Priscila Marianno

**Camundongos C57BL/6 alojados em ambiente enriquecido
apresentam menor consumo de etanol após estresse**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

São Paulo
2014

Priscila Marianno

**Camundongos C57BL/6 alojados em ambiente enriquecido
apresentam menor consumo de etanol após estresse**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosana Camarini

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Marianno, Priscila.

Camundongos C56BL/6 alojados em ambiente enriquecido
apresentam menor consumo de etanol após estresse / Priscila
Marianno. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Rosana Camarini.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de
concentração. Linha de pesquisa: Neurobiologia da dependência a
drogas de abuso.

Versão do título para o inglês: C57BL/6 mice housed in enriched
environment exhibit lower ethanol consumption after stress.

1. Etanol 2. Consumo 3. Dependência 4. Estresse 5.
Camundongos 6. Comportamento animal I. Camarini, Profa. Dra.
Rosana II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0206/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Priscila Marianno.

Título da Dissertação: Camundongos C56BL/6 alojados em ambiente enriquecido
apresentam menor consumo de etanol após estresse.

Orientador(a): Profa. Dra. Rosana Camarini.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **143** nas fls. **133** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Rosana Camarini**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Avaliação do consumo de etanol em camundongos expostos ao ambiente enriquecido*" do qual participam o(s) aluno(s), **Priscila Marianno, André Veloso Lima Rueda, Karina Possa Abrahão**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **26.10.2012**, com validade de 4 anos.

São Paulo, 29 de outubro de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

*Aos meus pais,
Meire e Luiz*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Rosana Camarini por ter me recebido em seu laboratório e me dado espaço para a realização do trabalho. Obrigada pela orientação, paciência, ensinamentos, dedicação e também pela confiança depositada em mim durante esses dois anos e meio.

Agradeço à Karina Abrahão por estar sempre disposta a me passar parte do grande conhecimento que possui e por até hoje, mesmo distante, sempre me ajudar quando preciso.

Às professoras Carolina Demarchi, Vanessa Abílio e Cláudia Faturi pelas observações construtivas sobre o meu trabalho durante o exame de qualificação. Agradeço também a professora Isabel Quadros, da UNIFESP, que disponibilizou uma parte do material das garrafas utilizadas para o consumo.

Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e à FAPESP pelo apoio financeiro para a realização deste projeto.

À todos os meus amigos do Laboratório de Neuroquímica e Farmacologia Comportamental que foram fundamentais para a realização desse projeto. André, Mari, Lucas, Pri, Marcos, Cris, Bia, Rafa, Rodolfo e Caio, agradeço não só pela ajuda no trabalho, mas também pelas conversas, por todos os momentos de descontração proporcionados e pela companhia, mesmo nos finais de semana e feriados. Agradeço também a Livia, agregada do lab, que sempre me ajudou quando precisei. Obrigada pessoal, por deixarem de ser apenas colegas de laboratório e tornarem - se meus amigos.

Aos funcionários Manoel e Mateus pelo suporte oferecido nos cuidados e manejo dos animais.

Agradeço aos meus amigos Cynthia, Nath, Plack, Thata, Má, Saissu, Dani, Fer Figueira, Gabriel, Fer Bersi, Polly, Jackson, Bianca, Julianne, Anne e Dan pela amizade sincera e por estarem sempre presentes.

E principalmente, agradeço aos meus pais, Meire e Luiz, pelo amor, carinho, compreensão, incentivo e dedicação. Ao meu irmão Thi, pelo apoio, cumplicidade e amizade, e à minha afilhada Gigi, por me proporcionar momentos tão alegres ao seu lado.

Muito obrigada!

RESUMO

Marianno P. Camundongos C57BL/6 alojados em ambiente enriquecido apresentam menor consumo de etanol após estresse. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

A retomada do consumo excessivo de álcool após abstinência é uma das características do processo da dependência. O enriquecimento ambiental (EA) parece minimizar vários efeitos induzidos por drogas de abuso, assim como a naltrexona (NTX), um dos principais fármacos usados na dependência ao álcool. Entretanto, este antagonista opióide causa diversos efeitos indesejáveis. O estudo avaliou se o EA alterou o consumo de etanol após períodos de abstinência, na ausência ou na presença de um estímulo estressor que precedia a reexposição ao etanol e se, associado a baixas doses de NTX, induziria um efeito aditivo. Camundongos C57BL/6 foram expostos ao consumo de escolha entre duas garrafas baseado no paradigma *“Drinking in the Dark”*. Após a fase de aquisição (2 h/dia), os animais foram separados em grupos. Em um experimento, um grupo foi alojado em condições padrões (CT) e o outro em EA, 24 h/dia. Em um segundo experimento, o tempo de EA foi reduzido para 3 h/dia. Após 6 dias de abstinência os animais voltaram a ter acesso ao etanol semanalmente. O ciclo abstinência - reexposição se repetiu por algumas semanas consecutivas. Durante um dos períodos de abstinência, os animais foram testados no labirinto em cruz elevado (LCE). O grupo mantido 24 h no EA passou menos tempo nos braços abertos, indicando um comportamento tipo ansioso em relação ao CT. Com a redução do tempo de EA, não foram mais observadas alterações no LCE. Durante as duas últimas semanas de consumo, os animais tiveram acesso livre ao etanol por 24 h. Imediatamente antes da última reexposição, eles foram submetidos ao estresse de contenção por uma 1 h. Apenas neste caso, os grupos EA (3 h e 24 h) apresentaram uma redução no consumo de etanol durante o acesso de 24 h. Em relação ao experimento de associação do EA a baixas doses de NTX (0,25 e 0,5 mg/kg), utilizando um delineamento similar ao citado (com o acesso ao etanol 2h/dia), não foram observadas alterações no consumo entre os grupos EA + NTX e EA + salina. Os resultados sugerem que o EA pode ajudar o animal a lidar melhor com situações estressantes agudas, o que o “protegeria” de um comportamento de maior consumo de etanol.

Palavras-chave: Dependência. Consumo voluntário. Etanol. Enriquecimento ambiental. Estresse. Naltrexona.

ABSTRACT

Marianno P. C57BL/6 mice housed in enriched environment exhibit lower ethanol consumption after stress. [Masters thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

The excessive alcohol consumption after abstinence is one of the key features in the process of addiction. Environmental enrichment (EE) appears to minimize drug craving, as well as naltrexone (NTX), a drug used in alcohol dependence. However, this opioid antagonist causes many undesirable effects. The study evaluated whether EE altered ethanol consumption after withdrawal periods, with or without a stressful stimulus before ethanol re-exposure, and whether EE in combination with low doses of NTX would induce an additive effect. C57BL/6 mice were given a two-bottle choice paradigm using the "Drinking in the Dark" protocol. After a 15-day acquisition phase (2 h/day), the mice were distributed into groups. In the first experiment, a group was housed in standard conditions (SC) and the other in EE, 24 h/day. In a second experiment, the exposure to EE was reduced to 3 h/day. The animals were deprived of ethanol for 6 days, and then re-exposed to ethanol weekly. The withdrawal - re-exposure cycle was repeated for consecutive weeks. During one of the withdrawal periods, mice were tested in the elevated plus maze. The EE 24 h/day group spent less time in the open arms, showing anxiety-like behavior. However, no anxiety-like effect was detected in the EE 3 h/day group. In the last two weeks of re-exposure, the animals had free access to ethanol for 24 h. The mice were exposed to 1 h restraint stress immediately before the last re-exposure. EE mice (3 h and 24 h) showed reduced ethanol consumption, when they had 24 h free access to ethanol after the stress. The EE housing combined with low doses of NTX (0.25 and 0.5 mg/kg), using a similar experimental design with 2 h/day of ethanol access, showed no differences among EE + NTX and EE + saline groups. The results suggest that EE may help the animal to cope better with stressful situations, resulting in blunted ethanol drinking.

Keywords: Addiction. Voluntary consumption. Ethanol. Environmental enrichment. Stress. Naltrexone.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico (*Adrenocorticotropic hormone*)

ADE - Efeito de privação do álcool (*Alcohol Deprivation Effect*)

ANOVA - Análise de Variância

ATV - Área tegmental ventral

BDNF - Fator neurotrófico derivado do encéfalo (*Brain - derived neurotrophic factor*)

CEBRID - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas

CPF - Córtex pré-frontal

CPP - Preferência condicionada de lugar (*Conditioned Place Preference*)

CRF - Fator liberador de corticotrofina (*Corticotropin-releasing factor*)

DID - Beber no escuro (*Drinking in the Dark*)

EA - Enriquecimento ambiental

EIA - Ensaio imunoenzimático (*Enzyme immunoassay*)

EtOH - Etanol

GABA - Ácido γ – aminobutírico

HPA - Hipotálamo-pituitária-adrenal

i.p. - Intraperitoneal

LCE - Labirinto em cruz elevado

n - Número de animais por grupo

NAc - Núcleo accumbens

NMDA - N-metil-D-aspartato

NTX - Naltrexona

POMC - Pró-opiomelanocortina

SENAD - Secretaria Nacional Antidrogas

WHO - Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Imagem dos animais alojados em ambientes enriquecidos.....	30
Figura 2 - Delineamento dos experimentos.....	35
Figura 3 - Consumo de etanol, preferência e volume de água consumido em 2 h por dia durante a fase de aquisição (Experimentos 1 e 2).....	38
Figura 4 - Relação linear entre a quantidade de etanol consumido e a concentração no plasma imediatamente após 2 h de acesso ao etanol no último dia da fase de aquisição do experimento 1.....	39
Figura 5 - Quantidade de etanol consumida comparada à fase de aquisição, preferência e consumo de água, durante 2 h por dia em reexposições semanais, dos grupos CT e EA (Experimentos 1 e 2).....	42
Figura 6 - Quantidade de etanol consumido, preferência e consumo de água dos grupos CT e EA, em 24 h, sem o estresse agudo de contenção e após o estresse (Experimentos 1 e 2).....	45
Figura 7 - Corticosterona plasmática em pg/ml dos grupos CT e EA (Experimento 2).....	46
Figura 8 - Porcentagem de tempo gasto e número de entradas nos braços abertos no teste LCE dos grupos CT e EA (Experimentos 1 e 2).....	47
Figura 9 - Porcentagem de tempo gasto e número de entradas nos braços fechados no teste LCE dos grupos CT e EA (Experimentos 1 e 2).....	48
Figura 10 - Tempo de latência, em segundos, para entrada nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (Experimentos 1 e 2).....	49
Figura 11 - Número total de espreitas realizadas pelos animais dos grupos CT e EA (Experimentos 1 e 2).....	49
Figura 12 - Consumo de etanol, preferência e volume de água consumido em 2 h por dia durante a fase de aquisição (Experimento 3).....	50
Figura 13 - Quantidade de etanol consumida comparada a fase de aquisição, preferência por etanol, consumo de água e consumo de ração durante 2 h por dia em	

reexposições semanais, dos grupos salina, 0.5 NTX, 1.0 NTX e 4.0 NTX (Experimento 3).....52

Figura 14 - Consumo de etanol, preferência, volume de água e ração consumida em 2 h por dia durante a fase de aquisição (Experimento 4).....54

Figura 15 - Quantidade de etanol consumida comparada a fase de aquisição, preferência por etanol, consumo de água e consumo de ração durante 2 h por dia em reexposições semanais, dos grupos salina, 0.25 NTX, EA + salina, EA + 0.25 NTX e EA + 0.5 NTX (Experimento 4).....55

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 MATERIAIS E MÉTODOS	27
2.1 ANIMAIS	27
2.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES	27
2.2.1 Etanol 20%	27
2.2.2 Naltrexona	27
2.3 CONSUMO ORAL POR LIVRE ESCOLHA ENTRE DUAS GARRAFAS (“TWO-BOTTLE CHOICE”)	28
2.4 CÁLCULOS DA QUANTIDADE DE ETANOL CONSUMIDO E DA PREFERÊNCIA POR ETANOL	29
2.5 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL	29
2.6 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	30
2.7 ESTRESSE POR CONTENÇÃO	31
2.8 COLETA DE SANGUE PARA DOSAGEM DO ETANOL	31
2.9 DOSAGEM DE CORTICOSTERONA	32
2.10 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	32
2.10.1 Experimento 1 - Exposição ao enriquecimento ambiental contínuo (24 h/dia)	32
2.10.2 Experimento 2 - Exposição ao enriquecimento ambiental 3 h/dia	33
2.10.3 Experimento 3 - Definição das doses subterapêuticas de naltrexona	33
2.10.4 Experimento 4 - Efeitos do enriquecimento ambiental associado às administrações semanais de doses subterapêuticas de naltrexona	34
2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
3 RESULTADOS	37
3.1 EXPERIMENTOS 1 E 2	37
3.1.1 Consumo de etanol, preferência por etanol e consumo de água durante a fase de aquisição	37
3.1.1.1 <i>Dosagem da concentração de etanol plasmática no final da fase de aquisição</i>	39
3.1.2 Efeito do enriquecimento ambiental, contínuo e de 3 h por dia, no consumo de etanol, preferência e consumo de água em reexposições semanais de 2 h	40
3.1.3 Avaliação dos efeitos do enriquecimento ambiental, contínuo e de 3 h por dia, em 24 horas de consumo e após o estresse de contenção	43
3.1.3.1 <i>Dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona no consumo 24 h após o estresse</i>	46

