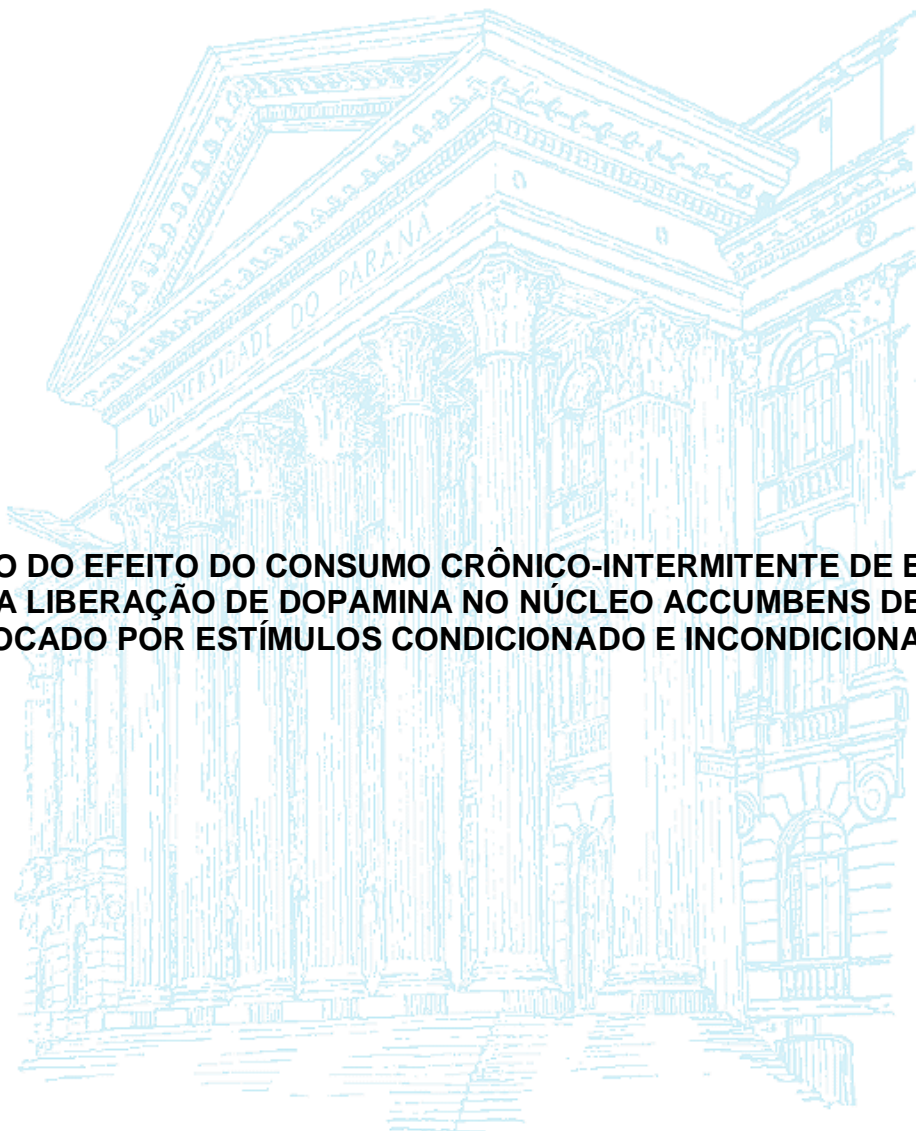


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
AMANDA MAINO FIORENZA

**ESTUDO DO EFEITO DO CONSUMO CRÔNICO-INTERMITENTE DE ETANOL
SOBRE A LIBERAÇÃO DE DOPAMINA NO NÚCLEO ACCUMBENS DE RATOS
EVOCADO POR ESTÍMULOS CONDICIONADO E INCONDICIONADO**



CURITIBA
2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PÓS-GRADUAÇÃO E CIÊNCIAS-BIOQUÍMICA
AMANDA MAINO FIORENZA**

**ESTUDO DO EFEITO DO CONSUMO CRÔNICO-INTERMITENTE DE ETANOL
SOBRE A LIBERAÇÃO DE DOPAMINA NO NÚCLEO ACCUMBENS DE RATOS
EVOCADO POR ESTÍMULOS CONDICIONADO E INCONDICIONADO**

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências:
Bioquímica, Setor de Ciências
Biológicas da Universidade
Federal do Paraná, como requisito
parcial à obtenção do título de
Doutor em Bioquímica
Orientador: Prof. Dr. Cláudio Da
Cunha
Co-orientador: Profa. Dra. Donita
Robinson**


**CURITIBA
2015**

TERMO DE APROVAÇÃO

AMANDA MAINO FIORENZA

Estudo do efeito do consumo crônico-intermitente de etanol sobre a liberação de dopamina no núcleo accumbens de ratos evocado pelos estímulos condicionado e incondicionado

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Claudio da Cunha – Orientador
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof.ª Dr.ª Maria Aparecida B. F. Vital
Departamento Farmacologia, UFPR



Prof.ª Dr.ª Maribel A. Rubin
Departamento de Bioquímica, UFSM



Prof. Dr. Roberto Andreatini
Departamento Farmacologia, UFPR

Curitiba, 22 de janeiro de 2016.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais que com tanto amor e sacrifício me conduziram até aqui. Dedico, também, aos meus avós por serem meus exemplos de caráter.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao Grande Arquiteto do Universo por me conduzir até aqui, por me dar forças, nunca me deixar perder a esperança e por colocar pessoas iluminadas no meu caminho.

Agradeço aos meu pais, por sempre preservar a família embora todo o sacrifício que passamos juntos. Por todo o apoio nesse período mesmo muito distantes. Se hoje estou aqui, com certeza é por vocês e para vocês. Amo muito os dois!

Agradeço ao meu orientador por ser um educador no sentido mais amplo da palavra e por ser uma fonte inesgotável de entusiasmo científico. Agradeço também, pela compreensão e disponibilidade sempre! Me aceitaste com toda a boa vontade embora nunca tivesse me conhecido, nunca esquecerei disso.

Agradeço aos membros da banca por se fazerem presentes e por reservar um precioso tempo para se dedicar à correção do meu trabalho! Certamente vocês enriquecerão meu trabalho.

À minha co-orientadora, Profa. Donita Robinson, obrigada por me receber de braços abertos em um país estranho, tentando me fazer sentir em casa sempre. Me conduziste com tanto carinho e paciência que nunca esquecerei.

Agradeço aos meus colegas do laboratório na UNC, principalmente às minhas ajudantes Kaitlin e Megan pela honra de ensinar vocês e pela ajuda comprometida.

Aos meus colegas de laboratório que fizeram todos os dias muito mais suaves e alegres. Encontrei uma família de verdade aqui no laboratório e me sinto orgulhosa de dizer que nos amamos, nos apoiamos e torcemos incondicionalmente um pelo outro. Somos o exemplo de que a união faz a força e traz resultado! Que jamais nos afastemos! Como dizemos sempre: “A gente morre abraçado! ”.

Agradeço especialmente a Julie, minha “filha científica”, minha ajudante de todo o dia, me sinto honrada e muito orgulhosa de ver a tua evolução desde o primeiro dia no laboratório até hoje. Você se comprometeu de uma forma singular comigo e com meu trabalho, adotando-o como seu! Me reservo a dizer que tens um grande futuro! Me sinto orgulhosa de fazer parte da tua formação. Obrigada.

Ao meu “marigo” Jonas, por ter dividido por anos a tua vida, os problemas, as alegrias, as noites em claro, os risos e as contas. Foi, é, e será meu eterno amigo! Te amo!

Aos meus amigos presentes e distantes pelo apoio e carinho sempre. Vocês são anjos que me deram privilégio da amizade e convivência! Obrigada sempre!

Agradeço aos professores que dedicadamente fizeram parte da construção do meu conhecimento até aqui. Sem dúvida escolhi esse caminho por exemplo de vocês.

Aos funcionários do departamento de Bioquímica e Farmacologia pelo carinho e disponibilidade. Em especial à Sílvia, Ely e dona Júlia pelo alegria diária, carinho e respeito.

Aos animais que docemente cederam a sua vida aos nossos cuidados, certamente são os protagonistas da nossa ciência e construção de um bem maior.

A minha “filha” canina Frida que sempre me faz rir assim que abro a porta depois de um dia exaustivo! O teu rabinho balançando salva até o pior dia!

E finalmente ao meu companheiro: André! Qualquer agradecimento seria pouco pelo que tu fizeste por mim! Sempre, longe ou perto me dá forças, carinho e esperança! Me deste um lar cheio de amor, uma família que me recebeu de braços abertos e com certeza, ainda teremos muitas experiências maravilhosas pela frente na construção da nossa família! Te amo!

Desiderata

Siga tranquilamente entre a inquietude e a pressa, lembrando-se que há sempre paz no silêncio. Tanto que possível, sem humilhar-se, viva em harmonia com todos os que o cercam.

Fale a sua verdade mansa e calmamente e ouça a dos outros, mesmo a dos insensatos e ignorantes – eles também tem sua própria história.

Evite as pessoas agressivas e transtornadas, elas afligem nosso espírito. Se você se comparar com os outros você se tornará presunçoso e magoado, pois haverá sempre alguém inferior e alguém superior a você. Viva intensamente o que já pode realizar.

Mantenha-se interessado em seu trabalho, ainda que humilde, ele é o que de real existe ao longo de todo tempo. Seja cauteloso nos negócios, porque o mundo está cheio de astúcia, mas não caia na descrença, a virtude existirá sempre.

“Você é filho do Universo, irmão das estrelas e árvores. Você merece estar aqui e mesmo que você não possa perceber a terra e o universo vão cumprindo o seu destino.”

Muita gente luta por altos ideais e em toda parte a vida está cheia de heroísmos.

Seja você mesmo, principalmente, não simule afeição nem seja descrente do amor; porque mesmo diante de tanta aridez e desencanto ele é tão perene quanto a relva.

Aceite com carinho o conselho dos mais velhos, mas seja compreensível aos impulsos inovadores da juventude.

Alimente a força do Espírito que o protegerá no infortúnio inesperado, mas não se desespere com perigos imaginários, muitos temores nascem do cansaço e da solidão.

E a despeito de uma disciplina rigorosa, seja gentil para consigo mesmo. Portanto esteja em paz com Deus, como quer que você. O conceba, e quaisquer que sejam seus trabalhos e aspirações, na fatigante jornada da vida, mantenha-se em paz com sua própria alma.

Acima da falsidade, dos desencantos e agruras, o mundo ainda é bonito, seja prudente.

FAÇA TUDO PARA SER FELIZ

RESUMO

O etanol é uma droga que promove a adição, aumentando a liberação de dopamina no núcleo accumbens (NAc). Após a realização de um condicionamento, os estímulos condicionados (CS) que prevêm a oferta de etanol, adquirem a propriedade de induzir a liberação de dopamina fásica no NAc. Isto gera um comportamento direcionado à aproximação do CS, o que contribui para a adição ao etanol. A naltrexona (NTX) é um antagonista dos receptores μ opióides capaz de diminuir a liberação de dopamina no sistema nervoso central, sendo assim utilizada para tratar o alcoolismo. Nossa hipótese é que a exposição crônica intermitente ao etanol (CIE) promove um comportamento direcionado ao CS, bem como altera as respostas de dopamina para o consumo do etanol e seu estímulo preditivo. Além disso, nossa hipótese é que a naltrexona previne o aumento do comportamento direcionado ao CS causado pela exposição CIE, ao passo que reduz a procura por recompensas alcoólicas. Para tal foi realizada uma exposição CIE seguida do condicionamento Pavloviano em que um CS foi associado à recompensas alcoólicas e não alcoólicas. A voltametria cíclica de varredura rápida (FSCV) foi utilizada para medir a liberação de dopamina fásica no NAc em resposta ao CS e ao estímulo incondicionado. Finalmente, o efeito da naltrexona sobre o comportamento foi avaliado. Os dados mostram que a presença de etanol na recompensa diminuiu o comportamento direcionado ao CS e que uma exposição CIE impediu este efeito. Foi observada uma interação significativa entre a exposição CIE e o tratamento com a naltrexona, mas nenhum desses fatores *per se* causou um efeito significativo sobre o comportamento direcionado ao CS. A presença de etanol como recompensa também diminuiu a liberação de dopamina no NAc em resposta a entrega do estímulo incondicionado, bem como a um CS, mas somente em ratos que foram submetidos à exposição CIE. Os dados mostram que um histórico prévio de exposição ao etanol e um tratamento com naltrexona parece mudar a maneira que a presença do etanol em uma recompensa afeta a liberação de dopamina no NAc e no comportamento direcionado ao CS.

Palavras-chave: Dopamina, Etanol, Voltametria cíclica de varredura rápida, Naltrexona e Comportamento.

ABSTRACT

Ethanol is an addictive drug that promotes phasic release of dopamine in the nucleus accumbens (NAc). After a conditioning, the conditioned stimuli (CS) that predicts ethanol delivery acquires the property of inducing phasic dopamine release in the NAc. This causes attentional bias and approach behavior towards the CS which is known as a sign tracking behavior that contributes to maintenance of ethanol addiction. The naltrexone (NTX) is an opioid antagonist that decreases dopamine release in the NAc and for therefore is used to treat ethanol addiction. Our hypothesis was that a chronic intermittent ethanol exposure (CIE) can promote a behavior directed to the conditioned stimulus, and can change the dopamine response for ethanol consumption and a stimulus that provides this consumption. Besides, a treatment with naltrexone could prevent the increase in sign-tracking behavior caused by a CIE exposure and reduce the demand for alcoholic rewards. Rats were submitted to CIE exposure followed by Pavlovian conditioning in which a CS was associated with alcoholic and nonalcoholic rewards. Next, fast-scan cyclic voltammetry was used to measure phasic dopamine release in the NAc in response to the CS and to the alcoholic and nonalcoholic rewards. Finally, the effect of NTX on sign tracking behavior was measured. The presence of alcohol in the reward decreased sign tracking behavior and CIE prevented this effect. A significant interaction was observed between CIE exposure and NTX treatment, but none of these factors by themselves caused a significant effect on sign-tracking behavior. The presence of alcohol in the reward also decreased DA release in the NAc in response to reward delivery and in response to the predictive CS only in rats submitted to the CIE exposure. In conclusion, the previous history of ethanol exposure and a naltrexone treatment seem to change how the presence of alcohol in a reward affects DA release in the NAc and sign-tracking behavior.

Key words: Dopamine, Ethanol, Fast-scan cyclic voltammetry, Naltrexone and Behavior.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Sinapse dopaminérgica; em detalhe os receptores tipo D_1 e tipo D_2 (Cenci, 2014).*_____ 17
- Figura 2. Vias dopaminérgicas no encéfalo de humanos (esquada) e de roedores (direita).* _____ 19
- Figura 3. Ilustração de registros de variações fásica (esq.) e tônica (dir.) na liberação de dopamina por fibras estimuladas por uma sequência de pulsos elétricos de alta e baixa frequência, respectivamente (Bass et al., 2013).*_____ 21
- Figura 4. Ilustração de uma sonda de microdiálise in vivo inserida em um tecido nervoso (Chefer et al., 2009).*_____ 22
- Figura 5. Voltametria cíclica de varredura rápida.* _____ 24
- Figura 6. Sistema de recompensa e suas projeções (Adaptado de : Russo e Nestler, 2013).* _____ 266
- Figura 7. Evolução dos estágios de uso de substâncias de abuso até a dependência (Koob e Volkow, 2010).*_____ 27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALC- Recompensa alcoólica (Ensure+Etanol)

AMPc- Monofosfato de Adenosina cíclico

ATP- Trifosfato de Adenosina

CIE- Exposição crônica Intermitente (do inglês *Chronic Intermittent exposure*)

COMT- Catecol orto-metiltransferase

CREB- Proteína de ligação elemento-responsiva à AMPc (do inglês *cAMP response element-binding protein*)

CS- Estímulo condicionado (do inglês *conditioned stimulus*)

DA- Dopamina

DAT – Transportador de dopamina

ENS- Recompensa não- alcoólica (Ensure®)

FSCV- Voltametria cíclica de varredura rápida (do inglês *Fast-scan cyclic voltammetry*)

GABA- Ácido gama-amino butírico

Gpe- Globo pálido externo

GPI- Globo pálido interno

HVA- Ácido Homovanílico (do inglês *Homovanilic acid*)

LTD- Depressão de longo prazo (do inglês *Long-term depression*)

LTP- Potenciação de longo prazo (do inglês *Long-term potentiation*)

MAO- Monoamina oxidase

MAP- Proteína ativada por mitógenos (do inglês *mitogen-activated protein*)

NAC- Núcleo Accumbens

NEMs- Neurônios espinhosos médios

NTX- Naltrexona

PKA- Proteína Cinase A

SNC- Sistema nervoso central

SNC- Substância negra compacta

SNr- Substância negra reticulada

ST – Comportamento direcionado ao estímulo (do inglês *Sign-tracking*)

STN- Núcleo subtalâmico (do inglês *Subthalamic Nuclei*)

TH- Tirosina Hidroxilase

US- Estímulo incondicionado (do inglês *Unconditioned stimulus*)

VMAT- Transportador vesicular de monoaminas (do inglês *vesicular monoamine transporter*)

VTA- Área tegmental ventral (do inglês *Ventral Tegmental Area*)

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO:	15
1.1 Sistema dopaminérgico	15
1.2 Liberação de dopamina	20
1.3 Técnicas de monitoramento da dopamina	21
1.4 Dopamina e adição	25
1.5 Etanol e adição	28
2.Objetivo Geral	31
2.1.Objetivos específicos	31
3.Artigo científico	32
4.Discussão Geral	53
5.Conclusão	56
6.Referências bibliográficas	57

APRESENTAÇÃO

Esta tese apresenta os resultados na forma de artigo científico no qual encontram-se descrito os seguintes itens: Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências.

Na tese, o item 4, Discussão Geral, apresenta a integração dos resultados apresentados no artigo. No item 5, Conclusão, são apresentadas as conclusões gerais da tese. As referências Bibliográficas apresentadas no item 6 referem-se às citações que aparecem na Introdução e na Discussão Geral.

