



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



**PAULA CRISTINA BIANCHI**

**INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS NEUROBIOLÓGICOS ENVOLVIDOS  
NAS PROPRIEDADES REFORÇADORAS, SENSIBILIZAÇÃO LOCOMOTORA E  
REINSTALAÇÃO DA AUTOADMINISTRAÇÃO DE ETANOL**

**ARARAQUARA – SP**

**2018**

**PAULA CRISTINA BIANCHI**

**INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS NEUROBIOLÓGICOS ENVOLVIDOS  
NAS PROPRIEDADES REFORÇADORAS, SENSIBILIZAÇÃO LOCOMOTORA E  
REINSTALAÇÃO DA AUTOADMINISTRAÇÃO DE ETANOL**

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Ciências Fisiológicas.

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

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

**ARARAQUARA – SP**

**2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

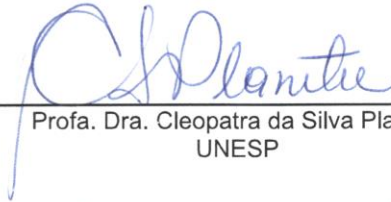
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Paula Cristina Bianchi, realizada em 26/10/2018:



---

Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta  
UNESP



---

Profa. Dra. Rosana Camarini  
USP



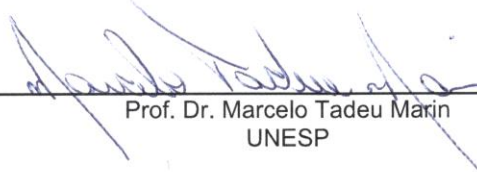
---

Profa. Dra. Isabel Marian Hartmann de Quadros  
UNIFESP



---

Profa. Dra. Carolina Demarchi Munhoz  
USP



---

Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin  
UNESP

## DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus queridos e amados pais **Cleonice Moro Bianchi** e **Paulo José Bianchi**. É difícil expressar em palavras a emoção que sinto ao agradecer tudo o que fizeram e ainda fazem por mim. Obrigado por terem, com afeto e dedicação, me ensinado a trilhar meus próprios passos sem medo. Pela educação que me deram, por acreditarem em mim e por sempre me incentivarem a persistir nos meus objetivos. O amor, o apoio e a confiança de vocês foram fundamentais na realização deste trabalho.

Dedico também ao meu marido e companheiro de vida **Rafael A. Lia Vaccari (Rafa)** que esteve ao meu lado em mais esta caminhada. Obrigada pelo seu apoio incondicional, pelo seu incentivo nos momentos mais difíceis e, principalmente, por todo amor, carinho, atenção e paciência dispensados durante a realização do meu doutorado. Tenho a certeza de que o amor nos torna mais fortes.

*“Foi o tempo que dedicaste a tua rosa que a fez tão importante.”  
(O Pequeno Príncipe)*

## AGRADECIMENTOS

*“Cada um que passa em nossa vida, leva um pouco de nós mesmos, e deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito, e há os que deixam muito, mas não há os que não deixam nada”.*

*(Antoine de Saint-Exupéry)*

Agradeço a **Deus** por se fazer presente em todas as formas de amor. Obrigada por ter colocado pessoas tão especiais no meu caminho, sem elas eu não seria quem eu sou hoje. Agradeço pelas oportunidades recebidas e pela força espiritual que me fez forte nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora **Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta**, uma profissional de extrema competência, que me deu a oportunidade de conhecer e continuar trilhando o caminho da neurociência. Cleo, minha admiração por você só aumentou durante esses oito anos de convivência. Sua postura profissional, seus ensinamentos e conselhos foram de extrema importância para o meu amadurecimento científico. Apesar de todas as atribuições fora do laboratório sempre esteve aberta e presente para qualquer tipo de dúvida e possíveis dificuldades. Obrigada por sua confiança em meu trabalho, pela paciência e contribuição. Sinto imenso orgulho em fazer parte do nosso grupo de pesquisa e levarei comigo todas as experiências e aprendizados.

Ao meu coorientador **Prof. Dr. Fábio Cardoso Cruz**, por seu exemplo de ser humano, profissionalismo e perseverança. Chefe Fabeta, obrigada por me permitir sonhar e realizar parte desse sonho com você. Nós sabemos como nossa jornada foi árdua, mas seu incentivo e colaboração incessantes fizeram com que tudo valesse a pena. Tenho muito orgulho da sua trajetória e foi uma alegria imensa ver você se tornar Professor. Se eu estou aqui hoje, é porque jamais me esqueci dos seus olhinhos brilhando ao ministrar as aulas da V Escola de Férias em Neuropsicofarmacologia. Obrigada por todas as oportunidades, ensinamentos, momentos compartilhados, abrigo, amizade e confiança. Você sempre será um exemplo para mim.

Aos meus queridos ratentos **Chefe, Paolinha, Paulão e Vampeta**, peças essenciais na realização deste trabalho. Eu não teria conseguido sem a ajuda de vocês. Tenho certeza que alcançamos nossos objetivos porque encaramos os desafios juntos, com muita determinação, trabalho, diversão e parceria. Com certeza temos muita história pra contar. Agradeço também as pipeteiras mais lindas: **Ana Carolina (Florzinha)** e **Fernanda (Fer)**, que acompanharam e participaram de todas as nossas lutas e confusões. Vocês têm todo o meu carinho, admiração, gratidão e saudade por tudo o que passamos juntos.

Aos amigos do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, do passado e do presente, **Adrielle, Ariela, Ana Cláudia (Ana), Celina, Diego (Di), Fábio (Fabeta), Gabriel, Gessynger (Gessy), Josiane (Josi), Karina (Ká), Leandro (Lê), Lígia, Lucas (Luquinhas), Lucas Canto, Lucas (Debi), Marion (Marica), Matheus (Capiou), Nathália (Nat/Bang), Paola (Paolinha), Paulo (Paulão), Ricardo, Rodrigo (Vampeta), Sheila, Tarciso (Tar), Tatiani (Tati) e Willian (Will)**, muito obrigada pela parceria, pelo apoio e por fazerem os dias de trabalho mais divertidos e prazerosos. Guardo com carinho as inúmeras aventuras que compartilhamos.

À minha parceira de dupla sertaneja **Paola**, que dividiu comigo as viagens, os experimentos, as dificuldades, as aventuras, as confusões e as conquistas. Muito obrigada Paolinha, por sua amizade, carinho, apoio e abrigo. Sua parceria foi essencial nesta caminhada, levarei comigo todos os momentos que passamos juntas.

Às minhas queridas cocotas **Helga, Laís (Lá), Natália (Ná), e Priscilla (Pri)** que desde a graduação dividem comigo as experiências e dificuldades da vida científica. Meninas, muito obrigada pela amizade, carinho, torcida e momentos de diversão. Tenho enorme carinho e admiração por vocês.

À amiga, madrinha e secretária **Tirene Pavanelli**, por desempenhar com competência os serviços prestados ao departamento e por estar sempre disposta a ajudar. Ti,

agradeço de coração pela amizade, pelos cafezinhos, pelas inúmeras conversas, risadas, conselhos e por todo amor compartilhado.

À amiga **Sheila**, pelos anos de parceria no laboratório e por toda a ajuda na reta final deste trabalho. Sheilinha, obrigada pela amizade, por ter me dado abrigo, por toda a ajuda nos experimentos, pelas conversas, vinhos e momentos de descontração.

À querida **Giovana (Gi)**, uma pessoa de luz e de enorme coração. Obrigada pela amizade e por ter me acolhido tão bem em sua casa.

Aos amigos que o PDSE-Paris me deu: **Ana Carolina (Ana Catarina), Ana Paula (Rubana), Bruno (Brrrunoo), Caio, Catarina (Cata), Diego (Costa Rica), Diego (Di), Genaro, Jacqueline (Jac), Juliana (Ju), Larissa (Larissinha de Montmartre), Luiz Arthur (monsieur ARRthuRR), Nadayca (Naná), Rafael (Piá) e Ruben (Rubão)**. Agradeço por toda ajuda, acolhimento, conversas, risadas e momentos compartilhados. Jamais imaginaria conhecer pessoas tão queridas.

À minha sogra **Ana Beatris Lia Vaccari (Bia)** e a minha cunhada **Isabela Lia Vaccari (Isa)** por serem exemplos de determinação e de senso crítico. Obrigada pelas conversas, pelo conhecimento compartilhado, pelo incentivo e pelo amor.

À todos os amigos que fizeram e fazem parte da minha vida. Tenho cada um de vocês nas minhas lembranças.

À todos da minha família pelo carinho, incentivo e torcida.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza**, pessoa pela qual tenho tremenda admiração. Professor Ricardo, sua contribuição foi de extrema importância para a minha trajetória acadêmica e pessoal. Agradeço pelos ensinamentos, conselhos, amizade e boas risadas. Muito obrigada por ter sido acessível e por ter me acolhido em tantos momentos no laboratório.

Ao **Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani** por sua dedicação e por estar sempre disposto a colaborar e a ensinar. Obrigada pela paciência e pela colaboração em nossos experimentos.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin** por sua dedicação e ensinamentos.

Ao meu orientador durante o doutorado sanduíche **Dr. Vincent Vialou**. Obrigada por ter me acolhido de braços abertos e por ter confiado em meu trabalho. Agradeço a colaboração científica, os ensinamentos, auxílios e amizade. Merci beaucoup!

Ao grupo de pesquisa do Dr. Vialou, **Raphaële, Marta, Myriam e Annette**, pelo apoio e pelos momentos compartilhados. Em especial, agradeço à Raphaële por toda a paciência, ensinamento e ajuda na realização dos experimentos. E a Myriam pela amizade, pelo carinho e pela companhia.

Aos amigos que ganhei no final deste caminho: **Augusto (Augustinho), Caroline (Carol), Flávia (Flavinha), Jacqueline (Jack), Roberta (Rô), Sara (Sarinha), Thais (Thaisinha)**, obrigada pelo carinho, pelas conversas, risadas e por toda ajuda nos experimentos.

Às técnicas do Laboratório, **Elizabeth Zocal Paro Lepera (Bete)** e **Rosana Finoti Pupin Silva (Rô)** pela dedicação e auxílios incansáveis e também pela amizade e carinho.

À minha terapeuta **Paola**, pessoa e profissional maravilhosa. Paula, obrigada por todo o suporte emocional durante o desenvolvimento deste trabalho.

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



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

Ao **Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF - UFSCar/UNESP)** pelo auxílio e oportunidade de realização do meu doutorado.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pelo apoio financeiro indispensável para a realização deste trabalho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo apoio financeiro para a realização do doutorado sanduíche no exterior.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP**, pelo espaço físico e laboratorial; equipamentos e materiais fornecidos para realização desse trabalho.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio financeiro ao projeto desenvolvido no laboratório.

À **Université Pierre et Marie Curie (UPMC – Paris, França)**, pelo espaço físico e laboratorial, necessários para a realização dos meus experimentos durante o doutorado sanduíche.

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

Ao **Departamento de Farmacologia da UNIFESP - Campus de São Paulo**, pelo espaço físico e laboratorial; equipamentos e materiais fornecidos para realização desse trabalho.

***“Ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem  
aprender a fazer o caminho caminhando, sem  
aprender a refazer, a retocar o sonho, por causa do  
qual a gente se pôs a caminhar”.***

***(Paulo Freire)***

## Resumo

O etanol é a substância de abuso mais consumida no Brasil e em diversos países. A alta taxa de recaída nos indivíduos dependentes do etanol continua sendo o desafio central no tratamento do alcoolismo. Estudos em humanos e em animais de laboratório mostram que estímulos ambientais associados ao uso de drogas podem promover recaída ao uso da substância. Contudo, os mecanismos neurobiológicos envolvidos na recaída ao uso de etanol não estão totalmente elucidados. Evidências sugerem que o efeito sinaptogênico da proteína matricelular Hevin pode promover neuroplasticidades que modulam as propriedades motivacionais das drogas de abuso. Entretanto, a participação da Hevin nos comportamentos relacionados ao etanol, ainda não foram investigados. No presente estudo investigamos a participação do córtex pré-límbico (PL), orbitofrontal (OFC) e núcleo acumbens (NAc) na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto em ratos. Avaliamos também, o efeito da inibição da Hevin nos astrócitos e nos interneurônios parvoalbumina (PV) do estriado, no consumo de etanol, na preferência condicionada por lugar (PCL) e na sensibilização locomotora induzida pelo etanol em camundongos. Nossos resultados demonstraram que: a) não houve diferenças entre ratos e ratas no comportamento de reinstalação da busca pelo etanol; b) a reexposição ao contexto-droga restabeleceu o comportamento de busca do etanol e aumentou a expressão de Fos no OFC, PL, centro e concha do NAc; c) a inativação reversível do OFC ou do centro do NAc atenuaram a reinstalação induzida pelo contexto; d) houve maior ativação da via PL – centro do NAc nos animais expostos ao contexto-droga, em relação aos expostos ao contexto-extinção; e) a inibição da Hevin astrocítica no NAc não alterou o consumo de etanol, porém diminuiu a PCL induzida por essa substância; f) a inibição da Hevin astrocítica e neuronal no estriado dorsal diminuiu a sensibilização locomotora induzida pelo etanol; g) injeções repetidas de etanol promoveram aumento do volume dos compartimentos dendríticos dos interneurônios PV no estriado dorsal de camundongos.

**Palavras-chave:** córtex orbitofrontal, córtex pré-límbico, etanol, hevin, núcleo acumbens, recaída.

## Abstract

Alcohol is the most consumed drug in Brazil and in many other countries in the world. The high rate of relapse in alcohol-dependent individuals remains a central challenge for treating alcoholism. Several studies in human and animal models of addiction show that environmental stimuli associated with previous drug use can provoke relapse to drug use. However, the neurobiological mechanisms involved in the alcohol relapse induced by environmental stimuli are not fully understood. Recent studies have been demonstrated that the synaptogenic effect of matricellular protein Hevin can promote striatal neuroplasticity that can modulate motivational properties of drugs. Despite that, the role of Hevin in alcohol addiction related behaviors has not been investigated. In the present study, we investigated the participation of pre-limbic cortex (PL); orbitofrontal cortex (OFC), and nucleus accumbens (NAc) in the context-induced reinstatement of alcohol-seeking in rats. We also evaluated the effect of Hevin inhibition in astrocytes or parvalbumin interneurons (PV) in the striatum on ethanol consumption, ethanol-induced conditioned place preference (CPP) and locomotor sensitization in mice. Our results demonstrated that: a) there were no differences between male and female rats in the reinstatement of alcohol-seeking behavior; b) re-exposure to the drug-context reinstated alcohol-seeking and increased Fos expression in the OFC, PL and NAc core and shell; c) reversible inactivation of the OFC or NAc core attenuated context-induced reinstatement of alcohol-seeking; d) there was more activation of the PL – NAc core pathway in the animals exposed to the drug-context, compared to those that were exposed to the extinction-context; e) inhibition of astrocytic Hevin into NAc did not alter ethanol consumption, but decreased alcohol-induced CPP; f) inhibition of astrocytic and neuronal Hevin in the dorsal striatum decreased locomotor sensitization induced by alcohol; and g) repeated alcohol injections in mice increased the volume of dendritic compartments of PV interneurons in the dorsal striatum.

**Keywords:** alcohol, orbitofrontal cortex, prelimbic cortex, nucleus accumbens, hevin, relapse.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Representação esquemática do sistema mesocorticolímbico no encéfalo humano e de roedor.....32
- Figura 2** - Regiões encefálicas envolvidas nos comportamentos associativos relacionados ao uso de drogas e suas conexões.....57
- Figura 3** - Caixa de autoadministração operante (Med Associates®).....65
- Figura 4** - Representação esquemática do protocolo experimental referente ao Capítulo 1.....67
- Figura 5** - Representação esquemática do desenho experimental utilizado nos Experimentos 3 e 4 do Capítulo 1.....78
- Figura 6** - Representação esquemática do desenho experimental utilizado no Experimento 5.....80
- Figura 7** - Comparação entre ratos e ratas durante o treino e a extinção da autoadministração de etanol.....84
- Figura 8** - Consumo de etanol em ratos e ratas no modelo de livre-escolha entre duas garrafas e durante o treino da autoadministração de etanol em RF-1 e IV-30s.....85
- Figura 9** - Concentração de etanol no sangue de ratos e ratas.....86
- Figura 10** - Comparação entre ratos e ratas na reinstalação do comportamento de busca ao etanol associada ao contexto.....87
- Figura 11** - Área usada para quantificar os núcleos positivos para Fos no córtex orbitofrontal e pré-límbico de ratos e cortes representativos mostrando a marcação positiva da proteína Fos.....88
- Figura 12** - A reinstalação da busca ao etanol induzida pelo contexto foi associada à indução de Fos no córtex orbitofrontal e pré-límbico.....89

<b>Figura 13</b> - Área usada para quantificar os núcleos positivos para Fos no núcleo acumbens de ratos.....	90
<b>Figura 14</b> - A reinstalação da busca ao etanol induzida pelo contexto foi associada ao aumento de células positivas para Fos no núcleo acumbens.....	90
<b>Figura 15</b> - Cortes representativos mostrando a marcação de NeuN e de Fos e a dupla marcação de Fos-NeuN.....	91
<b>Figura 16</b> - Treino e extinção da autoadministração de etanol.....	92
<b>Figura 17</b> - Correlação entre a concentração de etanol no sangue e número de reforços.....	93
<b>Figura 18</b> - Inativação reversível do córtex orbitofrontal diminui a reinstalação da busca de etanol induzida pelo contexto.....	94
<b>Figura 19</b> - Inativação do córtex orbitofrontal com baclofen+muscimol não alterou as respostas para a sacarina.....	95
<b>Figura 20</b> - Representação da localização das cânulas no córtex orbitofrontal.....	96
<b>Figura 21</b> - Treino e extinção da autoadministração de etanol.....	97
<b>Figura 22</b> - Correlação entre a concentração de etanol no sangue e número de reforços.....	98
<b>Figura 23</b> - Inativação farmacológica reversível do centro do núcleo acumbens diminui a reinstalação da busca de etanol induzida pelo contexto.....	99
<b>Figura 24</b> - Inativação do centro do núcleo acumbens com baclofen + muscimol não alterou as respostas para obtenção de sacarina.....	100
<b>Figura 25</b> - Representação da localização das cânulas no centro do núcleo acumbens.....	101
<b>Figura 26</b> - Treino e extinção da autoadministração de etanol.....	102
<b>Figura 27</b> - Reinstalação da busca ao etanol induzida pelo contexto.....	103

<b>Figura 28</b> - Cortes representativos do córtex pré-límbico mostrando a marcação de <i>Red beads</i> (RB) e de Fos e da dupla marcação de Fos-RB.....	104
<b>Figura 29</b> - Ativação das projeções do córtex pré-límbico para o centro do núcleo acumbens durante o teste de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto.....	105
<b>Figura 30</b> - Cortes representativos do córtex pré-límbico mostrando a marcação de <i>Red beads</i> (RB) e de Fos e da dupla marcação de Fos-RB.....	105
<b>Figura 31</b> - Ciclotron (Imetronic) – medidor automático da atividade locomotora.....	146
<b>Figura 32</b> - Imagem ilustrativa indicando os elementos que constituem a arborização dendrítica.....	148
<b>Figura 33</b> - Imagem ilustrativa identificando o número de ramificações, terminações e bifurcações de um neurônio.....	148
<b>Figura 34</b> - Consumo e preferência pela solução de etanol em camundongos no modelo de acesso intermitente entre duas garrafas.....	157
<b>Figura 35</b> - Consumo e preferência pela solução de etanol 20% em camundongos no modelo de acesso intermitente entre duas garrafas.....	158
<b>Figura 36</b> - Efeito da inibição da Hevin astrocítica na preferência condicionada por lugar (PCL) induzida pelo etanol em camundongos.....	159
<b>Figura 37</b> - Efeito da inibição da Hevin astrocítica na atividade locomotora basal dos camundongos após a injeção de salina durante a habituação.....	160
<b>Figura 38</b> - Efeito da inibição da Hevin astrocítica na atividade locomotora de camundongos após a injeção aguda de etanol (1,75 g/kg) ou salina.....	161
<b>Figura 39</b> - Efeito da inibição da Hevin astrocítica na expressão da sensibilização locomotora induzida pela exposição repetida ao etanol.....	162
<b>Figura 40</b> - Efeito da inibição da Hevin neuronal na atividade locomotora basal dos camundongos após a injeção de salina durante a habituação.....	162

<b>Figura 41</b> - Efeito da inibição de Hevin neuronal na atividade locomotora de camundongos após a injeção aguda de etanol (1,75 g/kg) ou salina.....	163
<b>Figura 42</b> - Efeito da inibição da Hevin neuronal na expressão da sensibilização locomotora induzida pela exposição repetida ao etanol.....	164
<b>Figura 43</b> - Imagem representativa de um interneurônio PV do estriado dorsal marcado com proteína fluorescente verde (GFP).....	164
<b>Figura 44</b> - Análise geométrica dos comprimentos dendríticos dos interneurônios PV do estriado dorsal.....	165
<b>Figura 45</b> - Ordem e número de ramificações, número de terminações e número de bifurcações dendríticas nos interneurônios PV do estriado dorsal.....	166



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Critérios diagnósticos do DSM-5 para transtornos relacionados ao uso de substâncias.....	30
<b>Tabela 2</b> - Porcentagem de ativação neuronal nos diferentes contextos e regiões encefálicas.....	91

## LISTA DE ABREVIações

**5-HT** - 5-hidroxitriptamina

**AMPA** - alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

**AP** - Antero-posterior

**ATV** - Área tegmental ventral

**CB<sub>1</sub>** - receptor canabinóide tipo 1

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

**CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais

**CID** - Classificação Internacional de Doenças

**COBEA** - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

**CPF** - Córtex pré-frontal

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

**DV** - Dorso-ventral

**EtOH** - Etanol

**GABA** - Ácido gama-amino butírico

**I. M.** - Intramuscular

**I. P.** - Intraperitoneal

**IV** - Intervalo variável

**LENAD** - Levantamento Nacional de Álcool e Drogas

**ML** - Mediolateral

**MSNs** - Neurônios espinhosos médios

**NAc** - Núcleo acumbens

**NaCl** - Cloreto de sódio

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

**OFC** - Córtex Orbitofrontal

**PBS** - Solução de fosfato de sódio (PBS)

**PCL** - Preferência condicionada por lugar

**PFA** - Paraformaldeído

**PKA** - Proteína quinase A

**PKC** - Proteína quinase C

**PL** - Cortex pré-límbico

**PV** - Parvoalbumina

**RB** - RetroBeads (marcador retrógrado)

**RF** - Razão fixa

**S.C.** - Subcutânea

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

## SUMÁRIO

<b>ASPECTOS GERAIS.....</b>	<b>23</b>
1 Histórico e epidemiologia do uso de etanol.....	24
2 Mecanismo de ação do etanol.....	27
3 Transtornos associados ao uso de substâncias.....	28
4 Teorias neurobiológicas da dependência.....	30
5 Procedimentos experimentais para o estudo da dependência.....	34
6 Referências bibliográficas.....	38
<b><u>CAPÍTULO 1</u></b>	
<b>Participação do córtex pré-frontal e do núcleo acumbens na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto.....</b>	<b>50</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>51</b>
1.1 Recaída.....	52
1.2 Participação dos neuronal ensembles na recaída ao uso de drogas.....	55
1.3 Circuitos neurais envolvidos na recaída.....	56
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>61</b>
2.1 Objetivo geral.....	62
2.2 Objetivos específicos.....	62
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>63</b>
3.1 Animais.....	64
3.2 Substâncias.....	64
3.3 Caixa de autoadministração operante.....	65
3.4 Procedimento comportamental.....	66
3.4.1 <i>Livre-escolha entre duas garrafas.....</i>	<i>67</i>
3.4.2 <i>Treino da autoadministração de etanol.....</i>	<i>67</i>
3.4.3 <i>Extinção das respostas na barra ativa.....</i>	<i>68</i>
3.4.4 <i>Teste de reinstalação induzida pelo contexto.....</i>	<i>68</i>
3.5 Concentração de etanol no sangue.....	69

3.6 Cirurgia intracraniana.....	69
3.7 Administração intracraniana dos fármacos.....	70
3.8 Teste da sacarina.....	70
3.9 Histologia.....	71
3.10 Injeção central do marcador retrógrado.....	71
3.11 Imuno-histoquímica.....	71
3.12 Imunofluorescência.....	73
3.13 Análise estatística.....	74
<b>4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>76</b>
4.1 Experimento 1 - Avaliação de diferenças entre ratos e ratas no protocolo de reinstalação da busca de etanol induzida pelo contexto.....	77
4.2 Experimento 2 - Identificação da participação de regiões corticais (córtex orbitofrontal e pré-limbico) e do núcleo acumbens (concha e centro) na reinstalação da busca de etanol induzida pelo contexto.....	77
4.3 Experimento 3 - Efeito da inibição farmacológica reversível do córtex orbitofrontal na reinstalação da busca do etanol induzida pelo contexto.....	77
4.4 Experimento 4 - Efeito da inibição farmacológica reversível do centro do núcleo acumbens na reinstalação da busca do etanol induzida pelo contexto.....	79
4.5 Experimento 5 - Identificação da participação da via córtex pré-limbico - centro do núcleo acumbens e córtex orbitofrontal - centro do núcleo acumbens na reinstalação da busca de etanol induzida pelo contexto.....	80
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>81</b>
5.1 Experimento 1 - Avaliação de diferenças entre ratos e ratas no protocolo de reinstalação da busca de etanol induzida pelo contexto.....	82
5.2 Experimento 2 - Identificação da participação de regiões corticais (córtex orbitofrontal e pré-limbico) e do núcleo acumbens (concha e centro) na reinstalação da busca de etanol induzida pelo contexto.....	88
5.3 Experimento 3 - Efeito da inibição farmacológica reversível do córtex orbitofrontal na reinstalação da busca do etanol induzida pelo contexto.....	91

5.4 Experimento 4 - Efeito da inibição farmacológica reversível do centro do núcleo acumbens na reinstalação da busca do etanol induzida pelo contexto.....	96
5.5 Experimento 5 - Identificação da participação da via córtex pré-limbico - centro do núcleo acumbens e córtex orbitofrontal - centro do núcleo acumbens na reinstalação da busca de etanol induzida pelo contexto.....	101
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>106</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>117</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>119</b>

## **CAPÍTULO 2**

<b>Efeito do etanol na morfologia dos interneurônios parvalbumina e o papel da proteína Hevin nas propriedades reforçadoras e na sensibilização comportamental induzida pelo etanol.....</b>	<b>135</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>136</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>140</b>
2.1 Objetivo geral.....	141
2.2 Objetivos específicos.....	141
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>142</b>
3.1 Animais.....	143
3.2 Drogas.....	143
3.3 Vetores virais.....	143
3.4 Cirurgia intracraniana para injeção de vírus.....	144
3.5 Acesso Intermitente a Duas Garrafas.....	144
3.6 Preferência condicionada por lugar (PCL).....	145
3.7 Avaliação da atividade locomotora.....	146
3.8 Histologia.....	146
3.9 Administração de etanol.....	147
3.10 Análise morfológica por microscopia confocal.....	147
3.11 Análise estatística.....	149
<b>4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>150</b>
4.1 Experimento 1 - Papel da Hevin astrocítica nas propriedades reforçadoras do etanol.....	151

4.1.1 Experimento 1A - Efeito da inibição da Hevin nos astrócitos do núcleo acumbens no consumo de etanol em camundongos.....	151
4.1.2 Experimento 1B - Efeito da inibição da Hevin nos astrócitos do núcleo acumbens na preferência condicionada por lugar induzida pelo etanol.....	151
4.2 Experimento 2 - Efeito da inibição da Hevin nos astrócitos do estriado dorsal na sensibilização locomotora induzida pelo etanol.....	151
4.3 Experimento 3 - Efeito da inibição da Hevin nos neurônios do estriado dorsal na sensibilização locomotora induzida pelo etanol.....	152
4.4 Experimento 4 - Efeito da exposição repetida ao etanol na morfologia dos interneurônios parvalbumina imunorreativos do estriado dorsal.....	153
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>155</b>
5.1 Experimento 1 - Papel da Hevin astrocítica nas propriedades reforçadoras do etanol.....	156
5.1.1 Experimento 1A - Efeito da inibição da Hevin nos astrócitos do núcleo acumbens no consumo de etanol em camundongos.....	156
5.1.2 Experimento 1B - Efeito da inibição da Hevin nos astrócitos do núcleo acumbens na preferência condicionada por lugar induzida pelo etanol.....	159
5.2 Experimento 2 - Efeito da inibição da Hevin nos astrócitos do estriado dorsal na sensibilização locomotora induzida pelo etanol.....	159
5.3 Experimento 3 - Efeito da inibição da Hevin nos neurônios do estriado dorsal na sensibilização locomotora induzida pelo etanol.....	162
5.4 Experimento 4 - Efeito da exposição repetida ao etanol na morfologia dos interneurônios parvalbumina imunorreativos do estriado dorsal.....	164
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>167</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>172</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>174</b>
<b>APÊNDICE A – Artigo publicado na revista <i>Drug and Alcohol Dependence</i>...</b>	<b>179</b>
<b>ANEXO A – Parecer CEUA/IFSC .....</b>	<b>190</b>
<b>ANEXO B – Parecer CEUA/UNIFESP.....</b>	<b>191</b>
<b>ANEXO C – Parecer <i>Comité d'éthique en expérimentation animale</i>/UPMC.....</b>	<b>192</b>

# *Aspectos gerais*

**"Sem a curiosidade que me move, que me inquieta, que me insere na busca, não aprendo nem ensino".  
(Paulo Freire)**



## **1 Histórico e epidemiologia do uso de etanol**

Ao longo da história e ao redor do mundo, indícios demonstram que a humanidade fez uso do processo de fermentação de frutas e cereais para obtenção das bebidas alcoólicas (MCGOVERN et al., 2004; VALLEE, 1994). Registros arqueológicos das primeiras civilizações, murais, pinturas em parede, e embarcações de todo o mundo, fornecem uma linha contínua de evidências da universalidade e importância das bebidas alcoólicas no desenvolvimento da humanidade (MCGOVERN et al., 2004). Indícios de uso e produção de bebidas alcoólicas datam do período neolítico. Vestígios de misturas alcólicas fermentadas de arroz, mel e frutas, foram encontrados em jarras de cerâmica datadas de 7000-6600 a.C., na atual região da China (MCGOVERN et al., 2004). Além disso, sinais químicos indicativos de bebida alcoólica fermentada feita de uvas em fragmentos de jarros de cerâmica de aproximadamente 6 mil anos encontrados na Geórgia, região do Sul do Cáucaso, indicam a mais antiga produção de vinho já encontrada (MCGOVERN et al., 2017).

Evidências da utilização e produção das bebidas alcoólicas também foram encontradas nos primeiros registros escritos, como as prescrições médicas em argila feitas pelos sumérios, seguidas pelos papiros egípcios, relatos hebraicos encontrados na Bíblia e as lendas da mitologia greco-romana. Todos esses registros indicam que o fenômeno da produção de bebidas fermentadas seria um combinado dos efeitos analgésicos, desinfetantes e euforizantes do etanol (MCGOVERN et al., 2004; VALLEE, 1994). Além disso, sugerem que o processo de fermentação teria sido aplicado à preservação e aumento do valor nutricional dos alimentos e bebidas. Dessa forma, o domínio dos processos de fermentação, contribuiu para o desenvolvimento da agricultura e das tecnologias de processamento de produtos alimentícios (MCGOVERN et al., 2004; VALLEE, 1994).

Os relatos dos problemas decorrentes do uso de etanol também datam da antiguidade. Por exemplo, na passagem bíblica do Antigo Testamento (Gênesis 9.21), Noé, após o dilúvio, fez o plantio de videiras e então com as uvas produziu o vinho, com o qual se embriagou e foi encontrado nu em sua tenda. Registros de embriaguez também são encontrados na mitologia greco-romana, como na lenda do

deus Baco (deus do vinho), que após se embriagar foi amarrado no tronco de uma roseira por outros deuses (MATTEDI, 2005).

Na Idade Média, os árabes passaram a produzir bebidas alcoólicas por meio do processo de destilação, aumentando assim, o teor alcoólico das bebidas, que passaram a ser consideradas um potente remédio para as doenças e para o alívio da dor (CEBRID, 2003).

No Brasil colonial, a cerveja era feita, basicamente, da fermentação da mandioca e do milho, principalmente entre os índios tupinambá. O processo de fermentação era visto como um acontecimento mágico, capaz de transformar alimentos em substâncias que alteravam a consciência humana. As bebidas, também chamadas de “*cauim*” eram parte essencial dos rituais indígenas, incluindo os casamentos e os funerais (FERNANDES, 2004).

Em 1532, Martim Affonso de Souza introduziu a cana-de-açúcar no Brasil iniciando seu cultivo no primeiro engenho de açúcar da Capitania de São Vicente. Entretanto, foi nas Capitanias de Pernambuco e da Bahia, que os engenhos de açúcar se multiplicaram e deram origem a produção da cachaça (VIALA-ARTIGUES, 2003).

A coroa portuguesa, entretanto, não era favorável a produção da cachaça, uma vez que, ela concorria com o vinho e com a bebida destilada produzida por meio das cascas da uva (RODRIGUES; RODRIGUES, 2008). Assim, em 1635, houve a proibição da comercialização da bebida oriunda da cana-de-açúcar, culminando na primeira manifestação popular do Brasil: a revolta da cachaça. Mesmo com a insatisfação da corte de Portugal, em 1661, a produção e comercialização da cachaça foram regulamentadas no Brasil (RODRIGUES; RODRIGUES, 2008).

No século XVIII, com o advento da Revolução Industrial, registrou-se grande aumento na produção e oferta de bebidas alcoólicas, o que contribuiu para um maior consumo e, conseqüentemente, problemas de saúde decorrentes do uso excessivo do etanol (CEBRID, 2003).

O termo alcoolismo surgiu em 1849, caracterizando os sinais e sintomas apresentados pelos sujeitos que consumiam bebidas alcoólicas de forma contínua e excessiva, durante um longo período. Entretanto, somente em 1960, por meio do

trabalho de Morton Jellinek, o alcoolismo foi classificado como doença. De acordo com esse pesquisador, o alcoolista seria todo indivíduo cujo consumo de bebidas alcoólicas pudesse prejudicar a ele próprio, a sociedade ou ambos (HECKMANN; SILVEIRA, 2009).

Atualmente, a dependência de etanol é definida como um distúrbio crônico e recidivante caracterizado pela perda do controle sobre o consumo, uso compulsivo da substância, e um estado emocional negativo quando a substância não está disponível (KOOB, 2013, 2015; KWAKO et al., 2016).

O etanol é a substância de abuso mais consumida no Brasil e em diversos países do mundo (PEACOCK et al., 2018; WORLD HEALTH ORGANISATION, 2014; CEBRID, 2005). Dados da Organização Mundial da Saúde revelaram que, em 2016, a média mundial de ingestão de etanol puro em indivíduos maiores de 15 anos foi de 6,4 litros. O mesmo estudo mostrou que no Brasil essa média foi de 7,8 litros (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Estima-se que cerca de 3,3 milhões de mortes em 2012 tenham sido causadas pelo consumo de etanol, o que corresponde a uma em cada vinte mortes no mundo (WORLD HEALTH ORGANISATION, 2014).

Apesar do consumo de etanol ainda ser maior nos homens quando comparado as mulheres (WORLD HEALTH ORGANISATION, 2014), estudos recentes mostram que essa diferença tem diminuído nos últimos anos (DAWSON et al., 2015; KEYES et al., 2010, 2011; KEYES; GRANT; HASIN, 2008). Este fato tem despertado a atenção dos órgãos de saúde, pois estudos indicam que as mulheres apresentam maior vulnerabilidade à doenças relacionadas ao uso de etanol, além de poderem desenvolver dependência em menor tempo de exposição ao etanol, quando comparadas aos homens (DIEHL et al., 2007; EHLERS et al., 2010; EROL; KARPYAK, 2015; MANN et al., 2005; RANDALL et al., 1999; SCHUCKIT et al., 1998).

Dados do II Levantamento Domiciliar Sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil revelaram que 74,6% da população brasileira consumiu etanol pelo menos uma vez na vida, sendo 12,3% a porcentagem de indivíduos que se tornaram dependentes (CEBRID, 2005). De acordo com o II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (II LENAD), realizado em 2012, 59% dos indivíduos que fizeram uso de etanol pelo menos uma vez no ano, relataram o consumo em binge, ou seja,

ingestão de grandes quantidades da droga em um único episódio (LARANJEIRA, 2014). Em relação as consequências sociais e econômicas, o uso desta substância no Brasil é responsável por cerca de 10% dos problemas totais de saúde pública (MELONI; LARANJEIRA, 2004), acarretando aos cofres públicos custo anual aproximado de 7% do produto interno bruto (GALLASSI et al., 2008).

## **2 Mecanismo de ação do etanol**

O etanol, cuja a fórmula química é  $C_2H_6O$ , é o princípio psicoativo presente nas bebidas alcóolicas. Devido a sua pequena e relativamente simples estrutura, ele atravessa a membrana celular por difusão simples e atua em diversos alvos no sistema nervoso central (HECKMANN; SILVEIRA, 2009; WESTERMEYER, 1998). Assim, o etanol apresenta um mecanismo de ação bastante complexo, que envolve a ação dessa substância em diversos receptores e proteínas efetoras. Em concentrações sanguíneas altas pode promover, também, alteração na composição lipídica das membranas citoplasmáticas.

Os efeitos comportamentais do etanol, em baixas doses, caracterizam-se por euforia, desinibição comportamental e loquacidade. Com o aumento da dose, observa-se sedação, diminuição da coordenação motora, instabilidade emocional, perda da capacidade de julgamento e prejuízo da memória recente (O'BRIEN, 2006). Este efeito bifásico do etanol, é decorrente de sua ação depressora em diferentes regiões encefálicas e sistemas de neurotransmissão. Assim, o aumento da atividade neuronal em algumas partes do sistema nervoso central, é ocasionada por desinibição (AGUAYO et al., 2002; RANG; DALE, 2016).

Os receptores gabaérgicos ( $GABA_A$ ) constituem a mediação primária da neurotransmissão inibitória. O etanol ao atuar como modulador alostérico positivo desses receptores, aumenta a afinidade do ácido gama-aminobutírico (GABA) ao seu receptor, aumentando a frequência de abertura e a corrente dos canais de cloreto (REYNOLDS; PRASAD; MACDONALD, 1992; SANTHAKUMAR; WALLNER; OTIS, 2007). O etanol também produz aumento da função do receptor de glicina, tanto por sua ação direta na subunidade  $\alpha 1$  do receptor, quanto pelos efeitos indiretos através da ativação da proteína quinase C (PKC) (RANG; DALE, 2016).

Os efeitos excitatórios do glutamato são inibidos pelo etanol, uma vez que, o etanol promove alterações na abertura dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, diminuindo a frequência e o tempo de abertura do canal, reduzindo, conseqüentemente, o influxo de íons positivos nos neurônios (PEOPLES; STEWART, 2000; WRIGHT; PEOPLES; WEIGHT, 1996; ZHAO et al., 2006).

Outros efeitos produzidos pelo etanol podem ser mediados pela sua interação com receptores colinérgicos nicotínicos e serotoninérgicos (LOVINGER, 1999; NARAHASHI et al., 1999; VENGELIENE et al., 2008). Neste âmbito, dados da literatura mostram que o aumento do consumo e preferência pelo etanol, envolve a ativação de receptores colinérgicos nicotínicos na área tegmental ventral e ainda que subtipos de receptores serotoninérgicos, como o 5-HT<sub>1A</sub> e o 5-HT<sub>3</sub>, também estão envolvidos do comportamento de consumo dessa substância (GILPIN; KOOB, 2008).

Os canais iônicos também são alvo da ação do etanol. O etanol reduz a liberação de neurotransmissores em resposta à despolarização dos terminais nervosos ao inibir a abertura de canais de Ca<sup>2+</sup> voltagem dependente nos neurônios. Também reduz a excitabilidade neuronal ao ativar canais de K<sup>+</sup> ativados por proteína G, assim como potencializa a atividade do canal de potássio ativado por cálcio (LOVINGER, 1999; NARAHASHI et al., 1999; VENGELIENE et al., 2008).

O etanol também altera direta ou indiretamente enzimas e proteínas envolvidas na transdução de sinal. Por exemplo, o etanol aumenta a atividade de várias isoformas da adenilato ciclase, ocasionando aumento da produção do AMP cíclico e, conseqüentemente, maior atividade da proteína quinase A (PKA) (O'BRIEN, 2006). Além disso, em concentrações sanguíneas elevada, o etanol pode promover alteração na composição lipídica das membranas citoplasmáticas (VENGELIENE et al., 2008).

A exposição crônica ao etanol promove alterações nesses sistemas de neurotransmissão e também na função neuronal, culminando no desenvolvimento da tolerância, síndrome de abstinência e uso compulsivo dessa substância (GILPIN; KOOB, 2008; VENGELIENE et al., 2008).

### **3 Transtornos associados ao uso de substâncias**

As substâncias psicoativas de abuso podem ser definidas como toda substância natural ou sintética que quando introduzida no organismo pode alterar o funcionamento do sistema nervoso central, proporcionando experiências subjetivas de prazer, com potencial de levar parte de seus usuários à dependência (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

De acordo com a décima edição da Classificação Internacional de Doenças (CID-10) três padrões de uso das substâncias de abuso podem ser identificados:

1. uso ocasional: refere-se a manutenção de uso regular, não compulsivo e que não interfere com as atividades habituais do indivíduo.
2. uso abusivo ou nocivo: caracterizado por um padrão mal-adaptado de uso, manifestado por consequências adversas recorrentes e significativas.
3. uso compulsivo ou dependência: caracterizado por um conjunto de sinais e sintomas indicativos de que o indivíduo perdeu o controle do uso da droga e o mantém a despeito das suas consequências adversas.

De acordo com o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH, do inglês *National Institute of Health*), a dependência é uma desordem psiquiátrica crônica e recorrente, que tem como característica o uso e procura compulsiva pela droga, apesar dos efeitos negativos decorrentes do uso. Outra característica importante da dependência é o surgimento de estados emocionais negativos (disforia, ansiedade, irritabilidade) quando o acesso à substância é limitado.

Na quinta edição do Manual de Diagnóstico e Estatística da Sociedade Americana de Psiquiatria (DSM-5), abuso e dependência foram reunidos em um único capítulo, intitulado “transtornos relacionados ao uso de substâncias”, com classificação de gravidade em três níveis: leve (2-3 sintomas), moderado (4-5 sintomas) e grave (6 ou mais sintomas). Segundo a Sociedade Americana de Psiquiatria, essa nova classificação possibilitou intervenções preventivas e curativas mais eficazes (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION APA, 2013).

De modo geral, o diagnóstico de um transtorno por uso de substâncias baseia-se em um padrão problemático de uso da substância, levando a comprometimento ou sofrimento clinicamente significativo, manifestado por pelo menos dois dos critérios apresentados na tabela 1, ocorrendo durante um período de 12 meses:

**Tabela 1.** Critérios diagnósticos do DSM-5 para transtornos relacionados ao uso de substâncias.

- 
- 1- A substância é frequentemente consumida em maiores quantidades ou por um período mais longo do que o pretendido.
  - 2- Desejo persistente ou esforços mal sucedidos no sentido de reduzir ou controlar o uso da substância.
  - 3- Maior tempo gasto em atividades necessárias para a obtenção da substância, em sua utilização ou na recuperação de seus efeitos.
  - 4- Fissura ou um forte desejo ou necessidade de usar a substância.
  - 5- Uso recorrente da substância resultando em fracasso em cumprir obrigações importantes.
  - 6- Uso continuado da substância apesar de problemas sociais ou interpessoais persistentes ou recorrentes causados ou exacerbados pelos efeitos de seu uso.
  - 7- Importantes atividades sociais, profissionais ou recreacionais são abandonadas ou reduzidas em virtude do uso da substância.
  - 8- Uso recorrente da substância em situações nas quais isso representa perigo para a integridade física.
  - 9- O uso da substância é mantido apesar da consciência de ter um problema físico ou psicológico persistente ou recorrente que tende a ser causado ou exacerbado por ela.
  - 10- Tolerância (caracterizada pelo aumento do consumo ou diminuição do efeito da droga).
  - 11- Síndrome de abstinência.
- 

Fonte: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais (DSM), 5ª ed., 2013.

#### **4 Teorias neurobiológicas da dependência**

Algumas teorias neurobiológicas foram propostas para explicar o desenvolvimento da dependência de substâncias de abuso. Apesar de possuírem diferentes abordagens, as teorias apresentadas a seguir, são complementares e contribuem para a compreensão de vários aspectos da dependência.

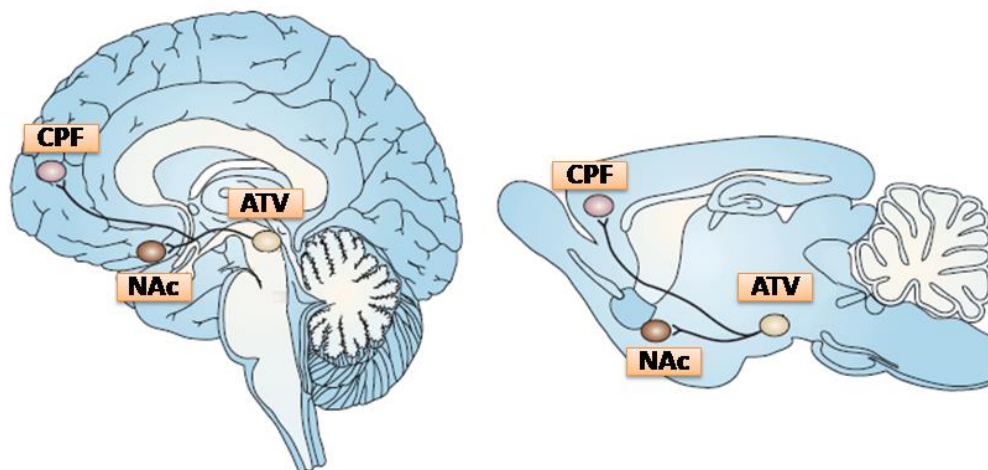
Nos primeiros estudos sistemáticos com o objetivo de entender a farmacodependência predominaram as investigações das consequências adversas decorrentes da interrupção do uso das drogas. Esses estudos foram realizados com opióides e etanol, substâncias que apresentam tolerância e síndrome de abstinência marcantes, características que definiram a dependência física (PLANETA; GRAEFF, 2012).

A tolerância é um estado adaptativo caracterizado pela diminuição da resposta à administração da mesma quantidade da droga, ou seja, o indivíduo aumenta a dose para obter o mesmo efeito farmacológico do início do uso. A síndrome de abstinência reflete as neuroadaptações relacionadas ao desenvolvimento da tolerância e ocorre como consequência da interrupção do uso da droga, após seu uso repetido. Ela é caracterizada por um conjunto de sinais e sintomas (específicos para cada droga), geralmente opostos aos efeitos agudos da substância, que provocam desconforto intenso ao indivíduo (JAFFE et al., 1989; O'BRIEN, 2006). Com base nessas observações, foi proposto que indivíduos dependentes mantinham o uso da droga para evitar o desconforto da retirada e, dessa forma, a droga atuaria como reforçador negativo.

Porém, a teoria do reforço negativo apresentou algumas limitações. Por exemplo, o tratamento da síndrome de abstinência é pouco eficaz no tratamento da dependência. Além disso, muitos fármacos utilizados na terapêutica como os antidepressivos e antipsicóticos, causam síndrome de abstinência, mas não induzem o uso compulsivo. E ainda, o início do uso das drogas ocorre na ausência da síndrome de abstinência (WISE E BOZARTH, 1987; JAFFE, 1989; O'BRIEN, 2006).

Posteriormente, Wise e Bozarth (1987) propuseram a teoria do reforço positivo. De acordo com essa teoria, todas as substâncias capazes de promover dependência produziram efeitos euforizantes e prazerosos responsáveis por reforçar o comportamento de uso e busca pela droga. Esses efeitos seriam decorrentes da ação dessas substâncias no mesmo substrato neurobiológico, o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, composto pela área tegmental ventral e suas projeções para o córtex pré-frontal e regiões do sistema límbico, como o núcleo acumbens, conforme ilustrado na figura 1 (KOOB, 2001; WISE; BOZARTH, 1987). A ativação desse sistema resulta no aumento da liberação de dopamina no núcleo acumbens, evento associado à euforia e sensação subjetiva de prazer (WISE, 1978; WISE; BOZARTH, 1987).





**Figura 1.** Representação esquemática do sistema mesocorticolímbico no encéfalo humano (esquerda) e de roedor (direita), destacando as projeções dopaminérgicas oriundas da área tegmental ventral (ATV) para o núcleo acumbens (NAc) e córtex pré-frontal (CPF). Fonte: adaptado de (LAVIOLETTE; VAN DER KOOY, 2004).

A partir dessas observações, vários estudos demonstraram aumento da liberação de dopamina no núcleo acumbens após a administração de nicotina, cocaína, anfetamina, morfina, etanol e  $\Delta^9$ -THC (CADONI; DI CHIARA, 2000; DI CHIARA, 2000; DI CHIARA; IMPERATO, 1988; IMPERATO; MULAS; DI CHIARA, 1986; KIIANMAA et al., 1995; SCHILSTRÖM et al., 1998; TANDA; PONTIERI; DI CHIARA, 1997).

Estudos indicam que o efeito reforçador do etanol no sistema mesocorticolímbico ocorre devido ao bloqueio dos receptores NMDA, localizados no corpo celular dos interneurônios GABAérgicos na área tegmental ventral. Dessa forma, a redução da inibição GABAérgica sobre os neurônios dopaminérgicos resulta no aumento da liberação de dopamina no núcleo acumbens. Da mesma forma, o álcool pode inibir a transmissão GABAérgica na área tegmental ventral ao se ligar aos receptores do tipo GABA<sub>A</sub> (GILPIN; KOOB, 2008).

Outras evidências sugerem que o etanol pode ativar os neurônios opioidérgicos da área tegmental ventral, que por sua vez, inibem os interneurônios GABAérgicos, intensificando a transmissão dopaminérgica e aumentando a liberação de dopamina no núcleo acumbens (GILPIN; KOOB, 2008). Além disso, a administração de etanol pode ativar os receptores canabinóides CB<sub>1</sub> e alterar a liberação de dopamina, glutamato e GABA na via mesocorticolímbica. Neste sentido, antagonistas dos receptores CB<sub>1</sub> podem bloquear o efeito do etanol no sistema

dopaminérgico (MALINEN; HYYTIÄ, 2008; SOLINAS; GOLDBERG; PIOMELLI, 2008; O'BRIEN, 2006).

Apesar dos estados afetivos hedônicos proporcionados pelas substâncias psicoativas explicarem a experimentação e o uso ocasional, eles não explicam a característica principal da dependência: a perda do controle do uso da droga (O'BRIEN, 2011).

Neste contexto, Robinson e Berridge (1993) propuseram que o desejo compulsivo pela droga resultaria da sensibilização de vias dopaminérgicas mesolímbicas envolvidas com o incentivo motivacional e recompensa. De acordo com esses autores, além de mediar as sensações hedônicas, o sistema dopaminérgico mesolímbico regularia o incentivo motivacional e a atenção aos estímulos ambientais relacionados ao uso da substância. Com o uso repetido, neuroplasticidades induzidas nas vias dopaminérgicas mesolímbicas pelo uso prolongado das substâncias de abusos resultariam no aumento da saliência motivacional atribuída aos efeitos específicos da droga e dos estímulos a ela associados. Assim, independentemente da propriedade de causar prazer, a droga e os estímulos pareados a ela promoveriam desejo incontrolável de usar a substância (fissura), capaz de controlar o comportamento. Essa teoria foi denominada sensibilização do incentivo (ROBINSON; BERRIDGE, 1993, 2003).

A sensibilização do incentivo decorre de plasticidades duradouras no sistema mesocorticolímbico (ROBINSON; BERRIDGE, 1993, 2003). Por exemplo, estudos indicam que a administração repetida de etanol pode aumentar a neurotransmissão glutamatérgica, assim como promover alterações duradouras nas sinapses glutamatérgicas na via corticolímbica (RAO et al., 2015). Evidências da literatura indicam que essas plasticidades estariam envolvidas no desenvolvimento da sensibilização e da dependência (BLANCO et al., 2014; VOLKOW et al., 2011).

Teorias mais recentes propõe que a dependência à substâncias de abuso envolve comportamentos de aprendizado associativo (ANAGNOSTARAS; ROBINSON, 1996; BADIANI; ROBINSON, 2004; EVERITT; ROBBINS, 2005; VEZINA; LEYTON, 2009; WISE, 2004). Assim, o indivíduo ao fazer o uso de uma droga de abuso, associa os efeitos intraceptivos físicos e emocionais da droga aos estímulos ambientais presentes no momento do uso. Com a exposição contínua,

essas associações tornam-se bastante salientes, fazendo com que a simples exposição do indivíduo ao contexto ou as dicas associadas ao uso da substância, seja capaz de desencadear a fissura, levando o usuário a recair ao uso da droga (JAFFE et al., 1989; LUDWIG; STARK, 1974; O'BRIEN et al., 1992; SIEGEL, 1999).

Entretanto, um dos grandes desafios na área da dependência é compreender como essas associações são armazenadas no sistema nervoso central. Donald Hebb, em 1949 propôs que o aprendizado associativo e a memória seriam armazenados em um pequeno grupo de neurônios, dispersamente distribuídos pelo encéfalo e conectados entre si através de sinapses bem estruturadas (*neuronal ensembles*) que, frente a um determinado estímulo, despolarizariam ao mesmo tempo e na mesma intensidade, promovendo a evocação da memória (HEBB, 1949). Baseado nessas observações, o grupo de pesquisa coordenado pelo Dr. Bruce Hope demonstrou que os aprendizados associativos envolvidos no desenvolvimento da dependência também podem ser armazenados nos *neuronal ensembles* (BOSSERT et al., 2011; CRUZ et al., 2013, 2014; FANOUS et al., 2013; KOYA et al., 2009, 2012; RUBIO et al., 2015). Esses estudos promoveram um avanço na compreensão das bases neurobiológicas da dependência, indicando que as neuroplasticidades decorrentes da administração repetida de drogas podem ocorrer nesses grupos neuronais específicos, espalhados por diversas regiões do encéfalo (BOSSERT et al., 2011; CRUZ et al., 2013, 2014; FANOUS et al., 2013; KOYA et al., 2009, 2012; MATTSON et al., 2008; RUBIO et al., 2015).