3.1.4 Efeitos da exposição ao ambiente enriquecido nos parâmetros comportamentais avaliados no labirinto em cruz elevado	46
3.1.4.1 <i>Porcentagem de tempo gasto e número de entradas nos braços abertos</i>	46
3.1.4.2 <i>Porcentagem de tempo gasto e número de entradas nos braços fechados..</i>	47
3.1.4.3 <i>Tempo de latência para entrada no braço aberto.....</i>	48
3.1.4.4 <i>Número total de espreitas</i>	49
3.2 EXPERIMENTO 3.....	50
3.2.1 Consumo de etanol, preferência por etanol e consumo de água durante a fase de aquisição	50
3.2.2 Definição da dose subterapêutica de naltrexona: consumo de etanol, preferência e consumo de água em reexposições semanais de 2 h.....	51
3.3 EXPERIMENTO 4.....	53
3.3.1 Consumo de etanol, preferência por etanol, consumo de água e ração durante a fase de aquisição	53
3.3.2 Efeito do enriquecimento ambiental contínuo associado à administração semanal de doses subterapêuticas de naltrexona no consumo de etanol, preferência, consumo de água e de ração.....	54
4 DISCUSSÃO	57
5 CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

O álcool etílico, ou etanol, é amplamente consumido em todo o mundo e, apesar de sua grande aceitação social, a perda do controle do consumo de bebidas alcoólicas é um problema de saúde pública muito grave. O seu consumo excessivo afeta tanto a própria pessoa, pelo impacto sobre sua saúde, desencadeando doenças como a cirrose hepática, a pancreatite alcoólica, o câncer, a gastrite e outras lesões; quanto a outros indivíduos, devido às ações perigosas de pessoas intoxicadas, como dirigir e se envolver em episódios de violência durante a embriaguez ou pelo consumo durante a gestação, afetando o desenvolvimento embrio-fetal (*World Health Organization* (WHO), 2011). Segundo dados divulgados no *Global status report on alcohol and health* (WHO, 2014), aproximadamente 6% de todas as mortes no mundo, em 2012, foram atribuídas ao uso abusivo do álcool.

O consumo de álcool a longo prazo, dependendo da dose, frequência e circunstâncias, pode provocar um quadro de dependência, uma doença crônica, recidivante e com influências ambientais e individuais significativas (Kreek et al., 2005; Piazza, Le Moal, 1996). A dependência é definida como um conjunto de fenômenos comportamentais, cognitivos e fisiológicos que se desenvolvem após repetida utilização da substância psicoativa e está associada a fatores como: um forte desejo de consumir e buscar a droga; dificuldade no controle da sua utilização, persistindo em seu uso, apesar das consequências prejudiciais; uma maior prioridade dada ao uso da droga em detrimento de outras atividades e obrigações, e um gasto importante de tempo em atividades para obter a substância; consumo em maiores quantidades e por períodos mais longos do que o pretendido; aumento da tolerância, e um estado de abstinência física (*American Psychiatric Association*, 2013).

A dependência ao álcool é considerada um problema de saúde pública de escala mundial, acarretando altos custos para a sociedade e envolvendo questões médicas, psicológicas, profissionais e familiares. No Brasil, um levantamento realizado pela Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD) em 2005, em parceria com o Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas (CEBRID), apontou que 12,3% das pessoas pesquisadas, com idades entre 12 e 65 anos, foram considerados dependentes do álcool e cerca de 75% já beberam pelo menos uma vez na vida. Os dados também indicaram um consumo de álcool em faixas etárias cada vez mais precoces, sugerindo assim a necessidade de revisão tanto nas medidas de prevenção, quanto de

tratamento (Carlini, 2006). Mais recentemente, um outro levantamento realizado pelo SENAD e CEBRID (2010), confirmou essa preocupação, mostrando que o álcool, é uma das drogas psicotrópicas de maior prevalência de uso durante a vida de estudantes do ensino médio e fundamental, em todas as capitais do país.

O etanol é considerado uma droga não-específica, por atuar em sítios de diversos receptores do Sistema Nervoso Central (SNC), modulando seu funcionamento de diferentes maneiras (Vengeliene et al., 2008). Através de uma ligação alostérica, o etanol aumenta a condutância dos canais de cloreto acoplados ao receptor GABA_A, facilitando assim sua atividade inibitória (Mihic, Harris, 1997). Atua também antagonizando os receptores glutamatérgicos NMDA, principalmente os compostos pelas subunidades NR1/NR2A ou NR1/NR2B que são mais sensíveis aos efeitos inibitórios do álcool (Allgaier, 2002; Hoffman et al., 1989; Lovinger et al., 1989). A sedação, ataxia e os efeitos ansiolíticos do álcool são mediadas principalmente através das sinalizações GABAérgicas e glutamatérgicas. Em contraste, nas propriedades reforçadoras do etanol, como a euforia e estimulação psicomotora, acredita-se que estão mais envolvidos sistemas neuroquímicos dos opióides endógenos e da dopamina mesocorticolímbica (Spanagel, 2009).

Sobre os sistemas opioidérgicos, a administração aguda de etanol parece induzir a liberação de β -endorfina e encefalinas (Froehlich, Li, 1994; Olive et al., 2001; Rasmussen et al., 1998), as quais atuam modulando a transmissão do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico ou sistema de recompensa. Esse sistema é constituído por neurônios dopaminérgicos que se projetam da área tegmental ventral (ATV) para o núcleo accumbens (NAc), córtex pré-frontal (CPF), amígdala e hipocampo (Hyman et al., 2006; Nestler, 2001). Estas regiões cerebrais intermedeiam as emoções reconhecidas como gratificantes e prazerosas e estão relacionadas com aspectos da dependência, como os efeitos reforçadores positivos e o desejo compulsivo pela droga, a “fissura” (Kauer, Malenka, 2007; Koob, Le Moal, 2001).

Os mecanismos das drogas de abuso convergem para essa circuitaria e, através de diferentes ações, produzem efeitos comuns, como o aumento na concentração de dopamina no NAc e consequente ativação do sistema de recompensa (Nestler, 2005). Após a administração crônica, as drogas são capazes de causar uma sensibilização nesse sistema, o que pode ser visto como uma resposta homeostática à ativação repetida do sistema pela substância (Nestler, 2005),

ocasionando uma deficiência nos níveis de dopamina no cérebro (Koob, Le Moal, 2001).

A indução da liberação de opióides endógenos pelo etanol, principalmente as β - endorfinas (Marinelli et al., 2003), ativam os receptores μ em interneurônios GABAérgicos, removendo o tônus inibitório sobre a ATV e levando a um aumento da liberação de dopamina no NAc (Froehlich, Li, 1994; Gianoulakis et al., 1996). O bloqueio desses receptores opioidérgicos parece ser o mecanismo de ação de uma das três drogas aprovadas pelo FDA, *Food and Drug Administration*, órgão governamental dos Estados Unidos responsável pelo controle dos medicamentos, para a redução da recaída durante períodos de abstinência (FDA, 2013). A naltrexona, um antagonista de receptor opióide não específico, que se liga nos subtipos μ , κ e δ , é capaz de reduzir o consumo de etanol, provavelmente bloqueando os aumentos induzidos por ele na sinalização dopaminérgica em áreas como o NAc, diminuindo assim o seu efeito reforçador (Froehlich, 1996), e consequentemente reduzindo o desejo pelo consumo (Sinclair, 2001). Esse fármaco também parece diminuir a palatabilidade da solução alcoólica, alterando seu gosto e assim aumentando a resposta aversiva ao etanol (Coonfield et al., 2002; Hill, Kiefer, 1997). Além disso, tratamentos repetidos com a naltrexona em ratos Warsaw High Preferring (WHP) resultaram em um aumento da concentração de β - endorfina no plasma, similar ao aumento observado depois de uma única administração de etanol (Zalewska-Kasubaska et al., 2006).

Estudos em animais mostraram que a naltrexona reduziu o consumo de etanol e a sua preferência. Lê et al. (1993) encontraram uma efetiva redução de mais de 50% no consumo de etanol em camundongos. Um outro estudo mostrou que a naltrexona reduziu a preferência por etanol após a estabilização do consumo em camundongos C57BL/6 (Phillips et al., 1997).

O uso clínico da naltrexona pode ser benéfico na redução do número de episódios de recaída e da quantidade de álcool consumida, além de aumentar o tempo de latência para a primeira recidiva (Kiefer et al., 2003; O'Malley et al., 1996). Entretanto, nem todos os pacientes respondem bem a essa farmacoterapia (Bouza et al., 2004) e além disso a naltrexona, nas doses terapêuticas recomendadas para humanos, causa efeitos adversos frequentemente relatados como náuseas, vômitos, tontura, dores de cabeça, fadigas, sonolência, diminuição do apetite (FDA, 2013), além da toxicidade hepática associada a altas doses do fármaco (Mitchell, 1986), e

dos efeitos colaterais neuropsiquiátricos, incluindo ansiedade, depressão, irritabilidade, nervosismo e insônia (Oncken et al., 2001), o que contribui para uma menor adesão ao tratamento. A naltrexona é uma medicação eficaz para a dependência do álcool (Anton et al., 2006; Volpicelli et al., 1992) e se mostra mais efetiva na redução do consumo quando é combinada com uma terapia cognitiva-comportamental (Anton et al., 1999; O'Malley et al., 1992).

As interações do álcool com diversos neurotransmissores nos circuitos cerebrais de recompensa e também do estresse produzem os efeitos reforçadores do etanol. O reforço é um processo no qual uma resposta ou comportamento é fortalecido com base em experiências anteriores. Os estímulos reforçadores positivos são aceitos como fatores motivacionais importantes no consumo de bebidas alcoólicas nas primeiras fases do abuso de álcool. Por exemplo, as experiências gratificantes, como as sensações de prazer, bem-estar e euforia induzidas pelo álcool, aumentam a probabilidade de reexposições (Gilpin, Koob, 2008). O reforço negativo do álcool refere-se à propriedade de evitar um estado aversivo e é um componente crítico da motivação para o consumo de álcool durante a transição para a dependência, após a descontinuação do uso de álcool, quando ocorrem os sintomas de abstinência. O estado afetivo negativo gerado pela ausência da droga, como disforia, ansiedade e irritabilidade, desencadeiam um forte desejo de buscar e usar a droga novamente, levando a recidiva para prevenir ou aliviar o estado aversivo (Koob, 2003).

Existe a teoria de que os efeitos reforçadores estão associados com as 3 fases da dependência: antecipação, intoxicação e abstinência. A impulsividade predomina nas fases iniciais, e ocorre devido aos efeitos reforçadores positivos da droga. Entretanto, durante a abstinência, ocorre uma procura compulsiva pela droga para aliviar os efeitos reforçadores negativos, e essa busca pode ser iniciada apenas por pistas ambientais relacionadas a essa droga ou, até menos, por situações de estresse. Um estágio interage com o outro, de forma cada vez mais intensa, iniciando um ciclo que leva ao estado patológico (Koob, Volkow, 2010).

Os reforços positivos são frequentemente analisados utilizando modelos animais de autoadministração. Uma das abordagens para o estudo da autoadministração das drogas é o consumo por livre escolha, que permite determinar a ingestão e a preferência pelo álcool de animais. Já as propriedades de reforço negativo do álcool são estudadas durante os períodos de abstinência impostos após exposição crônica ao etanol (Cunningham et al., 2000; Sanchis-Segura, Spanagel,

2006). Existem modelos que utilizam abordagens experimentais de autoadministração associadas a períodos de privação, e tentam assim, mimetizar aspectos diferentes da adição, como o desejo persistente pelo álcool (fissura) e a recaída (Spanagel, 2000; Spanagel, Höltter, 1999), que é o retorno do uso do álcool aos mesmos níveis, ou até a níveis superiores, consumidos antes da abstinência (Marlatt, 1993),

O elevado consumo voluntário de etanol e a sua alta preferência são algumas das características que estão relacionadas a um estado semelhante à dependência (Cox et al., 2013). O consumo excessivo, que reflete a fissura pela droga, exige que os animais superem o sabor aversivo do etanol e bebam quantidades suficientes para alcançarem um estado de intoxicação (Koob, 2000). A ocorrência desse comportamento, como citado acima, pode ser avaliada no modelo de autoadministração por livre escolha, no qual duas garrafas estão disponíveis aos animais, uma com a solução de etanol e a outra com água. Após um período prolongado de acesso livre ou limitado à droga, pode-se seguir uma fase de privação e os animais então, permanecem abstinentes por alguns dias. Em seguida, as soluções contendo a droga são novamente oferecidas. Este procedimento é repetido várias vezes (Sanchis-Segura, Spanagel, 2006; Spanagel, 2000). Caso o consumo de etanol, após um período de abstinência forçado, apresente um acentuado aumento, este é denominado “Efeito de privação do álcool”, em inglês *Alcohol Deprivation Effect* (ADE). Esse efeito parece refletir a transição do uso controlado para o compulsivo e tem sido proposto como um modelo na análise da eficácia de agentes farmacológicos na prevenção de recaída (Heyser et al., 1998; Melendez et al., 2006).

