por grupo). \* $p<0,05$ ; comparado aos demais contextos. # $p,0,05$ ; comparado ao contexto B.

### 5.2.3 Porcentagem de ativação neuronal (dupla marcação Fos/NeuN)

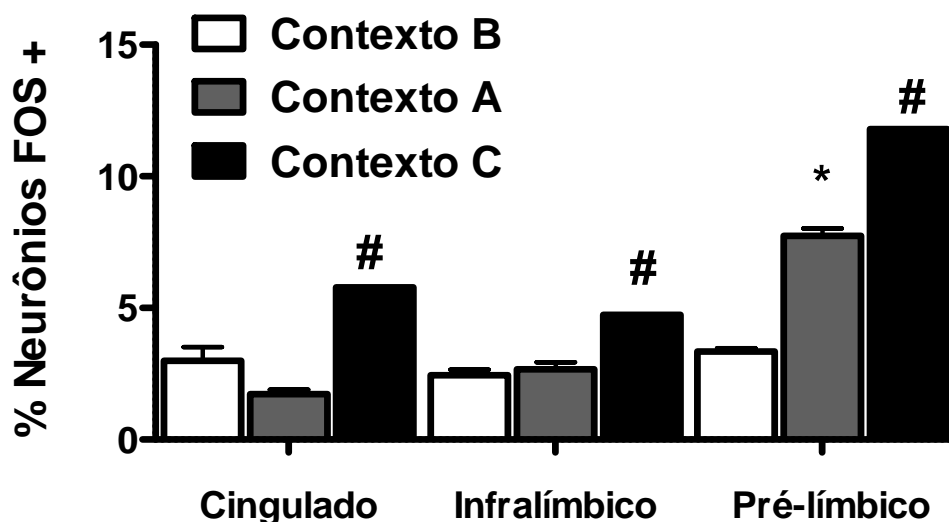
Utilizamos a técnica de dupla marcação para Fos/NeuN afim de determinar a porcentagem de neurônios ativados nas regiões que mostraram aumento significativo na expressão de Fos durante o teste de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto. O cálculo da porcentagem de

ativação neuronal foi feito através da seguinte fórmula: [(número de Fos / número de NeuN) \* 100].

Essa análise indicou que apenas uma pequena proporção de células foi ativada durante o teste de reinstalação. No córtex pré-límbico Fos foi expresso em  $3,4 \pm 0,12\%$ ,  $7,7 \pm 0,27\%$  e  $11,8 \pm 0,87\%$  dos neurônios depois da exposição aos contextos B, A e C respectivamente. No córtex infralímbico, os totais de células ativadas foram:  $2,44 \pm 1,31\%$ , Contexto B;  $2,66 \pm 0,62\%$ , Contexto A e  $4,74 \pm 0,20\%$ , Contexto C; respectivamente. Finalmente, no córtex cingulado a porcentagem de células positivas para Fos foi de:  $2,99 \pm 0,10\%$ ;  $1,73 \pm 1,31\%$  e  $5,78 \pm 1,15\%$  para os contextos B, A e C respectivamente (**Tabela 2 e Figura 21**).

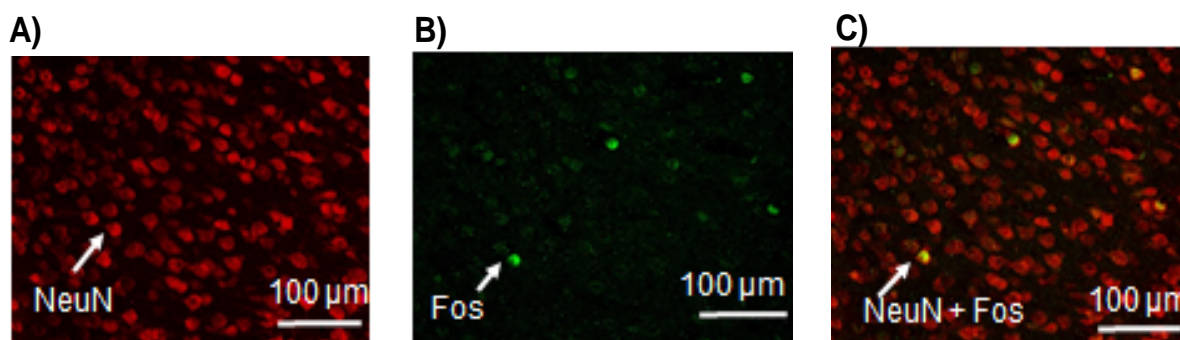
**Tabela 2-** Porcentagem de ativação neuronal nos diferentes contextos e regiões corticais. Os valores representam a média  $\pm$  EPM da porcentagem ( $n = 4$  animais por grupo) de células ativadas em diferentes áreas encefálicas: córtex pré-frontal pré-límbico, infralímbico e cingulado.

Regiões Corticais	Contexto B (Extinção)	Contexto A (Etanol)	Contexto C (Novidade)
<b>Pré-límbico</b>	3,4%	7,7%	11,8%
<b>Infralímbico</b>	2,44%	2,66%	4,74%
<b>Cingulado</b>	2,99%	1,73%	5,78%



## Áreas Corticais

**Figura 21-** Os valores representam a média  $\pm$  EPM da porcentagem de células duplamente marcadas para as proteínas Fos e NeuN no córtex pré-frontal cingulado, infralímbico e pré-límbico após a exposição aos contextos A, B e C na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto ( $n=4$  por grupo).



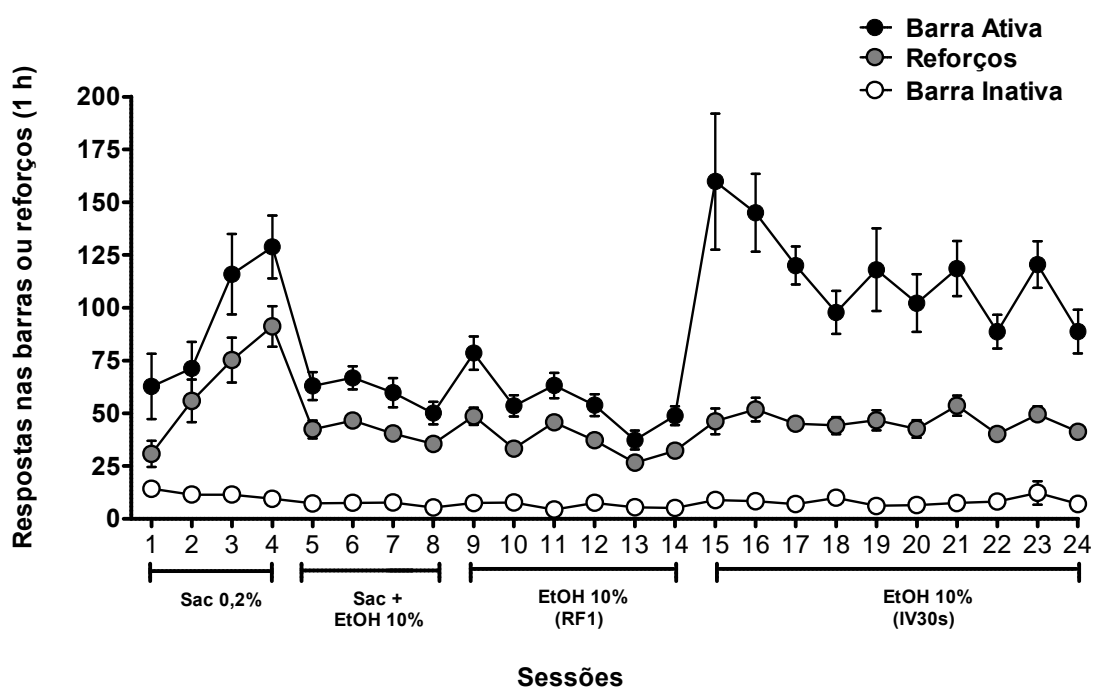
**Figura 22 -** Imagem representativa do córtex pré-límbico para dupla marcação das proteínas Fos e NeuN.

### 5.3 Investigação funcional da participação do córtex pré-límbico na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto

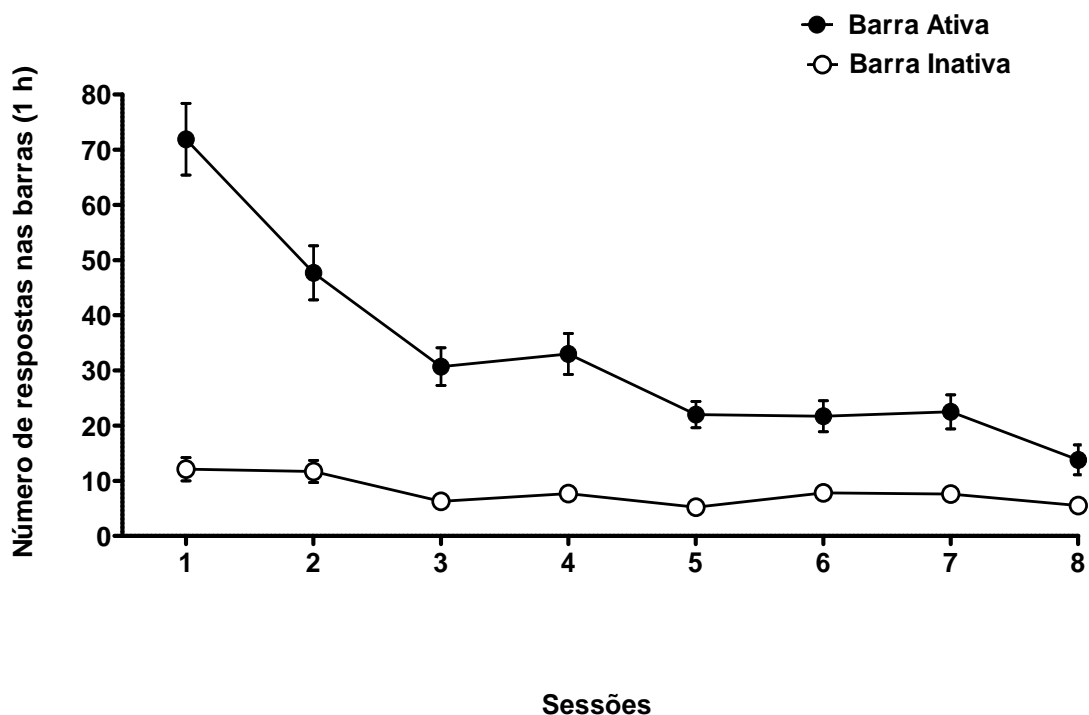
No experimento anterior observamos que a reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto foi acompanhada por aumento de células marcadas positivamente para Fos no córtex pré-límbico, sugerindo a participação dessa área nesse comportamento. Nesse experimento utilizamos o procedimento de inativação reversível por Baclofen/Muscimol (McFarland e Kalivas, 2001; Bossert *et al.*, 2011; Cruz, Babin, *et al.*, 2014) para investigar a participação do

córtex pré-límbico na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto.

Como nos demais experimentos, os animais demonstraram consistente autoadministração de etanol observada pelo aumento no número de reforços e respostas na barra ativa ao decorrer das sessões de autoadministração (**Figura 23**). Observamos ainda, diminuição no número de respostas na barra ativa durante a extinção do comportamento (**figura 24**). As respostas na barra inativa permaneceram constantes ao longo das sessões, evidenciando que os animais aprenderam associar o recebimento do reforço com as respostas na barra ativa.

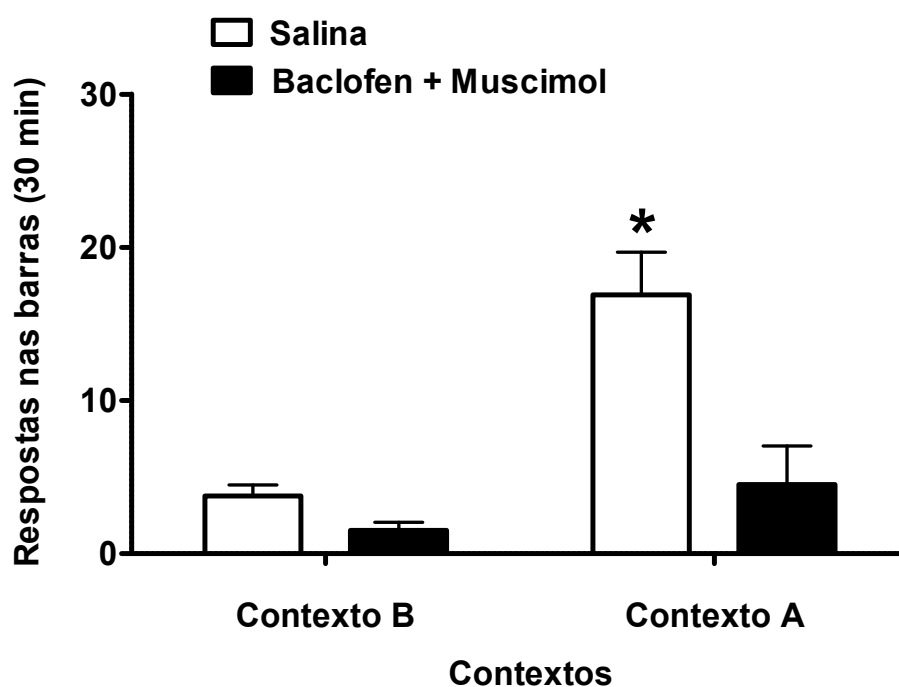


**Figura 23-** Efeito da inativação farmacológica do córtex pré-límbico na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto. Médias  $\pm$  EPM do número de respostas nas barras ativa, inativa e reforços durante as sessões de treinamento do comportamento operante da autoadministração de etanol de ratos Long-Evans ( $n= 14$  animais para o contexto B e 17 para o contexto A).

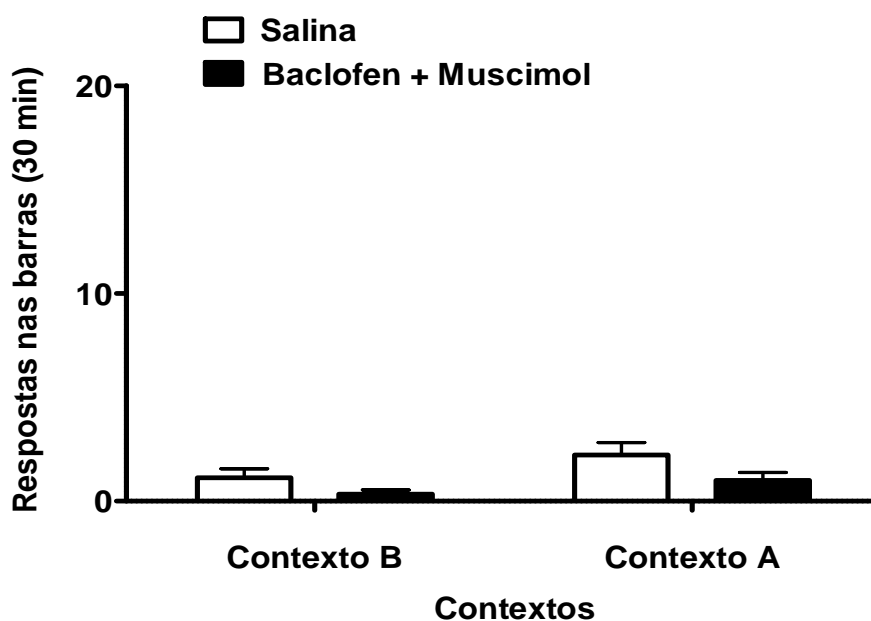


**Figura 24-** Efeito da inativação farmacológica do córtex pré-límbico na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto. Médias  $\pm$  EPM do número de respostas nas barras ativa, inativa e reforços durante as sessões de extinção do comportamento operante da autoadministração de etanol de ratos Long-Evans adultos ( $n= 14$  animais para o contexto B e 17 para o contexto A).