## **5 Procedimentos experimentais para o estudo da dependência**

A utilização de modelos animais que possam evidenciar alterações comportamentais e moleculares relacionadas ao uso e a dependência de drogas é fundamental para o avanço do conhecimento da neurobiologia da dependência (CAPRIOLI et al., 2007).

O efeito reforçador positivo promovido pelas drogas de abuso tem sido amplamente demonstrado em modelos experimentais baseados nos princípios do condicionamento clássico (preferência condicionado por lugar) ou operante (autoadministração) (CARBONI; VACCA, 2003; PANLILIO; GOLDBERG, 2007).

O modelo de preferência condicionada por lugar (PCL) avalia a capacidade reforçadora da droga pelo estabelecimento de associações entre os efeitos hedônicos da substância e um ambiente específico. Esse modelo é baseado no condicionamento clássico ou pavloviano e consiste da associação repetida da administração da substância de abuso com um ambiente, enquanto o outro ambiente, de características sensoriais distintas, é associado à administração do veículo (SANCHIS-SEGURA; SPANAGEL, 2006). Dessa forma, estímulos sensoriais distintos e inicialmente neutros, pareados alternadamente com estímulos incondicionados, adquirem as características dos estímulos incondicionados e se transformam em estímulos condicionados (SANCHIS-SEGURA; SPANAGEL, 2006). Todas as substâncias psicoativas que causam dependência em humanos, também desenvolvem o comportamento de procura pelo ambiente associado com a substância psicoativa em roedores (ROBINSON; BERRIDGE, 2003). Neste sentido, diversos estudos demonstraram que a administração de etanol, cocaína, anfetamina, opióides e nicotina induz PCL (MOREIRA-SILVA et al., 2014; NOCJAR; MIDDAUGH; TAVERNETTI, 1999; SCHECHTER; CALCAGNETTI, 1998; TZSCHENTKE, 1998; VASTOLA et al., 2002).

A autoadministração operante é um modelo que têm por característica principal o fato de que os próprios animais buscam e operam para receber a droga. Evento que se assemelha à situação humana no aspecto da opção pelo uso e busca pela substância. Nesse modelo, o animal aprende a pressionar uma barra para receber a droga, seja por via oral, intravenosa ou intracerebral. Cada resposta operante é reforçada pelos efeitos da própria substância de abuso (reforço positivo), fazendo com que o animal busque a droga novamente. A autoadministração operante foi demonstrada para cocaína, heroína, etanol, anfetamina, nicotina e  $\Delta^9$ -THC (AHMED; KOOB, 1999; DAI et al., 1989; GRANT; SAMSON, [s.d.]; KNACKSTEDT; KALIVAS, 2007; LEÃO et al., 2013, 2015; ROTHMAN; BAUMANN, 2006; TANDA; MUNZAR; GOLDBERG, 2000).

Em roedores, a sensibilização comportamental é caracterizada pelo aumento gradual da atividade locomotora após administrações repetidas de uma substância de abuso. A correlação entre a sensibilização do incentivo e o aumento progressivo da atividade locomotora (sensibilização locomotora) se dá devido ao

compartilhamento das estruturas cerebrais que controlam a relevância motivacional e a atividade motora em roedores (BERRIDGE; ROBINSON; ALDRIDGE, 2009; ROBINSON; BERRIDGE, 1993, 2003). A sensibilização locomotora é considerada um modelo robusto, que indica a presença de plasticidades duradouras no sistema mesocorticolímbico relacionadas à diferentes aspectos comportamentais da dependência de drogas (BLANCO et al., 2014; ROBINSON; BERRIDGE, 1993, 2003; VOLKOW et al., 2011). Ela já foi demonstrada para cocaína, anfetamina, morfina, etanol, nicotina e  $\Delta^9$ THC (AIZENSTEIN; SEGAL; KUCZENSKI, 1990; BAHÍ; DREYER, 2012; CADONI et al., 2001; CADONI; DI CHIARA, 2000; CRUZ; DELUCIA; PLANETA, 2005; MARIN; CRUZ; PLANETA, 2008; MARIN; PLANETA, 2004; MOHAMED; EL-MAS; ABDEL-RAHMAN, 1999; MORAIS-SILVA; FERREIRA-SANTOS; MARIN, 2016).

Todos os fatores que promovem a fissura e a recaída em humanos, também tem a capacidade de reinstalar a busca de drogas em animais de laboratório (BROWN et al., 1995; JAFFE et al., 1989; LUDWIG; STARK, 1974; O'BRIEN et al., 1992; SINHA, 2001). Neste sentido, o modelo pavloviano conhecido como *ABA renewal* tem sido amplamente utilizado para avaliar a reinstalação da autoadministração operante de drogas induzida pelo contexto (BOUTON, 1993; BOUTON; KING, 1983; BOUTON; RICKER, 1994; CROMBAG; SHAHAM, 2002). Neste 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 distinto (contexto-sem droga), que se difere do contexto-droga em termos táteis e visuais e sonoros. 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) (BOSSERT et al., 2013; FUCHS et al., 1998; MARCHANT et al., 2015; SHAHAM et al., 2003). Este modelo já foi utilizado para investigar a influência do ambiente na recaída à diferentes drogas, como a cocaína, a heroína e o etanol (BOSSERT et al., 2011; CRUZ et al., 2014; FANOUS et al., 2012; MARCHANT et al., 2013).

A alta taxa de recaída nos indivíduos dependentes do etanol continua sendo o desafio central no tratamento do alcoolismo (GOLDSTEIN; VOLKOW, 2011; HEINZ

et al., 2010; VENGELIENE et al., 2008). Neste contexto, a exposição à estímulos ambientais associados ao uso do etanol, é considerado um fator desencadeador importante da fissura (humanos) e da busca pela droga (não humanos) (HEINZ et al., 2010; LUDWIG; STARK, 1974; LUDWIG; WIKLER, 1974; STAIGER; WHITE, 1991). Com o objetivo de contribuir para a compreensão dos circuitos neurais envolvidos na recaída do etanol induzida pela exposição ao ambiente, investigamos a participação de regiões corticais e límbicas e de suas projeções na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto. O aprofundamento da fundamentação teórica e os resultados dessas investigações estão descritas no Capítulo 1.

Outro aspecto fundamental para entender os problemas relacionados ao uso de etanol é a investigação dos mecanismos neurais envolvidos nas neuroplasticidades associadas ao desenvolvimento da dependência (GILPIN; KOOB, 2008; VENGELIENE et al., 2008). Neste sentido, estudos recentes tem demonstrado que o efeito sinaptogênico da proteína matricelular Hevin pode promover neuroplasticidades no estriado, modulando as propriedades reforçadoras e a sensibilização locomotora induzida pelo uso de drogas, como a cocaína (JONES; BOUVIER, 2014; KUCUKDERELI et al., 2011; MONGREDIEN et al., 2017; VIALOU et al., 2010). Entretanto, nenhum estudo investigou o papel dessa proteína nas propriedades reforçadoras e na sensibilização locomotora induzida pelo etanol. No Capítulo 2, apresentamos a base teórica e os resultados da investigação do papel da Hevin nos comportamentos de consumo de etanol, preferência condicionada por lugar e sensibilização locomotora, após a exposição repetida ao etanol. Essas atividades foram desenvolvidas no departamento de Neurociência Paris Seine (NPS) da Université Pierre et Marie Curie sob a orientação do Dr. Vincent Vialou, durante o desenvolvimento do doutorado sanduíche pelo Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE/CAPES).

## 6 Referências Bibliográficas

AGUAYO, L. G. et al. GABA(A) receptors as molecular sites of ethanol action. Direct or indirect actions? **Current topics in medicinal chemistry**, [s. l.], v. 2, n. 8, p. 869–85, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12171577>>

AHMED, S. H.; KOOB, G. F. Long-lasting increase in the set point for cocaine self-administration after escalation in rats. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 146, n. 3, p. 303–12, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10541731>>

AIZENSTEIN, M. L.; SEGAL, D. S.; KUCZENSKI, R. Repeated amphetamine and fencamfamine: sensitization and reciprocal cross-sensitization. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 283–90, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1976010>>

AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION APA. **DSM-V-TR - Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. [s.l: s.n.].

ANAGNOSTARAS, S. G.; ROBINSON, T. E. Sensitization to the psychomotor stimulant effects of amphetamine: modulation by associative learning. **Behavioral neuroscience**, [s. l.], v. 110, n. 6, p. 1397–414, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8986341>>

BADIANI, A.; ROBINSON, T. E. Drug-induced neurobehavioral plasticity: the role of environmental context. **Behavioural pharmacology**, [s. l.], v. 15, n. 5–6, p. 327–39, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15343056>>

BAHI, A.; DREYER, J. L. Involvement of nucleus accumbens dopamine D1 receptors in ethanol drinking, ethanol-induced conditioned place preference, and ethanol-induced psychomotor sensitization in mice. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 222, n. 1, p. 141–153, 2012.

BERRIDGE, K. C.; ROBINSON, T. E.; ALDRIDGE, J. W. Dissecting components of reward: “liking”, “wanting”, and learning. **Current Opinion in Pharmacology**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 65–73, 2009.

BLANCO, E. et al. Cocaine-induced behavioral sensitization is associated with changes in the expression of endocannabinoid and glutamatergic signaling systems in the mouse prefrontal cortex. **The international journal of neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 18, n. 1, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25539508>>

BOSSERT, J. M. et al. Ventral medial prefrontal cortex neuronal ensembles mediate context-induced relapse to heroin. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 420–422, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nn.2758>>

BOSSERT, J. M. et al. The reinstatement model of drug relapse: Recent neurobiological findings, emerging research topics, and translational research. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 229, n. 3, p. 453–476, 2013.

BOUTON, M. E. Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of

Pavlovian learning. **Psychological bulletin**, [s. l.], v. 114, n. 1, p. 80–99, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8346330>>

BOUTON, M. E.; KING, D. A. Contextual control of the extinction of conditioned fear: tests for the associative value of the context. **Journal of experimental psychology. Animal behavior processes**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 248–65, 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6886630>>

BOUTON, M. E.; RICKER, S. T. Renewal of extinguished responding in a second context. **Animal Learning & Behavior**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 317–324, 1994. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.3758/BF03209840>>

BROWN, S. A. et al. Stress, vulnerability and adult alcohol relapse. **Journal of studies on alcohol**, [s. l.], v. 56, n. 5, p. 538–45, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7475034>>

CADONI, C. et al. Behavioural sensitization after repeated exposure to Delta 9-tetrahydrocannabinol and cross-sensitization with morphine. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 158, n. 3, p. 259–66, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11713615>>

CADONI, C.; DI CHIARA, G. Differential changes in accumbens shell and core dopamine in behavioral sensitization to nicotine. **European journal of pharmacology**, [s. l.], v. 387, n. 3, p. R23-5, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10650185>>

CAPRIOLI, D. et al. Modeling the role of environment in addiction. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, [s. l.], v. 31, n. 8, p. 1639–53, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17889978>>

CARBONI, E.; VACCA, C. Conditioned place preference. A simple method for investigating reinforcing properties in laboratory animals. **Methods in molecular medicine**, [s. l.], v. 79, p. 481–98, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12506719>>

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. **Drogas Psicotrópicas**. [s. l.], p. 1–64, 2003. Disponível em: <<http://200.144.91.102/sitenovo/conteudo.aspx?cd=644>>

CROMBAG, H. S.; SHAHAM, Y. Renewal of drug seeking by contextual cues after prolonged extinction in rats. **Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 116, n. 1, p. 169–173, 2002.

CRUZ, F. C. et al. New technologies for examining the role of neuronal ensembles in drug addiction and fear. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 743–754, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrn3597>>



CRUZ, F. C. et al. Role of Nucleus Accumbens Shell Neuronal Ensembles in Context-Induced Reinstatement of Cocaine-Seeking. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 34, n. 22, p. 7437–7446, 2014. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.0238-14.2014>>

CRUZ, F. C.; DELUCIA, R.; PLANETA, C. S. Differential behavioral and neuroendocrine effects of repeated nicotine in adolescent and adult rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 80, n. 3, p. 411–417, 2005.

DAI, S. et al. Heroin self-administration by rats: influence of dose and physical dependence. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 1009–15, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2798525>>

DAWSON, D. A. et al. Changes in alcohol consumption: United States, 2001-2002 to 2012-2013. **Drug and alcohol dependence**, [s. l.], v. 148, p. 56–61, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25620731>>

DI CHIARA, G. Role of dopamine in the behavioural actions of nicotine related to addiction. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 393, n. 1–3, p. 295–314, 2000.

DI CHIARA, G.; IMPERATO, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 85, n. 14, p. 5274–5278, 1988. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.85.14.5274>>

DIEHL, A. et al. Alcoholism in women: is it different in onset and outcome compared to men? **European archives of psychiatry and clinical neuroscience**, [s. l.], v. 257, n. 6, p. 344–51, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17629733>>

EHLERS, C. L. et al. Age at Regular Drinking, Clinical Course, and Heritability of Alcohol Dependence in the San Francisco Family Study: A Gender Analysis. **The American Journal on Addictions**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 101–110, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20163381>>

EROL, A.; KARPAYAK, V. M. Sex and gender-related differences in alcohol use and its consequences: Contemporary knowledge and future research considerations. **Drug and alcohol dependence**, [s. l.], v. 156, p. 1–13, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26371405>>

EVERITT, B. J.; ROBBINS, T. W. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. **Nature neuroscience**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 1481–9, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16251991>>

FANOUS, S. et al. Role of orbitofrontal cortex neuronal ensembles in the expression of incubation of heroin craving. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 32, n. 34, p. 11600–9, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22915104>>

FANOUS, S. et al. Expression of Incubation of Heroin Craving. [s. l.], v. 32, n. 34, p.

11600–11609, 2013.

FERNANDES, J. A. *Selvagens Bebedeiras: Álcool, Embriaguez e Contatos Culturais no Brasil Colonial*. [s. l.], 2004.

FUCHS, R. A. et al. Predictive validity of the extinction/reinstatement model of drug craving. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 135, n. 2, p. 151–60, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9497020>>

GALLASSI, A. D. et al. Custos dos problemas causados pelo abuso do álcool. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, [s. l.], v. 35, p. 25–30, 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-60832008000700007&lng=pt&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-60832008000700007&lng=pt&nrm=iso&tlng=en)>

GILPIN, N. W.; KOOB, G. F. Neurobiology of alcohol dependence: focus on motivational mechanisms. **Alcohol research & health: the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 185–95, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19881886>> <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2770186>>

GOLDSTEIN, R. Z.; VOLKOW, N. D. Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: Neuroimaging findings and clinical implications. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 652–669, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrn3119>>

GRANT, K. A.; SAMSON, H. H. Oral self administration of ethanol in free feeding rats. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 317–21, [s.d.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4040380>>

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

HECKMANN, W.; SILVEIRA, C. M. Dependência do álcool: aspectos clínicos e diagnósticos. **Álcool E Suas Consequências: Uma Abordagem Multiconceitual.**, [s. l.], p. 67–87., 2009.

HEINZ, A. et al. Chapter 4 Alcohol Craving and Relapse Prediction. **Advances in the Neuroscience of Addiction**, [s. l.], p. 1–16, 2010.

IMPERATO, A.; MULAS, A.; DI CHIARA, G. Nicotine preferentially stimulates dopamine release in the limbic system of freely moving rats. **European journal of pharmacology**, [s. l.], v. 132, n. 2–3, p. 337–8, 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3816984>>

JAFFE, J. H. et al. Cocaine-induced cocaine craving. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 97, n. 1, p. 59–64, 1989. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00443414>>

JONES, E. V.; BOUVIER, D. S. Astrocyte-secreted extracellular matrix proteins in CNS remodelling during development and disease. **Neural Plasticity**, [s. l.], v. 2014,

2014.

KEYES, K. M. et al. Telescoping and gender differences in alcohol dependence: new evidence from two national surveys. **The American journal of psychiatry**, [s. l.], v. 167, n. 8, p. 969–76, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20439391>>

KEYES, K. M. et al. Alcohol craving and the dimensionality of alcohol disorders. **Psychological medicine**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 629–40, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20459881>>

KEYES, K. M.; GRANT, B. F.; HASIN, D. S. Evidence for a closing gender gap in alcohol use, abuse, and dependence in the United States population. **Drug and Alcohol Dependence**, [s. l.], v. 93, n. 1–2, p. 21–29, 2008.

KLIANMAA, K. et al. Effect of ethanol on extracellular dopamine in the nucleus accumbens of alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 29–34, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7501675>>

KNACKSTEDT, L. A.; KALIVAS, P. W. Extended access to cocaine self-administration enhances drug-primed reinstatement but not behavioral sensitization. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, [s. l.], v. 322, n. 3, p. 1103–9, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17601982>>

KOOB, G. F. Drug addiction, reward dysregulation and allostasis. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 24, n. 02, 2001. Disponível em: <isi:000172372400195>

KOOB, G. F. Theoretical frameworks and mechanistic aspects of alcohol addiction: alcohol addiction as a reward deficit disorder. **Current topics in behavioral neurosciences**, [s. l.], v. 13, p. 3–30, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21744309>>

KOOB, G. F. Alcohol use disorders: tracts, twins, and trajectories. **The American journal of psychiatry**, [s. l.], v. 172, n. 6, p. 499–501, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25982661>>

KOYA, E. et al. Targeted disruption of cocaine-activated nucleus accumbens neurons prevents context-specific sensitization. **Nature neuroscience**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 1069–73, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19620976>>

KOYA, E. et al. Silent synapses in selectively activated nucleus accumbens neurons following cocaine sensitization. **Nature neuroscience**, [s. l.], v. 15, n. 11, p. 1556–62, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23023294>>

KUCUKDERELI, H. et al. Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 108, n. 32, p. E440–E449, 2011. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1104977108>>

KWAKO, L. E. et al. Addictions Neuroclinical Assessment: A Neuroscience-Based Framework for Addictive Disorders. **Biological psychiatry**, [s. l.], v. 80, n. 3, p. 179–89, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26772405>>

LARANJEIRA, R. (SUP). **II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD) - 2012**. São Paulo: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD), UNIFESP, 2014.

LAVIOLETTE, S. R.; VAN DER KOOY, D. The neurobiology of nicotine addiction: Bridging the gap from molecules to behaviour. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 55–65, 2004.

LEÃO, R. M. et al. Enhanced nicotine-seeking behavior following pre-exposure to repeated cocaine is accompanied by changes in BDNF in the nucleus accumbens of rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 104, n. 1, p. 169–176, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2013.01.007>>

LEÃO, R. M. et al. Chronic Nicotine Activates Stress/Reward-Related Brain Regions and Facilitates the Transition to Compulsive Alcohol Drinking. **The Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 35, n. 15, p. 6241–6253, 2015. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.3302-14.2015>>

LOVINGER, D. M. 5-HT<sub>3</sub> receptors and the neural actions of alcohols: an increasingly exciting topic. **Neurochemistry international**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 125–30, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10405996>>

LUDWIG, A. M.; STARK, L. H. Alcohol craving. Subjective and situational aspects. **Quarterly journal of studies on alcohol**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 899–905, 1974. 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**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 108–30, 1974. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4827273>>

MALINEN, H.; HYYTIÄ, P. Ethanol self-administration is regulated by CB1 receptors in the nucleus accumbens and ventral tegmental area in alcohol-preferring AA rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, [s. l.], v. 32, n. 11, p. 1976–1983, 2008.

MANN, K. et al. Neuroimaging of gender differences in alcohol dependence: are women more vulnerable? **Alcoholism, clinical and experimental research**, [s. l.], v. 29, n. 5, p. 896–901, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15897736>>

MARCHANT, N. J. et al. Context-induced relapse to alcohol seeking after punishment in a rat model. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 73, n. 3, p. 256–262, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.07.007>>

MARCHANT, N. J. et al. Role of corticostriatal circuits in context-induced reinstatement of drug seeking. **Brain Research**, [s. l.], v. 1628, p. 219–232, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2014.09.004>>

MARIN, M. T.; CRUZ, F. C.; PLANETA, C. S. Cocaine-induced behavioral sensitization in adolescent rats endures until adulthood: Lack of association with GluR1 and NR1 glutamate receptor subunits and tyrosine hydroxylase. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 91, n. 1, p. 109–114, 2008.

MARIN, M. T.; PLANETA, C. S. Maternal separation affects cocaine-induced locomotion and response to novelty in adolescent, but not in adult rats. **Brain research**, [s. l.], v. 1013, n. 1, p. 83–90, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15196970>>

MATTEDI, L. E. DA V. A embriaguez alcoólica e as suas conseqüências jurídicopenais. **Jus Navigandi**, v. 10, n. 714, p. 1–8, 2005.

MATTSON, B. J. et al. Context-specific sensitization of cocaine-induced locomotor activity and associated neuronal ensembles in rat nucleus accumbens. **The European journal of neuroscience**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 202–12, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18093170>>

MCGOVERN, P. et al. Early Neolithic wine of Georgia in the South Caucasus. [s. l.], 2017.

MCGOVERN, P. E. et al. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 101, n. 51, p. 17593–17598, 2004. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0407921102>>

MELONI, J. N.; LARANJEIRA, R. Custo social e de saúde do consumo do álcool. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, [s. l.], v. 26, n. suppl 1, p. 7–10, 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-44462004000500003&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-44462004000500003&lng=pt&tlng=pt)>

MOHAMED, M. K.; EL-MAS, M. M.; ABDEL-RAHMAN, A a. Estrogen enhancement of baroreflex sensitivity is centrally mediated. **The American journal of physiology**, [s. l.], v. 276, n. 4 Pt 2, p. R1030-7, 1999.

MONGREDIEN, R. et al. Role of the matricellular protein hevin in drug response. **European Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 27, p. S539–S540, 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924977X17310271>>

MORAIS-SILVA, G.; FERREIRA-SANTOS, M.; MARIN, M. T. Conessine, an H3receptor antagonist, alters behavioral and neurochemical effects of ethanol in mice. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 305, p. 100–107, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.02.025>>

MOREIRA-SILVA, D. et al. Stress Abolishes the Effect of Previous Chronic Ethanol Consumption on Drug Place Preference and on the Mesocorticolimbic Brain Pathway. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, [s. l.], v. 38, n. 5, p. 1227–1236, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/acer.12388>>

NARAHASHI, T. et al. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: a new target site of ethanol. **Neurochemistry international**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 131–41, 1999.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10405997>>

NOCJAR, C.; MIDDAUGH, L. D.; TAVERNETTI, M. Ethanol consumption and place-preference conditioning in the alcohol-preferring C57BL/6 mouse: relationship with motor activity patterns. **Alcoholism, clinical and experimental research**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 683–92, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10235304>>

O'BRIEN, C. Addiction and dependence in DSM-V. **Addiction**, [s. l.], v. 106, n. 5, p. 866–867, 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1360-0443.2010.03144.x>>

O'BRIEN, C. P. et al. Classical conditioning in drug-dependent humans. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 654, p. 400–15, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1632593>>

O'BRIEN, C. P. Drug Addiction and Abuse. In: Hardman, J.G.; Limbird, L.E. (eds). **Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics**, 11th Ed. Pregamon, New York, p. 621-642, 2006.

PANLILIO, L. V.; GOLDBERG, S. R. Self-administration of drugs in animals and humans as a model and an investigative tool. **Addiction**, [s. l.], v. 102, n. 12, p. 1863–1870, 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1360-0443.2007.02011.x>>

PEACOCK, A. et al. Global statistics on alcohol, tobacco and illicit drug use: 2017 status report. **Addiction (Abingdon, England)**, [s. l.], v. 113, n. 10, p. 1905–1926, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29749059>>

PEOPLES, R. W.; STEWART, R. R. Alcohols inhibit N-methyl-D-aspartate receptors via a site exposed to the extracellular environment. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 39, n. 10, p. 1681–91, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10884550>>

PLANETA, C. S.; GRAEFF, F.G. Abuso e dependência de substâncias psicoativas. In: Frederico Guilherme Graeff; Francisco Silveira Guimarães. (Org.). **Fundamentos de psicofarmacologia**. 2 ed. São Paulo: 2012, v. 1, p. 245-268.

RANDALL, C. L. et al. Telescoping of landmark events associated with drinking: a gender comparison. **Journal of studies on alcohol**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 252–60, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10091964>>

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., FLOWER, R.J., HENDERSON, G. **Farmacologia**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

RAO, P. S. S. et al. Targeting glutamate uptake to treat alcohol use disorders. **Frontiers in neuroscience**, [s. l.], v. 9, p. 144, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25954150>>

REYNOLDS, J. N.; PRASAD, A.; MACDONALD, J. F. Ethanol modulation of GABA receptor-activated Cl<sup>-</sup> currents in neurons of the chick, rat and mouse central

nervous system. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 224, n. 2–3, p. 173–181, 1992. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/001429999290802B>>

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. **Brain research**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 247–291, 1993.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. Addiction. **Annual Review of Psychology**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 25–53, 2003. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.psych.54.101601.145237>>

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.** Disponível em: <[http://www.cerescaico.ufrn.br/mneme/anais/st\\_suma\\_pg/st9.html](http://www.cerescaico.ufrn.br/mneme/anais/st_suma_pg/st9.html)>. Acesso em: 04 de setembro de 2018.

ROTHMAN, R. B.; BAUMANN, M. H. Balance between dopamine and serotonin release modulates behavioral effects of amphetamine-type drugs. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 1074, p. 245–60, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17105921>>

RUBIO, F. J. et al. Context-induced reinstatement of methamphetamine seeking is associated with unique molecular alterations in Fos-expressing dorsolateral striatum neurons. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 35, n. 14, p. 5625–39, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25855177>>

SANCHIS-SEGURA, C.; SPANAGEL, R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: An overview. **Addiction Biology**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 2–38, 2006.

SANTHAKUMAR, V.; WALLNER, M.; OTIS, T. S. Ethanol acts directly on extrasynaptic subtypes of GABAA receptors to increase tonic inhibition. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 211–21, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17591544>>

SCHECHTER, M. D.; CALCAGNETTI, D. J. Continued trends in the conditioned place preference literature from 1992 to 1996, inclusive, with a cross-indexed bibliography. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 827–46, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9809314>>

SCHILSTRÖM, 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**, [s. l.], v. 85, n. 4, p. 1005–9, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9681941>>

SCHUCKIT, M. A. et al. The clinical course of alcohol-related problems in alcohol dependent and nonalcohol dependent drinking women and men. **Journal of studies on alcohol**, [s. l.], v. 59, n. 5, p. 581–90, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9718111>>

SHAHAM, Y. et al. The reinstatement model of drug relapse: History, methodology and major findings. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 168, n. 1–2, p. 3–20, 2003.

SIEGEL, S. Drug anticipation and drug addiction. The 1998 H. David Archibald Lecture. **Addiction (Abingdon, England)**, [s. l.], v. 94, n. 8, p. 1113–24, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10615727>>

SINHA, R. How does stress increase risk of drug abuse and relapse? **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 158, n. 4, p. 343–59, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11797055>>

SOLINAS, M.; GOLDBERG, S. R.; PIOMELLI, D. The endocannabinoid system in brain reward processes. [s. l.], n. December 2007, p. 369–383, 2008.

STAIGER, P. K.; WHITE, J. M. Cue reactivity in alcohol abusers: stimulus specificity and extinction of the responses. **Addictive behaviors**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 211–21, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1776539>>

TANDA, G.; MUNZAR, P.; GOLDBERG, S. R. Self-administration behavior is maintained by the psychoactive ingredient of marijuana in squirrel monkeys. **Nature neuroscience**, [s. l.], v. 3, n. 11, p. 1073–4, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11036260>>

TANDA, G.; PONTIERI, F. E.; DI CHIARA, G. Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 276, n. 5321, p. 2048–50, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9197269>>

TZSCHENTKE, T. M. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. **Progress in Neurobiology**, [s. l.], v. 56, n. 6, p. 613–672, 1998. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008298000604>>

VALLEE, B. L. Alcohol in human history. **Toward a Molecular Basis of Alcohol Use and Abuse**, [s. l.], v. 71, p. 1–8, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8032143>>[http://link.springer.com/10.1007/978-3-0348-7330-7\\_1](http://link.springer.com/10.1007/978-3-0348-7330-7_1)>

VASTOLA, B. J. et al. Nicotine-induced conditioned place preference in adolescent and adult rats. **Physiology & behavior**, [s. l.], v. 77, n. 1, p. 107–14, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12213508>>

VENGELIENE, V. et al. Neuropharmacology of alcohol addiction. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 154, n. 2, p. 299–315, 2008.

VEZINA, P.; LEYTON, M. Conditioned cues and the expression of stimulant sensitization in animals and humans. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 56 Suppl 1, p. 160–8, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18657553>>

VIALA-ARTIGUES, M. Histoire de l'alcool archéologie partie 1. **Paris : Fédération des Acteurs de l'Alcoologie et de l'Addictologie**, 2003. Disponível em:



<<http://www.alcoologie.org/Histoire-de-l-alcool-archeologie,118.html>>. Visitado em: 10 de fevereiro de 2017.

VIALOU, V. et al.  $\Delta$ FosB in brain reward circuits mediates resilience to stress and antidepressant responses. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 745–752, 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nn.2551>>

VOLKOW, N. D. et al. Addiction: Beyond dopamine reward circuitry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 108, n. 37, p. 15037–15042, 2011. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1010654108>>

WESTERMEYER, J. The Pharmacology of Alcohol and Alcohol Dependence. **American Journal of Psychiatry**, [s. l.], v. 155, n. 5, p. 704a–705, 1998. Disponível em: <<http://psychiatryonline.org/doi/abs/10.1176/ajp.155.5.704a>>

WISE, R. A. Catecholamine theories of reward: a critical review. **Brain research**, [s. l.], v. 152, n. 2, p. 215–47, 1978. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/354753>>

WISE, R. A. Dopamine, learning and motivation. **Nature reviews. Neuroscience**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 483–94, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15152198>>

WISE, R. A.; BOZARTH, M. A. A psychomotor stimulant theory of addiction. **Psychological Review**, [s. l.], v. 94, n. 4, p. 469–492, 1987. Disponível em: <<http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/0033-295X.94.4.469>>

WORLD HEALTH ORGANISATION. Global status report on alcohol and health 2014. **Global status report on alcohol**, [s. l.], p. 1–392, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health topics: substance abuse**. Disponível em: <[http://www.who.int/topics/substance\\_abuse/en](http://www.who.int/topics/substance_abuse/en)>. Acesso em: 04 de setembro de 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Statistics 2018- Monitoring Health for the SDG's (Sustainable development goals)**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272596/9789241565585-eng.pdf?ua=1>>

WRIGHT, J. M.; PEOPLES, R. W.; WEIGHT, F. F. Single-channel and whole-cell analysis of ethanol inhibition of NMDA-activated currents in cultured mouse cortical and hippocampal neurons. **Brain research**, [s. l.], v. 738, n. 2, p. 249–56, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8955520>>

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. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 26, n. 39, p. 9967–9974, 2006. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.2384-06.2006>>

# *Capítulo 1*

***“O progresso depende de nosso cérebro. A parte mais importante do nosso cérebro, o neocórtex, deve ser usada para ajudar os outros e não apenas para fazer descobertas”.***

***(Rita Levi-Montalcini)***

**Participação do córtex pré-frontal e do núcleo acumbens na  
reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo  
contexto**

***1 Introdução***

### 1.1 Recaída

A dependência de etanol é caracterizada por altas taxas de recaída, fato que dificulta o sucesso no tratamento do alcoolismo (FOX et al., 2007; SEO; SINHA, 2014; SINHA et al., 2009). A recaída pode ser definida como a retomada do uso da droga após longa série de respostas mal-adaptadas frente a estímulos ou fatores estressores, externos ou internos (MARLATT, 1996). Mesmo após períodos prolongados de abstinência, a exposição a estímulos associados ao uso da droga, fatores estressantes ou o próprio uso de pequenas quantidades da substância, podem desencadear forte desejo pela droga (fissura), aumentando a probabilidade de reicidiva ao uso dessa substância (SINHA; LI, 2007).

O ambiente associado ao uso da droga é um fator desencadeador importante na retomada do uso. Evidências da literatura demonstram que estímulos ambientais associados ao uso de drogas são capazes de evocar expectativa em relação a disponibilidade da droga e memórias associadas aos efeitos euforizantes promovidos por essas substâncias (EVERITT; ROBBINS, 2005; WEISS, 2005). As respostas condicionadas à esses estímulos podem ainda, ativar os mecanismos de recompensa encefálicos, promovendo a manutenção do consumo da droga, a evocação da fissura durante a abstinência e a precipitação da recaída (KENNY; KOOB; MARKOU, 2003; WEISS, 2005). Neste sentido, um estudo clínico demonstrou que 34% das recaídas em usuários de crack foram desencadeadas pela exposição desses indivíduos a estímulos relacionados ao uso dessa droga (WALLACE, 1989). Além disso, usuários de cocaína relataram aumento do desejo de usar a droga quando expostos à imagens e sons associados ao uso dessa substância (GARAVAN et al., 2000; KILGUS; PUMARIEGA, 1994; MODESTO-LOWE et al., 1997).

Em relação ao etanol, observações clínicas relatam que 80 a 95% dos alcoolistas recaem durante o tratamento da dependência, sendo a exposição do indivíduo a dicas ambientais, um dos principais fatores desencadeadores da recaída ao consumo da droga (BOOTHBY; DOERING, 2005; LUDWIG; STARK, 1974; LUDWIG; WIKLER, 1974; MCCUSKER; BROWN, 1991; MILLER; SANCHEZ-CRAIG, 1996; MONTI et al., 1993). Neste contexto,

estudos demonstram que a exposição a lugares, pessoas ou pistas previamente associadas ao uso de bebidas alcoólicas, evocam o desejo de usar a droga (fissura) e frequentemente promovem recaída em pacientes abstinentes (COLLINS; BRANDON, 2002; MODESTO-LOWE et al., 1997; O'BRIEN et al., 1992; STAIGER; WHITE, 1991).

Essas evidências demonstram que comportamentos de aprendizado associativo e memória estão presentes no desenvolvimento da dependência e na recaída ao uso das substâncias de abuso (VEZINA; LEYTON, 2009; WISE, 2004).

Em 1981, Wit e Stewart (1981) relataram que a injeção única de cocaína ou a exposição à dicas pareadas a autoadministração da droga, reinstalavam o comportamento de respostas na barra, após a extinção da autoadministração dessa substância em animais de laboratório (DE WIT; STEWART, 1981). Baseados nestas evidências e em estudos anteriores, Wit e Stewart validaram o modelo de reinstalação, que poderia ser utilizado para estudar os fatores envolvidos na recaída ao uso de substâncias (STEWART; DE WIT, 1987). No modelo proposto, a reinstalação da busca pela droga, referia-se à retomada do comportamento de autoadministração operante, por meio da exposição à própria droga ou a estímulos (estressores ou associados a administração da droga), após a extinção desse comportamento (STEWART; DE WIT, 1987).

O modelo de reinstalação da autoadministração é considerado bastante preditivo, pois os fatores que restabelecem a busca de drogas em animais de laboratório, também promovem a fissura e a recaída em humanos (BROWN et al., 1995; JAFFE et al., 1989; LUDWIG; STARK, 1974; O'BRIEN et al., 1992; SINHA, 2001).

Ao longo do tempo, baseados no modelo proposto por Wit e Stewart (1981), outros modelos foram desenvolvidos para se investigar os mecanismos neurobiológicos envolvidos na recaída induzida por estímulos ambientais previamente pareados ao uso de drogas (CROMBAG et al., 2008; EPSTEIN et al., 2006; SHAHAM et al., 2003). Dentre estes modelos, destacam-se: o modelo de reinstalação por dicas (discretas ou discriminativas), do inglês *cue-induced* (CHILDRESS et al., 1993; PERRY et al., 2014; SEE, 2002) e o modelo de reinstalação pelo contexto (*context-induced*, em inglês) (BOSSERT et al.,

2013; CROMBAG et al., 2008; CROMBAG; SHAHAM, 2002; SHAHAM et al., 2003).

O modelo de reinstalação da autoadministração de drogas induzida pelo contexto é conhecido como *ABA renewal* (BOUTON; KING, 1983; BOUTON; RICKER, 1994; CROMBAG; SHAHAM, 2002). Neste modelo, as dicas discretas (luz e som pareados com o recebimento do reforço) estão presentes em todas as fases do protocolo (treino, extinção e teste), permitindo que apenas os estímulos associados ao contexto promovam a reinstalação do comportamento. Dessa forma, o contexto modelaria o local de uso da droga, por exemplo, bares, boates ou outros ambientes nos quais as drogas são consumidas.

Neste procedimento, roedores são treinados a autoadministrarem uma substância de abuso em um determinado contexto (Contexto A). Ao longo das sessões de autoadministração, o efeito reforçador da droga é pareado aos aspectos visuais, táteis e sonoros deste contexto, que adquirem propriedades condicionadas. Em seguida, esse comportamento é extinto em um contexto com aspectos distintos do anterior (Contexto B), no qual os animais deixam de receber a substância de abuso. Quando os animais são expostos ao Contexto A (na ausência da droga), as respostas na barra ativa retornam, ou seja, os animais reinstalam a busca pela substância (BOUTON; KING, 1983; BOUTON; SWARTZENTRUBER, 1991). Dessa forma, estímulos previamente neutros adquirem propriedade de reforço condicionado que desencadeiam a busca por drogas (CROMBAG et al., 2008).

Através da utilização do modelo *ABA renewal*, Bossert e colaboradores (2011) demonstraram que a exposição ao contexto previamente associado a autoadministração de heroína foi capaz de reinstalar o comportamento de busca por essa substância (BOSSERT et al., 2011). Do mesmo modo, Cruz et al. (2014), mostraram que a procura por cocaína foi restabelecida após a exposição dos animais ao contexto previamente pareado à autoadministração dessa droga.

Burattini e colaboradores (2006) foram os primeiros a demonstrar, no modelo *ABA renewal*, que a exposição ao contexto associado à autoadministração de etanol era capaz de restabelecer a busca pelo etanol em ratos (ZIRONI et al., 2006). Desde então, diversos pesquisadores têm utilizado

esse modelo para investigar os mecanismos neurobiológicos da recaída ao uso de etanol desencadeada pelo ambiente (CHAUDHRI; SAHUQUE; JANAK, 2009; GEORGE; HOPE, 2017; MARCHANT et al., 2013; PALOMBO et al., 2017; WILLCOCKS; MCNALLY, 2013).

Esse modelo também pode ser utilizado para estudar as possíveis diferenças entre machos e fêmeas durante o treino da autoadministração, extinção e reinstalação da busca de etanol, uma vez que, essas evidências ainda são escassas e controversas na literatura (BECKER; KOOB, 2016; BERTHOLOMEY; NAGARAJAN; TORREGROSSA, 2016; RANDALL; STEWART; BESHEER, 2017). Neste sentido, Randall e colaboradores (2017) mostraram que ratos e ratas apresentaram número de respostas na barra ativa semelhante durante o teste de reinstalação da busca de etanol induzida por dicas discretas. Entretanto, quando o etanol foi disponibilizado, após a extinção, os machos apresentaram maior número de respostas do que as fêmeas (RANDALL; STEWART; BESHEER, 2017). Outro estudo mostrou que ratas adultas, mas não ratos, quando expostos cronicamente à corticosterona na adolescência, exibiram maior reinstalação da busca do etanol induzida por dicas discretas (BERTHOLOMEY; NAGARAJAN; TORREGROSSA, 2016). Contudo, nenhum estudo avaliou as respostas de ratos e ratas na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto.

### **1.2 Participação dos neuronal ensembles na recaída ao uso de drogas**

As associações contextuais relacionadas ao uso de drogas são combinações complexas de diferentes estímulos (visuais, táteis, sonoros, sensoriais e interoceptivos) e por isso a capacidade de armazenamento e de reconhecimento desse tipo de aprendizado associativo exige alto grau de discriminação neuronal (CRUZ et al., 2013; CRUZ; JAVIER RUBIO; HOPE, 2015).

Em 1909, Richard Semon propôs que os aprendizados associativos induziam alterações estruturais e moleculares nos neurônios, particularmente nas sinapses, de maneira robusta e persistentes. Essas alterações seriam responsáveis pela formação dos traços de memória (engramas), que quando ativados promoveriam a evocação da mesma (PAVÃO, 2014).



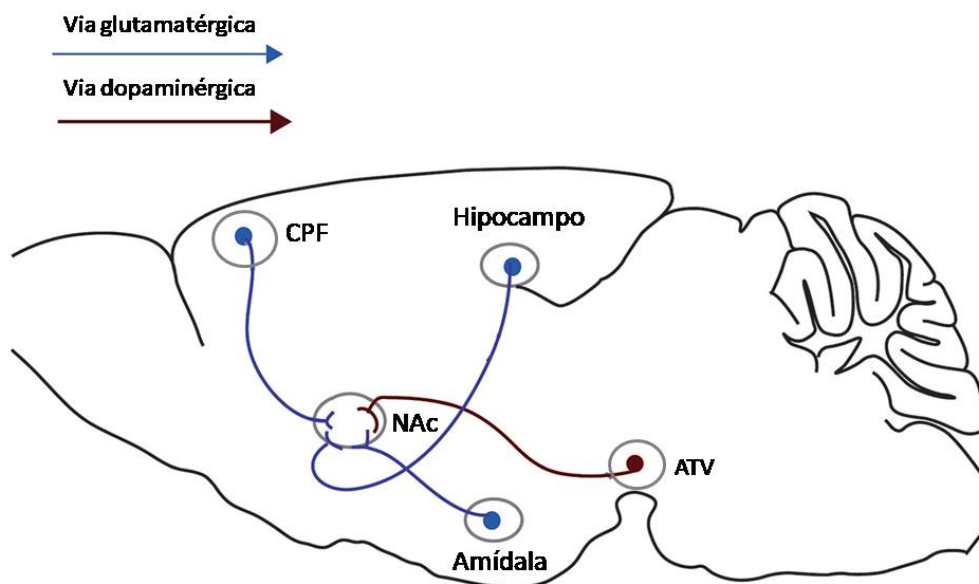
Essa observação foi posteriormente ampliada pela teoria dos *neuronal ensembles* proposta por Donald Hebb, que sugeriu que os aprendizados associativos seriam mediados por grupos neurais específicos, distribuídos pelo encéfalo e conectados entre si por meio de sinapses fortes. Com o avanço das técnicas moleculares e da neurociência, foi possível observar que os engramas, responsáveis pelo armazenamento e evocação de uma determinada memória, estavam representados nesses circuitos neurais propostos por Hebb, funcionando de maneira cooperativa nas diversas regiões encefálicas (NICOLELIS; FANSELOW; GHAZANFAR, 1997; PAVÃO, 2014; SCHWINDEL; MCNAUGHTON, 2011; TONEGAWA; MORRISSEY; KITAMURA, 2018). Portanto, as plasticidades sinápticas nesses grupos neurais específicos reforçariam a comunicação entre as regiões.

Estudos recentes têm demonstrado a participação desses conjuntos neurais específicos na reinstalação da busca por drogas (BOSSERT et al., 2011; CRUZ et al., 2013, 2014; FANOUS et al., 2012; GEORGE; HOPE, 2017). Por exemplo, Cruz, et al. (2014) demonstraram que apenas 3,4% dos neurônios 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. Essas evidências tem colaborado com o entendimento de como os animais respondem especificamente aos estímulos associados às drogas, em oposição aos estímulos não pareados, evocando respostas aprendidas, altamente específicas e dirigidas ao objetivo (GEORGE; HOPE, 2017).

### **1.3 Circuitos neurais envolvidos na recaída**

Os comportamentos associativos relacionados ao uso de drogas parecem envolver a participação de diversas regiões encefálicas (AMBROGGI et al., 2011; BOSSERT et al., 2013; LASSETER et al., 2010; MARCHANT et al., 2015; SCHOENBAUM; SHAHAM, 2008). Por exemplo, estudos demonstraram que estímulos ambientais (contexto, luzes, odor e sons) associados à administração de drogas e aos efeitos promovidos por essas substâncias, ativam grupos neurais específicos em regiões como o córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala (BOSSERT et al., 2011; FANOUS et al., 2012; GEORGE; HOPE, 2017; MARCHANT; HAMLIN; MCNALLY, 2009). Essas

regiões enviam projeções glutamatérgicas que convergem ao núcleo acumbens (MCFARLAND; LAPISH; KALIVAS, 2003; MCLAUGHLIN; SEE, 2003; STEFANIK et al., 2013; STEFANIK; KALIVAS, 2013; STEFANIK; KUPCHIK; KALIVAS, 2016; SUN; REBEC, 2003). No núcleo acumbens, essas projeções ativam seletivamente pequenos grupos neurais (CRUZ et al., 2014). Os sinais excitatórios no núcleo acumbens podem ainda, ser modulados por projeções dopaminérgicas provenientes da área tegmental ventral, aumentando a saliência aos estímulos associados ao uso (figura 2) (BOLAM et al., 2000; JONES et al., 2010; NICOLA; SURMEIER; MALENKA, 2000; PENNARTZ; GROENEWEGEN; LOPES DA SILVA, 1994; SESACK; GRACE, 2010).



**Figura 2.** Regiões encefálicas envolvidas nos comportamentos associativos relacionados ao uso de drogas e suas conexões. CPF (córtex pré-frontal), NAc (núcleo acumbens) e ATV (área tegmental ventral). Fonte: adaptado de (GARDONI; BELLONE, 2015).

Estudos clínicos mostraram que a fissura reportada por indivíduos dependentes, quando expostos a dicas associadas ao uso da droga, estava relacionada a maior atividade metabólica no córtex pré-frontal (BONSON et al., 2002; BREITER et al., 1997; GARAVAN et al., 2000; GRANT et al., 1996; SINHA; LI, 2007). Outros estudos, também sugerem que alterações estruturais, fisiológicas e funcionais no córtex pré-frontal facilitam a evocação da fissura e a

busca pelas drogas (EHRMAN et al., 1992; FOLTIN; HANEY, 2000; ROHSENOW et al., 2007).

Em roedores, o córtex pré-frontal é formado por diversas sub-regiões, incluindo o córtex cingulado anterior, pré-límbico, infralímbico e orbitofrontal, que podem executar funções distintas devido às suas conexões específicas (LASSETER et al., 2010). Com exceção do córtex orbitofrontal, as demais regiões formam o córtex pré-frontal medial (EUSTON; GRUBER; MCNAUGHTON, 2013; HEIDBREDE; GROENEWEGEN, 2003; MOORMAN et al., 2015), que em humanos é dividido em porção dorsal e ventral, baseado em suas funções e conectividade (BICKS et al., 2015; GASS; CHANDLER, 2013). O córtex pré-límbico e infralímbico de roedores corresponderiam a áreas específicas da porção dorsal e ventral, respectivamente, do córtex pré-frontal medial de humanos (BICKS et al., 2015; GASS; CHANDLER, 2013).

O córtex pré-frontal medial desempenha função importante nos processos de tomada de decisão (EUSTON; GRUBER; MCNAUGHTON, 2013). Entretanto, o uso repetido de drogas pode promover alterações na atividade dessa região, diminuindo sua ação inibitória sobre o comportamento de busca por drogas (BELIN et al., 2013; HAMPTON; BOSSAERTS; O'DOHERTY, 2006; URRY et al., 2006).

Estudos de neuroimagem mostraram que dicas relacionadas ao consumo de etanol aumentaram a ativação do córtex pré-frontal medial de alcoolistas (BÜHLER; MANN, 2011). No mesmo sentido, estudos imunohistoquímicos e funcionais sugerem a participação do córtex pré-frontal medial na reinstalação do comportamento de busca por drogas (BOSSERT et al., 2011; PALOMBO et al., 2017; PETERS; KALIVAS; QUIRK, 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). Recentemente, dados do nosso laboratório demonstraram que a inativação farmacológica dessa região atenuou a reinstalação da busca de etanol induzida pelo contexto (PALOMBO et al., 2017). Além disso, Willcocks e McNally (2013) demonstram que a inativação do córtex pré-frontal dorsomedial diminuiu a reinstalação do comportamento de busca por cervejas alcoólicas desencadeada pelo contexto.

Estudos de neuroimagem em humanos também mostraram que o uso compulsivo de drogas e a recaída, são mediados, pelo menos em parte, por plasticidades promovidas pelas drogas no córtex orbitofrontal (LONDON et al., 2000). Evidências em roedores, mostraram que a busca por cocaína ou heroína induzida por dicas ambientais foi acompanhada pelo aumento de marcadores de ativação neuronal nessa região (FANOUS et al., 2012; MORGAN; CURRAN, 1991; THOMAS; ARROYO; EVERITT, 2003). Além disso, foi demonstrado, em ratos, que a inativação reversível do córtex orbitofrontal diminui a reinstalação da autoadministração de cocaína e heroína induzida por dicas ambientais (FANOUS et al., 2012; FUCHS, 2004; LASSETER et al., 2009).

No mesmo sentido, estudos pré-clínicos também demonstram a participação do córtex orbitofrontal nos comportamentos relacionados à dependência de etanol. Por exemplo, Jupp et al. (2011) mostraram maior expressão de Fos no córtex orbitofrontal durante a reinstalação da busca de etanol induzida por dicas discretas. Outro estudo, observou aumento da expressão de delta-FosB (uma molécula que estudos sugerem estar envolvida na transição para a dependência) no córtex orbitofrontal de ratos cronicamente tratados com etanol (WATANABE et al., 2009). Entretanto, até o momento, nenhum estudo investigou a participação funcional do córtex orbitofrontal na reinstalação do etanol induzida pelo contexto.

É bem descrito na literatura, que o núcleo acumbens exerce função importante nos processos de recompensa e de associação aos estímulos condicionados ao uso de drogas (CHAUDHRI et al., 2010a; CORBIT; MUIR; BALLEINE, 2001; KATNER; WEISS, 1999; NICOLA, 2007). Por exemplo, estudos de neuroimagem em alcoolistas, mostraram que o aumento da atividade do núcleo acumbens estava relacionada à fissura e a recompensa promovida pelo uso de etanol (GRÜSSER et al., 2004; HEINZ et al., 2004).

A participação do núcleo acumbens também tem sido demonstrada nos modelos de reinstalação da autoadministração de drogas induzida por estímulos ambientais (CRUZ et al., 2014; DAYAS et al., 2007; STEFANIK; KUPCHIK; KALIVAS, 2016; XIE et al., 2012). Por exemplo, Cruz e colaboradores (2014) demonstraram que a inativação do núcleo acumbens atenuou a reinstalação da autoadministração de cocaína induzida pelo

contexto. Resultados similares foram observados por Xie et al. (2012), estes autores demonstraram que o bloqueio da transmissão glutamatérgica no centro e na concha do núcleo acumbens atenuou a reinstalação da autoadministração de cocaína induzida pelo contexto.

Ainda neste contexto, Dayas et al. (2007) observaram que exposição a dicas discriminativas associadas à autoadministração de etanol aumentou o número de células positivas para Fos tanto na concha como no centro do núcleo acumbens. Além disso, Chaudhri e colaboradores mostraram que a administração de baclofen+muscimol ou de um antagonista do receptor dopaminérgico D1, no centro e na concha do núcleo acumbens, reduziu a reinstalação da busca por etanol induzida pelo contexto (CHAUDHRI et al., 2010a; CHAUDHRI; SAHUQUE; JANAK, 2009).

Apesar de vários estudos terem investigado, separadamente, a importância de algumas regiões corticais e estriatais sobre o comportamento de reinstalação de busca de drogas induzido por estímulos ambientais, até o presente momento, nenhum estudo investigou a participação das projeções corticoestriatal na reinstalação do comportamento de busca ao etanol desencadeada pelo contexto.

Diante das evidências apontadas acima, nossa hipótese foi que o córtex orbitofrontal, o córtex pré-límbico e o núcleo acumbens, assim como as projeções entre essas regiões estariam envolvidas na reinstalação da busca do etanol induzida pelo contexto.

**2 Objetivos**

## **2.1 Objetivo geral**

O presente estudo teve como objetivo investigar a participação do córtex pré-límbico e orbitofrontal, do núcleo acumbens e das projeções corticoestriatais na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto previamente pareado a administração dessa substância.

## **2.2 Objetivos específicos**

- Verificar as diferenças entre ratos e ratas no protocolo de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo ambiente.

- Identificar o envolvimento de regiões corticais (córtex pré-límbico e orbitofrontal) e do núcleo acumbens (centro e concha) na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto.

- Quantificar a porcentagem de neuronal ensembles no córtex pré-límbico, orbitofrontal e núcleo acumbens (centro e concha) envolvidos na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pela exposição ao contexto.

- Avaliar funcionalmente a participação do córtex orbitofrontal e do centro do núcleo acumbens no comportamento de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pela exposição ao contexto.

- Identificar a participação de projeções corticais (orbitofrontal e pré-límbica) para o centro do núcleo acumbens na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto.