Camundongos da linhagem C57BL/6 são amplamente usados em pesquisas com o álcool por serem geneticamente predispostos a consumirem significativas quantidades de etanol voluntariamente (Crabbe, Phillips, 2004). Isso se deve provavelmente pela sua menor sensibilidade a sabores e/ou cheiros aversivos ou novos quando comparados a outras linhagens (Rhodes et al., 2007). Além disso, alguns trabalhos mostram diferenças bioquímicas, relacionadas com o metabolismo do álcool, entre as linhagens C57BL/6 (alta preferência por álcool) e DBA/2 (baixa preferência por álcool). Os camundongos C57BL/6 metabolizam o etanol mais rapidamente do que os DBA (Schlesinger, 1966). Os resultados são consistentes com a hipótese de que os animais de alta preferência bebem mais álcool porque menos acetaldeído, um metabólito tóxico do álcool, se acumula no sangue. O teor de álcool-desidrogenase do fígado dos camundongos C57BL/6 aumentaram significativamente

após o consumo forçado de 10% de etanol, mas outras enzimas do fígado mantiveram-se inalteradas. É possível que o fenótipo deste comportamento possa ser explicado por uma combinação de bioquímica e teoria de reforço. Os camundongos C57BL/6J apresentam menor concentração e menor “turnover” de dopamina nos terminais de neurônios dopaminérgicos mesoestriatais, comparados com os camundongos DBA/2J. Estes dados sugerem que uma função hipodopaminérgica nestas vias, determinada geneticamente, desempenha um papel importante na predisposição para maior consumo voluntário de etanol (George et al., 1995).

A ingestão voluntária de álcool e a vulnerabilidade ao abuso dessa droga, depende de fatores genéticos e também pode ser influenciada por fatores ambientais (Cloninger, 1987). As condições ambientais podem influenciar as alterações comportamentais e neuroquímicas das drogas de abuso (Goeders, 2002; Lu et al., 2003).

Um ambiente com condições ambientais positivas, como o propiciado pelo modelo do enriquecimento ambiental (EA), é formado por combinações de estimulações físicas e sociais. Modificações estruturais no ambiente, com a inclusão de recursos que permitem o exercício voluntário, brincadeiras e exploração do ambiente, visam melhorar as funções sensoriais, cognitivas e motoras dos animais (Nithianantharajah, Hannan, 2006; Simpson, Kelly, 2011). Para o funcionamento do modelo, é de fundamental importância a troca de posição dos objetos e da ração, o que favorece a aprendizagem e a formação de novos mapas espaciais (Nithianantharajah, Hannan, 2006, van Praag et al., 2000), e também é necessária a substituição desses objetos para estimular o comportamento exploratório, curiosidade e a atenção (Sale et al., 2014).

Diversos estudos mostram efeitos benéficos do EA sobre o cérebro em níveis anatômicos, incluindo aumento na ramificação dendrítica e da densidade sináptica em várias estruturas cerebrais (Mora et al., 2007), além da capacidade de aumentar a neurogênese hipocampal (Kempermann et al., 1997) e reduzir a morte neuronal por apoptose (Young et al., 1999). O EA também é capaz de modificar o comportamento em tarefas que envolvem complexa função cognitiva, melhorando o aprendizado e a memória. Sugere-se que essa melhora ocorra devido às alterações nos níveis de fatores neurotróficos, especialmente do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) no hipocampo (Simpson, Kelly, 2011). Esses resultados positivos de melhora na capacidade cognitiva fornecem novos conhecimentos sobre os mecanismos da

neuroplasticidade causados pelas alterações ambientais e sua relevância para as doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, e para o envelhecimento (van Praag et al., 2000, Nithianantharajah, Hannan, 2006), como uma possível estratégia terapêutica.

Além dessas alterações, estudos mostram que EA também pode causar mudanças neuroanatômicas e neuroquímicas no sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (Bezard et al., 2003; Solinas et al., 2008a), como a diminuição da expressão do transportador de dopamina no córtex pré-frontal medial em ratos (Zhu et al., 2005). Já no sistema opioidérgico, o EA parece promover um aumento da sinalização, elevando por exemplo níveis de expressão cerebral do gene PDYN (Lee et al., 2013), que codifica uma molécula precursora de peptídeos opióides endógenos, como a β - neoendorfina, dinorfina, leu-encefalina e leumorfina (Horikawa et al., 1983), e também a expressão do polipeptídeo POMC (pró-opiomelanocortina), precursora da β - endorfina (Hadley, Haskell-Luevano, 1999), na hipófise de camundongos privados do álcool (Pang et al., 2013). Entretanto, já foi mostrado que ratos criados em EA não apresentaram diferença na densidade de receptores μ em regiões como ATV e NAc (Bardo et al., 1997)

Embora os mecanismos pelos quais o EA atua na dependência não estejam completamente esclarecidos, acredita-se que ele é capaz de alterar comportamentos como a procura por novidades, a impulsividade e o comportamento tipo ansioso, fatores que facilitam o início e continuação do consumo das drogas (Stairs, Bardo, 2009).

Estudos sugerem que o EA reduz os efeitos reforçadores de drogas psicoativas, como cocaína (Solinas et al., 2008a), anfetamina (Bardo et al., 2001), nicotina (Green et al., 2003) e heroína (El Rawas et al., 2009). No estudo realizado por Solinas e colaboradores (2008a), camundongos que viveram em um ambiente enriquecido desde o desmame até a idade adulta não apresentaram preferência condicionada por lugar causada pela cocaína, mostrando uma redução dos efeitos reforçadores da droga. A preferência condicionada por lugar, em inglês *Conditioned Place Preference* (CPP), é um método de condicionamento pavloviano no qual um conjunto de pistas ambientais é pareado com a droga e então a preferência por esse ambiente é usada para medir seus efeitos recompensadores (Grolewski et al., 2008). O mesmo modelo foi utilizado em um estudo realizado por Thiriet et al. (2011),

entretanto este mostrou que camundongos criados em ambientes enriquecidos não reduziram a preferência condicionada por lugar à metanfetamina.

Deehan et al. (2011) demonstraram que a exposição de ratos a um ambiente enriquecido, imediatamente após o desmame, reduziu o consumo, a preferência e a motivação para a obtenção de etanol, em um modelo de autoadministração operante. Este modelo, diferente da autoadministração por livre escolha entre as garrafas, permite avaliar não somente a preferência, mas também o trabalho que o animal realiza para obter a droga (Sanchis-Segura, Spanagel, 2006). Um outro trabalho mostrou que ratas, de uma linhagem espontaneamente hipertensa, criadas em ambiente enriquecido consumiram menos etanol e apresentaram menor preferência condicionada por lugar (de Carvalho et al., 2010). Entretanto, Rockman e colaboradores (1989) encontraram um aumento no consumo voluntário de etanol em ratos criados no EA.

Apesar de algumas controvérsias, a maioria desses trabalhos sugere que indivíduos expostos a ambientes enriquecidos, antes de um contato prévio com a droga, possuem menor vulnerabilidade à dependência, ressaltando, dessa maneira, a importância de proporcionar ambientes positivos durante períodos do desenvolvimento. No entanto, talvez a maneira como ocorra essa exposição pode desencadear efeitos protetores ou não em relação ao consumo de drogas. Existe uma grande variabilidade nos protocolos de enriquecimento utilizado por diferentes pesquisadores. Os tipos de objetos utilizados, idade dos animais no início do enriquecimento, o tempo de duração do experimento, os tipos de controles utilizados, as linhagens utilizadas, entre outros aspectos, variam entre os experimentos (Simpson, Kelly, 2011).

Um estudo no nosso laboratório demonstrou que o EA foi capaz de prevenir e também reverter a sensibilização comportamental induzida pelo etanol (Rueda et al., 2012), um fenômeno de hiperatividade locomotora causada pela administração repetida da droga (Wise, Bozarth, 1987). No entanto, dados na literatura sobre exposição ao ambiente enriquecido após a administração das drogas são escassos. Isso poderia mostrar se esse novo ambiente seria capaz de alterar os efeitos reforçadores das drogas, mesmo após o estabelecimento de comportamentos relacionados a dependência. Solinas e colaboradores (2008b), por exemplo, mostraram que a exposição ao EA durante o período de abstinência, atenuou comportamentos como a sensibilização e preferência condicionada por lugar da

cocaína em camundongos, e sugeriram que a estimulação ambiental pode ser um fator importante no tratamento a longo prazo da dependência.

Outro estudo interessante realizado por Nader et al. (2012) mostrou que a interrupção do EA levou a um aumento nos efeitos de recompensa da cocaína, medidos através da CPP, em comparação com ratos que nunca foram expostos ao EA. Assim, privar os camundongos de um ambiente positivo, aumentou a vulnerabilidade ao consumo de cocaína. Os pesquisadores acreditam que esse aumento tenha sido uma consequência do estresse emocional negativo causado pela mudança de um ambiente enriquecido para o alojamento padrão.

Se condições positivas sugerem reduzir os efeitos reforçadores de drogas, por outro lado, uma manipulação ambiental que proporciona condições negativas aos animais de laboratório, como a exposição a situações de estresse, parece aumentar os efeitos de reforço das drogas e desempenhar um papel importante na determinação da vulnerabilidade para desenvolvimento da dependência (Goeders, 2002).

Em modelos animais, a exposição crônica a estresse físico e psicológico, como choque na pata e isolamento social, podem aumentar a autoadministração de cocaína e anfetamina (Goeders, Guerin, 1994; Kosten et al., 2000; Piazza et al., 1990). Além disso, a exposição repetida ao nado forçado aumentou a preferência condicionada por lugar da cocaína, mostrando uma maior propriedade reforçadora da droga (McLaughlin et al., 2003). Vengeliene et al. (2003) mostraram que o consumo de etanol em ratos aumentou após repetidas exposições a eventos estressores.

Muitos estudos têm demonstrado que a exposição a eventos estressantes também podem restabelecer comportamento extintos de procura de droga em animais. O estresse agudo por imobilização, por exemplo, produziu restabelecimento do comportamento de preferência condicionada por lugar induzida pela cocaína (Sanchez et al., 2003), morfina (del Rosario Capriles, Cancela, 2002) e pela anfetamina (Capriles, Cancela, 1999). Os resultados de um outro estudo demonstraram que a exposição a choques elétricos nas patas, apenas antes dos testes, restabeleceu o comportamento de busca pelo álcool, que estava extinto (Lê et al., 1998). Dessa maneira, o estresse, assim como o enriquecimento ambiental, é um fator que pode influenciar a iniciação e continuação do consumo da droga.

O estresse pode ser definido como uma resposta adaptativa fisiológica, frente a situações adversas, que visa adaptar o indivíduo à nova situação e manter a sua

homeostase (Pacak, Palkovits, 2001; Selye, 1956). Situações estressantes desencadeiam a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), através do fator liberador de corticotrofina (CRF) produzido no núcleo paraventricular do hipotálamo. O CRF, através da sua ligação nos receptores CRF1, controla a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), um outro peptídeo derivado da clivagem da POMC, na hipófise anterior (glândula pituitária), que por sua vez, regula a síntese e secreção de hormônios glicocorticoides, como a corticosterona em roedores, pelo córtex da adrenal (Herman, Cullinan 1997). Os glicocorticoides, então, interagem com seus receptores nos tecidos - alvo e são responsáveis pelo *feedback* negativo de liberação de ACTH e CRF (Aron et al., 2007; Goeders, 2002).

A relação entre o consumo de álcool e a exposição a fatores estressantes, em humanos e animais de laboratório, é complexa. O álcool é conhecido por possuir um efeito ansiolítico e, portanto, sugere-se que em alguns indivíduos o comportamento de beber seja uma tentativa de aliviar a tensão (Pohorecky, 1990; Vengeliene et al., 2003). Entretanto, por outro lado, o álcool é capaz de ativar o eixo HPA e também sistemas extra-hipotalâmicos do estresse e, deste modo, pode servir por si só como um estressor (Richardson et al., 2008). Diante dessa relação, não há um consenso claro sobre as circunstâncias e o modo em que o estresse influencia o consumo (Becker et al., 2011).

Existem diversos trabalhos com modelos animais que possuem resultados contraditórios, com evidências de que o estresse aumenta, diminui, ou não altera a ingestão de álcool (revisado em Becker et al., 2011). Já em estudos epidemiológicos, pesquisadores tem demonstrado que indivíduos com maiores níveis de estresse apresentam também maiores níveis de consumo do álcool (Keyes et al., 2012).

Adicionada a essa complexidade, até mesmo durante a transição da administração aguda das drogas de abuso para a crônica são observadas mudanças progressivas no eixo HPA. Pesquisas recentes levam à hipótese de que a transição para a dependência do álcool envolve a desregulação não só dos circuitos neurais envolvidos na recompensa, mas também de circuitos que medeiam respostas comportamentais a eventos estressores (Vendruscolo et al., 2012). A desregulação do eixo HPA e, principalmente, as alterações na atividade de sistemas de estresse extra-hipotalâmicos, após consumo crônico e retirada, influenciam significativamente a motivação para autoadministração do álcool (Koob, Kreek, 2007; Koob, Le Moal, 2001). Evidências indicam que a via do sistema de recompensa dopaminérgico

também é sensível ao estresse, o qual pode facilitar a atividade nos circuitos motivacionais (Piazza, Le Moal, 1998).