INTRODUÇÃO:

1.1 Sistema dopaminérgico

O neurotransmissor dopamina (3,4-dihidroxi-feniletanamina; DA), assim como a epinefrina e a norepinefrina, é uma amina biogênica do grupo das catecolaminas (SIEGEL *et al.*, 2006; JACKOWSKA & KRYSINSKI, 2013). A síntese desses neurotransmissores se dá a partir do aminoácido tirosina ácido (S)-2-Amino-3-(4-hidroxifenilpropanóico, que, através da ação enzimática da tirosina hidroxilase (TH) irá converter a tirosina em L-DOPA (3,4-diidroxifenilalanina) esta, por sua vez, é convertida a DA pela enzima DOPA descarboxilase.

A DA é então transportada para vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de dopamina (VMAT, do inglês *vesicular monoamine transporter*) e liberada por exocitose quando o terminal sináptico é despolarizado (KANDEL, 2000; JONES *et al.*, 2014). Essa liberação pode ocorrer de duas formas, a tônica e a fásica, sendo que a quantidade de neurotransmissor que será liberado depende da intensidade do estímulo, da capacidade preditiva do mesmo e da saliência associada ao estímulo em questão (GRACE, 2000).

Após ser liberada, a DA é recaptada para os terminais sinápticos pelo transportador de dopamina (DAT, do inglês *dopamine transporter*). Além disso, ela pode também ser metabolizada pelas enzimas monoamina oxidase (MAO) e pela catecolamina ortometiltransferase (COMT). A MAO possui duas isoformas, a MAO-A e a MAO-B e se encontra ligada à membrana mitocondrial externa, onde degrada o excesso de DA citosólica. A COMT também possui duas isoformas: a COMT-MB que se encontra ligada à parte extracelular das membranas pré e pós-sinápticas; e a COMT-S presente em solução no meio extracelular. Ambas enzimas têm como produto final de suas vias de metabolização, o ácido homovanílico (HVA, do inglês *homovanillic acid*) (BJORKLUND & DUNNETT, 2007).

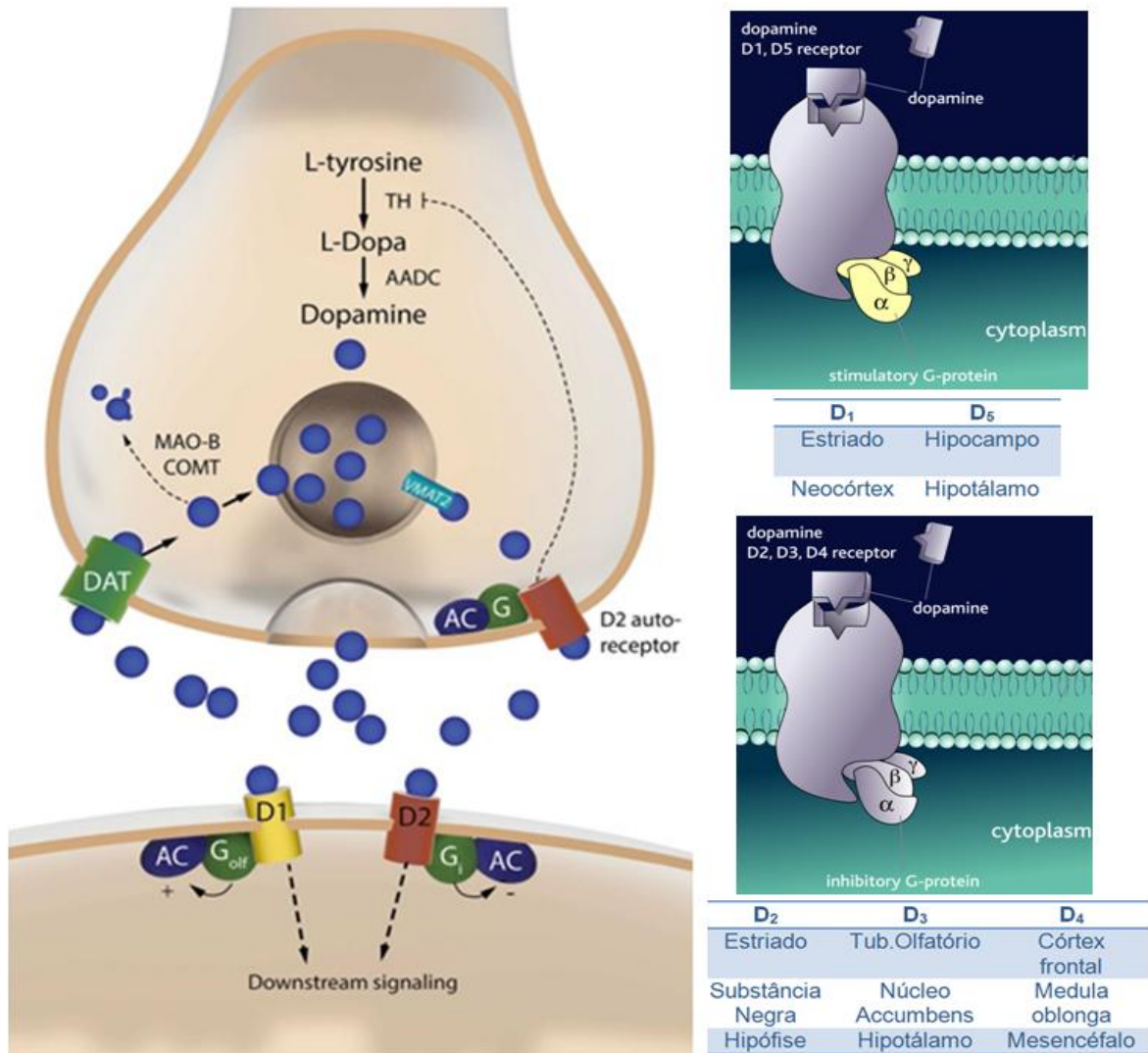
Os receptores dopaminérgicos são divididos em duas famílias: a dos receptores do tipo D₁ (compreendendo os receptores D₁ e D₅) e a dos receptores do tipo D₂ (compreendendo os receptores D₂, D₃ e D₄)(ver Fig. 1) (SIBLEY & MONSMA, 1992; MISSALE *et al.*, 1998; JONES *et al.*, 2014). Os receptores do tipo D₁ ativam a

enzima adenilato ciclase via proteína G_s e também ativam a enzima fosfolipase C; os do tipo D_2 inibem a adenilato ciclase via proteínas G_i e G_o (MIYANO *et al.*, 2014).

A enzima adenilato ciclase, ativada por receptores do tipo D_1 , catalisa a reação de síntese da adenosina monofosfato cíclico (AMPC) a partir da adenosina trifosfato (ATP). O AMPC ativa a proteína cinase dependente de AMPC (PKA) que, por sua vez, fosforila canais de potássio dependentes de voltagem. Isso altera o limiar de potencial elétrico para a abertura desses canais causando despolarização ou hiperpolarização. Esse fenômeno, depende do tipo de neurônio que apresenta esses receptores, da frequência de potenciais de ação da fibra pré-sináptica, do estado de despolarização da membrana pós-sináptica, entre outros fatores (UNDIEH, 2010).

A ligação da DA aos receptores tipo D_2 e a consequente ativação das proteínas $G_{i/o}$ inibe a enzima adenilato ciclase e conseqüentemente reduz os níveis de AMPC. Esses receptores D_2 estão presentes tanto na membrana pré-sináptica de neurônios dopaminérgicos e glutamatérgicos, bem como na membrana dos neurônios pós-sinápticos. Já os receptores do tipo D_1 estão presentes somente na membrana de neurônios pós-sinápticos (SIBLEY & MONSMA, 1992; MISSALE *et al.*, 1998; CENCI, 2014).

Figura 1. Sinapse dopaminérgica; em detalhe os receptores tipo D₁ e tipo D₂.



Fonte: CENCI (2014).

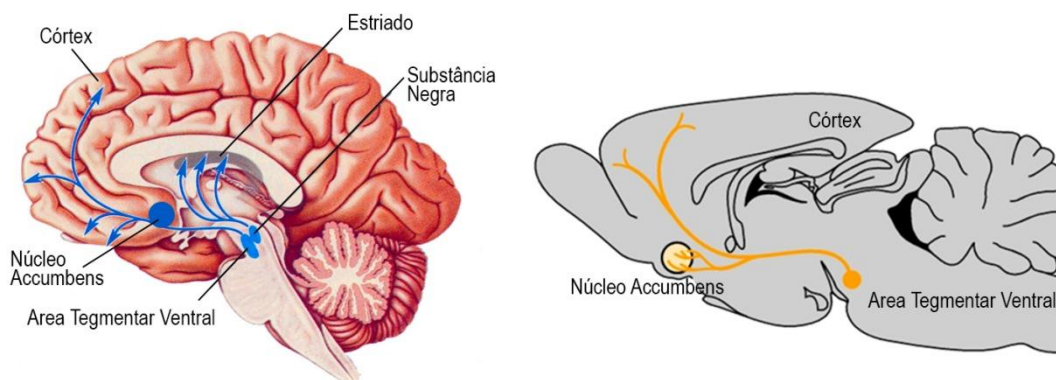
Há também outros mecanismos pelos quais os receptores dopaminérgicos podem modular a excitabilidade de neurônios, como por exemplo através da ativação da cascata das MAP cinases (do inglês *mitogen-activated protein*). A ativação da PKA desencadeada pelos receptores do tipo D₁ pode também levar à fosforilação da proteína CREB (do inglês *cAMP response element-binding protein*) que, por sua vez, modula a transcrição de genes de expressão imediata (UNDIEH, 2010).

Os mecanismos pelos quais os receptores D₁ e D₂ aumentam ou diminuem a excitabilidade dos neurônios são complexos. Porém, do ponto de vista adaptativo,

visam otimizar a razão sinal/ruído da neurotransmissão excitatória por uma regra simples: eles aumentam a probabilidade de neurotransmissão nas sinapses entre neurônios mais ativos (sinal) e diminuem essa probabilidade nas sinapses entre neurônios pouco ativos (ruído). Esse mecanismo, faz com que a DA seja um modulador da neurotransmissão excitatória, agindo como um moderador dessas mensagens em uma rede neural. É através dessa modulação que os neurônios dopaminérgicos aumentam ou diminuem a motivação para o início de ações motoras e reforçam a aprendizagem de ações com consequências gratificantes (SCHULTZ, 1998).

Os neurônios dopaminérgicos da substância negra compacta (SNc) e da área tegmentar ventral (VTA, do inglês *ventral tegmental area*) fazem sinapses difusas com neurônios de projeção do estriado (WU *et al.*, 2012). A via nigroestriatal (ver Fig. 2) possui os corpos celulares de seus neurônios na SNc e projeta pelo feixe prosencefálico medial para a parte dorsal do corpo estriado. A via mesolímbica/mesocortical possui os corpos celulares de seus neurônios alojados na VTA e seus axônios projetam os seus terminais para estruturas do sistema límbico (núcleo accumbens, hipocampo e amígdala) e para o córtex pré-frontal (NIRENBERG *et al.*, 1996; RICE & CRAGG, 2008, SESACK & GRACE, 2010).

Figura 2. Vias dopaminérgicas no encéfalo de humanos (esquerda) e de roedores (direita).



Fonte: <http://thesalience.wordpress.com> e <http://writepass.com> (Acesso em 10/01/2016 às 09:06).

Os núcleos da base são estruturas subcorticais responsáveis pela escolha e iniciação de ações motoras. Eles estão, também, envolvidos na seleção de estados motivacionais que resultam em um esforço voluntário na obtenção de uma recompensa. As principais estruturas que compreendem esses núcleos são: o corpo estriado (formado pelo núcleo caudado, putâmen e núcleo accumbens); os segmentos internos e externos do globo pálido (GPe e GPI); o núcleo subtalâmico (STN, do inglês *subthalamic nucleus*); a substância negra parte reticulada (SNr) e compacta (SNc) e a VTA (DA CUNHA *et al.*, 2009). Formado pelos neurônios espinhosos médios (NEMs) e interneurônios, o corpo estriado é a principal estrutura de entrada dos núcleos da base. Os NEMs são neurônios gabaérgicos e recebem aferências glutamatérgicas do córtex cerebral, tálamo e de outras estruturas límbicas tais como o hipocampo e a amígdala. (RICE *et al.*, 2011; SOMOGYI & SMITH, 1979; KAWAGUCHI *et al.*, 1995; FRENCH & TOTTERDELL, 2002; 2003; SESACK & GRACE, 2010).

Duas populações distintas de NEMs formam as vias de projeção para o GPI e SNr que são as estações de saída dos núcleos da base. Os NEMs da via direta apresentam a substância P e receptores D1. Seus axônios fazem projeções diretas para o Gpi e SNr. Os NEMs da via indireta apresentam encefalina e receptores D2.

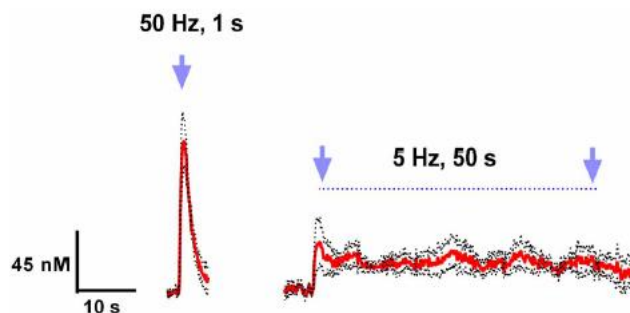
Seus axônios fazem projeções indiretas para as estações de saída, projetando para o GPe. Este, faz sinapses com os neurônios do GPi e neurônios do STN que também projetam para o GPi. A DA exerce um papel modulador sobre as sinapses glutamatérgicas que projetam para o estriado, selecionando as ações apropriadas pela via direta e inibindo ações concorrentes pela via indireta (ALEXANDER et al., 1986; EAGLE & BAUNEZ, 2010).

Os interneurônios do estriado usam GABA ou acetilcolina como neurotransmissores; eles ajudam a sincronizar a liberação de DA pelos neurônios da SNc e VTA (KAWAGUCHI *et al.*, 1995; ZHOU *et al.*, 2002; TEPPER *et al.*, 2007). A variação na concentração sináptica da DA têm uma grande importância para a seleção de ações motoras, estados motivacionais e aprendizagem.

1.2 Liberação de dopamina

A liberação da DA se dá em dois padrões distintos: liberação tônica, que acontece quando as fibras dopaminérgicas apresentam uma baixa frequência de potenciais de ação que resultam na liberação de pequenas quantidades de dopamina de forma contínua; e a liberação fásica, que acontece quando as fibras dopaminérgicas exibem altas frequências de potenciais de ação por períodos breves, o que resulta em um grande aumento na concentração sináptica de dopamina de curta duração (ver Fig. 3) (ROBINSON & WIGHTMAN, 2007) .

Figura 3. Ilustração de registros de variações fásica (esq.) e tônica (dir.) na liberação de dopamina por fibras estimuladas por uma sequência de pulsos elétricos de alta e baixa frequência, respectivamente



Fonte : BASS (2013).

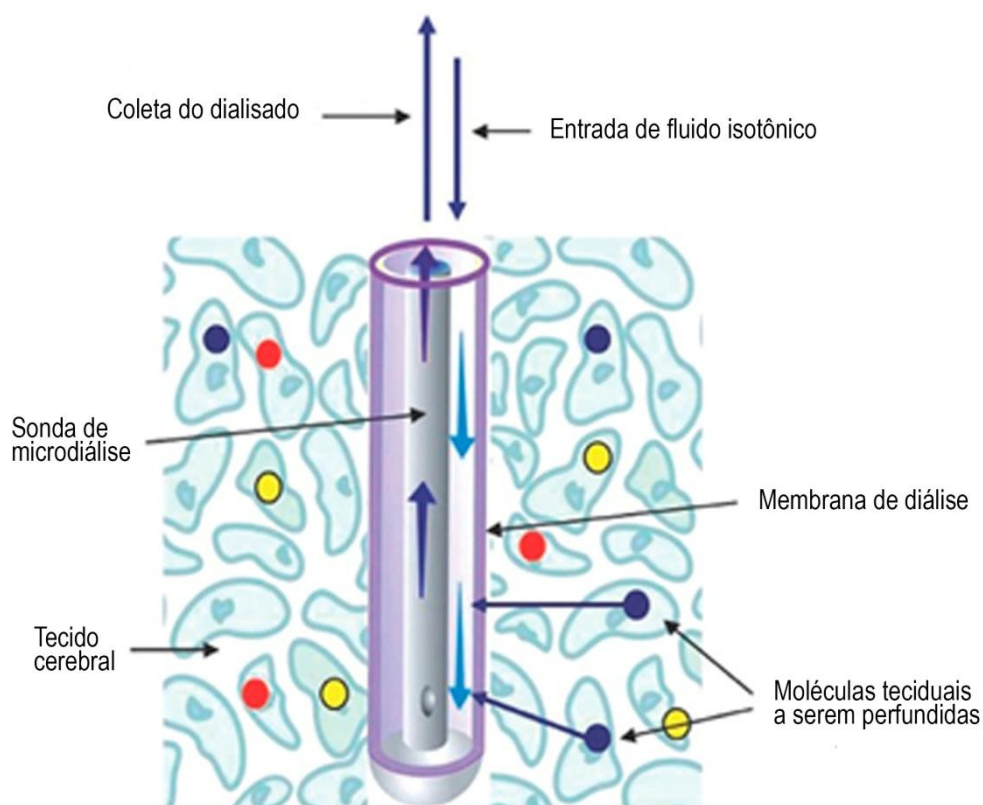
A liberação fásica de DA no NAc promove um aumento na motivação para iniciar ações que resultam na obtenção de recompensas imediatas. Além disso, tanto no NAc como no estriado dorsal a liberação fásica de DA funciona como um sinal de aprendizagem (*teaching signal*) que sinaliza quando uma associação entre um estímulo e uma resposta motora deve ser reforçado ou enfraquecido. Os mecanismos do reforço ou extinção dessas associações envolvem o fortalecimento ou enfraquecimento das sinapses entre os neurônios glutamatérgicos (que codificam estímulos) e os NEMs (que selecionam e iniciam ações motoras). Esses processos de plasticidade sináptica são conhecidos como potenciação de longo prazo e depressão de longo prazo (LTP e LTD do inglês *long term potentiation/depression*) e possuem um papel importante no processo de adição (CALABRESI *et al.*, 1996; CALABRESI *et al.*, 2000; TEPPER & BOLAM, 2004; GERFEN & SURMEIER, 2011).