### *3 Materiais e métodos*



## 3.1 Animais

Foram utilizados ratos e ratas Long-Evans (200-300 g) 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 na Universidade de São Paulo (IFSC-USP), no mínimo 7 dias antes do início dos experimentos. Eles foram agrupados (n=4) em gaiolas de plástico, com 32 × 40 × 16 cm, e mantidos em condições controladas de umidade e temperatura (23±2 °C). Foram expostos ao ciclo claro-escuro invertido (ciclo 12/12 horas, luzes acesas às 19h) e tiveram livre acesso à alimento e água. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo-IFSC-USP (CEUA/IFSC nº 01/2015). Para o último experimento deste capítulo, foram utilizados ratos Long-Evans machos (250g) provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME). Os animais foram transferidos para o Biotério do Departamento de Farmacologia da UNIFESP - Campus de São Paulo, no mínimo 7 dias antes do início dos experimentos, e foram mantidos nas mesmas condições descritas anteriormente. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIFESP (CEUA/1592270616). Todos os experimentos foram conduzidos seguindo os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

## 3.2 Substâncias

- Sacarina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), diluída em água na concentração de 0,2% e 0,05% (p/v).
- Etanol (EtOH; Sigma-Aldrich, 96% v/v, St. Louis, MO, EUA) diluído em solução de sacarina ou água nas concentrações de 10% ou 20% (p/v).
- Megluminato de flunixinina (Schering-Plough) dissolvido em solução salina (NaCl 0,9 %) na concentração de 0,5 mg ml<sup>-1</sup>.
- Muscimol e Baclofen (Tocris; concentração 0,06 mM + 0,6 mM), dissolvidos em salina (NaCl 0,9 %).

- Estreptomicina e penicilina poliantibiótica (Pentabiotico®, Fort-Dogde, Brasil) dissolvidas em soro fisiológico estéril (NaCl 0,9 %) na concentração de 560 mg ml<sup>-1</sup>.

- Tribromoetanol (Sigma-Aldrich) dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%) na concentração de 2,5 mg em 100 ml.

### **3.3 Caixa de autoadministração operante**

Foram utilizadas caixas operantes de autoadministração (Med Associates®, St. Albans, VT, EUA). Cada caixa possui duas barras localizadas 9 cm acima do piso e lateralmente distantes (4,5 cm) do bebedouro central. As pressões na barra ativa (retrátil) acionam uma bomba de infusão (Razel, Stamford®, CT, EUA), liberando a solução de interesse no bebedouro central. As pressões na barra inativa (não retrátil) não resulta em nenhuma consequência programada. O registro das respostas operantes e subsequente disponibilidade da solução são controlados pelo programa MED\_PC\_IV, instalado no computador que se conecta as interfaces das caixas operantes. As caixas ficam individualmente alocadas dentro de armários de isolamento acústico feitos de madeira, com o objetivo de minimizar possíveis distúrbios ambientais (figura 3).



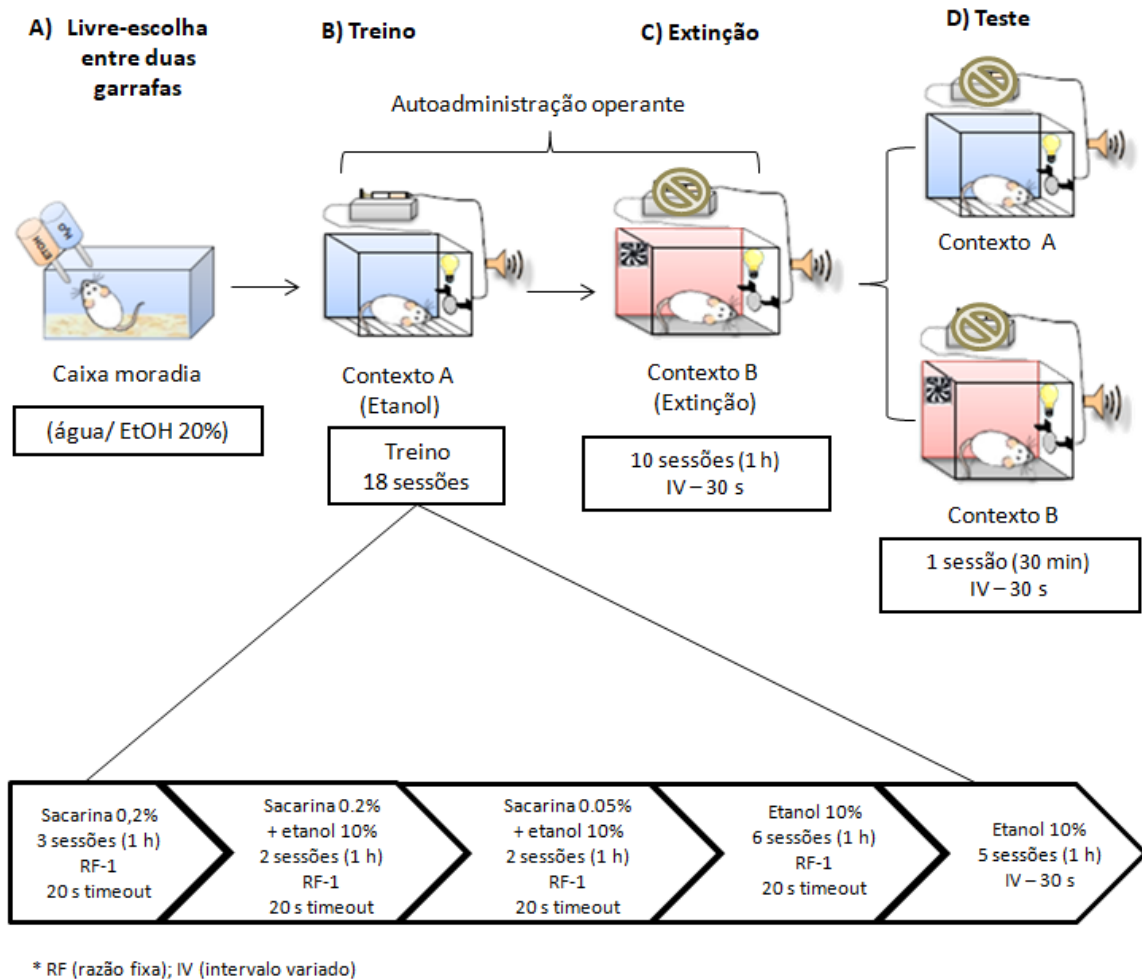
**Figura 3.** Caixa de autoadministração operante (Med Associates®, St. Albans, VT, EUA).

Foram estabelecidos dois contextos para os testes comportamentais, o Contexto A (treino da autoadministração de etanol) e o Contexto B (extinção da autoadministração de etanol), sendo eles contrabalanceados. Os contextos diferiam um do outro em relação a largura da grade do piso (estreita/larga), iluminação teto (luz branca/vermelha), ruído de fundo (ventilador ligado/desligado) e outros sinais visuais (adesivos presentes/ausentes; portas de armários abertas/fechadas). Esse protocolo foi adaptado de Marchant et al. (2013).

### **3.4 Procedimento comportamental**

O protocolo comportamental foi constituído de quatro fases: 1) teste de livre-escolha entre duas garrafas (5 dias); 2) treino da autoadministração operante (18 sessões); 3) extinção (10 sessões); 4) teste de reinstalação da busca de etanol induzida pelo contexto (1 sessão).

A sequência experimental foi: a) gaiola-moradia (consumo de solução de etanol na garrafa); b) Contexto A (treino da autoadministração operante); c) Contexto B (extinção); d) Contextos A e B (teste), conforme ilustrado na figura 4.



**Figura 4.** Representação esquemática do protocolo experimental e suas fases: A) livre-escolha entre duas garrafas; B) treino; C) extinção e D) teste.

### 3.4.1 Livre-escolha entre duas garrafas

Para que os animais se habituassem ao gosto do etanol eles foram expostos ao paradigma de livre-escolha entre duas garrafas, no qual eles tinham acesso à uma garrafa de água e outra garrafa de solução de etanol 20%, por um período de 24 horas durante 5 dias consecutivos na gaiola-morada.

### 3.4.2 Treino da autoadministração de etanol

Todas as sessões de treino da autoadministração foram realizadas no Contexto A. A resposta na barra ativa resultava no acionamento de dicas discriminativas por 2 s (luz branca de 7,5 W e som de intensidade de 2900 Hz e 20 dB), além da ativação da bomba de infusão e liberação de 0,1 ml do reforço no bebedouro central. Em seguida, a barra ativa tornava-se inativa por um

período de 10 s (*time-out*). As respostas na barra inativa não tinham consequências programadas.

O início de cada sessão era sinalizado pelo acionamento da luz do teto e inserção da barra ativa no painel da caixa.

Para a aquisição do comportamento de autoadministração, realizamos sessões diárias de 1 h em esquema de reforço de razão fixa 1 (RF-1). Nas 3 primeiras sessões, os ratos foram treinados a pressionarem a barra para receberem solução de sacarina 0,2%. Em seguida, passaram por 2 sessões nas quais as respostas eram reforçadas com solução de sacarina 0,2 % + etanol 10 % e outras 2 sessões reforçadas com solução de sacarina 0,05 % + etanol 10 %. Por fim, foram realizadas 6 sessões de 1 h em que cada pressão na barra ativa foi reforçada com uma solução contendo apenas etanol 10%. Após as sessões de treino em RF-1, os animais foram treinados a pressionarem a barra para receberem o reforço (solução de etanol 10%) em intervalo variável de 30 segundos (IV-30 s) por 5 sessões de 1 h. Nesse esquema de reforço, a barra ativa (após a liberação de um reforço), tornava-se inativa em intervalos variados de 1 a 59 segundos. Esse intervalo foi introduzido para aumentar o número de respostas na barra ativa.

### **3.4.3 Extinção das respostas na barra ativa**

A fase de extinção foi realizada no Contexto B. Utilizamos o mesmo protocolo de IV-30 s aplicado na última etapa do treino. A resposta na barra ativa resultava na apresentação das dicas discriminativas utilizadas no treino (som, luz e ativação da bomba), entretanto não havia liberação de nenhum reforço no bebedouro. As respostas nas barras ativas foram consideradas extintas quando os ratos pressionaram a barra menos de 25 % em relação à média de respostas apresentadas no treino em IV-30 s.

### **3.4.4 Teste de reinstalação induzida pelo contexto**

O teste foi realizado 24 horas após a última sessão de extinção e constituiu na avaliação do comportamento de busca pelo etanol (pressões nas barras ativas, nos mesmos parâmetros utilizados na extinção). A sessão teste foi realizada tanto no Contexto A, como no Contexto B, e teve a duração de 30

minutos. Durante o teste, a pressão na barra ativa não resultava na liberação de etanol.

### 3.5 Concentração de etanol no sangue

Imediatamente após o término da última sessão de treino, amostras de sangue (100 µL) foram coletadas a partir da ponta da cauda dos animais. As amostras de sangue foram centrifugadas (8.000 rpm por 10 min), e a concentração de etanol no soro foi determinada através do sistema enzimático baseado na análise do consumo de oxigênio durante a reação de etanol-acetaldeído (AM1 Analyzer; Analox Instruments Ltd, London, UK).

### 3.6 Cirurgia intracraniana

Realizamos as cirurgias intracranianas entre a 5ª e a 6ª sessão de treino em IV-30 s. Para tanto, ratos foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) e em seguida, receberam lidocaína 2 % (anestésico local) subcutaneamente na região do crânio do animal. Logo após, o crânio foi exposto e as cânulas guia de aço inoxidável (26 G, 12 mm de comprimento) foram implantadas bilateralmente, com o auxílio de um estereotáxico (Modelo 900, Kopf), 1 mm acima do local da administração intracraniana das substâncias.

No Experimento 3, as cânulas foram implantadas - de acordo com as coordenadas obtidas no atlas de Paxinos; Watson (2005) - no córtex orbitofrontal utilizando um ângulo de 10° e as seguintes coordenadas a partir do bregma: antero-posterior (AP), +3,2 mm; mediolateral (ML), +2.6 mm; dorsoventral (DV), -4.0 mm. No Experimento 4, as cânulas foram implantadas no centro do núcleo acumbens utilizando um ângulo de 6° e as seguintes coordenadas a partir do bregma: AP +1,7 mm; ML +2.5 mm; DV -6.0 mm.

As cânulas foram fixadas ao crânio com cimento acrílico e cinco parafusos de metal (3 mm). Após a cirurgia, os animais receberam uma mistura de antibióticos contendo estreptomicina e penicilina (560 mg ml<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup>, i.m.) para prevenir infecção e o anti-inflamatório não esteroideal megluminato de flunixinina (0,5 mg ml<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup>, s.c.) para analgesia pós-operatória. Os ratos tiveram 7 dias de recuperação antes de serem resubmetidos a mais duas sessões de treino em IV-30 s. Durante os primeiros 3 dias da fase de

recuperação, os ratos continuaram a receber o anti-inflamatório megluminato de flunixinina ( $0,5 \text{ mg ml}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ , s.c.), 1 vez ao dia.

### 3.7 Administração intracraniana dos fármacos

Quinze minutos antes do teste de reinstalação os animais receberam injeções intracraniana bilaterais de salina ou uma mistura de baclofen (0,6 mM) e muscimol (0,06 mM) (agonistas GABA<sub>B</sub> e GABA<sub>A</sub>, respectivamente). As injeções foram administradas usando uma bomba de infusão de fármacos (Harvard Apparatus) e seringas Hamilton de 2µl conectadas a tubos de polietileno (10 mm) acoplados com agulhas injetoras na extremidade. Os injetores foram implantados 1 mm abaixo da cânula. O volume das microinjeções foi de 0,5 µl por hemisfério com velocidade constante de 0,5 µl/min. Os microinjetores foram removidos 1 minuto após o término da infusão. Os fármacos e as doses foram baseados em estudos anteriores (BOSSERT et al., 2011; CRUZ et al., 2014; MARCHANT et al., 2014).

Ao final dos testes comportamentais, os ratos foram anestesiados profundamente com tribromoetanol ( $500 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.). Em seguida, os encéfalos foram perfundidos por perfusão cardíaca com 100 ml de solução de fosfato de sódio, seguido por 400 ml de paraformaldeído 4%. Logo após os encéfalos foram removidos, congelados e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, eles foram seccionados em fatias coronais de 40 µm com o auxílio de um criostato (Leica CM 1850). Os cortes, contendo as estruturas de interesse, foram coletados em lâminas de vidro, corados com cresil violeta (item 3.9) e cobertos com lamínula fixadas com Permount (Sigma). As secções foram examinadas em microscopia óptica para determinar a localização das cânulas.

### 3.8 Teste da sacarina

Para avaliar se a administração de baclofen + muscimol não causou prejuízos motores, parte dos animais foram submetidos à 2 sessões de treino de autoadministração operante de sacarina 0,2 % (FR-1, 1 h por dia). Quinze minutos antes da terceira sessão de autoadministração de sacarina, administramos baclofen + muscimol ou salina (como descrito anteriormente no item 3.7) e avaliamos o número de pressões na barra ativa e inativa.

Ao final do teste, os animais foram anestesiados, os encéfalos perfundidos, removidos, fatiados e corados para análise da posição da cânula.

### 3.9 Histologia

Ao final dos experimentos envolvendo microinjeção, os animais foram anestesiados e perfundidos com uma solução de paraformaldeído (4%). Os encéfalos foram removidos e seccionados em fatias coronais. Inicialmente, as fatias foram desidratadas em gradiente seriado de titulações crescentes de etanol (100%, 95%, 70%), permanecendo 3 minutos em cada titulação. Posteriormente, foram hidratadas (3 minutos) e transferidas para a solução de acetato de cresil violeta (3 minutos). Em seguida foram enxaguadas e desidratadas em gradiente seriado de titulações decrescentes de etanol (70%, 95%, 100%, 100%), 3 minutos por titulação. Por fim, permaneceram em Xilol (Labsynth®) por 10 minutos e foram cobertas com Permount (Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, EUA) e lamínulas. Os cortes foram examinados em microscopia óptica para determinar a localização das cânulas.

### 3.10 Injeção central do marcador retrógrado

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol ( $250 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.), colocados no estereotáxico e receberam uma microinjeção unilateral do marcador retrógrado de fluorescência vermelha (RetroBeads™ - LumaFluor Inc.) no centro do núcleo acumbens, utilizando um ângulo de  $6^\circ$  e as seguintes coordenadas a partir do bregma: AP +1,7 mm; ML +2.5mm ; DV -7.0 mm (PAXINOS; WATSON, 2005). A microinjeção foi realizada utilizando uma seringa Hamilton de 10  $\mu\text{l}$ , acoplada a um microinjetor automático (World Precision Instruments), conectado ao braço do estereotáxico. Foi infundido 0,5  $\mu\text{l}$  em uma taxa de 0,1  $\mu\text{l}/\text{min}$  e cinco minutos após o término da infusão a agulha injetora foi removida do local de injeção, para minimizar a difusão do marcador.

### 3.11 Imuno-histoquímica

Sessenta minutos após o teste comportamental, os ratos foram anestesiados profundamente com tribromoetanol ( $500 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.) e perfundidos intracardiacamente, com 100 ml de solução de fosfato de sódio



(PBS), seguido por 400 ml de paraformaldeído 4%. Os encéfalos foram pós-fixados em paraformaldeído durante 90 minutos e transferidos para solução de sacarose 30% em PBS a 4°C durante 2-3 dias. Posteriormente, os encéfalos foram congelados em gelo seco em pó por 1 hora e mantidos à -80°C até serem fatiados.

Os encéfalos foram seccionados no criostato em fatias coronais de 40 µm de espessura, sob temperatura de -15 a -20°C, seguindo-se as coordenadas estereotáxicas para ratos do atlas de Paxinos; Watson (2005): entre +4,2 e +2,76 mm para o córtex pré-frontal; e entre +2,2 e +1,0 mm para o núcleo acumbens.

As fatias coronais contendo as regiões encefálicas de interesse foram lavadas 3 vezes (10 minutos cada lavagem) com PBS 1X e em seguida incubadas em solução bloqueadora (soro de cabra 3% e Triton X-100 0,25% dissolvidos em PBS 1X) por uma hora à temperatura ambiente. Após o bloqueio as fatias foram incubadas com anticorpo anti-Fos (diluição 1:4000; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA; produzido em coelho), em solução bloqueadora por 24 horas à 4°C.

Após essa incubação, as fatias foram lavadas com PBS por 3 vezes (10 minutos cada lavagem) e incubadas com anticorpo secundário, biotilado anti-coelho (diluição 1:400; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) em PBS-Tx (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 (10 minutos cada lavagem) e incubadas por 1 hora em solução de avidina-biotina-peroxidase (ABC Elite kit, PK-6100; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), Triton X-100 0,5% e PBS 1X. Finalmente, as fatias foram lavadas 3 vezes (10 minutos cada lavagem) e incubadas em 3,3'-diaminobenzidina por aproximadamente 5 minutos. Na sequência foram lavadas 5 vezes (5 minutos cada lavagem), transferidas para solução de PBS e montadas em lâminas gelatinizadas (gelatina e alumínio-crômico). Quando secas as lâminas foram hidratadas em água destilada, em seguida desidratadas, em gradiente seriado de titulações crescentes de etanol (30%, 60%, 90%, 95% e 100%) e Xilol (Labsynth®), e finalmente, cobertas com Permount (Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, EUA) e lamínulas.

A imunomarcção de Fos foi capturada através de uma câmera (Axiocam 503 color – Zeiss) acoplada ao microscópio (Zeiss Axioskop 2). Foram capturadas imagens de 4 hemisférios por ratos e as células positivas para Fos foram contadas usando-se o programa *Zen 2 Pro*. O valor de células Fos positivas para cada animal representa a média de 4 hemisférios.

### 3.12 Imunofluorescência

Após o teste comportamental, os ratos foram anestesiados, perfundidos e seus encéfalos seccionados, conforme descrito no item 3.11.

As fatias contendo as regiões do córtex pré-frontal, córtex orbitofrontal e do núcleo acumbens foram lavadas com PBS por 5 vezes (5 minutos cada lavagem). Em seguida, os cortes foram submersos em tampão citrato de sódio (0,01 molar, pH 8,0) e colocados em banho maria na temperatura de 70°C por 20 min. Ainda na solução de citrato, os cortes foram removidos do banho e ficaram em temperatura ambiente por 30 min.

Posteriormente, os cortes foram lavados com PBS por 5 vezes (5 minutos cada lavagem) e colocados em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1% diluída em PBS, por 20 min.

Os cortes foram novamente lavados com PBS por 5 vezes (5 minutos cada lavagem) e incubados com anticorpo primário anti-Fos (diluição 1:2000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA; anti-coelho), anti-NeuN (1:2000, catálogo: MAB37, EMD Millipore; anti-camundongo), Tween 20 1%, leite em pó integral (Molico) 1%, diluídos em PBS 1X, por 48 h à 4°C. As fatias corticais pertencentes aos animais que haviam recebido a injeção do marcador retrógrado, foram incubadas somente com o anticorpo primário anti-Fos.

Na sequência, as fatias foram lavadas 5 vezes (5 minutos por lavagem) com PBS e incubadas com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (diluição 1:200, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA; anti-coelho), Alexa Fluor 568 (diluição 1:200, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA; anti-camundongo), Tween 20 1%, diluídos em PBS 1X, por 2 horas à temperatura ambiente. As fatias corticais que haviam sido incubadas apenas com anticorpo primário anti-Fos, foram incubadas somente com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488.

Por fim, as fatias foram lavadas 3 vezes (5 minutos por lavagem) com PBS. Na quarta lavagem, foi adicionado 1 µl de DAPI (marcador nuclear) nos pocinhos contendo PBS e foram realizadas outras 2 lavagens de 5 minutos

cada. Os cortes foram colocados em lâminas gelatinizadas, que depois de secas, foram cobertas com lamínulas com auxílio do *VectaShield hard-set mounting media* (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, EUA).

A fluorescência foi detectada através de uma câmera (Axiocam 503 color – Zeiss) acoplada ao microscópio Zeiss Axioskop 2 (Carl Zeiss Microscopy, LLC, Thornwood, NY, EUA). Foram capturadas imagens de 4 hemisférios por ratos e as células positivas foram contadas através do programa ImageJ. O valor de células positivas para cada animal representa a média dos 4 hemisférios.

### 3.13 Análise estatística

Os dados comportamentais das fases de treino da autoadministração de etanol, foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas. Os dados comportamentais do teste de reinstalação, foram analisados por meio da ANOVA bifatorial. Nos casos em que foram detectadas diferenças pela ANOVA, a análise prosseguiu com o teste *post-hoc* de Newman-Keuls. As medidas dependentes e fatores utilizados estão detalhados na seção resultados. Essas análises foram feitas com o auxílio do programa *Statistic StatSoft*.

Para as análises de correlação entre o número de reforços e a concentração de etanol no sangue, utilizamos a função de regressão linear e o coeficiente de Person, como auxílio do software *Graphpad Prism*.

O teste estatístico de Equações de Estimação Generalizadas (GEE) foi utilizado para a comparação das respostas comportamentais, entre machos e fêmeas, durante as sessões de treino e extinção da autoadministração operante. Esta análise nos permitiu avaliar o efeito do tempo e do sexo no número de reforços e respostas nas barras ativas e inativas nas diferentes fases da autoadministração. Para essa análise, utilizamos o software *SPSS Statistics 17*. Cinco períodos da autoadministração foram analisados, separadamente (treino com sacarina: sessões 1-3; treino com sacarina + etanol: sessões 4-7; treino com etanol/ RF-1: sessões 8-13; treino etanol/ IV-30 s: sessões 14-18 e 10 sessões de extinção).

Os dados moleculares e as diferenças sexuais no consumo de etanol foram analisados pela distribuição *t* de *Student*. Para essas análises utilizamos o programa *Statistic StatSoft*.

Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos em todas as análises.

*4 Delineamento experimental*

#### **4.1 Experimento 1 – Avaliação de diferenças entre ratos e ratas no protocolo de reinstalação da busca de etanol induzida pelo contexto**

Ratos e ratas foram subdivididos em dois grupos (A-B-B e A-B-A), para então serem submetidos ao protocolo descrito no item 3.4. Resumidamente, o grupo A-B-B (controle) foi submetido ao treino de autoadministração de etanol no contexto A, extinção no contexto B e teste de reinstalação no contexto B. O grupo A-B-A (reinstalação) foi submetido ao treino de autoadministração de etanol no contexto A, extinção no contexto B e teste de reinstalação no contexto A. O número de ratos por grupo no dia do teste foi: contexto B (6 machos e 7 fêmeas) e contexto A (7 machos e 6 fêmeas).

#### **4.2 Experimento 2 - Identificação da participação de regiões corticais (córtex orbitofrontal e pré-limbico) e do núcleo acumbens (concha e centro) na reinstalação da busca de etanol induzida pelo contexto**

Sessenta minutos após o término do teste de reinstalação do Experimento 1, os animais foram anestesiados profundamente com tribromoetanol (500 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), perfundidos e seus encéfalos removidos e seccionados para realização das técnicas de imunomarcagem da proteína Fos (marcador de ativação neuronal), conforme descrito no item 3.11, e imunofluorescência para a realização da dupla marcação das proteínas Fos e NeuN (marcador de neurônios), como descrito no item 3.12.

#### **4.3 Experimento 3 - Efeito da inibição farmacológica reversível do córtex orbitofrontal na reinstalação da busca do etanol induzida pelo contexto**

Ratos (n=15) e ratas (n=18) foram submetidos ao procedimento experimental descrito no item 3.4. Entretanto, após cinco sessões de treino em intervalo variado, os animais foram submetidos ao processo cirúrgico para a implantação de cânulas bilaterais no córtex orbitofrontal, conforme descrito no item 3.6. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em repouso, durante 5 dias, para recuperação. Ao término desse período, os ratos retornaram para as sessões de autoadministração. Foram realizadas mais 2 sessões de treino em intervalo variado, seguidas de 8 sessões de extinção. Quinze minutos antes do

teste de reinstalação, os animais receberam injeções de muscimol + baclofen (0,06 + 0,6 mM) ou salina (0,5 µl por lado) no córtex orbitofrontal e então foram testados conforme descrito no item 3.7. O número de ratos por grupo no dia do teste foi: salina - contexto B (n = 8); baclofen + muscimol - contexto B (n = 7); salina - contexto A (n = 7); baclofen + muscimol - contexto A (n = 11). Machos e fêmeas foram distribuídos proporcionalmente entre os grupos. O desenho experimental está representado na figura 5.

Para descartar a possibilidade de que o efeito do baclofen + muscimol no dia do teste tivesse sido ocasionado devido à impedimentos motores, 13 dos ratos testados anteriormente foram treinados a autoadministrarem solução de sacarina 0,2%, por dois dias. A capacidade motora dos animais em pressionar a barra foi avaliada no terceiro dia. Para isto, quinze minutos antes do início da terceira sessão de autoadministração de sacarina os animais receberam uma injeção de baclofen + muscimol no córtex orbitofrontal, e o número de respostas nas barras ativas e inativas forma avaliadas por 30 minutos (item 3.8).

Ao final dos experimentos, os ratos foram anestesiados com tribromoetanol (500 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) e seus encéfalos perfundidos e seccionados. Os cortes foram corados com cresil violeta e fotografados por meio de microscopia óptica para verificação da localização das cânulas (item 3.9).

<b>1 - Gaiola moradia</b>	<b>2 - Contexto A</b>				
5 dias	3 sessões RF-1	2 sessões RF-1	2 sessões RF-1	6 sessões RF-1	5 sessões IV-30 s
Livre escolha 2 garrafas Etanol 20% vs. água	Sacarina 0,2%	Sacarina 0,2% + Etanol 10%	Sacarina 0,05% + Etanol 10%	Etanol 10%	Etanol 10%

<b>3 - Cirurgia intracraniana</b>	<b>4 - Contexto A</b>	<b>5 - Contexto B</b>	<b>6- Teste</b>	<b>7- Teste sacarina</b>
	2 sessões IV-30 s  Etanol 10%	10 sessões IV-30 s  Condição de extinção	1 sessão IV-30 s  Condição de extinção no contexto A ou B	1 sessão RF-1  Sacarina 0,2% Independente contexto

**Figura 5.** Representação esquemática do desenho experimental utilizado nos Experimentos 3 e 4.

#### **4.4 Experimento 4 - Efeito da inibição farmacológica reversível do centro do núcleo acumbens na reinstalação da busca do etanol induzida pelo contexto**

Ratos (n=21) e ratas (n=15) foram submetidos ao procedimento experimental descrito no item 3.4. Entretanto, após cinco sessões de treino em intervalo variável, os animais foram submetidos ao processo cirúrgico para a implantação de cânulas bilaterais no centro do núcleo acumbens, conforme descrito no item 3.7. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em repouso e tratamento (5 dias) para recuperação. Ao término desse período, os ratos retornaram para as sessões de autoadministração. Foram realizadas mais 2 sessões de treino em intervalo variável, seguidas de 8 sessões de extinção. Quinze minutos antes do teste de reinstalação, os animais receberam injeções de muscimol + baclofen (0,06 + 0,6 mM) ou salina (0,5 µl por lado) no centro do núcleo acumbens e então foram testados conforme descrito no item 3.7. O número de ratos por grupo no dia do teste foi: salina - Contexto B (n = 9); baclofen + muscimol - Contexto B (n = 7); salina - Contexto A (n = 10); baclofen + muscimol - Contexto A (n = 10). Machos e fêmeas foram distribuídos proporcionalmente entre os grupos.

Para descartar a possibilidade de que o efeito de baclofen + muscimol no dia do teste tivesse sido ocasionado devido a impedimentos motores, 19 dos ratos testados anteriormente foram treinados a autoadministrarem solução de sacarina 0,2%, por dois dias. A capacidade motora dos animais em pressionar a barra foi avaliada no terceiro dia. Para isto, quinze minutos antes do início da terceira sessão de autoadministração de sacarina os animais receberam uma injeção de baclofen + muscimol no centro do núcleo acumbens, e o número de respostas nas barras ativas e inativas foram avaliadas por 30 minutos (item 3.8). O desenho experimental está representado na figura 5.

Ao final dos experimentos, os ratos foram anestesiados profundamente com tribromoetanol (500 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) e seus encéfalos foram perfundidos e seccionados. Os cortes foram corados com cresil violeta e fotografados por meio de microscopia óptica para verificação da localização das cânulas (item 3.9).



**4.5 Experimento 5 – Identificação da participação da via córtex pré-  
límbico - centro do núcleo acumbens e córtex orbitofrontal - centro do  
núcleo acumbens na reinstalação da busca de etanol induzida pelo  
contexto**

Para essa finalidade, utilizamos a técnica de dupla marcação de Fos + RB (red RetroBeads - marcador retrógrado de fluorescência vermelha). Assim, após a 9ª sessão de extinção, ratos machos receberam injeção de RB unilateralmente no centro do núcleo acumbens, conforme descrito no item 3.10. Após o período de recuperação pós-cirúrgica (7 dias), os animais foram submetidos a mais 3 sessões de extinção, para que as respostas na barra ativa atingissem o critério de extinção. O desenho experimental está representado na figura 6.

Sessenta minutos após o término do teste de reinstalação, os animais foram perfundidos, os encéfalos foram removidos, seccionados e armazenados a -80°C. Posteriormente, as fatias coronais contendo o córtex orbitofrontal e o córtex pré-límbico foram processados para a marcação de Fos, por meio da técnica de imunofluorescência, descrita no item 3.12. O número de ratos por grupo no dia do teste foi: Contexto B (n = 6) e Contexto A (n = 6).

1 - Gaiola moradia	2 - Contexto A				
5 dias	3 sessões RF-1	2 sessões RF-1	2 sessões RF-1	6 sessões RF-1	7 sessões IV-30 s
Livre escolha 2 garrafas Etanol 20% vs. água	Sacarina 0,2%	Sacarina 0,2% + Etanol 10%	Sacarina 0,05% + Etanol 10%	Etanol 10%	Etanol 10%

3 - Contexto B	4 - Cirurgia intracraniana	5 - Contexto B	6- Teste	7- Teste sacarina
9 sessões IV-30s		3 sessões IV-30s	1 sessão IV-30s	1 sessão RF-1
Condição de extinção	Condição de extinção	Condição de extinção no contexto A ou B	Sacarina 0,2% Independente contexto	

**Figura 6.** Representação esquemática do desenho experimental utilizado no Experimento 5.

**5 Resultados**

### **5.1 Experimento 1 - Avaliação de diferenças entre ratos e ratas no protocolo de reinstalação da busca de etanol induzida pelo contexto**

A figura **7A** e **B** representa as médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM) do número de respostas nas barras ativa e inativa e o número de reforços, respectivamente, durante a fase de treino no Contexto A, em ratos e ratas. Os animais mostraram comportamento operante consistente para a busca de etanol, uma vez que, aumentaram o número de respostas nas barras ativas quando expostos as sessões de treino em IV-30 s, quando comparado as sessões em RF-1. A figura **7C** representa as médias  $\pm$  EPM do número de respostas nas barras ativa e inativa durante as 10 sessões de extinção no Contexto B. Como esperado, o número de pressões na barra ativa diminuiu no decorrer das sessões.

Através do teste estatístico de Equações de Estimação Generalizadas, observamos aumento do número de respostas ( $b = 59,51$ ,  $p < 0,05$ ) e reforços ( $b = 32,93$ ,  $p < 0,05$ ), durante o treino com sacarina. Porém não houve, diferença significativa para o fator sexo e nenhuma interação significativa entre os fatores sexo e tempo foi observada.

No treino de sacarina + EtOH também observamos efeito significativo nas pressões da barra ativa ( $b = -11,42$ ,  $p < 0,05$ ) e nos reforços ( $b = -5,36$ ,  $p < 0,001$ ) ao longo do tempo. Os animais diminuíram o número de respostas na barra ativa e de reforços ao longo das sessões. Não houve diferença estatística para o fator sexo, e nenhuma interação significativa entre sexo e tempo foi demonstrada.

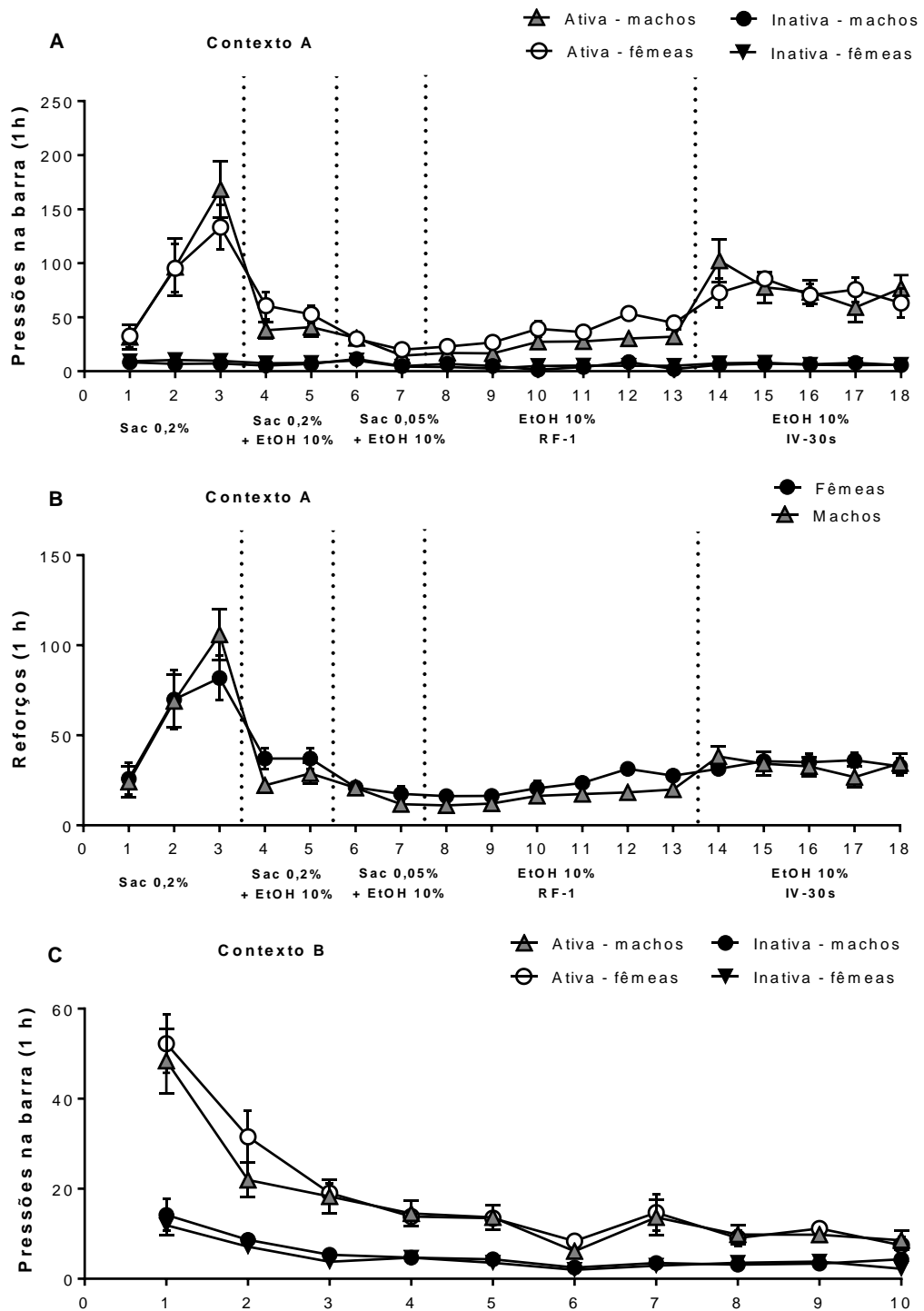
Durante as sessões de EtOH em RF-1 observamos que as respostas na barra ativa diferiram ao longo do tempo ( $b = 4,18$ ,  $p < 0,05$ ) e conforme o sexo ( $b = 11,78$ ,  $p < 0,05$ ). Demonstrando assim, maior número de respostas na barra ativa nas fêmeas, quando comparadas aos machos, durante as sessões de treino em RF-1. Além disso, houve efeito significativo do tempo ( $b = 1,89$ ,  $p < 0,003$ ) e do sexo ( $b = 6,58$ ,  $p < 0,001$ ) para o número de reforços; indicando que ratos e ratas aumentaram o número de reforços durante o treino de EtOH em RF-1 e que as fêmeas apresentaram maior número de reforços quando comparadas aos machos. Também observamos interação significativa entre sexo e tempo para o número de respostas nas barras inativas ( $b = -0,85$ ,  $p$

<0,02), indicando que as ratas pressionaram menos a barra inativa do que os ratos.

Para as sessões em IV-30 s observamos apenas efeito do tempo ( $b = -5,03$ ,  $p < 0,05$ ) nas pressões da barra ativa, demonstrando diminuição do número de respostas durante as sessões. Não houve diferença estatística para o fator sexo, assim como não houve interação significativa entre sexo e tempo.

No decorrer das sessões de extinção, houve efeito significativo do tempo nas pressões da barra ativa ( $b = -3,76$ ,  $p < 0,05$ ) e inativa ( $b = -0,86$ ,  $p < 0,001$ ). Mostrando que os animais diminuíram o número de respostas em ambas as barras. Não houve diferença estatística para o fator sexo, assim como não houve interação significativa entre os fatores sexo e tempo.

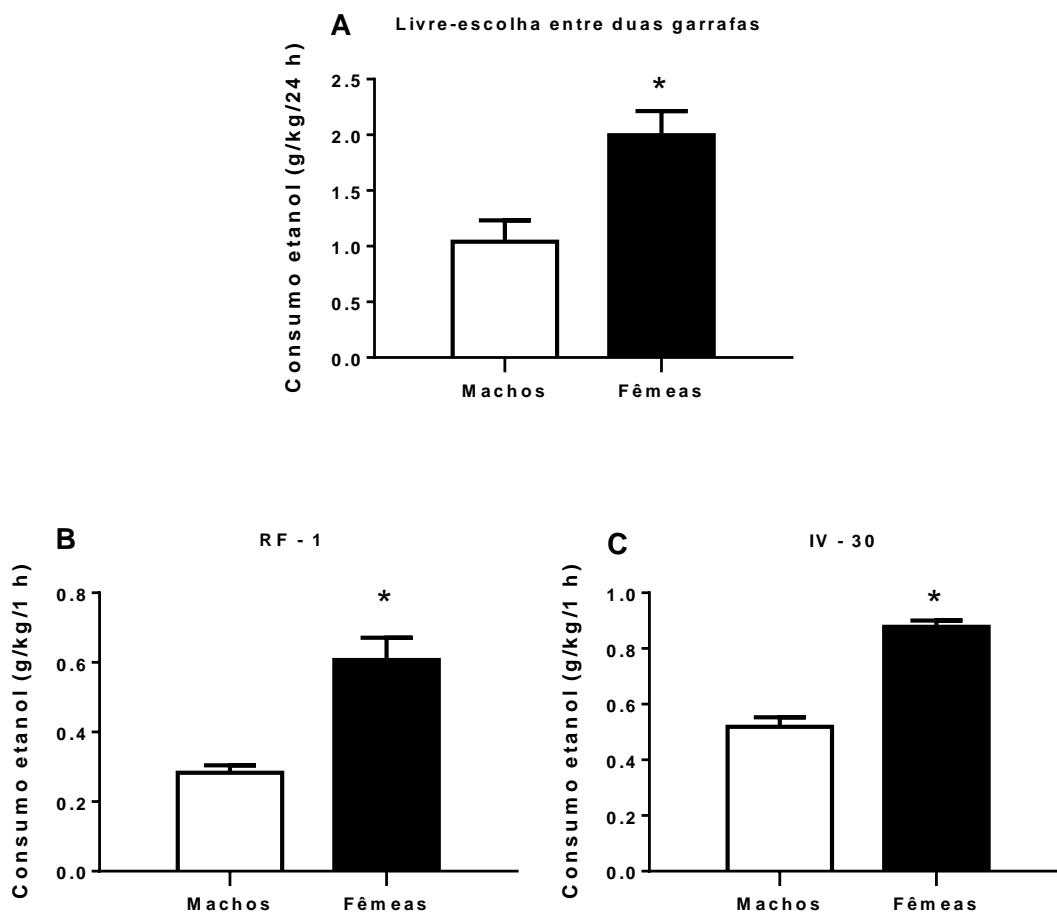
Em resumo, os dados mostraram que as respostas e reforços durante a autoadministração, nas sessões de sacarina, sacarina + etanol, etanol (IV-30 s) e extinção, não diferiram significativamente entre ratos e ratas. No entanto, durante o treino da autoadministração de etanol em RF-1, as ratas mostraram maior número de reforços e de respostas na barra ativa para o etanol quando comparadas aos ratos.



**Figura 7.** Comparação entre ratos e ratas durante o treino e a extinção da autoadministração de etanol. **(A)** Número de respostas nas barras ativa e inativa, de ratos e ratas, durante o treino da autoadministração no Contexto A. **(B)** Número de reforços, de ratos e ratas, durante o treino da autoadministração no Contexto A. **(C)** Número de respostas nas barras ativa e inativa, de ratos e ratas, durante as sessões de extinção conduzidas na ausência de etanol, no Contexto B. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n=13 por grupo).

A figura 8 representa as médias  $\pm$  EPM do consumo de etanol (g/kg) durante: o teste de livre-escolha entre duas garrafas (Fig. 8A), a autoadministração operante em RF-1 (Fig. 8B) e a autoadministração operante em IV-30 (Fig. 8C).

O consumo de etanol foi maior nas fêmeas, quando comparadas aos machos, tanto no teste de livre escolha das garrafas ( $t_{(8)} = -3,29$ ;  $p < 0,05$ ) quanto no treino de autoadministração de etanol em RF-1 ( $t_{(10)} = -4,77$ ;  $p < 0,05$ ) e IV-30 s ( $t_{(8)} = -8,74$ ;  $p < 0,05$ ) (figura 8).

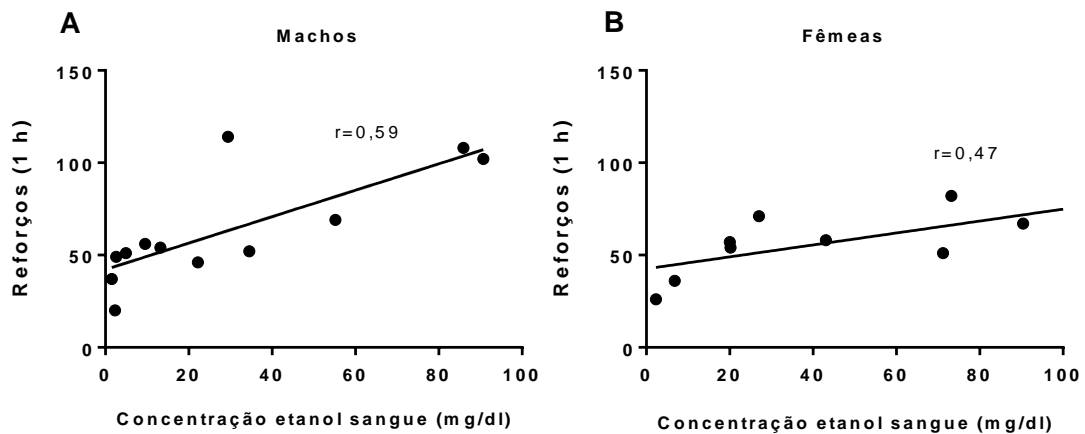


**Figura 8.** Consumo de etanol em ratos e ratas. **(A)** Consumo total de etanol (g/ kg/ 24 h) no modelo de livre-escolha entre duas garrafas (água e EtOH 20%) durante 5 dias. Consumo total de etanol (g /kg/ 1 h) durante as diferentes programações da autoadministração de etanol 10%: **(B)** razão fixa 1 (RF-1) - 6 sessões e **(C)** intervalo variado (IV-30) - 5 sessões. Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* diferente dos machos,  $p < 0,05$  ( $n=10-13$  por grupo).

Para a análise da alcoolemia, amostras de sangue (100  $\mu$ l) foram coletadas da ponta da cauda dos ratos e ratas, imediatamente após o término da última sessão de treino. A figura 9A e 9B mostram a correlação entre o

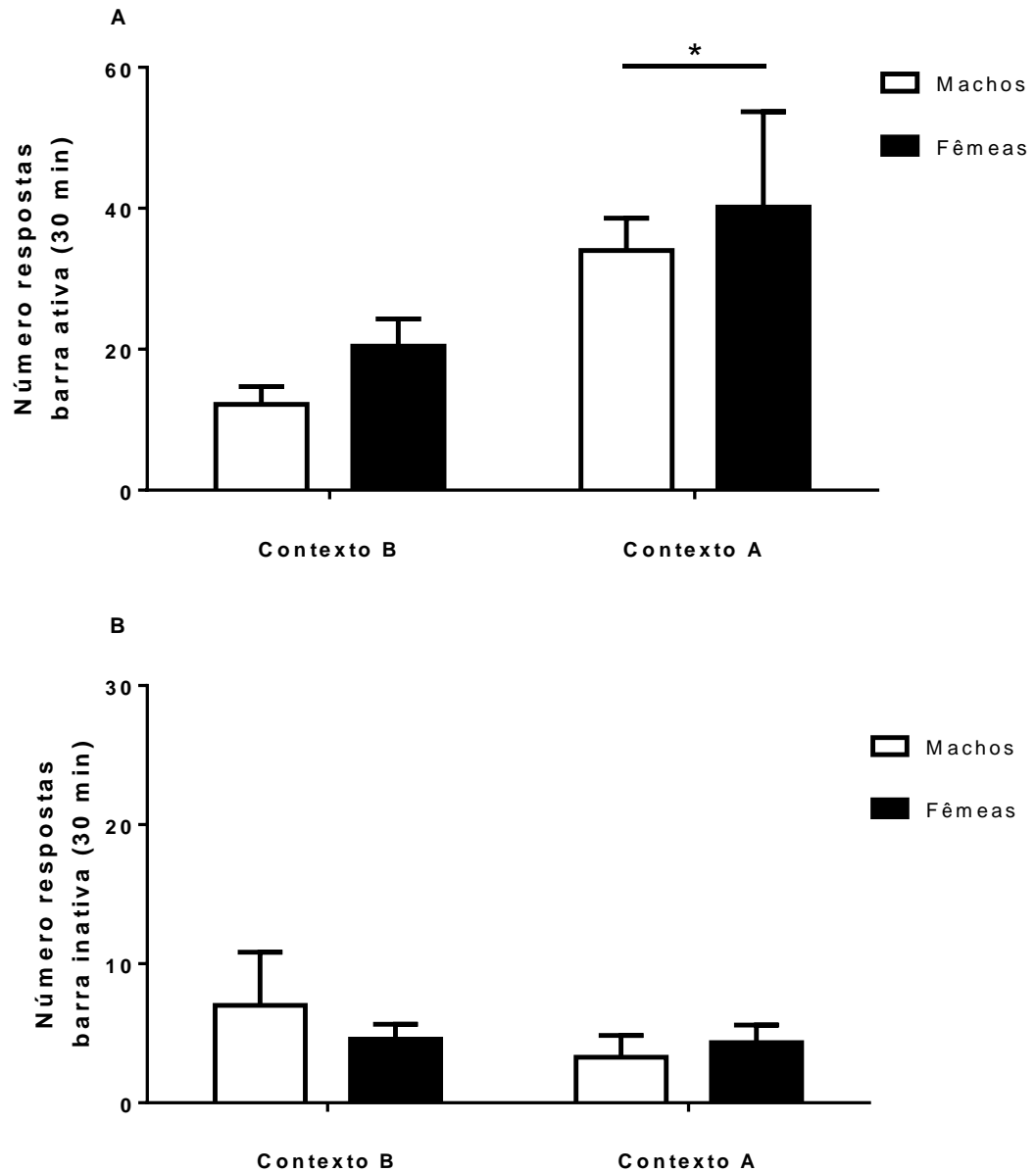
número de reforços obtidos durante a última sessão de treino em IV-30 e a concentração de etanol no sangue de ratos e ratas, respectivamente.

Observamos correlação significativa entre o número de reforços e a concentração de etanol no sangue, tanto em machos ( $r = 0,59$ ;  $p < 0,05$ ), como em fêmeas ( $r = 0,47$ ;  $p < 0,05$ ) (figura 9).



**Figura 9.** Concentração de etanol no sangue de ratos e ratas. Correlação entre o número de reforços durante a última sessão de treino em IV-30 e a concentração de etanol no sangue nos (D) ratos ( $r=0,59$ ;  $p < 0,05$ ) e (E) ratas ( $r=0,47$ ;  $p < 0,05$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* diferente dos machos,  $p < 0,05$  ( $n=10-13$  por grupo).

No dia do teste, avaliamos a reinstalação do comportamento de busca ao etanol através da avaliação das pressões na barra ativa (não reforçada) no Contexto A e no Contexto B. A figura 10A e 10B mostra a média  $\pm$  EPM do número de pressões nas barras ativa e inativa, respectivamente, durante o teste em ratos e ratas. Em relação as respostas na barra ativa, ANOVA bifatorial indicou diferença significativa entre o fator contexto (A, B:  $F_{1,22} = 8,50$ ,  $p < 0,05$ ), mas não entre o fator sexo (machos, fêmeas:  $F_{1,22} = 1,02$ ,  $p > 0,05$ ). Também não houve interação significativa entre os fatores contexto e sexo ( $F_{1,22} = 0,02$ ,  $p > 0,05$ ). Os resultados indicaram que a exposição ao Contexto A, mas não ao Contexto B, aumentou o número de pressões na barra ativa (não reforçada), independentemente do sexo.



**Figura 10.** Comparação entre ratos e ratas na reinstalação do comportamento de busca ao etanol associada ao contexto. Número de respostas nas barras **(A)** ativa e **(B)** inativa dos animais expostos ao Contexto B ou ao Contexto A, durante o teste de reinstalação. Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* diferente do Contexto B,  $p < 0,05$  ( $n=6-7$  por grupo).

Para avaliar se a diferença entre ratos e ratas observada durante o treino de etanol em RF-1 poderia influenciar o teste de reinstalação, realizamos o teste estatístico ANCOVA de duas vias, considerando os fatores contexto (A, B), sexo (machos, fêmeas) e a covariável da média das pressões na barra ativa durante os 6 dias em RF-1. A análise não revelou interação significativa entre os fatores contexto e sexo ( $F_{1,21} = 0,012$ ,  $p > 0,05$ ). Assim, podemos inferir que



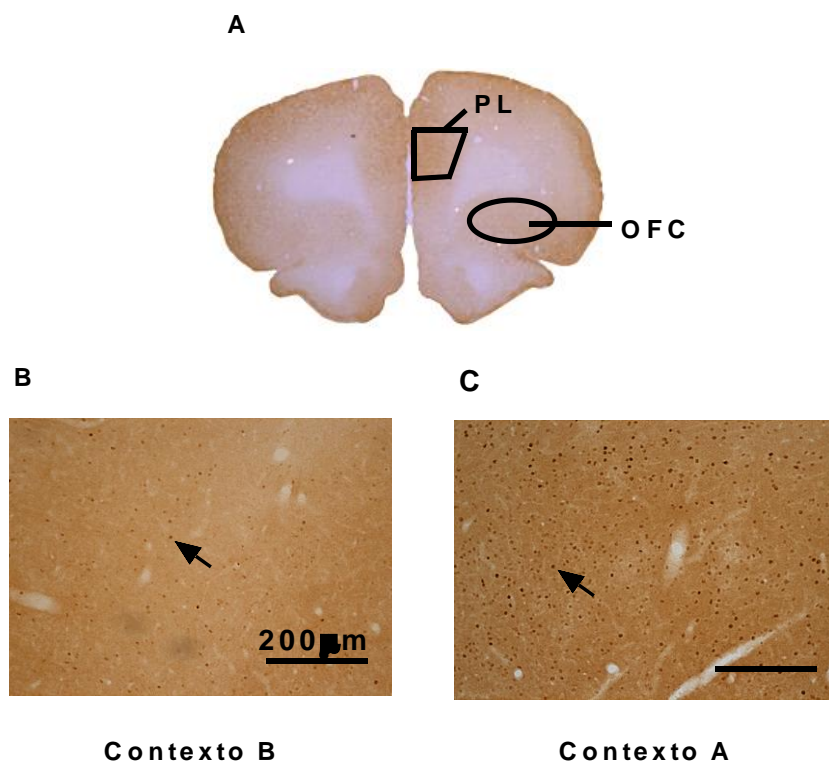
as respostas dos ratos e ratas durante o treino de etanol em RF-1 não influenciaram as pressões na barra ativa no dia do teste de reinstalação.