Em geral, os estudos no sistema CRF sugerem que o desenvolvimento de dependência ao álcool, em particular depois de repetidos ciclos de exposição ao álcool e retirada, está associado com o aumento da ansiedade e aumento da sensibilidade ao estresse nos animais. Estas alterações parecem ser resultado, pelo menos em parte, do aumento da liberação de CRF e da quantidade de receptores CRF1 na amígdala, estrutura importante para o comportamento emocional. As mudanças nesse sistema são na teoria, responsáveis pela mudança na motivação para o consumo de álcool (Gilpin, Koob, 2008). Estudos que comprovam essa hipótese mostram que características associadas a dependência, como o comportamento tipo ansioso (Rassnick et al., 1993) e o alto consumo de etanol (Funk et al., 2006), são suprimidas quando antagonistas de CRF são injetados diretamente no núcleo central da amígdala. Esses trabalhos mostram um importante papel do sistema CRF extra-hipotalâmico em mediar efeitos tipo ansiosos durante a abstinência e o aumento da ingestão da droga associado a dependência. Sztainberg et al. (2010) já mostraram que o EA promoveu uma diminuição da expressão de mRNA dos receptores CRF1 na amígdala basolateral.

Os efeitos do EA na resposta ao estresse não são totalmente compreendidos. O próprio EA pode ser considerado um estressor positivo, um “*eustress*” (Lehmann, Herkenham, 2011). A introdução repetida de novos objetos e a oportunidade de explorá-los é comparável a leves exposições repetidas a fatores estressantes (Larsson et al., 2002). Esse estresse pode ajudar o animal a lidar melhor com situações mais aversivas (Segovia et al. 2009). Evidências indicam que o EA pode proteger ou até mesmo reverter o efeito negativo causado por um estresse. Um estudo realizado por Lehmann e Herkenham (2011), por exemplo, mostrou que o EA conferiu resiliência aos efeitos do estresse crônico causado por derrota social.

Alguns trabalhos têm demonstrado que as respostas comportamentais e endócrinas, mediadas pelo eixo HPA, evocadas pelo estresse, podem ser atenuadas pelo enriquecimento ambiental (Fernández - Teruel et al., 2002; Fox et al., 2006). Do ponto de vista comportamental, o EA parece ser capaz de produzir efeitos opostos aos do estresse, como a diminuição do comportamento tipo ansioso (de Kloet et al., 2005; Sztainberg et al., 2010). Francis e colaboradores (2002) demonstraram que a exposição a um ambiente enriquecido foi capaz de reverter os efeitos ansiogênicos

da separação materna, causando uma redução nos níveis de corticosterona plasmática e um aumento nos comportamentos exploratórios e de alimentação, sugerindo que o EA, durante a fase de desenvolvimento, parece atenuar as consequências negativas de eventos estressantes. No contexto da dependência, um estudo realizado por Chauvet et al. (2009) mostrou que os ratos alojados em EA durante períodos de privação da droga reduziram o restabelecimento da autoadministração da cocaína induzido por um estressor farmacológico. Esse trabalho sugere um efeito favorável do ambiente enriquecido em facilitar a abstinência após um evento estressante, considerado um potente desencadeador de recaídas (Epstein et al., 2009).

Como mostrado no trabalho de Francis et al. (2002), sugere-se que o EA é capaz de diminuir a ativação do eixo HPA em resposta a estressores, a qual é medida através dos níveis plasmáticos de corticosterona, um resultado mostrado também em outros estudos (Darnaudery, Maccari, 2008; Morley-Fletcher *et al.*, 2003; Welberg *et al.*, 2006). Entretanto, alguns pesquisadores discordam sobre o efeito da EA na função do eixo HPA. Por exemplo, Schrijver *et al.* (2002) também mostraram que nos grupos de animais enriquecidos ocorreu uma diminuição dos níveis de corticosterona liberados após exposição a eventos estressante, enquanto outros estudos mostraram um aumento (Marashi et al., 2003) ou nenhuma alteração (Roy et al., 2001) nos níveis da corticosterona.

O estudo da interação entre os fatores ambientais e a dependência se mostra relevante, e diante de todos os possíveis benefícios do enriquecimento ambiental nesse contexto, como efeitos protetores e até mesmo de atenuação de comportamentos relacionados à dependência, no presente trabalho avaliamos se a exposição a uma condição ambiental positiva, durante o período de privação, foi capaz de reduzir o consumo de etanol, já estabelecido previamente em camundongos C57BL/6. O comportamento tipo ansioso durante um período de privação e o consumo de etanol desses animais após um estresse agudo por contenção também foram avaliados.

Ainda, sabendo-se que a terapia não - farmacológica pode ser uma ferramenta importante na cessação do consumo de drogas, atuando como um tratamento de suporte ao farmacológico ou até mesmo alternativo, neste trabalho verificamos se a associação da naltrexona em baixas doses com o EA apresentaria um efeito sinérgico, acarretando uma diminuição no consumo de etanol reapresentado após períodos de

abstinência, com a vantagem da administração do antagonista em doses com menores efeitos colaterais. Para isso, foi necessária a definição das doses subterapêuticas no nosso modelo de consumo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram usados no total 113 camundongos machos C57BL/6, com idades entre 65 e 75 dias, fornecidos pelo Biotério de Camundongos do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas. Os animais foram alojados em grupo em gaiolas de polycarbonato (42 cm x 28 cm x 21,5 cm), com alimento e água *ad libitum*, na sala experimental de ciclo invertido. A sala possuía condições controladas de temperatura (21 ± 2 °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo as luzes apagadas às 9 h). Os animais foram levados para esta sala duas semanas antes do início das sessões de consumo, para adaptação. Luzes vermelhas foram utilizadas para lidar com os animais durante a fase escura. Todos os procedimentos de cuidados, manutenção e tratamento foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo, protocolo registrado sob nº 143.

2.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES

2.2.1 Etanol 20%

A solução disponível para consumo de etanol foi preparada a 20% (v/v), com água da torneira, a partir de etanol 95% (Labsynth®, Diadema, SP, Brasil).

2.2.2 Naltrexona

Cloridrato de naltrexona (Tocris Bioscience, Bristol, BS, UK) foi diluído em salina 0,9% e foi administrado via intraperitoneal (i.p.) em um volume de 10 ml/kg (Tarragón et al., 2012). A naltrexona foi administrada nas doses 0,25, 0,5, 1,0 e 4,0 mg/kg, que foram escolhidas baseadas na literatura de consumo de etanol por camundongos C57BL/6 (Kamdar et al., 2007; Middaugh, Bandy, 2000; Tarragón et al., 2012).

2.3 CONSUMO ORAL POR LIVRE ESCOLHA ENTRE DUAS GARRAFAS (“TWO-BOTTLE CHOICE”)

O consumo oral por livre escolha deste trabalho foi baseado no paradigma “*Drinking in the Dark*” (DID). A fim de alcançar um maior consumo voluntário de etanol, o experimento foi realizado durante a fase escura do ciclo circadiano, período em que os animais apresentam maior atividade (Gill et al., 1986). Estudos anteriores mostraram que a ingestão voluntária de etanol por C57BL/6 é mais elevada durante a fase escura do ciclo circadiano e que o pico de consumo de fluido ocorre aproximadamente a 3 h após o início do período escuro (Goldstein, Kakihana, 1977; Rhodes et al., 2005). Esse modelo foi utilizado por ser capaz de elevar a concentração sanguínea de etanol a níveis farmacologicamente significativos, acima de 1,0 mg/ml em apenas 2 h. Entretanto, esses níveis sanguíneos de etanol são alcançados em protocolos do DID que apresentam privação de água durante o consumo (Rhodes et al., 2005). Com a garrafa de água disponível, a concentração sanguínea de etanol diminui aproximadamente 40% (Rhodes et al., 2007). No modelo utilizado neste trabalho, os animais tiveram acesso a água e foi utilizada a estratégia de apresentar o álcool de forma intermitente para aumentar voluntariamente o consumo (Khisti et al., 2006) e alcançar níveis plasmáticos significativos. Dessa maneira, não ocorreu a privação de água e assim a sede não foi considerada um possível fator motivacional que impulsionasse o consumo de etanol.

Durante o período de consumo, os animais foram isolados antes do início do período escuro do ciclo e foram expostos a duas garrafas de 30 ml, uma contendo etanol a 20% e outra, água da torneira, 3 h após as luzes se apagarem. As soluções foram trocadas diariamente. As posições das garrafas foram alternadas ao longo do experimento para evitar o viés de preferência por local.

Após 2 h de consumo, as garrafas foram retiradas. Todas as garrafas foram pesadas antes e imediatamente depois das sessões de consumo. As diferenças nos pesos das garrafas foram convertidas em volumes ingeridos através das densidades da solução de etanol e da água. O volume de etanol ingerido foi então convertido em gramas de etanol/kg de peso do animal/2 h.

Logo após o consumo, os camundongos foram alojados novamente em grupo, permanecendo aproximadamente 5 h por dia em gaiolas individuais (3 h de isolamento e 2 h de consumo voluntário).

Em todos os testes de consumo foi colocada uma gaiola com duas garrafas controles para estimar o derramamento de líquido devido à manipulação ou evaporação. Um maior vazamento foi evitado, utilizando um bico com duas esferas e deixando apenas 2 cm do bico para fora da rolha, impossibilitando assim que os animais conseguissem subir nos bicos.

2.4 CÁLCULOS DA QUANTIDADE DE ETANOL CONSUMIDO E DA PREFERÊNCIA POR ETANOL

O consumo de etanol em gramas por quilograma de peso corporal do animal foi calculado aplicando-se a fórmula abaixo. A densidade e a concentração da solução de etanol foram usadas para calcular o coeficiente 0,16.

$$C_{EtOH} = (V_{EtOH} \times 0,16) / p \times 1000$$

C_{EtOH} = consumo de etanol em g/kg do animal.

V_{EtOH} = volume de etanol consumido (ml).

p = peso do animal (g). Os animais foram pesados 3 vezes por semana.

A preferência (P), proporção entre a ingestão de álcool e a ingestão total de fluidos, foi calculada pela seguinte fórmula:

$$P = V_{EtOH} / (V_{EtOH} + V_{\text{água}})$$

V_{EtOH} = volume de etanol consumido (ml).

$V_{\text{água}}$ = volume de água consumido (ml).

2.5 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL

O enriquecimento ambiental (EA) é constituído por objetos adicionados nas caixas dos animais desse grupo, como tubos de plástico, rodas de exercício, rampas, escadas, bolas e casas (Figura 1). Esses materiais foram substituídos ou trocados de posição 3 vezes por semana, para manter a novidade no ambiente. É importante salientar que o exercício também era voluntário e faz parte do rol de estímulos físicos.

Figura 1 - Animais alojados em ambientes enriquecidos.

2.6 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um dos principais modelos usados no estudo de comportamento do tipo ansiedade. Esse aparelho apresenta quatro braços, dois abertos (33,5 cm de comprimento x 7 cm de largura), margeados por um anteparo de 0,5 cm de altura para evitar a queda dos animais, e dois fechados por paredes (33,5 cm de comprimento x 7 cm de largura, com paredes de 20 cm de altura). O aparato foi colocado a 50 cm do chão em uma sala com iluminação adequada e com um sistema de câmera para filmar o comportamento do animal. Na interseção entre os braços fechados e abertos há uma plataforma central medindo 13,5 x 10 cm, onde o animal foi colocado no início do teste com a cabeça voltada para o braço aberto oposto do qual se localizava o experimentador. O animal foi avaliado por 5 minutos e após esse período, foi retirado do aparato e devolvido a sua caixa. Antes de ser realizado o teste com o animal seguinte, o labirinto foi limpo usando álcool 5%. Esse teste foi realizado no período das 12:00 às 15:30 h, período escuro do ciclo.

Os parâmetros comportamentais avaliados incluíram: porcentagem de tempo gasto nos braços abertos e nos braços fechados em relação ao tempo total de teste,

o número de entradas nos braços abertos e fechados separadamente, tempo de latência para a entrada nos braços abertos e número total de espreitas.

Só foi considerado uma entrada, quando o animal introduziu as quatro patas no braço. O comportamento de espreita foi observado quando o camundongo, da plataforma central, esticava-se para o braço aberto sem retirar as patas traseiras do lugar e retornava para a posição inicial (Carobrez, Bertoglio, 2005). Esse evento é considerado um comportamento de avaliação de risco, que promove informação, confirmação e identificação do perigo pelo animal (Espejo, 1997).

Um animal considerado mais “ansioso” entra menos e permanece menos tempo nos braços abertos do aparato. Esses parâmetros são considerados os índices primários de “ansiedade” no LCE (Lister, 1987). Um aumento na latência para a entrada no braço aberto e na frequência de espreitas também caracterizam maiores índices do comportamento tipo ansioso. Já a frequência de entrada nos braços fechados é utilizada como índice de atividade locomotora/ exploratória do animal (Rodgers et al., 1995).