Para o teste, ANOVA revelou interação significativa entre os fatores contexto (A e B), barras (ativa e inativa) e injeção (salina e Baclofen/Muscimol) ( $F_{1,58}=5,15$ ;  $p<0,05$ ). Análise *Post-hoc* mostrou que a injeção de Baclofen/Muscimol no córtex pré-límbico reduziu o número de repostas na barra ativa no contexto A (associado ao treino de etanol) ( $p<0,05$ ), mas não no contexto de extinção B (**figura 25**). Nenhuma diferença estatística foi observada para as respostas na barra inativa (**figura 26**).



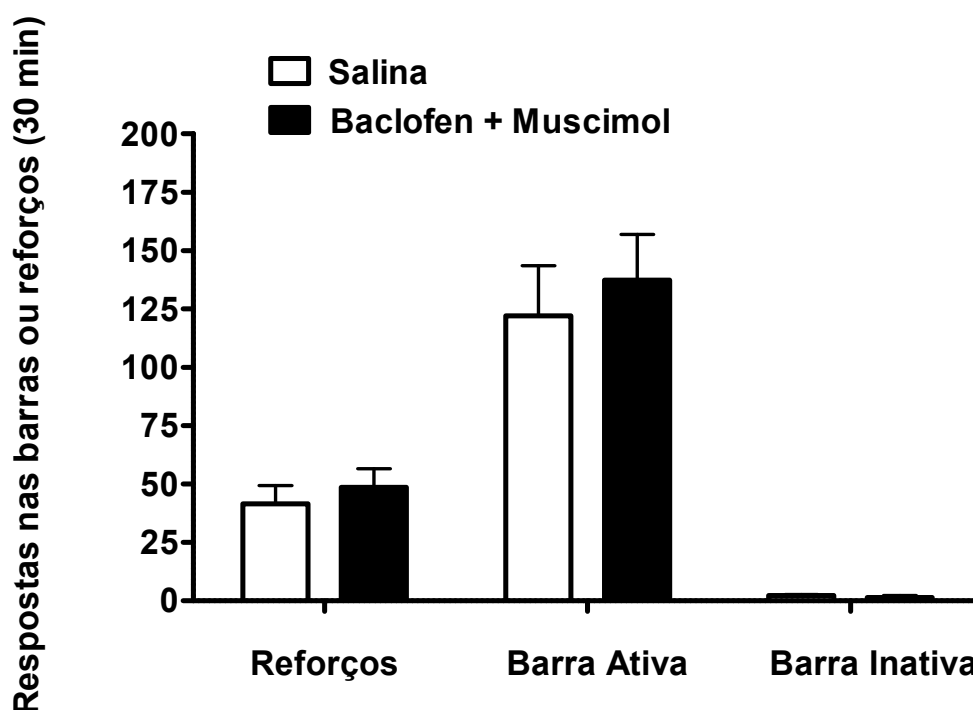
**Figura 25-** O histograma representa média  $\pm$  EPM de respostas nas barras ativa no teste de reinstalação nos contextos A e B de ratos Long-Evans. ( $n=8$  contexto B salina,  $n=6$  contexto B B/M,  $n=9$  contexto A salina,  $n=8$  contexto A B/M ratos por grupo).  $*p<0,05$ ; quando comparada às outras médias.



**Figura 26-** O histograma representa média  $\pm$  EPM de respostas nas barras inativa no teste de reinstalação nos contextos A e B de ratos Long-Evans. ( $n=8$  contexto B salina,  $n=6$  contexto B B/M,  $n=9$  contexto A salina,  $n=8$  contexto A B/M ratos por grupo).  $*p>0,05$ ; quando comparada às outras médias.

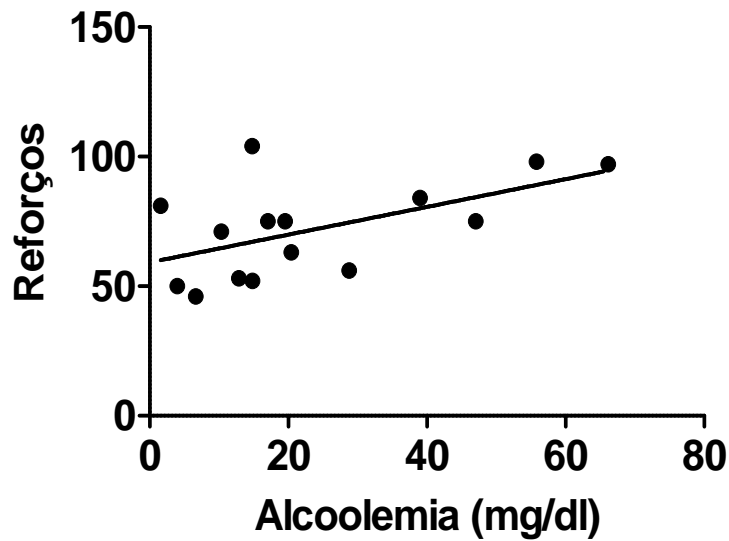
Finalmente, para demonstrar que injeções de Baclofen/Muscimol no córtex pré-límbico não causou prejuízo motor, nós treinamos novamente 18 ratos a pressionar a barra para receber solução de sacarina 0,2% (FR1 com time out de 20s, 1 h/dia) por 5 dias. Então, administramos Baclofen/Muscimol ou veículo (como descrito anteriormente), quinze minutos antes da última sessão de autoadministração de sacarina.

Observamos que a inativação do córtex pré-límbico com o Baclofen/Muscimol não teve efeito na resposta da autoadministração de sacarina, indicando que os efeitos desses fármacos sobre a reinstalação da autoadministração de etanol pelo contexto não se deve a prejuízos motores (**figura 27**).



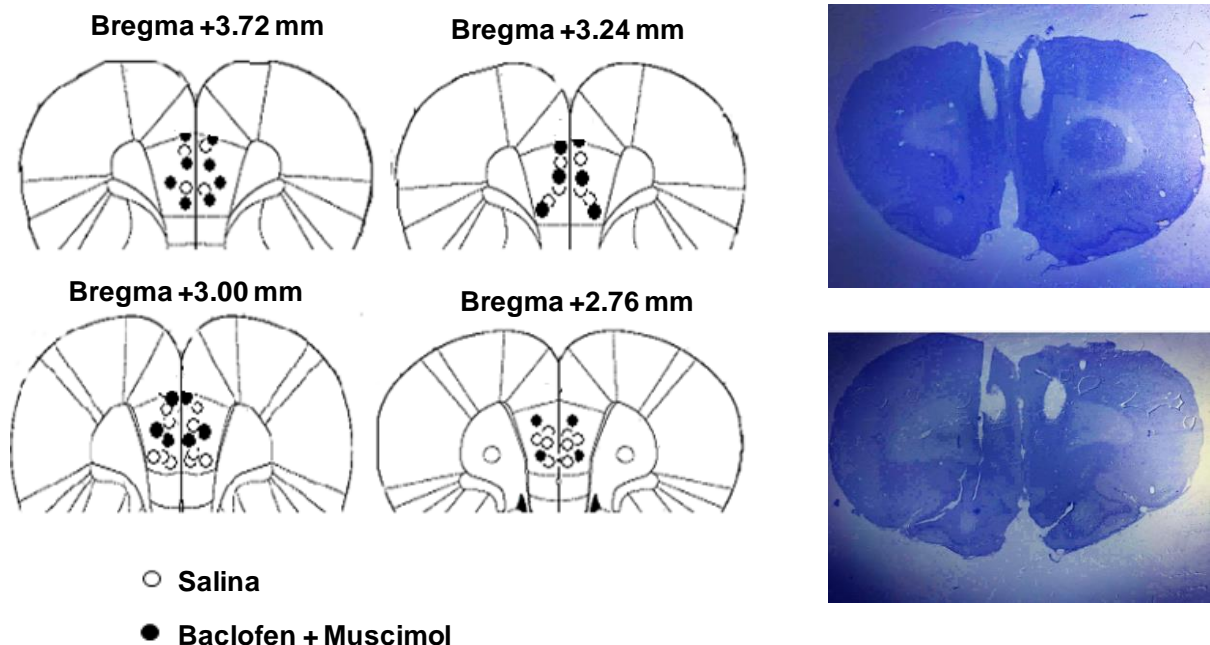
**Figura 27-** O histograma representa média  $\pm$  EPM de respostas nas barras ativa, inativa e reforços no teste de autoadministração de sacarina ( $n=18$ ).

Na última sessão de treino do intervalo variável, avaliamos a alcoolemia para comprovar que o reforço recebido foi ingerido pelo animal. Observamos correlação positiva entre as concentrações sanguíneas de etanol e o número de reforços ( $Person = 0,56$ ;  $R^2 = 0,33$ ;  $p < 0,05$ ), indicando que os reforços obtidos foram consumidos pelos animais (**Figura 28**).



**Figura 28** - O histograma representa a determinação de álcool no sangue. Curvas de correlação do número de reforço alcançados durante a última sessão de treino em função do nível de álcool no sangue.  $r=0,56$ .  $*p < 0,05$ .

Ao final dos testes, os tecidos foram corados com cresil-violeta para observar a localização das inserções das cânulas (**Figura 29**).



**Figura 29**- Posições das implantações das cânulas no córtex pré-límbico ( $n=8$  contexto B salina,  $n=6$  contexto B B/M,  $n=9$  contexto A salina,  $n=8$  contexto A B/M ratos por grupo).



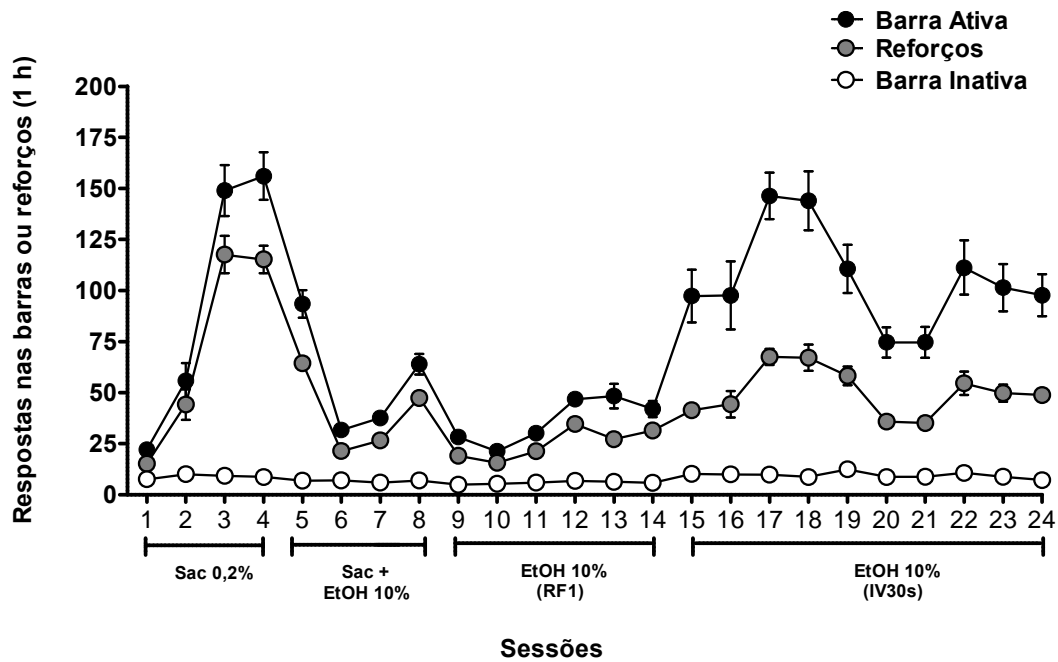
## 5.4 Análise das alterações na expressão gênica de neurônios ativados, do córtex pré-límbico durante a reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto

Após confirmarmos a participação de córtex pré-frontal na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto, nós utilizamos a metodologia da separação de neurônios ativados por citometria de fluxo (FACS) e da Reação de Polimerização em Cadeia em tempo Real (RT-PCR) para analisar as alterações nas expressões gênicas em “*neuronal ensembles*” relacionados a reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto.

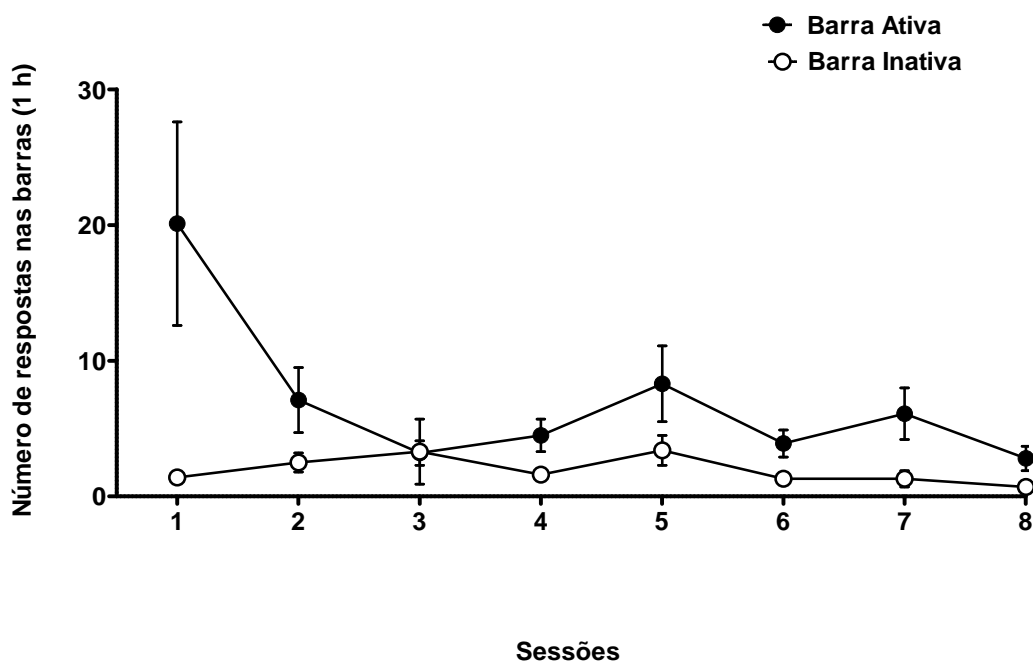
### 5.4.1 Comportamento

A **figura 30** mostra as médias  $\pm$  EPM das repostas nas barras ativa e inativa, bem como a média de reforços durante a fase de treinamento da autoadministração operante de etanol. Como para os demais experimentos, observamos que o número de repostas na barra ativa e número de reforços aumentaram durante a autoadministração de sacarina 0,2% e diminuíram conforme a sacarina foi removida da solução. Entretanto, esses números aumentaram novamente com o início do esquema de razão variável de etanol 10%. O número de repostas na barra ativa foi superior ao da barra inativa durante o treino evidenciando a aquisição do comportamento de autoadministração de etanol ( $p < 0,05$ ).