Como não foram observadas diferenças significativas entre machos e fêmeas no teste de reinstalação, agrupamos os animais para análise de imunohistoquímica (Experimento 2).

### 5.2 Experimento 2 - Identificação da participação de regiões corticais (córtex orbitofrontal e pré-limbico) e do núcleo acumbens (concha e centro) na reinstalação da busca de etanol induzida pelo contexto.

Avaliamos a ativação neuronal de regiões corticais (córtex orbitofrontal e pré-limbico) e do núcleo acumbens (concha e centro), através da contagem de células positivas para a proteína Fos ao final do teste de reinstalação da busca de etanol induzida pelo contexto.

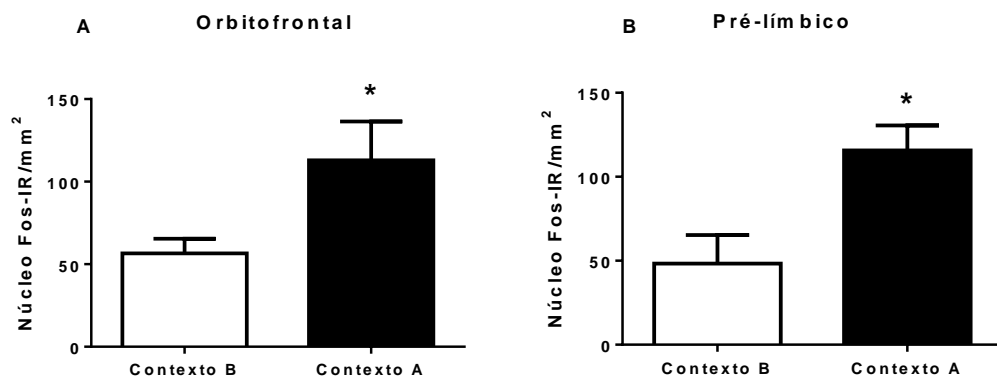
A figura 11 mostra a região do córtex orbitofrontal e do córtex pré-limbico utilizadas para quantificar as células positivas para Fos e também cortes representativos indicando a marcação positiva da proteína Fos no córtex orbitofrontal dos animais expostos ao Contexto B ou ao Contexto A.



**Figura 11. (A)** Área usada para quantificar os núcleos positivos para Fos no córtex orbitofrontal e pré-límbico de ratos. Cortes representativos mostrando a marcação positiva da proteína Fos no córtex orbitofrontal de animais expostos ao **(B)** Contexto B **(C)** ou ao Contexto A no dia do teste de reinstalação (aumento de 100X). As setas sinalizam células positivas para a proteína Fos.

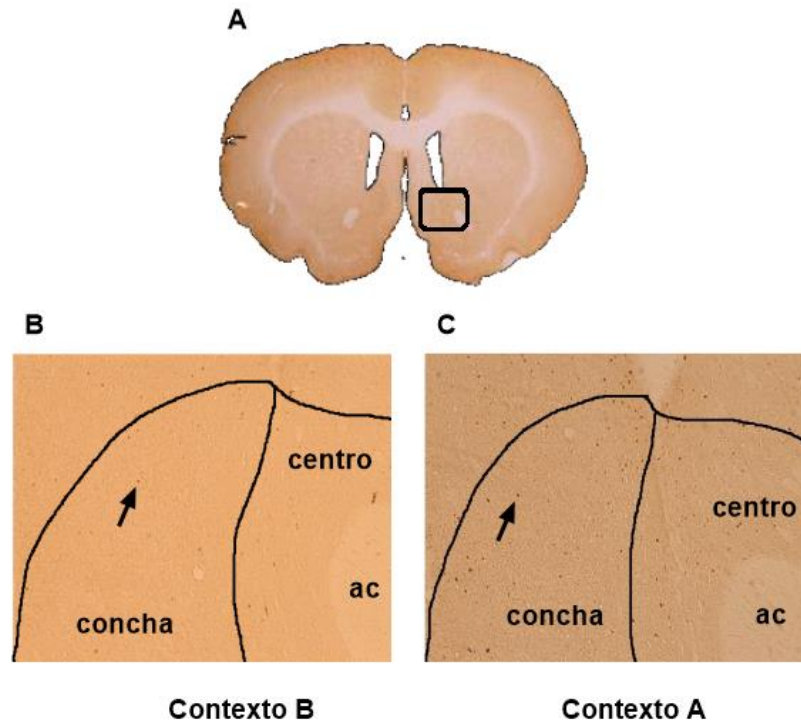
A exposição ao contexto associado ao etanol (Contexto A) aumentou o número de núcleos imunorreativos para Fos (Fos-IR) no córtex orbitofrontal quando comparado ao Contexto B ( $t_{(10)} = 2,23$ ;  $p < 0,05$ ) (figura **12A**).

Observamos também maior ativação do córtex pré-límbico após a exposição dos animais ao Contexto A quando comparado ao Contexto B ( $t_{(10)} = 2,98$ ;  $p < 0,05$ ). A figura **12B** mostra o aumento do número de núcleos positivos para Fos-IR no córtex pré-límbico dos animais que foram expostos ao Contexto A.



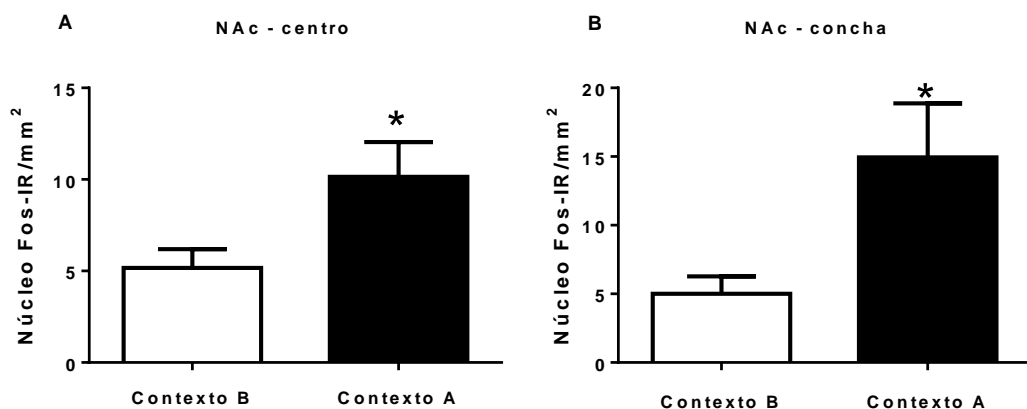
**Figura 12.** A reinstalação da busca ao etanol induzida pelo contexto foi associada à indução de Fos no córtex orbitofrontal e pré-límbico. Número de núcleos Fos-IR por mm<sup>2</sup> no **(A)** córtex orbitofrontal e **(B)** córtex pré-límbico. Os dados representam a média ± EPM. \* diferente do Contexto B,  $p < 0.05$  ( $n=6$  por grupo).

A figura 13 mostra a região do núcleo acumbens utilizada para quantificar as células positivas para Fos e também cortes representativos indicando a marcação positiva da proteína Fos no centro e na concha do núcleo acumbens dos animais expostos aos contextos A ou B.



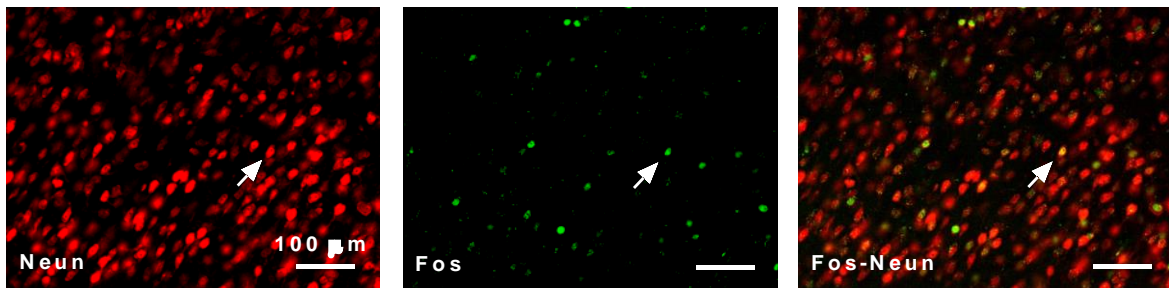
**Figura 13.** (A) Área usada para quantificar os núcleos positivos para Fos no núcleo acumbens de ratos. Cortes representativos indicando a marcação positiva da proteína Fos no centro e na concha do núcleo acumbens de animais expostos ao (B) Contexto B (C) ou ao Contexto A no dia do teste de reinstalação (aumento de 100X). \*ac (comissura anterior). As setas sinalizam células positivas para a proteína Fos.

A figura 14 mostra aumento do número de núcleos Fos-IR tanto no centro ( $t_{(17)} = 2,37$ ;  $p < 0,05$ , **Fig. 14A**), como na concha ( $t_{(18)} = 2,40$ ;  $p < 0,05$ , **Fig. 14B**) do núcleo acumbens nos animais que foram expostos ao Contexto A, quando comparados aos que foram expostos ao Contexto B.



**Figura 14.** A reinstalação da busca ao etanol induzida pelo contexto foi associada ao aumento de células positivas para Fos no núcleo acumbens. Número de núcleos Fos-IR por mm<sup>2</sup> no (A) centro e na (B) concha do núcleo acumbens (NAc). Os dados representam a média ± EPM. \* diferente do Contexto B,  $p < 0,05$  (n=9-10 por grupo).

Determinamos a percentagem de neurônios positivos para Fos utilizando a técnica de dupla marcação para Fos e NeuN, por imunofluorescência. O cálculo da porcentagem de ativação neuronal foi feito através da seguinte fórmula: [(número de células positivas para Fos / número células positivas para de NeuN) \* 100]. A figura 15 ilustra um corte representativo para a marcação de Fos e NeuN e também para a dupla marcação (Fos-NeuN).



**Figura 15.** Cortes representativos mostrando a marcação de (A) NeuN e de (B) Fos e a (C) dupla marcação de Fos-NeuN (aumento de 200X). As setas sinalizam células positivas para as proteínas NeuN, Fos e dupla marcação Fos/NeuN, respectivamente.

A dupla marcação para Fos e para o marcador neuronal geral (NeuN), indicou que apenas uma pequena percentagem de neurônios foi ativada após o teste de reinstalação. As percentagens podem ser observadas na tabela 2.

**Tabela 2.** Porcentagem de ativação neuronal nos diferentes contextos e regiões encefálicas. Os valores representam a média  $\pm$  EPM da porcentagem ( $n = 4-6$  animais por grupo) de células ativadas em diferentes áreas encefálicas: córtex pré-límbico, córtex orbitofrontal e núcleo acumbens (centro e concha).

Grupos	Córtex (%)		Núcleo acumbens (%)	
	Orbitofrontal	Pré-límbico	Centro	Concha
<b>Contexto B</b>	13,8 $\pm$ 3,4	5,6 $\pm$ 0,9	4,2 $\pm$ 0,4	6,4 $\pm$ 0,2
<b>Contexto A</b>	15,8 $\pm$ 4,2	6,4 $\pm$ 0,4	10,0 $\pm$ 0,1*	7,3 $\pm$ 1,2

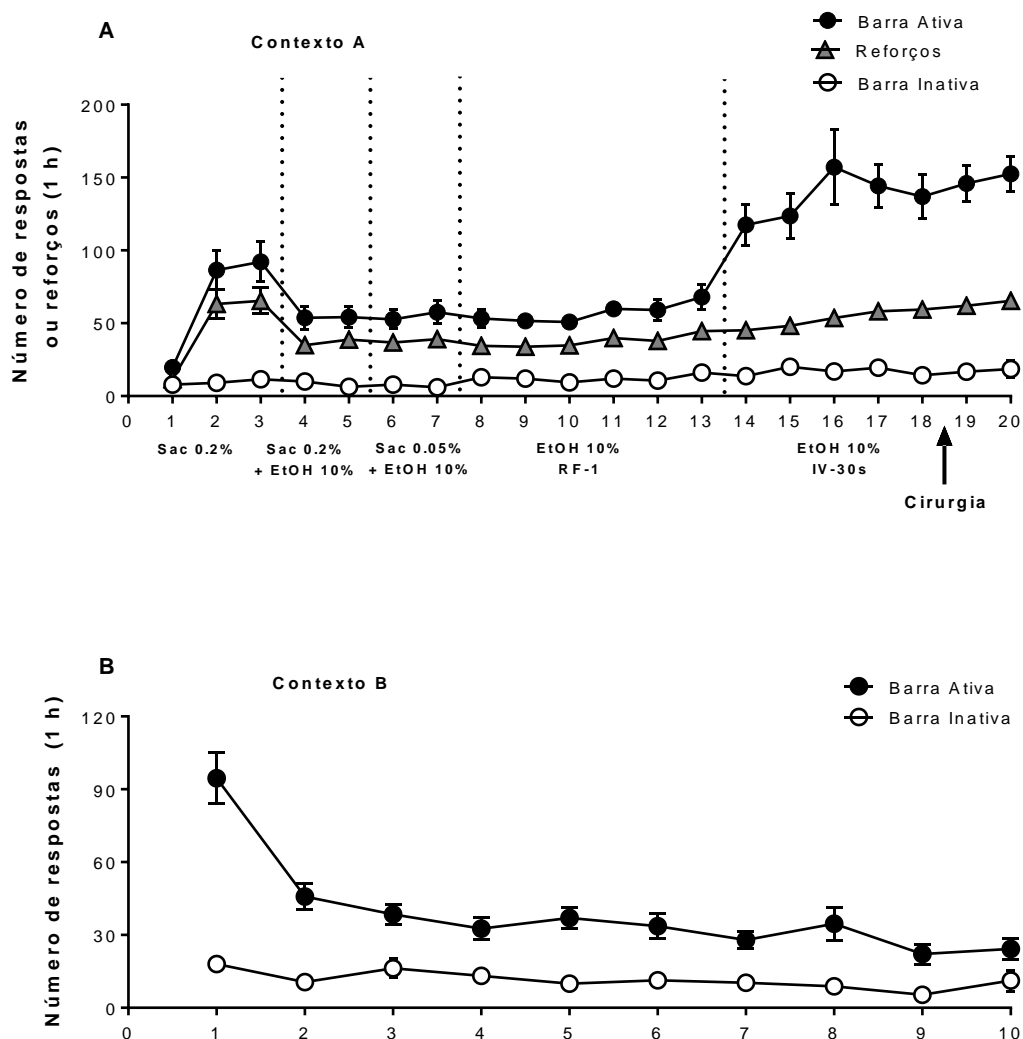
\* diferente do respectivo grupo controle (Contexto B),  $p < 0,05$ .

### 5.3 Experimento 3 - Efeito da inibição farmacológica reversível do córtex orbitofrontal na reinstalação da busca do etanol induzida pelo contexto

A figura 16A mostra a média  $\pm$  EPM do número de reforços e das respostas nas barras ativa e inativa durante a fase de treino da autoadministração no Contexto A. Analisamos o número de respostas na barra ativa e inativa durante as sessões de treino de etanol em RF-1 e IV-30 s.

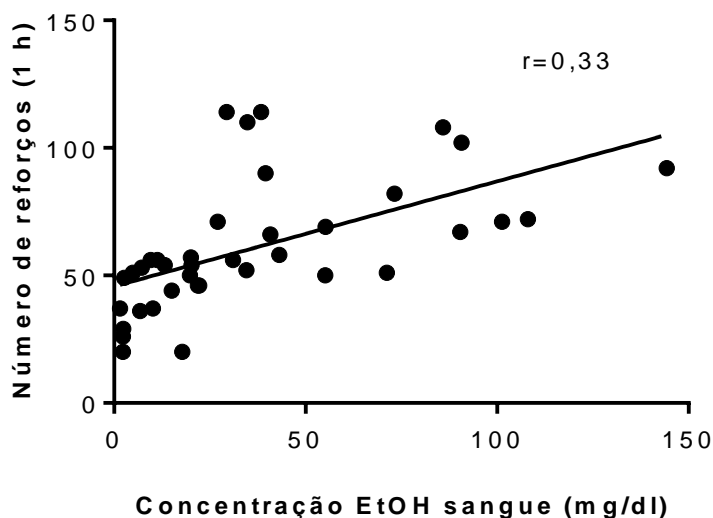
ANOVA de medidas repetidas indicou diferença significativa para o fator barra (ativa, inativa:  $F_{1,10} = 768,8$ ,  $p < 0,05$ ) e também para o fator esquema de reforço (RF-1, IV-30 s:  $F_{1,10} = 310,7$ ,  $p < 0,05$ ). Além disso, observamos interação significativa entre os fatores ( $F_{1,10} = 241,0$ ,  $p < 0,05$ ). Os ratos demonstraram autoadministração consistente de etanol, evidenciada pelo maior número de pressões na barra ativa do que na barra inativa e também pelo aumento do número de respostas na barra ativa, nas sessões de IV-30 s, quando comparada as sessões de RF-1.

A figura 16B representa a média  $\pm$  EPM do número de respostas nas barras ativa e inativa durante as 10 sessões de extinção no Contexto B. Como esperado, o número de pressões na barra ativa diminuiu no decorrer das sessões.



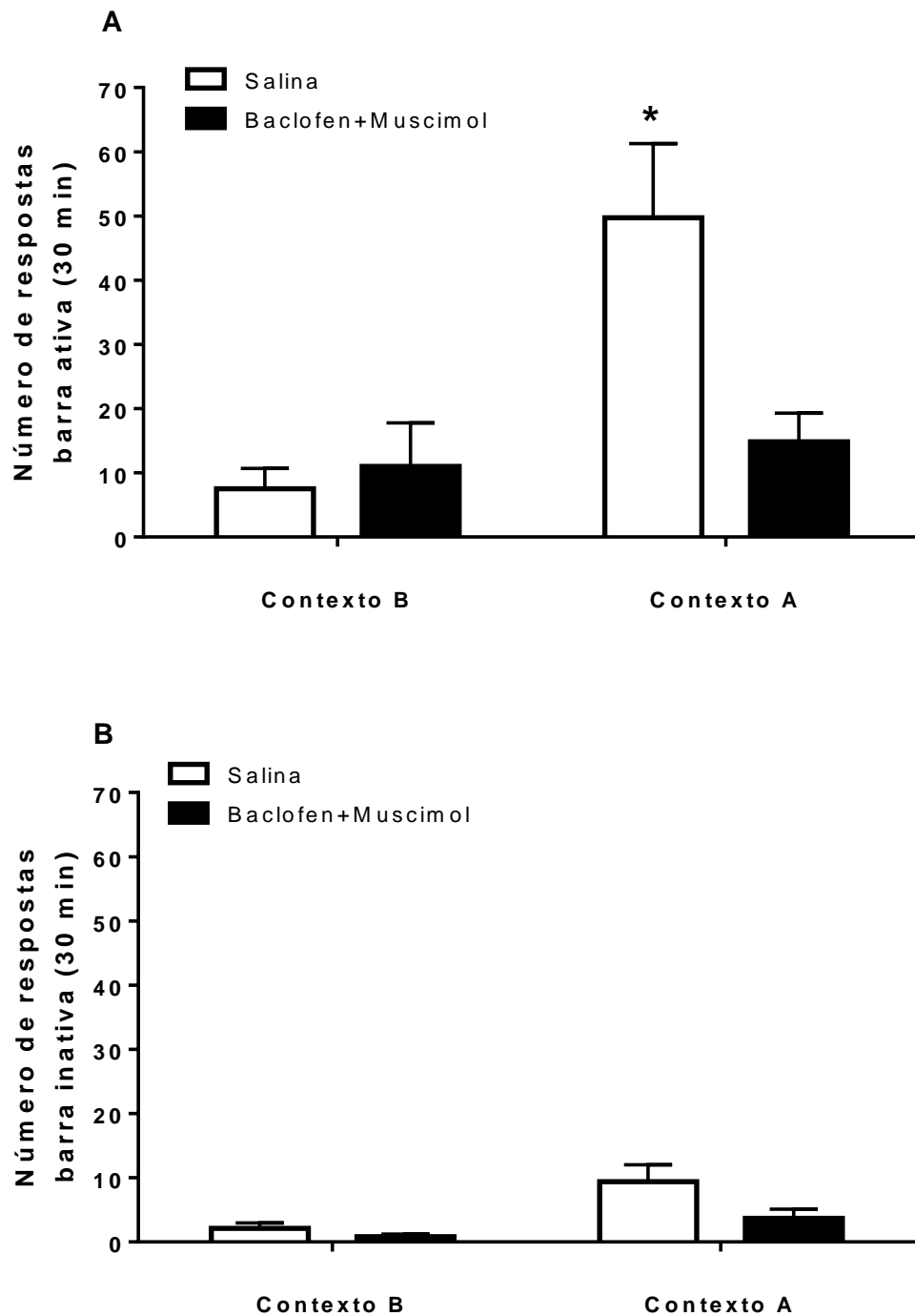
**Figura 16.** Treino e extinção da autoadministração de etanol. **(A)** Número de reforços e respostas nas barras ativa e inativa durante o treino da autoadministração de etanol no Contexto A. **(B)** Número de respostas nas barras ativa e inativa durante as sessões de extinção no Contexto B. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n=33).

A figura 17 mostra correlação positiva e significativa entre o número de reforços obtidos durante a última sessão de treino em IV-30 s e a concentração de etanol no sangue ( $r = 0,33$ ;  $p < 0,05$ ).



**Figura 17.** Correlação entre a concentração de etanol no sangue e número de reforços. O gráfico mostra a correlação entre o número de reforços alcançados durante a última sessão de treino em IV-30 s em função da concentração de etanol no sangue ( $r = 0,33$ ,  $p < 0,05$ ;  $n = 33$ ).

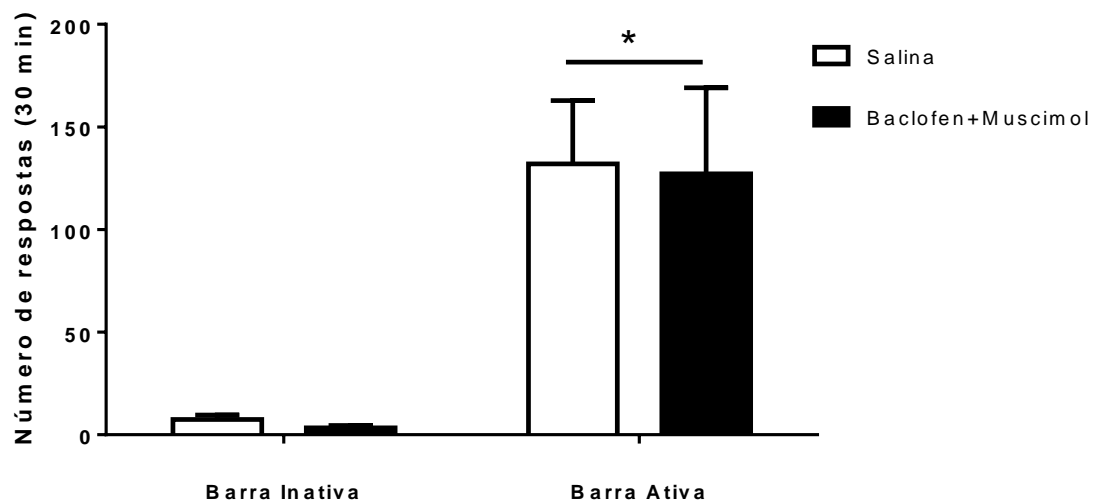
O procedimento de inativação reversível com baclofen + muscimol foi utilizado para avaliar o papel funcional do córtex orbitofrontal na reinstalação do comportamento de busca ao etanol, induzida pelo contexto. ANOVA bifatorial revelou interação significativa entre os fatores contexto (A, B) e fármaco (veículo, muscimol + baclofen) para as respostas na barra ativa ( $F_{1,28} = 8,75$ ,  $p < 0,05$ ). A injeção de muscimol + baclofen no córtex orbitofrontal atenuou o número de respostas na barra ativa no Contexto A, mas não no Contexto B. Não houve interação significativa entre contexto e fármaco para as respostas na barra inativa ( $F_{1,28} = 3,06$ ,  $p > 0,05$ ) (figura 18).



**Figura 18.** Inativação reversível do córtex orbitofrontal diminui a reinstalação da busca de etanol induzida pelo contexto. Número de respostas nas barras **(A)** ativa e **(B)** inativa dos animais que receberam salina ou baclofen + muscimol no dia do teste de reinstalação da busca de etanol. Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* diferente dos demais grupos,  $p < 0,05$  ( $n=7-11$  por grupo).

Para demonstrar que as injeções de baclofen + muscimol não promoveram redução do número de respostas na barra ativa devido à prejuízo motores, testamos o efeito desses fármacos no protocolo em que os animais

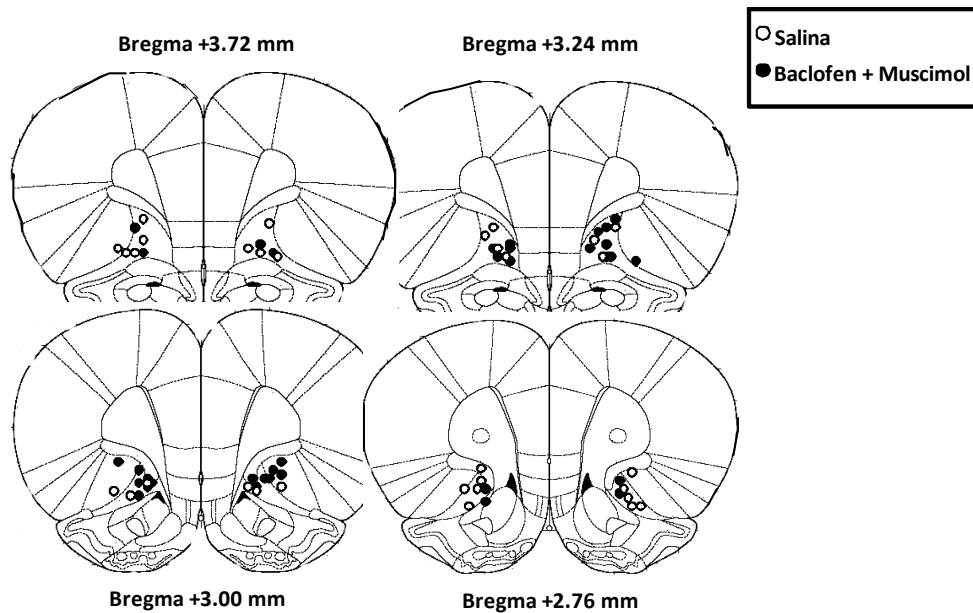
apresentam alto número de respostas para obter sacarina como reforço (RUBIO et al., 2015). ANOVA bifatorial indicou diferença significativa para o fator barra (ativa, inativa:  $F(1,22) = 21,33, p < 0,05$ ), porém não encontramos interação significativa entre os fatores barra e fármaco (salina, muscimol + baclofen:  $F(1,14) = 0,00021, p > 0,05$ ). Ou seja, a inativação do córtex orbitofrontal não teve efeito na resposta de busca à sacarina, indicando que o efeito do muscimol + baclofen sobre o reinstalação do comportamento de busca pelo etanol não foi ocasionado por déficits motores (figura 19).



**Figura 19.** Inativação do córtex orbitofrontal com baclofen+muscimol não alterou as respostas para a sacarina. Os dados representam a média  $\pm$  EPM das repostas na barras ativas e inativas, durante a autoadministração de sacarina 0,2%, de ratos tratados com salina ou baclofen + muscimol. \*diferente da barra inativa  $p < 0,05$  ( $n = 6-7$  por grupo).

A figura 20 representa a localização aproximada das cânulas ao final dos testes comportamentais.



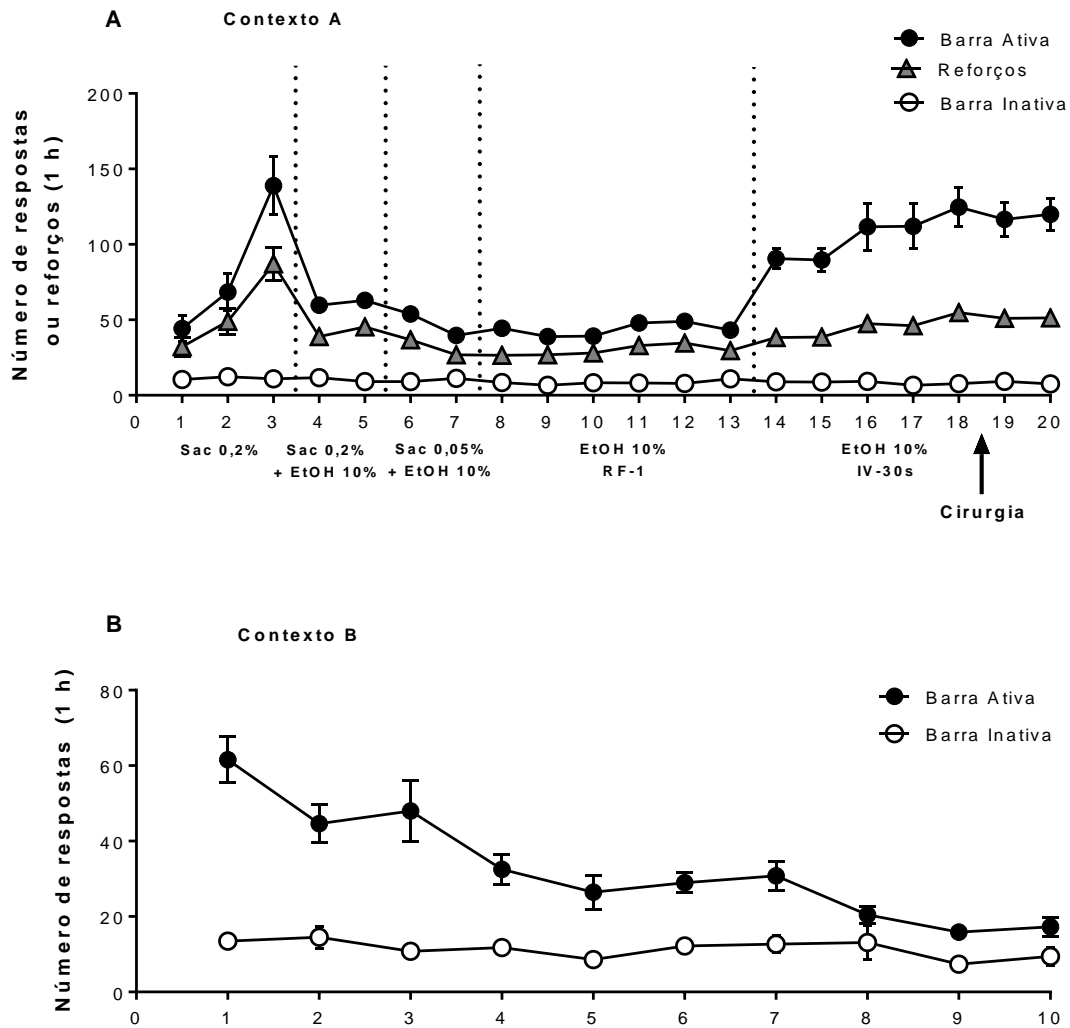


**Figura 20.** Representação da localização das cânulas no córtex orbitofrontal. Os círculos fechados indicam o local aproximado das cânulas nos animais que receberam baclofen + muscimol e os ciclos abertos dos animais que receberam salina.

#### 5.4 Experimento 4 - Efeito da inibição farmacológica reversível do centro do núcleo acumbens na reinstalação da busca do etanol induzida pelo contexto

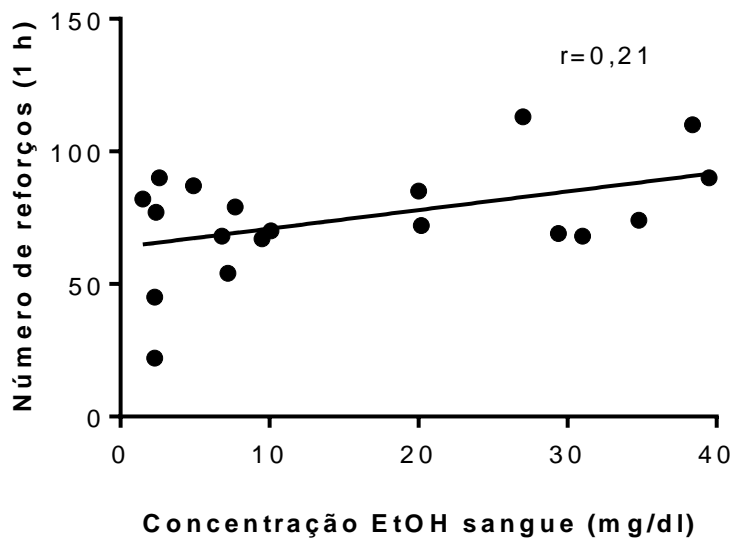
A figura **21A** mostra a média  $\pm$  EPM do número de reforços e de respostas nas barras ativa e inativa durante a fase de treino da autoadministração no Contexto A. Ao analisarmos o número de respostas nas barras ativa e inativa durante as sessões de treino de etanol em RF-1 e IV-30 s, ANOVA de medidas repetidas revelou diferença significativa para o fator barra (ativa, inativa:  $F_{1,10} = 608,1$ ,  $p < 0,05$ ), assim como para o fator esquema de reforço (RF-1, IV-30 s:  $F_{1,10} = 191,0$ ,  $p < 0,05$ ). Indicou ainda, interação significativa entre os fatores ( $F_{1,10} = 193,2$ ,  $p < 0,05$ ). As respostas dos animais durante o treino da autoadministração de etanol mostraram que o protocolo foi eficiente, uma vez que, houve aumento do número de respostas na barra ativa, sem alteração das respostas na barra inativa, nas sessões de treino em IV-30s, quando comparada as sessões em RF-1. Além disso, 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.

A figura 21B representa a média  $\pm$  EPM do número de pressões nas barras ativa e inativa durante as 10 sessões de extinção no Contexto B. Observamos que o número de pressões na barra ativa diminuiu no decorrer das sessões de extinção.



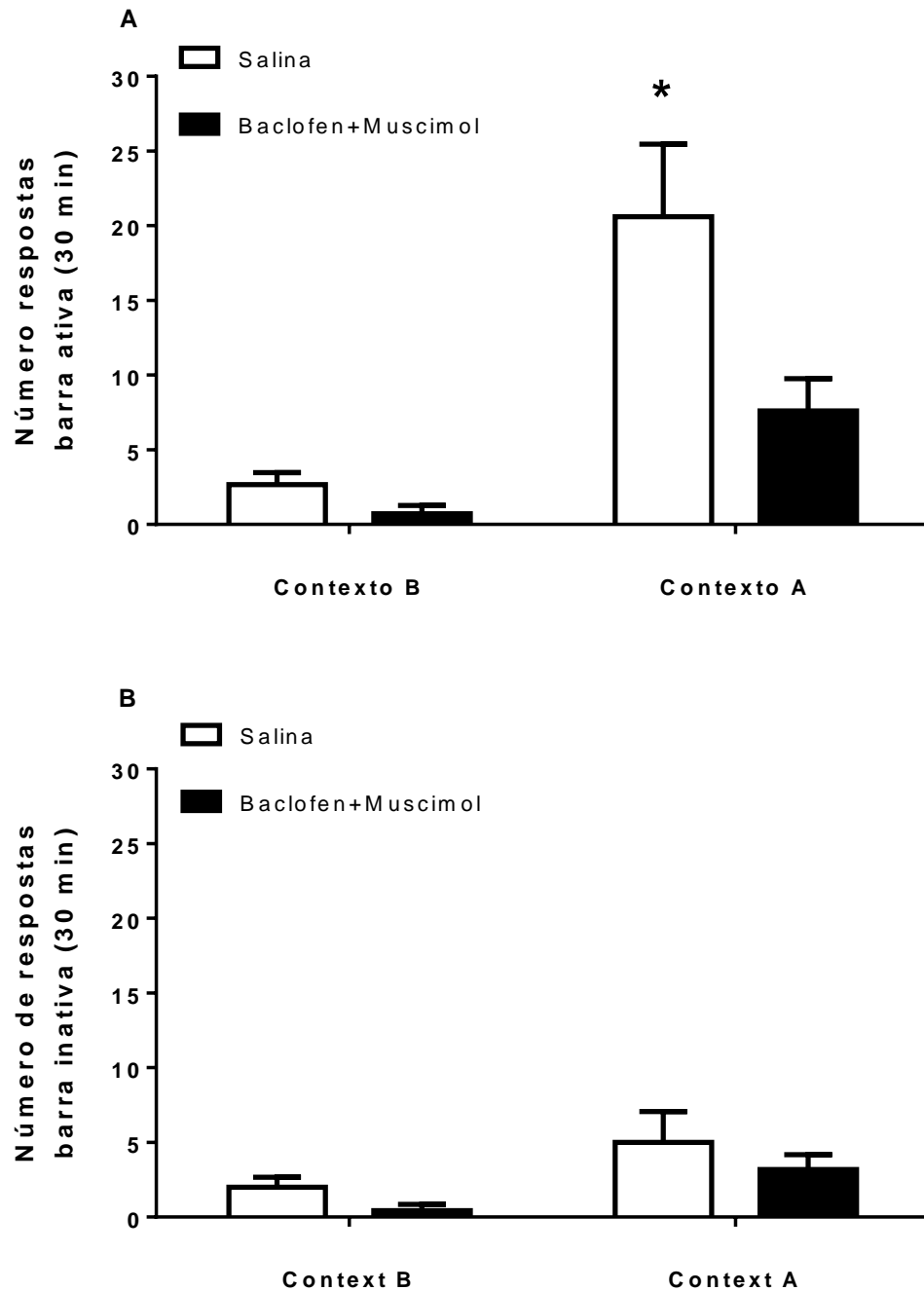
**Figura 21.** Treino e extinção da autoadministração de etanol. **(A)** Número de reforços e respostas nas barras ativa e inativa durante o treino da autoadministração de etanol no Contexto A. **(B)** Número de respostas nas barras ativa e inativa durante as sessões de extinção no Contexto B. Os dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n=35$ ).

A figura 22 mostra a correlação significativa entre o número de reforços obtidos durante a última sessão de treino em IV-30 s e a concentração de etanol no sangue ( $r = 0,21$ ;  $p < 0,05$ ).



**Figura 22.** Correlação entre a concentração de etanol no sangue e número de reforços. O gráfico mostra correlação positiva entre o número de reforços durante a última sessão de treino em IV-30 s (antes da cirurgia) e a concentração de etanol no sangue ( $r = 0,21$ ,  $p < 0,05$ ;  $n = 19$ ).

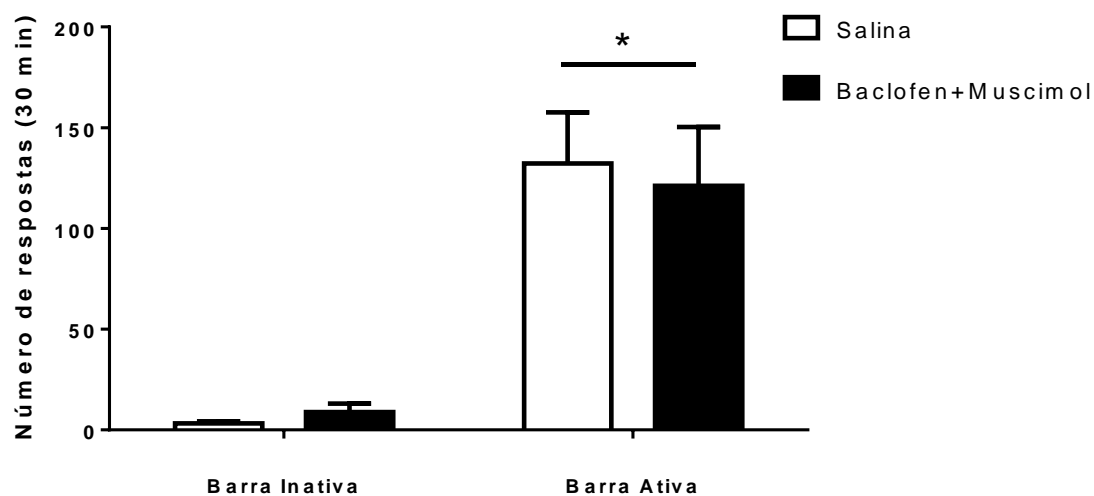
O procedimento de inativação reversível com baclofen + muscimol também foi utilizado para avaliar o papel funcional do centro do núcleo acumbens na reinstalação do comportamento de busca do etanol induzida pelo contexto. ANOVA bifatorial indicou interação significativa entre o fator contexto (A, B:  $F_{1,33} = 17,36$ ,  $p < 0,05$ ) e o fator fármaco (salina, muscimol + baclofen:  $F_{1,33} = 6,50$ ,  $p < 0,05$ ), para as respostas na barra ativa. A administração de muscimol + baclofen no centro do núcleo acumbens atenuou o número de repostas na barra ativa no Contexto A, mas não no Contexto B. Em relação a barra inativa, não houve diferença significativa para o fator droga ( $F_{1,33} = 1,84$ ,  $p > 0,05$ ), assim como a interação significativa entre os fatores contexto e fármaco ( $F_{1,33} = 0,01$ ,  $p > 0,05$ ) não foi observada (figura 23).



**Figura 23.** Inativação farmacológica reversível do centro do núcleo acumbens diminui a reinstalação da busca de etanol induzida pelo contexto. Número de respostas nas barras **(A)** ativa e **(B)** inativa dos animais que receberam salina ou baclofen + muscimol no dia do teste de reinstalação da busca de etanol. Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* diferente dos demais grupos,  $p < 0,05$  ( $n=7-10$  por grupo).

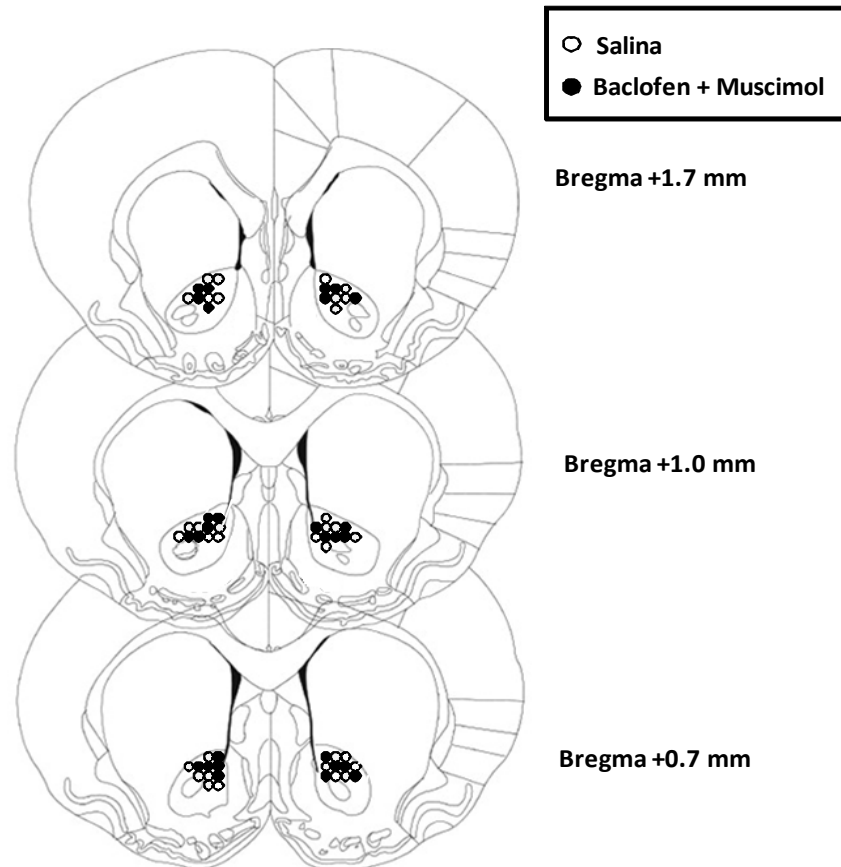
Para descartar a possibilidade de que a injeção de muscimol + baclofen no centro do núcleo acumbens poderia ter ocasionado déficit motor nos animais, testamos o efeito desses fármacos no protocolo em que os animais apresentam alto número de respostas para obter reforço de sacarina (RUBIO et

al., 2015). ANOVA bifatorial indicou diferença significativa para o fator barra (ativa, inativa:  $F_{1,34} = 38,94$   $p < 0,05$ ), porém não foi observado interação significativa entre os fatores barra e fármaco (salina, baclofen + muscimol:  $F_{1,34} = 0,19$ ,  $p > 0,05$ ). Ou seja, a inativação do centro do núcleo acumbens não teve efeito nas respostas operantes na barra ativa para obter o reforço de sacarina, indicando que o efeito do muscimol + baclofen sobre o reinstalação do comportamento de busca de etanol não foi ocasionado por déficits motores (figura 24).



**Figura 24.** Inativação do centro do núcleo acumbens com baclofen + muscimol não alterou as respostas para obtenção de sacarina. Os dados representam a média  $\pm$  EPM das repostas na barras ativas e inativas, durante a autoadministração de sacarina 0,2%, de ratos tratados com salina ou baclofen + muscimol. \* diferente da barra inativa  $p < 0,05$  ( $n = 9-10$  por grupo).

A figura 25 representa a localização aproximada das cânulas ao final dos testes comportamentais.



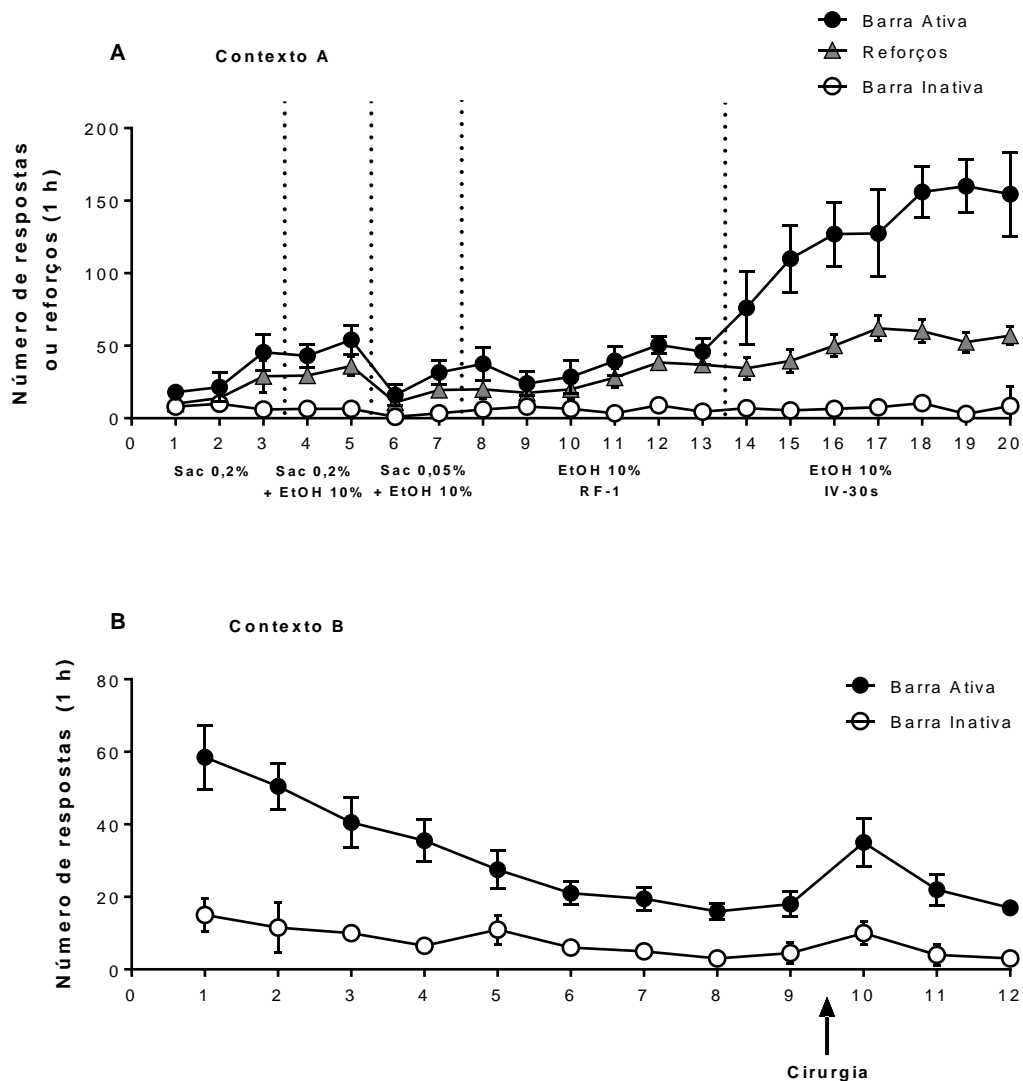
**Figura 25.** Representação da localização das cânulas no centro do núcleo acumbens. Os círculos fechados indicam o local aproximado das cânulas nos animais que receberam baclofen + muscimol e os círculos abertos dos animais que receberam salina.

**5.5 Experimento 5 - Identificação da participação da via córtex pré-  
limbico - centro do núcleo acumbens e córtex orbitofrontal - centro do  
núcleo acumbens na reinstalação da busca de etanol induzida pelo  
contexto**

A figura **26A** mostra a média  $\pm$  EPM do número de reforços e das respostas nas barras ativa e inativa durante a fase de treino da autoadministração no Contexto A. Durante o treino de autoadministração de etanol em RF-1 e IV-30 s, ANOVA de medidas repetidas revelou diferença significativa para o fator barra (ativa, inativa:  $F_{1,10} = 608,1$ ,  $p < 0,05$ ) e também para o fator esquema de reforço (RF-1, IV-30 s:  $F_{1,10} = 191,0$ ,  $p < 0,05$ ). Além disso, houve interação significativa entre os fatores ( $F_{1,10} = 193,2$ ,  $p < 0,05$ ). Os animais mostraram comportamento operante consistente para a busca de etanol, pois apresentaram maior número de respostas na barra ativa do que na

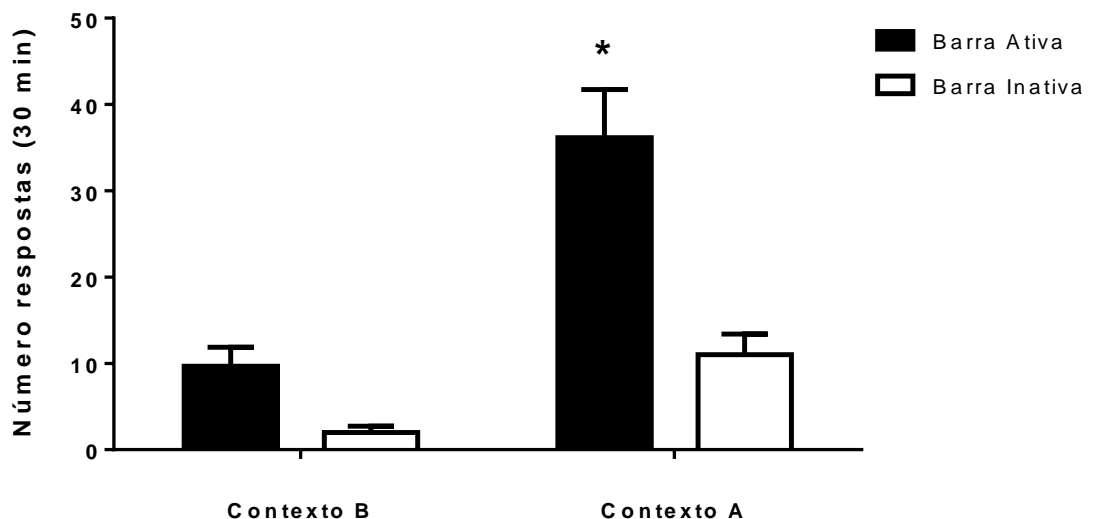
barra inativa e ainda aumentaram o número de respostas na barra ativa nas sessões de treino em IV-30 s, quando comparada as sessões em RF-1.

A figura **26B** representa a média  $\pm$  EPM do número de respostas nas barras ativa e inativa durante as 10 sessões de extinção no Contexto B. Ocorreu diminuição do número de respostas na barra ativa no decorrer das sessões de extinção, exceto na décima sessão, na qual ocorre aumento no número de pressões na barra ativa. Possivelmente, o aumento observado nessa sessão está relacionado ao fato dos animais não terem sido submetidos as sessões de extinção por uma semana, pois estavam no período de recuperação pós-cirúrgica. No entanto, nas duas sessões seguintes (11 e 12) o número de respostas na barra ativa diminuiu e voltou aos valores estabelecidos pelo critério de extinção.



**Figura 26.** Treino e extinção da autoadministração de etanol. **(A)** Número de reforços e respostas nas barras ativa e inativa durante o treino da autoadministração de etanol no Contexto A. **(B)** Número de respostas nas barras ativa e inativa durante as sessões de extinção no Contexto B. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n=12).

A figura 27 mostra a média  $\pm$  EPM do número de respostas nas barras ativa e inativa durante o teste de reinstalação. ANOVA bifatorial indicou diferença significativa para o fator contexto (A, B :  $F_{1,18} = 38,88$ ,  $p < 0,05$ ) e para o fator barra (ativa, inativa:  $F_{1,18} = 13,99$ ,  $p > 0,05$ ). Entretanto, não houve interação significativa entre os fatores contexto e barra ( $F_{1,18} = 2,57$ ,  $p > 0,05$ ). O número de respostas na barra ativa dos animais testados no Contexto A foi maior que o número de respostas dos animais testados no Contexto B. No Contexto A, os animais pressionaram mais a barra ativa do que a inativa. Não observamos diferenças entre o número de repostas nas barras ativa e inativa, nos animais testados no Contexto B.