1.3 Técnicas de monitoramento da dopamina

Para melhor compreender esses processos de liberação fásica e tônica de DA, podemos utilizar técnicas de monitoramento da concentração extracelular desse neurotransmissor como a microdiálise e a voltametria cíclica de varredura rápida.

A microdiálise fornece uma boa seletividade química, porém, conta com uma resolução temporal pobre, da ordem de minutos a horas (ver Fig. 4) (CHEFER *et al.*, 2009; ROBINSON *et al.*, 2009), sendo mais adequada para observar as liberações tônicas de DA. Já a voltametria cíclica de varredura rápida ou FSCV (do inglês *fast scan cyclic voltammetry*) realiza uma amostragem com alta resolução temporal (décimos de segundos), embora não apresente uma alta seletividade química. A FSCV é uma técnica mais adequada para registrar a liberação fásica de DA, sendo assim, muito utilizada para observações em tempo real associadas à comportamentos. Outra vantagem da FSCV é um menor dano tecidual pois os eletrodos usados têm um comprimento inferior a 100 μm , enquanto as sondas de microdiálise têm comprimentos da ordem de milímetros (WESTERINK, 1995).

Figura 4. Ilustração de uma sonda de microdiálise in vivo inserida em um tecido nervoso



Fonte: CHEFER (2009).

Visto as vantagens da FSCV e a melhor adequação para o presente estudo, vejamos mais detalhadamente o funcionamento dessa técnica e seus princípios.

Os registros de FSCV são feitos com eletrodos de fibra de carbono, onde é aplicado repetidamente um ciclo de variação de potencial elétrico. Essa variação ou varredura tem a forma de uma onda triangular que vai de valores de potencial elétrico onde nenhum dos analitos se oxida, até valores superiores aos necessários para oxidar todos os analitos. Após a inflexão do potencial, este faz a varredura decrescente, diminuindo gradativamente até os valores iniciais (ver Fig. 5) (ROBINSON *et al.*, 2003; WIGHTMAN, 2006; ROBERTS *et al.*, 2013). Na fase ascendente dessa rampa de potencial elétrico, os grupos químicos dos analitos que podem se oxidar, doam os seus elétrons para a superfície da fibra de carbono. Na rampa descendente de potencial, os analitos que podem se reduzir, recuperam os elétrons anteriormente perdidos para o eletrodo, regenerando, assim, o analito que serviu de substrato às reações de oxi-redução. As transferências de elétrons dos analitos para o eletrodo e do eletrodo para o analito geram uma variação de corrente elétrica que é medida por um potenciostato. As varreduras de potencial aplicado em função da corrente, podem ser representadas na forma de um gráfico chamado de voltamograma cíclico. As variações de corrente que ocorrem ao longo dos potenciais aplicados e ao longo do tempo são representadas em um gráfico de cores (*color plot*), onde o tempo é representado no eixo x, a variação de potencial elétrico de cada ciclo é representado no eixo y e as correntes positivas (oxidação), bem como as correntes negativas (redução) são representadas pelo código de cores (eixo z).

As correntes geradas pelas reações de oxi-redução dos neurotransmissores liberados são muito pequenas comparadas às correntes capacitivas do eletrodo e às correntes geradas por outros compostos do meio extracelular que não apresentam uma variação rápida na sua concentração. Para que essas correntes não dificultem a análise das correntes de oxi-redução da DA elas são subtraídas do gráfico de cores por um processo chamado de *background subtraction*. Esse processo consiste na subtração digital das correntes geradas em um tempo fixo (linha de base ou *background*) das correntes geradas nos eventos de interesse. Esse processo faz com que apenas as varreduras nas correntes de oxi-redução da DA e de outros analitos que têm uma variação rápida na sua concentração sejam plotadas. Os dados desses gráficos passam por alisamentos digitais e pela aplicação de filtros

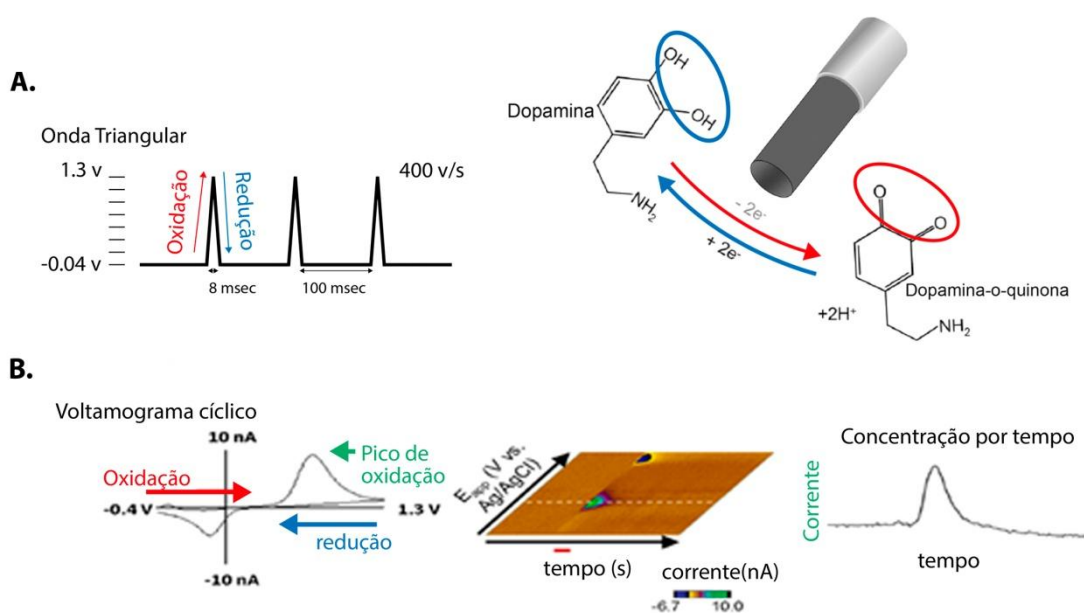
que subtraem as variações de corrente que ocorrem com uma frequência não condizente com as causadas pela liberação e recaptação de neurotransmissores.

Após os registros de FSCV *in vivo*, os eletrodos de carbono são calibrados com concentrações conhecidas de DA para que os valores de corrente possam ser extrapolados para as concentração de DA reais.

Como toda técnica, a FSCV apresenta algumas limitações: Ela não se aplica à detecção de compostos que não são eletroativos (p. ex. neurotransmissores aminoácidos e acetilcolina); ela registra variações rápidas (fásicas) na concentração extracelular de neurotransmissores mas não mensura a concentração absoluta desses compostos; não registra variações lentas (tônicas) na concentração de neurotransmissores e seus metabólitos; essa técnica não permite identificar neurotransmissores que se oxidam ou reduzem em potenciais muito semelhantes como, por exemplo, a dopamina e a norepinefrina (ROBINSON *et al.*, 2003; WIGHTMAN, 2006; ROBERTS *et al.*, 2013). Porém, essas limitações não interferem na aplicação dessa técnica para registrar a liberação fásica de DA no NAc, por ser uma estrutura com uma concentração muito pequena de norepinefrina.

Figura 5. Voltametria cíclica de varredura rápida. A) Ondas triangulares cíclicas de varredura do potencial elétrico são aplicadas ao eletrodo de registro. Isso faz com que a dopamina se oxide a na fase ascendente da varredura e que o seu produto de oxidação, a dopamina orto-quinona, se reduza a dopamina na fase descendente da varredura. Os elétrons gerados pela dopamina durante a oxidação são doados para o eletrodo e os elétrons necessários para a oxidação da quinona são doados de volta pelo eletrodo. B) As correntes de oxi-redução da dopamina e sua quinona estão representadas em 3 tipos de gráfico. Aqui estão representados apenas os dados após o a subtração da linha de base (veja texto). O voltamograma cíclico da oxi-redução dopamina/dopamina orto-quinona mostra seus potenciais ótimos de oxidação (valores positivos) e de redução (valores negativos). Os dados de todos os voltamogramas (10 voltamogramas a cada segundo) são representados em um color plot onde o tempo é representado no eixo do x , a variação de potencial elétrico a cada ciclo é representada no eixo do y e as correntes de

oxidação/redução são representadas por cores. Os pontos verde e preto desse color plot mostram a oxidação e redução da dopamina respectivamente. A variação de corrente no potencial ótimo de oxidação da dopamina ao longo do tempo (linha pontilhada do gráfico central em B) é mostrada no gráfico de linha à direita. Esses valores podem ser transformados em valores de variação na concentração de dopamina usando uma curva de calibração do eletrodo obtida com concentrações conhecidas de dopamina

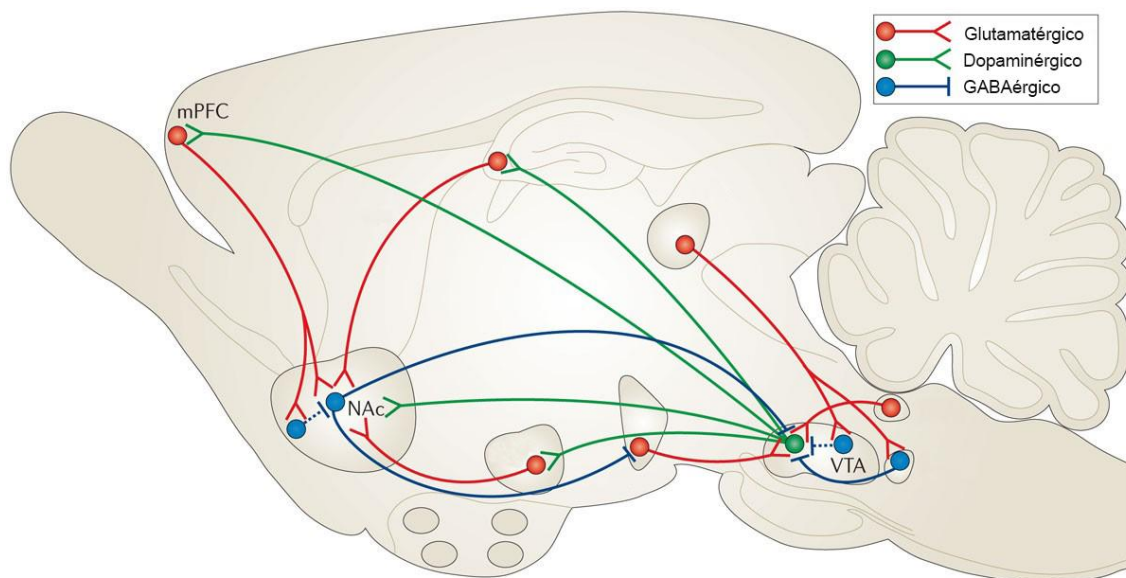


Fonte: Robinson & Wightman (2007)

1.4 Dopamina e adição

A liberação fásica de DA pelo sistema mesolímbico gera a motivação para a busca de recompensas. Assim, estímulos naturalmente gratificantes, como as drogas de abuso, promovem a liberação de DA pelo sistema mesolímbico. A via dopaminérgica que vai da VTA para o NAc é chamada de sistema de recompensa. Ela é de particular importância para os mecanismos que levam ao abuso de drogas (ver Fig. 6) (NESTLER, 2001).

Figura 6. Sistema de recompensa e suas projeções.

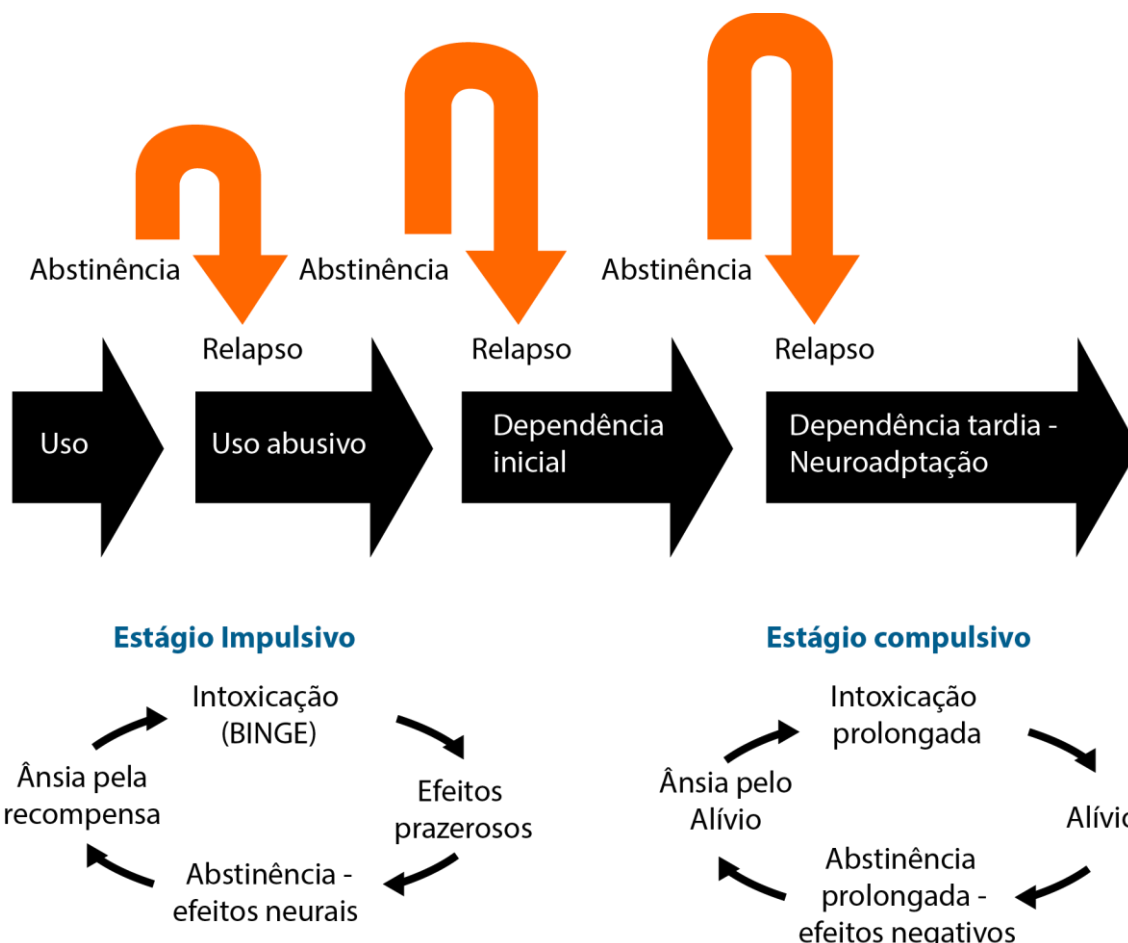


Fonte: Adaptado de Russo e Nestler (2013).

A apresentação de um estímulo com saliência (biológica/motivacional) promove um aumento fásico na liberação de DA no NAc. Isso promove LTP entre as sinapses dos neurônios que codificam esse estímulo e os neurônios do estriado que selecionam uma resposta motora de se aproximar desse estímulo. Isso aumenta a probabilidade deste indivíduo repetir a mesma resposta motora sempre que for apresentado o mesmo estímulo. Em casos de aprendizagem associativa chamada de condicionamento Pavloviano podemos relacionar um estímulo biologicamente irrelevante com outro relevante de forma que o primeiro passa a ter um caráter preditivo. Nesse caso, a liberação de dopamina também produz LTP entre os neurônios que codificam o estímulo e os neurônios que selecionam a resposta motora. A partir de então, esse estímulo (antes irrelevante) também passará a desencadear a liberação de DA e a aumentar a motivação para executar a mesma resposta motora (SCHULTZ, 1998; CALABRESI *et al.*, 2000; MALENKA & BEAR, 2004).

O aprendizado que uma droga de abuso causa leva o indivíduo ao uso repetitivo e indiscriminado da droga, mesmo que ela apresente consequências negativas. Com o fortalecimento dessa aprendizagem o sujeito perde até mesmo a capacidade de julgamento e controle do uso da droga passando a um padrão de consumo compulsivo. Essas neuroadaptações que acontecem durante a adição são muito estáveis, levando à síndrome de abstinência e a recaídas que podem ocorrer mesmo após muitos anos de abstinência (ver Fig. 7) (ROBINSON & BERRIDGE, 2008; BERRIDGE *et al.*, 2009; KOOB & VOLKOW, 2010).

Figura 7. Evolução dos estágios de uso de substâncias de abuso até a dependência.



Fonte: Koob & Volkow (2010).

1.5 Etanol e adição

O álcool etílico, ou etanol, apesar de ser lícito, é uma droga de abuso com capacidade aditiva. A dependência do etanol é um problema sério de saúde pública, vez que o consumo de etanol associa-se com mais de 200 doenças e como a dependência de etanol, cirrose, câncer e lesões. Além disso, o consumo de etanol tem sido associado à causa de aproximadamente 3,3 milhões de mortes somente no ano de 2012. Em 2010, o consumo mundial de etanol foi de 6,2 litros de etanol puro por pessoa, considerando indivíduos de 15 anos ou mais, o que se traduz como consumo de 13,5 g de etanol por dia. Destes indivíduos, cerca de 16% apresentou o consumo excessivo de etanol, mais conhecido como “binge drinking” (WHO, 2014).