Na etapa de extinção do comportamento operante, observamos diminuição no número de repostas na barra ativa, que se igualou ao da barra inativa no final dessa etapa, indicando a extinção do comportamento (**figura 31**).

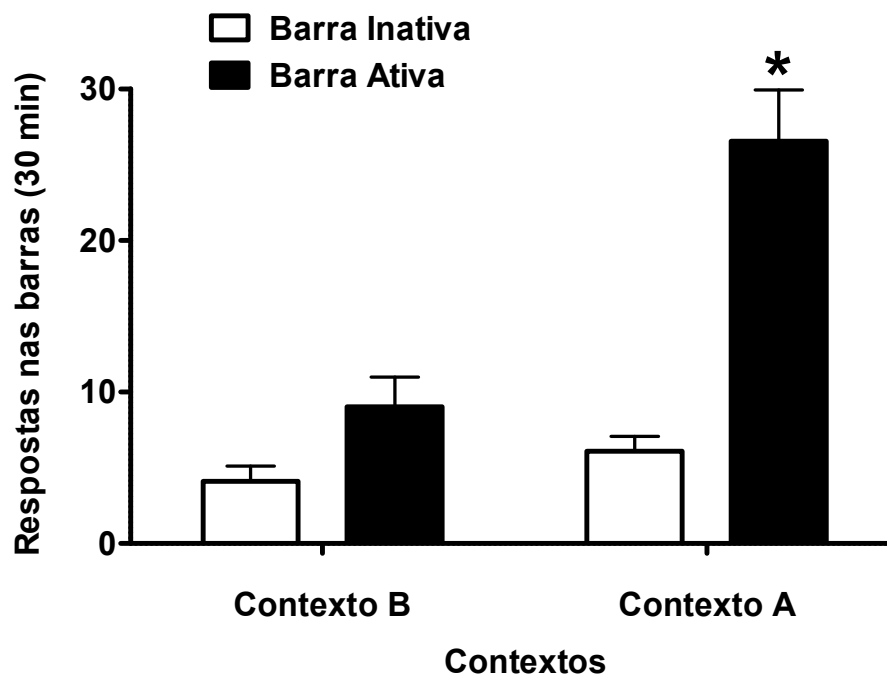


**Figura 30-** Médias  $\pm$  EPM do número de respostas nas barras ativa, inativa e reforços durante as sessões de treinamento de reinstalação da autoadministração de etanol em ratos Long-Evans ( $n= 12$  ratos por grupo para o contexto B e  $n=13$ , ratos por grupo para contexto A).



**Figura 31-** Médias  $\pm$  EPM do número de respostas nas barras ativa, inativa e reforços durante as sessões de extinção de reinstalação da autoadministração de etanol em ratos Long-Evans ( $n= 12$  ratos por grupo para o contexto B e  $n=13$  ratos por grupo para contexto A).

No teste, ANOVA revelou diferenças significativas para o fator contexto ( $F_{1,46} = 21,15$ ;  $p < 0,0001$ ), bem como para respostas nas barras ativa e inativa ( $F_{1,46} = 35,70$ ;  $p < 0,0001$ ). Além disso, ANOVA apontou interação entre os fatores contexto e barras (ativa e inativa) ( $F_{1,46} = 13,40$ ;  $p < 0,05$ ). Nenhuma diferença foi observada em relação a barra inativa entre os contextos (**figura 32**).

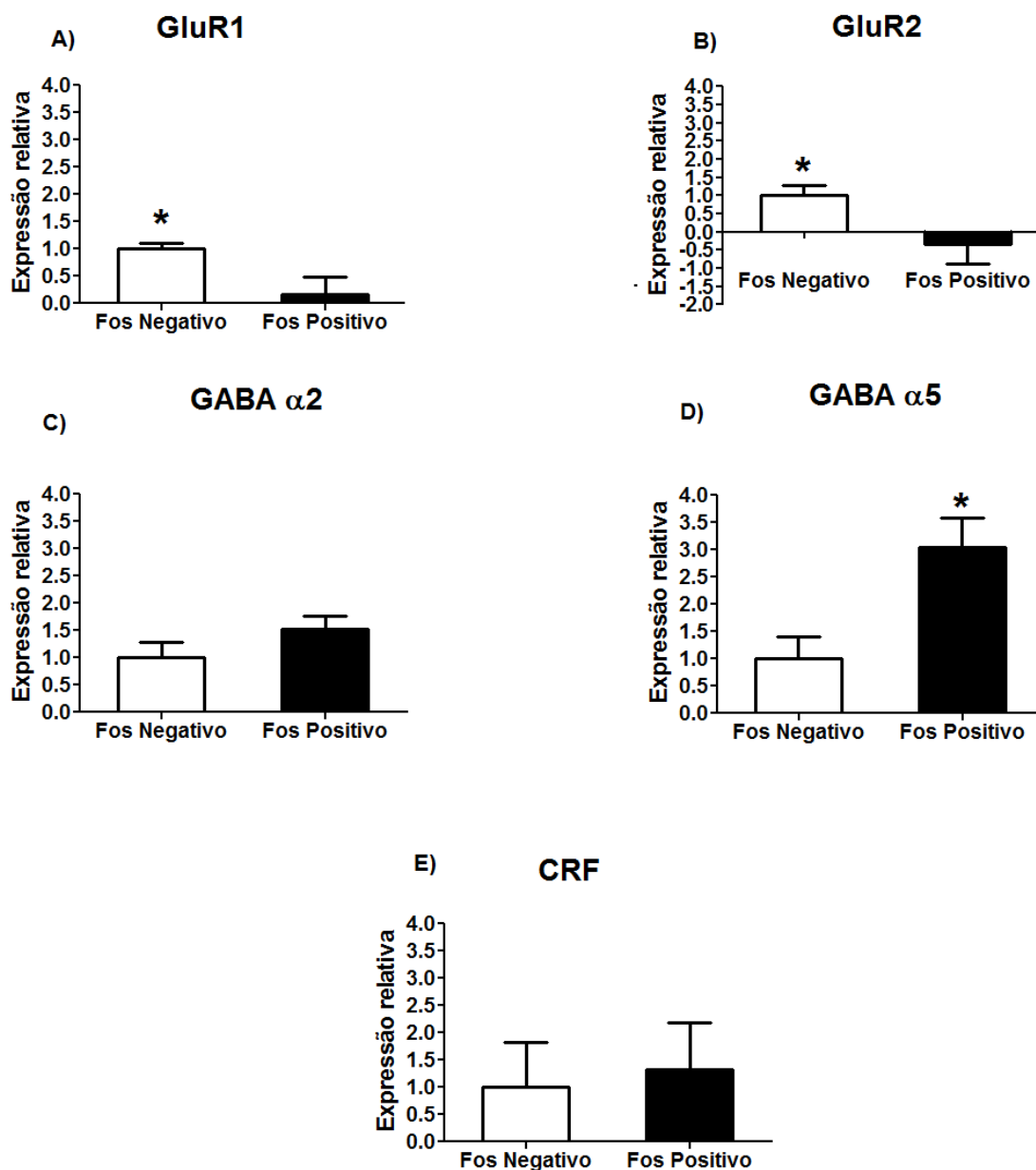


**Figura 32-** O histograma representa média  $\pm$  EPM de respostas nas barras ativa e inativa no teste de reinstalação nos contextos A e B de ratos Long-Evans ( $n = 12$  ratos por grupo para o contexto B e  $n = 13$  ratos por grupo para contexto A). \* $p < 0,05$ ; quando comparada as demais médias.

#### 5.4.2 Expressão dos genes codificantes das proteínas GluR1, GluR2, GABA $\alpha$ 2, GABA $\alpha$ 5 e CRF na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto

Os resultados são apresentados como o valor da expressão relativa. As **figuras 33** e **34** mostram a análise da expressão gênica de neurônios ativados e não ativados (Fos positivos e negativos, respectivamente) separados pela técnica de citometria de fluxo (FACS). Analisamos diferenças da expressão gênica entre os neurônios ativados versus não ativados durante a exposição aos contextos A e B. Os dados foram expressos em relação a expressão gênica dos neurônios Fos negativos (expressão relativa), assim como descrito no item 3.11.

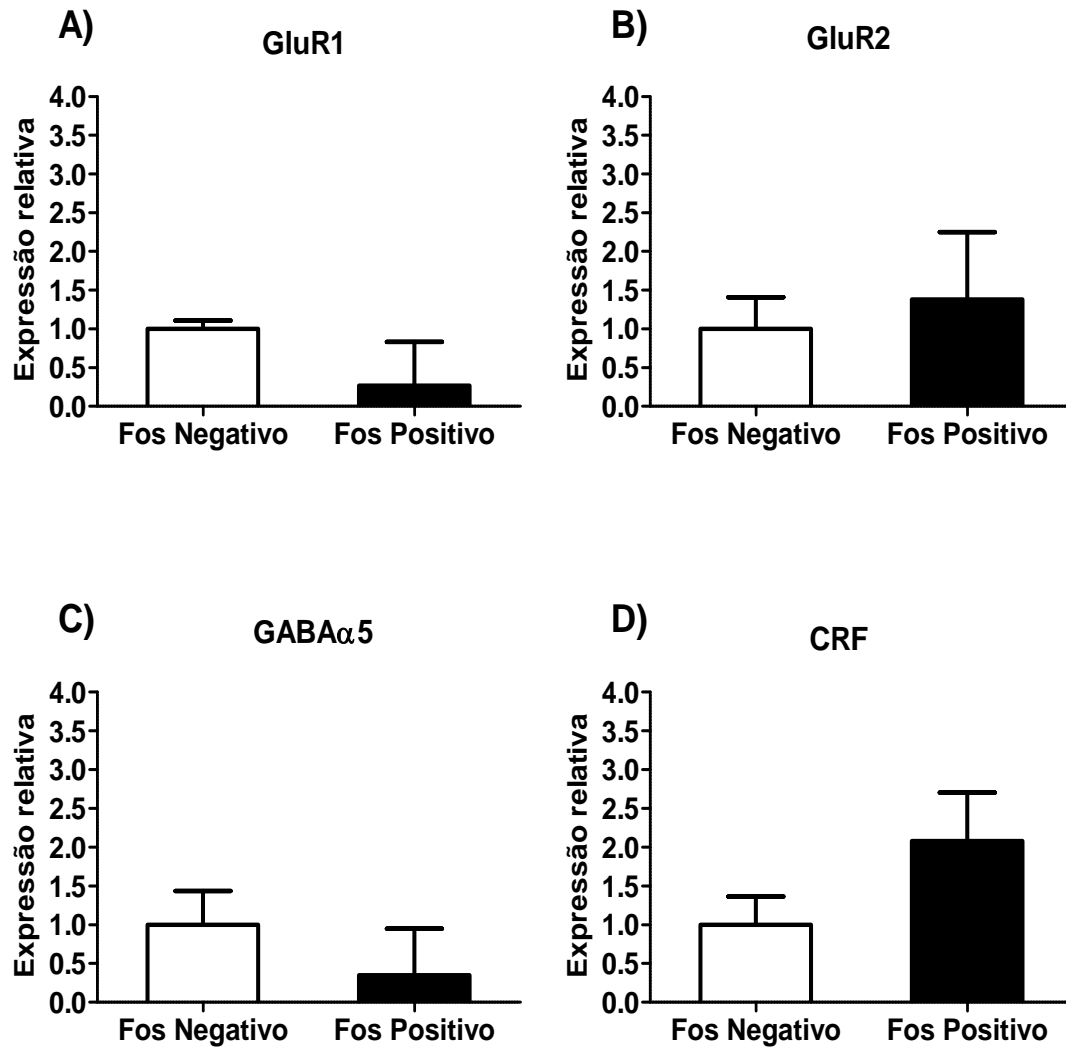
Para a exposição dos animais ao contexto A houve aumento da expressão do gene  $GABA\alpha 5$  e redução da expressão dos genes  $GluR1$  e  $GluR2$  ( $t < 0,05$ ). Nenhuma alteração foi observada para a expressão dos genes  $GABA\alpha 2$  e  $CRF$  (figura 33).



**Figura 33-** Média  $\pm$  EPM da expressão gênica relativa (relativa a expressão nas células Fos negativas) dos genes  $GluR1$  (A),  $GluR2$  (B),  $GABA\alpha 2$  (C),  $GABA\alpha 5$  (D) e  $CRF$  (E) durante a exposição ao contexto relacionado a administração de etanol (Contexto A) ( $n=4-9$  por grupo). \* $p < 0,05$ ; comparado ao neurônios Fos negativos.

A análise da expressão gênica para os animais expostos ao contexto da extinção (Contexto B) não demonstrou alterações na expressão gênica de nenhum

dos genes analisados (GluR1, GluR2, GABA A $\alpha$ 5 e CRF). Não foi possível detectar a expressão do gene GABA $\alpha$ 2 nas amostras analisadas (**Figura 34**).



**Figura 34-** Média  $\pm$  EPM da expressão gênica relativa (relativa a expressão nas células Fos negativas) dos genes GluR1 (A), GluR2 (B), GABA $\alpha$ 5(C) e CRF (D) durante a exposição ao contexto relacionado a extinção da autoadministração de etanol (Contexto B) (n=2-7 por grupo).

# DISCUSSÃO

*“Educar verdadeiramente não é ensinar fatos novos ou enumerar fórmulas prontas, mas sim preparar a mente para pensar.”*

*Albert Einstein*

Os resultados encontrados no presente estudo demonstram que: a) a exposição ao contexto previamente associada a autoadministração de etanol foi capaz de reinstalar esse comportamento em ratos Long-Evans e Wistar; b) a linhagem de ratos Long-Evans apresentou melhor desempenho no teste de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto quando comparado aos ratos Wistar; c) a reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto promoveu aumento da ativação do córtex pré-límbico; d) uma pequena porcentagem de neurônios foi ativado no córtex pré-límbico durante a reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto (~7,7%); e) a inibição farmacológica do córtex pré-límbico atenuou a reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto; f) a reinstalação da autoadministração de etanol foi associada a redução na expressão de GluR1 e GluR2 (subunidades do receptor glutamatérgico AMPA) e ao aumento na expressão de GABA $\alpha$ 5 (subunidade do receptor GABAérgico A) nos neurônios seletivamente ativados, no córtex pré-límbico, durante o teste comportamental.