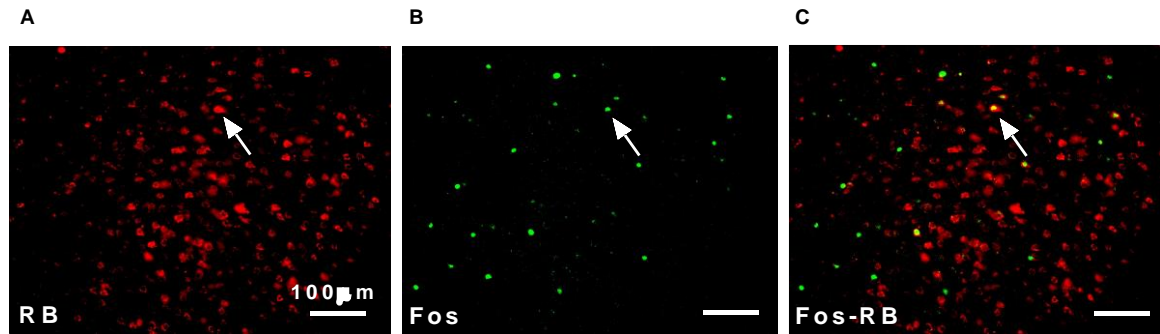


**Figura 27.** Reinstalação da busca ao etanol induzida pelo contexto. Número de respostas nas barras ativa e inativa dos animais expostos ao Contexto B ou Contexto A durante o teste de reinstalação. Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* diferente dos demais grupos,  $p < 0,05$  (n=6 por grupo).

Por meio da técnica de dupla marcação de Fos (imunofluorescência) e *Red beads* (RB) (marcador neuronal retrógrado de fluorescência vermelha), investigamos a participação da projeção do córtex pré-límbico - centro do núcleo acumbens e do córtex orbitofrontal - centro do núcleo acumbens na reinstalação da busca de etanol induzida pelo contexto.

A figura 28 ilustra um corte representativo do córtex pré-límbico para a marcação de Fos e RB e também da dupla marcação (Fos-RB).





**Figura 28.** Cortes representativos do córtex pré-límbico mostrando a marcação de **(A)** *Red beads* (RB) e de **(B)** Fos e da **(C)** dupla marcação de Fos-RB (aumento de 200X). As setas sinalizam células positivas para os Red beads, proteína Fos e dupla marcação, respectivamente.

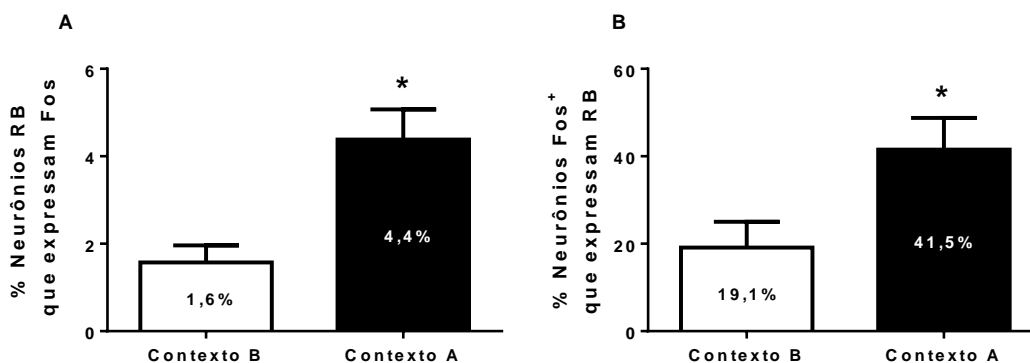
Nós avaliamos a percentagem de células RB que expressavam Fos (%RB) (Fig. 29A) e a porcentagem de células Fos que expressavam RB (% Fos) (Fig. 29B), através das seguintes fórmulas: %RB [(número de células positivas para RB / número de células positivas para Fos-RB) \* 100] e %Fos [(número de células positivas para Fos / número de células positivas para Fos-RB) \* 100].

A figura 29A mostra a média  $\pm$  EPM da percentagem de neurônios do córtex pré-límbico retrogradamente marcados, a partir do centro do núcleo acumbens, que foram ativados durante o teste de reinstalação da busca de etanol em animais testados no Contexto A ou B. Nossos resultados mostraram que 4,4% dos neurônios do córtex pré-límbico que se projetavam para o centro do núcleo acumbens foram ativados quando os animais foram expostos ao Contexto A, enquanto que a porcentagem para os animais expostos ao Contexto B foi de 1,6%. Ou seja, maior percentagem de neurônios do córtex pré-límbico que se projetavam para o centro do núcleo acumbens foram ativados quando os animais foram expostos ao Contexto A, em comparação aos expostos ao Contexto B ( $t(10) = -3,52; p < 0,05$ ).

A figura 29B mostra a média  $\pm$  EPM da percentagem de ativação do córtex pré-límbico referente aos neurônios que se projetam para o centro do núcleo acumbens. Observamos que 41,5% dos neurônios ativados no córtex pré-límbico se projetavam para o centro do núcleo acumbens quando os animais eram expostos ao Contexto A. Quando os animais foram expostos ao Contexto B, a porcentagem foi de 19,1%. Dessa forma, a percentagem de ativação dos neurônios do córtex pré-límbico que se projetam para o centro do

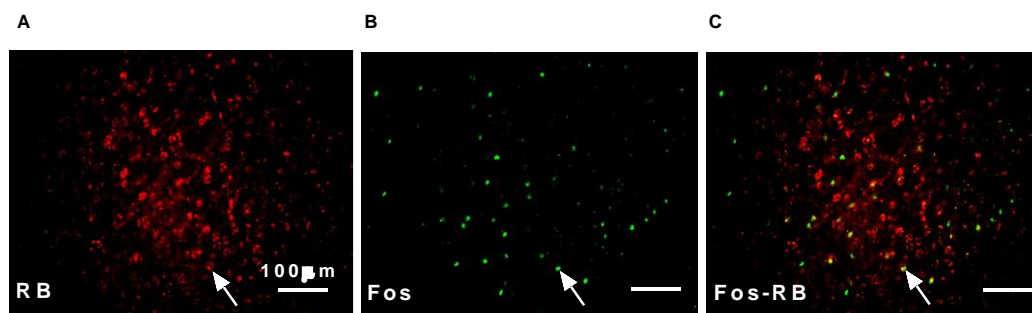
núcleo acumbens foi maior nos animais expostos ao contexto associado ao etanol (Contexto A), quando comparados aos animais expostos ao contexto extinção (Contexto B) ( $t(10) = -2,39$ ;  $p < 0,05$ ).

As análises, em conjunto, mostram significativamente maior ativação das projeções do córtex pré-límbico para o centro do núcleo acumbens nos animais expostos ao contexto associado ao etanol.



**Figura 29.** Ativação das projeções do córtex pré-límbico para o centro do núcleo acumbens durante o teste de reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto. **(A)** Porcentagem de neurônios do córtex pré-límbico marcados com RB que expressaram Fos durante a exposição dos animais ao Contexto B ou A. **(B)** Porcentagem de neurônios positivos para Fos que expressaram RB durante a exposição dos animais ao Contexto B ou A.

A figura 30 ilustra um corte representativo do córtex orbitofrontal para a marcação de Fos, de RB e da dupla marcação (Fos-RB). As imagens mostram que a marcação retrógrada com RB no córtex orbitofrontal não foi satisfatória, impossibilitando a análise de quantificação dos neurônios dessa região que se projetavam para o centro do núcleo acumbens.



**Figura 30.** Cortes representativos do córtex orbitofrontal mostrando a marcação de **(B)** Red beads (RB), **(C)** Fos e **(D)** dupla marcação de Fos-RB (aumento de 200X).

***6 Discussão***

Neste capítulo, investigamos a participação cortical e estriatal na reinstalação da busca de etanol induzida pelo contexto. Nossos resultados mostraram que o comportamento de reinstalação da busca de etanol induzida pelo contexto: (I) não apresentou diferença entre ratos e ratas; (II) aumentou o número de células positivas para Fos no córtex orbitofrontal, pré-límbico e no núcleo acumbens (centro e concha); (III) foi atenuado pela inibição farmacológica do córtex orbitofrontal e do (IV) centro do núcleo acumbens; (IV) apresentou correlação com o aumento da ativação das projeções do córtex pré-límbico para o centro do núcleo acumbens.

A dependência de etanol, assim como de outras drogas de abuso, é caracterizada pelo desejo intenso de usar a substância e ainda, por sua natureza crônica e recidivante. Estímulos associados ao uso de etanol, como pistas contextuais, são considerados fatores de risco para a recaída ao uso dessa substância, pois são capazes de desencadear a fissura (aumento do desejo de voltar a beber) em indivíduos abstinentes (HEINZ et al., 2010; LUDWIG; STARK, 1974; LUDWIG; WIKLER; STARK, 1974; O'BRIEN et al., 1990; STAIGER; WHITE, 1991). Neste sentido, foi demonstrado que alcoolistas são mais responsivos à estímulos relacionados ao consumo de etanol em comparação aos indivíduos não dependentes à essa substância (MYRICK et al., 2004).

A recaída ao uso de drogas promovida pela exposição ao ambiente pode ser estudada através do modelo animal ABA *renewal* (BOUTON; KING, 1983; BOUTON; SWARTZENTRUBER, 1991; CROMBAG; SHAHAM, 2002). Neste paradigma, por meio de processos de aprendizagem associativa, estímulos previamente neutros adquirem propriedade de reforço condicionado e de incentivo motivacional que permitem a busca de drogas na ausência do reforço (CROMBAG et al., 2008; FUCHS et al., 2005). Esse modelo já foi utilizado para estudar a influência do contexto na reinstalação à busca de cocaína, heroína, nicotina, metanfetamina e etanol (BOSSERT et al., 2011; CRUZ et al., 2014; DIERGAARDE et al., 2008; MARCHANT et al., 2013; PALOMBO et al., 2017; RUBIO et al., 2015; WILLCOCKS; MCNALLY, 2013).

Nossos resultados demonstraram que o contexto previamente associado ao uso de etanol foi capaz de reinstalar o comportamento de busca por essa droga, corroborando com os estudos clínicos (LITT; COONEY, 2000;

O'BRIEN et al., 1990; SEO; SINHA, 2014) e pré-clínicos (MARCHANT et al., 2013; PALOMBO et al., 2017; WILLCOCKS; MCNALLY, 2013), que também mostram a influência do ambiente na recaída ao etanol após um período de abstinência.

A influência do sexo sobre as respostas comportamentais e fisiológicas ainda é um desafio na pesquisa básica e clínica. Mesmo duas décadas após o Instituto Nacional de Saúde (NIH, do inglês "National Institute of Health") nos Estados Unidos exigirem que todas as pesquisas clínicas incluíssem mulheres e homens nos estudos, poucas mulheres são inseridas e nem sempre os resultados entre homens e mulheres são analisados separadamente (MAZURE; JONES, 2015). Nos estudos pré-clínicos, ainda há o predomínio da utilização de animais machos. Clayton e Collins (2014) apontam duas razões para esse fato: convenção (maioria dos estudos foram padronizados em machos) e as flutuações hormonais associadas ao ciclo reprodutivo. No entanto, estudos recentes de meta-análise em ratos e camundongos demonstraram que fêmeas testadas ao longo de seus ciclos hormonais não apresentaram maior variabilidade do que os machos (BECKER; PRENDERGAST; LIANG, 2016; PRENDERGAST; ONISHI; ZUCKER, 2014). Resultados semelhantes foram obtidos em relação a expressão gênica em humanos (ITOH; ARNOLD, 2015). Assim, a compreensão científica das descobertas no âmbito do sexo, sejam elas semelhanças, diferenças ou eventos mais complexos, são cruciais para a preditividade das pesquisas e para o avanço nos objetivos finais.

Em nosso estudo, comparamos ratos e ratas nas diferentes etapas de nosso protocolo comportamental, utilizado para avaliar a reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo contexto. As análises comparativas mostraram que as ratas consumiram maior quantidade de etanol (g/kg), quando comparadas aos ratos, durante a exposição ao paradigma de livre escolha entre duas garrafas. As ratas também apresentaram maior número de respostas (na barra ativa) e de reforços, e maior consumo de etanol (g/kg) durante o treino da autoadministração em RF-1, quando comparadas aos ratos. Nas sessões de treino em IV-30 s, ratos e ratas mostraram comportamentos similares em relação ao número de respostas na barra ativa e o número de reforços, no entanto, as ratas consumiram mais etanol (g /kg) do que os ratos.

A maioria dos estudos que avalia o consumo de etanol no modelo de livre escolha entre garrafas mostra que fêmeas consomem mais etanol do que machos (ALMEIDA et al., 2015, 1998; JUÁREZ; BARRIOS DE TOMASI, 1999; LANCASTER; SPIEGEL, 1992; MELISKA et al., 1995; PRIDDY et al., 2017; TING-KAI; LUMENG, 1984). No entanto, a literatura referente ao comportamento operante de autoadministração de etanol apresenta resultados heterogêneos, enquanto alguns estudos não encontraram diferenças entre ratos e ratas na busca e consumo de etanol (MOORE; LYNCH, 2015; PRIDDY et al., 2017), outros demonstram que fêmeas buscam e consomem mais etanol do que os machos (BERTHOLOMEY; NAGARAJAN; TORREGROSSA, 2016; PRIDDY et al., 2017). Outro estudo, conduzido por Randall et al. (2017), mostrou que embora ratos obtivessem maior número de reforços para o etanol, as fêmeas apresentavam consumo de etanol (g/kg) maior ou igual aos machos, dependendo da fase da autoadministração.

Observamos também, que ratos e ratas apresentaram consistência durante o treino de autoadministração de etanol tanto na fase de razão fixa, como na fase de intervalo variado (Fig. 9A e 9B). Esse padrão consistente observado nas ratas, sugere que as fases do ciclo estral provavelmente não impactaram dramaticamente o comportamento de autoadministração, como relatado no estudo de Randall et al. (2017). Essa observação também é apoiada por Priddy et al. (2017) que mostraram que a preferência e o consumo de etanol não foram significativamente diferentes ao longo do ciclo estral de ratas Long-Evans.

Durante a avaliação do processo de extinção e do teste de reinstalação, não observamos diferença do fator sexo em relação ao número de respostas dos animais. Nossos resultados corroboram com o estudo de Randall et al. (2017), no qual ratos e ratas apresentaram número de respostas semelhantes durante as sessões de extinção e do teste de reinstalação da busca do etanol por dicas discretas.

Estudos pré-clínicos que avaliaram diferenças sexuais em comportamentos semelhantes à recaída ao etanol são limitados. McKinzie et al. (1998) também não encontraram diferença no sexo quando avaliaram a reinstalação da busca e do consumo de etanol na autoadministração após longos períodos de privação. Por outro lado, Bertholomey; Nagarajan;

Torregrossa (2016) mostraram que ratas adultas, mas não ratos, quando expostos cronicamente à corticosterona na adolescência, exibiram maior comportamento de reinstalação ao etanol induzido por dicas. Sugerindo que o estresse pode aumentar o risco de comportamentos relacionados à recaída em fêmeas (BERTHOLOMEY; NAGARAJAN; TORREGROSSA, 2016).

Processos neuronais subjacentes à fissura e recaída são complexos devido a interação entre plasticidades decorrentes do uso crônico do etanol e comportamentos associativos relacionados à dependência (SEO; SINHA, 2014). Neste sentido, estudos recentes indicam que comportamentos associativos relacionados ao uso de substâncias de abuso promovem a formação de engramas de memórias em *neuronal ensembles* (BOSSERT et al., 2011; CRUZ et al., 2013, 2014; FANOUS et al., 2012; KOYA et al., 2009; LEÃO et al., 2015; RUBIO et al., 2015). Esses estudos propõe que a ativação desses pequenos grupos neurais, frente aos estímulos associados ao uso da droga, promoveria a evocação de memórias associativas, podendo desencadear a busca por essas substâncias (BOSSERT et al., 2011; CRUZ et al., 2013, 2014; FANOUS et al., 2012; RUBIO et al., 2015).

Estudos de neuroimagem mostraram, em voluntários saudáveis, que o desejo de consumir etanol, desencadeado pela exposição à dicas, foi relacionado ao aumento da atividade do estriado ventral e dorsal (SEO et al., 2011). Em alcoolistas, o aumento da atividade do estriado ventral tem sido correlacionada com a fissura e a recompensa promovida pelo uso dessa substância (GRÜSSER et al., 2004; HEINZ et al., 2004). Dessa forma, diversos estudos sugerem que o núcleo acumbens desempenha um papel chave nos processos de recompensa e de aprendizado associativo relacionados ao uso e busca de drogas (CHAUDHRI et al., 2010b; CORBIT; MUIR; BALLEINE, 2001; KATNER; WEISS, 1999; NICOLA, 2007).

Neste sentido, nossos resultados mostraram que animais expostos ao contexto associado ao etanol (Contexto A) apresentaram aumento de células positivas para Fos, tanto no centro, como na concha do núcleo acumbens. Observamos ainda, por meio da dupla marcação para Fos e NeuN, que apenas uma pequena porcentagem dos neurônios do núcleo acumbens foi ativada após o teste de reinstalação, sendo 6,4% e 7,3% para a concha e 4,2% e 10% para o centro, após a exposição aos contextos B e A, respectivamente.

Demonstramos ainda, que a inativação do centro do núcleo acumbens diminuiu a busca de etanol induzida pelo contexto.

Nossos resultados corroboram com dados da literatura que mostram o envolvimento de pequenos grupos neuronais no núcleo acumbens em comportamentos associativos relacionado à dependência (CRUZ et al., 2014; KOYA et al., 2009, 2012; LEÃO et al., 2015). Por exemplo, Cruz e colaboradores (2014) demonstraram que apenas 3,4% dos neurônios da concha 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 do comportamento. Koya et al. (2009), mostraram que apenas 4% dos neurônios do núcleo acumbens foram ativados na expressão da sensibilização locomotora contexto-específica à cocaína e que a inativação exclusiva dessa pequena população de neurônios inibiu a expressão da sensibilização.

Diferente dos nossos resultados, Hamlin; Newby; McNally (2007) mostraram que a reinstalação da procura por cerveja alcoólica foi associada ao aumento da expressão de Fos na concha do núcleo acumbens, mas não no centro. Por outro lado, Dayas e colaboradores (2007) demonstraram aumento de células positivas para Fos tanto no centro como na concha do núcleo acumbens quando os animais foram expostos a dicas discriminativas associadas ao consumo de etanol (DAYAS et al., 2007). No mesmo sentido, Chaudhri e colaboradores, demonstraram que injeções do antagonista D1 (CHAUDHRI; SAHUQUE; JANAK, 2009) ou de baclofen + muscimol (CHAUDHRI et al., 2010), tanto na concha como no centro do núcleo acumbens, atenuaram a reinstalação da busca do etanol associada ao contexto. No entanto, os autores demonstraram que o centro do núcleo acumbens foi mais sensível ao bloqueio dos receptores D1, quando comparado à concha (CHAUDHRI; SAHUQUE; JANAK, 2009).

Chaudhri et al. (2010) observaram ainda, que na reinstalação da busca pelo etanol associada a dicas discriminativas, a inativação do centro do núcleo acumbens, mas não da concha, foi capaz de diminuir essa resposta condicionada. Esses resultados, juntamente com os discutidos anteriormente, indicam que o centro do núcleo acumbens participa das respostas comportamentais associadas as dicas e ao contexto (BLAISS; JANAK, 2009;



BOSSERT et al., 2007; FUCHS, 2004; ITO; ROBBINS; EVERITT, 2004), enquanto que a concha parece estar mais envolvida com as respostas condicionadas ao contexto (BOSSERT et al., 2007; CRUZ et al., 2014; HAMLIN; NEWBY; MCNALLY, 2007; ITO et al., 2008).

Dados da literatura sugerem que a estimulação repetida das regiões estriatais (ventral e dorsal), após o uso repetido de substâncias, podem afetar negativamente a função regulatória do córtex pré-frontal, diminuindo a ação inibitória dessa região sobre o comportamento de busca por drogas (BELIN et al., 2013; SINHA; LI, 2007; VOLKOW et al., 2007). Neste sentido, alterações na atividade funcional do córtex pré-frontal medial e do córtex orbitofrontal foram observadas em indivíduos dependentes do etanol (SCHOENBAUM; ROESCH; STALNAKER, 2006; SEO; SINHA, 2014). Essas alterações foram associadas à menor capacidade de controle dos impulsos para a busca compulsiva de drogas de abuso (LI; SINHA, 2008; SEO; SINHA, 2014).

Estudos de imuno-histoquímica indicam correlação entre a busca de drogas induzida por estímulos ambientais e a ativação do córtex orbitofrontal. Por exemplo, foi demonstrado que a exposição a dicas previamente associadas à administração de cocaína, heroína e etanol aumentou a expressão de marcadores de ativação neuronal no córtex orbitofrontal (FANOUS et al., 2012; JUPP et al., 2011; THOMAS; ARROYO; EVERITT, 2003).

Nosso estudo foi o primeiro a demonstrar a participação funcional do córtex orbitofrontal na reinstalação da busca de etanol induzida pelo contexto. Em concordância com os nossos achados, Lassetter et al. (2009), relataram que a injeção de baclofen + muscimol no córtex orbitofrontal, diminuiu a busca por cocaína induzida pelo contexto. Além disso, Fanous et al. (2012) demonstraram, em ratos, que a inibição do córtex orbitofrontal diminuiu a procura de heroína induzida por dicas discretas.

Fanous et al. (2012) mostraram ainda que apenas 12% dos neurônios do córtex orbitofrontal foram ativados durante a reinstalação da busca de heroína induzida por dicas, e que a inibição seletiva desses neurônios atenuou a reinstalação desse comportamento. Esses dados sugerem que os *neuronal ensembles* do córtex orbitofrontal codificam o aprendizado associativo entre os estímulos ambientais e os efeitos da heroína. Neste sentido, nossos estudos também mostraram que apenas 15,8% dos neurônios do córtex orbitofrontal

foram ativados após a exposição dos ratos ao ambiente pareado ao etanol. Entretanto, estudos de inibição específica dos *neuronal ensembles* do córtex orbitofrontal são necessários para comprovar o envolvimento desses grupos neuronais na reinstalação da busca de etanol induzida pelo contexto.

A função do córtex orbitofrontal na reinstalação da busca de drogas induzida por estímulos ambientais, poderia ser justificada pela participação dessa estrutura nos processos de memória e aprendizado, decorrentes de suas conexões com regiões límbicas, como o núcleo acumbens e a amígdala basolateral (MOORMAN; ASTON-JONES, 2014). Neste sentido, Lassetter et al. (2011) observaram que a inativação unilateral da amígdala basolateral juntamente com a inibição contralateral ou ipsilateral do córtex orbitofrontal atenuaram o comportamento de busca pela cocaína induzida pelo contexto. Assim, as projeções entre a amígdala basolateral e o córtex orbitofrontal parecem mediar a reinstalação da busca de cocaína induzida pelo contexto. Outro estudo, observou que a apresentação de um odor previamente associado à estímulos recompensadores ou punitivos, promoveu a evocação de potenciais de ação nos neurônios do córtex orbitofrontal, em antecipação à apresentação dessa recompensa ou punição (SCHOENBAUM et al., 2003; SCHOENBAUM; CHIBA; GALLAGHER, 1998). Esses resultados sugerem que o córtex orbitofrontal, em associação com regiões límbicas, desempenha função importante nos processos de memória e de saliência motivacional associada à estímulos recompensadores ou punitivos (SCHOENBAUM; ROESCH; STALNAKER, 2006).

Dados da literatura associam o córtex pré-frontal medial a processos de memórias associativas e afetivas. Essa estrutura cortical também parece desempenhar função importante nos processos recompensadores e de tomada de decisão (EUSTON; GRUBER; MCNAUGHTON, 2013; HAMPTON; BOSSAERTS; O'DOHERTY, 2006; URRY et al., 2006). Estudos de neuroimagem mostraram que dicas relacionadas ao consumo de etanol aumentaram a ativação do córtex pré-frontal medial de indivíduos alcoolistas (BÜHLER; MANN, 2011). Em roedores, foi demonstrado que a reinstalação da autoadministração de etanol e cocaína induzida pelo contexto foi acompanhada pelo aumento de células positivas para Fos no córtex pré-límbico, e que a inibição farmacológica dessa estrutura inibiu a reinstalação da busca à essas

substâncias (FUCHS et al., 2005; LASSETER et al., 2010; MARCHANT et al., 2015; PALOMBO et al., 2017; STEFANIK; KUPCHIK; KALIVAS, 2016; WILLCOCKS; MCNALLY, 2013). Em concordância com essas evidências, nosso estudo demonstrou que a reinstalação da busca do etanol induzida pelo contexto aumentou o número de células positivas para Fos no córtex pré-límbico de ratos.

A participação do córtex pré-frontal medial na reinstalação da autoadministração de drogas induzida pelo contexto, foi demonstrada também por Bossert e colaboradores (2011). Esses autores observaram que 12% dos neurônios do córtex pré-frontal ventromedial foram ativados durante o teste de reinstalação da autoadministração de heroína induzida pelo contexto e que a inibição seletiva desses neurônios atenuou o comportamento de reinstalação (BOSSERT et al., 2011). Estudos do nosso laboratório mostraram que a exposição ao contexto pareado ao etanol ativou apenas 7,7% dos neurônios do córtex pré-límbico e que a inativação farmacológica dessa região atenuou a reinstalação da busca de etanol induzida pelo contexto (PALOMBO et al., 2017). Nossos resultados corroboram com esses dados, uma vez que, a reinstalação da busca de etanol induzida pelo contexto promoveu a ativação de apenas 6,4% dos neurônios do córtex pré-límbico.

É importante ressaltar que apesar do córtex pré-frontal medial estar envolvido no comportamento de reinstalação à busca de drogas, existem diferenças na participação de suas sub-regiões, dependendo da substância de abuso envolvida (MARCHANT et al., 2015). Por exemplo, estudos demonstram que a porção dorsomedial modula a reinstalação da busca por etanol e cocaína (FUCHS et al., 2005; PALOMBO et al., 2017; WILLCOCKS; MCNALLY, 2013), enquanto que a porção ventromedial, participa da busca pela heroína (BOSSERT et al., 2011).

Vários processos relacionados ao aprendizado associativo e a evocação de memórias de longo prazo são atribuídos ao córtex pré-límbico (EUSTON; GRUBER; MCNAUGHTON, 2013; QUINN et al., 2008). Por meio de suas conexões com o estriado, amígdala, área tegmental ventral, hipocampo e córtex orbitofrontal, o córtex pré-límbico medeia informações sensoriais, emocionais e motivacionais (EUSTON; GRUBER; MCNAUGHTON, 2013; MILLER, 2000; MULDER et al., 2000). Estudos indicam que essas conexões estão envolvidas

nas respostas condicionadas ao contexto e na mediação cognitiva e emocional dos processos de consolidação da memória (EUSTON; GRUBER; MCNAUGHTON, 2013; MILLER; COHEN, 2001). Por exemplo, projeções do hipocampo para o córtex pre-límbico proporcionam informações espaciais fundamentais para formação da memória contextual (FLORESCO; SEAMANS; PHILLIPS, 1997). Além disso, projeções glutamatérgicas do córtex pré-límbico para o centro do núcleo acumbens, parecem mediar a busca por cocaína induzida por estímulos ambientais (MCFARLAND; LAPISH; KALIVAS, 2003; STEFANIK et al., 2013; STEFANIK; KUPCHIK; KALIVAS, 2016).

Neste contexto, nosso estudo demonstrou que a exposição dos ratos ao contexto associado ao etanol, promoveu maior ativação de Fos nos neurônios do córtex pré-límbico que se projetavam para o centro do núcleo acumbens, em comparação aos animais que foram expostos ao contexto de extinção. Para o nosso conhecimento, nosso estudo foi o primeiro a mostrar a possível participação das projeções do córtex pré-límbico para o centro do núcleo acumbens na reinstalação à busca por etanol induzida pelo contexto.

Na mesma direção, McGlinchey et al. (2016) observaram que durante a reinstalação da busca por cocaína induzida por dicas, maior porcentagem de neurônios do córtex pré-límbico, retrogradamente marcados a partir do centro do núcleo acumbens, expressavam Fos. O aumento dessa expressão foi correlacionado positivamente ao comportamento de reinstalação à cocaína. Esses autores demonstraram ainda, que essa projeção era glutamatérgica, pois o bloqueio contralateral da sinalização de glutamato no centro do núcleo acumbens atenuou a reinstalação à cocaína induzida por dicas discretas (MCGLINCHEY et al., 2016). A importância dessa via também foi demonstrada por meio da técnica de optogenética, Stefanik et al. (2013) mostraram que a inibição bilateral do córtex pré-límbico, do centro do núcleo acumbens ou das fibras do córtex pré-límbico que chegavam ao centro do núcleo acumbens, atenuaram a reinstalação da busca por cocaína.

Ainda neste contexto, Stefanik; Kupchik; Kalivas (2016) observaram que a inibição da projeção do córtex pré-límbico para o centro do núcleo acumbens, além de diminuir o comportamento de reinstalação da cocaína induzido por dicas, também reduzia o diâmetro da cabeça dos espinhos dendríticos e a relação dos receptores glutamatérgicos AMPA/NMDA nos neurônios

espinhosos médios do centro do núcleo acumbens. Essas alterações na plasticidade sináptica glutamatérgica têm sido relacionadas à maior propensão de recaída em indivíduos abstinentes (ROBINSON; KOLB, 2004; RUSSO et al., 2010). Assim, poderíamos supor que a aferência glutamatérgica vinda do córtex pré-límbico desencadeia alterações nas propriedades sinápticas excitatórias do centro do núcleo acumbens e facilita a busca de drogas (STEFANIK; KUPCHIK; KALIVAS, 2016). Entretanto, estudos funcionais demonstrando o papel dessa via na reinstalação da busca do etanol induzida pelo contexto, ainda são necessários e serão alvo de nossos estudos futuros.

## *7 Conclusão*

Nossos resultados demonstraram que, apesar de ratos e ratas terem apresentado diferenças nas respostas e no consumo de etanol durante o protocolo de autoadministração, ambos apresentaram comportamento semelhante durante a extinção e a reinstalação da busca de etanol induzida pelo contexto. Os resultados obtidos indicaram também que regiões corticolímbicas como o córtex orbitofrontal, o córtex pré-límbico e o núcleo acumbens (centro e concha), participam do comportamento de busca do etanol induzida pelo contexto. Através da técnica de inibição farmacológica, demonstramos que o córtex orbitofrontal e o centro do núcleo acumbens exercem papel importante na modulação desse comportamento. Além disso, mostramos que a exposição ao contexto previamente associado à autoadministração de etanol aumentou a ativação das projeções do córtex pré-límbico para o centro do núcleo acumbens, sugerindo a participação dessa via na busca de etanol induzida pelo contexto.

*8 Referências Bibliográficas*



ALMEIDA, J. et al. Effects of nitric oxide synthesis inhibitor or fluoxetine treatment on depression-like state and cardiovascular changes induced by chronic variable stress in rats. **Stress**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 462–474, 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10253890.2015.1038993>>

ALMEIDA, O. F. et al. Gender differences in ethanol preference and ingestion in rats. The role of the gonadal steroid environment. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 101, n. 12, p. 2677–2685, 1998. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/1198>>

AMBROGGI, F. et al. Roles of Nucleus Accumbens Core and Shell in Incentive-Cue Responding and Behavioral Inhibition. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 31, n. 18, p. 6820–6830, 2011. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.6491-10.2011>>

BECKER, J. B.; KOOB, G. F. Sex Differences in Animal Models: Focus on Addiction. **Pharmacological Reviews**, [s. l.], v. 68, n. 2, p. 242–263, 2016. Disponível em: <<http://pharmrev.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/pr.115.011163>>

BECKER, J. B.; PRENDERGAST, B. J.; LIANG, J. W. Female rats are not more variable than male rats: A meta-analysis of neuroscience studies. **Biology of Sex Differences**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–7, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13293-016-0087-5>>

BELIN, D. et al. Addiction: Failure of control over maladaptive incentive habits. **Current Opinion in Neurobiology**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 564–574, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2013.01.025>>

BERTHOLOMEY, M. L.; NAGARAJAN, V.; TORREGROSSA, M. M. Sex differences in reinstatement of alcohol seeking in response to cues and yohimbine in rats with and without a history of adolescent corticosterone exposure. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 233, n. 12, p. 2277–2287, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00213-016-4278-x>>

BICKS, L. K. et al. Prefrontal Cortex and Social Cognition in Mouse and Man. **Frontiers in Psychology**, [s. l.], v. 6, 2015. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpsyg.2015.01805/abstract>>

BLAISS, C. A.; JANAK, P. H. The nucleus accumbens core and shell are critical for the expression, but not the consolidation, of Pavlovian conditioned approach. **Behavioural brain research**, [s. l.], v. 200, n. 1, p. 22–32, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19159648>>

BOLAM, J. P. et al. Synaptic organisation of the basal ganglia. **Journal of anatomy**, [s. l.], v. 196 ( Pt 4, p. 527–42, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10923985>>

BONSON, K. R. et al. Neural systems and cue-induced cocaine craving. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 376–86, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11850152>>

BOOTHBY, L. A.; DOERING, P. L. Acamprosate for the treatment of alcohol dependence. **Clinical Therapeutics**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 695–714, 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149291805001086>>

BOSSERT, J. M. et al. Differential Effects of Blockade of Dopamine D1-Family Receptors in Nucleus Accumbens Core or Shell on Reinstatement of Heroin Seeking Induced by Contextual and Discrete Cues. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 27, n. 46, p. 12655–12663, 2007. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.3926-07.2007>>

BOSSERT, J. M. et al. Ventral medial prefrontal cortex neuronal ensembles mediate context-induced relapse to heroin. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 420–422, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nn.2758>>

BOSSERT, J. M. et al. The reinstatement model of drug relapse: Recent neurobiological findings, emerging research topics, and translational research. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 229, n. 3, p. 453–476, 2013.

BOUTON, M. E.; KING, D. A. Contextual control of the extinction of conditioned fear: tests for the associative value of the context. **Journal of experimental psychology. Animal behavior processes**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 248–65, 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6886630>>

BOUTON, M. E.; RICKER, S. T. Renewal of extinguished responding in a second context. **Animal Learning & Behavior**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 317–324, 1994. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.3758/BF03209840>>

BOUTON, M. E.; SWARTZENTRUBER, D. Sources of relapse after extinction in Pavlovian and instrumental learning. **Clinical Psychology Review**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 123–140, 1991. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0272735891900918>>

BREITER, H. C. et al. Acute effects of cocaine on human brain activity and emotion. **Neuron**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 591–611, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9331351>>

BROWN, S. A. et al. Stress, vulnerability and adult alcohol relapse. **Journal of studies on alcohol**, [s. l.], v. 56, n. 5, p. 538–45, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7475034>>

BÜHLER, M.; MANN, K. Alcohol and the human brain: a systematic review of different neuroimaging methods. **Alcoholism, clinical and experimental research**, [s. l.], v. 35, n. 10, p. 1771–93, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21777260>>

BURATTINI, C. et al. The ethanol self-administration context as a reinstatement cue: acute effects of naltrexone. **Neuroscience**, [s. l.], v. 139, n. 3, p. 877–87, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16516392>>

CHAUDHRI, N. et al. Separable roles of the nucleus accumbens core and shell in context- and cue-induced alcohol-seeking. **Neuropsychopharmacology**, [s.

l.], v. 35, n. 3, p. 783–791, 2010. a.

CHAUDHRI, N. et al. Separable Roles of the Nucleus Accumbens Core and Shell in Context- and Cue-Induced Alcohol-Seeking. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 783–791, 2010. b. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/npp2009187>>

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**, [s. l.], v. 207, n. 2, p. 303–314, 2009.

CHILDRESS, A. R. et al. Cue reactivity and cue reactivity interventions in drug dependence. **NIDA research monograph**, [s. l.], v. 137, p. 73–95, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8289929>>

CLAYTON, J. A.; COLLINS, F. S. Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies. **Nature**, [s. l.], v. 509, n. 7500, p. 282–283, 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/509282a>>

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**, [s. l.], v. 70, n. 2, p. 390–7, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11952197>>

CORBIT, L. H.; MUIR, J. L.; BALLEINE, B. W. The Role of the Nucleus Accumbens in Instrumental Conditioning: Evidence of a Functional Dissociation between Accumbens Core and Shell. **The Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 21, n. 9, p. 3251–3260, 2001. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.21-09-03251.2001>>

CROMBAG, H. S. et al. Context-induced relapse to drug seeking: A review. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 363, n. 1507, p. 3233–3243, 2008.

CROMBAG, H. S.; SHAHAM, Y. Renewal of drug seeking by contextual cues after prolonged extinction in rats. **Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 116, n. 1, p. 169–173, 2002.

CRUZ, F. C. et al. New technologies for examining the role of neuronal ensembles in drug addiction and fear. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 743–754, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrn3597>>

CRUZ, F. C. et al. Role of Nucleus Accumbens Shell Neuronal Ensembles in Context-Induced Reinstatement of Cocaine-Seeking. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 34, n. 22, p. 7437–7446, 2014. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.0238-14.2014>>

CRUZ, F. C.; JAVIER RUBIO, F.; HOPE, B. T. Using c-fos to study neuronal ensembles in corticostriatal circuitry of addiction. **Brain research**, [s. l.], v. 1628, n. Pt A, p. 157–73, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25446457>>

DAYAS, C. V. et al. Distinct Patterns of Neural Activation Associated with Ethanol Seeking: Effects of Naltrexone. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 61, n. 8, p. 979–989, 2007.

DE WIT, H.; STEWART, J. Reinstatement of cocaine-reinforced responding in the rat. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 75, n. 2, p. 134–43, 1981. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6798603>>

DIERGAARDE, L. et al. Contextual renewal of nicotine seeking in rats and its suppression by the cannabinoid-1 receptor antagonist Rimonabant (SR141716A). **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 55, n. 5, p. 712–6, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18588903>>

EHRMAN, R. N. et al. Conditioned responses to cocaine-related stimuli in cocaine abuse patients. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 107, n. 4, p. 523–9, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1603895>>

EPSTEIN, D. H. et al. Toward a model of drug relapse: An assessment of the validity of the reinstatement procedure. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 189, n. 1, p. 1–16, 2006.

EUSTON, D. R.; GRUBER, A. J.; MCNAUGHTON, B. L. The Role of Medial Prefrontal Cortex in Memory and Decision Making. **Neuron**, [s. l.], v. 76, n. 6, p. 1057–1070, 2013.

EVERITT, B. J.; ROBBINS, T. W. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. **Nature neuroscience**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 1481–9, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16251991>>

FANOUS, S. et al. Role of orbitofrontal cortex neuronal ensembles in the expression of incubation of heroin craving. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 32, n. 34, p. 11600–9, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22915104>>

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. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 1880–90, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9030646>>

FOLTIN, R. W.; HANEY, M. Conditioned effects of environmental stimuli paired with smoked cocaine in humans. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 149, n. 1, p. 24–33, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10789879>>

FOX, H. C. et al. Stress-induced and alcohol cue-induced craving in recently abstinent alcohol-dependent individuals. **Alcoholism, clinical and experimental research**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 395–403, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17295723>>

FUCHS, R. A. Differential Involvement of Orbitofrontal Cortex Subregions in Conditioned Cue-Induced and Cocaine-Primed Reinstatement of Cocaine Seeking in Rats. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 24, n. 29, p. 6600–6610,

2004. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.1924-04.2004>>

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: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 296–309, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15483559>>

GARAVAN, H. et al. Cue-induced cocaine craving: Neuroanatomical specificity for drug users and drug stimuli. **American Journal of Psychiatry**, [s. l.], v. 157, n. 11, p. 1789–1798, 2000.

GARDONI, F.; BELLONE, C. Modulation of the glutamatergic transmission by Dopamine: a focus on Parkinson, Huntington and Addiction diseases. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s. l.], v. 9, n. March, p. 1–11, 2015. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fncel.2015.00025/abstract>>

GASS, J. T.; CHANDLER, L. J. The Plasticity of Extinction: Contribution of the Prefrontal Cortex in Treating Addiction through Inhibitory Learning. **Frontiers in psychiatry**, [s. l.], v. 4, p. 46, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23750137>>

GEORGE, O.; HOPE, B. T. Cortical and amygdalar neuronal ensembles in alcohol seeking, drinking and withdrawal. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 122, p. 107–114, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.04.031>>

GRANT, S. et al. Activation of memory circuits during cue-elicited cocaine craving. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 93, n. 21, p. 12040–5, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8876259>>

GRÜSSER, S. M. et al. Cue-induced activation of the striatum and medial prefrontal cortex is associated with subsequent relapse in abstinent alcoholics. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 175, n. 3, p. 296–302, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15127179>>

HAMLIN, A. S.; NEWBY, J.; MCNALLY, G. P. The neural correlates and role of D1 dopamine receptors in renewal of extinguished alcohol-seeking. **Neuroscience**, [s. l.], v. 146, n. 2, p. 525–36, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17360123>>

HAMPTON, A. N.; BOSSAERTS, P.; O'DOHERTY, J. P. The role of the ventromedial prefrontal cortex in abstract state-based inference during decision making in humans. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 26, n. 32, p. 8360–7, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16899731>>

HEIDBREder, C. A.; GROENEWEGEN, H. J. The medial prefrontal cortex in the rat: Evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 555–579, 2003.

HEINZ, A. et al. Correlation between dopamine D(2) receptors in the ventral striatum and central processing of alcohol cues and craving. **The American journal of psychiatry**, [s. l.], v. 161, n. 10, p. 1783–9, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15465974>>

HEINZ, A. et al. Chapter 4 Alcohol Craving and Relapse Prediction. **Advances in the Neuroscience of Addiction**, [s. l.], p. 1–16, 2010.

ITO, R. et al. Functional interaction between the hippocampus and nucleus accumbens shell is necessary for the acquisition of appetitive spatial context conditioning. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 28, n. 27, p. 6950–9, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18596169>>

ITO, R.; ROBBINS, T. W.; EVERITT, B. J. Differential control over cocaine-seeking behavior by nucleus accumbens core and shell. **Nature neuroscience**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 389–97, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15034590>>

ITOH, Y.; ARNOLD, A. P. Are females more variable than males in gene expression? Meta-analysis of microarray datasets. **Biology of Sex Differences**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 18, 2015. Disponível em: <<http://www.bsd-journal.com/content/6/1/18>>

JAFFE, J. H. et al. Cocaine-induced cocaine craving. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 97, n. 1, p. 59–64, 1989. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00443414>>

JONES, J. L. et al. The basolateral amygdala differentially regulates conditioned neural responses within the nucleus accumbens core and shell. **Neuroscience**, [s. l.], v. 169, n. 3, p. 1186–1198, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.05.073>>

JUÁREZ, J.; BARRIOS DE TOMASI, E. Sex differences in alcohol drinking patterns during forced and voluntary consumption in rats. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 15–22, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10487383>>

JUPP, B. et al. Discrete cue-conditioned alcohol-seeking after protracted abstinence: Pattern of neural activation and involvement of orexin 1 receptors. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 162, n. 4, p. 880–889, 2011.

KATNER, S. N.; WEISS, F. Ethanol-associated olfactory stimuli reinstate ethanol-seeking behavior after extinction and modify extracellular dopamine levels in the nucleus accumbens. **Alcoholism, clinical and experimental research**, [s. l.], v. 23, n. 11, p. 1751–60, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10591591>>

KENNY, P. J.; KOOB, G. F.; MARKOU, A. Conditioned facilitation of brain reward function after repeated cocaine administration. **Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 117, n. 5, p. 1103–1107, 2003. Disponível em: <<http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/0735-7044.117.5.1103>>

KILGUS, M. D.; PUMARIEGA, A. J. Experimental manipulation of cocaine craving by videotaped environmental cues. **Southern medical journal**, [s. l.], v. 87, n. 11, p. 1138–40, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7973900>>

KOYA, E. et al. Targeted disruption of cocaine-activated nucleus accumbens neurons prevents context-specific sensitization. **Nature neuroscience**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 1069–73, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19620976>>

KOYA, E. et al. Silent synapses in selectively activated nucleus accumbens neurons following cocaine sensitization. **Nature neuroscience**, [s. l.], v. 15, n. 11, p. 1556–62, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23023294>>

LANCASTER, F. E.; SPIEGEL, K. S. Alcoholic and nonalcoholic beer drinking during gestation: Offspring growth and glucose metabolism. **Alcohol**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 9–15, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1733430>>

LASSETER, H. C. et al. Involvement of the lateral orbitofrontal cortex in drug context-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior in rats. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 30, n. 7, p. 1370–1381, 2009.

LASSETER, H. C. et al. Prefrontal Cortical Regulation of Drug Seeking in Animal Models of Drug Relapse. In: [s.l.: s.n.]. p. 101–117.

LASSETER, H. C. et al. Interaction of the basolateral amygdala and orbitofrontal cortex is critical for drug context-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior in rats. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 711–720, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/npp.2010.209>>

LEÃO, R. M. et al. Chronic Nicotine Activates Stress/Reward-Related Brain Regions and Facilitates the Transition to Compulsive Alcohol Drinking. **The Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 35, n. 15, p. 6241–6253, 2015. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.3302-14.2015>>

LI, C. R.; SINHA, R. Inhibitory control and emotional stress regulation: neuroimaging evidence for frontal-limbic dysfunction in psycho-stimulant addiction. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 581–97, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18164058>>

LITT; COONEY. Re: Comments on “Reactivity to alcohol-related stimuli in the laboratory and in the field: predictors of craving in treated alcoholics: a reply”. **Addiction (Abingdon, England)**, [s. l.], v. 95, n. 7, p. 1107–8, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10962778>>

LONDON, E. D. et al. Orbitofrontal cortex and human drug abuse: functional imaging. **Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 334–42, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10731228>>

LUDWIG, A. M.; STARK, L. H. Alcohol craving. Subjective and situational aspects. **Quarterly journal of studies on alcohol**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 899–

905, 1974. 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**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 108–30, 1974. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4827273>>

LUDWIG, A. M.; WIKLER, A.; STARK, L. H. The first drink: psychobiological aspects of craving. **Archives of general psychiatry**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 539–47, 1974. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4131353>>

MARCHANT, N. J. et al. Context-induced relapse to alcohol seeking after punishment in a rat model. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 73, n. 3, p. 256–262, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.07.007>>

MARCHANT, N. J. et al. A Critical Role of Lateral Hypothalamus in Context-Induced Relapse to Alcohol Seeking after Punishment-Imposed Abstinence. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 34, n. 22, p. 7447–7457, 2014. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.0256-14.2014>>

MARCHANT, N. J. et al. Role of corticostriatal circuits in context-induced reinstatement of drug seeking. **Brain Research**, [s. l.], v. 1628, p. 219–232, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2014.09.004>>

MARCHANT, N. J.; HAMLIN, A. S.; MCNALLY, G. P. Lateral Hypothalamus Is Required for Context-Induced Reinstatement of Extinguished Reward Seeking. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 29, n. 5, p. 1331–1342, 2009. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.5194-08.2009>>

MARLATT, G. A. Models of relapse and relapse prevention: A commentary. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 55–60, 1996. Disponível em: <<http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/1064-1297.4.1.55>>

MAZURE, C. M.; JONES, D. P. Twenty years and still counting: including women as participants and studying sex and gender in biomedical research. **BMC Women’s Health**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 94, 2015. Disponível em: <<http://bmcmwomenshealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12905-015-0251-9>>

MCCUSKER, C. G.; BROWN, K. The cue-responsivity phenomenon in dependent drinkers: “personality” vulnerability and anxiety as intervening variables. **British journal of addiction**, [s. l.], v. 86, n. 7, p. 905–12, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1912743>>

MCFARLAND, K.; LAPISH, C. C.; KALIVAS, P. W. Prefrontal glutamate release into the core of the nucleus accumbens mediates cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. 3531–3537, 2003. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12716962](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12716962)>

MCGLINCHEY, E. M. et al. Prelimbic to Accumbens Core Pathway Is Recruited



in a Dopamine-Dependent Manner to Drive Cued Reinstatement of Cocaine Seeking. **The Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 36, n. 33, p. 8700–8711, 2016. Disponível em:

<<http://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.1291-15.2016>>

MCLAUGHLIN, J.; SEE, R. E. Selective inactivation of the dorsomedial prefrontal cortex and the basolateral amygdala attenuates conditioned-cued reinstatement of extinguished cocaine-seeking behavior in rats. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 168, n. 1–2, p. 57–65, 2003. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00213-002-1196-x>>

MELISKA, C. J. et al. Ethanol, nicotine, amphetamine, and aspartame consumption and preferences in C57BL/6 and DBA/2 mice. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, [s. l.], v. 50, n. 4, p. 619–26, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7617710>>

MILLER, E. K. The prefrontal cortex and cognitive control. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 59–65, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11252769>>

MILLER, E. K.; COHEN, J. D. An integrative theory of prefrontal cortex function. **Annual review of neuroscience**, [s. l.], v. 24, p. 167–202, 2001. Disponível em: <<http://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 (Abingdon, England)**, [s. l.], v. 91, n. 6, p. 779–85, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8696242>>

MODESTO-LOWE, V. et al. Effects of naltrexone on cue-elicited craving for alcohol and cocaine. **Drug and alcohol dependence**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 9–16, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9476694>>

MONTI, P. M. et al. Alcohol cue reactivity: effects of detoxification and extended exposure. **Journal of studies on alcohol**, [s. l.], v. 54, n. 2, p. 235–45, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8384678>>

MOORE, C. F.; LYNCH, W. J. Alcohol preferring (P) rats as a model for examining sex differences in alcohol use disorder and its treatment. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 132, p. 1–9, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2015.02.014>>

MOORMAN, D. E. et al. Differential roles of medial prefrontal subregions in the regulation of drug seeking. **Brain Research**, [s. l.], v. 1628, n. 0 0, p. 130–146, 2015.

MOORMAN, D. E.; ASTON-JONES, G. Orbitofrontal Cortical Neurons Encode Expectation-Driven Initiation of Reward-Seeking. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 34, n. 31, p. 10234–10246, 2014. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.3216-13.2014>>

MORGAN, J. I.; CURRAN, T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. **Annual**

**review of neuroscience**, [s. l.], v. 14, p. 421–51, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1903243>>

MULDER, A. B. et al. Plasticity of neuronal firing in deep layers of the medial prefrontal cortex in rats engaged in operant conditioning. **Progress in brain research**, [s. l.], v. 126, p. 287–301, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11105653>>

MYRICK, H. et al. Differential brain activity in alcoholics and social drinkers to alcohol cues: relationship to craving. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 393–402, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14679386>>

NICOLA, S. M. The nucleus accumbens as part of a basal ganglia action selection circuit. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 191, n. 3, p. 521–50, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16983543>>

NICOLA, S. M.; SURMEIER, J.; MALENKA, R. C. Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. **Annual review of neuroscience**, [s. l.], v. 23, p. 185–215, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10845063>>

NICOLELIS, M. A.; FANSELOW, E. E.; GHAZANFAR, A. A. Hebb's dream: the resurgence of cell assemblies. **Neuron**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 219–21, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9292712>>

O'BRIEN, C. P. et al. Integrating systemic cue exposure with standard treatment in recovering drug dependent patients. **Addictive behaviors**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 355–65, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2248109>>

O'BRIEN, C. P. et al. Classical conditioning in drug-dependent humans. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 654, p. 400–15, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1632593>>

PALOMBO, P. et al. Inactivation of the prelimbic cortex impairs the context-induced reinstatement of ethanol seeking. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 8, n. OCT, p. 1–11, 2017.

PAVÃO, R. Memória e Aprendizagem. [s. l.], 2014. Disponível em: <<http://www.ib.usp.br/~rpavao/memoria.pdf>>

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

PENNARTZ, C. M.; GROENEWEGEN, H. J.; LOPES DA SILVA, F. H. The nucleus accumbens as a complex of functionally distinct neuronal ensembles: an integration of behavioural, electrophysiological and anatomical data. **Progress in neurobiology**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 719–61, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7938546>>

PERRY, C. J. et al. Role of cues and contexts on drug-seeking behaviour. **British journal of pharmacology**, [s. l.], v. 171, n. 20, p. 4636–72, 2014.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24749941>>

PETERS, J.; KALIVAS, P. W.; QUIRK, G. J. Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 279–88, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19380710>>

PRENDERGAST, B. J.; ONISHI, K. G.; ZUCKER, I. Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 40, p. 1–5, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763414000049>>

PRIDDY, B. M. et al. Sex, strain, and estrous cycle influences on alcohol drinking in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 152, p. 61–67, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091305716301356>>

QUINN, J. J. et al. Inverse temporal contributions of the dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex to the expression of long-term fear memories. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 368–72, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18441294>>

RANDALL, P. A.; STEWART, R. T.; BESHEER, J. Sex differences in alcohol self-administration and relapse-like behavior in Long-Evans rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 156, n. February, p. 1–9, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2017.03.005>>

ROBINSON, T. E.; KOLB, B. Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 47, p. 33–46, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15464124>>

ROHSENOW, D. J. et al. Cocaine craving as a predictor of treatment attrition and outcomes after residential treatment for cocaine dependence. **Journal of studies on alcohol and drugs**, [s. l.], v. 68, n. 5, p. 641–8, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17690796>>

RUBIO, F. J. et al. Context-induced reinstatement of methamphetamine seeking is associated with unique molecular alterations in Fos-expressing dorsolateral striatum neurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 35, n. 14, p. 5625–39, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25855177>>

RUSSO, S. J. et al. The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 33, n. 6, p. 267–276, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223610000202>>

SCHOENBAUM, G. et al. Encoding predicted outcome and acquired value in orbitofrontal cortex during cue sampling depends upon input from basolateral amygdala. **Neuron**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 855–67, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12948451>>

SCHOENBAUM, G.; CHIBA, A. A.; GALLAGHER, M. Orbitofrontal cortex and

basolateral amygdala encode expected outcomes during learning. **Nature neuroscience**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 155–9, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10195132>>

SCHOENBAUM, G.; ROESCH, M. R.; STALNAKER, T. A. Orbitofrontal cortex, decision-making and drug addiction. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 116–124, 2006.

SCHOENBAUM, G.; SHAHAM, Y. The Role of Orbitofrontal Cortex in Drug Addiction: A Review of Preclinical Studies. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 63, n. 3, p. 256–262, 2008.