O etanol, assim como todas as drogas de abuso, gera um aumento na liberação fásica de DA no NAc levando ao aprendizado associativo entre o contexto em que o etanol foi consumido e o seu efeito gratificante. Esse tipo de aprendizagem aumenta a probabilidade de recidiva dos usuários (TOMIE & SHARMA, 2013). Existe uma grande dificuldade terapêutica para os transtornos do alcoolismo devido à ampla heterogeneidade de fatores genéticos e ambientais que contribuem para a não efetividade das terapias atuais. O etanol se liga a vários neuroreceptores, o que dificulta o uso de drogas de ação específica para tratar o alcoolismo (NEVO & HAMON, 1995; DAVIES, 2003)

Os receptores GABA_A sofrem modulação alostérica pelo etanol permitindo a entrada de cloreto intracelular que hiperpolariza o neurônio (MELDRUM, 1987; MIZUNO *et al.*, 2013). Os receptores de GABA apresentam sua atividade amplificada quando em contato com o etanol agudo, aumentando, também, a liberação deste neurotransmissor. Isso explica os sintomas de sedação, incoordenação motora e efeitos ansiolíticos (MELDRUM, 1982; MIZUNO *et al.*, 2013). Já a exposição crônica ao etanol, causa a diminuição da ativação do sistema gabaérgico a fim de compensar a ativação da fase aguda. Há uma diminuição do número de receptores GABA_A, e alteração nas subunidades deste, causando excitabilidade quando em abstinência e levando a quadros de ansiedade e até convulsão (LOVINGER, 1996; LOVINGER & ROBERTO, 2013).

Ainda não está bem estabelecido o mecanismo pelo qual o etanol promove o aumento da liberação de DA no NAc. Sabe-se que três sistemas de neurotransmissores estão envolvidos nesse mecanismo: o glutamatérgico, o gabaérgico e o opióide (DAVIES, 2003). A teoria mais aceita é que o etanol aumenta a liberação de DA no NAc atuando na VTA sobre o soma dos neurônios. O etanol atua também inibindo neurônios glutamatérgicos do córtex pré-frontal que fazem sinapses com neurônios gabaérgicos da VTA. Um segundo mecanismo propõe que os corpos celulares dos neurônios dopaminérgicos da VTA que, em situação normal, estão constantemente inibidos pela ação de neurônios gabaérgicos, sofrem uma desinibição pelo efeito do etanol. Isso se dá porque o etanol aumenta a liberação de endorfinas que se ligam aos receptores μ opióides dos neurônios gabaérgicos da VTA, levando a uma redução da sua atividade inibitória sobre os corpos celulares dos neurônios dopaminérgicos e o consequente aumento da liberação de DA no NAc (NEVO & HAMON, 1995; DI CHIARA, 1997). Alguns experimentos de microdiálise testaram essa hipótese, mostrando que a infusão de etanol no NAc causou o aumento da liberação tônica de dopamina (YIM & GONZALES, 2000). Já a infusão de etanol na VTA, não causou o mesmo efeito. Esses resultados sugerem que o etanol tem efeito direto sobre os neurônios dopaminérgicos. (YIM *et al.*, 1997; YIM *et al.*, 1998; YIM E GONZALES, 2000; BUDYGIN *et al.*, 2001; BUDYGIN *et al.*, 2001; ERICSON *et al.*, 2003; OKAMOTO *et al.*, 2006).

A falta de conhecimento sobre os mecanismos de ação do etanol na adição e o fato de que ele atua sobre vários sistemas de neurotransmissores se reflete na baixa eficácia dos tratamentos disponíveis. Além disso, diferentes mecanismos podem contribuir para a adição por etanol em diferentes pacientes (LOVINGER & ROBERTO, 2013). Nesse caso um medicamento que pode ser eficaz para um paciente pode não ser para outros. As terapias comportamentais e psicossociais complementam o tratamento farmacológico e são efetivas na formação de novas associações e extinção de comportamentos aditivos (DAVIES, 2003; CHEER *et al.*, 2007; LOVINGER & ROBERTO, 2013), sendo assim, é importante estudar e conhecer o comportamento relacionado ao consumo do etanol.

O presente estudo visa elucidar por meio de abordagens neuroquímicas e comportamentais qual o efeito etanol sobre a liberação de DA no NAc em um

modelo animal, bem como o efeito de estímulos que preveem a disponibilidade de etanol ou de um líquido apetitivo em animais controles e previamente tratados com etanol. Foi, também, estudado o efeito da naltrexona sobre o comportamento desses animais, visto que essa droga é utilizada no tratamento do alcoolismo. Os resultados deste estudo são importantes para o estabelecimento de estratégias comportamentais e farmacológicas no tratamento do alcoolismo.

2.Objetivo Geral

O objetivo geral desse estudo é verificar se a liberação fásica de dopamina no núcleo accumbens em resposta a uma recompensa ou a um estímulo que sinaliza uma recompensa iminente é alterada pelo consumo crônico intermitente de etanol e por tratamento com o antagonista opióide naltrexona.

2.1.Objetivos específicos

- Estabelecer a técnica de voltametria cíclica de varredura rápida em nosso laboratório para uso em animais anestesiados e acordados;
- Monitorar os níveis extra-celulares de DA no NAc de ratos, pela FSCV em animais acordados;
- Observar as flutuações dopaminérgicas relacionadas com a apresentação de um estímulo condicionado e um estímulo incondicionado em animais expostos de forma crônico-intermitente ao etanol e tratados com naltrexona;
- Observar se há um viés de comportamento relacionado a apresentação de um estímulo condicionado em animais expostos de forma crônico-intermitente

3.Artigo científico

Ethanol exposure history and alcoholic reward differentially alter dopamine release in the nucleus accumbens to a reward-predictive cue

Fiorenza, A.M.¹, Shnitko, T.A.², Sullivan, K.M.², Vemuru, S.R.², Gomez, A.A.¹, Esaki, J.Y.¹, Da Cunha, C.¹, Robinson, D.L.²

¹ Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, BR.

² Bowles Center for Alcohol Studies and Department of Psychiatry, University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA

Corresponding author:

Donita L. Robinson, PhD, Bowles Center for Alcohol Studies, CB #7178, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599-7178; Email: DLR@unc.edu; Phone: 919-966-9178 ; Fax: 919-966-5679

Abstract

Background- Ethanol is an addictive drug that promotes phasic release of dopamine in the nucleus accumbens (NAc). Conditioned stimuli (CS) that predicts ethanol delivery acquires the property of inducing phasic dopamine release in the NAc. This causes attentional bias and approach behavior towards the CS which is known as a sign tracking behavior that contributes to maintenance of ethanol addiction. The μ opioid receptor antagonist naltrexone decreases dopamine release in the NAc and is used to treat ethanol addiction. Here we hypothesize that a chronic intermittent ethanol (CIE) exposure may promote sign tracking behavior by increasing the dopamine responses to ethanol intake and to the predictive CS. We also hypothesize that naltrexone prevents CIE increased sign-tracking behavior and reduce the demand of alcoholic rewards.

Methods- Rats were submitted to CIE exposure followed by Pavlovian conditioning in which a CS was associated with alcoholic and nonalcoholic rewards. Next, fast-scan cyclic voltammetry was used to measure phasic dopamine release in the NAc in response to the CS and to alcoholic and nonalcoholic rewards. Finally, the effect of naltrexone on sign tracking behavior was measured by a sign tracking behavior score.

Results- The presence of alcohol in the reward has decreased sign tracking behavior and CIE has shown to prevent this effect. We observed a significant interaction between CIE exposure and naltrexone treatment, but, when evaluated independently, none of these factors showed significant effect on sign-tracking behavior. The presence of alcohol in the reward also decreased DA release in the NAc, in response to the reward delivery and to the predictive CS in rats submitted to the CIE exposure.

Conclusions- The previous history of ethanol exposure and naltrexone treatment seem to modify how the presence of alcohol in a reward affects DA release in the NAc and sign-tracking behavior.

Introduction

The addictive properties of ethanol can induce depressant and stimulant effects (Smoothy and Berry 1985, Imperato and Di Chiara 1986, Prunell, Boada *et al.* 1987, Fadda and Rossetti 1998). The depressant effects of ethanol are mostly mediated by GABA-A receptors (Ferreira, Hartmann Quadros *et al.* 2004, Weiner and Valenzuela 2006), while its stimulant properties are generally due to the activation of mesolimbic dopamine neurons (Brabant, Guarnieri *et al.* 2014); Di Chiara and Imperato 1988).

The rewarding property of ethanol is also mediated by the activation of mesolimbic dopamine neurons, as it leads to dopamine release in the nucleus accumbens (NAc) (Di Chiara 1997, Volkow, Wang *et al.* 2011, Hamid, Pettibone *et al.* 2015). This property allows ethanol to act as an appetitive unconditioned stimulus (US) in Pavlovian conditioning (Tomie 2013). In this process, a neutral stimulus that precedes ethanol consumption acquires a predictive value, becoming a conditioned stimulus (CS). A CS predictive of ethanol availability also acquires motivational salience – the property of attracting attention and to motivate approach behavior. An approaching behavior towards the CS is named as sign-tracking behavior (ST) since the conditioned stimuli has more salience for the subject than the reward itself. On the other hand, an approaching behavior towards the reward (US) is named as goal-tracking (GT), as the subject finds the reward to be more salient than the conditioned stimuli (Flagel, Watson *et al.* 2007, Flagel, Akil *et al.* 2009, Tomie 2013, Robinson, Yager *et al.* 2014). In human alcoholism and in animal models of alcoholism, these conditioned behaviors compel the subject to look for and approach locations where they usually consume alcohol, presumably contributing to addiction maintenance and relapse (Chaudhri, Sahuque *et al.* 2008, Chaudhri, Sahuque *et al.* 2010, Ostlund, Maidment *et al.* 2010, Remedios, Woods *et al.* 2014, Tipps, Raybuck *et al.* 2015). ST behavior is proposed as indicative of an addictive phenotype (Roitman, Stuber *et al.* 2004, Flagel, Watson *et al.* 2007, Flagel, Akil *et al.* 2009, Flagel, Robinson *et al.* 2010, Tomie 2013). Therefore, understanding the neural mechanism of GT and ST behaviors is critical to develop strategies to treat ethanol addiction.

Two findings are particularly important to improve treatments for ethanol addiction: (i) during Pavlovian conditioning, the property of causing phasic dopamine release in

the NAc is transferred from the US to the CS (Schultz 1997); (ii) μ opioid receptor antagonists have been used to treat ethanol addiction in humans by reducing dopamine release in the NAc (Gonzales and Weiss 1998). Therefore, we hypothesize that the therapeutic effects of naltrexone occur due to a decrease in dopamine release when it is evoked by the CS predictive cue, which reduces sign tracking behavior.

In addition, because chronic alcohol consumption is shown to alter the dopamine response to alcohol (US) and to predictive cues of alcohol delivery (CS), we hypothesize that a previous history of chronic intermittent ethanol (CIE) consumption can promote ST behavior and change the way a μ opioid antagonist treatment affects dopamine release evoked by the CS and US.

In order to test these hypotheses, rats were submitted to CIE or control (CON) exposure, followed by Pavlovian conditioning in which a CS was associated with alcoholic and nonalcoholic rewards. Next, we used fast-scan cyclic voltammetry to measure phasic dopamine release in the NAc in response to the CS and to the alcoholic and nonalcoholic rewards. Finally the effect of the μ opioid antagonist naltrexone on sign tracking behavior was measured by sign tracking behavior score.

Materials and Methods

Animals

Twenty-nine male Sprague–Dawley rats were used in the present study (Charles River; Raleigh, NC). Animals were housed in a controlled environment ($21\pm 1^\circ\text{C}$) with 12h light/dark cycles and *ad libitum* access to food and water during the entire study. Animals were pair-housed during ethanol or control exposure, and during Pavlovian training and dopamine measurements, they were individually housed. All procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of University of North Carolina at Chapel Hill.

Ethanol and control exposure

An experimental timeline is shown in Figure 1. Rats were run in cohorts of 4 and were assigned to exposure groups in a balanced order so that each cohort

included rats from two exposure groups. Exposure groups were CIE, Water controls, or No Exposure controls; cage-mates were assigned to the same exposure group. Next, rats in the CIE and Water groups received ethanol (20% w/v) or equivalent volumes of water on Mondays, Tuesdays, Thursdays and Fridays by gavage as follows: 3g/kg on day 1, 4g/kg on day 2 and 5g/kg on the next twelve administration days.

Behavioral training

Two days after the exposure period, pair-housed rats were isolate-housed, with one rat assigned to receive alcoholic reward and the other to receive nonalcoholic reward. The reward consisted of chocolate Ensure® with or without 10% ethanol (w/v), denoted as ALC and ENS, respectively. Before behavioral training began, rats were given access to 30 ml of Ensure® in their home cage to allow familiarization with the fluid. Next, rats were given 2 days of dispenser training followed by 6 days of Pavlovian conditioning and 1 day of extinction training (data not shown). Behavior training was performed in a chamber (Med Associates, St Albans, VT) with two levers on either side of one wall, each with a cue light above. There were two fluid cups in between the levers and a house light on the opposite wall. Each session started with the chamber darkened; after 5 minutes house light was turned on. For dispenser training, 25 reward (US) deliveries were made into the left fluid cup on a variable interval schedule that averaged 90 s (VI90). For the conditioning sessions, 25 CS-US pairs were presented on a VI90 schedule. When a trial started, the house light turned off, the right cue light was illuminated and the right lever was extended (conditioned stimuli). After 8 s, the house light turned on, the cue light was extinguished, and the lever retracted. Simultaneously, 0.1 ml of reward was delivered into the left fluid cup (unconditioned stimuli). During the extinction session, cues were delivered on the VI90 schedule but no fluid was delivered. All experiments were video recorded for later analysis of behavior.

Surgery

Rats were anesthetized with isoflurane (5% induction, 2% maintenance) and secured in a stereotaxic frame on a heated pad. Anterior–posterior (AP), medial–lateral (ML), and dorsal–ventral (DV) positions refer to bregma and coordinates were obtained from a rat brain atlas (Paxinos and Watson 1998). A guide cannula

(Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN) was implanted above the NAc (AP +1.7 mm, ML +1.7 mm, DV -2.5 mm). An Ag/AgCl reference electrode was implanted in the contralateral cortex. A bipolar stimulating electrode (Plastics One, Roanoke, VA, polished tips, 1 mm apart) was implanted in the VTA (AP -5.2 mm, ML +1.4 mm, DV -8.5 mm). Rats received ibuprofen (15 mg/kg, P.O.) immediately after surgery and the next two days.

Fast scan cyclic voltammetry

For FSCV data collection, rats were in a behavioral chamber identical to those used during behavioral training, except that it was positioned in a Faraday cage and contained a tether connecting the electrodes to an electrical swivel. For the first session after surgery, rats received a regular conditioning session without the tether for cage habituation. For the second session, the rats were tethered; and during third session, FSCV data were collected. Carbon-fiber (T650, Thornel/Cytec Industries Inc., Woodland Park, NJ, USA) electrodes were sealed in glass with 60–120 μm fiber exposed. The average carbon fiber length was 80 μm and electrodes were soaked for >10 min in isopropyl alcohol cleaned with activated carbon (Bath *et al.* 2000). To place the electrode, awake rats were manually restrained while the carbon-fiber electrode was lowered in increments of approximately 75 μm into the NAc via a manipulator inserted into the guide cannula. Voltammetric parameters, electrical stimulation parameters, and data acquisition were controlled by a computer using LabVIEW instrumentation software (National Instruments, Austin, TX) as previously described (Robinson, Zitzman *et al.* 2011). Voltammetric recordings were made at the carbon-fiber microelectrodes by applying a ramping, triangle-waveform potential (-0.4V to +1.3V to -0.4V, 400 V/s). After the microelectrode was positioned just dorsal to the NAc core, rats were left undisturbed for 15-20 min while the triangle-waveform was applied at 60 Hz to condition the electrode. Next, the triangle-waveform application was reduced to 10 Hz, and assessments were made for spontaneous and electrically-evoked dopamine transients. Electrical stimulation (16–24 biphasic pulses, 40–60 Hz, 120 μA , 2 ms/phase) was delivered to the VTA. The carbon-fiber electrode was moved in 75 μm increments until dopamine transients were detected, at which point the electrode was secured in place and the behavioral session was initiated. At the end of session, the carbon-fiber electrode was removed and placed in

isopropyl alcohol until calibrated in a flow-cell with 0.5 and 1 μM DA in TRIS buffer (Logman, Budygin *et al.* 2000, Robinson, Howard *et al.* 2009). The average calibration factor was $0.082 \pm 0.002 \mu\text{M DA/nA}$.

Naltrexone experiments

For naltrexone behavioral data collection, rats were no longer tethered and were run in an additional week of Pavlovian conditioning sessions. In a balanced design, naltrexone (1 mg/kg, S.C.) or saline at same volume was administered 5 minutes before the start of the session. During the session all behaviors were video recorded for later behavioral scoring as described below.

Behavior analysis

To assess behavior during conditioning sessions, the videos were analyzed by researchers blind to the rat's experimental group. We designated an area surrounding the CS lever/light (13.7cm x 7.7 cm) and another area surrounding the US cup (9.25 cm x 7.0 cm) and determined when the rat's head moved in and out of the CS and US areas. An interval of 16 s was scored around each CS presentation (8 s prior to CS onset and the 8 s of CS presentation) to characterize time spent in close proximity to either the CS or US location. First, the latency from the onset of the cue to entrance in either area was scored. If a rat did not enter the CS or US area during the CS presentation, the latency for entrance to that area was scored as 8 s, and if the rat was already in the area it was scored as 0 s.

Voltammetry data analysis

Dopamine transients from the FSCV recording were statistically identified by using principal component analysis as previously described (Shnitko and Robinson 2015). Data around each CS presentation were extracted into 25-s windows of 5 s before the CS, the 8 s CS presentation, and 12 s after the CS. These data snippets were digitally filtered with a 2 kHz, fourth-order Bessel low-pass filter and the color plot data of each 25-s around the CS presentation underwent two passes of two-dimensional smoothing before background subtraction. Trials were signal-averaged to enhance signal-to-noise and then analyzed with principal component analysis by using training sets of 5 dopamine and 5 basic pH cyclic voltammograms, all triggered

by electrical stimulation of the VTA. The analysis yielded an extracted concentration-versus-time trace of estimated dopamine concentrations, which were analyzed for the peak dopamine concentration, or $[DA]_{\max}$, during the CS presentation and US delivery. Specifically, we selected a window around each event (CS, US) that included 0.5 seconds before through 3 seconds after the event onset. We determined the minimum and maximum concentrations of dopamine within the target window; note that the maximum was only selected from the part of the target window after the onset of the event, but the minimum was often immediately before the onset. The dependent variable $[DA]_{\max}$ was calculated as the difference between these values.