A recaída é um dos principais problemas para o tratamento da dependência (Stasiewicz *et al.*, 2007). Estudos demonstram que a exposição do indivíduo a ambientes relacionados ao consumo da droga é o principal fator desencadeador da recaída (Ludwig e Stark, 1974; Ludwig e Wikler, 1974; Mccusker e Brown, 1991; Monti *et al.*, 1993; Miller e Sanchez-Craig, 1996). Neste sentido, estudos mostram que a exposição de etilistas abstinentes a lugares, pessoas ou contextos associados ao uso prévio de etanol, frequentemente promove recaída (Staiger e White, 1991; O'brien *et al.*, 1992; Collins e Brandon, 2002).

Durante décadas, muitos modelos animais foram desenvolvidos com o objetivo de compreender os mecanismos neurobiológicos envolvidos na recaída ao uso de drogas (Shaham *et al.*, 2003; Crombag *et al.*, 2008). A influência do ambiente na recaída ao uso de substâncias de abuso pode ser estudada através do modelo animal de reinstalação da autoadministração operante de drogas induzida pelo contexto, modelo conhecido como “ABA renewal”, como previamente apresentado na introdução dessa dissertação (Fuchs *et al.*, 1998; Shalev *et al.*, 2002; Shaham *et al.*, 2003; Bossert *et al.*, 2005). A reinstalação da autoadministração de drogas induzida pelo contexto já foi observada para diferentes drogas de abuso, como speedball (uma combinação de heroína e cocaína), cocaína, heroína, nicotina, metanfetamina e cervejas alcóolicas (Crombag e Shaham, 2002; Diergaarde *et al.*, 2008; Bossert *et al.*, 2012; Cruz *et al.*, 2013;

Willcocks e McNally, 2013). Esses resultados demonstram que o contexto é um fator importante na recaída ao uso de drogas e sugerem que terapias para reduzir a recidiva ao uso dessas substâncias devem levar em consideração a influência do ambiente.

No presente estudo, demonstramos que a exposição ao contexto associado ao consumo de etanol foi capaz de reinstalar a busca por essa droga. Nossos resultados estão de acordo aos observados por Marchant *et al.*, (2013), que ao utilizar um protocolo semelhante, demonstrou também a influência do contexto na reinstalação da busca ao etanol após um período de extinção.

Ao comparar nosso modelo com outros modelos de reinstalação, nosso estudo possibilitou o desenvolvimento de um protocolo novo para a investigação da influência do ambiente na recaída ao uso de etanol. Os protocolos empregados até então, apresentam algumas variações metodológicas. Por exemplo, utilizam cervejas alcoólicas ao invés de uma solução de etanol e água (Willcocks e McNally, 2013). Outros protocolos utilizam choque nas patas associado a liberação do reforço de etanol, durante a fase de extinção do comportamento (Marchant *et al.*, 2013). Além disso, outros modelos utilizam ratos que apresentam alta preferência ao etanol (ratos Wistar P) (Cannella *et al.*, 2016).

O uso de cervejas alcoólicas pode prejudicar a autoadministração de etanol devido seu alto valor calórico e a presença de outros componentes (cevada, malte e outros). Esses fatores dificultam a interpretação se realmente o animal está buscando etanol ou os outros componentes dessas bebidas, o que exige a adoção de outros grupos experimentais controles. O uso do choque durante a extinção pode promover alterações moleculares que não estão realmente associadas a neurobiologia da recaída induzida pelo ambiente. E por fim, o uso de ratos Wistar P pode gerar um viés experimental, visto que esta população homogênea de animais é selecionada baseada em seu fenótipo de preferência ao etanol. Assim, nosso procedimento pode ser um modelo alternativo, mais fácil e reprodutivo para investigar os mecanismos envolvidos na recaída ao uso de etanol.

A linhagem de ratos utilizados nos procedimentos de autoadministração operante de etanol é outro fator importante a se considerar, pois estudos demonstram que linhagens diferentes apresentam padrões distintos de ingestão dessa substância (Carnicella *et al.*, 2014). Por exemplo, foi demonstrado que ratos Wistar ingerem mais etanol comparados a ratos Fisher ou Sprague-Dawley (Bell, Rodd, Lumeng, *et al.*, 2006; Bell, Rodd, Sable, *et al.*, 2006). No presente estudo, nós



demonstramos que ratos Long-Evans apresentaram melhor desempenho na reinstalação da autoadministração operante de etanol quando comparados a Wistar. De fato, a literatura da área demonstra que ratos Wistar não apresentam um comportamento robusto de reinstalação da busca de etanol (Liu e Weiss, 2002). Alguns trabalhos atribuem essa diversidade no consumo de etanol a diferenças na metabolização dessas substâncias entre essas linhagens (Simms *et al.*, 2008; Carnicella *et al.*, 2014). Neste sentido, estudos demonstram que ratos Long-Evans em relação a Wistar atingem concentrações plasmáticas mais altas de etanol durante a sessão de autoadministração operante de etanol (Bitó-Onon *et al.*, 2011), o que poderia favorecer o desempenho dos animais. Foi demonstrado também, durante uma sessão operante, que os ratos Long-Evans apresentam um aumento da motivação para respostas na barra ativa, semelhantes à de ratos de ninhadas que demonstram alta preferência por etanol (ratos P) (Bell, Rodd, Lumeng, *et al.*, 2006; Bell, Rodd, Sable, *et al.*, 2006; Simms *et al.*, 2008). Estudos utilizando acesso intermitente de etanol 20%, com 2 garrafas de livre escolha, demonstraram também que a linhagem Long-Evans apresenta maior ingestão de etanol e consumo excessivo comparado a linhagem Wistar (Simms *et al.*, 2008).

A literatura mostra, que para a observação da recaída em ratos Wistar é necessário a utilização de alguns artifícios, como por exemplo, linhagens que mostram preferência acentuada ao etanol (Wistar P) ou a exposição desses animais à câmara de vapor de etanol (Gilpin *et al.*, 2008). Nesse sentido, Liu e Weiss (2002) mostraram que a reinstalação da autoadministração de etanol induzida por estímulos ambientais foi mais proeminente em ratos Wistar P quando comparados àqueles que não apresentavam preferência ao etanol. Liu e Weiss (2002) demonstraram que somente os ratos Wistar que foram expostos a câmara de vapor de etanol, reinstalaram a autoadministração de etanol após a exposição a dicas ambientais.

Como em nossos experimentos os ratos Long-Evans apresentaram melhor desempenho no teste de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto, adotamos essa linhagem como modelo animal para os estudos apresentados nessa dissertação.

Embora muitos modelos animais foram desenvolvidos para o estudo da recaída ao uso de etanol induzida pelo ambiente, muitas lacunas neurobiológicas ainda devem ser preenchidas (Shaham *et al.*, 2003).

Neste contexto, estudos imuno-histoquímicos mostram que córtex pré-frontal medial dorsal, núcleo accumbens (centro e borda), amígdala basolateral, hipocampo

dorsal, área tegmental ventral e córtex orbital frontal são ativados na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo ambiente (Zhao *et al.*, 2006; Dayas *et al.*, 2007; Dayas *et al.*, 2008; Jupp *et al.*, 2011). Estes resultados foram confirmados através de estudos funcionais utilizando injeções intracerebrais de Muscimol/Baclofen (agonistas GABA<sub>A</sub> e B) que mostram a participação do núcleo accumbens (borda e centro), córtex pré-frontal pré-límbico, hipotálamo lateral e amígdala basolateral nesse comportamento (Chaudhri *et al.*, 2008; Chaudhri *et al.*, 2009; Chaudhri *et al.*, 2013; Willcocks e McNally, 2013; Marchant *et al.*, 2014; Marchant *et al.*, 2015).

Em nosso estudo, observamos que a reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto foi acompanhada pelo aumento da expressão de Fos no córtex pré-límbico e que a inibição farmacológica dessa região inibiu a reinstalação da autoadministração de etanol. Nossos resultados são consistentes com os previamente demonstrados por Willcocks e McNally (2013), que mostraram que a inativação farmacológica reversível do córtex pré-frontal dorso medial atenuou a reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto. Estes resultados corroboram com a literatura que demonstram papel importante do córtex pré-límbico em diferentes formas de reinstalação da busca de drogas de abuso (Lasseter *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2014; Marchant *et al.*, 2015; Stefanik *et al.*, 2016). Por exemplo, McFarland e Kalivas (2001) demonstraram que a inativação farmacológica do córtex pré-límbico atenuou a reinstalação da busca por cocaína induzida por uma subdose de cocaína. No mesmo sentido, Fuchs *et al.* (2005) mostraram que a inativação do córtex pré-límbico atenuou a reinstalação da autoadministração de cocaína induzida por dicas. Essas evidências sugerem que o córtex pré-límbico poderia ser uma região comum que medeia a recaída ao uso de drogas.

Dados da literatura sugerem que regiões distintas do córtex pré-frontal medial controlam os comportamentos de extinção e reinstalação da autoadministração de drogas de abuso (Fuchs *et al.*, 2005; Lasseter *et al.*, 2010; Bossert *et al.*, 2011; Willcocks; McNally, 2013; Marchant *et al.*, 2015). Em uma revisão recente, Heilig (2017) e seus colaboradores sugerem que a região pré-límbica e infralímbica atuam em processos dicotômicos. Enquanto o córtex pré-límbico atuaria no controle das repostas de medo condicionado, nas respostas condicionadas de recompensa e no controle de comportamentos apetitivos, o córtex infralímbico atuaria na supressão dessas respostas (Heilig *et al.*, 2017).

Vários processos relacionados com aprendizado associativo e evocação de memórias de longo prazo são atribuídos ao córtex pré-límbico. Essas evidências poderiam explicar o papel dessa estrutura na reinstalação da autoadministração induzida pelo contexto (Quinn *et al.*, 2008; Euston *et al.*, 2012). Por exemplo, estudos sugerem que o córtex pré-límbico recebe informações de estruturas relacionadas à emoções e a processos de aprendizagem e memória associativa (Euston *et al.*, 2012). Além disso, outras evidências demonstraram que essa estrutura recebe informações sensoriais e emocionais evocadas por dicas contextuais através de projeções provindas do hipocampo, amígdala, córtex orbital frontal e área tegmental ventral (Miller, 2000; Mulder *et al.*, 2000). Foi demonstrado que ativação dessas projeções medeia respostas condicionadas ao contexto (Miller e Cohen, 2001).

Dados da literatura demonstram que neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos do córtex pré-límbico recebem projeções específicas de outras regiões corticais, hipocampais, da amígdala e área tegmental ventral. Essas projeções possuem papel relevante na mediação cognitiva e emocional dos processos de consolidação de memórias (Brandstatter *et al.*, 1995). Por exemplo, projeções advindas do hipocampo proporcionam informações espaciais essenciais para formação da memória contextual (Floresco *et al.*, 1997). Baseados em todas essas evidências, nós poderíamos supor que a ativação do córtex pré-límbico, por dicas contextuais, poderia aumentar o desejo de busca pela droga e promover recaída ao uso da substância (Marchant *et al.*, 2015).

Nossos resultados mostraram ainda, que não houve ativação do córtex infralímbico e cíngulo durante a reinstalação da autoadministração de etanol. Esses achados corroboram com os estudos de Willcocks e McNally (2013) que também não demonstraram a participação do córtex infralímbico e cíngulo na reinstalação da autoadministração de bebidas alcólicas induzida pelo contexto. Esses autores observaram que a inativação dessas regiões não atenuou a reinstalação da autoadministração (Pfarr *et al.*, 2015; Heilig, 2017).

Embora estudos demonstrem a participação de diferentes áreas na recaída induzida pelo contexto, a literatura mostra que esse comportamento envolve processos muito mais complexos. Pois, dicas ambientais relacionadas ao uso de drogas são uma complexa combinação de diferentes estímulos (visuais, táteis, sonoros, sensoriais e interoceptivos) que são reconhecidos pelo encéfalo com alto grau de resolução. Portanto, qualquer mecanismo capaz de armazenar este tipo de

aprendizado deve ter, comparativamente, um alto grau de resolução (Cruz *et al.*, 2013; Cruz, Javier Rubio, *et al.*, 2015).

Assim, foi proposto que os processos de aprendizados associativos e memória envolvem alterações moleculares conhecidos como engramas em sinapses de “*neuronal ensembles*” (Tonegawa *et al.*, 2015). Embora muitos trabalhos comprovem o envolvimento desses pequenos grupos de neurônios em comportamentos associados ao abuso de substâncias, essa nova abordagem não foi empregada nos estudos dos mecanismos neurais envolvidos na dependência ao etanol.

Observamos em nossos estudos que a reinstalação da autoadministração induzida pelo contexto correlacionou-se com a indução de Fos em  $\sim 7,7 \pm 0,27\%$  dos neurônios do córtex pré-límbico. Estes resultados corroboram dados da literatura que demonstram envolvimento de pequenos grupos neuronais na reinstalação da autoadministração de drogas induzida pelo contexto (Cruz *et al.*, 2013; 2014; 2015, Leao *et al.*, 2015, Rubio *et al.*, 2015). Por exemplo, Bossert e colaboradores (2011) demonstraram que apenas 12% dos neurônios do córtex pré-frontal, porção ventromedial, foram ativados durante o teste de reinstalação da autoadministração de heroína induzida pelo contexto. Esses autores demonstraram ainda que quando esses neurônios foram seletivamente inibidos, a reinstalação foi atenuada (BOSSERT *et al.*, 2011). Da mesma forma, Cruz e colaboradores (2014) demonstraram que apenas 3,4% dos neurônios da borda do núcleo accumbens foram ativados durante a reinstalação da autoadministração de cocaína induzida pelo contexto e que a inibição seletiva desses neurônios atenuou a reinstalação desse comportamento. Reforçando as evidências da participação de “*neuronal ensembles*” em comportamentos condicionados relacionados à dependência de drogas de abuso, Koya e colaboradores (2009), demonstraram que apenas 4% dos neurônios do núcleo accumbens são ativados na expressão da sensibilização locomotora contexto-específica à cocaína e que a inativação específica dessa pequena população de neurônios inibiu a expressão dessa sensibilização (Koya *et al.*, 2009).

Dessa maneira, nosso estudo poderia sugerir a participação de “*neuronal ensembles*” do córtex pré-límbico na associação entre o efeito reforçador do etanol e o contexto associado a administração dessa substância. E ainda, que a reativação deste pequeno arranjo neural poderia promover a reinstalação da autoadministração

de etanol. Entretanto mais experimentos, utilizando ratos transgênicos, precisam ser realizados para confirmarmos essa hipótese.

Baseados na hipótese acima e na teoria que propõe que processos de aprendizado associativos relacionados à dependência a substâncias de abuso promovem plasticidades singulares em “*neuronal ensembles*”, no presente estudo investigamos alterações na expressão gênica de moléculas relacionadas com alterações nas funções sinápticas, em neurônios que foram seletivamente ativados, durante o teste de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto (Guez-Barber *et al.*, 2011; Guez-Barber *et al.*, 2012; Koya *et al.*, 2012; Fanous *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Rubio *et al.*, 2015).