SCHWINDEL, C. D.; MCNAUGHTON, B. L. Hippocampal-cortical interactions and the dynamics of memory trace reactivation. **Progress in brain research**, [s. l.], v. 193, p. 163–77, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21854962>>

SEE, R. E. Neural substrates of conditioned-cued relapse to drug-seeking behavior. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 517–29, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11830186>>

SEO, D. et al. Sex differences in neural responses to stress and alcohol context cues. **Human brain mapping**, [s. l.], v. 32, n. 11, p. 1998–2013, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21162046>>

SEO, D.; SINHA, R. **The neurobiology of alcohol craving and relapse**. 1. ed. [s.l.] : Elsevier B.V., 2014. v. 125 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-62619-6.00021-5>>

SESACK, S. R.; GRACE, A. A. Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 27–47, 2010. 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**, [s. l.], v. 168, n. 1–2, p. 3–20, 2003.

SINHA, R. How does stress increase risk of drug abuse and relapse? **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 158, n. 4, p. 343–59, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11797055>>

SINHA, R. et al. Enhanced negative emotion and alcohol craving, and altered physiological responses following stress and cue exposure in alcohol dependent individuals. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 1198–208, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18563062>>

SINHA, R.; LI, C. S. R. Imaging stress- and cue-induced drug and alcohol craving: association with relapse and clinical implications. **Drug and alcohol review**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 25–31, 2007. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17364833>>

STAIGER, P. K.; WHITE, J. M. Cue reactivity in alcohol abusers: stimulus specificity and extinction of the responses. **Addictive behaviors**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 211–21, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1776539>>

STEFANIK, M. T. et al. Optogenetic inhibition of cocaine seeking in rats. **Addiction Biology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 50–53, 2013.

STEFANIK, M. T.; KALIVAS, P. W. Optogenetic dissection of basolateral amygdala projections during cue-induced reinstatement of cocaine seeking. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 7, 2013. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2013.00213/abstract>>

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 Structure and Function**, [s. l.], v. 221, n. 3, p. 1681–1689, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00429-015-0997-8>>

STEWART, J.; DE WIT, H. Reinstatement of Drug-Taking Behavior as a Method of Assessing Incentive Motivational Properties of Drugs. In: **Methods of Assessing the Reinforcing Properties of Abused Drugs**. New York, NY: Springer New York, 1987. p. 211–227.

SUN, W.; REBEC, G. V. Lidocaine inactivation of ventral subiculum attenuates cocaine-seeking behavior in rats. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 23, n. 32, p. 10258–64, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14614084>>

THOMAS, K. L.; ARROYO, M.; EVERITT, B. J. Induction of the learning and plasticity-associated gene Zif268 following exposure to a discrete cocaine-associated stimulus. **The European journal of neuroscience**, [s. l.], v. 17, n. 9, p. 1964–72, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12752796>>

TING-KAI, U.; LUMENG, L. Alcohol Preference and Voluntary Alcohol Intakes of Inbred Rat Strains and the National Institutes of Health Heterogeneous Stock of Rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 485–486, 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6391261>>

TONEGAWA, S.; MORRISSEY, M. D.; KITAMURA, T. The role of engram cells in the systems consolidation of memory. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 19, n. 8, p. 485–498, 2018.

URRY, H. L. et al. Amygdala and ventromedial prefrontal cortex are inversely coupled during regulation of negative affect and predict the diurnal pattern of cortisol secretion among older adults. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 26, n. 16, p. 4415–25, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16624961>>

VAN DEN OEVER, M. C. et al. Prefrontal cortex plasticity mechanisms in drug seeking and relapse. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 276–84, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19932711>>

VEZINA, P.; LEYTON, M. Conditioned cues and the expression of stimulant sensitization in animals and humans. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 56 Suppl 1, p. 160–8, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18657553>>

VOLKOW, N. D. et al. Dopamine in drug abuse and addiction: results of imaging studies and treatment implications. **Archives of neurology**, [s. l.], v. 64, n. 11, p. 1575–9, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17998440>>

WALLACE, B. C. Psychological and environmental determinants of relapse in crack cocaine smokers. **Journal of substance abuse treatment**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 95–106, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2746717>>

WATANABE, H. et al. FOSB proteins in the orbitofrontal and dorsolateral prefrontal cortices of human alcoholics. **Addiction biology**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 294–7, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19523044>>

WEISS, F. Neurobiology of craving, conditioned reward and relapse. **Current Opinion in Pharmacology**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 9–19, 2005.

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

WISE, R. A. Dopamine, learning and motivation. **Nature reviews. Neuroscience**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 483–94, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15152198>>

XIE, X. et al. Subregion-specific role of glutamate receptors in the nucleus accumbens on drug context-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior in rats. **Addiction biology**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 287–99, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21521425>>

ZIRONI, I. et al. Context is a trigger for relapse to alcohol. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 167, n. 1, p. 150–155, 2006.

## *Capítulo 2*

***“Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre.”***

***(Marie Curie)***

**Efeito do etanol na morfologia dos interneurônios  
parvalbumina e o papel da proteína Hevin nas propriedades  
reforçadoras e na sensibilização comportamental induzida pelo  
etanol**



***1 Introdução***

A persistência de comportamentos como a recaída e o uso compulsivo de drogas, ao longo da vida de um dependente, sugere que a exposição as substâncias de abuso resultam em adaptações de longo prazo no sistema nervoso central (HAYDON et al., 2009). Por exemplo, estudos demonstram que plasticidades moleculares e sinápticas no sistema mesocorticolímbico estão relacionadas ao aumento da saliência motivacional, perda do controle do uso da droga e recaída (KOOB; VOLKOW, 2010; NESTLER; AGHAJANIAN, 1997).

Embora as alterações nos processos neurais tenham sido o foco de muitas pesquisas nas últimas décadas, o papel dos astrócitos nas plasticidades subjacentes à dependência de drogas, ainda não é bem compreendido (HAYDON et al., 2009). Dados da literatura indicam que os astrócitos atuam na regulação da formação, maturação, estabilidade e manutenção das sinapses neuronais (DZYUBENKO; GOTTSCHLING; FAISSNER, 2016; SLEZAK; PFRIEGER, 2003). Em contrapartida, disfunções nos astrócitos, promovem prejuízos na formação de plasticidades sinápticas (ADERMARK; BOWERS, 2016; SLEZAK; PFRIEGER, 2003). Pesquisas recentes demonstram que a exposição crônica ao etanol induz alterações na fisiologia dos astrócitos, causando efeitos pronunciados na excitabilidade, neurotransmissão e viabilidade neuronal (ADERMARK; BOWERS, 2016; AYERS-RINGLER et al., 2016; DAHCHOUR et al., 2000; DING et al., 2013; MULHOLLAND et al., 2009; SMITH, 1997). Além disso, Bull e colaboradores (2014) mostraram aumento na densidade dos astrócitos do núcleo acumbens de ratos abstinentes de etanol. Eles observaram que esta alteração se correlacionava positivamente à motivação dos animais em retomar o consumo dessa substância, após a retirada. Estes pesquisadores observaram ainda, maior densidade de astrócitos no núcleo acumbens dos ratos, após a autoadministração de etanol (BULL et al., 2014). Essas evidências sugerem que os astrócitos podem promover plasticidades sinápticas no sistema mesolímbico, modulando as respostas às substâncias de abuso, em particular ao etanol (HAYDON et al., 2009). Entretanto, mais estudos são necessários para melhor compreender os mecanismos envolvidos na ação plástica dos astrócitos.

Neste sentido, dados da literatura mostram que a ação dos astrócitos na função e estrutura sináptica está relacionada à liberação de proteínas

matricelulares (EROGLU, 2009; KUCUKDERELI et al., 2011). Dentre elas, a proteína matricelular Hevin. A proteína Hevin é constitutivamente expressa no sistema nervoso central de adultos, secretada por astrócitos, e tem como função regular a conectividade sináptica (EROGLU, 2009; JONES et al., 2011; KUCUKDERELI et al., 2011; LIVELY; RINGUETTE; BROWN, 2007). Kucukdereli et al. (2011) demonstraram que quando a Hevin foi adicionada em cultura primária de células ganglionares de neurônios retiniais purificados, ela estimulou a sinaptogênese de vias glutamatérgicas. Ao contrário, camundongos *knockout* para Hevin, apresentavam significativamente menos sinapses excitatórias e deficiência nas formações sinápticas. Esses pesquisadores observaram ainda, que a atividade sinaptogênica da Hevin era regulada por uma proteína homóloga a ela e também expressa por astrócitos, chamada SPARC (KUCUKDERELI et al., 2011).

Vários estudos têm associado Hevin e SPARC a transtornos psiquiátricos (CAMPOLONGO et al., 2012; IKEMOTO et al., 2000; JONES et al., 2010; VIALOU et al., 2010). Ikemoto et al. (2000) observaram que a administração crônica de anfetamina aumentou a quantidade de SPARC na amígdala e promoveu aumento da sensibilização locomotora a essa substância. Em relação a Hevin, Vialou et al. (2010) mostraram que camundongos susceptíveis ao estresse crônico social apresentaram comportamentos do tipo depressivo e menor expressão de Hevin no núcleo acumbens. Por outro lado, camundongos resilientes à esse tipo de estresse demonstraram aumento de Hevin no núcleo acumbens. Além disso, esses pesquisadores demonstraram que a superexpressão de Hevin no núcleo acumbens dos camundongos susceptíveis, promovia respostas do tipo anti-depressivas e de resiliência ao estresse.

O grupo de pesquisa coordenado pelo Dr. Vincent Vialou, têm realizado vários estudos sobre o papel da Hevin na dependência às drogas de abuso (MONGREDIEN et al., 2017). Neste sentido, este grupo observou que camundongos tratados cronicamente com cocaína apresentaram aumento de Hevin no núcleo acumbens, e que camundongos *knockout* para Hevin, diminuíram o comportamento de PCL induzido por esta substância (MONGREDIEN et al., 2017). Essas evidências sugerem o envolvimento da

Hevin no reforço positivo e/ou no processo de aprendizado condicionado induzido pela cocaína.

Mongredien e colaboradores (2017) observaram que a Hevin pode ser expressa tanto nos astrócitos, como nos interneurônios gabaérgicos parvoalbumina imunorreativos (PV) do estriado. Os PV estão distribuídos dispersamente pelo núcleo acumbens e estriado dorsal (COWAN et al., 1990; DAMODARAN; EVANS; BLACKWELL, 2014; TODTENKOPF et al., 2004), esses neurônios, por serem interligados por meio de junções comunicantes, são classificados como neurônios de disparo rápido (*fast-spiking*). Assim, apresentam alta sincronicidade de disparos entre si, atuando como importantes moduladores inibitórios da atividade dos neurônios espinhosos médios (MSNs, do inglês *medium spiny neurons*) estriatais (DAMODARAN; EVANS; BLACKWELL, 2014; KITA; KOSAKA; HEIZMANN, 1990; KOÓS; TEPPER, 1999). Dessa forma, Hevin ao ser liberada no estriado, tanto pelos astrócitos como pelos PV, poderia modular as respostas motivacionais às drogas, ao alterar a plasticidade sináptica nos MSNs.

Wang e colaboradores (2018) mostraram que a inibição seletiva dos interneurônios PV, no núcleo acumbens de camundongos, diminuiu a expressão da sensibilização locomotora e da PCL induzidas pela anfetamina. Além disso, mostraram que a inibição da sinalização dos interneurônios PV estava associada ao aumento da expressão de Fos no núcleo acumbens, confirmando que os neurônios PV regulam a atividade dos MSNs nessa região (WANG et al., 2018). Ainda neste contexto, Todtenkopf et al. (2004) demonstraram que a administração repetida de cocaína promoveu sensibilização locomotora e aumento do número de PV na região ventral e dorsal do estriado (TODTENKOPF et al., 2004). Entretanto, os efeitos da administração repetida de etanol na função e estrutura dos PV no estriado ainda não foram investigados.

Com base nas evidências apresentadas acima, nossa hipótese foi que a exposição repetida ao etanol poderia promover alterações nos interneurônios PV e/ou nos astrócitos, que por sua vez modulariam a liberação de Hevin no estriado, alterando a plasticidade sináptica e, conseqüentemente, as propriedades reforçadoras e motivacionais do etanol.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar os efeitos da administração repetida de etanol na morfologia dos interneurônios imunoreativos para parvoalbumina e o papel da proteína matricelular Hevin nas propriedades reforçadoras do etanol e na expressão da sensibilização locomotora induzida por esta substância.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o papel da Hevin astrocítica no consumo de etanol, na preferência condicionada por lugar e na expressão da sensibilização locomotora induzidos por essa substância.

- Avaliar o papel da Hevin neuronal na expressão da sensibilização locomotora induzida pelo etanol.

- Investigar os efeitos da administração repetida de etanol na arborização dendrítica dos interneurônios PV do estriado dorsal.

***3 Materiais e Métodos***

### 3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6J (20-25g), provenientes do laboratório Janvier-Labs (Paris, França) e camundongos transgênicos PV-Cre (25-35g), provenientes do biotério *rodent facility* do Instituto de Biologia Paris Seine (IBPS) (Paris, França). Os animais foram transferidos para o biotério do Departamento de Neurociência da Universidade Pierre et Marie Curie (UPMC - Paris, França), no mínimo 7 dias antes do início dos experimentos, sendo mantidos em condições controladas de temperatura ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e luz (ciclo de 12/12 horas, luzes acesas às 07:00 e apagadas às 19:00), e com livre acesso ao alimento e à água. Os animais permaneceram agrupados ( $n=5$ ) em caixas-moradia plásticas, exceto no período em que o consumo de etanol foi avaliado individualmente. Todos os experimentos foram realizados conforme as leis e políticas da União Europeia para uso de animais nas pesquisas em neurociência (European Committee Council Directive 2010/63/EU) e autorizados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Pré-Clinica (Comitê d'éthique en expérimentation animale - Charles Darwin, N° 01376.03).

### 3.2 Drogas

- Etanol (Sigma-Aldrich, 96%) diluído em água nas concentrações de 3%, 6%, 10% e 20% (p/v).

- Etanol (Sigma-Aldrich, 99,8%) diluído em salina (NaCl 0,9 %), na concentração de 20% (v/v) e administrado (0,109 mL/10 g, i.p.) na dose de  $1,75 \text{ g kg}^{-1}$ .

- Cetamina e xilazina ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.) dissolvidos em solução salina (NaCl 0,9 %).

### 3.3 Vetores virais

#### Ação nos astrócitos:

AAV2.5-**GFAP**-GFP (controle)

AAV2.5-**GFAP**-microRNA contra Hevin (supressão da Hevin)

#### Ação neuronal:



AAV2.2-hSyn-GFP (controle)

AAV2.2-hSyn-microRNA contra Hevin – (supressão Hevin)

Dependente da Cre-recombinase:

AAV2.2-Ef1 $\alpha$ -DIO-GFP

### **3.4 Cirurgia intracraniana para injeção de vírus**

Os camundongos foram anestesiados com cetamina e xilazina (100 mg kg<sup>-1</sup> e 10 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) e colocados no estereotáxico para receberem uma microinjeção bilateral de um dos vírus citados no item 3.3. A microinjeção foi realizada utilizando-se duas seringas Hamilton de 5  $\mu$ l, conectadas aos braços do estereotáxico. As agulhas foram introduzidas com ângulo de 10°, no núcleo acumbens ou no estriado dorsal, de acordo com as coordenadas a partir do bregma: NAc (AP +1,6 mm; ML +1,45 mm; D -4,3 mm) e estriado dorsal (AP +0,8 mm; ML +2,4 mm; DV -3,2 mm). Foi injetado 0,1  $\mu$ l do vírus por minuto, totalizando o volume de 0,5  $\mu$ l por hemisfério. Para minimizar a difusão do vírus a agulha injetora foi removida do local da injeção cinco minutos após o término da infusão.

### **3.5 Acesso Intermitente a Duas Garrafas**

Para avaliar o consumo voluntário de etanol utilizamos o protocolo de acesso intermitente a duas garrafas, de acordo com Hwa e colaboradores (2011). Durante esse procedimento, os animais foram colocados em gaiolas individuais onde foram expostos, durante 24 horas, a dois bebedouros simultaneamente, um contendo apenas água e outro contendo solução de etanol. As garrafas contendo solução de etanol foram oferecidas três vezes na semana (às segundas, quartas e sextas-feiras), durante 4 semanas. A concentração de etanol foi alterada de forma crescente na primeira semana de exposição 3, 6 e 10% (v/v). Nas semanas seguintes, os animais receberam solução de etanol 20% (v/v). A posição das garrafas era sempre alternada (entre direita e esquerda) para evitar a escolha de garrafas devido a posição.

A quantidade de etanol consumido foi calculada através da pesagem das garrafas antes e após elas serem oferecidas aos animais. Os valores foram normalizados pelo peso corporal de cada animal, sendo apresentados como

gramas de etanol/Kg. A quantidade de líquido perdida nos bebedouros por vazamento ou evaporação foi aferida por bebedouros colocados em gaiolas vazias no mesmo momento que as soluções teste foram expostas aos animais.

### **3.6 Preferência condicionada por lugar (PCL)**

A PCL foi realizada no labirinto em Y, utilizando-se apenas os braços em “V” do aparato. Dessa forma, o aparato da PCL consistia de dois compartimentos retangulares de acrílico (35 x 15 cm) - com a cor das paredes e a textura do assoalho distintas – separados por um compartimento central, triangular e neutro (15 x 15 x 15 cm). O procedimento foi baseado no descrito por Nocjar; Middaugh; Tavernetti (1999).

O protocolo experimental foi dividido em 3 fases: 1) habituação e pré-condicionamento, 2) condicionamento e 3) pós-condicionamento.

Na fase 1, os camundongos foram colocados no compartimento central do aparato e tiveram livre acesso aos compartimentos durante 15 min, por 3 sessões diárias. As duas primeiras sessões foram consideradas habituação ao aparato e a terceira sessão, indicou a preferência inicial do animal por cada compartimento (pré-condicionamento).

Posteriormente, na segunda fase, os camundongos passaram por 12 sessões diárias de condicionamento com duração de 10 min. Nos dias 4, 6, 8, 10, 12 e 14 os animais receberam injeções de etanol (1,75 g kg<sup>-1</sup>, i.p.) e foram confinados no compartimento em que passaram menor tempo no pré-condicionamento. Nos dias 5, 7, 9, 11, 13 e 15 os animais receberam injeções de salina (10 ml kg<sup>-1</sup>, i.p.) e foram confinados no compartimento oposto ao pareado com etanol. Para reduzir a possibilidade de associação aos possíveis efeitos aversivos das injeções intraperitoneais de etanol com o ambiente da PCL, logo após as injeções, os camundongos eram devolvidos à sua caixa-moradia por 5 min, e em seguida, eram colocados nos seus respectivos compartimentos.

No último dia da PCL, os animais passaram pelo teste de pós-condicionamento, no qual os camundongos foram colocados no compartimento central da caixa, com livre acesso aos compartimentos.

O tempo gasto nos compartimentos durante o pré-condicionamento e o pós-condicionamento, foi quantificado pelo programa IMETRONIC-PLACE PREFERENCE, instalado no computador que se conectava as câmeras presentes nas caixas da PCL. A preferência dos animais pelo ambiente pareado ao etanol foi quantificada pela comparação entre o tempo gasto no pré-condicionamento e no pós-condicionamento, no ambiente em que os animais foram expostos após as injeções de etanol.

### 3.7 Avaliação da atividade locomotora

A atividade locomotora induzida pelo etanol foi avaliada no aparato ciclotron (Imetronic), que consistia de um corredor circular - formado por dois cilindros plásticos transparentes - envolto por quatro feixes infravermelhos dispostos em ângulos de 90°, na base do aparato (65 cm<sup>2</sup>) (figura 31). Cada unidade de locomoção correspondia à interrupção consecutiva de dois feixes infravermelhos adjacentes.



**Figura 31.** Ciclotron (Imetronic, Pessac - France) - medidor automático da atividade locomotora. Fonte: <http://www.imetronic.com/devices/couloir-circulaire/>.

Através de uma interface eletrônica os sinais dos sensores infravermelhos comunicavam-se com o computador, e os dados eram coletados pelo programa IMETRONIC-CYCLOTRON.

### 3.8 Histologia

Ao final dos experimentos comportamentais envolvendo microinjeção viral, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.) e perfundidos com uma solução de paraformaldeído 4%. Os encéfalos foram removidos, pós-fixados em paraformaldeído por 2h e transferidos para solução de sacarose 30% em PBS  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, os encéfalos foram fatiados ao longo do trajeto da injeção, com o auxílio de um micrótomo de lâmina vibratória (Leica VT1000). As seções foram inspecionadas em microscopia óptica para visualização da dispersão da proteína fluorescente verde (GFP) ou da injúria no tecido, indicando o local da injeção.

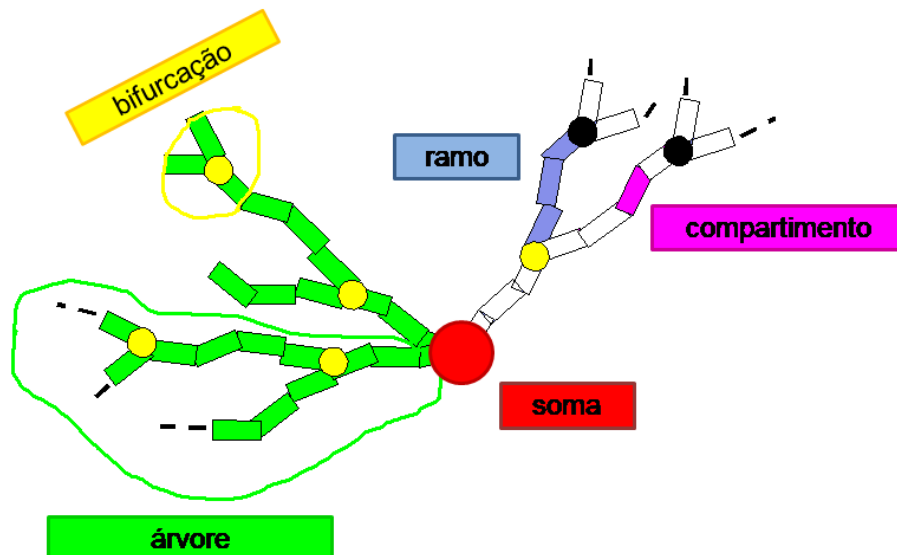
### 3.9 Administração de etanol

Camundongos transgênicos PV-Cre (25-35g) foram tratados durante 21 dias com uma injeção diária de etanol ( $1,75 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ou salina ( $10 \text{ ml kg}^{-1}$ ) pela via intraperitoneal. O tempo de tratamento foi realizado de acordo com Udomuksorn et al. (2011).

### 3.10 Análise morfológica por microscopia confocal

Camundongos PV-Cre foram anestesiados com cetamina e xilazina ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.) e perfundidos com paraformaldeído 4%. Os encéfalos foram removidos, pós-fixados em paraformaldeído por 2h e transferidos para solução de sacarose 30% em PBS  $4^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, os encéfalos foram seccionados com o auxílio de um micrótomo de lâmina vibratória (Leica VT1000), em fatias coronais de  $150 \mu\text{m}$ , contendo a região do estriado. Posteriormente as fatias foram fixadas em lâmina e lamínula com o auxílio do *Fluoromount* (Sigma-Aldrich). Fotos da arborização dendrítica dos neurônios PV do estriado dorsal, foram obtidas utilizando-se o microscópio confocal invertido (Leica TCS SP5, modelo DMI6000), com objetiva de 40X. Foram fotografados, aproximadamente, 7 neurônios por animal. As imagens obtidas foram analisadas por meio do programa *NeuronStudio*, que permite análise 3D da arborização dendrítica. Estas análises foram posteriormente processadas pelo programa *L-Measure* (LM v5.3), permitindo que a análise fosse dividida em categorias. Dessa forma, avaliamos: o volume e o

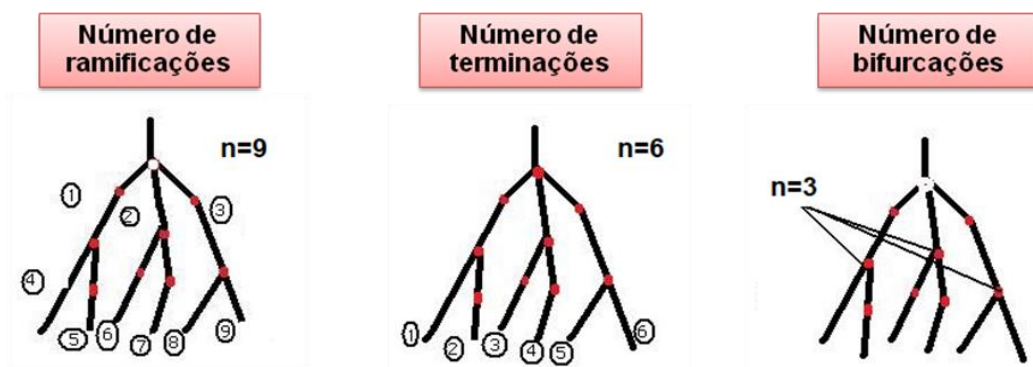
comprimento dos compartimentos dendríticos; o número de ramificações, o número de terminações, o número de bifurcações; e a ordem das ramificações dendríticas. A figura 32 indica os elementos que constituem a arborização dendrítica.



**Figura 32.** Imagem ilustrativa indicando os elementos que constituem a arborização dendrítica. Fonte: <http://cng.gmu.edu:8080/Lm/help/index.htm>.

O volume do compartimento dendrítico foi calculado pela fórmula ( $\pi \times r^2 \times h$ ), na qual  $r$  é o raio e  $h$  é a altura do compartimento.

Um ramo refere-se a um ou mais compartimentos que se situam entre dois pontos de ramificação ou entre um ponto de ramificação e um ponto de terminação. A figura 33 ilustra o número de ramos, terminações e bifurcações.



**Figura 33.** Imagem ilustrativa identificando o número de ramificações, terminações e bifurcações de um neurônio. Fonte: <http://cng.gmu.edu:8080/Lm/help/index.htm>.

A ordem de bifurcação refere-se a ordem da ramificação em relação ao soma, onde o soma tem ordem = 0. Assim, a primeira bifurcação tem ordem = 1, a segunda tem ordem = 2, e assim sucessivamente.

### 3.11 Análise estatística

Os dados comportamentais de consumo de etanol, PCL e expressão da sensibilização locomotora foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas. A habituação e o efeito agudo do etanol na atividade locomotora foram analisados por meio da ANOVA unifatorial. Nos casos em que foram detectadas diferenças pela ANOVA, a análise prosseguiu com o teste *post-hoc* de Newman-Keuls. As medidas dependentes e fatores utilizados estão detalhados na seção resultados.

Os dados de microscopia confocal foram analisados pela distribuição *t* de *Student*.

Todas as análises foram feitas com o programa *Statistic StatSoft*.

Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos em todas as análises.

*4 Delineamento experimental*

#### **4.1 Experimento 1 - Papel da Hevin astrocítica nas propriedades reforçadoras do etanol**

##### ***4.1.1 Experimento 1A - Efeito da inibição da Hevin nos astrócitos do núcleo acumbens no consumo de etanol em camundongos***

Camundongos C57BL/6J machos foram submetidos a cirurgia estereotáxica para a injeção viral no núcleo acumbens, conforme descrito no item 3.4. Nos animais do grupo GFP (controle), foi injetado o vírus AAV2.5-**GFAP**-GFP, e nos animais do grupo miRNA Hevin (supressão da Hevin), foi injetado o vírus AAV2.5-**GFAP**-miRNA contra Hevin. Vinte e três dias após a cirurgia (tempo necessário para o espraiamento do vírus), os camundongos foram individualizados nas caixas-moradia e mantidos isolados para habituação por 7 dias. Em seguida, iniciou-se o procedimento para análise do consumo de etanol no acesso intermitente a duas garrafas (item 3.5), com duração de quatro semanas. O número de animais por grupo foi: GFP (n=8) e miRNA Hevin (n=10).

##### ***4.1.2 Experimento 1B - Efeito da inibição da Hevin nos astrócitos do núcleo acumbens na preferência condicionada por lugar induzida pelo etanol***

Ao término do experimento 4.1.1, os mesmos animais foram agrupados novamente. Sete dias após, iniciamos o procedimento da PCL (item 3.6), com duração de 16 dias. Os animais, tanto do grupo GFP, como do grupo miRNA Hevin, receberam injeções de etanol (1,75 g kg<sup>-1</sup>, i.p.), alternadas com salina (10 ml kg<sup>-1</sup>, i.p.), durante os dias de condicionamento da PCL. Ao final do experimento, o número de animais por grupo foi: GFP (n=6) e miRNA Hevin (n=9).

#### **4.2 Experimento 2 - Efeito da inibição da Hevin nos astrócitos do estriado dorsal na sensibilização locomotora induzida pelo etanol**

Camundongos C57BL/6J machos foram submetidos à cirurgia estereotáxica para a injeção de vírus no estriado dorsal, conforme descrito no item 3.4. Três grupos foram formados após a cirurgia: o grupo GFP, que



recebeu a injeção do vírus AAV2.5-**GFAP**-GFP; o grupo miRNA Hevin, que recebeu a injeção do vírus AAV2.5-**GFAP**-miRNA contra Hevin; e o grupo Sham, que passou por todo o procedimento cirurgico, mas não recebeu injeção viral.

Trinta dias após a cirurgia, iniciamos o protocolo de sensibilização, com duração de 21 dias, baseado no protocolo descrito por Bahi; Dreyer (2012). Nos dois primeiros dias do protocolo, todos os animais receberam injeção de salina (10 ml kg<sup>-1</sup>, i.p.) e foram colocados no ciclotron para avaliação da atividade locomotora (item 3.7) por 20 min. Essa fase foi chamada de habituação e foi necessária para eliminar os efeitos da novidade do ambiente na locomoção dos animais. Após essa fase, os animais foram submetidos a fase de desenvolvimento da sensibilização, com duração de 13 dias. Nessa fase, os animais do grupo GFP e miRNA Hevin receberam injeção de etanol (1,75 g kg<sup>-1</sup>, i.p.) e os animais do grupo Sham receberam injeção de salina (10 ml kg<sup>-1</sup>, i.p.), diariamente. Assim, formaram-se os grupos: Sham-salina, GFP-EtOH e miRNA Hevin-EtOH. No primeiro dia da fase de sensibilização, após as injeções, os animais foram colocados no ciclotron por 20 min, para avaliação do efeito agudo do etanol na locomoção dos camundongos. Seguido da fase de desenvolvimento da sensibilização, entre os dias 16 e 19, os animais não receberam nenhuma injeção. No dia 20, todos os animais receberam uma injeção de etanol (1,75 g kg<sup>-1</sup>, i.p.) e foram colocados no ciclotron para avaliação da atividade locomotora por 20 min. No dia seguinte, todos os animais receberam uma injeção de salina (10 ml kg<sup>-1</sup>, i.p.) e foram colocados no ciclotron para avaliação da atividade locomotora por 20 min. A expressão da sensibilização locomotora foi avaliada comparando-se a atividade locomotora entre os grupos (Sham-salina, GFP-EtOH e miRNA Hevin-EtOH), após as injeções de etanol e salina. O número de animais por grupo foi: Sham-Salina (n=6), GFP-EtOH (n=7) e miRNA Hevin-EtOH (n=9).

### **4.3 Experimento 3 - Efeito da inibição da Hevin nos neurônios do estriado dorsal na sensibilização locomotora induzida pelo etanol**

Camundongos C57BL/6J machos foram submetidos à cirurgia estereotóxica para a injeção de vírus no estriado dorsal, conforme descrito no

item 3.4. Após a cirurgia, três grupos foram formados: o grupo GFP, que recebeu a injeção do vírus AAV2.2-hSyn-GFP (controle); o grupo miRNA Hevin, que recebeu a injeção do vírus AAV2.2-hSyn-miRNA contra Hevin (supressão Hevin); e o grupo Sham, que passou por todo o procedimento cirúrgico, mas não recebeu injeção viral.

Trinta dias após a cirurgia, iniciamos o protocolo de sensibilização locomotora, conforme descrito no experimento anterior (item 4.2). O número de animais por grupo foi: Sham-Salina (n=6), GFP-EtOH (n=7) e miRNA Hevin-EtOH (n=9).

#### **4.4 Experimento 4 - Efeito da exposição repetida ao etanol na morfologia dos interneurônios parvalbumina imunorreativos do estriado dorsal**

Camundongos transgênicos PV-Cre foram submetidos à cirurgia estereotáxica para a injeção do vírus AAV2.2-Ef1 $\alpha$ -DIO-GFP no estriado dorsal, conforme descrito no item 3.4. Dez dias após a cirurgia, receberam uma injeção diária de salina (10 ml kg<sup>-1</sup>) ou etanol (1,75 mg kg<sup>-1</sup>) durante 21 dias.

O vetor viral possuía um promotor constitutivo e uma sequência de leitura gênica invertida para a proteína de fluorescência verde (GFP). Essa sequência gênica localizava-se entre dois sítios “LoxP”, fazendo com que o gene não possa ser transcrito, a menos que, a enzima Cre-recombinante se ligue aos sítios “LoxP” e coloque o gene na sequência correta de leitura.

Os camundongos transgênicos PV-Cre possuem expressão transitória da enzima Cre-recombinante. Essa enzima ao se ligar nos dois sítios “LoxP” do DNA viral, inverte a sequência de leitura do gene que está localizado entre os sítios “LoxP”, e dessa forma, permite a expressão da proteína GFP. Assim, apenas os interneurônios PV passam a expressar a proteína GFP, podendo ser identificados por microscopia confocal.

Vinte e quatro horas após o término do tratamento com salina ou etanol, os animais foram anestesiados, com cetamina e xilazina (100 mg kg<sup>-1</sup> e 10 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), perfundidos e os encéfalos fixados em paraformaldeído 4%. Posteriormente, os encéfalos foram seccionados em fatias coronais de 150  $\mu$ m de espessura para análise morfológica por microscopia confocal (item 3.10).

Foram utilizados 4 animais por grupo. As análises morfológicas representam a média dos neurônios analisados por grupo: salina (n=17) e etanol (n=26).

*5 Resultados*

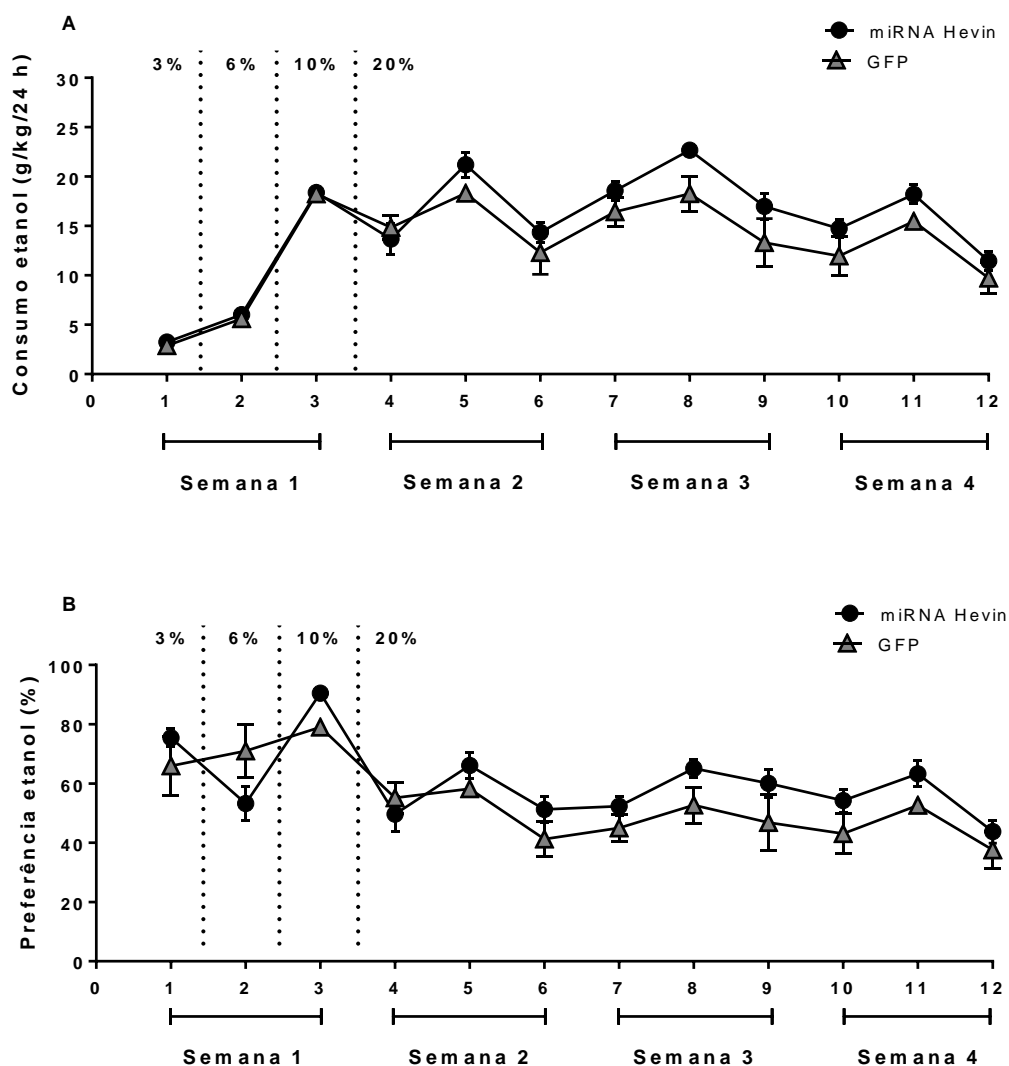
**5.1 Experimento 1 - Papel da Hevin astrocítica nas propriedades reforçadoras do etanol**

**5.1.1 Experimento 1A - Efeito da inibição da Hevin nos astrócitos do núcleo acumbens no consumo de etanol em camundongos**

A figura **34A** mostra o consumo médio de diferentes concentrações de solução de etanol (g/kg) pelos animais ao longo das 4 semanas de exposição. O gráfico indica consumo de etanol (g/kg) ascendente nas concentrações de 3, 6 e 10%, em ambos os grupos. Entretanto, o consumo de etanol (g/Kg) permanece constante, nos dois grupos, comparando-se as concentrações de 10 e 20%.

A figura **34B** mostra a porcentagem de preferência por diferentes concentrações de solução de etanol [razão: consumo de etanol (g) / consumo total de líquido (g)], durante as 4 semanas de exposição. A preferência pelo etanol tendeu a aumentar, em ambos os grupos, entre as concentrações de etanol de 3 e 10%, no entanto, ocorreu diminuição na preferência ao etanol entre as concentrações de 10 e 20%.

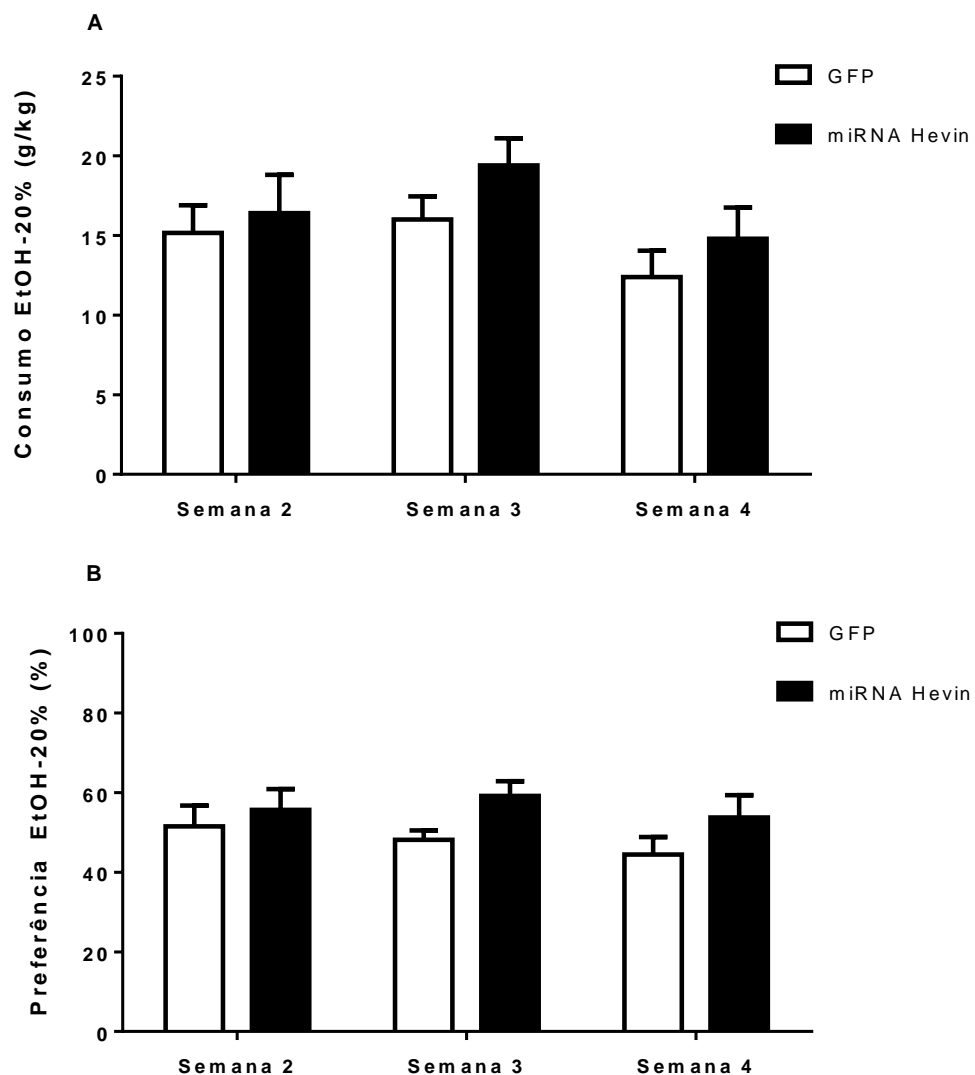
As análises estatísticas do consumo e da preferência pelo etanol na concentração de 20% encontra-se adiante, na figura 35.



**Figura 34.** Efeito da inibição da Hevin astrocítica no consumo e preferência pela solução de etanol em camundongos. **(A)** Consumo de etanol em solução por camundongos no modelo de acesso intermitente a duas garrafas. Os dados representam a média  $\pm$  EPM do consumo diário de solução de etanol em diferentes concentrações, durante as 4 semanas de quantificação (3 dias / semana). **(B)** Preferência pelo etanol em solução pelos camundongos no modelo de acesso intermitente a duas garrafas. Os dados representam a média  $\pm$  EPM da preferência pelas soluções de etanol em diferentes concentrações, durante as 4 semanas de quantificação (3 dias / semana). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n=8-10 por grupo).

A figura **35A** e **35B** mostra o consumo médio e a porcentagem de preferência pela solução de etanol 20%, respectivamente, durante as 3 últimas semanas de exposição. Para o consumo de solução de etanol 20%, ANOVA de medidas repetidas indicou diferença significativa para o fator tempo (semanas:  $F_{1,8} = 30,81$   $p < 0,05$ ), porém, não indicou alteração significativa para o fator tratamento (GFP, miRNA Hevin:  $F_{1,8} = 0,91$   $p > 0,05$ ). Além disso, nenhuma interação significativa entre tratamento e tempo ( $F_{1,8} = 0,18$   $p > 0,05$ ) foi

observada. Em relação a preferência por solução de etanol 20%, ANOVA de medidas repetidas não revelou diferença significativa nem para o fator tempo (semanas:  $F_{1,8} = 2,08$   $p > 0,05$ ) e nem para o fator tratamento (GFP, miRNA Hevin:  $F_{1,8} = 1,87$   $p > 0,05$ ). Nenhuma interação foi observada entre os fatores ( $F_{1,8} = 0,88$   $p > 0,05$ ). Assim, a inibição da proteína Hevin liberada pelos astrócitos no núcleo acumbens, não alterou o consumo e a preferência de camundongos para a solução de etanol 20% no modelo de acesso intermitente a duas garrafas.

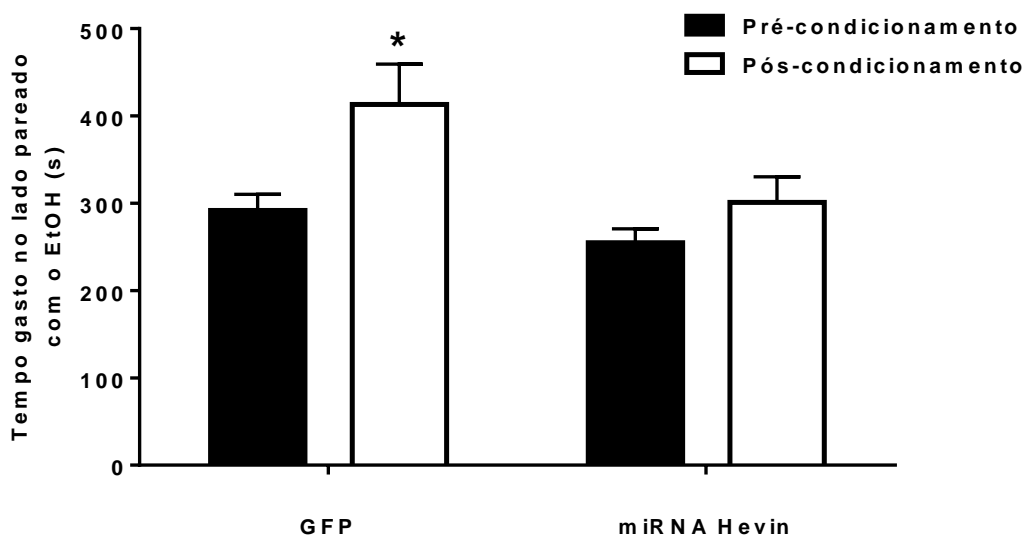


**Figura 35.** Efeito da inibição da Hevin astrocítica no consumo e preferência pela solução de etanol em camundongos. (A) Consumo de solução de etanol 20% por camundongos no modelo de acesso intermitente a duas garrafas. Os dados representam a média  $\pm$  EPM do consumo semanal de solução de etanol 20%, durante as 3 semanas de quantificação (3 dias / semana). (B) Preferência pela solução de etanol 20% pelos camundongos no modelo de acesso intermitente a duas garrafas. Os dados representam a média  $\pm$  EPM da preferência

semanal pela solução de etanol 20%, durante as 3 semanas de quantificação (3 dias / semana) (n=8-10 por grupo).

### 5.1.2 Experimento 1B - Efeito da inibição da Hevin nos astrócitos do núcleo acumbens na preferência condicionada por lugar induzida pelo etanol

Os resultados da PCL estão mostrados na figura 36. ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo para os fatores tratamento (GFP, miRNA Hevin:  $F_{1,13} = 5,35$ ;  $p < 0,05$ ) e condicionamento (pré, pós:  $F_{1,13} = 11,62$ ;  $p < 0,05$ ). As comparações entre pré e pós-condicionamento indicaram que os animais controle GFP permaneceram mais tempo no ambiente pareado ao etanol no pós-condicionamento, enquanto que os animais que receberam microRNA contra Hevin no núcleo acumbens não apresentaram alteração significativa no tempo gasto no compartimento pareado ao etanol após o condicionamento ( $p < 0,05$ ). Portanto, a inibição de Hevin astrocítica no núcleo acumbens inibiu a indução da PCL pelo etanol.

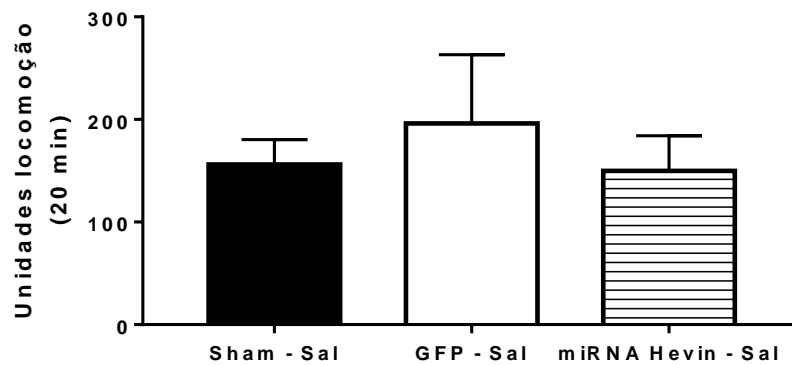


**Figura 36.** Efeito da inibição da Hevin astrocítica na preferência condicionada por lugar (PCL) induzida pelo etanol em camundongos. Os dados representam a média  $\pm$  EPM do tempo gasto no ambiente pareado às injeções de etanol (1,75 g/kg) no grupo GFP e no grupo miRNA Hevin (n=6-9 animais por grupo). \* =  $p < 0,05$  em relação ao pré-condicionamento do mesmo grupo.

### 5.2 Experimento 2 - Efeito da inibição da Hevin nos astrócitos do estriado dorsal na sensibilização locomotora induzida pelo etanol

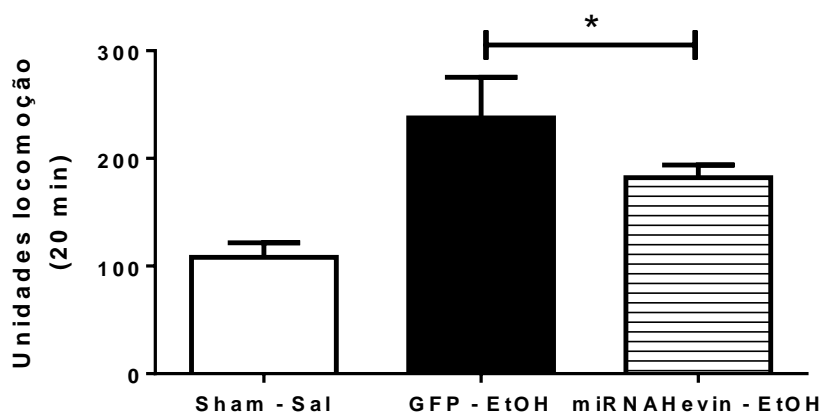


A figura 37 mostra a atividade locomotora dos animais após receberem salina no segundo dia da habituação. ANOVA unifatorial não indicou diferença significativa entre os grupos ( $F_{1,19} = 2,22$   $p > 0,05$ ). Ou seja, as injeções virais não influenciaram a atividade locomotora basal dos animais.



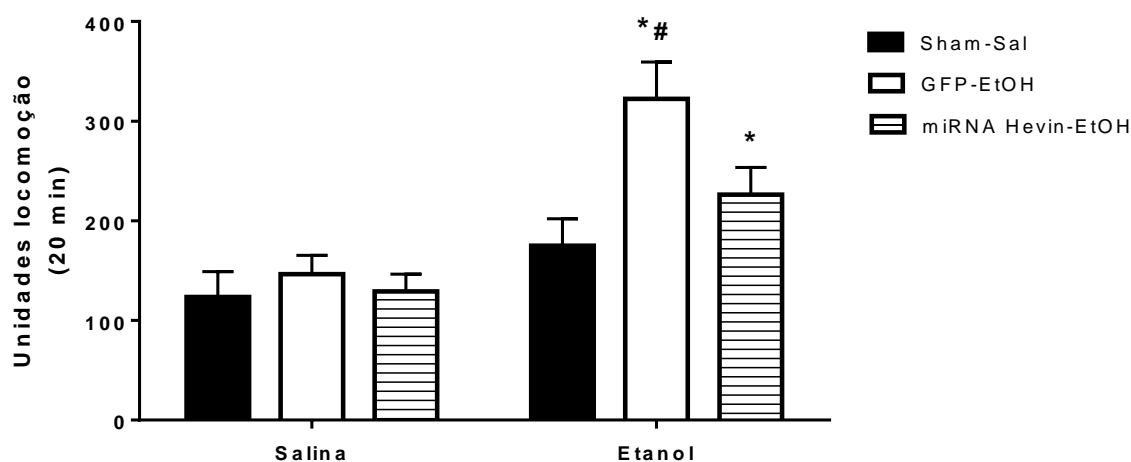
**Figura 37.** Efeito da inibição da Hevin astrocítica na atividade locomotora basal dos camundongos após a injeção de salina durante a habituação. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n=6-9 por grupo).

O efeito agudo do etanol na atividade locomotora pode ser observado na figura 38. ANOVA unifatorial revelou diferença significativa para o fator tratamento (salina, etanol :  $F_{1,19} = 6,87$   $p > 0,05$ ). A análise comparativa indicou que os grupos que receberam etanol eram diferentes do grupo que recebeu salina, porém não foram observadas diferenças significativas entre os grupos GFP-EtOH e miRNA Hevin-EtOH. Assim, a inibição da Hevin astrocítica no estriado dorsal não alterou a resposta de aumento da atividade locomotora induzida pela exposição aguda ao etanol.



**Figura 38.** Efeito da inibição da Hevin astrocítica na atividade locomotora de camundongos após a injeção aguda de etanol (1,75 g/kg) ou salina. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n=6-9 por grupo). \* =  $p < 0,05$  em relação ao grupo salina.

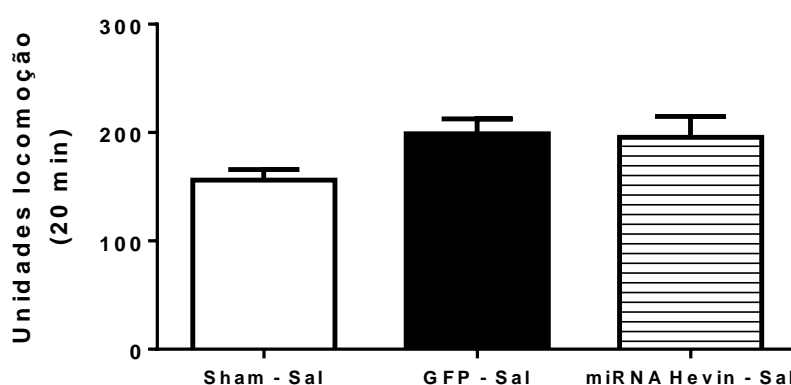
A figura 39 mostra o efeito da inibição da Hevin astrocítica no estriado dorsal, na expressão da sensibilização locomotora induzida pela exposição repetida ao etanol. ANOVA de medidas repetidas revelou diferenças significativas considerando os fatores teste (salina, etanol:  $F_{1,19} = 34,83$ ;  $p < 0,05$ ) e cirurgia (sham, GFP, miRNA Hevin:  $F_{1,19} = 3,95$ ;  $p < 0,05$ ). Além disso, foi observada interação significativa entre os fatores ( $F_{1,19} = 3,65$ ;  $p < 0,05$ ). As análises comparativas indicaram que o grupo GFP-EtOH, quando recebeu injeção de etanol no dia do teste, apresentou maior atividade locomotora quando comparado aos demais grupos. Além disso, observou-se maior atividade locomotora quando os animais do grupo miRNA Hevin-EtOH receberam etanol em comparação ao recebimento de salina. Dessa forma, a inibição da Hevin astrocítica no estriado dorsal bloqueou a expressão da sensibilização locomotora induzida pelo tratamento repetido com etanol.