Um fator importante nesse modelo é a novidade do ambiente, portanto trata-se de uma medida única e por isso foi realizada apenas uma sessão (Dawson, Tricklebank, 1995).

2.7 ESTRESSE POR CONTENÇÃO

Antes do último consumo, nos experimentos 1 e 2 (descritos abaixo no item 2.10), os animais foram contidos por 1 h em tubos de polipropileno com 3 cm de diâmetro e 11,5 cm de comprimento. Esses tubos possuíam pequenos furos em toda sua extensão para permitir a respiração do animal.

2.8 COLETA DE SANGUE PARA DOSAGEM DO ETANOL

Amostras de sangue de aproximadamente 20 µl foram coletadas da veia submandibular utilizando uma lanceta de 4.0 mm (Golde et al., 2005) logo após as últimas sessões de consumo da fase de aquisição dos experimentos. O sangue foi coletado em um tubo com heparina e em seguida, centrifugado por 15 minutos a 2000 x g à 4 °C, para separar o plasma, que foi armazenado a - 20 °C até o momento da dosagem.

A dosagem do etanol foi realizada através de um ensaio enzimático realizado pelo Analox[®] (Analox Instruments, Lunenburg, MA, EUA). Esse ensaio se baseia na conversão, pela álcool desidrogenase, de etanol em acetaldeído. A quantidade de substrato inicialmente presente na amostra é diretamente proporcional a quantidade de oxigênio consumida nessa conversão.

2.9 DOSAGEM DE CORTICOSTERONA

A coleta de sangue do tronco foi realizada após a eutanásia, nos experimentos 1 e 2 (descritos abaixo no item 2.10), para posterior quantificação de corticosterona plasmática. Foram recolhidos aproximadamente 0,5 ml de sangue em tubos heparinizados. As amostras foram centrifugadas a 2000 x g à 4 °C. por 15 minutos para separação do plasma que foi armazenado a - 20 °C.

A dosagem de corticosterona plasmática, o parâmetro utilizado para avaliação de um possível efeito do EA no eixo HPA, foi realizada por meio da técnica de EIA (*Enzyme immunoassay*) com o *Corticosterone EIA Kit* (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA). As dosagens foram feitas em duplicata, foi obtida a absorbância média e a partir da curva padrão obteve-se a concentração de corticosterona das amostras.

2.10 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os delineamentos dos quatro experimentos estão ilustrados na figura 2.

2.10.1 Experimento 1 - Exposição ao enriquecimento ambiental contínuo (24 h/dia)

Vinte e um animais foram submetidos ao procedimento de livre escolha entre duas garrafas por 15 dias não contínuos para estabilização do consumo. Esse período inicial, chamado de fase de aquisição, apresentou três períodos curtos de privação do etanol (2 dias), na tentativa de aumentar o consumo. Após a fase de aquisição, os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos, um exposto a ambientes enriquecidos, grupo EA - 24h (n = 11), e o outro em alojamentos padrões, grupo CT (n = 10), e foram privados de etanol por 6 dias. Depois desse período de abstinência, os animais tiveram acesso limitado ao etanol 20% por apenas 2 horas. Este procedimento de abstinência seguido por reexposição semanal ao etanol foi realizado

durante 4 semanas. No 5º período de abstinência, os animais foram expostos a um teste do Labirinto em Cruz Elevado.

Nas reexposições das semanas 5 e 6, os camundongos receberam 24 horas de livre acesso ao etanol ao invés de 2 horas. Entretanto, o consumo foi medido após as 2 h e ao término das 24 h de exposição às duas garrafas (álcool e água). Na 6ª semana, 1 h antes do consumo, os animais foram submetidos ao estresse de contenção. Após o último consumo de 24 h, eles foram eutanasiados por deslocamento cervical e o sangue do tronco foi coletado. Porém, esses dados foram perdidos porque o sangue coagulou.

2.10.2 Experimento 2 - Exposição ao enriquecimento ambiental 3 h/dia

Vinte animais foram submetidos aos mesmos procedimentos citados anteriormente. O grupo EA - 3h (n = 10) foi exposto ao ambiente enriquecido apenas 3 horas por dia. Os brinquedos foram colocados imediatamente após as luzes se apagarem (9:00 h) e retirados depois de 3 horas (12:00 h). As caixas do grupo CT (n = 10) também foram manipuladas.

O experimento 2 durou quatro semanas ao invés de seis semanas como no experimento 1, por não termos observado diferença significativa entre os grupos experimentais. Nas reexposições 3 e 4, o consumo foi medido duas vezes, 2 h e 24 h após o início do consumo.

Na 4ª semana, foi realizado o estresse de contenção durante 1 h e logo em seguida iniciou-se o consumo. Após o consumo de 24 h, os animais foram eutanasiados e o sangue do tronco foi coletado.

2.10.3 Experimento 3 - Definição das doses subterapêuticas de naltrexona

Vinte e dois animais foram submetidos ao procedimento de livre escolha entre duas garrafas por 15 dias, a fase de aquisição, para estabilização do consumo. Após a fase de aquisição, os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: salina (n = 5), 0.5 NTX (n = 6), 1.0 NTX (n = 6) e 4.0 NTX (n = 5), que receberam injeções i.p. de salina, 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg e 4,0 mg/kg de naltrexona, respectivamente, 30 minutos antes das reexposições semanais de 2 horas. O consumo de ração também foi avaliado durante esse período de reapresentação ao

etanol. As doses de naltrexona foram escolhidas com base em artigos que mostraram que a menor dose utilizada não produziu um efeito robusto na diminuição de consumo de álcool em camundongos (Kamdar et al., 2006; Tarragón et al., 2012)

Ao todo, foram realizadas quatro reexposições. Após o último consumo, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

2.10.4 Experimento 4 - Efeitos do enriquecimento ambiental associado às administrações semanais de doses subterapêuticas de naltrexona

Cinquenta animais foram submetidos ao procedimento de livre escolha por 15 dias. Após o 15º dia da fase de aquisição, os animais foram privados do consumo de etanol por 6 dias e separados em cinco grupos: dois alojados em gaiolas padrões e que receberam salina ou 0,25 mg/kg de naltrexona (grupos salina e 0.25 NTX, respectivamente), e três mantidos em ambientes enriquecidos e que receberam salina, 0,25 mg/kg ou 0,5 mg/kg de naltrexona (grupos EA + salina, EA + 0.25 NTX e EA + 0.5 NTX, respectivamente). Todos os grupos foram formados por 10 animais. As doses subterapêuticas de naltrexona utilizadas nesse experimento (0,25 e 0,5 mg/kg), foram baseadas nos resultados do consumo de etanol do experimento 3.

As injeções de salina ou naltrexona foram administradas 30 minutos antes do consumo de 2 h. Foram realizadas quatro semanas de reexposições. Nesse experimento, além do consumo de etanol e água, a quantidade de alimento consumida pelos animais foi avaliada durante todo o experimento, sendo medida na fase de aquisição e nas reexposições. Após o último consumo, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical

Experimento 1

Experimento 2

Experimento 3

Experimento 4

Figura 2 - Delineamento dos experimentos.

2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística do consumo de etanol, da preferência e do consumo de água durante a fase de aquisição foram utilizadas ANOVAs de uma via para medidas repetidas. Após a divisão dos grupos, na análise dos dados das reexposições, foram utilizadas ANOVAs de duas vias para medidas repetidas e, sempre que encontradas diferenças significativas, foram realizados testes *post hoc* de Newman-Keuls. Para evitar um possível efeito de diferenças no comportamento basal entre os grupos experimentais, os dados de consumo de etanol das reexposições foram transformados em porcentagem em relação à média dos últimos cinco dias da fase de aquisição.

Na análise dos parâmetros observados no LCE foi realizado um teste t-*Student*. Para dados não normais foi utilizado o teste não paramétrico U de Mann-Whitney.

Correlações entre as variáveis consumo de etanol e concentrações do etanol no plasma, medidas no mesmo animal, foram analisadas por regressão linear simples.

Em todas as comparações realizadas, o valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo e os dados representam média $\pm$ erro padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa STATISTICA 7.0.

3 RESULTADOS

3.1 EXPERIMENTOS 1 E 2

3.1.1 Consumo de etanol, preferência por etanol e consumo de água durante a fase de aquisição

Uma ANOVA de uma via para medidas repetidas, seguida de um teste *post hoc*, foi realizada para a análise dos dados obtidos no consumo de etanol, preferência e consumo de água durante a fase de aquisição, nos dois experimentos.

Em relação ao experimento 1, o consumo de etanol (Figura 3A₁), apresentou uma diferença significativa no fator dia [$F_{(14,280)} = 11,05$; $p < 0,01$]. O teste de Newman-Keuls mostrou que no 4º dia de exposição à solução de etanol, logo após dois primeiros dias de abstinência, ocorreu um aumento significativo do consumo. Esse consumo maior se manteve até o 15º dia. Não houve diferença na ingestão dos últimos cinco dias, mostrando uma estabilização do consumo. Em relação à preferência por etanol, também existem diferenças entre os dias [$F_{(14,280)} = 13,99$; $p < 0,01$], com menor preferência detectada no 1º dia da fase de aquisição, em relação aos dias seguintes (Figura 3B₁). No consumo de água, o 1º dia também apresentou diferença significativa dos demais [$F_{(14,280)} = 7,21$; $p < 0,01$] (Figura 3C₁).

No experimento 2, foi detectada uma diferença significativa entre os dias [$F_{(14,266)} = 3,13$; $p < 0,01$] no consumo de etanol. A análise *post hoc* mostrou que no 4º dia, após o primeiro período de abstinência, o consumo foi maior que nos demais. Não há diferença na ingestão dos cinco últimos dias (Figura 3A₂). Em relação à preferência por etanol (Figura 3B₂) e ao consumo de água (Figura 3C₂), existem diferenças entre alguns dias [$F_{(14,266)} = 2,42$; $p < 0,01$ e $F_{(14,266)} = 3,43$; $p < 0,01$, respectivamente], entretanto não ocorreram diferenças significativas logo após o primeiro período de abstinência. Os últimos cinco dias também não apresentaram diferença.

Nos dois experimentos, a quantidade de etanol consumida nos últimos cinco dias se manteve constante e foi usada para calcular as médias da fase de aquisição dos grupos CT e EA.

Figura 3 - Consumo de etanol (A), preferência por etanol (B) e volume de água consumido (C) nos experimentos 1 (lado esquerdo da figura) e 2 (lado direito da figura) em 2 h por dia durante a fase de aquisição. Cada espaço no gráfico (maior intervalo entre dois números do eixo das abscissas) corresponde aos 2 dias de abstinência. Ao todo, foram 3 períodos de abstinência durante a fase de aquisição. * $p < 0,01$ em relação aos dias 1, 2 e 3; # $p < 0,01$ em relação a todos os outros dias; + $p < 0,01$ em relação aos dias 9,10 e 11.

3.1.1.1 Dosagem da concentração de etanol plasmática no final da fase de aquisição

Apenas a concentração de etanol no plasma dos animais do experimento 1 foi dosada. Dos 21 animais, foram analisadas 15 amostras, devido a quantidade insuficiente de plasma coletado de 6 animais. Os resultados mostraram que as concentrações plasmáticas de etanol alcançaram níveis superiores a 1 mg/ml, mesmo com a presença da garrafa de água (Tabela 1).

Tabela 1 - Média da quantidade de etanol consumida (g/kg) e da concentração do etanol no plasma (mg/ml) dos animais no último dia da fase de aquisição.

Etanol consumido (g/kg)	Concentração de etanol no plasma (mg/ml)
3,41 (± 0,47)	1,79 (± 0,10)

O erro padrão está entre parênteses. n = 15

A figura 4 mostra o consumo de etanol (g/kg) como um significativo preditor linear da concentração de etanol no plasma ($r^2 = 0,41$; n = 15; $p < 0,01$).

Figura 4 - Relação linear entre a quantidade de etanol consumido e a concentração no plasma imediatamente após 2 h de acesso ao etanol no último dia da fase de aquisição do experimento 1. Consumo de etanol prediz a sua concentração no plasma.

3.1.2 Efeito do enriquecimento ambiental, contínuo e de 3 h por dia, no consumo de etanol, preferência e consumo de água em reexposições semanais de 2 h

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas foi realizada para o consumo de etanol, preferência e consumo de água, considerando a reexposição como medida repetida e o grupo como variável independente, nos dois experimentos. Em relação ao consumo de etanol do primeiro experimento, a análise detectou diferenças significativas para o fator reexposição [$F_{(5,95)} = 13,24$; $p < 0,01$], mas não detectou como significativo o fator grupo [$F_{(1,19)} = 1,42$; $p = 0,25$] e a interação grupo x reexposição [$F_{(5,95)} = 2,00$; $p = 0,09$]. O teste *post hoc* mostrou diferença significativa na 6ª reexposição ao etanol. Esse resultado indica que após o estresse ambos os grupos consumiram uma quantidade menor de etanol, em relação as outras semanas, sem o estresse. A 1ª reexposição também é diferente das outras, exceto da 5ª. Apesar de uma variação no consumo durante as semanas de reexposições, os animais do grupo EA consumiram a mesma quantidade de etanol que o grupo CT, não mostrando efeito do enriquecimento de 24 h (Figura 5A₁).