Nossos resultados demonstram aumento na expressão da subunidade GABA $\alpha$ 5, do receptor GABAérgico A e diminuição nas expressões das subunidades GluR1 e GluR2, do receptor glutamatérgico AMPA em neurônios que foram seletivamente ativados pela exposição ao contexto relacionado com a administração de etanol quando comparado aos não ativados. Não encontramos nenhuma alteração na expressão desses genes quando os animais foram expostos ao contexto da extinção.

Esses resultados corroboram os estudos que mostram a presença de alterações gênicas singulares somente em “*neuronal ensembles*” que armazenam as memórias relacionadas a comportamentos condicionados a administração de uma substância de abuso (Guez-Barber *et al.*, 2011; Guez-Barber *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015; Rubio *et al.*, 2015). Por exemplo, Rubio e colaboradores (2015) demonstraram que a reinstalação da autoadministração de metanfetamina foi associada ao aumento da expressão dos genes de expressão imediata Fos e FosB e do gene da subunidade do receptor NMDA Grin2a, somente em células ativadas pelo contexto associado a metanfetamina. Da mesma forma, Fanous e colaboradores (2012), demonstraram aumento na expressão dos genes FosB, Arc, Egr1, Egr2, NPY e MAP2K6, somente em neurônios ativados pela associação do contexto e a administração de heroína. Alterações moleculares apenas em “*neuronal ensembles*” relacionados com a associação droga e contexto também foram demonstradas para a sensibilização contexto específica para cocaína (Guez-Barber *et al.*, 2011; Koya *et al.*, 2012).

Assim, nossos dados reafirmam a importância de estudar alterações moleculares presentes em “*neuronal ensembles*” para a elucidação dos mecanismos realmente envolvidos em comportamentos condicionados a drogas de abuso.

Embora a teoria sobre “*neuronal ensembles*” e seus *engramas* promoveu grande impacto sobre as pesquisas de dependência, estudos baseados nesta teoria são escassos. A vasta maioria dos estudos sobre plasticidades e os mecanismos sinápticos relacionados ao reforço, recaída e efeitos condicionados das substâncias de abuso analisam as alterações que ocorrem em neurônios randomicamente isolados ou em um específico tipo celular de neurônios, sem levar em consideração seu estado de ativação (Cruz *et al.*, 2013; Cruz, Javier Rubio, *et al.*, 2015). Assumindo que apenas uma pequena população neural é recrutada em cada comportamento, as plasticidades avaliadas em grande parte dos estudos sobre dependência provêm, na sua maioria, de neurônios que não participam do comportamento. Infelizmente, as alterações moleculares que presumidamente medeiam a busca por drogas são perdidas ou mascaradas pelas alterações que ocorrem nos neurônios não ativados, que são a maioria das células presentes em cada região encefálica (Cruz *et al.*, 2013; Cruz, Javier Rubio, *et al.*, 2015).

A literatura mostra que a exposição repetida a substâncias psicoativas pode promover alterações duradouras na expressão de genes que podem influenciar no desenvolvimento da dependência e na recaída (Nestler, 2008; Liu *et al.*, 2014). Em relação aos sistemas de neurotransmissão envolvidos na recaída ao uso de etanol, evidências sugerem que esse comportamento parece estar relacionado a alterações na expressão de genes de proteínas envolvidas nos sistemas de neurotransmissão glutamatérgica, GABAérgica e CRFérgica (Vengeliene *et al.*, 2008).

Nossos resultados mostraram diminuição na expressão do gene GluR1 e GluR2 no córtex pré-límbico durante a reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto.

Nossos resultados contrapõem dados da literatura que demonstram que a reinstalação da busca de etanol e outras substâncias de abuso está relacionada ao aumento na transmissão glutamatérgica, mediada pela ativação dos receptores AMPA (Nestler e Aghajanian, 1997; Saal *et al.*, 2003; Kalivas, 2009; Bowers, 2010). Por exemplo, foi demonstrado que aumento na atividade de receptores AMPA potencializa a reinstalação da autoadministração de etanol induzida por dicas ambientais (Cannady *et al.*, 2013). E que a administração de antagonistas desses



receptores atenua a reinstalação da autoadministração de etanol induzida por contexto (Backstrom e Hyytia, 2004; Sanchis-Segura *et al.*, 2006b). Foi demonstrado também aumento de receptores glutamatérgicos contendo as subunidades GluR1/GluR2 após teste de reinstalação da autoadministração de cocaína induzida pela administração dessa substância (Famous *et al.*, 2008).

Entretanto, algumas diferenças entre os protocolos podem justificar as diferenças encontradas entre nossos resultados e os apresentados acima. Neste sentido, nenhum trabalho investigou o papel dessas subunidades (GluR1 e GluR2) na reinstalação induzida pelo contexto (Bossert *et al.*, 2013; Adhikary *et al.*, 2016; Venniro *et al.*, 2016). É importante ressaltar ainda que estudamos a expressão gênica, enquanto os estudos citados na literatura fazem a análise de quantidades de proteína ou das correntes elétricas evocadas por canais contendo essas subunidades dos receptores glutamatérgicos. Assim, esses mecanismos poderiam interferir e aumentar a transcrição dessas proteínas.

Um fator muito importante a ser considerado é que enquanto os estudos da literatura estudam a função ou expressão desses receptores em populações gerais de neurônios (Nestler e Aghajanian, 1997; Saal *et al.*, 2003; Kalivas, 2009; Bowers, 2010), nossa análise foi realizada apenas nos neurônios que participaram de nosso comportamento (~7,7%). Portanto, essa mesma redução na expressão das subunidades GluR1/GluR2 pode ter ocorrido nos experimentos reportados acima, porém esta redução pode ter sido mascarada por alterações que possam ter ocorrido na vasta maioria dos neurônios que não participaram dos comportamentos analisados.

Neste sentido, Koya e colaboradores (2012) encontraram resultados distintos da literatura quando analisaram a presença de sinapses silenciosas em “*neuronal ensembles*” relacionados com a sensibilização contexto específico a cocaína. Enquanto os estudos da literatura que analisavam populações geral de neurônios, sem considerar seu estado de ativação, mostravam aumento da razão AMPA/NMDA em animais sensibilizados a cocaína, Koya *et al.* (2012) demonstraram diminuição desta razão nos neurônios que foram ativados durante o teste da sensibilização.

Estes resultados corroboram com nossos dados, pois a diminuição na razão AMPA/NMDA observada por Koya *et al.* (2012) pode ter sido ocasionada por redução na expressão dos receptores AMPA, como observado em nosso estudo.

Entretanto não podemos afirmar se a redução na expressão das subunidades GluR1 e GluR2 é causa ou consequência da reinstalação da busca de etanol.

A literatura demonstra que ativação do receptor GABA A medeia diversos efeitos comportamentais em resposta a administração de etanol (Grobin *et al.*, 1998). Estudos mostraram que estes efeitos parecem ser mediados principalmente por receptores GABA A que possuem as subunidades GABA $\alpha$ 2 e  $\alpha$ 5 (Grobin *et al.*, 1998).

Nossos resultados mostraram aumento da expressão da subunidade GABA $\alpha$ 5 após o teste de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto. Os receptores GABAérgicos que expressam a subunidade  $\alpha$ 5 representam uma pequena população de receptores (Sur *et al.*, 1999; Uusi-Oukari e Korpi, 2010). Evidências relatam o potencial papel desses receptores nos mecanismos relacionados ao abuso e dependência de etanol (Sesack e Grace, 2010). Neste sentido, Song e colaboradores (2003) reportaram a associação entre alterações no gene que codifica a subunidade GABA $\alpha$ 5 e alcoolismo. Foi demonstrado também que a administração de um agonista inverso de receptores GABA que continha a subunidade  $\alpha$ 5 diminui a autoadministração de etanol em ratos (June *et al.*, 2001; Foster *et al.*, 2004). Além disso, foi relatado que camundongos *knockout para a subunidade  $\alpha$ 5* apresentam diminuição da preferência e consumo de etanol (Boehm *et al.*, 2004). Assim, poderíamos supor que o aumento na expressão desse gene poderia favorecer a reinstalação da autoadministração de etanol.

Em relação a transmissão CRFérgica, Logrip e colaboradores (2012) demonstraram que a recaída ao uso de drogas de abuso está relacionada com o aumento da expressão do gene CRF (Chang *et al.*, 1993; Lovenberg *et al.*, 1995).

A corticotrofina é capaz de influenciar vários estágios da dependência a substâncias psicoativas. Por exemplo, ela promove elevados níveis de ansiedade e pensamentos negativos que podem vir a sensibilizar o processo de recaída ao uso dessas substâncias (Goeders, 2003; Sinha, 2008). Pelo fato dela também ser o principal neurotransmissor relacionado com as respostas do estresse, Blacktop e colaboradores (2011) demonstraram que a recaída ao uso de cocaína é intensificada com o aumento de expressão CRFérgica. Além disso, a injeção de antagonistas de receptores CRFérgicos do tipo 1 diminuiu a reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo estresse ou por dicas ambientais (Le *et al.*, 2000; Gehlert *et al.*,



2007; Marinelli *et al.*, 2007). Entretanto nosso estudo não evidenciou alteração na expressão desse gene relacionada a recaída induzida pelo ambiente.

# CONSIDERAÇÕES FINAIS

*“Nada na vida se perde. Quando erramos adquirimos aprendizado. Quando corrigimos um erro, adquirimos conhecimento, e, quando ajudamos alguém a corrigir um erro, demonstramos ter adquirido sabedoria. “*

*(Rafael Silveira)*

Esta dissertação teve como temática a recaída ao uso de etanol, que é um dos principais problemas do tratamento da dependência a essa substância. Para o melhor entendimento da neurobiologia desse comportamento, utilizamos o modelo de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo ambiente. Através desse modelo, observamos o envolvimento histológico e funcional do córtex pré-límbico na reinstalação da autoadministração de etanol. Identificamos que uma pequena proporção de neurônios dessa região medeia esse comportamento. Observamos também, que a redução na expressão gênica de GluR1 e GluR2 e aumento na expressão de GABA  $\alpha 5$  nos “*neuronal ensembles*” do córtex pré-frontal se correlacionou com a reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto.

Esse projeto permitiu a utilização de metodologias inovadoras, utilizadas em laboratórios de excelência em pesquisa. Nosso estudo foi o primeiro a utilizar a teoria dos “*neuronal ensembles*” para o entendimento das bases neurais da recaída ao uso de etanol.

# CONCLUSÃO

*“A sabedoria é a única porta para o futuro.”*

*(Wilian Santos)*

## 8.1 Conclusão Geral

Demonstramos o envolvimento de pequenos grupamentos neurais do córtex pré-límbico na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto. Identificamos a presença de alterações moleculares nestes grupamentos neurais, que se correlacionaram com reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto. Nossos resultados mostram que o para o melhor entendimento da neurobiologia da dependência é preciso a identificação e a investigação das alterações moleculares presentes em “*neuronal ensembles*”.

## 8.2 Conclusões Específicas

1. Ratos Long-Evans apresentaram melhor desempenho durante o protocolo de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto quando comparado a ratos Wistar;
2. Evidenciamos o aumento da ativação do córtex pré-límbico na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto;
3. A reinstalação da autoadministração de etanol induzida pela exposição ao contexto promoveu a ativação de 7,7% de neurônios no córtex pré-límbico;
4. A inativação farmacológica reversível do córtex pré-límbico com Muscimol/Baclofen (agonista GABA<sub>A</sub>eGABA<sub>B</sub>) atenuou a reinstalação da autoadministração de etanol induzida pela exposição ao contexto;
5. Observamos diminuição na expressão das subunidades GluR1 e GluR2 dos receptores glutamatérgicos AMPA e aumento da expressão da subunidade GABA $\alpha$ 5 dos receptores GABAérgicos nos grupamentos neurais seletivamente ativados no córtex pré-límbico após a reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

*“O mais importante de tudo é nunca deixar de se perguntar.  
A curiosidade tem sua própria razão de existir”.*

*(Albert Einstein)*

ADHIKARY, S. et al. Incubation of extinction responding and cue-induced reinstatement, but not context- or drug priming-induced reinstatement, after withdrawal from methamphetamine. **Addict Biol**, Mar 14 2016. ISSN 1369-1600 (Electronic) 1355-6215 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26989042>>.

AGUAYO, L. G. et al. GABA(A) receptors as molecular sites of ethanol action. Direct or indirect actions? **Curr Top Med Chem**, v. 2, n. 8, p. 869-85, Aug 2002. ISSN 1568-0266 (Print) 1568-0266 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12171577>>.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM). 5a edição, Washington, DC, 2013. Disponível em: <<http://c026204.cdn.sapo.io/1/c026204/cld-file/1426522730/6d77c9965e17b15/b37dfc58aad8cd477904b9bb2ba8a75b/obaudoe-ducador/2015/DSM%20V.pdf>>. Acesso em: 15 de janeiro de 2017.

BACKSTROM, P.; HYYTIA, P. Ionotropic glutamate receptor antagonists modulate cue-induced reinstatement of ethanol-seeking behavior. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 28, n. 4, p. 558-65, Apr 2004. ISSN 0145-6008 (Print) 0145-6008 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15100606>>.

BACKSTROM, P.; HYYTIA, P. Suppression of alcohol self-administration and cue-induced reinstatement of alcohol seeking by the mGlu2/3 receptor agonist LY379268 and the mGlu8 receptor agonist (S)-3,4-DCPG. **European journal of pharmacology**, v. 528, n. 1-3, p. 110-8, Dec 28 2005. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16324694>>.

BASTOS, F. I. et al. [Drug and alcohol use: main findings of a national survey, Brazil 2005]. **Rev Saude Publica**, v. 42 Suppl 1, p. 109-17, Jun 2008. ISSN 0034-8910 (Print) 0034-8910 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18660930>>.

BELL, R. L. et al. The alcohol-preferring P rat and animal models of excessive alcohol drinking. **Addict Biol**, v. 11, n. 3-4, p. 270-88, Sep 2006. ISSN 1355-6215 (Print) 1355-6215 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16961759>>.

BELL, R. L. et al. Daily patterns of ethanol drinking in peri-adolescent and adult alcohol-preferring (P) rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 83, n. 1, p. 35-46, Jan 2006. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16442608>>.

BITO-ONON, J. J. et al. Varenicline, a partial agonist at neuronal nicotinic acetylcholine receptors, reduces nicotine-induced increases in 20% ethanol operant self-administration in Sprague-Dawley rats. **Addict Biol**, v. 16, n. 3, p. 440-9, Jul 2011. ISSN 1369-1600 (Electronic) 1355-6215 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21392178>>.

BLACKTOP, J. M. et al. Augmented cocaine seeking in response to stress or CRF delivered into the ventral tegmental area following long-access self-administration is mediated by CRF receptor type 1 but not CRF receptor type 2. **J Neurosci**, v. 31, n. 31, p. 11396-403, Aug 03 2011. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21813699>>.

BOEHM, S. L., 2ND et al. Over-expression of the fyn-kinase gene reduces hypnotic sensitivity to ethanol in mice. **Neurosci Lett**, v. 372, n. 1-2, p. 6-11, Nov 30 2004. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15531078>>.