**Figura 39.** Efeito da inibição da Hevin astrocítica na expressão da sensibilização locomotora induzida pela exposição repetida ao etanol. Atividade locomotora dos camundongos após o teste com salina ou etanol (1,75g/kg). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n=6-9 por grupo). \* =  $p < 0,05$  em relação ao seu grupo controle; # =  $p < 0,05$  em relação aos outros grupos.

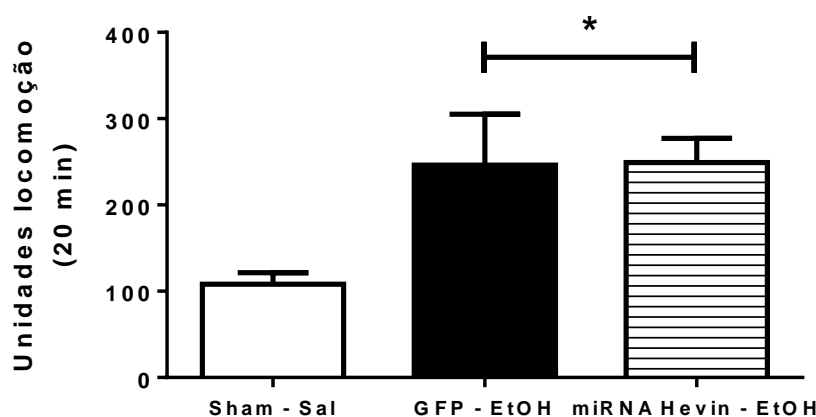
### 5.3 Experimento 3 - Efeito da inibição da Hevin neuronal do estriado dorsal na expressão da sensibilização locomotora induzida pelo etanol

A atividade locomotora basal dos camundongos após receberem salina no segundo dia da habituação está demonstrada na figura 40. ANOVA unifatorial não revelou diferença significativa entre os grupos ( $F_{1,19} = 2,22$   $p > 0,05$ ). Assim, as injeções virais não alteraram a atividade locomotora basal dos animais.



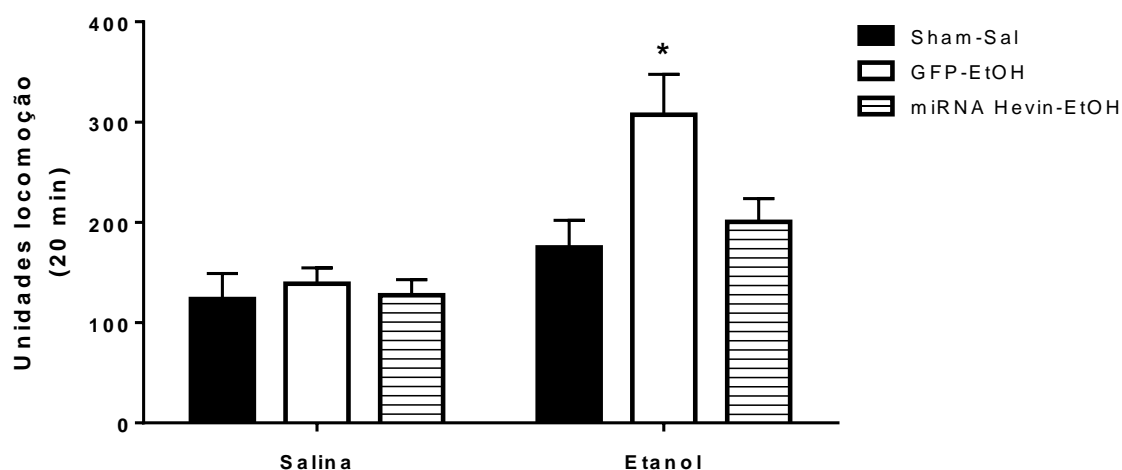
**Figura 40.** Efeito da inibição da Hevin neuronal na atividade locomotora basal dos camundongos após a injeção de salina durante a habituação. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n=6-9 por grupo).

A figura 41 mostra o efeito agudo do etanol na atividade locomotora dos camundongos. ANOVA unifatorial revelou diferença significativa para o fator tratamento (salina, etanol :  $F_{1,19} = 6,87$   $p > 0,05$ ). As análises comparativas revelaram que os grupos que receberam etanol eram diferentes do grupo que recebeu salina, porém não foram observadas diferenças significativas entre os grupos GFP-EtOH e miRNAHevin-EtOH. Assim, a injeção aguda de etanol promoveu aumento da atividade locomotora nos animais, e a inibição da Hevin neuronal no estriado dorsal não alterou essa resposta.



**Figura 41.** Efeito da inibição de Hevin neuronal na atividade locomotora de camundongos após a injeção aguda de etanol (1,75 g/kg) ou salina. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n=6-9 por grupo). \* =  $p < 0,05$  em relação ao grupo salina.

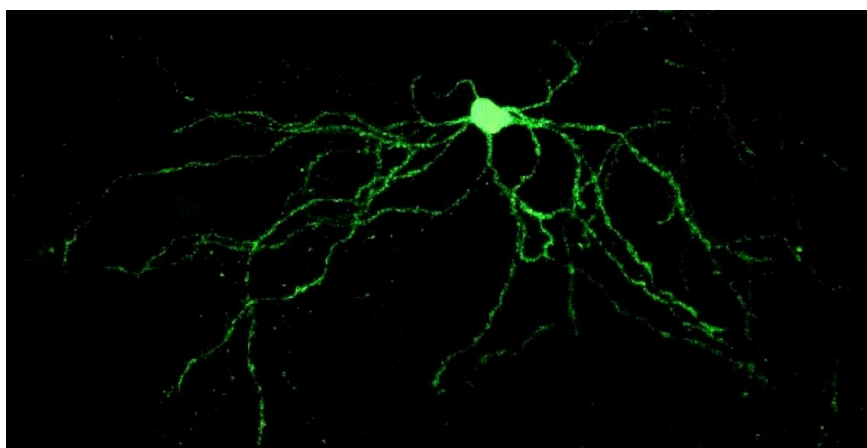
O efeito da inibição da Hevin neuronal no estriado dorsal na expressão da sensibilização locomotora induzida pelo tratamento repetido com etanol pode ser observado na figura 42. ANOVA de medidas repetidas revelou diferenças significativas considerando os fatores teste (salina, etanol:  $F_{1,19} = 34,83$ ;  $p < 0,05$ ) e cirurgia (sham, GFP, miRNA Hevin:  $F_{1,19} = 3,95$ ;  $p < 0,05$ ). Além disso, foi observada interação significativa entre os fatores ( $F_{1,19} = 3,65$ ;  $p < 0,05$ ). As análises comparativas indicaram que o grupo GFP cronicamente tratado com etanol e que receberam etanol no dia do teste, apresentou maior atividade locomotora quando comparado aos demais grupos. Além disso, não houve diferença significativa no grupo miRNA Hevin quando os animais foram testados com salina ou etanol. Assim, a inibição da Hevin neuronal no estriado dorsal bloqueou a expressão da sensibilização locomotora induzida pelo tratamento repetido com etanol.



**Figura 42.** Efeito da inibição da Hevin neuronal na expressão da sensibilização locomotora induzida pela exposição repetida ao etanol. Atividade locomotora dos camundongos após o teste com salina ou etanol (1,75g/kg). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n=6-9 por grupo). \* =  $p < 0,05$  em relação aos outros grupos.

#### 5.4 Experimento 4 - Efeito da exposição repetida ao etanol na morfologia dos interneurônios parvalbumina imunorreativos do estriado dorsal

A figura 43 mostra um interneurônio PV representativo, marcado com proteína fluorescente verde (GFP), após a injeção do vírus dependente da Cre-recombinase (AAV2.2-Ef1 $\alpha$ -DIO-GFP) em camundongos PV-Cre.



**Figura 43.** Imagem representativa de um interneurônio PV do estriado dorsal marcado com proteína fluorescente verde (GFP).

A figura 44 mostra as análises geométricas dos compartimentos dendríticos dos interneurônios PV do estriado. O teste  $t$  de Student revelou aumento do volume do compartimento dendrítico ( $t_{(41)} = 3,30$ ;  $p < 0,05$ ; Fig. 44A), após o tratamento repetido com etanol, quando comparado com a salina.

Entretanto, não observamos diferença significativa no comprimento dos compartimentos ( $t_{(41)} = 1,49$ ;  $p > 0,05$ ; Fig. **44B**), após as injeções repetidas de salina ou etanol.

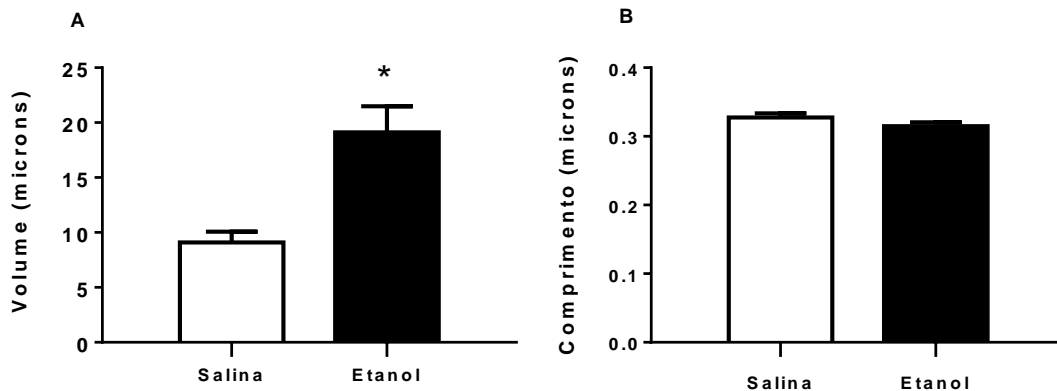
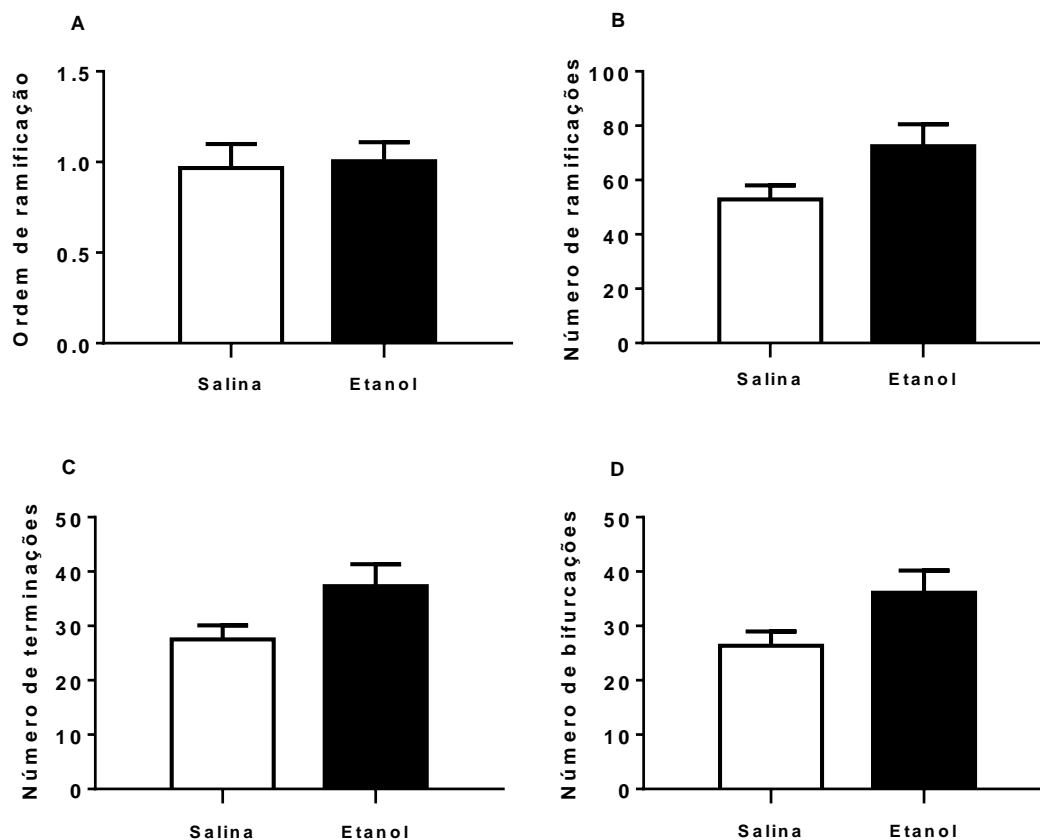


Figura 44. Análise geométrica dos comprimentos dendríticos dos interneurônios PV do estriado dorsal. (A) Volume do compartimento dendrítico e (B) comprimento dos compartimentos dendríticos nos animais tratados cronicamente com salina ou etanol ( $1,75 \text{ g kg}^{-1}$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EPM dos neurônios do grupo salina ( $n=17$ ) e etanol ( $n=26$ ) durante 21 dias. \*  $p < 0,05$  em relação aos outros grupos.

A figura **45** mostra a ordem de ramificação dos dendritos a partir do soma; número de ramificações, de terminações e de bifurcações. O test  $t$  de Student não revelou diferença significativa na ordem de ramificação dos dendritos após os tratamentos com salina ou etanol ( $t_{(41)} = 0,22$ ;  $p > 0,05$ ; Fig. **45A**). Também não houve diferença significativa para o número de ramificações ( $t_{(41)} = 1,78$ ;  $p = 0,08$ ; Fig. **45B**), número de terminações ( $t_{(41)} = 1,78$ ;  $p = 0,08$ ; Fig. **45C**) e número de bifurcações ( $t_{(41)} = 1,78$ ;  $p = 0,08$ ; Fig. **45D**).



**Figura 45.** Ordem e número de ramificações, número de terminações e número de bifurcações dendríticas nos interneurônios PV do estriado dorsal. **(A)** Ordem de ramificação dendrítica, **(B)** número de ramificações, **(C)** número de terminações e **(D)** número de bifurcações, após as injeções repetidas de salina ou etanol ( $1,75 \text{ g kg}^{-1}$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EPM dos neurônios dos animais que receberam salina ( $n=17$ ) ou etanol ( $n=26$ ) durante 21 dias.

**6 Discussão**



No presente estudo, investigamos o efeito da inibição da Hevin nos astrócitos e neurônios estriatais, no consumo de etanol, na preferência condicionada por lugar e na expressão da sensibilização locomotora induzida pelo etanol em camundongos. Avaliamos ainda, se a administração repetida de etanol promoveria alterações morfológicas nos dendritos dos interneurônios parvoalbumina. Nossos resultados demonstraram que (I) a inibição da Hevin astrocítica no núcleo acumbens não alterou o consumo de etanol, porém diminuiu a preferência condicionada por lugar induzida por essa substância; (II) a inibição da Hevin astrocítica e neuronal no estriado dorsal diminuiu a sensibilização locomotora induzida pelo etanol, e (III) injeções repetidas de etanol aumentou o volume do compartimento dendrítico dos interneurônios parvoalbumina no estriado dorsal de camundongos.

As plasticidades decorrentes do uso repetido de etanol, sensibilizam o sistema de recompensa e aumentam a saliência motivacional tanto para o consumo como para os estímulos associados ao uso dessa substância (KOOB et al., 2004; SINHA, 2001). Estudos sugerem que os astrócitos podem promover plasticidades sinápticas no sistema mesolímbico, modulando as respostas comportamentais às substâncias de abuso (HAYDON et al., 2009). Um dos mecanismos envolvidos na ação plástica dos astrócitos é a liberação de proteínas matricelulares, como a Hevin, que tem como função regular a conectividade sináptica (EROGLU, 2009; JONES et al., 2011; KUCUKDERELI et al., 2011; LIVELY; RINGUETTE; BROWN, 2007).

Nossos resultados mostraram que a inibição da Hevin astrocítica no núcleo acumbens, não alterou o consumo de etanol no modelo de acesso intermitente entre duas garrafas, mas inibiu a PCL induzida por essa substância. Os resultados obtidos corroboram com os encontrados por Mongredien et al. (2017) que observaram que camundongos tratados cronicamente com cocaína apresentaram aumento de Hevin no núcleo acumbens, e que camundongos *knockout* para essa proteína, diminuíram o comportamento de PCL induzido pela cocaína.

Em relação ao consumo de etanol, diferente dos nossos resultados, Bull e colaboradores (2014) demonstraram que os astrócitos modulam o consumo dessa substância, em ratos. Esses pesquisadores observaram que o aumento

do número de astrócitos no núcleo acumbens estava correlacionado a maior motivação dos animais em retomarem a autoadministração de etanol, após a abstinência. No entanto, algumas considerações devem ser feitas em relação aos nossos resultados. Por exemplo, independentemente do tratamento, nossos camundongos apresentaram diminuição no consumo de etanol 20% durante as semanas de exposição, sendo que o esperado nesse protocolo, era o consumo permanecer estável ou aumentar no decorrer das exposições (HWA et al., 2011). Além disso, o consumo de etanol em g/kg foi menor em nosso experimento (15 g/kg), quando comparado aos resultados de Hwa e colaboradores (2011), que mostraram consumo de etanol na média de 20 g/kg. Nossos resultados, também mostraram que a preferência pelo etanol foi baixa, em torno de 50%, valor que geralmente é observado em camundongos que são expostos ao protocolo de acesso contínuo ao etanol (HWA et al., 2011). A preferência pelo etanol no protocolo de acesso intermitente, encontra-se na faixa de 60 a 70% (HWA et al., 2011). Baseado nessas observações, podemos inferir que possivelmente nosso protocolo não foi eficiente em modelar um consumo estável e consistente de etanol, fato que pode ter influenciado a ausência de alterações no consumo de etanol entre os grupos GFP e miRNA Hevin. Dessa forma, outros estudos são necessários para avaliar a participação da Hevin astrocítica no consumo dessa substância.

Os resultados obtidos demonstraram ainda, que a inibição da Hevin astrocítica no estriado dorsal atenuou a expressão da sensibilização locomotora induzida pelo etanol, sem alterar o aumento da atividade locomotora promovido pela injeção aguda dessa substância. Narita et al. (2005) mostraram que o aumento da atividade locomotora, promovida pelo tratamento repetido com metanfetamina, foi positivamente correlacionado ao número de astrócitos no núcleo acumbens de camundongos. Esses pesquisadores demonstraram ainda, que o desenvolvimento da sensibilização locomotora induzida pela metanfetamina, foi bloqueado pela inibição da PKC, uma proteína envolvida na modulação da plasticidade sináptica (NARITA et al., 2005). Esses dados, em conjunto com nossos resultados, sugerem que a exposição repetida à substâncias de abuso podem promover alterações nos astrócitos, que por

sua vez, modulam proteínas sinaptogênicas envolvidas no desenvolvimento da sensibilização comportamental.

Em resumo, nossos resultados sugerem que a proteína Hevin astrocítica parece estar envolvida nas neuroplasticidades subjacentes ao reforço positivo, aprendizado condicionado e sensibilização locomotora induzida pelo tratamento repetido com etanol.

É bem descrito na literatura, que plasticidades nos MSNs do estriado, promovidas pelo uso crônico de drogas, estão associadas às alterações comportamentais, como sensibilização comportamental, uso compulsivo e recaída durante a abstinência (LÜSCHER; MALENKA, 2011; SMITH et al., 2013; STEFANIK; KUPCHIK; KALIVAS, 2016; WOLF, 2010). Os interneurônios GABAérgicos parvoalbumina exercem controle importante sobre a atividade dos MSNs estriatais (DAMODARAN; EVANS; BLACKWELL, 2014; KITA; KOSAKA; HEIZMANN, 1990; KOÓS; TEPPER, 1999). Dessa forma, alterações na quantidade e na morfologia dos interneurônios PV, podem influenciar os comportamentos relacionados à dependência (TODTENKOPF et al., 2004; WANG et al., 2018; WARREN; WHITAKER, 2018). Entretanto, o papel dos interneurônios PV estriatais nesses comportamentos ainda é pouco investigado.

Nossos resultados mostraram que injeções repetidas de etanol promoveram aumento do volume dos compartimentos dendríticos dos interneurônios PV localizados no estriado dorsal. Além disso, demonstramos que a inibição da Hevin nesses neurônios, bloqueou a expressão da sensibilização locomotora induzida pelo etanol.

Ellender e colaboradores (2014), demonstraram que os compartimentos dendríticos, dos interneurônios PV, de maior ou menor volume, apresentavam respostas distintas na concentração de íons cloreto intracelular, após a ativação de receptores do tipo GABA<sub>A</sub> nesses neurônios. Esses pesquisadores observaram que compartimentos dendríticos de maior volume, eram mais resistentes ao acúmulo de íons cloreto, quando comparados à compartimentos de menor volume (ELLENDER et al., 2014). Baseado nessas evidências, podemos inferir que o aumento no volume dos compartimentos dendríticos dos interneurônios PV, promovido pela administração repetida de etanol, poderia

alterar a eletrofisiologia desses neurônios, influenciando seu controle sobre os MSNs estriatais.

Neste contexto, Wang e colaboradores (2018) mostraram que a inibição seletiva dos interneurônios PV no núcleo acumbens de camundongos, diminuiu a expressão da sensibilização locomotora induzida pela anfetamina e aumentou a atividade dos MSNs. Além disso, Todtenkopf et al. (2004) demonstraram que a administração repetida de cocaína promoveu sensibilização locomotora e aumento do número de interneurônios PV no estriado dorsal.

Nossos resultados, em conjunto com os discutidos acima, sugerem que os interneurônios PV sofrem alterações após a administração repetida de substâncias de abuso. Essas alterações nos PV podem modificar a liberação de Hevin ou sua eletrofisiologia, influenciando a atividade dos MSNs, que por consequência, modulam comportamentos relacionados à dependência, como a sensibilização locomotora.

***7 Conclusão***

Nossos resultados demonstraram que a inibição da Hevin astrocítica no núcleo acumbens não alterou o consumo de etanol, porém inibiu a preferência condicionada por lugar induzida por essa substância. Observamos ainda, que a inibição da Hevin astrocítica e neuronal no estriado dorsal diminuiu a sensibilização locomotora induzida pelo etanol. Além disso, demonstramos que o tratamento repetido com etanol aumentou o volume do compartimento dendrítico dos interneurônios parvoalbumina no estriado dorsal de camundongos. Os resultados obtidos sugerem que a proteína matricelular Hevin esteja envolvida nas neuroplasticidades subjacentes a comportamentos recompensadores e motivacionais importantes para o desenvolvimento da dependência. Dessa forma, a proteína Hevin pode ser alvo de estudos promissores para o entendimento das plasticidades sinápticas envolvidas na dependência de etanol e de outras substâncias.

*8 Referências Bibliográficas*

ADERMARK, L.; BOWERS, M. S. Disentangling the Role of Astrocytes in Alcohol Use Disorder. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, [s. l.], v. 40, n. 9, p. 1802–1816, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/acer.13168>>

AYERS-RINGLER, J. R. et al. Role of astrocytic glutamate transporter in alcohol use disorder. **World Journal of Psychiatry**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 31, 2016. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/2220-3206/full/v6/i1/31.htm>>

BAHI, A.; DREYER, J. L. Involvement of nucleus accumbens dopamine D1 receptors in ethanol drinking, ethanol-induced conditioned place preference, and ethanol-induced psychomotor sensitization in mice. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 222, n. 1, p. 141–153, 2012.

BULL, C. et al. Rat Nucleus Accumbens Core Astrocytes Modulate Reward and the Motivation to Self-Administer Ethanol after Abstinence. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 39, n. 12, p. 2835–2845, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24903651>>

CAMPOLONGO, M. et al. Hippocampal SPARC regulates depression-related behavior. **Genes, brain, and behavior**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 966–76, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22950524>>

COWAN, R. L. et al. Parvalbumin-containing GABAergic interneurons in the rat neostriatum. **The Journal of comparative neurology**, [s. l.], v. 302, n. 2, p. 197–205, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2289971>>

DAHCHOUR, A. et al. Effects of ethanol on extracellular amino acid levels in high-and low-alcohol sensitive rats: a microdialysis study. **Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 548–53, [s.d.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11093960>>

DAMODARAN, S.; EVANS, R. C.; BLACKWELL, K. T. Synchronized firing of fast-spiking interneurons is critical to maintain balanced firing between direct and indirect pathway neurons of the striatum. **Journal of Neurophysiology**, [s. l.], v. 111, n. 4, p. 836–848, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24304860>>

DING, Z.-M. et al. Alcohol drinking and deprivation alter basal extracellular glutamate concentrations and clearance in the mesolimbic system of alcohol-preferring (P) rats. **Addiction Biology**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 297–306, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23240885>>

DZYUBENKO, E.; GOTTSCHLING, C.; FAISSNER, A. Neuron-Glia Interactions in Neural Plasticity: Contributions of Neural Extracellular Matrix and Perineuronal Nets. **Neural Plasticity**, [s. l.], v. 2016, p. 1–14, 2016. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/np/2016/5214961/>>

ELLENDER, T. J. et al. Excitatory Effects of Parvalbumin-Expressing Interneurons Maintain Hippocampal Epileptiform Activity via Synchronous Afterdischarges. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 34, n. 46, p. 15208–15222,



2014. Disponível em:  
<<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.1747-14.2014>>

EROGLU, C. The role of astrocyte-secreted matricellular proteins in central nervous system development and function. **Journal of Cell Communication and Signaling**, [s. l.], v. 3, n. 3–4, p. 167–176, 2009.

HAYDON, P. G. et al. Astrocytic control of synaptic transmission and plasticity: a target for drugs of abuse? **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 56, n. SUPPL. 1, p. 83–90, 2009. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.06.050>>

HWA, L. S. et al. Persistent Escalation of Alcohol Drinking in C57BL/6J Mice With Intermittent Access to 20% Ethanol. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, [s. l.], v. 35, n. 11, p. 1938–1947, 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1530-0277.2011.01545.x>>

IKEMOTO, M. et al. Increased sensitivity to the stimulant effects of morphine conferred by anti-adhesive glycoprotein SPARC in amygdala. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 8, p. 910–915, 2000. Disponível em:  
<<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/78675>>

JONES, J. L. et al. The basolateral amygdala differentially regulates conditioned neural responses within the nucleus accumbens core and shell. **Neuroscience**, [s. l.], v. 169, n. 3, p. 1186–98, 2010. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20570714>>

JONES, E. V. et al. Astrocytes Control Glutamate Receptor Levels at Developing Synapses through SPARC- -Integrin Interactions. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 31, n. 11, p. 4154–4165, 2011. Disponível em:  
<<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.4757-10.2011>>

KITA, H.; KOSAKA, T.; HEIZMANN, C. W. Parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat neostriatum: a light and electron microscopic study. **Brain research**, [s. l.], v. 536, n. 1–2, p. 1–15, 1990. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2085740>>

KOOB, G. F. et al. Neurobiological mechanisms in the transition from drug use to drug dependence. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 27, n. 8, p. 739–749, 2004. Disponível em:  
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763403001489>>

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurocircuitry of addiction. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 217–238, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/npp.2009.110>>

KOÓS, T.; TEPPER, J. M. Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons. **Nature neuroscience**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. 467–72, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10321252>>

KUCUKDERELI, H. et al. Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. **Proceedings of the National**

**Academy of Sciences**, [s. l.], v. 108, n. 32, p. E440–E449, 2011. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1104977108>>

LIVELY, S.; RINGUETTE, M. J.; BROWN, I. R. Localization of the extracellular matrix protein SC1 to synapses in the adult rat brain. **Neurochemical research**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 65–71, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17151913>>

LÜSCHER, C.; MALENKA, R. C. Drug-Evoked Synaptic Plasticity in Addiction: From Molecular Changes to Circuit Remodeling. **Neuron**, [s. l.], v. 69, n. 4, p. 650–663, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627311000651>>

MONGREDIEN, R. et al. Role of the matricellular protein hevin in drug response. **European Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 27, p. S539–S540, 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924977X17310271>>

MULHOLLAND, P. J. et al. Ethanol disrupts NMDA receptor and astroglial EAAT2 modulation of Kv2.1 potassium channels in hippocampus. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 45–50, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19185209>>

NARITA, M. et al. Long-lasting change in brain dynamics induced by methamphetamine: Enhancement of protein kinase C-dependent astrocytic response and behavioral sensitization. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 93, n. 6, p. 1383–1392, 2005.

NESTLER, E. J.; AGHAJANIAN, G. K. Molecular and cellular basis of addiction. **Science**, [s. l.], v. 278, n. 5335, p. 58–63, 1997.

NOCJAR, C.; MIDDAUGH, L. D.; TAVERNETTI, M. Ethanol consumption and place-preference conditioning in the alcohol-preferring C57BL/6 mouse: relationship with motor activity patterns. **Alcoholism, clinical and experimental research**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 683–92, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10235304>>

SINHA, R. How does stress increase risk of drug abuse and relapse? **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 158, n. 4, p. 343–59, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11797055>>

SLEZAK, M.; PFRIEGER, F. W. New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. **Trends in neurosciences**, [s. l.], v. 26, n. 10, p. 531–5, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14522145>>

SMITH, R. J. et al. Cocaine-induced adaptations in D1 and D2 accumbens projection neurons (a dichotomy not necessarily synonymous with direct and indirect pathways). **Current opinion in neurobiology**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 546–52, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23428656>>

SMITH, T. L. Regulation of glutamate uptake in astrocytes continuously exposed to ethanol. **Life sciences**, [s. l.], v. 61, n. 25, p. 2499–505, 1997.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9416769>>

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 Structure and Function**, [s. l.], v. 221, n. 3, p. 1681–1689, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00429-015-0997-8>>

TODTENKOPF, M. S. et al. Differential distribution of parvalbumin immunoreactive neurons in the striatum of cocaine sensitized rats. **Neuroscience**, [s. l.], v. 127, n. 1, p. 35–42, 2004.

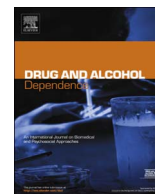
UDOMUKSORN, W. et al. Effects of alcohol administration during adulthood on parvalbumin and glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the rat cerebral cortex. **Acta Histochemica**, [s. l.], v. 113, n. 3, p. 283–289, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2009.11.001>>

VIALOU, V. et al.  $\Delta$ FosB in brain reward circuits mediates resilience to stress and antidepressant responses. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 745–752, 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nn.2551>>

WANG, X. et al. Parvalbumin Interneurons of the Mouse Nucleus Accumbens are Required for Amphetamine-Induced Locomotor Sensitization and Conditioned Place Preference. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 43, n. 5, p. 953–963, 2018.

WARREN, B. L.; WHITAKER, L. R. Parvalbumin-Expressing Neurons in the Nucleus Accumbens: A New Player in Amphetamine Sensitization and Reward. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 43, n. 5, p. 929–930, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/npp.2017.256>>

WOLF, M. E. The Bermuda Triangle of cocaine-induced neuroadaptations. **Trends in neurosciences**, [s. l.], v. 33, n. 9, p. 391–8, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20655604>>



Full length article

## Functional inactivation of the orbitofrontal cortex disrupts context-induced reinstatement of alcohol seeking in rats

Paula Cristina Bianchi<sup>a,b</sup>, Paulo Eduardo Carneiro de Oliveira<sup>a</sup>, Paola Palombo<sup>a,b</sup>, Rodrigo Molini Leão<sup>c</sup>, Hugo Cogo-Moreira<sup>d</sup>, Cleopatra da Silva Planeta<sup>a,b</sup>, Fábio Cardoso Cruz<sup>e,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Pharmacology, São Paulo State University, Rod. Araraquara-Jaú km 1, 14801-902, Araraquara-SP, Brazil

<sup>b</sup> Joint Graduate Program in Physiological Sciences, Federal University of São Carlos and São Paulo State University Araraquara, Rod. Washington Luís km 235, 13565-905, São Carlos-SP, Brazil

<sup>c</sup> Bioregulation Department Federal University of Bahia, UFBA, Av. Reitor Miguel Calmon s/n Vale do Canela Salvador/BA, Brazil

<sup>d</sup> Department of Psychiatry, São Paulo Federal University, R. Dr. Ovidio Pires de Campos, 78505403-903, SP, Brazil

<sup>e</sup> Department of Pharmacology, São Paulo Federal University, Leal Prado Building, Botucatu 862 Street, 04024-002, Vila Clementino, São Paulo-SP, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Alcohol self-administration  
Orbitofrontal cortex  
Male and female rats  
Functional inactivation

### ABSTRACT

**Background:** The high rate of relapse to drug use remains a central challenge to treating drug addiction. In human and rat models of addiction, environmental stimuli in contexts associated with previous drug use can provoke a relapse of drug seeking. Pre-clinical studies have used the ABA renewal procedure to study context-induced reinstatement of drug seeking. In the current study, we studied the role of the orbitofrontal cortex (OFC) in context-induced reinstatement to alcohol.

**Methods:** We trained male and female rats to self-administer alcohol in context A, extinguished drug-reinforced responding in a distinct context B, and assessed context-induced reinstatement in context A or B (control group). Next, we determined the effect of context-induced renewal of alcohol-seeking behavior on the expression of Fos (a neuronal activity marker) in the OFC. Finally, we determined the effect of reversible inactivation by GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor agonists (i.e., muscimol and baclofen, respectively) in the OFC.

**Results and conclusions:** There were no differences between male and female rats in context-induced reinstatement of alcohol-seeking behavior. Re-exposure to Context A, but not Context B, reinstated alcohol-seeking behavior and increased expression of the neural activity marker Fos in the OFC. Reversible inactivation of the OFC with muscimol and baclofen attenuated context-induced reinstatement. Our data indicated that the OFC mediates context-induced reinstatement of alcohol-seeking behavior.

### 1. Introduction

Alcohol addiction is characterized by high rates of relapse, which is a major problem in treating alcoholism (Fox et al., 2008; Sinha, 2009). Clinical and pre-clinical studies have demonstrated that the environmental context in which drugs are used can influence subsequent pharmacological effects of drugs as well as increase susceptibility to relapse (Janak and Chaudhri, 2010; O'Brien et al., 1990; Wikler, 1973). For instance, exposure to environments previously associated with drinking can contribute to precipitating drug-taking behavior in abstinent patients (Ludwig et al., 1974; Staiger and White, 1991).

Some animal models were developed to study the effect of environmental contexts on drug-seeking relapse. In rats, the ABA renewal procedure has been used to study context-induced relapse to alcohol-seeking behavior (Bouton and King, 1983; Crombag and Shaham,

2002). In this procedure, rats are trained to self-administer a drug paired with discrete cues in one context (A). The lever response is then removed in a different (non-drug) context (B) in the presence of discrete cues. In the end, rats are re-exposed to the drug-associated context (A). Several studies demonstrated that exposure to the alcohol self-administration context after the removal of the alcohol lever in a different context reinstated alcohol seeking in rats (Burattini et al., 2006; Hamlin et al., 2007; Janak and Chaudhri, 2010; Marchant et al., 2013).

Although the neural pathway mediating cue-induced alcohol craving (humans) or seeking (nonhumans) is complex, evidence from human brain imaging shows that important behaviors related to addiction, such as compulsive drug use and drug relapse, are mediated at least in part by drug-induced plasticity in the orbitofrontal cortex (OFC) (London et al., 2000). In rats, cue-induced cocaine and heroin seeking has been associated with increased expression of neuronal activation

\* Corresponding author at: Pharmacology Department, São Paulo Federal University, Botucatu Street, 862 - Ed. Leal Prado 1st floor, SP, Brazil.  
E-mail address: [f.cruz@unifesp.br](mailto:f.cruz@unifesp.br) (F.C. Cruz).

markers in the OFC (Fanous et al., 2012; Morgan and Curran, 1991; Thomas et al., 2003). Further, the reversible inactivation of this brain region decreases discrete cue-induced reinstatement of cocaine and heroin seeking in rats (Fanous et al., 2012; Fuchs et al., 2004; Lasseter et al., 2009).

The OFC connects with limbic areas, such as the basolateral amygdala (BLA) and nucleus accumbens, to enable encoding of memories (Schoenbaum and Shaham, 2008). Clinical studies with cocaine users demonstrated that exposure to cocaine-paired stimuli enhanced neural activity in the BLA and OFC, which was positively correlated with self-reports of cocaine craving (Childress et al., 1999; Grant et al., 1996; Kilts et al., 2001; London et al., 1999). In addition, Lasseter et al. (2011) demonstrated that administration of muscimol + baclofen to the BLA and OFC profoundly attenuated the reinstatement of drug context-induced cocaine seeking behavior. These findings indicated that the BLA and OFC are integral parts of the mesocorticolimbic neural circuitry known to direct cue and context-induced cocaine-seeking behavior in animal models of drug relapse. Despite the evidence demonstrating the role of OFC in conditioned behaviors, the relevance of this brain region in context-induced alcohol seeking has never been investigated.

To address this, we used Fos immunohistochemistry to characterize the involvement of the OFC in context-induced reinstatement of alcohol-seeking. Then, we combined reversible inactivation of the OFC, using muscimol and baclofen (i.e., GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> agonists, respectively), to assess whether the OFC mediates context-induced reinstatement of alcohol-seeking behavior. In addition, we assessed behavioral differences in context-induced reinstatement of alcohol seeking between female and male rats.

## 2. Method

### 2.1. Animals

Male (n = 38) and Female (n = 39) Long-Evans rats, weighing 250–350 g (obtained from the animal breeding facility of the São Paulo State University), were used for the current study. Groups of four animals were housed in plastic cages, which were 32 × 40 × 16 cm, in a room maintained at 23 ± 2 °C. Rats were continuously maintained on a reversed light cycle (i.e., 12:12h, lights off at 08:00 a.m.), with a controlled temperature (23 °C) and unrestricted access to food and water. All experiments were performed during the dark phase. The experimental protocol was approved by the Ethical Committee for Use of Animals of the Physical Institute of São Carlos, São Paulo University (Protocol # 01/2015) and were conducted according to ethics principles of the Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

We excluded 18 of the 77 rats (10 male and 8 female rats) from all the experiments for the following reasons: 5 due to inadequate training (< 15 reinforcements/day) or failure to meet an extinction criterion of a mean of < 25 responses over 5 days, 3 due to surgical procedure complications, and 10 due to misplaced cannula.

### 2.2. Apparatus

Rats were trained and tested in standard Med Associates (St. Albans, VT) self-administration chambers. Each chamber was equipped with two levers that were located 9 cm above the grid floor. Presses on the active retractable lever activated the infusion pump, while presses on the inactive non-retractable lever had no programmed consequences. Context A (the alcohol self-administration (training)) and B (extinction) were manipulated and counterbalanced. They differed from each other in terms of grid width (narrow/wide), illumination level (white/red house light), background noise (fan on/off), and background cues (stickers present/absent, cabinet doors close/open), as described by Marchant et al. (2013).

### 2.3. Substances

Saccharin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was diluted in tap water at a concentration of 0.2% and 0.05% (w/v). Ethanol (EtOH; Sigma-Aldrich, 96% v/v, St Louis, MO, USA) was diluted in saccharin solution or tap water to a final concentration of 10% or 20% (w/v). Flunixin Meglumine (Schering-Plough) was dissolved in saline solution (0.9% NaCl) in a concentration of 0.5 mg ml<sup>-1</sup>. Muscimol and baclofen (concentration, 0.06 mM + 0.6 mM) (Tocris) were dissolved in sterile saline. Streptomycin and Penicillin Polyantibiotic (Fort Dodge) were dissolved in sterile saline (0.9% NaCl) at a concentration of 560 mg ml<sup>-1</sup>. Tribromoethanol (Sigma-Aldrich) was dissolved in saline solution (0.9% NaCl) at a concentration of 2.5 mg in 100 ml.

### 2.4. Behavioral procedures

The experiments consisted of four phases as follows: home-cage alcohol intake (5 days), EtOH operant self-administration training (18 sessions), extinction (10 sessions), and test for context-induced reinstatement of ethanol seeking (1 session). The experimental sequence was home-cage alcohol intake – Context A (training) – Context B (extinction) – Contexts A and B (testing), as shown in Fig. 1.

#### 2.4.1. Phase 1: home-cage alcohol intake

We used a two-bottle choice paradigm in which rats had access to one bottle of alcohol (20% w/v) and one bottle of water for 5 consecutive days in their home cages in order to habituate them to the taste of alcohol (adapted from Marchant et al., 2013).

#### 2.4.2. Phase 2: alcohol self-administration training

All self-administration training sessions were performed in Context A. Reinforcements were earned using a fixed ratio 1 (FR-1) 20-s timeout reinforcement schedule. Active lever presses resulted in the presentation of a 2-s tone-light cue (7.5 W white light), compound tone (2900 Hz; 20 dB), and infusion pump activation. During the training phase, the activation of the infusion pump resulted in 0.1 ml of solution administered to the oral space. The initiation of each training session was signaled by the illumination of the house-light and insertion of the active lever into the chamber. Inactive lever presses and responses during the timeout interval had no programmed consequences.

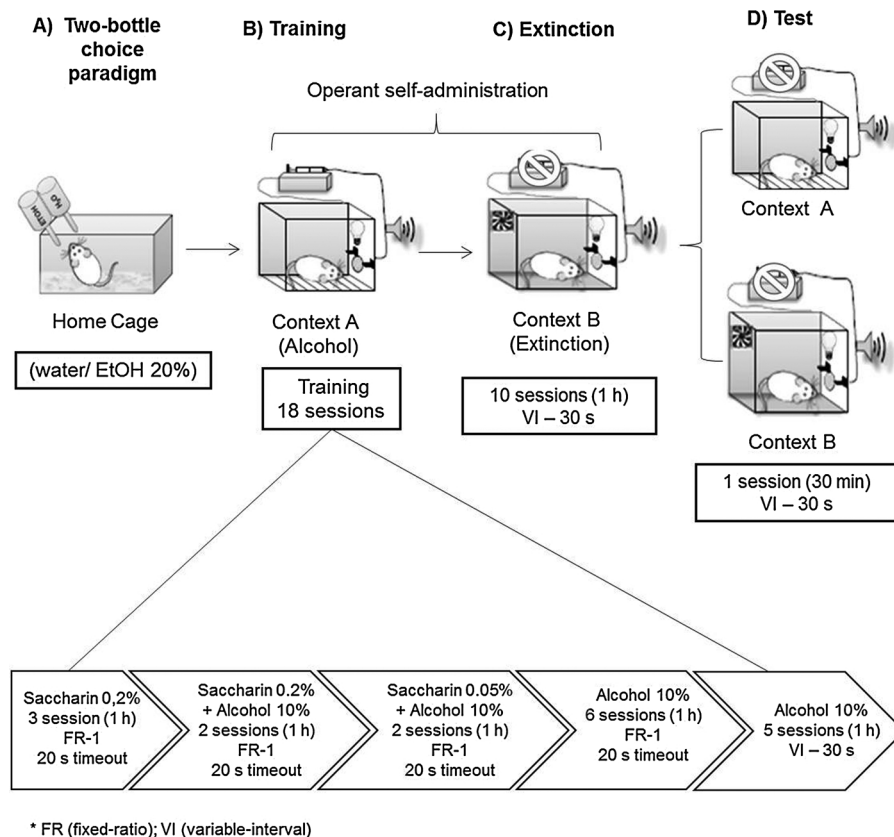
Rats were trained to press a lever for 0.1 ml of 0.2% saccharin for 1 h each day for 3 days. We then gradually replaced the saccharin reward with alcohol. Rats were trained to press the lever for 0.1 ml of 0.2% saccharin + 10% ethanol (w/v) for 1 h each day for 2 days, then for 0.1 ml of 0.05% saccharin + 10% ethanol (w/v) for 1 h each day for 2 days, and then for 0.1 ml of 10% ethanol (w/v) alone for 1 h each day for 6 days. Following FR-1 training, rats were trained to press the lever for 10% ethanol on a variable-interval 30-s (VI-30) schedule of reinforcement for 1 h each day for 5 days. The ethanol reinforcement, which was available at pseudo-random intervals (i.e., 1–59 s) following the preceding alcohol delivery, was delivered after an active lever press. Each alcohol delivery was also paired with the same compound tone (2900 Hz; 20 dB above background) and light (a 7.5 W white light) cues for 2.3 s.

#### 2.4.3. Phase 3: extinction of alcohol self-administration

During the extinction phase in Context B, responses on the previously active lever, under a VI-30 schedule of reinforcement, led to presentation of the tone-light cue, compound tone, and activation of the infusion pump, but the alcohol was not delivered. The alcohol self-administration was considered extinguished when the rats met extinction criterion of a mean of < 25 presses on the previously active lever over the last three extinction sessions.

#### 2.4.4. Phase 4: test for context-induced reinstatement

We tested the alcohol-seeking behavior (active lever presses under



**Fig. 1.** Schematic representation of the experimental design. Briefly, (A) rats were first given home-cage access to 20% ethanol. (B) Using a saccharin fading technique, rats are first trained to self-administer 10% ethanol in context A. (C) Next, lever pressing in the presence of the discrete cue was subsequently extinguished in a different context (B). (D) Subsequently, context-induced reinstatement of drug seeking was assessed by re-exposing rats to the drug-associated or extinction context under extinction conditions.

extinction conditions) in the rats during one 30-min session in either Context A or Context B. During the tests, an active lever press, under a VI-30 schedule of reinforcement, resulted in the 2-s tone-light cue and the activation of the infusion pump, but no alcohol was delivered.

## 2.5. Blood alcohol levels (BAL)

Immediately after the end of the last VI 30-s session, blood samples (100  $\mu$ l) were collected from the tip of the tail of some rats. The blood samples were centrifuged, and plasma alcohol levels were measured using an enzymatic system based on measurement of oxygen consumption during the ethanol-acetaldehyde reaction (AM1 Analyzer; Analox Instruments Ltd, London, UK).

## 2.6. Intracranial surgery

We performed all surgeries between the 5th and 6th VI-30 training session. Rats were anesthetized using tribromoethanol (250 mg  $\text{kg}^{-1}$ , i.p.). Following scalp anesthesia with 2% lidocaine, the skull was exposed and stainless-steel guide cannulas (26 G, 12-mm-long) were bilaterally implanted into the OFC, at a position that was 1 mm above the site of injection, using a stereotaxic apparatus (Model 900, Kopf). The coordinates for the OFC (from the Bregma) were as follows (nose bar set at  $-3.3$  mm): anteroposterior (AP),  $+3.2$ ; mediolateral (ML),  $+2.6$  ( $10^\circ$  angle); dorsoventral (DV),  $-4.0$  mm (Paxinos and Watson, 2005). Cannulae were fixed to the skull with dental cement and five metal screws. After the surgery, the animals received a poly-antibiotic with streptomycin and penicillin (560 mg  $\text{ml}^{-1}$   $\text{kg}^{-1}$ , i.m.) to prevent infection and the non-steroidal anti-inflammatory drug flunixin meglumine (0.5 mg  $\text{ml}^{-1}$   $\text{kg}^{-1}$ , s.c.) for post-operation analgesia. The rats were allowed to recover for 5 days before being subjected to a VI-30 training session phase again. During the first 3 days of recovery phase, the rats were injected with the anti-inflammatory drug, flunixin meglumine (0.5 mg  $\text{ml}^{-1}$   $\text{kg}^{-1}$ , s.c.).

## 2.7. Intracranial injections and histology

The rats received infusions of saline or a solution containing both muscimol + baclofen (concentration 0.06 mM + 0.6 mM, respectively) (Tocris). Intracranial injections were administered using a syringe pump (Harvard Apparatus) and 2- $\mu$ l Hamilton syringes, which were attached via polyethylene 10 tubing to 30-gauge injectors (Plastics One). All microinjections were performed at a volume of 0.5  $\mu$ l per side over 1 min. After allowing an additional 1 min for diffusion, the microinjectors were removed. The rats were placed into self-administration chambers for testing 15 min after the microinjection. The doses were based on previous studies (Cruz et al., 2014; Marchant et al., 2014; Willcocks and McNally, 2013). At the end of the test, the rats were given an overdose of tribromoethanol (500 mg  $\text{kg}^{-1}$ , i.p.). The rat brains were perfused by cardiac perfusion, removed, frozen, and sectioned coronally at a thickness of 40  $\mu$ m using a cryostat. All sections containing the cannula tracts were collected onto glass slides, stained for cresyl violet, and coverslipped with Permount (Sigma). The sections were examined under light microscopy to determine the placements of the cannula tips.

## 2.8. Experiment 1: orbitofrontal cortex neuronal activation after context-induced the reinstatement of ethanol seeking

First, we assessed the differences between male and female rats in the context-induced reinstatement of alcohol-seeking behavior. For that, we used a total of 26 rats (i.e., 13 male and 13 female rats). The control group (A-B-B) underwent alcohol self-administration training in context A, extinction training in context B, and reinstatement testing in context B. The Renewal (A-B-A) group underwent alcohol self-administration training in context A, extinction training in context B, and reinstatement testing in context A (30 min). The numbers of rats per group on the test day were as follows: context B (6 male and 7 female rats) and context A (7 male and 6 female rats). Rats in the Control and

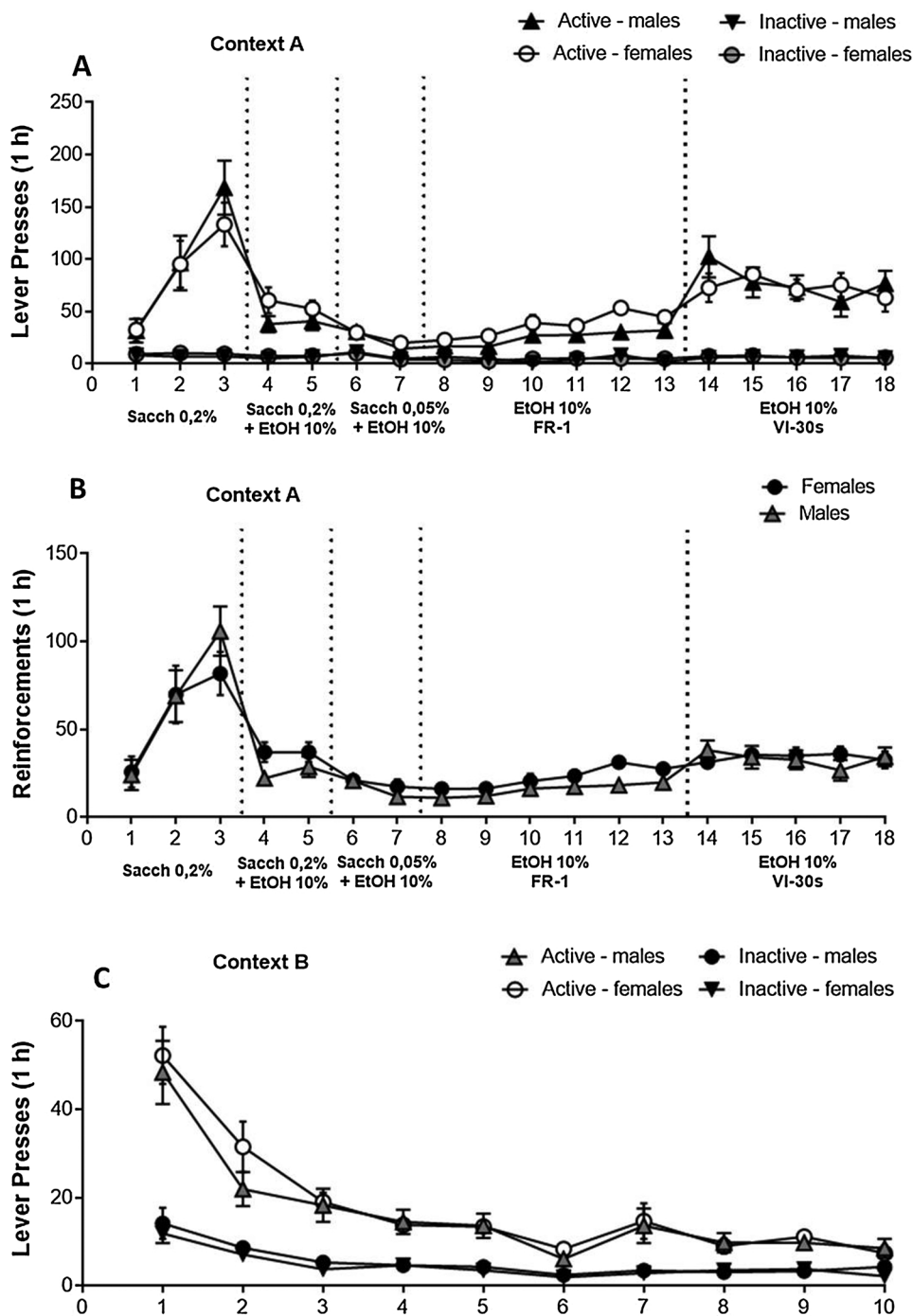


Fig. 2. Comparison between male and female rats during alcohol self-administration training and extinction. (A) Number of active and inactive lever presses, for male and female rats, during self-administration training in context A. (B) Number of reinforcements, for male and female rats, during self-administration training in context A. (C) Total number of presses on the active and inactive lever for male and female rats during the extinction sessions conducted in the absence of ethanol in context B. Data are depicted as mean ± standard error of mean (SEM), n = 13 per group.

Renewal groups were matched for their alcohol intake and number of active lever presses during training and extinction.