Statistical analysis

We planned to combine the two control groups (Water and No Exposure) in the event that they did not differ behaviorally or neurochemically. Thus, we first compared behavior (CS/US entry elevation scores, CS/US duration elevations scores and CS/US latency) on the 6th day of Pavlovian conditioning as well as $[DA]_{\max}$ after the CS and US presentation. Water and No Exposure groups trained to drink ENS were analyzed separately from those trained to drink ALC, and they were compared on each measure by using t-tests, not corrected for multiple comparisons to inflate our ability to detect a difference. As there were no significant differences between the two control groups on any of these measures, we combined them into a single control group labeled CON.

Data are represented as mean \pm SEM unless otherwise noted and were analyzed in STATISTICA (data analysis software system- StatSoft, Inc.), version 10. Behavioral parameters (CS/US entry elevation scores, CS/US duration elevations scores and CS/US latency) and $[DA]_{\max}$ were analyzed by using two-way ANOVA with exposure (CON, CIE) and reward (ENS, ALC) as factors. On naltrexone experiments were used Two-way ANOVA with repeated measures. Significant interactions of between exposure and reward were followed by Bonferroni post-hoc comparisons.

Results

About behavior analysis is important to emphasize that each phase was performed apart, so behavior from the Conditioning phase was the first data

collected, followed by a voltammetry dopamine and behavior recordings and the last collection that was performed on NTX/Sal treatment week.

As shown in Fig. 2, CIE prevented the decrease in ST behavior observed when alcohol was added to the reward. Two-way ANOVA showed a significant main effect of the reward ($F_{1,25} = 7.52$, $p < 0.05$), and a significant reward vs. CIE interaction ($F_{1,25} = 5.37$, $p < 0.05$). No significant effect was observed for CIE exposure factor ($F_{1,25} = 0.39$, $p = 0.53$), NTX treatment factor ($F_{1,25} = 1.34$, $p = 0.26$), and interactions among these factors ($p > 0.25$).

Two-way ANOVA on collapsed NTX/Sal treatment data found a significant effect on reward between CIE and reward factors ($F_{1, 54} = 13.12$, $p < 0.001$). As illustrated in Fig. 2A, Bonferroni post-hoc showed a significant reduction in the ST behavior of CON animals that received alcohol as a reward ($p < 0.05$), but not for the animals that were previously submitted to the CIE exposure ($p = 12$).

Two-way ANOVA showed no significant effect for the CIE exposure factor ($F_{1, 25} = 0.64$, $p = 0.84$) and NTX treatment factor ($F_{1, 25} = 5.47$, $p = 1.14$), but a significant interaction between these factors ($F_{1, 25} = 4.74$, $p < 0.05$). However, as illustrated in Fig. 2B, Bonferroni post-hoc test showed no significant effects among groups ($p > 0.19$).

FSCV data showed that a CIE treatment and the presence of alcohol in the sweet liquid used as reward during the Pavlovian conditioning caused significant differences in the amount of phasic dopamine released in the NAc in response to the CS and US. On Fig. 3 is observed a dopamine decrease on rats that were chronic-intermittent exposed to ethanol during the response to conditioned stimuli presentation (CS) in a conditioning chamber. In A are represented a concentration vs. time graph with the respective color plot and a voltammogram concerning a representative individual of each group. However in B we can observe a graph which represents on the filled line the average of all rat from each group and on the dashed line the \pm SEM. Fig. 4 shows dopamine decrease on rats that were chronic-intermittent exposed to ethanol during the response to a unconditioned stimuli presentation (US) in a conditioning chamber. Fig. 4 follows the same disposition of Fig.3.

Fig. 5 depicts the dopamine decrease on chronic-intermittent exposed animals, which received an ALC reward on a CS presentation (A) or on a US (B). A Two-way

ANOVA of the CS data (Fig. 5A) showed a non-significant effect of the CIE exposure factor ($F_{1,25} = 0.30$, $p = 0.58$), a non-significant effect of the reward factor ($F_{1,25} = 3.26$, $p = 0.08$), and a significant interaction between these factors ($F_{1,25} = 13.40$, $p < .001$). Rats submitted to CIE exposure and trained to expect ALC as reward released significantly less DA in response to the CS compared to rats that received only ensure ($p < 0.05$, Bonferroni post-hoc test). However, no significant difference was observed in rats that were not pre-exposed to ethanol.

Two-way ANOVA of the US data (Fig. 5B) showed a significant effect of the CIE exposure factor ($F_{1,25} = 6.58$, $p < 0.05$), a non-significant effect of the reward factor ($F_{1,25} = 0.01$, $p = 0.91$), and a significant interaction between these factors ($F_{1,25} = 8.67$, $p < 0.01$). CIE exposure caused a significant reduction in the amount of DA released in response to the US in rats that received ensure + alcohol ($p < 0.05$, Bonferroni post-hoc test), but not in rats that received only ensure as a reward.

As illustrated in Fig. 6, all FSCV data were recorded in the NAc core.

Discussion

The present study revealed that a previous history of ethanol exposure can cause subsequent alterations in behavioral and neurochemical aspects of alcohol addiction. ST behavior of rats without a history of chronic exposure to ethanol suggests that cues predicting delivery of a palatable reward were less salient in animals trained on alcoholic reward compared to those trained on a nonalcoholic reward. This finding suggests that control rats are more interested in the chocolate taste of ensure than in the rewarding effect of alcohol. On the other hand, rats with a history of CIE behaved as if ethanol was as rewarding as chocolate for them. In addition, treating these rats with naltrexone altered the impact of a history of CIE on ST behavior. Although the present study did not establish a causal link between naltrexone treatment and loss of preference for chocolate compared to chocolate + alcohol in subject with a history of alcoholism, our findings suggest that this causality might exist.

Naltrexone is a drug widely used to patient treatment for alcoholism. After many studies this drug proves its efficacy on animals by reducing the level and frequency of alcohol consumption, decreasing the preference for alcoholic rewards and even lowering the DA release during alcohol consumption (Gonzales and Weiss

1998, Hay, Jennings *et al.* 2013). Among patient's studies, in addition to promoting less episodes of consumption, this drug minimizes relapse, craving, and seems to reduce the pleasure of drinking in social drinkers and in heavy drinkers (Ciccocioppo, Martin-Fardon *et al.* 2002, Burattini, Gill *et al.* 2006).

Naltrexone is an opioid antagonist with a non-significant agonist activity. It acts as a competitive antagonist, mostly on μ receptor, but acts on κ and δ receptors in lower proportion (Ciccocioppo, Martin-Fardon *et al.* 2002). Although it is known where this drug acts, its action on alcoholism remains unclear. While some patients have a good response, others did not show any improvement, or had several side effects, such as dizziness, nausea, drowsiness, etc, which evidences the need of further studies (Kranzler, Modesto-Lowe *et al.* 2000, Carmen, Angeles *et al.* 2004).

Another important contribution of the present study is the finding that the presence of alcohol in the reward led to less dopamine release in the NAc in response to the reward itself (US), and in response to the CS predictive of reward delivery, but only in rats with a history of CIE.

Dopamine is released in the NAc in response to unpredicted appetitive stimuli. After learning that a CS predicts the delivery of an appetitive US, the dopamine release evoked by the US decreases (Schultz 1997, Redgrave, Gurney *et al.* 2008). This finding is in agreement with the results of the present study showing that rats that were previously submitted to a Pavlovian conditioning released relatively higher amounts of dopamine in the NAc in response to the CS than in response to the US. In addition, the present study suggests that, even though ENS alone was more rewarding for control rats, receiving a mixture of Ensure and alcohol has also shown to be rewarding.

The finding that a history of CIE decreased dopamine release in response to an alcoholic but not a non-alcoholic reward suggests that CIE history causes long-lasting tolerance to the rewarding effect of ethanol. This effect may contribute to increased craving observed in alcoholics after the intake of a small dose of alcohol. This tolerance may have substantial impact in relapse. The fact that a history of alcohol consumption did not affect dopamine release in response to a non-alcoholic reward suggests that natural rewards may help to prevent relapse in alcoholics.

Between some addiction theories, emerged a possible explanation about the reasons that drives the addicted to repeat the consumption and increase the amounts

of drug over time (Koob and Volkow 2010, Volkow, Wang *et al.* 2011; Koob, 2010). Patients that suffer from addiction have a physiological decrease of dopamine levels, which causes other associated symptoms, including tendency to anhedonia, major depression, suicide, etc. Drug consumption increases the DA release on NAc, which promotes the reinforcement feelings related to the drug. In order to compensate the lower levels of DA, these patients start an abusive use of the drug, which leads to tolerance and compulsion (Koob and Le Moal 2005, Feltstein and See 2008, Koob and Volkow 2010, Koob 2014, Wise and Koob 2014).

In summary, the present study showed that chronic ethanol exposure affected ST behavior and the mesolimbic dopamine response to alcoholic rewards and to predictive cues. We also demonstrated that treatment with naltrexone can alter these effects. These findings can lead to new hypotheses about the mechanisms that opioid antagonists and natural rewards affect alcoholism relapse.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Margaret Broadwater, Dawnya Bohager, Megan Villegas for valuable technical assistance. This research was funded by the National Institutes of Health (P60 AA011605) and by the University of North Carolina Bowles Center for Alcohol Studies. Amanda Maino Fiorenza was supported by a Doctoral Program Abroad Fellowship (CAPES) – Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (Brazil).

References

- ABRAHAM, A. J., T. RIECKMANN, T. MCNULTY, A. E. KOVAS AND P. M. ROMAN (2011). "Counselor Attitudes Toward the Use of Naltrexone in Substance Abuse Treatment: A Multi-level Modeling Approach." Addictive behaviors **36**(6): 576-583, 2011
- Anderson, R. I. and L. P. Spear (2011). "Autoshaping in adolescence enhances sign-tracking behavior in adulthood: Impact on ethanol consumption." Pharmacology, biochemistry, and behavior **98**(2): 250-260.
- Anton, R. F. (2008). "Naltrexone for the Management of Alcohol Dependence." The New England journal of medicine **359**(7): 715-721.
- Bath, B. D., D. J. Michael, B. J. Trafton, J. D. Joseph, P. L. Runnels and R. M. Wightman (2000). "Subsecond adsorption and desorption of dopamine at carbon-fiber microelectrodes." Anal Chem **72**(24): 5994-6002.
- Berridge, K. C. and T. E. Robinson (2003). "Parsing reward." Trends Neurosci **26**(9): 507-513.
- Brabant, C., D. J. Guarnieri and E. Quertemont (2014). "Stimulant and motivational effects of alcohol: lessons from rodent and primate models." Pharmacol Biochem Behav **122**: 37-52.
- Brodie, M. S., S. A. Shefner and T. V. Dunwiddie (1990). "Ethanol increases the firing rate of dopamine neurons of the rat ventral tegmental area in vitro." Brain Res **508**(1): 65-69.
- Burattini, C., T. M. Gill, G. Aicardi and P. H. Janak (2006). "The ethanol self-administration context as a reinstatement cue: Acute effects of naltrexone." Neuroscience **139**(3): 877-887.
- Carmen, B., M. Angeles, M. Ana and A. J. Maria (2004). "Efficacy and safety of naltrexone and acamprosate in the treatment of alcohol dependence: a systematic review." Addiction **99**(7): 811-828.
- Chaudhri, N., L. L. Sahuque and P. H. Janak (2008). "Context-induced relapse of conditioned behavioral responding to ethanol cues in rats." Biol Psychiatry **64**(3): 203-210.
- Chaudhri, N., L. L. Sahuque, W. W. Schairer and P. H. Janak (2010). "Separable roles of the nucleus accumbens core and shell in context- and cue-induced alcohol-seeking." Neuropsychopharmacology **35**(3): 783-791.
- Ciccocioppo, R., R. Martin-Fardon and F. Weiss (2002). "Effect of selective blockade of mu(1) or delta opioid receptors on reinstatement of alcohol-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats." Neuropsychopharmacology **27**(3): 391-399.
- Di Chiara, G. (1997). "Alcohol and dopamine." Alcohol Health Res World **21**(2): 108-114.
- Di Chiara, G. and A. Imperato (1988). "Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(14): 5274-5278.
- Fadda, F. and Z. L. Rossetti (1998). "Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration." Progress in Neurobiology **56**(4): 385-431.
- Feltenstein, M. W. and R. E. See (2008). "The neurocircuitry of addiction: an overview." Br J Pharmacol **154**(2): 261-274.
- Ferreira, S. E., I. M. Hartmann Quadros, A. A. Trindade, S. Takahashi, R. G. Koyama and M. L. Souza-Formigoni (2004). "Can energy drinks reduce the depressor effect of ethanol? An experimental study in mice." Physiol Behav **82**(5): 841-847.
- Flagel, S. B., H. Akil and T. E. Robinson (2009). "Individual differences in the attribution of incentive salience to reward-related cues: Implications for addiction." Neuropharmacology **56 Suppl 1**: 139-148.

- Flagel, S. B., S. J. Watson, T. E. Robinson and H. Akil (2007). "Individual differences in the propensity to approach signals vs goals promote different adaptations in the dopamine system of rats." Psychopharmacology (Berl) **191**(3): 599-607.
- Flagel, S. B., T. E. Robinson, J. J. Clark, S. M. Clinton, S. J. Watson, P. Seeman, P. E. Phillips and H. Akil (2010). "An animal model of genetic vulnerability to behavioral disinhibition and responsiveness to reward-related cues: implications for addiction." Neuropsychopharmacology **35**(2): 388-400.
- Foddai, M., G. Dosia, S. Spiga and M. Diana (2004). "Acetaldehyde increases dopaminergic neuronal activity in the VTA." Neuropsychopharmacology **29**(3): 530-536.
- Gessa, G. L., F. Muntoni, M. Collu, L. Vargiu and G. Mereu (1985). "Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area." Brain Res **348**(1): 201-203.
- Gonzales, R. A. and F. Weiss (1998). "Suppression of ethanol-reinforced behavior by naltrexone is associated with attenuation of the ethanol-induced increase in dialysate dopamine levels in the nucleus accumbens." J Neurosci **18**(24): 10663-10671.
- Hamid, A. A., J. R. Pettibone, O. S. Mabrouk, V. L. Hetrick, R. Schmidt, C. M. Vander Weele, R. T. Kennedy, B. J. Aragona and J. D. Berke (2015). "Mesolimbic dopamine signals the value of work." Nat Neurosci.
- Hay, R. A., J. H. Jennings, D. L. Zitzman, C. W. Hodge and D. L. Robinson (2013). "Specific and nonspecific effects of naltrexone on goal-directed and habitual models of alcohol seeking and drinking." Alcohol Clin Exp Res **37**(7): 1100-1110.
- Hay, R. A., J. H. Jennings, D. L. Zitzman, C. W. Hodge and D. L. Robinson (2013). "Specific and nonspecific effects of naltrexone on goal-directed and habitual models of alcohol seeking and drinking." Alcohol Clin Exp Res **37**(7): 1100-1110.
- Imperato, A. and G. Di Chiara (1986). "Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol." J Pharmacol Exp Ther **239**(1): 219-228.
- Inoue, H. (2000). "Effects of naltrexone on the accumulation of L-3, 4-dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxy-L-tryptophan and on the firing rate induced by acute ethanol administration." Eur J Pharmacol **406**(3): 375-380.
- Koob, G. F. (2014). "Neurocircuitry of alcohol addiction: synthesis from animal models." Handb Clin Neurol **125**: 33-54.
- Koob, G. F. and M. Le Moal (2005). "Plasticity of reward neurocircuitry and the 'dark side' of drug addiction." Nat Neurosci **8**(11): 1442-1444.
- Koob, G. F. and N. D. Volkow (2010). "Neurocircuitry of addiction." Neuropsychopharmacology **35**(1): 217-238
- Koob, G. F. and N. D. Volkow (2010). "Neurocircuitry of addiction." Neuropsychopharmacology **35**(1): 217-238.
- Kranzler, H. R., V. Modesto-Lowe and J. Van Kirk (2000). "Naltrexone vs. nefazodone for treatment of alcohol dependence - A placebo-controlled trial." Neuropsychopharmacology **22**(5): 493-503.
- Liu, X., M. I. Palmatier, A. R. Caggiula, A. F. Sved, E. C. Donny, M. Gharib and S. Booth (2009). "Naltrexone attenuation of conditioned but not primary reinforcement of nicotine in rats." Psychopharmacology (Berl) **202**(4): 589-598.
- Logman, M. J., E. A. Budygin, R. R. Gainetdinov and R. M. Wightman (2000). "Quantitation of in vivo measurements with carbon fiber microelectrodes." J Neurosci Methods **95**(2): 95-102.
- Mereu, G., F. Fadda and G. L. Gessa (1984). "Ethanol stimulates the firing rate of nigral dopaminergic neurons in unanesthetized rats." Brain Res **292**(1): 63-69.
- Okamoto, T., M. T. Harnett and H. Morikawa (2006). "Hyperpolarization-activated cation current (I_h) is an ethanol target in midbrain dopamine neurons of mice." J Neurophysiol **95**(2): 619-626.