A análise estatística da preferência por etanol do experimento 1 revelou diferença significativa para o fator reexposição [$F_{(6,114)} = 42,96$; $p < 0,01$], mas não para o fator grupo [$F_{(1,19)} = 2,72$; $p = 0,12$] e para a interação [$F_{(6,114)} = 1,76$; $p = 0,11$]. A análise *post hoc* mostrou diferenças nas semanas 2 e 6 em relação as outras reexposições. Ocorreu uma diminuição na preferência nessas duas semanas, mas não houve diferença entre os grupos (Figura 5B₁). Foi detectada também uma diferença significativa no fator reexposição [$F_{(6,114)} = 36,85$; $p < 0,01$] no consumo da água. O teste de Newman - Keuls mostrou diferenças significativas também na 6ª semana de reexposição. O consumo nessa semana foi maior quando comparado com as outras (Figura 5C₁). Não foram detectadas diferenças para o fator grupo [$F_{(1,19)} = 2,69$; $p = 0,12$] e para interação grupo x reexposição [$F_{(6,114)} = 1,31$; $p = 0,26$].

No segundo experimento, também foram detectadas diferenças significantes apenas para o fator reexposição [$F_{(3,54)} = 37,99$; $p < 0,01$], mas não para o fator grupo [$F_{(1,18)} = 1,45$; $p = 0,24$] e para interação dos fatores [$F_{(3,54)} = 0,23$; $p = 0,88$] no consumo de etanol. O teste posterior mostrou diferença significativa na 4ª semana de reexposição, que difere de todas as outras (Figura 5A₂). Esse resultado indica que ocorreu uma queda no consumo de 2 h após o estresse nos dois grupos, como no experimento 1.

Uma diferença foi verificada uma no fator reexposição [$F_{(4,72)} = 3,80$; $p < 0,01$], mas não no grupo [$F_{(1,18)} = 0,35$; $p = 0,56$] e na interação grupo x reexposição [$F_{(4,72)} = 0,45$; $p = 0,77$] na preferência por etanol. O teste *post hoc* revelou que a preferência após o estresse, foi menor em relação à 2ª reexposição, mas não houve diferença entre os grupos (Figura 5B₂). Também foi detectada uma diferença significativa apenas no fator reexposição [$F_{(4,72)} = 2,74$; $p < 0,05$] no consumo de água. Na 4ª reexposição, após o estresse, ocorreu um maior consumo comparado às outras semanas (Figura 5C₂). O fator grupo [$F_{(1,18)} = 0,76$; $p = 0,39$] e a interação entre os fatores [$F_{(4,72)} = 0,88$; $p = 0,48$] não apresentaram diferenças.

Os resultados dos dois experimentos sugerem que o estresse de contenção produziu uma diminuição no consumo de etanol nas duas horas que seguiram o evento estressor e essa diminuição foi acompanhada de um aumento no consumo de água. Entretanto, o consumo foi similar entre os grupos CT e EA - 24h, e CT e EA - 3h.

Figura 5 - Quantidade de etanol consumida comparada à fase de aquisição (A); preferência (B) e consumo de água (C), durante 2 h por dia em reexposições semanais, dos grupos CT e EA - 24h (experimento1 - lado esquerdo) e CT e EA - 3h (experimento 2 - lado direito). Fase de aquisição mostrada na semana 0. Os dados representam média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ em relação as outras reexposições; ** $p < 0,01$ em relação as outras reexposições; # $p < 0,01$ em relação a 2ª reexposição.

3.1.3 Avaliação dos efeitos do enriquecimento ambiental, contínuo e de 3 h por dia, em 24 horas de consumo e após o estresse de contenção

Para o experimento com animais mantidos 24 h no enriquecimento, a ANOVA de duas vias para medidas repetidas indicou significância estatística para o fator grupo [$F_{(1,19)} = 20,01$; $p < 0,01$] e para a interação grupo x reexposição [$F_{(1,19)} = 13,90$; $p < 0,01$] no consumo de etanol. O fator reexposição não apresentou diferença [$F_{(1,19)} = 0,71$; $p = 0,41$]. A análise *post hoc* detectou diferença entre os grupos na 6ª semana. O consumo de álcool dos animais CT não se alterou entre a 5ª e a 6ª semana, enquanto que o consumo dos animais EA - 24h foi menor na 6ª semana de reexposição quando comparado com a 5ª. Esses resultados indicam que, após o estresse agudo, os animais que viviam em ambiente enriquecido durante todo o dia, consumiram menos etanol que os animais do grupo CT e também diminuíram o seu consumo em relação à semana anterior, no consumo 24 h sem estresse. Já o grupo CT apresentou um consumo similar ao da 5ª reexposição (Figura 6A₁).

Na preferência pelo etanol, foram detectadas diferenças significativas para o fator reexposição [$F_{(1,19)} = 15,33$; $p < 0,01$]. O fator grupo [$F_{(1,19)} = 4,37$; $p = 0,051$] e a interação entre os fatores [$F_{(1,19)} = 1,56$; $p = 0,23$] não apresentaram diferenças (Figura 6B₁). A preferência pelo etanol foi menor após o estresse em ambos os grupos comparado com a semana anterior. A diminuição na preferência por etanol foi acompanhada de um aumento do consumo de água dos dois grupos, como mostrado na figura 6C₁. Não foram encontradas diferenças para o fator grupo [$F_{(1,19)} = 0,79$; $p = 0,39$] e na interação entre os fatores [$F_{(1,19)} = 0,81$; $p = 0,38$], apenas para o fator reexposição [$F_{(1,19)} = 24,58$; $p < 0,01$] na análise do consumo de água. Esse resultado mostrou que os animais, dos dois grupos, consumiram mais água após o estresse, no período de 24 h.

No experimento 2, a ANOVA de duas vias para medidas repetidas mostrou diferenças significativas para o fator grupo [$F_{(1,18)} = 17,94$; $p < 0,01$], reexposição [$F_{(1,18)} = 30,95$; $p < 0,01$] e a interação grupo x reexposição [$F_{(1,18)} = 20,10$; $p < 0,01$] no consumo de etanol. O teste *post hoc* revelou diferenças entre os grupos na 4ª semana. Semelhante ao experimento 1, o grupo EA apresentou um consumo inferior ao CT e o consumo de etanol do grupo CT não apresentou diferenças entre a 3ª e a 4ª semanas de reexposição, mas o consumo do grupo de animais que permaneceu 3 h por dia no ambiente enriquecido, diminuiu. Esses dados fortalecem os resultados do

experimento 1 e indicam que, após o estresse, os animais que foram expostos ao ambiente enriquecido consumiram menos etanol que os animais do grupo CT e também diminuíram o seu consumo quando comparados com a semana anterior (Figura 6A₂).

A preferência por etanol não apresentou diferença entre as reexposições [$F_{(1,18)} = 2,65$; $p = 0,12$], grupo [$F_{(1,18)} = 0,37$; $p = 0,55$] e na interação entre os fatores [$F_{(1,18)} = 0,34$; $p = 0,56$] (Figura 6B₂). A ingestão de água também não apresentou diferenças significativas para os fatores: grupo: [$F_{(1,18)} = 1,16$; $p = 0,30$]; reexposição: [$F_{(1,18)} = 1,07$; $p = 0,32$]; interação [$F_{(1,18)} = 0,81$; $p = 0,38$] (Figura 6C₂).

Figura 6 - Quantidade de etanol consumido (A); preferência (B) e consumo de água (C) dos grupos CT e EA - 24h (experimento1 - lado esquerdo) e CT e EA - 3h (experimento 2 - lado direito), em 24 h, sem o estresse agudo de contenção e após o estresse. Os dados representam média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,01$ em relação ao grupo controle e ao próprio grupo na semana anterior; + $p < 0,01$ em relação à semana anterior.

3.1.3.1 Dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona no consumo 24 h após o estresse

A dosagem da corticosterona foi feita apenas nos plasmas obtidos no final das 24 h de consumo da 4ª reexposição no experimento 2. Foi realizado um teste *t-Student*, que não detectou diferença na corticosterona plasmática entre os grupos ($t = -1,49$; $p = 0,16$), como mostrado na figura 7.

Figura 7 - Corticosterona plasmática em pg/ml dos grupos CT e EA - 3h do experimento 2. Os dados representam média $\pm$ erro padrão.

3.1.4 Efeitos da exposição ao ambiente enriquecido nos parâmetros comportamentais avaliados no labirinto em cruz elevado

3.1.4.1 Porcentagem de tempo gasto e número de entradas nos braços abertos

O teste *t-Student* para medidas independentes entre os grupos CT e EA - 24h detectou diferença estatística significativa na porcentagem de tempo gasto ($t = 3,50$; $p < 0,01$) e número de entradas ($t = 2,78$; $p < 0,05$) nos braços abertos, no primeiro experimento. Esses resultados mostram que os animais mantidos em ambiente enriquecido 24 h/dia, passaram menos tempo (Figura 8A₁) e entraram menos nos braços abertos em relação aos animais do grupo CT (Figura 8B₁).

Entretanto, o grupo enriquecido 3 h por dia não apresentou diferenças significativas na porcentagem de tempo gasto ($t = 1,02$; $p = 0,32$) e número de

entradas ($t = -0,27$; $p = 0,79$) nos braços abertos em relação ao CT (Figura 8A₂ e 8B₂, respectivamente).

Figura 8 - Porcentagem de tempo gasto (A) e número de entradas (B) nos braços abertos no teste LCE dos grupos CT e EA - 24h (experimento1 – lado esquerdo) e CT e EA - 3h (experimento 2 - lado direito). Os dados representam média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3.1.4.2 Porcentagem de tempo gasto e número de entradas nos braços fechados

No experimento 1, um teste t -Student detectou diferença estatística significativa apenas na porcentagem de tempo gasto nos braços fechados ($t = -3,62$; $p < 0,01$). O número de entradas ($t = -1,83$; $p = 0,08$), um parâmetro utilizado para medir a atividade locomotora, não diferiu entre os grupos. Os animais mantidos em ambiente enriquecido de maneira contínua, passaram mais tempo nos braços fechados em relação aos animais do grupo CT (Figura 9A₁). Entretanto, não houve diferença no número de entradas nesses braços entre os grupos (Figura 9B₁).

Para os animais mantidos 3 h por dia no enriquecimento, não foram detectadas diferenças na porcentagem de tempo gasto ($t = -1,12$; $p = 0,28$) e número de entradas ($t = 0,14$; $p = 0,89$) nos braços fechados (Figura 9A₂ e 9B₂ respectivamente)

Figura 9 - Porcentagem de tempo gasto (A) e número de entradas (B) nos braços fechados no teste LCE dos grupos CT e EA - 24h (experimento1 – lado esquerdo) e CT e EA - 3h (experimento 2 - lado direito). Os dados representam média $\pm$ erro padrão. ** $p < 0,01$.

3.1.4.3 Tempo de latência para entrada no braço aberto

Foi realizado o teste não paramétrico U de Mann-Whitney, no primeiro experimento, que não detectou diferença no tempo de latência entre os grupos CT e EA ($p = 0,36$) (Figura 10A).

No experimento 2, o teste *t-Student* para medidas independentes, também não revelou significância estatística entre os grupos para esse parâmetro ($t = -1,63$; $p = 0,12$) (Figura 10B).

Figura 10 - Tempo de latência, em segundos, para entrada nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, no experimento 1 (A) e experimento 2 (B). Os dados representam média $\pm$ erro padrão.

3.1.4.4 Número total de espreitas

A comparação entre os grupos CT e EA não demonstrou diferença significativa no experimento 1 ($t = 0,24$; $p = 0,81$) nem no experimento 2 ($t = 1,75$; $p = 0,10$), como mostrado na figura 11.

Figura 11 - Número total de espreitas realizadas pelos animais dos grupos CT e EA, no experimento 1 (A) e experimento 2 (B). Os dados representam média $\pm$ erro padrão.

3.2 EXPERIMENTO 3

3.2.1 Consumo de etanol, preferência por etanol e consumo de água durante a fase de aquisição

Na fase de aquisição, a ANOVA de uma via para medidas repetidas, seguida de um teste *post hoc*, foi realizada para a análise dos dados obtidos no consumo de etanol, preferência por etanol e consumo de água. O consumo de etanol (Figura 12A), apresentou uma diferença significativa no fator dia [$F_{(14,294)} = 2,81$; $p < 0,01$]. A análise *post hoc* mostrou que no 4º dia de exposição ao etanol, após a abstinência, houve um aumento significativo do consumo comparado ao dia anterior. A ingestão de etanol no dia 4 também foi maior em relação aos dias seguintes. Também foi detectada diferença entre os dias na preferência [$F_{(14,294)} = 2,09$; $p < 0,05$], uma diminuição no 7º dia em relação ao 9º (Figura 12B). Essa mesma diferença foi encontrada no consumo de água [$F_{(14,294)} = 2,90$; $p < 0,01$] (Figura 12C). Nas três análises realizadas, não foram detectadas diferenças nos últimos cinco dias.