We used immunohistochemistry to characterize the involvement of the OFC with context-induced reinstatement of alcohol operant self-administration.

The rats were anesthetized with tribromoethanol (250 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) 60 min after the end of the reinstatement test and perfused with 100 ml of phosphate-buffered saline (PBS) followed by 400 ml of 4% paraformaldehyde.

The brains were post-fixed in paraformaldehyde for 90 min and transferred to 30% sucrose in PBS solution, at 4 °C, for 2–3 days. The

brains were frozen in powdered dry ice and kept at -80 °C until sectioning. Coronal sections were cut, at a thickness of 40 μm, between Bregma +3.7 and +2.7 mm (Paxinos and Watson, 2005). Free-floating sections were washed three times in PBS, blocked with 3% normal goat serum (NGS) in PBS with 0.25% Triton X-100 (PBS-Tx), and incubated for 24 h at 4 °C with anti-Fos antibody (sc-52; Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:4000 in blocking solution. Sections were washed again with PBS and incubated for 2 h in biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody (1:400; Vector Laboratories) in PBS-Tx and 1% NGS. After washing in PBS, the sections were incubated for 1 h in avidin-biotin-peroxidase complex (ABC Elite kit, PK-6100; Vector

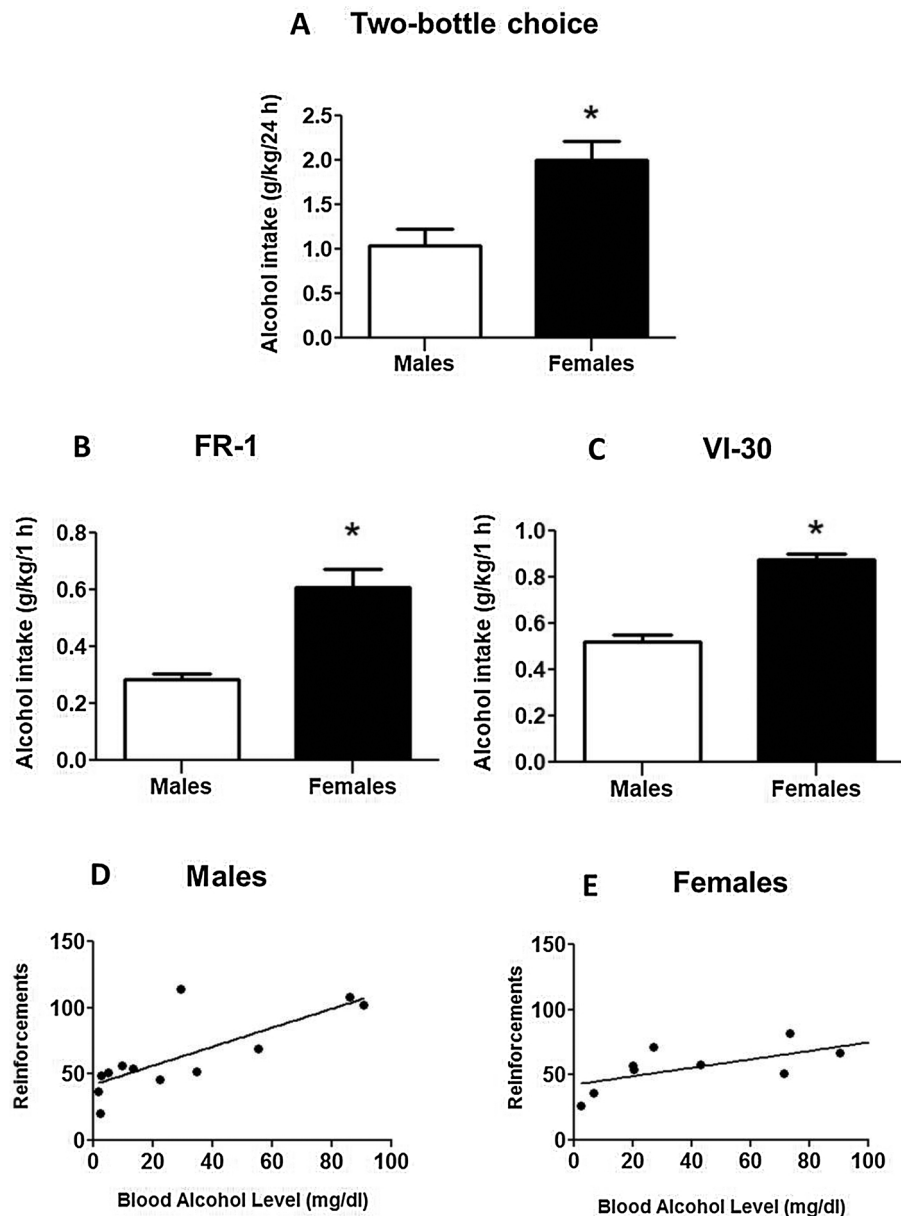


Fig. 3. Alcohol consumption and blood alcohol determination of male and female rats. (A) Total alcohol consumption (g/kg/24 h) in a free-choice home-cage access to 20% alcohol per 5 days. Alcohol intake in (g/kg/1 h) during the two different 10% alcohol self-administration schedules: (B) fixed-ratio 1 (FR-1), 6 sessions and (C) variable-interval (VI-30), 5 sessions. Correlation plots of the number of reinforcements achieved during the last training session as a function of the blood alcohol level for (D) male rats ( $r = 0.59$ ;  $p < 0.05$ ) and (E) female rats ( $r = 0.47$ ;  $p < 0.05$ ). Data represented as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM); \* different from male rats,  $p < 0.05$ ,  $n = 10$ –13 per group.

Laboratories) in PBS containing 0.5% Triton X-100. Finally, sections were washed in PBS and developed in 3,3'-diaminobenzidine for approximately 3 min, transferred into PBS, and mounted onto chromalum-gelatin-coated slides. Once dry, the slides were dehydrated through a graded series of alcohol and cleared with xylol (LabSynth, SP, Brazil) before being coverslipped with Permount (Sigma-Aldrich, St. Louis).

Bright-field images of Fos immunoreactivity in the OFC were captured using a CCD camera (Coolsnap Photometrics, Roper Scientific Inc) and Qimaging Exi Aqua attached to a Zeiss Axioskop 2 microscope. Images for counting labeled cells were captured at 100 $\times$  magnification. Labeled cells from 3 to 4 hemispheres per rat were automatically counted using IPLab software for Macintosh, version 3.9.4 r5 (Scanalytics Inc) and iVision for Macintosh, version 4.0.15 (Biovision). Counts from all images from each rat were averaged so that each rat was an  $n$  of 1.

### 2.9. Experiment 2: effect of pharmacological inactivation of orbital frontal cortex neurons on context-induced the reinstatement of alcohol seeking

We reversibly deactivated the OFC using muscimol and baclofen (Bossert et al., 2011; Cruz et al., 2014; Marchant et al., 2014) to determine the causal role of OFC in context-induced reinstatement of alcohol-seeking behavior. A total of 33 male ( $n = 15$ ) and female ( $n = 18$ ) rats were anesthetized and permanent bilateral guide cannulas were implanted into the OFC. On the test day, the rats received bilateral injections (0.5  $\mu$ l per side) of either muscimol + baclofen (0.06 + 0.6 mM) (Tocris) dissolved in sterile saline or its vehicle. The rats were injected 15 min prior to the reinstatement tests as described above. The numbers of rats per group on the test day were as follows: saline-context B ( $n = 8$ ); baclofen + muscimol-context B ( $n = 7$ ); saline-context A ( $n = 7$ ); baclofen + muscimol-context A ( $n = 11$ ). The male and female rats were spread equally across the groups.

To eliminate the possibility that the effect of baclofen + muscimol



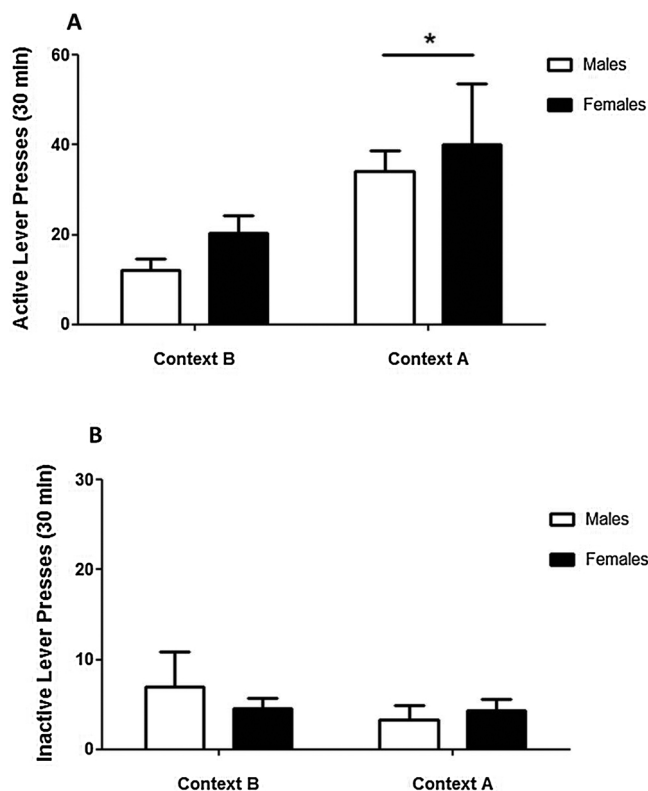


Fig. 4. Comparison between male and female rats in context-induced reinstatement of alcohol-seeking. Total number of (A) active and (B) inactive lever presses in rats tested in the Context B or Context A during reinstatement test. Data are showed as mean ± standard error of mean (SEM). \* different from Context B,  $p < 0.05$ ,  $n = 6-7$  per group.

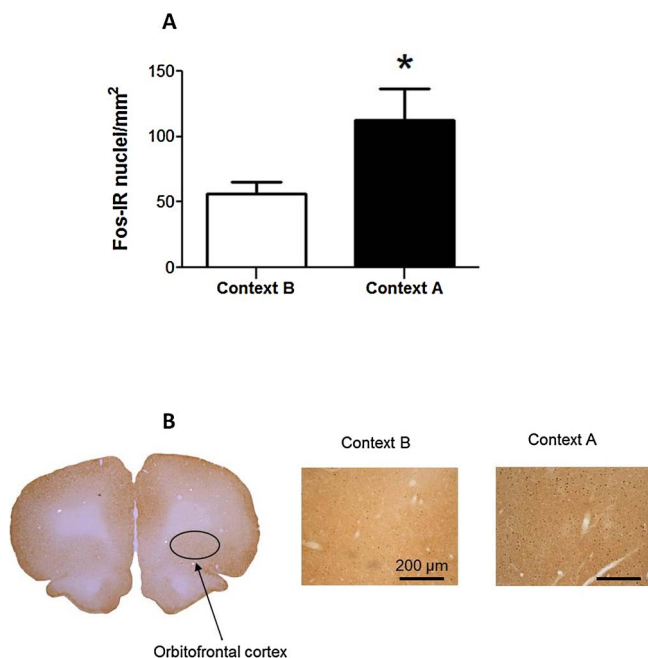


Fig. 5. Context-induced reinstatement of alcohol-seeking is associated with Fos induction in orbitofrontal cortex. (A) Number of Fos-IR nuclei per  $\text{mm}^2$  in orbitofrontal cortex. Data depicted as mean ± standard error of mean (SEM). \* different from context B  $p < 0.05$ ,  $n = 6$  per group. (B) Area used for quantifying Fos-IR neurons in the orbitofrontal cortex of rats. Fos-IR nuclei in orbitofrontal cortex captured at 100x magnification of rats that were exposed to (C) context B and (D) context A in the test day.

on test day was due to motor deficits, 13 rats were trained after completion of this experiment to lever-press for 0.2% saccharin solution on a FR-1, 20-s timeout reinforcement schedule for a 30-min session test. Subsequently, we assessed the effect of vehicle or baclofen + muscimol injections into OFC on saccharin-maintained responses. The experimental design is outlined in Fig. 6A.

At the end of the experiments, the rats were anesthetized, perfused, and their brains were removed and kept in 10% formaldehyde for 48 h. The rat brains were then sectioned at  $40 \mu\text{m}$ , using a Leica cryostat, stained with cresyl violet, and imaged using light microscopy to verify the cannula placements.

### 2.10. Statistical analyses

The behavioral data were analyzed using an analysis of variance (ANOVA). ANOVAs indicating interaction effects ( $p < 0.05$ ) were followed by Newman-Keuls post-hoc tests. Molecular data and sex differences in alcohol consumption were analyzed using a Student's *t*-test. The data were analyzed using Statistic StatSoft program, and statistical significance was set at  $p < 0.05$ . The dependent measures and factors used in the statistical analyses are described in the results section below. For correlation analyses between reinforcement and BAL we used the linear regression function of Graphpad Prism software.

In addition, we used a different Generalized Estimation Equations (GEE) during the training and extinction sessions, which allowed the assessment of the effect of time and sex on number of reinforcements and active and inactive lever presses. These data were analyzed using the SPSS Statistics 17 software. We also assessed the variability between five different manipulations and the within-subject variance. The robust estimator (Huber-White/sandwich estimator) under correlation matrix structure of an auto-regressive of first order was used. Five different periods of self-administration were analyzed separately (i.e., saccharin training: 0 to 3rd session; saccharin + EtOH training: 4th to 7th session; EtOH/FR-1 training: 8th to 13th session; EtOH/VI-30 training: 14th to 18th session; and 10 sessions of extinction).

## 3. Results

### 3.1. Experiment 1: comparison between male and female rats during training, extinction, and reinstatement test

Fig. 2A and B depict the mean ± standard error of mean (SEM) number of active or inactive lever presses and reinforcements for alcohol, respectively, during the training phase in context A for the male and female rats used in experiment 1. The rats showed consistent alcohol self-administration, as indicated by the increase in active lever presses during the VI-30 sessions. Fig. 2C depicts the mean ± SEM number of lever presses on the previously active and inactive levers during the first 10 extinction sessions in context B. As expected, the active lever presses decreased over time.

During the saccharin training, a significant effect of time on active lever presses ( $b = 59.51$ ,  $p < 0.001$ ) and reinforcements ( $b = 32.93$ ,  $p < 0.001$ ) was observed. This indicated the increase of active lever presses and reinforcements during this period. No statistical differences were observed between the sexes, and there was no significant interaction between sex and time.

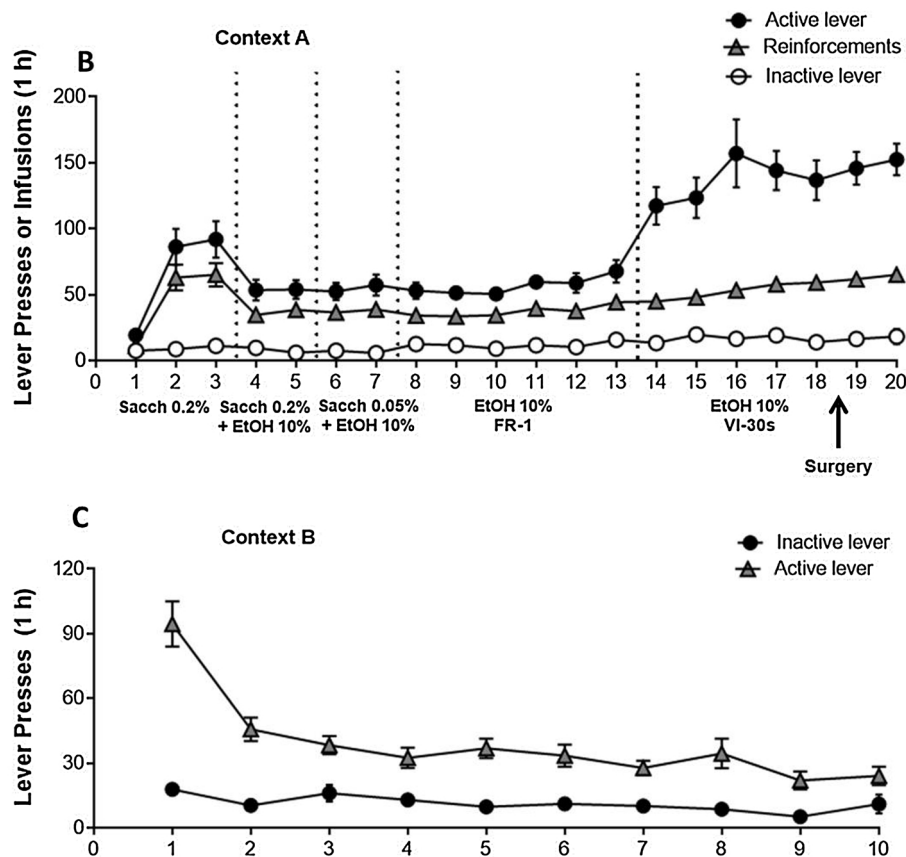
A significant effect of time on active lever presses ( $b = -11.42$ ,  $p < 0.001$ ) and reinforcements ( $b = -5.36$ ,  $p < 0.001$ ) was also observed during the saccharin + EtOH training. This indicated the decrease in active lever presses and reinforcements over time. There were no statistical differences between the sexes and no significant interaction between sex and time.

Significant effects of time ( $b = 4.18$ ,  $p < 0.003$ ) and sex ( $b = 11.78$ ,  $p < 0.001$ ) were observed on the active lever presses during EtOH FR-1. The number of active lever presses increased during this period. The sex analysis demonstrated that female rats had more

**A**

1: Home cage	2: Context A				
7x 24h sessions	3x FR-1 sessions	2x FR-1 sessions	2x FR-1 sessions	6x FR-1 sessions	5x VI-30s sessions
Two-bottle choice 20% alcohol vs. water	Saccharin 0.2%	Saccharin 0.2% + Alcohol 10%	Saccharin 0.05% + Alcohol 10%	Alcohol 10%	Alcohol 10%
3: Intracranial Surgery	4: Context A	5: Context B	6: Test day	7: Sacch Test	
	2x VI-30s sessions	10x VI-30s sessions	1x VI-30s session	1x FR-1 session	
	Alcohol 10%	Extinction conditions	Extinction conditions in context A or B	Saccharin 0.2% Independent context	

\* Sacch (saccharin)



**Fig. 6.** Alcohol self-administration training and extinction of alcohol reinforcement responding of Experiment 2. Rats were trained to self-administer alcohol 10%. (A) Graphical representation of the experimental design used in Experiment 2, see Methods for details. (B) Number of infusions and active and inactive lever presses during alcohol self-administration training in context A (n = 33). Data represented mean ± standard error of mean (SEM). (C) Number of reinforcements and presses on the active and inactive lever during the ten extinction sessions conducted in the absence of ethanol in context B. Data represented mean ± SEM.

active lever presses than the male rats. Further, time ( $b = 1.89$ ,  $p < 0.003$ ) and sex ( $b = 6.58$ ,  $p < 0.001$ ) also had a significant effect on the number of reinforcements, indicating that rats increased the number of reinforcements during EtOH/FR-1 training, and female rats had more reinforcements than male rats. Further, a significant interaction between sex and time was observed for inactive lever presses, which indicated that the female rats pressed the inactive lever fewer times than the male rats.

Statistical analyses of VI-30 interval data demonstrated the effect of time alone ( $b = -5.03$ ,  $p < 0.003$ ) on active lever presses, demonstrating a decrease of presses over time. No statistical differences were observed between the sexes; there was no significant interaction between sex and time.

During the extinction phase, time had a significant effect on active ( $b = -3.76$ ,  $p < 0.001$ ) and inactive ( $b = -0.86$ ,  $p < 0.001$ ) lever presses. A decrease in the numbers of active and inactive lever presses were observed. There were not significant differences between the sexes and, there was no significant interaction between the sex and time factors.

In summary, the data indicated that the self-administration responses and reinforces during the saccharin, ethanol+ saccharin, ethanol IV-30 training, and extinction sessions did not significantly differ between male and female rats. Female rats, however, showed a higher number of active lever presses and ethanol reinforcements compared to those of the male rats during the ETOH/FR-1 training.

Fig. 3 depicts the mean ± SEM total alcohol consumption (g/kg)

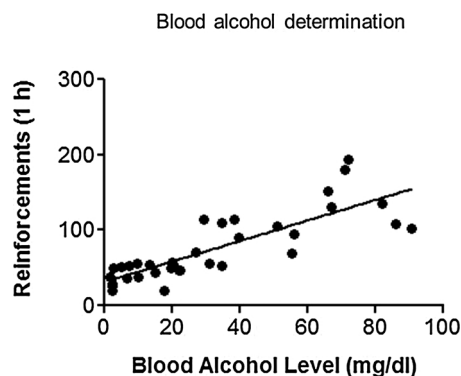


Fig. 7. Blood alcohol determination of Experiment 2. Immediately after the end of the last VI-30 s session, blood samples (100  $\mu$ l) were collected from the tip of the tail of rats ( $n = 35$ ). The graph depicts correlation plots of the number of reinforcements achieved during the last training session as a function of the blood alcohol level ( $r = 0.68$ ,  $p < 0.05$ ).

during the two-bottle choice paradigm (Fig. 3A), operant self-administration in FR-1 (Fig. 3B), and operant self-administration in VI-30 (Fig. 3C). Fig. 3D and E show the correlation between the number of reinforcements achieved during the last VI-30 training session and the blood alcohol levels in male and female rats, respectively.

Alcohol consumption was higher in female rats than in male rats during exposure to the two-bottle choice test ( $t_{(8)} = -3.29$ ;  $p < 0.05$ ), self-administration training in FR-1 ( $t_{(10)} = -4.77$ ;  $p < 0.05$ ), and VI-30 ( $t_{(8)} = -8.74$ ;  $p < 0.05$ ).

Immediately after the end of the last VI-30-s session, blood samples (100  $\mu$ l) were collected from the tip of the tail of male and female rats. A significant correlation between the number of reinforcements and blood alcohol level for male ( $r = 0.59$ ;  $p < 0.05$ ) and female ( $r = 0.47$ ;  $p < 0.05$ ) rats was observed.

On the test day, we assessed context-induced reinstatement of alcohol-seeking behavior by assessing non-reinforced lever presses in Context A versus Context B. Fig. 4A and B depict the mean  $\pm$  SEM number of active and inactive lever presses, respectively, during the test day for male and female rats. For active lever presses, there was a significant difference between context (A vs. B:  $F_{(1,22)} = 8.50$ ,  $p < 0.05$ ) but not between sex ( $F_{(1,22)} = 1.02$ ,  $p > 0.05$ ). There was also no significant interaction between context and sex ( $F_{(1,22)} = 0.02$ ,  $p > 0.05$ ). The results indicate that exposure to context A, but not context B, increased active non-reinforced lever pressing independent of sex.

To assess whether the difference between male and female rats observed during the ETOH/FR-1 training could influence the reinstatement test, we analyzed the active lever-press data during the test day using a two-way ANCOVA with between-subject factors of context (A, B) and sex (male, female) and the covariate of average of active lever-presses during the 6 days of FR-1. This analysis did not show a significant interaction between context and sex ( $F_{(1,21)} = 0.012$ ,  $p > 0.05$ ). The lever presses of male and female rats during the ETOH/FR-1 training did not have an effect on active lever-presses on the test day.

Since no significant differences were observed between male and female rats in the reinstatement test, we grouped male and female rats for Fos-immunoreactive analysis and for experiment 2.

We aimed to determine whether context-induced reinstatement of alcohol-seeking behavior was associated with increased Fos-immunoreactive nuclei (Fos-IR) in the OFC. We analyzed Fos expression in the OFC using Context (A, B) as the between-subject factor. We also determined the proportion of all OFC neurons expressing Fos during the reinstatement test using double-labeling immunohistochemistry.

Exposure to the Alcohol Context A increased the number of Fos-IR nuclei in the OFC (Fig. 5A). Fos-IR levels were higher in Context A than

in Context B ( $t_{(10)} = 2.23$ ;  $p < 0.05$ ).

### 3.2. Experiment 2: baclofen + muscimol inactivation of orbitofrontal cortex decreased context-induced reinstatement of alcohol-seeking

Fig. 6B depicts the mean  $\pm$  SEM number of alcohol reinforcements and active and inactive lever presses during the training phase in Context A. The rats showed consistent alcohol self-administration as indicated by the increase in active lever presses during the VI-30 session. Fig. 6C depicts the mean  $\pm$  SEM number of previously active and inactive lever during the 10 extinction sessions in context B. As expected, the number of active lever presses decreased over time. Fig. 7 shows the significant correlation between the number of reinforcements achieved during the last VI-30 training session and the blood alcohol level ( $r = 0.68$ ;  $p < 0.05$ ).

The reversibly inactivating procedure with baclofen + muscimol was used to determine the OFC causal role in context-induced reinstatement of alcohol-seeking behavior. A two-way ANOVA demonstrated the significant interaction between Context (A, B) and Drug (Vehicle, Muscimol + Baclofen) for active lever presses ( $F_{(1,28)} = 8.75$ ,  $p < 0.05$ ). Post-hoc analysis indicated that the muscimol + baclofen injections into the OFC attenuated active lever pressing in Context A, but not during Extinction Context B. There was no significant interaction between Context (A, B) and Drug (Vehicle, Muscimol + Baclofen) for inactive lever presses ( $F_{(1,28)} = 3.06$ ,  $p > 0.05$ ) (Fig. 8A and B).

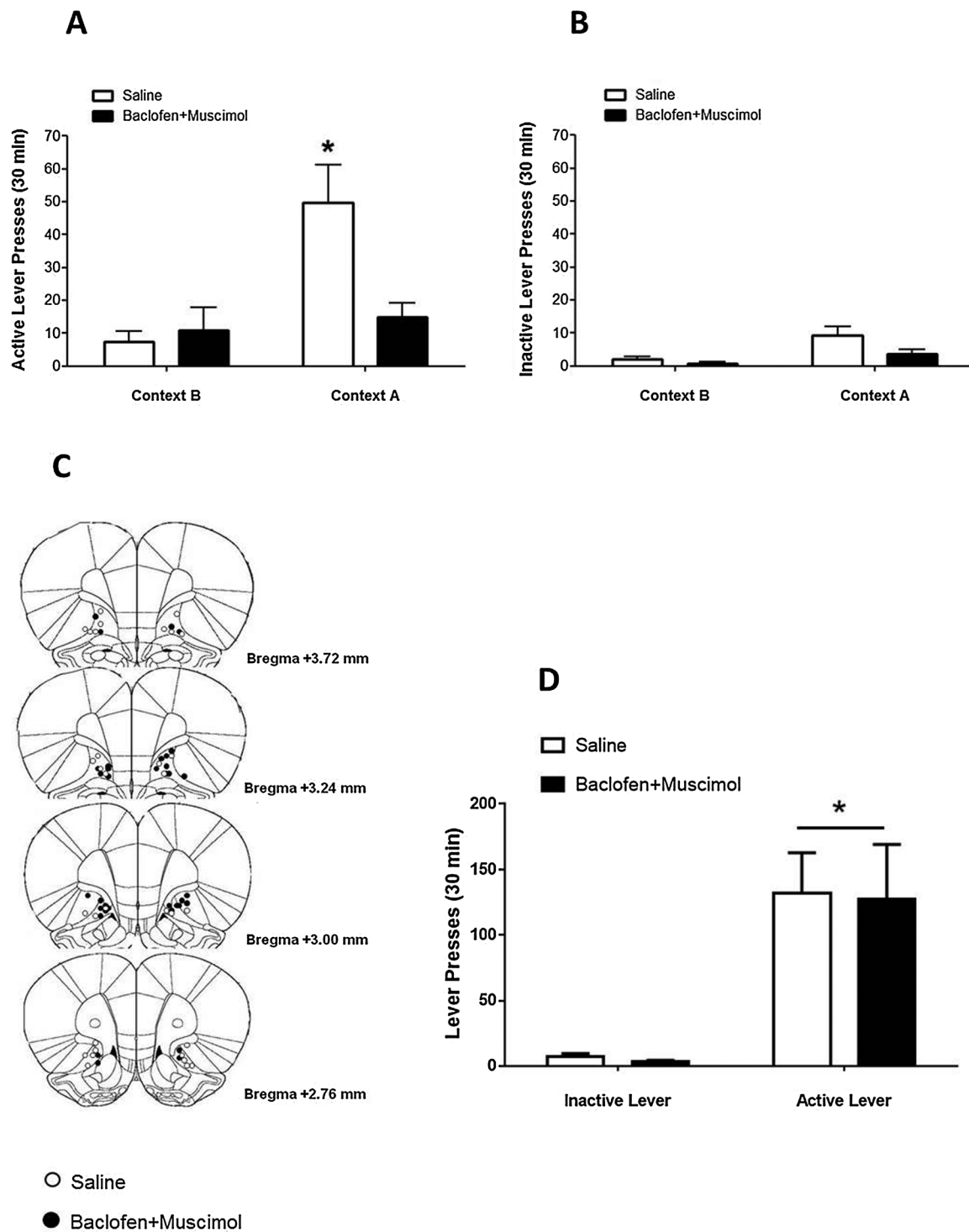
Finally, to eliminate the possibility that the effect of injecting muscimol + baclofen into the OFC were due to motor deficits, we re-trained 9 rats that previously participated in Experiment 3 to lever press for 0.2% saccharin solution. After a stable response was observed, we determined the effect of muscimol + baclofen or vehicle injections into the OFC on high-rate operant response for saccharin. A two-way ANOVA revealed a significant difference between Lever (Active vs. Inactive:  $F_{(1,22)} = 21.33$ ,  $p < 0.05$ ) but did not indicate a significant interaction between Lever (Active, Inactive) and Drug (Vehicle, Muscimol + Baclofen;  $F_{(1,14)} = 0.00021$ ,  $p > 0.05$ ). Local inactivation of the OFC with muscimol + baclofen had no effect on the high-rate saccharin response, indicating that their effects on context-induced reinstatement of alcohol-seeking behavior were not due to motor deficits (Fig. 8D).

## 4. Discussion

In the current study, we investigated the role of the OFC in context-induced reinstatement of alcohol-seeking behavior. Our results corroborated with previous reports (Marchant et al., 2013; Willcocks and McNally, 2013) demonstrating that alcohol-seeking behavior was induced by re-exposure to the alcohol-associated context after the extinction of drug self-administration in a different context. We demonstrated that the context-induced reinstatement of alcohol seeking was associated with increased Fos expression in the OFC. Reversible inactivation of OFC attenuated context-induced reinstatement of alcohol-seeking behavior. There was no difference in the observed context-induced reinstatement of alcohol-seeking behavior between male and female rats.

Context-induced reinstatement of extinguished drug seeking behavior has been observed for several drugs of abuse, including cocaine (Cruz et al., 2014; Lasseter et al., 2009), heroin (Bossert et al., 2011), nicotine (Diergaarde et al., 2008), and alcohol (Marchant et al., 2013; Willcocks and McNally, 2013). Our results corroborated with clinical studies indicating that a context which was previously associated with alcohol use often provoked relapse during abstinence (Litt and Cooney, 2000; O'Brien et al., 1990).

We observed that female rats showed higher alcohol consumption than males (g/kg) when exposed for 5 days in a two-bottle choice paradigm. Female rats also presented greater active lever presses, reinforcements, and alcohol intake (g/kg) during FR-1 training compared



**Fig. 8.** Baclofen + muscimol inactivation of the orbitofrontal cortex decreased context-induced reinstatement of alcohol-seeking. Total (A) active and (B) inactive lever-presses during context-induced reinstatement of alcohol-seeking on test day (n = 7–11 per group). Data are depicted as mean ± standard error of mean (SEM). \* different from all groups, p < 0.05. (C) Dots indicate approximate area of injector tip. (D) Local inactivation of the orbitofrontal cortex with muscimol + baclofen had no effect on the high-rate response to 0.2% saccharin reinforcements. Rats were tested after 2 days of 2% saccharin self-administration training (n = 6–7) per group. Data are depicted as mean ± SEM. \* Different from inactive lever, p < 0.05.

to male rats. Throughout the VI-30 phase, male and female rats showed similar numbers of active lever presses and reinforcements; the female rats, however, showed greater alcohol intake (g/kg) than the male rats. This finding is supported by several previous studies in which females showed more alcohol intake than males (Almeida et al., 1998; Gamsby et al., 2013; Juarez and Barrios de Tomasi, 1999; Lancaster and Spiegel, 1992; Maldonado-Devincci et al., 2010; Walker et al., 2008). However,

some previous studies demonstrated similar alcohol consumption between male and female rats (Schramm-Sapota et al., 2014; van Haaren and Anderson, 1994; Varlinskaya and Spear, 2015). Further, Randall et al. (2017), observed that although male rats tended to have greater alcohol-reinforced responses, female rats showed greater alcohol intake (g/kg) (Randall et al., 2017).

During the assessment of extinction and relapse-like behavior, there

was no sex differences in the number of lever presses throughout extinction or the context-induced reinstatement test. These findings corroborated with the study conducted by [Randall et al. \(2017\)](#), in which no differences in the responses during the extinction sessions and reinstatement of alcohol seeking test were observed between male and female rats.

Few studies have investigated sex differences in the reinstatement of alcohol seeking in rats. For instance, [McKinzie et al. \(1998\)](#) did not find any sex differences in the reinstatement of alcohol-seeking behavior and alcohol consumption when measured after a long period of alcohol deprivation. In contrast, [Bertholomey et al. \(2016\)](#) demonstrated that female rats were more sensitive to yohimbine-induced reinstatement of alcohol-seeking behavior than the male rats.

Addictive drugs modify brain circuits that are crucial for the normal control of behaviors ([Kauer and Malenka, 2007](#); [Koob and Volkow, 2010](#); [Schoenbaum et al., 2006](#)). Numerous studies have demonstrated that drug seeking and drug relapse are mediated by drug-induced changes in the OFC ([Jentsch and Taylor, 1999](#); [London et al., 2000](#); [Schoenbaum et al., 2006](#); [Volkow and Fowler, 2000](#)). However, the majority of these studies investigated the involvement of the OFC in psychostimulant-induced addiction-like behaviors ([London et al., 2004](#); [Stapleton et al., 1995](#)). For instance, brain imaging studies revealed that drug-related cues increase the activation of the OFC in cocaine, methamphetamine, and heroin users ([London et al., 2004](#); [Stapleton et al., 1995](#); [Volkow et al., 2001](#); [Volkow and Fowler, 2000](#); [Volkow et al., 1991](#)). To our knowledge our study is the first to demonstrate the involvement of the OFC in context-induced reinstatement of alcohol-seeking behavior.

Immunohistochemistry studies have suggested a correlation between cue- or context-induced drug seeking and OFC activation. For instance, it was demonstrated that exposure to cues previously paired with cocaine or heroin administration increased the expression of *Zif268* and c-Fos (neuronal activation markers) in the OFC ([Fanous et al., 2012](#); [Morgan and Curran, 1991](#); [Thomas et al., 2003](#)).

Functional studies also confirmed the involvement of OFC in contextual cues that induce drug-seeking behaviors. [Lasseter et al. \(2009\)](#) reported that reversible inactivation of the OFC using a mixture of GABAergic agonists, i.e., muscimol and baclofen, impaired context-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior in rats. Similarly, [Fanous et al. \(2012\)](#) demonstrated that injections of baclofen + muscimol into the OFC decreased cue-induced heroin seeking.

We speculated that the role of the OFC in context-induced reinstatement of drug-seeking could be attributed to its involvement in memory processes ([Moorman and Aston-Jones, 2014](#)). [Lasseter et al. \(2011\)](#) demonstrated that the BLA and lateral OFC are critical elements of the neural circuitry that regulate drug context-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. For example, re-exposure to alcohol-associated context increased c-Fos mRNA expression in the BLA, suggesting that this brain region plays a role in context-induced reinstatement of alcohol-seeking behavior ([Marinelli et al., 2007](#)). Further, OFC neurons fired in anticipation of the presentation of either reward or punishment during an odor-discrimination task ([Schoenbaum et al., 1998](#); [Schoenbaum et al., 2003](#)). Moreover, evidence has demonstrated that the OFC plays an important role in the acquisition and expression of Pavlovian stimulus-outcome associations ([Ostlund and Balleine, 2007](#); [Panayi and Killcross, 2014](#)). Overall, these findings indicated that neural activity of the OFC and associated limbic areas plays a role in the memory or motivational significance of associated stimuli to guide goal-directed behavior.

In conclusion, although male and female Long-Evans rats showed differences in alcohol intake and responses during the self-administration training, no differences in number of lever presses was observed during the extinction or reinstatement of alcohol-seeking behavior. In addition, the functional inactivation of the OFC prevented reinstatement of an extinguished response to alcohol. Thus, we demonstrated that the OFC is required for context-induced reinstatement of alcohol-

seeking behavior.

## Contributors

P.C.B., R.M.L., P.E.C.O., P.P., H.C.M., C.S.P and F.C.C. designed research; P.C.B., R.M.L., P.E.C.O., P.P., and F.C.C., performed research; F.C.C. and C.S.P contributed unpublished reagents/analytic tools; P.C.B, C.S.P, H.C.M., and F.C.C analyzed data; P.C.B, H.C.M., C.S.P and F.C.C. wrote the paper. We confirm that the manuscript has been read and approved by all named authors; there are no other persons who satisfied the criteria for authorship but are not listed. We further confirm that the order of authors listed in the manuscript has been approved by all of us.

## Role of funding source

This research was supported by São Paulo Research Foundation FAPESP (2013/24896-2) and National Council for Scientific and Technological Development-CNPq (164060/2014-6).

## Conflict of interest

No conflict declared.

## Acknowledgement

We are thankful to Bruce T. Hope for scientific support.

## References

- [Almeida, O.F., Shoaib, M., Deicke, J., Fischer, D., Darwish, M.H., Patchev, V.K., 1998.](#) Gender differences in ethanol preference and ingestion in rats. The role of the gonadal steroid environment. *J. Clin. Invest.* 101, 2677–2685.
- [Bertholomey, M.L., Nagarajan, V., Torregrossa, M.M., 2016.](#) Sex differences in reinstatement of alcohol seeking in response to cues and yohimbine in rats with and without a history of adolescent corticosterone exposure. *Psychopharmacology* 233, 2277–2287.
- [Bossert, J.M., Stern, A.L., Theberge, F.R., Cifani, C., Koya, E., Hope, B.T., Shaham, Y., 2011.](#) Ventral medial prefrontal cortex neuronal ensembles mediate context-induced relapse to heroin. *Nat. Neurosci.* 14, 420–422.
- [Bouton, M.E., King, D.A., 1983.](#) Contextual control of the extinction of conditioned fear: tests for the associative value of the context. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process.* 9, 248–265.
- [Burattini, C., Gill, T.M., Aicardi, G., Janak, P.H., 2006.](#) The ethanol self-administration context as a reinstatement cue: acute effects of naltrexone. *Neuroscience* 139, 877–887.
- [Childress, A.R., Mozley, P.D., McElgin, W., Fitzgerald, J., Reivich, M., O'Brien, C.P., 1999.](#) Limbic activation during cue-induced cocaine craving. *Am. J. Psychiatry* 156, 11–18.
- [Crombag, H.S., Shaham, Y., 2002.](#) Renewal of drug seeking by contextual cues after prolonged extinction in rats. *Behav. Neurosci.* 116, 169–173.
- [Cruz, F.C., Babin, K.R., Leao, R.M., Goldart, E.M., Bossert, J.M., Shaham, Y., Hope, B.T., 2014.](#) Role of nucleus accumbens shell neuronal ensembles in context-induced reinstatement of cocaine-seeking. *J. Neurosci.* 34, 7437–7446.
- [Dierraar, L., de Vries, W., Raaso, H., Schoffelmeier, A.N., De Vries, T.J., 2008.](#) Contextual renewal of nicotine seeking in rats and its suppression by the cannabinoid-1 receptor antagonist Rimonabant (SR141716A). *Neuropharmacology* 55, 712–716.
- [Fanous, S., Goldart, E.M., Theberge, F.R., Bossert, J.M., Shaham, Y., Hope, B.T., 2012.](#) Role of orbitofrontal cortex neuronal ensembles in the expression of incubation of heroin craving. *J. Neurosci.* 32, 11600–11609.
- [Fox, H.C., Hong, K.A., Sinha, R., 2008.](#) Difficulties in emotion regulation and impulse control in recently abstinent alcoholics compared with social drinkers. *Addict. Behav.* 33, 388–394.
- [Fuchs, R.A., Evans, K.A., Parker, M.P., See, R.E., 2004.](#) Differential involvement of orbitofrontal cortex subregions in conditioned cue-induced and cocaine-primed reinstatement of cocaine seeking in rats. *J. Neurosci.* 24, 6600–6610.
- [Gamsby, J.J., Templeton, E.L., Bonvini, L.A., Wang, W., Loros, J.J., Dunlap, J.C., Green, A.L., Gulick, D., 2013.](#) The circadian Per1 and Per2 genes influence alcohol intake reinforcement, and blood alcohol levels. *Behav. Brain Res.* 249, 15–21.
- [Grant, S., London, E.D., Newlin, D.B., Villemagne, V.L., Liu, X., Contoreggi, C., Phillips, R.L., Kimes, A.S., Margolin, A., 1996.](#) Activation of memory circuits during cue-elicited cocaine craving. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 12040–12045.
- [Hamlin, A.S., Newby, J., McNally, G.P., 2007.](#) The neural correlates and role of D1 dopamine receptors in renewal of extinguished alcohol-seeking. *Neuroscience* 146, 525–536.

- Janak, P.H., Chaudhri, N., 2010. The potent effect of environmental context on relapse to alcohol-seeking after extinction. *Open Addict. J.* 3, 76–87.
- Jentsch, J.D., Taylor, J.R., 1999. Impulsivity resulting from frontostriatal dysfunction in drug abuse: implications for the control of behavior by reward-related stimuli. *Psychopharmacology* 146, 373–390.
- Juarez, J., Barrios de Tomasi, E., 1999. Sex differences in alcohol drinking patterns during forced and voluntary consumption in rats. *Alcohol* 19, 15–22.
- Kauer, J.A., Malenka, R.C., 2007. Synaptic plasticity and addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 844–858.
- Kilts, C.D., Schweitzer, J.B., Quinn, C.K., Gross, R.E., Faber, T.L., Muhammad, F., Ely, T.D., Hoffman, J.M., Drexler, K.P., 2001. Neural activity related to drug craving in cocaine addiction. *Arch. Gen. Psychiatry* 58, 334–341.
- Koob, G.F., Volkow, N.D., 2010. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 217–238.
- Lancaster, F.E., Spiegel, K.S., 1992. Sex differences in pattern of drinking. *Alcohol* 9, 415–420.
- Lasseter, H.C., Ramirez, D.R., Xie, X., Fuchs, R.A., 2009. Involvement of the lateral orbitofrontal cortex in drug context-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior in rats. *Eur. J. Neurosci.* 30, 1370–1381.
- Lasseter, H.C., Wells, A.M., Xie, X., Fuchs, R.A., 2011. Interaction of the basolateral amygdala and orbitofrontal cortex is critical for drug context-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior in rats. *Neuropsychopharmacology* 36, 711–720.
- Litt, M.D., Cooney, N.L., 2000. Re: comments on reactivity to alcohol-related stimuli in the laboratory and in the field: predictors of craving in treated alcoholics: a reply. *Addiction* 95, 1107–1108.
- London, E.D., Bonson, K.R., Ernst, M., Grant, S., 1999. Brain imaging studies of cocaine abuse: implications for medication development. *Crit. Rev. Neurobiol.* 13, 227–242.
- London, E.D., Ernst, M., Grant, S., Bonson, K., Weinstein, A., 2000. Orbitofrontal cortex and human drug abuse: functional imaging. *Cereb. Cortex* 10, 334–342.
- London, E.D., Simon, S.L., Berman, S.M., Mandelkern, M.A., Lichtman, A.M., Bramen, J., Shinn, A.K., Miotto, K., Learn, J., Dong, Y., Matochik, J.A., Kurian, V., Newton, T., Woods, R., Rawson, R., Ling, W., 2004. Mood disturbances and regional cerebral metabolic abnormalities in recently abstinent methamphetamine abusers. *Arch. Gen. Psychiatry* 61, 73–84.
- Ludwig, A.M., Wikler, A., Stark, L.H., 1974. The first drink: psychobiological aspects of craving. *Arch. Gen. Psychiatry* 30, 539–547.
- Maldonado-Devincci, A.M., Alipour, K.K., Michael, L.A., Kirstein, C.L., 2010. Repeated binge ethanol administration during adolescence enhances voluntary sweetened ethanol intake in young adulthood in male and female rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 96, 476–487.
- Marchant, N.J., Khuc, T.N., Pickens, C.L., Bonci, A., Shaham, Y., 2013. Context-induced relapse to alcohol seeking after punishment in a rat model. *Biol. Psychiatry* 73, 256–262.
- Marchant, N.J., Rabei, R., Kaganovsky, K., Caprioli, D., Bossert, J.M., Bonci, A., Shaham, Y., 2014. A critical role of lateral hypothalamus in context-induced relapse to alcohol seeking after punishment-imposed abstinence. *J. Neurosci.* 34, 7447–7457.
- Marinelli, P.W., Funk, D., Juzysch, W., Li, Z., Le, A.D., 2007. Effects of opioid receptor blockade on the renewal of alcohol seeking induced by context: relationship to c-fos mRNA expression. *Eur. J. Neurosci.* 26, 2815–2823.
- McKinzie, D.L., Nowak, K.L., Yorger, L., McBride, W.J., Murphy, J.M., Lumeng, L., Li, T.K., 1998. The alcohol deprivation effect in the alcohol-preferring P rat under free-drinking and operant access conditions. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 22, 1170–1176.
- Moorman, D.E., Aston-Jones, G., 2014. Orbitofrontal cortical neurons encode expectation-driven initiation of reward-seeking. *J. Neurosci.* 34, 10234–10246.
- Morgan, J.I., Curran, T., 1991. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 421–451.
- O'Brien, C.P., Childress, A.R., McLellan, T., Ehrman, R., 1990. Integrating systemic cue exposure with standard treatment in recovering drug dependent patients. *Addict. Behav.* 15, 355–365.
- Ostlund, S.B., Balleine, B.W., 2007. Orbitofrontal cortex mediates outcome encoding in Pavlovian but not instrumental conditioning. *J. Neurosci.* 27, 4819–4825.
- Panayi, M.C., Killcross, S., 2014. Orbitofrontal cortex inactivation impairs between- but not within-session Pavlovian extinction: an associative analysis. *Neurobiol. Learn. Mem.* 108, 78–87.
- Paxinos, G., Watson, C., 2005. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Randall, P.A., Stewart, R.T., Besheer, J., 2017. Sex differences in alcohol self-administration and relapse-like behavior in Long-Evans rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 156, 1–9.
- Schoenbaum, G., Shaham, Y., 2008. The role of orbitofrontal cortex in drug addiction: a review of preclinical studies. *Biol. Psychiatry* 63, 256–262.
- Schoenbaum, G., Chiba, A.A., Gallagher, M., 1998. Orbitofrontal cortex and basolateral amygdala encode expected outcomes during learning. *Nat. Neurosci.* 1, 155–159.
- Schoenbaum, G., Setlow, B., Saddoris, M.P., Gallagher, M., 2003. Encoding predicted outcome and acquired value in orbitofrontal cortex during cue sampling depends upon input from basolateral amygdala. *Neuron* 39, 855–867.
- Schoenbaum, G., Roesch, M.R., Stalnaker, T.A., 2006. Orbitofrontal cortex, decision-making and drug addiction. *Trends Neurosci.* 29, 116–124.
- Schramm-Sapota, N.L., Francis, R., MacDonald, A., Keistler, C., O'Neill, L., Kuhn, C.M., 2014. Effect of sex on ethanol consumption and conditioned taste aversion in adolescent and adult rats. *Psychopharmacology* 231, 1831–1839.
- Sinha, R., 2009. Modeling stress and drug craving in the laboratory: implications for addiction treatment development. *Addict. Biol.* 14, 84–98.
- Staiger, P.K., White, J.M., 1991. Cue reactivity in alcohol abusers: stimulus specificity and extinction of the responses. *Addict. Behav.* 16, 211–221.
- Stapleton, J.M., Morgan, M.J., Phillips, R.L., Wong, D.F., Yung, B.C., Shaya, E.K., Dannals, R.F., Liu, X., Grayson, R.L., London, E.D., 1995. Cerebral glucose utilization in polysubstance abuse. *Neuropsychopharmacology* 13, 21–31.
- Thomas, K.L., Arroyo, M., Everitt, B.J., 2003. Induction of the learning and plasticity-associated gene Zif268 following exposure to a discrete cocaine-associated stimulus. *Eur. J. Neurosci.* 17, 1964–1972.
- Varlinskaya, E.I., Spear, L.P., 2015. Social consequences of ethanol: impact of age, stress, and prior history of ethanol exposure. *Physiol. Behav.* 148, 145–150.
- Volkow, N.D., Fowler, J.S., 2000. Addiction, a disease of compulsion and drive: involvement of the orbitofrontal cortex. *Cereb. Cortex* 10, 318–325.
- Volkow, N.D., Fowler, J.S., Wolf, A.P., Hitzemann, R., Dewey, S., Bendriem, B., Alpert, R., Hoff, A., 1991. Changes in brain glucose metabolism in cocaine dependence and withdrawal. *Am. J. Psychiatry* 148, 621–626.
- Volkow, N.D., Chang, L., Wang, G.J., Fowler, J.S., Ding, Y.S., Sedler, M., Logan, J., Franceschi, D., Gatley, J., Hitzemann, R., Gifford, A., Wong, C., Pappas, N., 2001. Low level of brain dopamine D2 receptors in methamphetamine abusers: association with metabolism in the orbitofrontal cortex. *Am. J. Psychiatry* 158, 2015–2021.
- Walker, B.M., Walker, J.L., Ehlers, C.L., 2008. Dissociable effects of ethanol consumption during the light and dark phase in adolescent and adult Wistar rats. *Alcohol* 42, 83–89.
- Wikler, A., 1973. Dynamics of drug dependence: implications of a conditioning theory for research and treatment. *Arch. Gen. Psychiatry* 28, 611–616.
- Willcocks, A.L., McNally, G.P., 2013. The role of medial prefrontal cortex in extinction and reinstatement of alcohol-seeking in rats. *Eur. J. Neurosci.* 37, 259–268.
- van Haaren, F., Anderson, K., 1994. Sex differences in schedule-induced alcohol consumption. *Alcohol* 11, 35–40.



## 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.

Profa. Dra. Cristina Kurachi  
Presidente da CEUA/IFSC

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Participação de pequenos grupos neurais seletivamente ativados (neuronal ensembles) na reinstalação da autoadministração de etanol induzida pelo ambiente: investigação farmacogenética, optogenética e molecular.", protocolada sob o CEUA nº 1592270616, sob a responsabilidade de **Fábio Cardoso Cruz e equipe; Paola Palombo; Paula Cristina Bianchi** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 29/09/2016.

We certify that the proposal "", utilizing Heterogenics rats, Transgenics rats, protocol number CEUA 1592270616, under the responsibility of **Fábio Cardoso Cruz and team; Paola Palombo; Paula Cristina Bianchi** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sao Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 09/29/2016.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [08/2016](#) a [12/2016](#)

Área: [Farmacologia/farmacologia](#)

Origem: [CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#) sexo: [Machos](#) idade: [60 a 60 dias](#) N: [---](#)

Linhagem: [Long-Evans](#) Peso: [250 a 250 g](#)

Origem: [CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia](#)

Espécie: [Ratos transgênicos](#) sexo: [Machos](#) idade: [60 a 60 dias](#) N: [---](#)

Linhagem: [Long-Evans c-FOS\\_tetop::iCre](#) Peso: [250 a 250 g](#)

Origem: [CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia](#)

Espécie: [Ratos transgênicos](#) sexo: [Machos](#) idade: [60 a 60 dias](#) N: [---](#)

Linhagem: [Wistar c-Fos\\_LacZ](#) Peso: [250 a 250 g](#)

Local do experimento:

São Paulo, 15 de junho de 2018

Profa. Dra. Monica Levy Andersen  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo





MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION NATIONALE,  
DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

Paris, le **22 AOUT 2014**

Direction générale  
de la recherche  
et de l'innovation

Service de la performance,  
du financement et de la  
contractualisation avec les  
organismes de recherche

Département de la culture  
scientifique et des relations  
avec  
la société

Expérimentation animale -  
Autorisation de projet

Affaire suivie par  
Virginie Vallet-Erdtmann  
Chargée de mission

Téléphone  
01 55 55 99 55  
Fax  
01 55 55 99 59  
Mél.  
Virginie.vallet-erdtmann  
@recherche.gouv.fr

1 rue Descartes  
75231 Paris Cedex 05

**Objet : Notification d'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques**

Monsieur,

En application des dispositions du code rural et de la pêche maritime, notamment ses articles R. 214-87 à R.214-126, le projet :

- référencé sous le numéro *01376.03*,
- ayant pour titre : « *Rôle de hevin dans la neuroplasticité des désordres liés au stress et à l'addiction* »,
- déposé par l'Établissement Utilisateur : *IFR 83 - Institut de biologie intégrative Université Pierre et Marie Curie*, numéro d'agrément : *B750524* dont le responsable est *Monsieur Michel Labouesse*,
- et dont les responsables de la mise en œuvre générale du projet et de sa conformité à l'autorisation sont *Monsieur Vincent VIALOU* et *Monsieur Bruno GIROS*,

est autorisé.

L'autorisation de projet est accordée pour une durée de *5 ans* à partir du

**22 AOUT 2014**

Le projet précité a été évalué sur le plan éthique par le Comité d'éthique en expérimentation animale n° *05* et a reçu un avis *favorable*.

Ce projet fera l'objet, à l'issue de sa réalisation, d'une appréciation rétrospective. Il vous appartiendra de prendre contact directement avec le Comité d'Éthique.

Pour le ministre et par délégation  
le chef du service de la performance, du  
financement et de la contractualisation avec  
les organismes de recherche

Éric BERNET

Monsieur Michel Labouesse  
[lmichel@igbmc.fr](mailto:lmichel@igbmc.fr)