- Ostlund, S. B., N. T. Maidment and B. W. Balleine (2010). "Alcohol-Paired Contextual Cues Produce an Immediate and Selective Loss of Goal-directed Action in Rats." Front Integr Neurosci **4**.
- Paxinos, G. and C. Watson (1998). "The rat brain in stereotaxic coordinates." San Diego, Academic Press.
- Prunell, M., J. Boada, M. Feria and M. A. Benitez (1987). "Antagonism of the stimulant and depressant effects of ethanol in rats by naloxone." Psychopharmacology (Berl) **92**(2): 215-218.
- Redgrave, P., K. Gurney and J. Reynolds (2008). "What is reinforced by phasic dopamine signals?" Brain Research Reviews **58**(2): 322-339.
- Remedios, J., C. Woods, C. Tardif, P. H. Janak and N. Chaudhri (2014). "Pavlovian-conditioned alcohol-seeking behavior in rats is invigorated by the interaction between discrete and contextual alcohol cues: implications for relapse." Brain Behav **4**(2): 278-289.
- Robinson, D. L., D. L. Zitzman and S. K. Williams (2011). "Mesolimbic dopamine transients in motivated behaviors: focus on maternal behavior." Front Psychiatry **2**: 23.
- Robinson, D. L., E. C. Howard, S. McConnell, R. A. Gonzales and R. M. Wightman (2009). "Disparity between tonic and phasic ethanol-induced dopamine increases in the nucleus accumbens of rats." Alcohol Clin Exp Res **33**(7): 1187-1196.
- Robinson, T. E. and K. C. Berridge (1993). "The neural basis of drug craving: An incentive-sensitization theory of addiction." Brain Research Reviews **18**(3): 247-291.
- Robinson, T. E., L. M. Yager, E. S. Cogan and B. T. Saunders (2014). "On the motivational properties of reward cues: Individual differences." Neuropharmacology **76**: 450-459.
- Roitman, M. F., G. D. Stuber, P. E. Phillips, R. M. Wightman and R. M. Carelli (2004). "Dopamine operates as a subsecond modulator of food seeking." J Neurosci **24**(6): 1265-1271.
- Saah, T. (2008) "The evolutionary origins and significance of drug addiction". Harm Reduction Journal. **2**:08 (review)
- Schultz, W. (1997). Chapter 17 - Adaptive Dopaminergic Neurons Report the Appetitive Value of Environmental Stimuli. Advances in Psychology. W. D. John and D. Vivian Packard, North-Holland. **Volume 121**: 317-335.
- Shnitko, T. A. and D. L. Robinson (2015). "Regional variation in phasic dopamine release during alcohol and sucrose self-administration in rats." ACS Chem Neurosci **6**(1): 147-154.
- Smoothy, R. and M. S. Berry (1985). "Time course of the locomotor stimulant and depressant effects of a single low dose of ethanol in mice." Psychopharmacology (Berl) **85**(1): 57-61.
- Tipps, M. E., J. D. Raybuck, K. J. Buck and K. M. Lattal (2015). "Acute ethanol withdrawal impairs contextual learning and enhances cued learning." Alcohol Clin Exp Res **39**(2): 282-290.
- Tomie, A. (2013). "Pavlovian sign-tracking model of alcohol abuse." Curr Drug Abuse Rev **6**(3): 201-219.
- Tomie, A., K. L. Grimes and L. A. Pohorecky (2008). "Behavioral Characteristics and Neurobiological Substrates Shared by Pavlovian Sign-Tracking and Drug Abuse." Brain research reviews **58**(1): 121-135.
- Volkow, N. D., G. J. Wang, J. S. Fowler, D. Tomasi and F. Telang (2011). "Addiction: beyond dopamine reward circuitry." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(37): 15037-15042.
- Weiner, J. L. and C. F. Valenzuela (2006). "Ethanol modulation of GABAergic transmission: The view from the slice." Pharmacology & Therapeutics **111**(3).
- Wise, R. A. and G. F. Koob (2014). "The development and maintenance of drug addiction." Neuropsychopharmacology **39**(2): 254-262.

Figure 1.

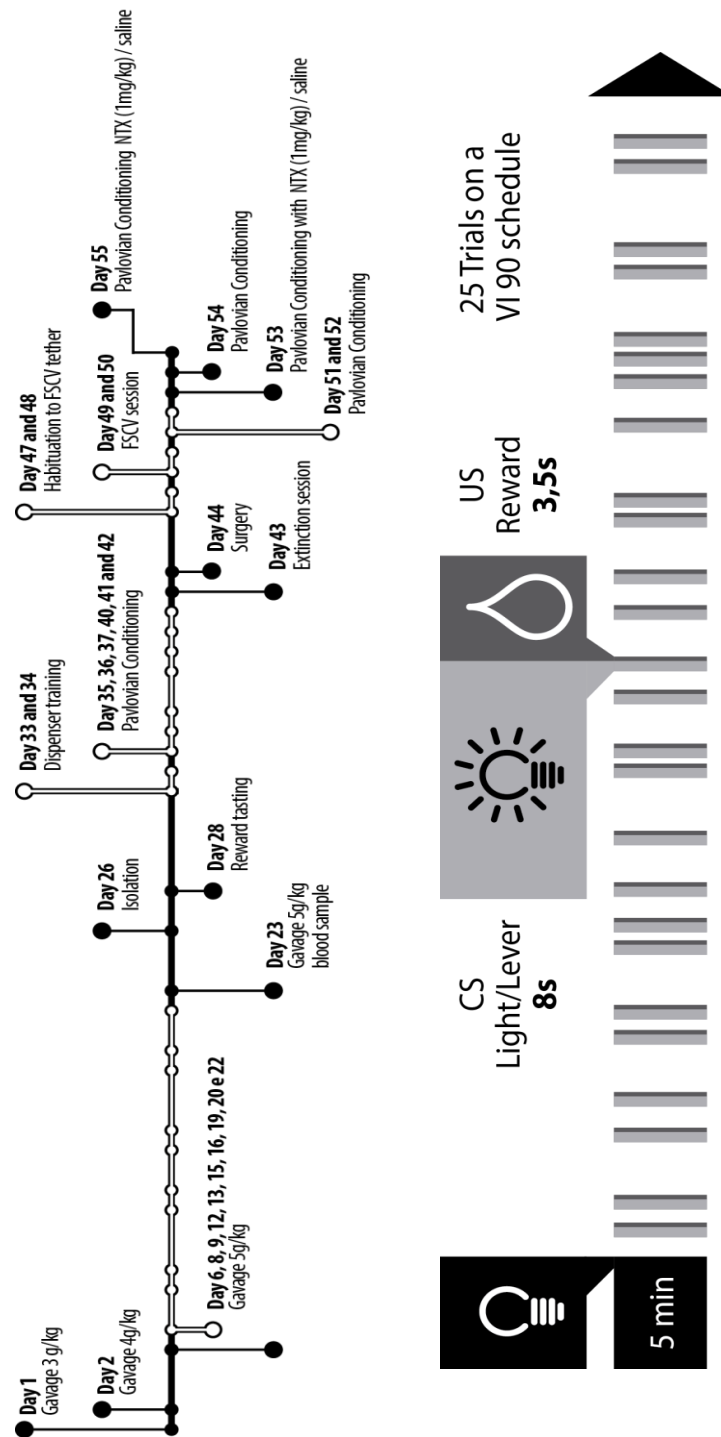


Figure 1. Timeline of the experiment. Frequencies and doses of ethanol administration by gavage, Pavlovian conditioning sessions and voltammetry recordings (A), and frequency and timing of the presentation of conditioned stimulus (CS, light cue) followed by reward delivery (US, unconditioned stimulus, liquid reward) in each Pavlovian conditioning session (B). See methods for details.

Figure 2.

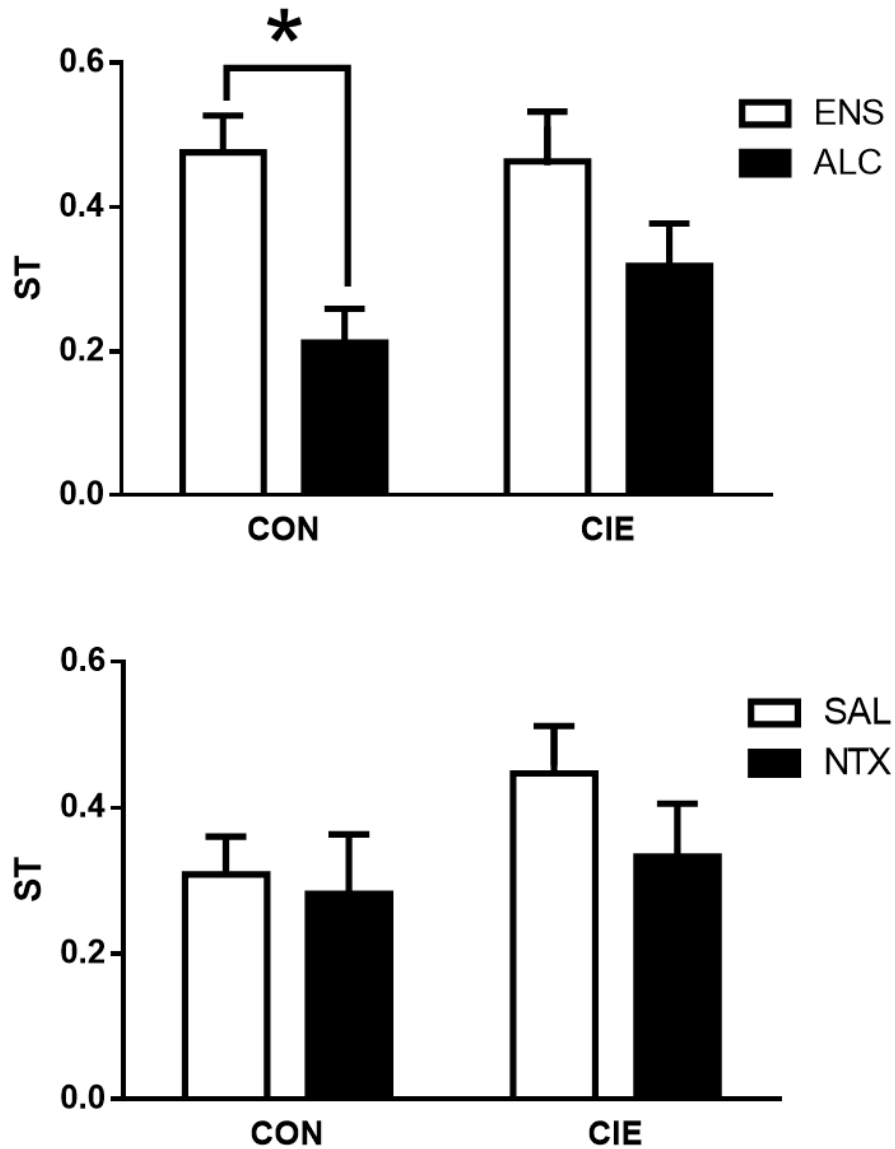


Figure 2. Chronic-intermittent ethanol exposure (CIE) prevents the decrease in sign tracking behavior observed when alcohol was added to the reward. Bars represent mean \pm SEM sign tracking behavior. CIE, ethanol-pretreated animals; CON, control rats; ENS, rats that received ensure as reward; ALC, rats that received ensure + alcohol as reward; SAL, saline treatment; NTX, naltrexone treatment. N = 11-20. * $p < 0.05$, Bonferroni after two-way ANOVA.

Figure 3.

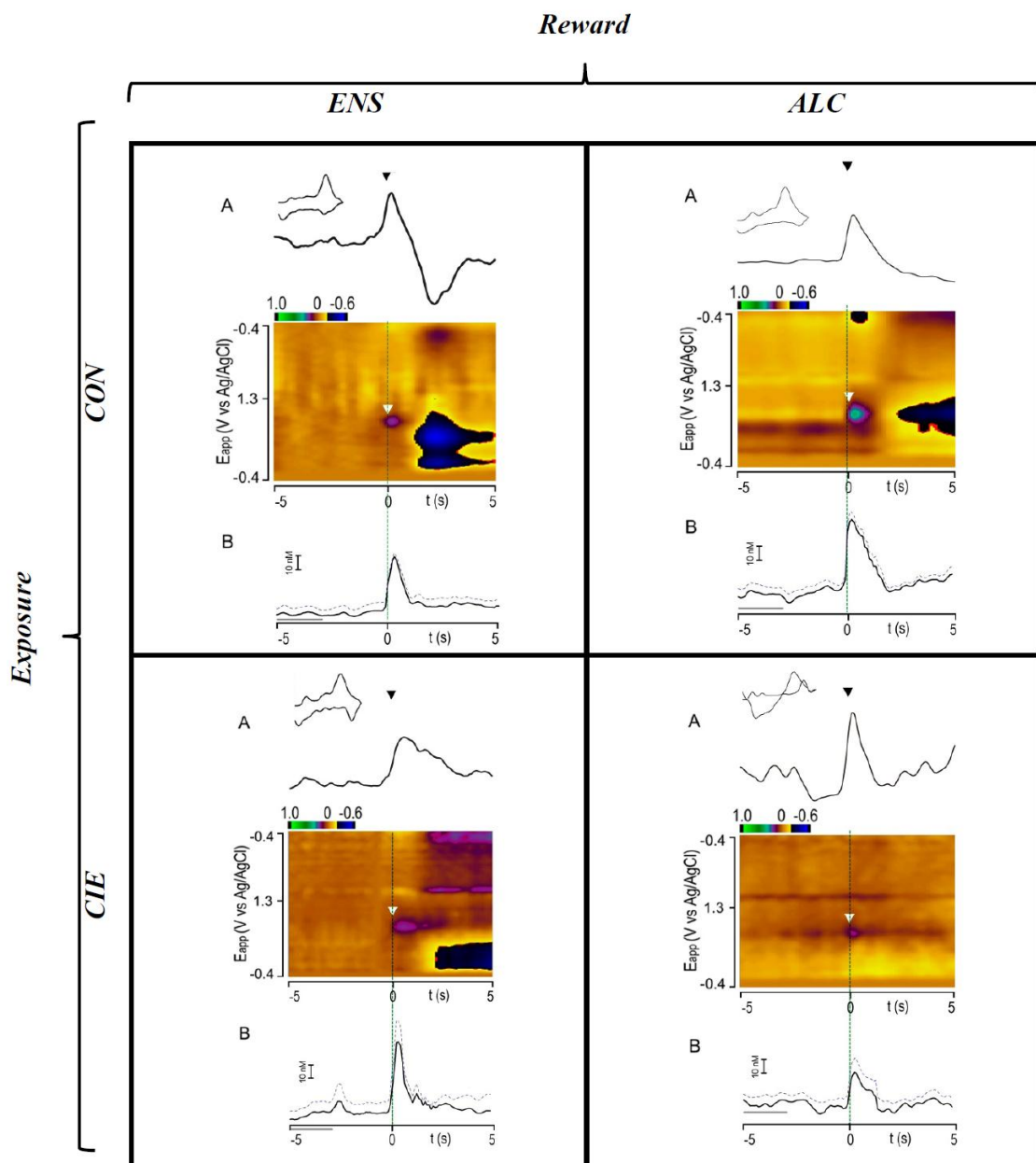


Figure 3. Chronic-intermittent exposure to ethanol decreased the DA response to the CS in animals trained with ethanol as a reward. Individual examples of DA transients recorded by using FSCV in the NAc of awake freely moving rats. DA was monitored by background-subtracted FSCV at carbon-fiber microelectrodes. From top to bottom are shown representative cyclic voltammograms taken at the peak oxidation current, concentration versus time traces, pseudo-color plots and mean \pm SEM concentration versus time traces (all rats). The voltammograms correspond to the peaks indicated by an arrow.

Figure 4.

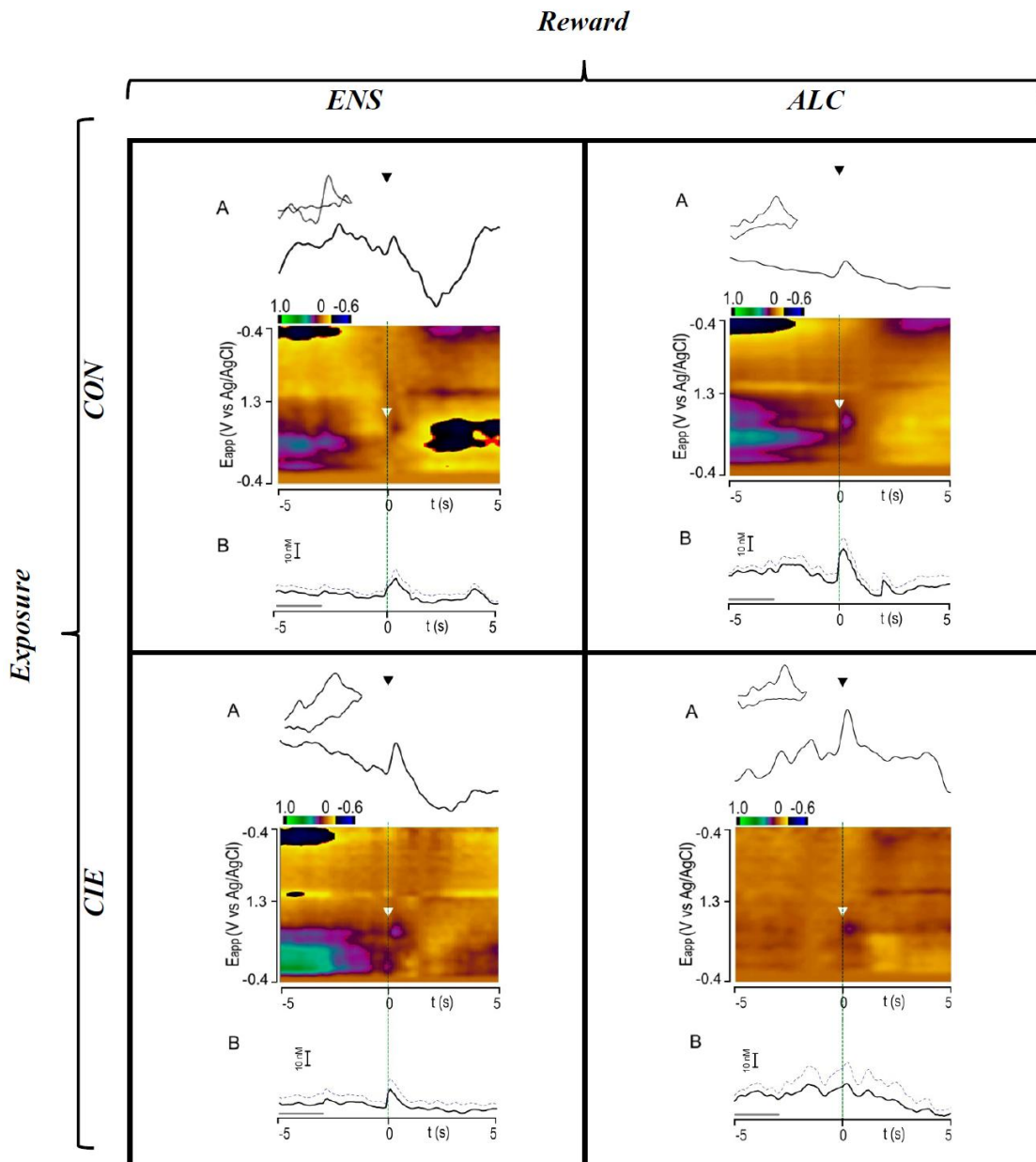


Figure 4. Chronic-intermittent exposure to ethanol decreased the DA response to the US in animals trained with ethanol as a reward. Individual examples of DA transients recorded by using FSCV in the NAc of awake freely moving rats. DA was monitored by background-subtracted FSCV at carbon-fiber microelectrodes. From top to bottom are shown representative cyclic voltammograms taken at the peak oxidation current, concentration versus time traces, pseudo-color plots and mean \pm SEM concentration versus time traces (all rats). The voltammograms correspond to the peaks indicated by an arrow.