Figura 12 - Consumo de etanol (A), preferência (B) e volume de água consumido (C) em 2 h por dia durante a fase de aquisição. Cada maior intervalo entre dois números no eixo das abscissas corresponde aos 2 dias de abstinência. * $p < 0,01$ em relação aos outros dias, exceto dia 1 e 2; # $p < 0,05$ em relação ao dia 9; ## $p < 0,01$ em relação ao dia 9.

3.2.2 Definição da dose subterapêutica de naltrexona: consumo de etanol, preferência e consumo de água em reexposições semanais de 2 h

Três doses retiradas da literatura foram testadas. A ANOVA de duas vias para medidas repetidas mostrou que houve diferença significativa dos fatores grupo: [$F_{(3,18)} = 9,25$; $p < 0,05$]; reexposições [$F_{(3,54)} = 6,57$; $p < 0,05$] e da interação entre os fatores [$F_{(9,54)} = 5,37$; $p < 0,05$] no consumo de etanol. O grupo de animais que recebeu a dose intermediária de naltrexona (1.0 NTX), foi o único que apresentou uma diminuição no consumo, na última semana de reexposição, quando comparado ao grupo salina e em relação ao próprio grupo nas semanas anteriores. O grupo que recebeu 0,5 mg/kg de naltrexona (0.5 NTX), menor dose utilizada, apresentou diferença entre as semanas de reexposição. O consumo de etanol foi menor nas reexposições 3 e 4, entretanto nessas semanas esse grupo não diferiu do grupo salina (Figura 13A).

No consumo de água, foi detectada significância estatística para a interação entre os fatores [$F_{(12,72)} = 2,30$; $p < 0,05$]. A análise posterior revelou que no grupo 1.0 NTX, o menor consumo de etanol na última reexposição foi acompanhado de uma diminuição no consumo de água, em relação as reexposições anteriores (Figura 13C). Consequentemente, essa queda no consumo de água, fez com que aumentasse a preferência nos animais desse grupo (interação entre os fatores [$F_{(12,72)} = 2,33$; $p < 0,05$]), apesar da diminuição do consumo de etanol. Dessa maneira, o grupo que recebeu 1,0 mg/kg de naltrexona apresentou uma maior preferência por etanol na quarta reexposição quando comparado as outras semanas (Figura 13B).

A quantidade de ração ingerida também apresentou diferença estatística significativa para o fator reexposição [$F_{(3,54)} = 10,29$; $p < 0,01$] e interação grupo x reexposição [$F_{(9,54)} = 3,82$; $p < 0,01$]. O fator grupo não apresentou diferença [$F_{(3,18)} = 2,65$; $p = 0,09$]. O grupo 1.0 NTX apresentou uma menor ingestão de ração na 4ª reexposição em relação as outras semanas (Figura 13D). Entretanto, esse consumo não diferiu do grupo salina.

Devido a diminuição no consumo de etanol nas últimas duas semanas do grupo 0.5 NTX, para a realização do experimento 4 foi escolhida, além da dose 0,5 mg/kg, uma dose ainda mais baixa de naltrexona, a de 0,25 mg/kg.

Figura 13 - Quantidade de etanol consumida comparada a fase de aquisição (A), preferência por etanol (B), consumo de água (C) e consumo de ração (D) durante 2 h por dia em reexposições semanais, dos grupos salina, 0.5 NTX, 1.0 NTX e 4.0 NTX. Fase de aquisição mostrada na semana 0. Os dados representam média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina e a reexposições anteriores; # $p < 0,05$ em relação as reexposições 1 e 2; + $p < 0,05$ em relação a reexposições anteriores; ++ $p < 0,01$ em relação a reexposições anteriores.

3.3 EXPERIMENTO 4

3.3.1 Consumo de etanol, preferência por etanol, consumo de água e ração durante a fase de aquisição

A ANOVA de uma via para medidas repetidas revelou uma diferença significativa no fator dia [$F_{(14,686)} = 6,18$; $p < 0,01$] para o consumo de etanol. Os animais passaram a consumir uma quantidade maior de etanol após o primeiro período de abstinência, ou seja, após o 4º dia de exposição (Figura 14A). O mesmo resultado foi verificado na preferência, exceto no 5º dia que não difere dos dias 2 e 3 [$F_{(14,686)} = 9,27$; $p < 0,01$] (Figura 14B). O consumo de água no primeiro dia apresentou diferença significativa em relação aos demais, exceto aos dias 2, 3, 4 e 5 [$F_{(14,686)} = 4,52$; $p < 0,01$] (Figura 14C). O consumo de ração no primeiro dia também apresentou diferença em relação aos demais [$F_{(14,686)} = 10,70$; $p < 0,01$] (Figura 14D). O aumento no consumo de etanol no 4º dia da fase de aquisição, verificado em todos os experimentos, não foi acompanhado de uma diminuição no consumo de água e de alimento. Como nos experimentos anteriores, os últimos cinco dias não apresentaram significância estatística, demonstrando assim, um consumo estável. Dessa maneira,

a quantidade de etanol consumida nesses dias foi usada no cálculo das médias da fase de aquisição de cada grupo.

Figura 14 - Consumo de etanol (A), preferência (B), volume de água (C) e ração consumida (D) em 2 h por dia durante a fase de aquisição. Cada maior intervalo entre dois números no eixo das abscissas corresponde aos 2 dias de abstinência. * $p < 0,01$ em relação aos dias 1, 2 e 3; # $p < 0,01$ em relação ao 1º dia; + $p < 0,01$ em relação aos outros dias.

3.3.2 Efeito do enriquecimento ambiental contínuo associado à administração semanal de doses subterapêuticas de naltrexona no consumo de etanol, preferência, consumo de água e de ração

No consumo de etanol, a ANOVA de duas vias para medidas repetidas indicou significância estatística apenas para o fator reexposição [$F_{(3,180)} = 5,87$; $p < 0,05$] e não para o fator grupo [$F_{(4,45)} = 0,60$; $p = 0,66$] e para a interação entre os fatores [$F_{(12,180)} = 0,91$; $p = 0,54$]. O teste subsequente mostrou diferença significativa na 4ª semana de reexposição, entretanto não ocorreram diferenças entre os grupos (Figura 9A).

A preferência pelo etanol apresentou diferença entre as reexposições [$F_{(4,180)} = 6,29$; $p < 0,05$]. Nas reexposições 1 e 3, ocorreu uma diminuição da preferência. O fator grupo [$F_{(4,45)} = 0,55$; $p = 0,70$] e a interação entre os fatores [$F_{(16,180)} = 0,51$; $p = 0,94$] não apresentaram significância.

Quanto ao consumo de água, também foi detectada diferença somente no fator reexposição [$F_{(4,180)} = 10,37$; $p < 0,05$]. O grupo não apresentou diferença [$F_{(4,45)} = 0,52$; $p = 0,72$] e nem a interação grupo x reexposição [$F_{(16,180)} = 0,66$; $p = 0,83$]. Todos os grupos consumiram mais água na primeira e terceira reexposição. Esse aumento no consumo de água explica a diminuição da preferência por etanol nessas semanas, como citado acima.

O consumo de ração não apresentou diferença entre os grupos [$F_{(4,45)} = 0,30$; $p = 0,87$], reexposição [$F_{(4,180)} = 2,06$; $p = 0,11$] e na interação entre os fatores [$F_{(16,180)} = 0,35$; $p = 0,98$].

Figura 15 - Quantidade de etanol consumida comparada a fase de aquisição (A), preferência por etanol (B), consumo de água (C) e consumo de ração (D) durante 2 h por dia em reexposições semanais dos grupos salina, 0.25 NTX, EA + salina, EA + 0.25 NTX e EA + 0.5 NTX. Fase de aquisição mostrada na semana 0. Os dados representam média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ em relação as outras reexposições; # $p < 0,05$ quando comparado as reexposições 0, 2 e 4.

4 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, que animais mantidos em um ambiente enriquecido durante os períodos de abstinência, após passarem por um estresse agudo de contenção, apresentaram um menor consumo de etanol, depois de 24 h de exposição, quando comparados aos grupos controles. Esse consumo também foi menor em relação à reexposição anterior, sem o fator estresse.

Tanto os animais que permaneceram 24 horas quanto os que permaneceram apenas 3 horas por dia no enriquecimento, mostraram um comportamento de consumo inferior após estresse, indicando que 3 h de exposição diária ao EA é suficiente para produzir efeitos semelhantes, no consumo de etanol, ao de uma exposição contínua. A diferença também no tempo de exposição total ao EA durante os dois experimentos, 45 e 30 dias, não foi determinante para o efeito de redução no consumo. O efeito foi o mesmo, independente dessas variáveis de tempo de exposição. Um estudo com cocaína também mostrou que ratos expostos ao ambiente enriquecido por 30 dias apresentaram efeitos semelhantes no comportamento de busca pela droga, comparados aos ratos expostos ao EA por um intervalo de tempo ainda maior, 90 dias (Chauvet et al., 2009).

Para investigar os efeitos do EA no consumo de etanol durante a abstinência, foi usado um modelo de consumo, com manipulações comportamentais (como acesso limitado e intermitente ao etanol), capaz de proporcionar níveis farmacologicamente significativos de álcool no sangue dos animais. O uso adicional da garrafa de água inserido no protocolo deste trabalho não ocasionou uma queda no nível plasmático de etanol e os animais conseguiram alcançar quantidades superiores a 1 mg/ml, verificadas no final da fase de aquisição, caracterizando um consumo excessivo. A estratégia de realizar um protocolo de exposição ao etanol não contínuo durante essa fase, parece ter ajudado a aumentar tanto o consumo quanto os níveis plasmáticos de etanol, mesmo na presença da água. Devido a problemas técnicos no equipamento Analox, por enquanto só foi possível realizar a dosagem do etanol plasmático nos animais do primeiro experimento. Entretanto, o resultado já mostrou que o paradigma utilizado é eficaz para se obter um consumo excessivo.

O comportamento de aumento do consumo após abstinência, o ADE (*Alcohol deprivation effect*), já foi observado na fase de aquisição dos quatro experimentos, no 4º dia de exposição ao etanol, após dois dias de abstinência. Estudos já descreveram

que pelo menos dois dias de abstinência são necessários para aumentar esse consumo (Sinclair et al., 1973), entretanto, foi surpreendente um ADE significativo logo após o primeiro período de privação, com apenas três dias de acesso prévio a droga. Diversos protocolos mostram esse efeito após semanas de consumo (Melendez et al., 2006; Wolffgramm, Heyne, 1995).

Ciclos repetidos de privação geralmente são seguidos por um aumento escalonado da ingestão do etanol (Melendez et al., 2006). Porém, os nossos resultados mostraram que após o primeiro período de abstinência os aumentos não foram mais observados, provavelmente por ter atingido um efeito “teto”, a partir do qual não seria mais possível aumentar o consumo de álcool, durante o período limitado de 2 horas das exposições.

Curiosamente, nos quatro experimentos, foram observados dois padrões de consumo dos camundongos C57BL/6. Na fase de aquisição dos experimentos 1 e 4 (Figuras 3A₁ e 14A, respectivamente), os animais apresentaram um menor consumo nos três primeiros dias e, após a abstinência ocorreu o ADE e um alto consumo se estabeleceu. Nos experimentos 2 e 3, os animais já iniciaram a fase de aquisição com um consumo elevado, que foi superado após os dois dias de abstinência, e logo no dia seguinte (5º dia) esse aumento se dissipou (Figuras 3A₂ e 12A, respectivamente). O ADE desses dois experimentos pareceu de menor magnitude e não se manteve. Estudos mostraram que a magnitude do ADE depende da duração do acesso ao álcool antes da privação e da duração da abstinência (Wolffgramm, Heyne, 1995). Entretanto, o delineamento foi o mesmo para todos os experimentos. Existem outros relatos que demonstraram que o efeito do ADE pode ser transitório e desaparecer, e o consumo tende então a retornar aos níveis basais (McKinzie et al., 1998; Rodd-Henricks et al., 2000; Sinclair, Li, 1989).

Após os primeiros períodos de privação, parece que os animais passaram a ajustar o consumo. De fato, sugere-se que os roedores apresentam uma autorregulação do consumo de etanol. Quando a taxa de ingestão se aproxima da taxa máxima a qual eles conseguem metabolizar o etanol e eliminá-lo, eles diminuem a ingestão (Dole et al., 1985). A grande quantidade de etanol ingerida pelos animais que já apresentavam um alto consumo, depois do curto período de privação, pode ter excedido a capacidade de metabolização, e talvez isso tenha ocasionado uma diminuição do consumo nas exposições seguintes.

A estabilização do consumo de etanol nos últimos cinco dias foi fundamental para a continuação do experimento e realização das reexposições após os períodos mais longos de privação. Durante essas reexposições dos experimentos 1 e 2, os grupos enriquecidos não apresentaram diferença no consumo de 2 h quando comparados aos controles. Observaram-se variações entre as semanas de reexposição no experimento 1, mas estas foram acompanhadas por ambos os grupos, provavelmente decorrente de algum fator externo, não inerente ao experimento. O consumo só foi alterado significativamente em relação às outras semanas, após o estresse.