BOSSERT, J. M. et al. Neurobiology of relapse to heroin and cocaine seeking: an update and clinical implications. **European journal of pharmacology**, v. 526, n. 1-3, p. 36-50, Dec 5 2005. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16289451>>.

BOSSERT, J. M. et al. The reinstatement model of drug relapse: recent neurobiological findings, emerging research topics, and translational research. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 229, n. 3, p. 453-76, Oct 2013. ISSN 1432-2072 (Electronic) 0033-3158 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23685858>>.

BOSSERT, J. M. et al. Ventral medial prefrontal cortex neuronal ensembles mediate context-induced relapse to heroin. **Nat Neurosci**, v. 14, n. 4, p. 420-2, Apr 2011. ISSN 1546-1726 (Electronic) 1097-6256 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21336273>>.

BOSSERT, J. M. et al. Role of projections from ventral medial prefrontal cortex to nucleus accumbens shell in context-induced reinstatement of heroin seeking. **J Neurosci**, v. 32, n. 14, p. 4982-91, Apr 04 2012. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22492053>>.

BOWERS, M. S. Activators of G-protein signaling 3: a drug addiction molecular gateway. **Behav Pharmacol**, v. 21, n. 5-6, p. 500-13, Sep 2010. ISSN 1473-5849 (Electronic) 0955-8810 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20700046>>.

BRANDSTATTER, J. H. et al. Co-stratification of GABAA receptors with the directionally selective circuitry of the rat retina. **Vis Neurosci**, v. 12, n. 2, p. 345-58, Mar-Apr 1995. ISSN 0952-5238 (Print) 0952-5238 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7786855>>.

BURATTINI, C. et al. The ethanol self-administration context as a reinstatement cue: acute effects of naltrexone. **Neuroscience**, v. 139, n. 3, p. 877-87, 2006. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16516392>>.

CADONI, C.; DI CHIARA, G. Differential changes in accumbens shell and core dopamine in behavioral sensitization to nicotine. **Eur J Pharmacol**, v. 387, n. 3, p.



R23-5, Jan 17 2000. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10650185>>.

CANNADY, R. et al. Enhanced AMPA receptor activity increases operant alcohol self-administration and cue-induced reinstatement. **Addict Biol**, v. 18, n. 1, p. 54-65, Jan 2013. ISSN 1369-1600 (Electronic) 1355-6215 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23126443>>.

CANNELLA, N. et al. Neuropeptide S differently modulates alcohol-related behaviors in alcohol-preferring and non-preferring rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 233, n. 15-16, p. 2915-24, Aug 2016. ISSN 1432-2072 (Electronic) 0033-3158 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27235017>>.

CARNICELLA, S.; RON, D.; BARAK, S. Intermittent ethanol access schedule in rats as a preclinical model of alcohol abuse. **Alcohol**, v. 48, n. 3, p. 243-52, May 2014. ISSN 1873-6823 (Electronic) 0741-8329 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24721195>>.

CEBRID (CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS). II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: 2005. Disponível em: <<http://200.144.91.102/cebridweb/download.aspx?cd=54>>. Acesso em: 25 de janeiro de 2017.

CEBRID (CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS). VI Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio da Rede Pública e Privada nas Capitais Brasileiras 2010. Disponível em: <<http://www.obid.senad.gov.br/portais/OBID/biblioteca/documentos/Publicacoes/328890.pdf>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2017.

CHANG, C. P. et al. Identification of a seven transmembrane helix receptor for corticotropin-releasing factor and sauvagine in mammalian brain. **Neuron**, v. 11, n. 6, p. 1187-95, Dec 1993. ISSN 0896-6273 (Print)0896-6273 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8274282>>.

CHAUDHRI, N. et al. Reinstated ethanol-seeking in rats is modulated by environmental context and requires the nucleus accumbens core. **Eur J Neurosci**, v. 28, n. 11, p. 2288-98, Dec 2008. ISSN 1460-9568 (Electronic)0953-816X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19046372>>.

CHAUDHRI, N.; SAHUQUE, L. L.; JANAK, P. H. Ethanol seeking triggered by environmental context is attenuated by blocking dopamine D1 receptors in the nucleus accumbens core and shell in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 207, n. 2, p. 303-14, Dec 2009. ISSN 1432-2072 (Electronic) 0033-3158 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19779700>>.

CHAUDHRI, N. et al. Unilateral inactivation of the basolateral amygdala attenuates context-induced renewal of Pavlovian-conditioned alcohol-seeking. **Eur J Neurosci**, v. 38, n. 5, p. 2751-61, Sep 2013. ISSN 1460-9568 (Electronic) 0953-816X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23758059>>.

COLLINS, B. N.; BRANDON, T. H. Effects of extinction context and retrieval cues on alcohol cue reactivity among nonalcoholic drinkers. **Journal of consulting and clinical psychology**, v. 70, n. 2, p. 390-7, Apr 2002. ISSN 0022-006X (Print) 0022-006X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11952197>>.

CREWS, F. T. et al. Effects of ethanol on ion channels. **Int Rev Neurobiol**, v. 39, p. 283-367, 1996. ISSN 0074-7742 (Print) 0074-7742 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8894851>>.

CROMBAG, H. S. et al. Review. Context-induced relapse to drug seeking: a review. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 363, n. 1507, p. 3233-43, Oct 12 2008. ISSN 1471-2970 (Electronic) 0962-8436 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18640922>>.

CROMBAG, H. S.; SHAHAM, Y. Renewal of drug seeking by contextual cues after prolonged extinction in rats. **Behav Neurosci**, v. 116, n. 1, p. 169-73, Feb 2002. ISSN 0735-7044 (Print) 0735-7044 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11895178>>.

CRUZ, F. C. et al. Role of nucleus accumbens shell neuronal ensembles in context-induced reinstatement of cocaine-seeking. **J Neurosci**, v. 34, n. 22, p. 7437-46, May 28 2014. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24872549>>.

CRUZ, F. C.; JAVIER RUBIO, F.; HOPE, B. T. Using c-fos to study neuronal ensembles in corticostriatal circuitry of addiction. **Brain Res**, Dec 2 2015. ISSN 1872-6240 (Electronic) 0006-8993 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25446457>>.

CRUZ, F. C. et al. New technologies for examining the role of neuronal ensembles in drug addiction and fear. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 11, p. 743-54, Nov 2013. ISSN 1471-0048 (Electronic) 1471-003X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24088811>>.

DAVIES, M. The role of GABAA receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. **J Psychiatry Neurosci**, v. 28, n. 4, p. 263-74, Jul 2003. ISSN 1180-4882 (Print) 1180-4882 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12921221>>.

DAYAS, C. V. et al. Distinct patterns of neural activation associated with ethanol seeking: effects of naltrexone. **Biol Psychiatry**, v. 61, n. 8, p. 979-89, Apr 15 2007. ISSN 0006-3223 (Print) 0006-3223 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17098214>>.

DAYAS, C. V. et al. Stimuli linked to ethanol availability activate hypothalamic CART and orexin neurons in a reinstatement model of relapse. **Biol Psychiatry**, v. 63, n. 2,

p. 152-7, Jan 15 2008. ISSN 1873-2402 (Electronic) 0006-3223 (Linking). Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17570346>>.

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) 0027-8424 (Linking). Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2899326>>.

DICK, D. M. et al. The role of GABRA2 in risk for conduct disorder and alcohol and drug dependence across developmental stages. **Behav Genet**, v. 36, n. 4, p. 577-90, Jul 2006. ISSN 0001-8244 (Print) 0001-8244 (Linking). Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16557364>>.

DIERGAARDE, L. et al. Contextual renewal of nicotine seeking in rats and its suppression by the cannabinoid-1 receptor antagonist Rimonabant (SR141716A). **Neuropharmacology**, v. 55, n. 5, p. 712-6, Oct 2008. ISSN 0028-3908 (Print) 0028-3908 (Linking). Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18588903>>.

DUALIBI, S.; LARANJEIRA, R. [Alcohol-related public policies]. **Rev Saude Publica**, v. 41, n. 5, p. 839-48, Oct 2007. ISSN 0034-8910 (Print) 0034-8910 (Linking). Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17923906>>.

ERDOZAIN, A. M.; CALLADO, L. F. Neurobiological alterations in alcohol addiction: a review. **Adicciones**, v. 26, n. 4, p. 360-70, 2014. ISSN 0214-4840 (Print) 0214-4840 (Linking). Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25578004>>.

EUSTON, D. R.; GRUBER, A. J.; MCNAUGHTON, B. L. The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. **Neuron**, v. 76, n. 6, p. 1057-70, Dec 20 2012. ISSN 1097-4199 (Electronic) 0896-6273 (Linking). Disponible em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23259943>>.

EVERITT, B. J.; ROBBINS, T. W. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. **Nat Neurosci**, v. 8, n. 11, p. 1481-9, Nov 2005. ISSN 1097-6256 (Print) 1097-6256 (Linking). Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16251991>>.

EZZATI, M. et al. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. **Lancet**, v. 360, n. 9343, p. 1347-60, Nov 02 2002. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736 (Linking). Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12423980>>.

FADDA, F.; ROSSETTI, Z. L. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. **Prog Neurobiol**, v. 56, n. 4, p. 385-431, Nov 1998. ISSN 0301-0082 (Print) 0301-0082 (Linking). Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9775400>>.

FAMOUS, K. R. et al. Phosphorylation-dependent trafficking of GluR2-containing AMPA receptors in the nucleus accumbens plays a critical role in the reinstatement of cocaine seeking. **J Neurosci**, v. 28, n. 43, p. 11061-70, Oct 22 2008. ISSN 1529-

2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18945913>>.

FANOUS, S. et al. Role of orbitofrontal cortex neuronal ensembles in the expression of incubation of heroin craving. **J Neurosci**, v. 32, n. 34, p. 11600-9, Aug 22 2012. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22915104>>.

FANOUS, S. et al. Unique gene alterations are induced in FACS-purified Fos-positive neurons activated during cue-induced relapse to heroin seeking. **J Neurochem**, v. 124, n. 1, p. 100-8, Jan 2013. ISSN 1471-4159 (Electronic) 0022-3042 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23113797>>.

FERNANDES, D. Cachaça: Uma dose de História - editora segmento. 2014. Disponível em: <[http://www2.uol.com.br/historiaviva/reportagens/cachaca\\_uma\\_dose\\_de\\_historia](http://www2.uol.com.br/historiaviva/reportagens/cachaca_uma_dose_de_historia)>. Visitada em: 14 de janeiro de 2017.

FLORESCO, S. B.; SEAMANS, J. K.; PHILLIPS, A. G. Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. **J Neurosci**, v. 17, n. 5, p. 1880-90, Mar 1 1997. ISSN 0270-6474 (Print) 0270-6474 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9030646>>.

FOSTER, K. L. et al. GABA(A) and opioid receptors of the central nucleus of the amygdala selectively regulate ethanol-maintained behaviors. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 269-84, Feb 2004. ISSN 0893-133X (Print) 0893-133X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14666116>>.

FUCHS, R. A. et al. The role of the dorsomedial prefrontal cortex, basolateral amygdala, and dorsal hippocampus in contextual reinstatement of cocaine seeking in rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 2, p. 296-309, Feb 2005. ISSN 0893-133X (Print) 0893-133X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15483559>>.

FUCHS, R. A. et al. Predictive validity of the extinction/reinstatement model of drug craving. **Psychopharmacology**, v. 135, n. 2, p. 151-60, Jan 1998. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9497020>>.

GALDUROZ, J. C. et al. Factors associated with heavy alcohol use among students in Brazilian capitals. **Rev Saude Publica**, v. 44, n. 2, p. 267-73, Apr 2010. ISSN 1518-8787 (Electronic) 0034-8910 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20339625>>.

GARNER, A. R. et al. Generation of a synthetic memory trace. **Science**, v. 335, n. 6075, p. 1513-6, Mar 23 2012. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22442487>>.

GASS, J. T. et al. Alcohol-seeking behavior is associated with increased glutamate transmission in basolateral amygdala and nucleus accumbens as measured by

glutamate-oxidase-coated biosensors. **Addiction Biology**, v. 16, n. 2, p. 215-28, Apr 2011. ISSN 1369-1600 (Electronic) 1355-6215 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21054692>>.

GATELY, I. Drink: a cultural history of alcohol. **New York, Gotham Books**, p. 644, 2008. Disponível em: <[http://file.zums.ac.ir/ebook/101-Drink%20-%20A%20Cultural%20History%20of%20Alcohol-Iain%20Gately-1592404642-Gotham-2009-560-\\$18.pdf](http://file.zums.ac.ir/ebook/101-Drink%20-%20A%20Cultural%20History%20of%20Alcohol-Iain%20Gately-1592404642-Gotham-2009-560-$18.pdf)>. Visitada em: 20 de janeiro de 2017.

GEHLERT, D. R. et al. 3-(4-Chloro-2-morpholin-4-yl-thiazol-5-yl)-8-(1-ethylpropyl)-2,6-dimethyl-imidazo [1,2-b]pyridazine: a novel brain-penetrant, orally available corticotropin-releasing factor receptor 1 antagonist with efficacy in animal models of alcoholism. **J Neurosci**, v. 27, n. 10, p. 2718-26, Mar 07 2007. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17344409>>.

GILPIN, N. W.; KOOB, G. F. Neurobiology of alcohol dependence: focus on motivational mechanisms. **Alcohol Res Health**, v. 31, n. 3, p. 185-95, 2008. ISSN 1930-0573 (Electronic) 1535-7414 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19881886>>.

GILPIN, N. W. et al. Vapor inhalation of alcohol in rats. **Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N. Crawley ... [et al.]**, v. Chapter 9, p. Unit 9 29, Jul 2008. ISSN 1934-8576 (Electronic) 1934-8576 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18634001>>.

GOEDERS, N. E. The impact of stress on addiction. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 13, n. 6, p. 435-41, Dec 2003. ISSN 0924-977X (Print) 0924-977X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14636959>>.

GRACE, A. A.; BUNNEY, B. S. Opposing effects of striatonigral feedback pathways on midbrain dopamine cell activity. **Brain Res**, v. 333, n. 2, p. 271-84, May 06 1985. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2986775>>.

GROBIN, A. C. et al. The role of GABA(A) receptors in the acute and chronic effects of ethanol. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 139, n. 1-2, p. 2-19, Sep 1998. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9768538>>.

GUEZ-BARBER, D. et al. FACS identifies unique cocaine-induced gene regulation in selectively activated adult striatal neurons. **J Neurosci**, v. 31, n. 11, p. 4251-9, Mar 16 2011. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21411666>>.

GUEZ-BARBER, D. et al. FACS purification of immunolabeled cell types from adult rat brain. **J Neurosci Methods**, v. 203, n. 1, p. 10-8, Jan 15 2012. ISSN 1872-678X (Electronic) 0165-0270 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21911005>>.



GUZOWSKI, J. F.; KNIERIM, J. J.; MOSER, E. I. Ensemble dynamics of hippocampal regions CA3 and CA1. **Neuron**, v. 44, n. 4, p. 581-4, Nov 18 2004. ISSN 0896-6273 (Print) 0896-6273 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15541306>>.