Figure 5.

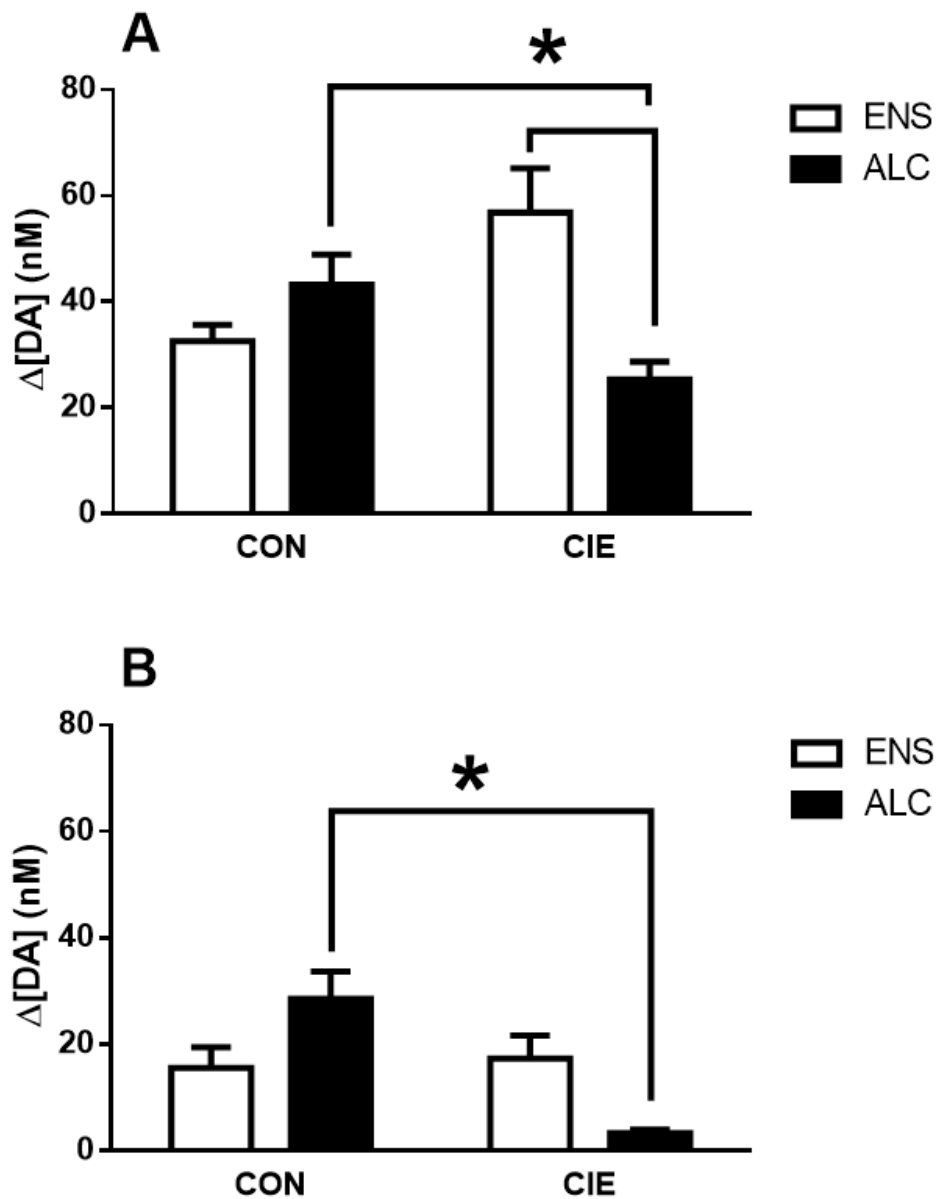


Figure 5. Chronic-intermittent exposure to ethanol decreased the DA response to alcoholic reward. Bars represent mean \pm SEM change in concentration of dopamine in the 3 s after the CS (A) or the 3 s after the US (B). N = 6-10. * $p < 0.05$ compared to the control group pre-treated with ethanol; Bonferroni test after repeated measure two-way ANOVA. ENS, rats that received ensure as reward; ALC, rats that received alcohol as reward; CON, control animals (rats that did no received pretreatment); CIE, rats submitted to a chronic-intermittent ethanol pretreatment.

Figure 6.

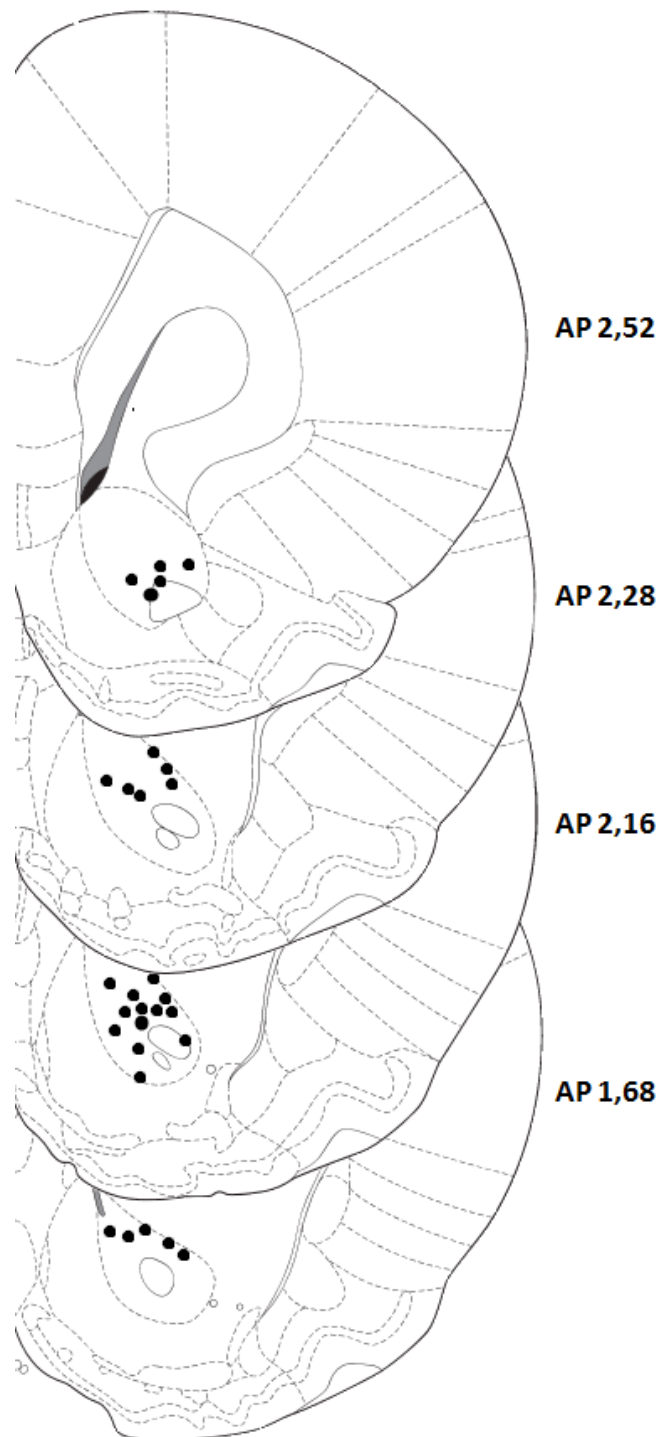


Figure 6. Site of recording electrodes in the NAc of rats. Schematic drawing of coronal sections shows the estimated locations of the electrode tips as black circles, according to the rat brain atlas of Paxinos and Watson (2004).

4. Discussão Geral

O presente estudo investigou a participação da dopamina frente à estímulos condicionados e incondicionados sobre o comportamento de procura pelo etanol, bem como o efeito da naltrexona sobre esse comportamento. Nossa hipótese principal foi que a exposição crônico intermitente ao etanol poderia afetar a saliência dos estímulos condicionados e, conseqüentemente, o comportamento de aproximação à eles.

No modelo animal utilizado foi mimetizado um histórico de consumo conhecido como *Binge*, onde os alcoólicos bebem de forma exagerada, repetida e intermitente. Sabe-se que o alcoólico sofre um processo de aprendizagem durante a experiência da droga, relacionando as pistas condicionadas do ambiente com os efeitos reforçadores do consumo do etanol. Tais estímulos podem ser de diversas naturezas e com a sucessiva repetição, adquirem a capacidade preditiva do consumo, um aprendizado conhecido como Condicionamento Pavloviano (TOMIE & SHARMA, 2013; MCCLORY & SPEAR, 2014).

Os resultados deste trabalho mostram que o indivíduo que possui um histórico de exposição crônico intermitente ao etanol apresenta alterações em aspectos comportamentais e neuroquímicos. Sendo que o comportamento ST de ratos sem histórico de exposição crônica intermitente ao etanol sugere que as pistas que prevêm a entrega de uma recompensa palatável eram menos salientes em animais treinados com recompensa alcoólica em comparação com aqueles treinados em uma recompensa não alcoólica. Estes dados sugerem que os ratos controle estão mais interessados no sabor do chocolate do que no próprio efeito de recompensa do álcool. Por outro lado, os ratos com um histórico de CIE comportaram-se como se etanol fosse gratificante da mesma forma que o chocolate .

A NTX é uma droga antagonista opióide com uma atividade agonista não significativa. Possui conhecida atividade redutora do o nível e frequência do consumo de etanol, além de reduzir a liberação DA durante o consumo do mesmo em animais (GONZALES & WEISS, 1998; HAY *et al.*, 2013). Em pacientes, foi capaz de promover menos episódios de consumo, reduzindo a recaída e o prazer consumir álcool, tanto em bebedores sociais, bem como em adictos (CICCOCIOPPO *et al.*, 2002; BURATTINI *et al.*, 2006). Apesar de ser conhecida onde esta droga age,

a ação sobre o alcoolismo permanece obscuro. Alguns pacientes têm uma boa resposta, mas alguns não apresentaram qualquer melhoria, bem como uma série de efeitos colaterais. Esses fatos evidenciam a necessidade de mais estudos envolvendo a NTX e seus efeitos (KLANZLER *et al.*, 2000)

O presente trabalho mostra que a NTX altera o impacto que um histórico de consumo de etanol apresenta sobre o comportamento ST. Apesar de nossos dados não nos dizerem o mecanismo pelo qual a NTX age sob a perda de preferência para o chocolate em comparação com chocolate + etanol em animais expostos, podemos dizer que pode existir uma relação de causalidade entre eles.

Sabe-se que estímulos incondicionados apetitivos promovem a liberação fásica de dopamina no NAc e que esse neurotransmissor ativa neurônios envolvidos na vontade de se aproximar e consumir tais estímulos (DI CHIARA, 1997; ROBINSON *et al.*, 2009; TOMIE & SHARMA, 2013). Da Cunha e colaboradores (2012), mostraram essa relação da liberação de dopamina e o comportamento de aproximação, mostrando que existem células específicas (*place-to-go cells*) que desencadeiam esse movimento direcionado ao estímulo.

Os US apetitivos são capazes de promover a liberação de dopamina no NAc, porém quando o sujeito aprende a prever quando e onde tais estímulos estarão disponíveis, a liberação de dopamina acontece associada ao estímulo condicionado. Já as drogas de abuso (que também são US), não perdem a propriedade de liberar dopamina no NAc mesmo após o sujeito ter aprendido onde e quando elas estarão disponíveis (DI CHIARA, 1997; SCHULTZ *et al.*, 1997; SCHULTZ & DICKINSON, 2000; SCHULTZ, 2001).

Nossos dados mostram que um histórico de exposição ao etanol diminui a liberação de dopamina em resposta à uma recompensa alcoólica, mas não para uma recompensa não-alcoólica. Podemos sugerir que uma exposição CIE provoca uma tolerância de longa duração para o efeito compensador de etanol. Este efeito pode contribuir para o aumento da ansia em alcoólicos observada após a ingestão de uma pequena porção de etanol; tendo isso um impacto substancial na recaída. O fato de que um histórico de consumo de etanol não afetou a liberação de dopamina em resposta a uma recompensa não-alcoólica sugere que as recompensas naturais podem ajudar a prevenir recaídas em alcoolistas.

Entre algumas teorias de dependência surgiu uma possível explicação sobre as razões que impulsiona o adicto em repetir o consumo e aumentar as quantidades de droga pelo tempo (KOOB & VOLKOW 2010; VOLKOW *et al.*, 2011). Os pacientes que sofrem de vício tem uma diminuição fisiológica dos níveis de dopamina que causam mais sintomas associados incluindo tendência de anedonia, depressão, suicídio, etc. O consumo de drogas aumenta a liberação DA em NAc que promove os sentimentos "elevados" relacionados com a droga . A fim de compensar os baixos níveis de DA estes pacientes fazem o uso abusivo de drogas, o que leva a uma tolerância e compulsão (KOOB & LE MOAL, 2005; FELTENSTEIN & SEE, 2008; KOOB E VOLKOW 2010; KOOB, 2014; WISE & KOOB, 2014) .

Em resumo, o presente estudo mostrou que a exposição crônica ao etanol afeta o comportamento ST e a resposta de dopamina mesolímbica à recompensa alcoólicas e aos sinais preditivos. Também mostrou que o tratamento com naltrexona pode alterar estes efeitos. Estes resultados fornecem novas hipóteses sobre os mecanismos pelos quais os antagonistas de opióides e recompensas naturais afetam a recaída no alcoolismo.

5. Conclusão

Tanto o CIE como a NTX afetam não apenas respostas neuroquímicas à CS e US associados ao alcoolismo, mas também o comportamento de procura por esses estímulos em animais de experimentação. Isso sugere que novas drogas com a propriedade de interferir nos mecanismos dopaminérgicos do alcoolismo provavelmente terão um impacto importante sobre o seu tratamento.

6.Referências bibliográficas

- ALEXANDER, G. E.; DELONG, M. R.; STRICK, P. L. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. **Annual Review of Neuroscience**, v. 9, p. 357, 1986.
- ANTON, R. F. Naltrexone for the Management of Alcohol Dependence. **The New England journal of medicine**, v. 359, n. 7, p. 715, 2008.
- BASS, C. E.; GRINEVICH, V.P.; GIOIA, D. DAY-BROWN, J.D.; BONIN, K.D.; STUBER, G.D.; WEINER, J.L.; BUDYGIN, E.A. Optogenetic stimulation of VTA dopamine neurons reveals that tonic but not phasic patterns of dopamine transmission reduce ethanol self-administration. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 7, p. 173, 2013.
- BERRIDGE, K. C. Espresso reward learning, hold the dopamine: theoretical comment on Robinson et al. (2005). **Behavioral Neuroscience**, v. 119, n. 1, p. 336, 2005.
- BERRIDGE, K. C.; ROBINSON, T. E.; ALDRIDGE, J. W. Dissecting components of reward: 'liking', 'wanting', and learning. **Current opinion in pharmacology**, v. 9, n. 1, p. 65, 2009.
- BJORKLUND, A.; DUNNETT, S. B. Dopamine neuron systems in the brain: an update. **Trends in Neurosciences**, v. 30, n. 5, p. 194, 2007.
- BOUZA, C.; ANGELES, M.; MUÑOZ, A.; AMATE, J.M. Efficacy and safety of naltrexone and acamprosate in the treatment of alcohol dependence: a systematic review. **Addiction**, v. 99, n. 7, p. 811, 2004.
- BUDYGIN, E. A.; PHILLIPS, P.E.; ROBINSON, D.L.; KENNEDY, A.P.; GAINETDINOV, R.R.; WIGHTMAN, R.M. Effect of acute ethanol on striatal dopamine neurotransmission in ambulatory rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 297, n. 1, p. 27, 2001.
- BUDYGIN, E. A. PHILLIPS, P.E.; WIGHTMAN, R.M.; JONES, S.R. Terminal effects of ethanol on dopamine dynamics in rat nucleus accumbens: an in vitro voltammetric study. **Synapse**, v. 42, n. 2, p. 77, 2001.
- BURATTINI, C.; Gill, T.M.; AICARDI, G.; JANAK, P.H. The ethanol self-administration context as a reinstatement cue: acute effects of naltrexone. **Neuroscience**, v. 139, n. 3, p. 877, 2006.
- CALABRESI, P.; GUBELLINI, P.; CENTONZE, D.; PICCONI, B.; BERNARDI, G.; CHERGUI, K.; SVENNINGSSON, P.; FIENBERG, A.A.; GREENGARD, P. Dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein 32 kDa controls both striatal long-term depression and long-term potentiation, opposing forms of synaptic plasticity. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 22, p. 8443, 2000.