HAMLIN, A. S.; BLATCHFORD, K. E.; MCNALLY, G. P. Renewal of an extinguished instrumental response: neural correlates and the role of D1 dopamine receptors. **Neuroscience**, v. 143, n. 1, p. 25-38, Nov 17 2006. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16949214>>.

HEBB, D. O. **The organization of behavior; a neuropsychological theory**. New York,: Wiley, 1949. xix, 335 p.

HOPE, B. T. et al. Cocaine-induced locomotor activity and Fos expression in nucleus accumbens are sensitized for 6 months after repeated cocaine administration outside the home cage. **Eur J Neurosci**, v. 24, n. 3, p. 867-75, Aug 2006. ISSN 0953-816X (Print) 0953-816X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16930414>>.

HORSCHITZ, S. et al. A dopamine transporter mutation associated with bipolar affective disorder causes inhibition of transporter cell surface expression. **Mol Psychiatry**, v. 10, n. 12, p. 1104-9, Dec 2005. ISSN 1359-4184 (Print) 1359-4184 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16103889>>.

HUANG, S.; HUGANIR, R. L.; KIRKWOOD, A. Adrenergic gating of Hebbian spike-timing-dependent plasticity in cortical interneurons. **J Neurosci**, v. 33, n. 32, p. 13171-8, Aug 07 2013. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23926270>>.

HUGANIR, R. L.; NICOLL, R. A. AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. **Neuron**, v. 80, n. 3, p. 704-17, Oct 30 2013. ISSN 1097-4199 (Electronic) 0896-6273 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24183021>>.

IMPERATO, A.; MULAS, A.; DI CHIARA, G. Nicotine preferentially stimulates dopamine release in the limbic system of freely moving rats. **Eur J Pharmacol**, v. 132, n. 2-3, p. 337-8, Dec 16 1986. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3816984>>.

JEROME, H. J. O conceito de dependência: Reflexões Histórico. **Saúde Álcool e Mundial Research**, v. 17, p. 188-190, 1993.

JUNE, H. L. et al. GABA(A) receptors containing (alpha)5 subunits in the CA1 and CA3 hippocampal fields regulate ethanol-motivated behaviors: an extended ethanol reward circuitry. **J Neurosci**, v. 21, n. 6, p. 2166-77, Mar 15 2001. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11245701>>.

JUPP, B. et al. Discrete cue-conditioned alcohol-seeking after protracted abstinence: pattern of neural activation and involvement of orexin(1) receptors. **Br J Pharmacol**, v. 162, n. 4, p. 880-9, Feb 2011. ISSN 1476-5381 (Electronic) 0007-1188 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20973776>>.

KALIVAS, P. W. The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 8, p. 561-72, Aug 2009. ISSN 1471-0048 (Electronic) 1471-003X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19571793>>.

KIENAST, T.; HEINZ, A. Dopamine and the diseased brain. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 5, n. 1, p. 109-31, Feb 2006. ISSN 1871-5273 (Print) 1871-5273 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16613557>>.

KIIANMAA, K. et al. Effect of ethanol on extracellular dopamine in the nucleus accumbens of alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 52, n. 1, p. 29-34, Sep 1995. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7501675>>.

KNACKSTEDT, L. A.; KALIVAS, P. W. Glutamate and reinstatement. **Current opinion in pharmacology**, v. 9, n. 1, p. 59-64, Feb 2009. ISSN 1471-4892 (Print) 1471-4892 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19157986>>.

KOOB, G. F. The neurobiology of addiction: a neuroadaptational view relevant for diagnosis. **Addiction**, v. 101 Suppl 1, p. 23-30, Sep 2006. ISSN 0965-2140 (Print) 0965-2140 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16930158>>.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. **Science**, v. 278, n. 5335, p. 52-8, Oct 03 1997. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9311926>>.

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) 0893-133X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11120394>>.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Addiction and the brain antireward system. **Annu Rev Psychol**, v. 59, p. 29-53, 2008a. ISSN 0066-4308 (Print) 0066-4308 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18154498>>.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Review. Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 363, n. 1507, p. 3113-23, Oct 12 2008b. ISSN 1471-2970 (Electronic) 0962-8436 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18653439>>.

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurocircuitry of addiction. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 217-38, Jan 2010. ISSN 1740-634X (Electronic) 0893-133X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19710631>>.

KOYA, E. et al. Silent synapses in selectively activated nucleus accumbens neurons following cocaine sensitization. **Nat Neurosci**, v. 15, n. 11, p. 1556-62, Nov 2012. ISSN 1546-1726 (Electronic) 1097-6256 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23023294>>.

KOYA, E. et al. Targeted disruption of cocaine-activated nucleus accumbens neurons prevents context-specific sensitization. **Nat Neurosci**, v. 12, n. 8, p. 1069-73, Aug 2009. ISSN 1546-1726 (Electronic) 1097-6256 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19620976>>.

KUMAR, S. et al. The role of GABA(A) receptors in the acute and chronic effects of ethanol: a decade of progress. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 205, n. 4, p. 529-64, Sep 2009. ISSN 1432-2072 (Electronic) 0033-3158 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19455309>>.

LASSETER, H. C. et al. Prefrontal cortical regulation of drug seeking in animal models of drug relapse. **Curr Top Behav Neurosci**, v. 3, p. 101-17, 2010. ISSN 1866-3370 (Print) 1866-3370 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21161751>>.

LE, A. D. et al. Intra-median raphe nucleus (MRN) infusions of muscimol, a GABA-A receptor agonist, reinstate alcohol seeking in rats: role of impulsivity and reward. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 195, n. 4, p. 605-15, Jan 2008. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17891381>>.

LE, A. D. et al. The role of corticotrophin-releasing factor in stress-induced relapse to alcohol-seeking behavior in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 150, n. 3, p. 317-24, Jun 2000. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10923760>>.

LEAO, R. M. et al. Chronic nicotine activates stress/reward-related brain regions and facilitates the transition to compulsive alcohol drinking. **J Neurosci**, v. 35, n. 15, p. 6241-53, Apr 15 2015. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25878294>>.

LI, X. et al. Incubation of methamphetamine craving is associated with selective increases in expression of Bdnf and trkb, glutamate receptors, and epigenetic enzymes in cue-activated fos-expressing dorsal striatal neurons. **J Neurosci**, v. 35, n. 21, p. 8232-44, May 27 2015. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26019338>>.

LIU, Q. R. et al. Detection of molecular alterations in methamphetamine-activated Fos-expressing neurons from a single rat dorsal striatum using fluorescence-activated cell sorting (FACS). **J Neurochem**, v. 128, n. 1, p. 173-85, Jan 2014. ISSN 1471-4159 (Electronic) 0022-3042 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23895375>>.

LIU, X. et al. Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. **Nature**, v. 484, n. 7394, p. 381-5, Mar 22 2012. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22441246>>.

LIU, X.; WEISS, F. Additive effect of stress and drug cues on reinstatement of ethanol seeking: exacerbation by history of dependence and role of concurrent activation of corticotropin-releasing factor and opioid mechanisms. **J Neurosci**, v. 22,



n. 18, p. 7856-61, Sep 15 2002. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking).  
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12223538>>.

LOGRIP, M. L.; ZORRILLA, E. P.; KOOB, G. F. Stress modulation of drug self-administration: implications for addiction comorbidity with post-traumatic stress disorder. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 2, p. 552-64, Feb 2012. ISSN 1873-7064 (Electronic) 0028-3908 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21782834>>.

LOVENBERG, T. W. et al. CRF2 alpha and CRF2 beta receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. **Endocrinology**, v. 136, n. 9, p. 4139-42, Sep 1995. ISSN 0013-7227 (Print) 0013-7227 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7544278>>.

LUDWIG, A. M.; STARK, L. H. Alcohol craving. Subjective and situational aspects. **Quarterly journal of studies on alcohol**, v. 35, n. 3, p. 899-905, Sep 1974. ISSN 0033-5649 (Print) 0033-5649 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4411909>>.

LUDWIG, A. M.; WIKLER, A. "Craving" and relapse to drink. **Quarterly journal of studies on alcohol**, v. 35, n. 1, p. 108-30, Mar 1974. ISSN 0033-5649 (Print) 0033-5649 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4827273>>.

MAJCHROWICZ, E. Induction of physical dependence upon ethanol and the associated behavioral changes in rats. **Psychopharmacologia**, v. 43, n. 3, p. 245-54, Sep 17 1975. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1237914>>.

MARCHANT, N. J.; HAMLIN, A. S.; MCNALLY, G. P. Lateral hypothalamus is required for context-induced reinstatement of extinguished reward seeking. **J Neurosci**, v. 29, n. 5, p. 1331-42, Feb 04 2009. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19193880>>.

MARCHANT, N. J. et al. Role of corticostriatal circuits in context-induced reinstatement of drug seeking. **Brain Res**, v. 1628, n. Pt A, p. 219-32, Dec 02 2015. ISSN 1872-6240 (Electronic) 0006-8993 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25199590>>.

MARCHANT, N. J. et al. Context-induced relapse to alcohol seeking after punishment in a rat model. **Biological psychiatry**, v. 73, n. 3, p. 256-62, Feb 1 2013. ISSN 1873-2402 (Electronic) 0006-3223 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22883434>>.

MARCHANT, N. J. et al. A critical role of lateral hypothalamus in context-induced relapse to alcohol seeking after punishment-imposed abstinence. **J Neurosci**, v. 34, n. 22, p. 7447-57, May 28 2014. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24872550>>.

MARINELLI, P. W. et al. The CRF1 receptor antagonist antalarmin attenuates yohimbine-induced increases in operant alcohol self-administration and

reinstatement of alcohol seeking in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 195, n. 3, p. 345-55, Dec 2007. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17705061>>.

MATTSON, B. J. et al. Repeated amphetamine administration outside the home cage enhances drug-induced Fos expression in rat nucleus accumbens. **Behav Brain Res**, v. 185, n. 2, p. 88-98, Dec 28 2007. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17720257>>.

MCCUSKER, C. G.; BROWN, K. The cue-responsivity phenomenon in dependent drinkers: 'personality' vulnerability and anxiety as intervening variables. **British journal of addiction**, v. 86, n. 7, p. 905-12, Jul 1991. ISSN 0952-0481 (Print) 0952-0481 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1912743>>.

MCFARLAND, K.; KALIVAS, P. W. The circuitry mediating cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. **J Neurosci**, v. 21, n. 21, p. 8655-63, Nov 01 2001. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11606653>>.

MEREU, G.; GESSA, G. L. Low doses of ethanol inhibit the firing of neurons in the substantia nigra, pars reticulata: a GABAergic effect? **Brain Res**, v. 360, n. 1-2, p. 325-30, Dec 23 1985. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3000533>>.

MILLER, E. K. The prefrontal cortex and cognitive control. **Nat Rev Neurosci**, v. 1, n. 1, p. 59-65, Oct 2000. ISSN 1471-003X (Print) 1471-003X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11252769>>.

MILLER, E. K.; COHEN, J. D. An integrative theory of prefrontal cortex function. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 167-202, 2001. ISSN 0147-006X (Print) 0147-006X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11283309>>.

MILLER, W. R.; SANCHEZ-CRAIG, M. How to have a high success rate in treatment: advice for evaluators of alcoholism programs. **Addiction**, v. 91, n. 6, p. 779-85, Jun 1996. ISSN 0965-2140 (Print) 0965-2140 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8696242>>.

MONTI, P. M. et al. Alcohol cue reactivity: effects of detoxification and extended exposure. **Journal of Studies on Alcohol**, v. 54, n. 2, p. 235-45, Mar 1993. ISSN 0096-882X (Print) 0096-882X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8384678>>.

MUIGG, P. et al. Impaired extinction of learned fear in rats selectively bred for high anxiety--evidence of altered neuronal processing in prefrontal-amygdala pathways. **Eur J Neurosci**, v. 28, n. 11, p. 2299-309, Dec 2008. ISSN 1460-9568 (Electronic) 0953-816X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19019199>>.

MULDER, A. B. et al. Plasticity of neuronal firing in deep layers of the medial prefrontal cortex in rats engaged in operant conditioning. **Prog Brain Res**, v. 126, p. 287-301, 2000. ISSN 0079-6123 (Print) 0079-6123 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11105653>>.

MULLEN, R. J.; BUCK, C. R.; SMITH, A. M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. **Development**, v. 116, n. 1, p. 201-11, Sep 1992. ISSN 0950-1991 (Print) 0950-1991 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1483388>>.

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) 1097-6256 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16251986>>.

NESTLER, E. J. Review. Transcriptional mechanisms of addiction: role of DeltaFosB. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 363, n. 1507, p. 3245-55, Oct 12 2008. ISSN 1471-2970 (Electronic) 0962-8436 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18640924>>.

NESTLER, E. J.; AGHAJANIAN, G. K. Molecular and cellular basis of addiction. **Science**, v. 278, n. 5335, p. 58-63, Oct 03 1997. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9311927>>.

NICOLELIS, M. A.; FANSELOW, E. E.; GHAZANFAR, A. A. Hebb's dream: the resurgence of cell assemblies. **Neuron**, v. 19, n. 2, p. 219-21, Aug 1997. ISSN 0896-6273 (Print) 0896-6273 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9292712>>.

NIE, H.; JANAK, P. H. Comparison of reinstatement of ethanol- and sucrose-seeking by conditioned stimuli and priming injections of allopregnanolone after extinction in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 168, n. 1-2, p. 222-8, Jul 2003. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12719962>>.

O'BRIEN, C. P. et al. Classical conditioning in drug-dependent humans. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 654, p. 400-15, Jun 28 1992. ISSN 0078923 (Print) 0077-8923 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1632593>>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE 1992. Disponível em: <<http://www.luzimarteixeira.com.br/wp-content/uploads/1992/04/relatorio-saude-mental-oms-3.pdf>>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE 2014. Disponível em: <[http://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/EN\\_WHS2014\\_Full.pdf](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/EN_WHS2014_Full.pdf)>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE 2016. Disponível em: <[http://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/EN\\_WHS2016\\_Full.pdf](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/EN_WHS2016_Full.pdf)>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2017.

PAXINOS, G and WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2005. Amsterdam: **Elsevier Academic Press**.

PERRA, S. et al. Alcohol inhibits spontaneous activity of basolateral amygdala projection neurons in the rat: involvement of the endocannabinoid system. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 32, n. 3, p. 443-9, Mar 2008. ISSN 1530-0277 (Electronic) 0145-6008 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18215217>>.

PETERS, J.; KALIVAS, P. W.; QUIRK, G. J. Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. **Learn Mem**, v. 16, n. 5, p. 279-88, May 2009. ISSN 1549-5485 (Electronic) 1072-0502 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19380710>>.

PFARR, S. et al. Losing Control: Excessive Alcohol Seeking after Selective Inactivation of Cue-Responsive Neurons in the Infralimbic Cortex. **J Neurosci**, v. 35, n. 30, p. 10750-61, Jul 29 2015. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26224858>>.

PONTIERI, F. E. et al. Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. **Nature**, v. 382, n. 6588, p. 255-7, Jul 18 1996. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8717040>>.

QUINN, J. J. et al. Inverse temporal contributions of the dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex to the expression of long-term fear memories. **Learn Mem**, v. 15, n. 5, p. 368-72, May 2008. ISSN 1549-5485 (Electronic) 1072-0502 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18441294>>.

REILLY, M. T. et al. Genetic studies of alcohol dependence in the context of the addiction cycle. **Neuropharmacology**, Jan 22 2017. ISSN 1873-7064 (Electronic) 0028-3908 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28118990>>.

RENTERIA, R.; JEANES, Z. M.; MORRISETT, R. A. Ethanol attenuation of long-term depression in the nucleus accumbens can be overcome by activation of TRPV1 receptors. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 38, n. 11, p. 2763-9, Nov 2014. ISSN 1530-0277 (Electronic) 0145-6008 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25421513>>.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. **Addiction**, v. 95 Suppl 2, p. S91-117, Aug 2000. ISSN 0965-2140 (Print) 0965-2140 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11002906>>.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. Incentive-sensitization and addiction. **Addiction**, v. 96, n. 1, p. 103-14, Jan 2001. ISSN 0965-2140 (Print) 0965-2140 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11177523>>.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. Addiction. **Annu Rev Psychol**, v. 54, p. 25-53, 2003. ISSN 0066-4308 (Print) 0066-4308 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12185211>>.

RODRIGUES, P. O., RODRIGUES, A. E. M. Revolta da cachaça: uma manifestação popular que demonstrou organização em torno dos seus interesses contra o poder excessivo., 2008. Disponível em:

<<http://falandodecachaca.blogspot.com.br/2012/09/dia-da-cachaca-um-pouco-de-historia.html>>. Acessado em: 20 de janeiro de 2017.

ROYCE, J. E. Alcohol Problems and Alcoholism **A Comprehensive Survey**. New York Free Press, p. 35, 1981.

RUBIO, F. J. et al. Context-induced reinstatement of methamphetamine seeking is associated with unique molecular alterations in Fos-expressing dorsolateral striatum neurons. **J Neurosci**, v. 35, n. 14, p. 5625-39, Apr 08 2015. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25855177>>.

SAAL, D. et al. Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. **Neuron**, v. 37, n. 4, p. 577-82, Feb 20 2003. ISSN 0896-6273 (Print) 0896-6273 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12597856>>.

SANCHIS-SEGURA, C. et al. Involvement of the AMPA receptor GluR-C subunit in alcohol-seeking behavior and relapse. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 4, p. 1231-8, Jan 25 2006. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16436610>>.

SBAROUNIS, C. N. Did Alexander the Great die of acute pancreatitis? **J Clin Gastroenterol**, v. 24, n. 4, p. 294-6, Jun 1997. ISSN 0192-0790 (Print) 0192-0790.

SCHILSTROM, B. et al. Nicotine and food induced dopamine release in the nucleus accumbens of the rat: putative role of alpha7 nicotinic receptors in the ventral tegmental area. **Neuroscience**, v. 85, n. 4, p. 1005-9, Aug 1998. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9681941>>.

SCHUCKIT, M. A. et al. fMRI differences between subjects with low and high responses to alcohol during a stop signal task. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 36, n. 1, p. 130-40, Jan 2012. ISSN 1530-0277 (Electronic) 0145-6008 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22003983>>.

SCHWINDEL, C. D.; MCNAUGHTON, B. L. Hippocampal-cortical interactions and the dynamics of memory trace reactivation. **Progress in brain research**, v. 193, p. 163-77, 2011. ISSN 1875-7855 (Electronic) 0079-6123 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21854962>>.

SEMON, R. W.; SIMON, L. **The mneme**. London, New York,: G. Allen & Unwin Ltd.; The Macmillan company, p.304, 1921.

SESACK, S. R.; GRACE, A. A. Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 27-47, Jan 2010. ISSN 1740-634X (Electronic) 0893-133X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19675534>>.



SHAHAM, Y. et al. The reinstatement model of drug relapse: history, methodology and major findings. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 168, n. 1-2, p. 3-20, Jul 2003. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12402102>>.

SHALEV, U.; GRIMM, J. W.; SHAHAM, Y. Neurobiology of relapse to heroin and cocaine seeking: a review. **Pharmacol Rev**, v. 54, n. 1, p. 1-42, Mar 2002. ISSN 0031-6997 (Print) 0031-6997 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11870259>>.

SHEN, H. W. et al. Prelimbic cortex and ventral tegmental area modulate synaptic plasticity differentially in nucleus accumbens during cocaine-reinstated drug seeking. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 5, p. 1169-77, Apr 2014. ISSN 1740-634X (Electronic) 0893-133X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24232172>>.

SIEGEL, S. Drug anticipation and drug addiction. The 1998 H. David Archibald Lecture. **Addiction**, v. 94, n. 8, p. 1113-24, Aug 1999. ISSN 0965-2140 (Print) 0965-2140 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10615727>>.

SIMMS, J. A. et al. Intermittent access to 20% ethanol induces high ethanol consumption in Long-Evans and Wistar rats. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 32, n. 10, p. 1816-23, Oct 2008. ISSN 1530-0277 (Electronic) 0145-6008 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18671810>>.

SINHA, R. Chronic stress, drug use, and vulnerability to addiction. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1141, p. 105-30, Oct 2008. ISSN 1749-6632 (Electronic) 0077-8923 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18991954>>.

SONG, J. et al. Association of GABA(A) receptors and alcohol dependence and the effects of genetic imprinting. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 117B, n. 1, p. 39-45, Feb 2003. ISSN 1552-4841 (Print) 1552-4841 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12555233>>.

STAIGER, P. K.; WHITE, J. M. Cue reactivity in alcohol abusers: stimulus specificity and extinction of the responses. **Addictive Behaviors**, v. 16, n. 5, p. 211-21, 1991. ISSN 0306-4603 (Print) 0306-4603 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1776539>>.

STANDAGE, T. A history of world in 6 glasses. . **New York, Walker & Company**, p. 213, 2006.

STASIEWICZ, P. R.; BRANDON, T. H.; BRADIZZA, C. M. Effects of extinction context and retrieval cues on renewal of alcohol-cue reactivity among alcohol-dependent outpatients. **Psychol Addict Behav**, v. 21, n. 2, p. 244-8, Jun 2007. ISSN 0893-164X (Print) 0893-164X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17563145>>.

STEFANIK, M. T.; KUPCHIK, Y. M.; KALIVAS, P. W. Optogenetic inhibition of cortical afferents in the nucleus accumbens simultaneously prevents cue-induced

transient synaptic potentiation and cocaine-seeking behavior. **Brain Struct Funct**, v. 221, n. 3, p. 1681-9, Apr 2016. ISSN 1863-2661 (Electronic) 1863-2653 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25663648>>.

SUR, C. et al. Preferential coassembly of alpha4 and delta subunits of the gamma-aminobutyric acidA receptor in rat thalamus. **Mol Pharmacol**, v. 56, n. 1, p. 110-5, Jul 1999. ISSN 0026-895X (Print) 0026-895X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10385690>>.

TANDA, G.; PONTIERI, F. E.; DI CHIARA, G. Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. **Science**, v. 276, n. 5321, p. 2048-50, Jun 27 1997. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9197269>>.

THAVORNCHAROENSAP, M. et al. The economic impact of alcohol consumption: a systematic review. **Subst Abuse Treat Prev Policy**, v. 4, p. 20, Nov 25 2009. ISSN 1747-597X (Electronic) 1747-597X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19939238>>.

TONEGAWA, S. et al. Memory Engram Cells Have Come of Age. **Neuron**, v. 87, n. 5, p. 918-31, Sep 02 2015. ISSN 1097-4199 (Electronic) 0896-6273 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26335640>>.

TOSCANO JR., A. "Um breve histórico sobre o uso de drogas". In: **EIBEL, Sergio D.; TOSCANO JR., Alfredo (Ed.) Dependência de drogas**, n. Ed. Atheneu, p. 181-190, 2001.

TURRIGIANO, G. G.; NELSON, S. B. Homeostatic plasticity in the developing nervous system. **Nat Rev Neurosci**, v. 5, n. 2, p. 97-107, Feb 2004. ISSN 1471-003X (Print) 1471-003X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14735113>>.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 6, p. 397-409, Jun 2009. ISSN 1471-0048 (Electronic) 1471-003X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19469025>>.

UNODC (*UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME*). **World Drug Report** 2016. Disponível em: <[http://www.unodc.org/unodc/secured/wdr/wdr2013/World\\_Drug\\_Report\\_2016.pdf](http://www.unodc.org/unodc/secured/wdr/wdr2013/World_Drug_Report_2016.pdf)>. Acesso em: 10 de janeiro de 2017.

UUSI-OUKARI, M.; KORPI, E. R. Regulation of GABA(A) receptor subunit expression by pharmacological agents. **Pharmacol Rev**, v. 62, n. 1, p. 97-135, Mar 2010. ISSN 1521-0081 (Electronic) 0031-6997 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20123953>>.

VAILLANT, G. E. *The Natural History of Alcoholism: Paths to Recovery*. . Cambridge, MA: Harvard University Press, 1983.

VAN DEN OEVER, M. C. et al. Prefrontal cortex plasticity mechanisms in drug seeking and relapse. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 35, n. 2, p. 276-84, Nov 2010. ISSN 1873-7528 (Electronic) 0149-7634 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19932711>>.

VARODAYAN, F. P. et al. Chronic ethanol exposure decreases CB1 receptor function at GABAergic synapses in the rat central amygdala. **Addict Biol**, v. 21, n. 4, p. 788-801, Jul 2016. ISSN 1369-1600 (Electronic) 1355-6215 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25940135>>.

VENGELIENE, V. et al. Neuropharmacology of alcohol addiction. **Br J Pharmacol**, v. 154, n. 2, p. 299-315, May 2008. ISSN 0007-1188 (Print) 0007-1188 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18311194>>.

VENNIRO, M.; CAPRIOLI, D.; SHAHAM, Y. Animal models of drug relapse and craving: From drug priming-induced reinstatement to incubation of craving after voluntary abstinence. **Prog Brain Res**, v. 224, p. 25-52, 2016. ISSN 1875-7855 (Electronic) 0079-6123 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26822352>>.

VIALA-ARTIGUES, M. Histoire de l'alcool archéologie partie 1. **Paris : Fédération des Acteurs de l'Alcoolologie et de l'Addictologie**, 2003. Disponível em: <<http://www.alcoolologie.org/Histoire-de-l-alcool-archeologie,118.html>>. Visitado em: 10 de fevereiro de 2017.

VOLKOW, N. D. What do we know about drug addiction? **Am J Psychiatry**, v. 162, n. 8, p. 1401-2, Aug 2005. ISSN 0002-953X (Print) 0002-953X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16055760>>.

VOLKOW, N. D.; KOOB, G. F.; MCLELLAN, A. T. Neurobiologic Advances from the Brain Disease Model of Addiction. **N Engl J Med**, v. 374, n. 4, p. 363-71, Jan 28 2016. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26816013>>.

VOLKOW, N. D. et al. Brain dopamine transporter levels in treatment and drug naive adults with ADHD. **Neuroimage**, v. 34, n. 3, p. 1182-90, Feb 01 2007. ISSN 1053-8119 (Print) 1053-8119 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17126039>>.

WEINER, J. L.; ZHANG, L.; CARLEN, P. L. Potentiation of GABAA-mediated synaptic current by ethanol in hippocampal CA1 neurons: possible role of protein kinase C. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 268, n. 3, p. 1388-95, Mar 1994. ISSN 0022-3565 (Print) 0022-3565 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8138953>>.

WHITAKER, L. R. et al. Associative Learning Drives the Formation of Silent Synapses in Neuronal Ensembles of the Nucleus Accumbens. **Biol Psychiatry**, Aug 14 2015. ISSN 1873-2402 (Electronic) 0006-3223 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26386479>>.

WILLCOCKS, A. L.; MCNALLY, G. P. The role of medial prefrontal cortex in extinction and reinstatement of alcohol-seeking in rats. **Eur J Neurosci**, v. 37, n. 2,



p. 259-68, Jan 2013. ISSN 1460-9568 (Electronic) 0953-816X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23106416>>.

WISE, R. A. Catecholamine theories of reward: a critical review. **Brain Res**, v. 152, n. 2, p. 215-47, Aug 25 1978. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/354753>>.

WISE, R. A. Drug-activation of brain reward pathways. **Drug Alcohol Depend**, v. 51, n. 1-2, p. 13-22, Jun-Jul 1998. ISSN 0376-8716 (Print) 0376-8716 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9716927>>.

WISE, R. A.; BOZARTH, M. A. A psychomotor stimulant theory of addiction. **Psychol Rev**, v. 94, n. 4, p. 469-92, Oct 1987. ISSN 0033-295X (Print) 0033-295X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3317472>>.

WOLLE, C. C. et al. Differences in drinking patterns between men and women in Brazil. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 33, n. 4, p. 367-73, Dec 2011. ISSN 1809-452X (Electronic) 1516-4446 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22189926>>.

ZHAO, Y. et al. Activation of group II metabotropic glutamate receptors attenuates both stress and cue-induced ethanol-seeking and modulates c-fos expression in the hippocampus and amygdala. **J Neurosci**, v. 26, n. 39, p. 9967-74, Sep 27 2006. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17005860>>.

ZIRONI, I. et al. Context is a trigger for relapse to alcohol. **Behav Brain Res**, v. 167, n. 1, p. 150-5, Feb 15 2006. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16256214>>.

**Parecer da Comissão de Ética**



Av. Trabalhador são-carlense, 400 / 13566-590  
Caixa Postal 369 / 13560-970  
São Carlos - SP, Brasil  
Fone: +55 16 3373-9758  
www.ifsc.usp.br

## PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS – CEUA/IFSC

Protocolo nº 01/2015

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado “Investigação optogenética e molecular em pequenos grupos neurais seletivamente ativados (neuronal ensembles) envolvidos na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo ambiente”, submetido pelo Dr. Fábio Cardoso Cruz, foi **aprovado** ad referendum da Comissão de Ética para o Uso de Animais do Instituto de Física de São Carlos – CEUA/IFSC no dia 09/04/2015.

São Carlos, 09 de abril de 2015.

A handwritten signature in blue ink, reading "Cristina Kurachi", is positioned above a horizontal line.

Profa. Dra. Cristina Kurachi  
Presidente da CEUA/IFSC

**Prêmio Menção Honrosa**

**CERTIFICATE**

We certify that the poster number **02.044**, presented by **Paola Palombo (Estudante Mestrado)**, received **Honorable Mention** at the **48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics and the 21st Latin American Congress of Pharmacology (SBFTE)** held in Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil, from October 04 to 07, 2016.

  
\_\_\_\_\_  
Maria Christina W. de Avellar  
Congress President

04-07 October 2016  
Rafain Palace Hotel

Foz do Iguaçu, PR, Brazil