- CALABRESI, P.; PISANI, A.; MERCURI, N.B.; BERNARDI, G. The corticostriatal projection: from synaptic plasticity to dysfunctions of the basal ganglia. **Trends in Neurosciences**, v. 19, n. 1, p. 19,1996.
- CENCI, M. A. Presynaptic mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia: the findings, the debate, the therapeutic implications. **Frontiers in Neurology**, v. 5, 2014.
- CHEER, J. F.; ARAGONA, B.J.; HEIEN, M.L.; SEIPEL, A.T.; CARELLI, R.M.; WIGHTMAN, R.M. Coordinated accumbal dopamine release and neural activity drive goal-directed behavior. **Neuron**, v. 54, n. 2, p. 237,2007.
- CHEER, J. F.; WASSUM, K.M.; SOMBERS, L.A.; HEIEN, M.L.; ARIANSEN, J.L.; ARAGONA, B.J.; PHILLIPS, P.E.; WIGHTMAN, R.M. Phasic dopamine release evoked by abused substances requires cannabinoid receptor activation. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 4, p. 791, 2007.
- CHEFER, V. I. et al. Overview of brain microdialysis. **Current Protocols in Neuroscience**, v. Chapter 7, p. Unit7.1, 2009.
- CICCOCIOPPO, R.; MARTIN-FARDON, R.; WEISS, F. Effect of selective blockade of mu(1) or delta opioid receptors on reinstatement of alcohol-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 27, n. 3, p. 391, 2002.
- CLAPP, P.; BHAVE, S. V.; HOFFMAN, P. L. How Adaptation of the Brain to Alcohol Leads to Dependence: A Pharmacological Perspective. **Alcohol Research & Health**, v. 31, n. 4, p. 310, 2008.
- DA CUNHA, C.; Wietzikoski, E.C.; Dombrowski, P.; Bortolanza, M.; Santos, L.M.; Boschen, S.L.; Miyoshi, E. Learning processing in the basal ganglia: A mosaic of broken mirrors. **Behavioural Brain Research**, v. 199, p. 156, 2009.
- DA CUNHA, C.; GOMEZ-A, A.; BLAHA, C. D. The role of the basal ganglia in motivated behavior. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 23, n. 5-6, p. 747, 2012.
- DAVIES, M. The role of GABAA receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v. 28, n. 4, p. 263, 2003.
- DEEHAN, G. A.; Hauser, S.R.; Wilden, J.A.; Truitt, W.A.; Rodd, Z.A. Elucidating the biological basis for the reinforcing actions of alcohol in the mesolimbic dopamine system: the role of active metabolites of alcohol. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 7, p. 104, 2013.
- DI CHIARA, G. Alcohol and dopamine. **Alcohol health and research world**, v. 21, n. 2, p. 108, 1997.
- 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**, v. 85, n. 14, p. 5274, 1988.

- EAGLE, D. M.; BAUNEZ, C. Is there an inhibitory-response-control system in the rat? Evidence from anatomical and pharmacological studies of behavioral inhibition. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 34, n. 1-3, p. 50, 2010.
- ERICSON, M.; MOLANDER, A.; LÖF, E.; ENGEL, J.A.; SÖDERPALM, B. Ethanol elevates accumbal dopamine levels via indirect activation of ventral tegmental nicotinic acetylcholine receptors. **European Journal of Pharmacology** v. 467, n. 1-3, p. 85, 2003.
- FELTENSTEIN, M. W.; SEE, R. E. The neurocircuitry of addiction: an overview. **British Journal of Pharmacology** v. 154, n. 2, p. 261, 2008.
- FLAGEL, S. B.; WATSON, S.J.; AKIL, H.; ROBINSON, T.E. Individual differences in the attribution of incentive salience to a reward-related cue: influence on cocaine sensitization. **Behavioural Brain Research**, v. 186, n. 1, p. 48, 2008.
- FRENCH & TOTTERDELL. Individual nucleus accumbens-projection neurons receive both basolateral amygdala and ventral subicular afferents in rats. **Neuroscience**, v. 119, n. 1, p. 19, 2003.
- FRENCH, S. J.; TOTTERDELL, S. Hippocampal and prefrontal cortical inputs monosynaptically converge with individual projection neurons of the nucleus accumbens. **Journal of Comparative Neurology**, v. 446, n. 2, p. 151, 2002.
- GERFEN, C. R.; SURMEIER, D. J. Modulation of striatal projection systems by dopamine. **Annual Review of Neuroscience**, v. 34, p. 441, 2011.
- GONZALES, R. A.; WEISS, F. Suppression of ethanol-reinforced behavior by naltrexone is associated with attenuation of the ethanol-induced increase in dialysate dopamine levels in the nucleus accumbens. **Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 24, p. 10663, 1998.
- GRACE, A. A. The tonic/phasic model of dopamine system regulation and its implications for understanding alcohol and psychostimulant craving. **Addiction**, v. 95 Suppl 2, p. S119, 2000.
- HAMID, A. A.; PETTIBONE, J.R.; MABROUK, O.S.; HETRICK, V.L.; SCHMIDT, R.; VANDER WEELE, C.M.; KENNEDY, R.T.; ARAGONA, B.J.; BERKE, J.D. Mesolimbic dopamine signals the value of work. **Nature Neuroscience** v.19, p 117, 2015.
- HAY, R. A.; JENNINGS, J.H.; ZITZMAN, D.L.; HODGE, C.W.; ROBINSON, D.L. Specific and nonspecific effects of naltrexone on goal-directed and habitual models of alcohol seeking and drinking. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 37, n. 7, p. 1100, 2013.
- HUYS, Q. J.; TOBLER, P.N.; HASLER, G.; FLAGEL, S.B. The role of learning-related dopamine signals in addiction vulnerability. **Progress in Brain Research**, v. 211, p. 31, 2014.
- JACKOWSKA, K.; KRYSINSKI, P. New trends in the electrochemical sensing of dopamine. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 11, p. 3753, 2013

- JONES, D. R.; MOUSSAUD, S.; MCLEAN, P. Targeting heat shock proteins to modulate α -synuclein toxicity. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, Sage UK: London, England, v. 7, n. 1, p. 33, 2014.
- KANDEL, E. R. S., J.H.; JESSELL, T.M. **Principles of neural science**. 2000.
- KAUER, J. A.; MALENKA, R. C. Synaptic plasticity and addiction. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 11, p. 844, 2007.
- KAWAGUCHI, Y.; WILSON, C.J.; AUGOOD, S.J.; EMSON, P.C. Striatal interneurons - chemical, physiological and morphological characterization. **Trends in Neurosciences**, v. 18, n. 12, p. 527, 1995.
- KOOB & VOLKOW. Neurocircuitry of addiction. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 217, 2010b.
- KOOB, G. F. Neurocircuitry of alcohol addiction: synthesis from animal models. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 125, p. 33, 2014.
- KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Plasticity of reward neurocircuitry and the 'dark side' of drug addiction. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 11, p. 1442, 2005.
- KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurocircuitry of addiction. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 217, 2010a.
- KRANK, M. D.; O'Neill, S.; Squarey, K.; Jacob, J. Goal- and signal-directed incentive: conditioned approach, seeking, and consumption established with unsweetened alcohol in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 196, n. 3, p. 397, 2008.
- KRANK, M. D. Pavlovian conditioning with ethanol: sign-tracking (autoshaping), conditioned incentive, and ethanol self-administration. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 27, n. 10, p. 1592, 2003.
- KRANZLER, H. R.; MODESTO-LOWE, V.; VAN KIRK, J. Naltrexone vs. nefazodone for treatment of alcohol dependence. A placebo-controlled trial. **Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 5, p. 493, May 2000.
- KRYSTAL, J. H.; GUEORGUIEVA, R.; CRAMER, J.; COLLINS, J.; ROSENHECK, R.; VA CSP NO. 425 STUDY TEAM. Naltrexone is associated with reduced drinking by alcohol dependent patients receiving antidepressants for mood and anxiety symptoms: results from VA Cooperative Study No. 425, "Naltrexone in the treatment of alcoholism". **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 32, n. 1, p. 85, 2008.
- LOVINGER, D. M. Interactions between ethanol and agents that act on the NMDA-type glutamate receptor. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 20, n. 8 Suppl, p. 187A, Nov 1996.
- LOVINGER, D. M.; ROBERTO, M. Synaptic effects induced by alcohol. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 13, p. 31, 2013.
- MALENKA, R. C.; BEAR, M. F. LTP and LTD: an embarrassment of riches. **Neuron**, v. 44, p. 51, 2004.

- MCCLORY, A. J.; SPEAR, L. P. Effects of ethanol exposure during adolescence or in adulthood on Pavlovian conditioned approach in Sprague-Dawley rats. **Alcohol**, v. 48, n. 8, p. 755, 2014.
- MELDRUM, B. Classification of GABA and benzodiazepine receptors. **Journal of Psychopharmacology** v. 1, n. 1, p. 1, 1987.
- MELDRUM, B. Pharmacology of GABA. **Clinical Neuropharmacology**, v. 5, n. 3, p. 293, 1982.
- MISSALE, C. et al. Dopamine Receptors: From Structure to Function. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 1, p. 189, 1998.
- MIYANO, K.; SUDO, Y.; YOKOYAMA, A.; HISAOKA-NAKASHIMA, K.; MORIOKA, N.; TAKEBAYASHI, M.; NAKATA, Y.; HIGAMI, Y.; UEZONO, Y. History of the G protein-coupled receptor (GPCR) assays from traditional to a state-of-the-art biosensor assay. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 126, n. 4, p. 302, 2014.
- MIZUNO, K.; KUROKAWA, K.; OHKUMA, S. Activation of GABA(A) receptors suppresses ethanol-induced upregulation of type 1 IP(3) receptors. **Synapse**, v. 67, n. 1, p. 51, 2013.
- NESTLER, E. J. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 2, p. 119, 2001.
- NEVO, I.; HAMON, M. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism. **Neurochemistry International**, v. 26, n. 4, p. 305, 1995.
- NIRENBERG, M. J.; Vaughan, R.A.; Uhl, G.R.; Kuhar, M.J.; Pickel, V.M. The dopamine transporter is localized to dendritic and axonal plasma membranes of nigrostriatal dopaminergic neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 2, p. 436, 1996.
- OKAMOTO, T.; HARNETT, M. T.; MORIKAWA, H. Hyperpolarization-activated cation current (I_h) is an ethanol target in midbrain dopamine neurons of mice. **Journal of Neurophysiology**, v. 95, n. 2, p. 619, 2006.
- PHILLIPS, P. E.; ROBINSON, D.L.; STUBER, G.D.; CARELLI, R.M.; WIGHTMAN, R.M. Real-time measurements of phasic changes in extracellular dopamine concentration in freely moving rats by fast-scan cyclic voltammetry. **Methods in Molecular Medicine**, v. 79, p. 443, 2003.
- POPP, R. L.; LICKTEIG, R.; BROWNING, M.D.; LOVINGER, D.M. Ethanol sensitivity and subunit composition of NMDA receptors in cultured striatal neurons. **Neuropharmacology**, v. 37, n. 1, p. 45, 1998.
- RIAL, D. Proteína Prion Celular (PrPC) altera a suscetibilidade ao etanol através da modulação do sistema dopaminérgico. 99p. Tese de doutorado - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2012.

- RICE, M. E.; CRAGG, S. J. Dopamine spillover after quantal release: rethinking dopamine transmission in the nigrostriatal pathway. **Brain Research Reviews**, v. 58, n. 2, p. 303, 2008.
- RICE, M. E.; PATEL, J. C.; CRAGG, S. J. Dopamine release in the basal ganglia. **Neuroscience**, v. 198, p. 112, 2011.
- ROBERTS, J. G.; Lugo-Morales, L.Z.; LOZIUK, P.L.; SOMBERS, L.A. Real-time chemical measurements of dopamine release in the brain. **Methods in Molecular Biology**, v. 964, p. 275, 2013.
- ROBINSON & WIGHTMAN. Rapid Dopamine Release in Freely Moving Rats. In: MICHAEL, A. C. e BORLAND, L. M. (Ed.). **Electrochemical Methods for Neuroscience**. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis
- ROBINSON, D. L.; VENTON, B.J.; HEIEN, M.L.; WIGHTMAN, R.M. Detecting subsecond dopamine release with fast-scan cyclic voltammetry in vivo. **Clinical chemistry**, v. 49, n. 10, p. 1763, 2003.
- ROBINSON, D. L.; HOWARD, E.C.; MCCONNELL, S.; GONZALES, R.A.; WIGHTMAN, R.M. Disparity between tonic and phasic ethanol-induced dopamine increases in the nucleus accumbens of rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 33, n. 7, p. 1187, 2009.
- ROBINSON, D. L., WIGHTMAN, R. M. Rapid Dopamine Release in Freely Moving European Journal of Neuroscience Rats. In: Michael, A.C.; Borland, L.M., editors. **Electrochemical Methods for Neuroscience**. Chapter 2. 2007.
- ROBINSON, D. L.; WIGHTMAN, R. M. Nomifensine amplifies subsecond dopamine signals in the ventral striatum of freely-moving rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 90, n. 4, p. 894, 2004.
- ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. Review. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, n. 1507, p. 3137, 2008.
- RUSSO, S. J.; NESTLER, E. J. The brain reward circuitry in mood disorders. **Nature Reviews Neuroscience** v. 14, n. 9, p. 609, 2013.
- SAUNDERS, B. T.; ROBINSON, T. E. The role of dopamine in the accumbens core in the expression of Pavlovian-conditioned responses. **European Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 4, p. 2521, 2012.
- SCHULTZ, W. Predictive Reward Signal of Dopamine Neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 80, n. 1, p. 1, 1998.
- SCHULTZ, W. Reward signaling by dopamine neurons. **Neuroscientist**, v. 7, n. 4, p. 293, 2001.
- SCHULTZ, W.; DAYAN, P.; MONTAGUE, P. R. A neural substrate of prediction and reward. **Science**, v. 275, n. 5306, p. 1593, 1997.

- SCHULTZ, W.; DICKINSON, A. Neuronal coding of prediction errors. **Annual Review of Neuroscience**, v. 23, p. 473, 2000.
- SESACK, S. R.; GRACE, A. A. Cortico-basal ganglia reward network: microcircuitry. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, p. 27, 2010.
- SIBLEY, D. R.; MONSMA, F. J., JR. Molecular biology of dopamine receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 13, n. 2, p. 61, 1992.
- SIEGEL, G. et al. **Basic Neurochemistry**. 7. London: Elsevier, 2006.
- SINGER, B. F.; Guptaroy, B., Austin, C.J.; Wohl, I.; Lovic, V.; Seiler, J.L.; Vaughan, R.A.; Gnegy, M.E.; Robinson, T.E.; Aragona, B.J. Individual Variation in Incentive Saliency Attribution and Accumbens Dopamine Transporter Expression and Function. **European Journal of Neuroscience**, 2015.
- SOMOGYI, P.; SMITH, A. D. Projection of neostriatal spiny neurons to the substantia nigra –application of a combined golgi-staining and horseradish-peroxide transport procedure at both light and electron-microscopic levels.. **Brain Research**, v. 178, n. 1, p. 3-15, 1979. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1979HU68000001 >.
- SREY, C. S.; MADDUX, J. M.; CHAUDHRI, N. The attribution of incentive saliency to Pavlovian alcohol cues: a shift from goal-tracking to sign-tracking. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 9, p. 54, 2015.
- TAKMAKOV, P.; McKinney, C.J.; Carelli, R.M.; Wightman, R.M. Instrumentation for fast-scan cyclic voltammetry combined with electrophysiology for behavioral experiments in freely moving animals. **Review of Scientific Instruments**, v. 82, n. 7, p. 074302, 2011.
- Taylor & Francis Group, LLC., 2007.
- TEPPER, J. M.; ABERCROMBIE, E. D.; BOLAM, J. P. Basal ganglia macrocircuits. In: (Ed.). **Gaba and the Basal Ganglia: from Molecules to Systems**, v.160, 2007. p.3-7.
- TEPPER, J. M.; BOLAM, J. P. Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 14, n. 6, p. 685, 2004.
- TOMIE, A.; SHARMA, N. Pavlovian sign-tracking model of alcohol abuse. **Current Drug Abuse Reviews**, v. 6, n. 3, p. 201,2013.
- UNDIÉH, A. S. Pharmacology of Signaling Induced by Dopamine D(1)-Like Receptor Activation. **Pharmacology & therapeutics**, v. 128, n. 1, p. 37, 2010.
- VOLKOW, N. D.; Wang, G.J.; Fowler, J.S.; Tomasi, D.; Telang, F. Addiction: beyond dopamine reward circuitry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 37, p. 15037, 2011.
- VOLKOW, N.D. A note from NIDA's Director. **Addiction Science & Clinical Practice**, v. 6, n.1, p.2, 2011.

- WEIGHT, F. F.; LOVINGER, D. M.; WHITE, G. Alcohol inhibition of NMDA channel function. **Alcohol and Alcoholism**, v. 1, p. 163, 1991.
- WESTERINK, B. H. C. Brain microdialysis and its application for the study of animal behaviour. **Behavioural Brain Research**, v. 70, n. 2, p. 103, 1995.
- WHO. **Global status report on alcohol and health** – 2014 ed.
- WIGHTMAN, R. M. Detection technologies. Probing cellular chemistry in biological systems with microelectrodes. **Science**, v. 311, n. 5767, p. 1570, 2006.
- WISE, R. A.; KOOB, G. F. The development and maintenance of drug addiction. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 2, p. 254, 2014.
- WU, T.; Wang, J.; Wang, C.; Hallett, M.; Zang, Y.; Wu, X.; Chan, P. Basal ganglia circuits changes in Parkinson's disease patients. **Neuroscience Letters**, v. 524, n. 1, p. 55, 2012.
- YIM, H. J.; Schallert, T.; Randall, P.K.; Gonzales, R.A. Comparison of local and systemic ethanol effects on extracellular dopamine concentration in rat nucleus accumbens by microdialysis. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 22, n. 2, p. 367, 1998.
- YIM, H. J.; Schallert, T.; Randall, P.K.; Bungay, P.M.; Gonzales, R.A. Effect of ethanol on extracellular dopamine in rat striatum by direct perfusion with microdialysis. **Journal of Neurochemistry**, v. 68, n. 4, p. 1527, 1997.
- YIM, H. J.; GONZALES, R. A. Ethanol-induced increases in dopamine extracellular concentration in rat nucleus accumbens are accounted for by increased release and not uptake inhibition. **Alcohol**, v. 22, n. 2, p. 107, 2000.
- ZHOU, F. M.; WILSON, C. J.; DANI, J. A. Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. **Journal of Neurobiology**, v. 53, n. 4, p. 590, 2002.