A exposição de 1 h ao estresse de contenção, imediatamente seguida de uma reexposição ao etanol, causou uma diminuição no consumo de 2 h nos experimentos 1 e 2. Tanto os grupos CT quanto os EA consumiram menos etanol que nas semanas anteriores. Essa redução no consumo de etanol foi acompanhada por um aumento do consumo de água. Portanto, o estresse por si só, independente do ambiente em que os animais permaneceram, foi capaz de alterar o padrão de consumo dos animais.

Cozzoli et al. (2014) realizaram um estudo aplicando um modelo de consumo semelhante ao utilizado nesse trabalho, onde as garrafas etanol (10% v/v) e água foram reapresentadas ao camundongo C57BL/6J imediatamente após o estresse de contenção por 30 minutos. Também foi observada uma diminuição no consumo do etanol, acompanhada por um aumento na ingestão de água, após esse tipo de estressor. O estresse de contenção, parece ocasionar uma considerável perda de água pelo animal. Michajlovskij et al. (1988) coletaram a urina dos animais durante o processo de contenção e observaram que ocorreu um aumento acentuado na produção total da urina, que por sua vez apresentou uma menor osmolaridade, ou seja, estava mais diluída. Uma desregulação no balanço hídrico pode desencadear mecanismos reguladores que mantem a homeostase dos fluidos corporais, como os mecanismos hipotalâmicos do controle da sede (McKinley, Johnson, 2004). Dessa maneira, uma possível maior perda de água corporal durante o estresse de contenção, pode ter ocasionado o aumento na ingestão de água imediatamente após o estresse. Sugere-se então que o menor consumo do etanol observado nas 2 h após o estresse ocorreu em consequência ao maior consumo de água durante esse período, para a possível manutenção do equilíbrio hídrico.

Possivelmente em decorrência dessa necessidade de maior consumo de água, não foi possível observar um efeito do enriquecimento nas duas primeiras horas de

consumo de etanol. Entretanto, uma diferença significativa entre os grupos foi percebida após 24h, nos dois experimentos, como consequência prolongada da exposição aguda ao estresse. Após uma única exposição, os animais mantidos em ambientes enriquecidos mostraram uma redução no consumo de etanol durante as 24 h, quando comparados com a semana anterior, sem o estresse. Já os grupos dos animais controles mantiveram um consumo semelhante ao da semana anterior. Nota-se que ambos os grupos diminuíram o consumo de etanol nas 2 horas após o estresse, e apenas os grupos controles consumiram, em 24 h, quantidades semelhantes àquelas obtidas em 24 h na semana anterior, sem o estresse. É possível inferir que em algum momento, dentro das 22 h, os animais controles aumentaram a ingestão de etanol quando comparados com as mesmas horas da semana anterior, em decorrência do estresse. Nos grupos enriquecidos, esse aumento do consumo não aconteceu. Os níveis de consumo de álcool dos animais do EA foram inferiores aos níveis anteriores, sugerindo um efeito “protetor” do EA à esse aumento da ingestão da droga causado pelo estresse, como observado nos grupos CT.

Alguns estudos sugerem que o EA pode mostrar algum efeito no comportamento apenas quando os níveis de estresse são altos o suficiente e causam pronunciada “ansiedade”. Um estudo mostrou que o EA, durante a abstinência, não foi capaz de reduzir o restabelecimento da autoadministração induzida por injeções de cocaína. Entretanto, ele bloqueou esse comportamento, quando o restabelecimento foi induzido por um estressor farmacológico, a ioimbina, uma droga que causa sintomas tipo ansiedade em animais (Chauvet et al., 2009).

O EA tem se mostrado capaz de atenuar respostas geradas por um estímulo estressor, como o aumento do comportamento tipo ansioso (revisado em Fox et al., 2006). O estresse de contenção é capaz de induzir a ativação do eixo HPA e levar a respostas comportamentais alteradas (Belda et al., 2008), como uma resposta tipo ansiosa. Entretanto, esse tipo de comportamento associado à contenção pode ser atenuado pelo EA, o qual parece exercer um efeito “protetor” sobre o estresse (Novaes, 2013).

De acordo com um estudo realizado recentemente por Cox et al. (2013), o paradigma DID associado a períodos de abstinência, em C57BL/6, promove apenas aumentos voluntários no consumo e na preferência por etanol, sem aumentar o comportamento tipo ansiedade, ataxia ou suscetibilidade a convulsão, características que associadas são típicas de um estado semelhante à dependência. Dessa maneira,

sugere-se que o protocolo utilizado neste estudo não foi capaz de gerar um comportamento tipo ansioso significativo nos animais abstinentes. Esse comportamento pode ter sido causado apenas com a contenção, e só assim o efeito de menor reatividade ao estresse dos animais enriquecidos foi observado. Acredita-se que esse efeito seja uma indicação de melhor capacidade dos animais expostos ao ambiente enriquecido de lidar com um evento estressor (Moncek et al., 2004; Schrijver et al., 2002; Zimmermann et al., 2001).

Essa menor reatividade ao estresse, no presente estudo, pareceu ser independente da possível ação modulatória do EA sobre o eixo HPA. Apesar das divergências apresentadas na literatura, diversos estudos mostram que o EA tem a capacidade de reduzir a ativação do eixo HPA em resposta a um estressor (revisado em Solinas et al., 2010). Um estudo mostrou que após um estresse de imobilização, o enriquecimento foi capaz de atenuar a liberação dos hormônios ACTH e da corticosterona plasmática (Schrijver et al., 2002). Entretanto, no presente estudo, os níveis de corticosterona, um indicativo de uma possível modulação do EA no eixo HPA, não se mostraram diferentes entre os grupos no final das 24 h de consumo. Apesar de apresentarem semelhantes níveis séricos hormonais, os animais dos grupos CT e EA não manifestaram o mesmo comportamento no consumo de etanol durante esse período. Novaes (2013) também mostrou que o efeito protetor exercido pelo EA no comportamento tipo ansioso, imediatamente após um estresse por imobilização, pareceu não decorrer de uma eventual regulação do eixo HPA, já que os níveis de corticosterona encontrados entre os grupos foram os mesmos.

Apesar de se observar que a exposição a eventos estressantes influencia na motivação do subsequente consumo de álcool em humanos (Keyes et al., 2012), em modelos animais a literatura é repleta de resultados contraditórios em relação a interação álcool X estresse (Becker et al., 2011). Acredita-se que essa interação dependa de diversas variáveis que podem significativamente alterar e influenciar o resultado no consumo, como por exemplo, o tipo de estresse, intensidade, a duração, o momento em que são realizados o estresse e o consumo, o paradigma de acesso ao etanol utilizado (Cozzoli et al., 2014; Pohorecky, 1990). Neste trabalho, usando o grupo CT como exemplo, a avaliação do consumo apenas nas 2 horas logo após o estresse, mostraria uma ingestão de etanol menor ao da semana anterior. Se fosse medido somente no final das 24 h de consumo, ou seja 1 dia após o estresse, essa diminuição no consumo não teria sido detectada. Já no intervalo de entre 2 h e 24 h

após o estresse, ou seja, no período de 22 h, houve uma escalada no consumo de etanol. Logo, as disparidades encontradas nos estudos podem ser também em decorrência das diferenças de tempo em que é medido o consumo após o estresse.

Os mecanismos que medeiam os efeitos do estresse no consumo de etanol ainda não estão esclarecidos. É possível que o circuito do CRF extra-hipotalâmico influencie os estados de motivação para autoadministração do álcool. Acredita-se que a desregulação no sistema CRF, causada tanto por um estresse quanto por um estado de abstinência da droga, seja o responsável pelo aumento no comportamento tipo ansioso e aumento no consumo de etanol. Essa hipótese é sustentada por estudos que mostram que a injeção de antagonistas de receptores CRF1 diretamente no núcleo central da amígdala é capaz de bloquear um aumento no consumo de etanol (Finn et al., 2007; Funk et al., 2006) e no comportamento tipo ansioso (Rassnick et al., 1993), induzidos pela abstinência ao etanol. Além disso, o estresse agudo é capaz de estimular a projeção glutamatérgica da amígdala para o ATV, ativando os neurônios dopaminérgicos mesocorticais e aumentando a liberação de dopamina no CPF (ver Segovia et al., 2009). Um estudo mostrou que o CRF é capaz de induzir uma potencialização do receptor NMDA que medeia a transmissão sináptica dos neurônios dopaminérgicos da ATV (Ungless et al., 2003). Dessa maneira, um fator estressante pode então tornar o indivíduo mais propenso a ingestão da droga, por aumentar a atividade de sistemas neurobiológicos envolvidos na motivação e recompensa (Piazza, Le Moal, 1998).

Entretanto, há especulações de que a exposição a um ambiente enriquecido está relacionada a uma menor liberação de dopamina no CPF após a exposição a um evento estressante (Segovia et al., 2008). Outros estudos mostraram uma redução da densidade de receptores de dopamina D1 no CPF de animais enriquecidos (del Arco et al., 2007; Zhu et al., 2005). Esta infrarregulação da atividade do sistema de dopaminérgico no CPF pode estar relacionada, pelo menos em parte, com a menor resposta comportamental às drogas de abuso causada pelo EA (Bardo et al., 1995). Mais pesquisas são necessárias para definir os mecanismos subjacentes aos efeitos do EA sobre o estresse.

Em relação ao teste LCE, neste estudo, a mudança no tempo de exposição diária ao EA causou variações no comportamento. O teste, realizado durante o período de abstinência, mostrou que os animais expostos ao ambiente enriquecido 24h por dia apresentaram menor entrada e tempo gasto nos braços abertos em

relação ao grupo CT, sugerindo um comportamento mais “ansioso” que os controles. Quando o período de enriquecimento foi reduzido para apenas 3 h por dia no experimento 2, o grupo EA não apresentou o mesmo comportamento. Entretanto, além dos índices primários, outros parâmetros comportamentais relacionados à “ansiedade” foram analisados, e não apresentaram diferenças entre os grupos. A frequência de entrada nos braços fechados, utilizada nesse estudo como índice dessa atividade locomotora/exploratória, também foi medida. Os animais enriquecidos 24h/dia não apresentaram diferença em relação aos do grupo CT. Apesar de permanecerem mais tempo nos braços fechados, os animais dos grupos EA apresentaram a mesma frequência de entradas nesses locais quando comparados aos controles.

Esse possível aumento da “ansiedade” devido à exposição contínua ao EA, apesar de ser contraditório ao que alguns resultados descritos na literatura sugerem (revisado em Simpson, Kelly, 2011), pode ser causada pela constante troca do ambiente em que esses animais vivem, o que é comparável a leves exposições a fatores estressantes (Larsson et al., 2002). O enriquecimento ambiental é considerado por alguns autores um estressor positivo (“eustress”), que difere dos estressores negativos (Selye, 1973), e aumenta a capacidade do indivíduo de lidar com situações mais aversivas (Lehmann, Herkenham, 2011). Esse efeito não ocorreu quando a mudança do ambiente foi temporária, na exposição de apenas 3h por dia aos objetos. No entanto, parece que essa resposta tipo ansiosa causada pela exposição contínua ao EA não foi intensa o suficiente para levar um aumento do consumo de etanol e do seu valor reforçador em nenhum momento do estudo.

Estudos já identificaram um comportamento tipo ansioso maior, menor ou inalterado dos animais enriquecidos em relação a animais alojados em caixas padrões, o que mostra discrepância na literatura dos efeitos do enriquecimento ambiental nesse comportamento. A variabilidade nos protocolos do enriquecimento, e também do LCE, utilizados por diferentes pesquisadores pode ser responsável por essas diferenças de respostas (Simpson, Kelly, 2011). Como visto no presente estudo, as diferenças nos comportamentos no LCE foram dependentes do tempo de exposição diária ao EA.

Contudo, sabendo-se que animais enriquecidos podem apresentar diminuição significativa da atividade locomotora (Sztainberg et al., 2010) e de comportamentos exploratórios (Rae, 2014), talvez uma maior atenção voltada para parâmetros que

mostrem o que os animais fazem de fato em todo o labirinto seria interessante, como forma de avaliação mais profunda do comportamento animal nesse modelo.

Em relação à combinação do EA com baixas doses da naltrexona, não foram verificadas alterações no consumo de etanol, água e ração. O objetivo da associação entre uma estratégia farmacológica e uma não-farmacológica era minimizar os efeitos colaterais do fármaco e proporcionar um efeito sinérgico para a redução do consumo de etanol, através de uma modulação de componentes que participam dos efeitos reforçadores do etanol. Entretanto, ela não se mostrou eficaz durante as 4 semanas de realização do experimento, indicando que as modificações causadas pelo EA não favoreceram a ação da naltrexona administrada em subdoses, nesse modelo de consumo.

Nas doses 0,25 e 0,5 mg/kg, a naltrexona sozinha ou combinada com o EA, não foi capaz de reduzir o consumo de etanol. No experimento 3, o grupo 0.5 NTX até apresentou um menor consumo nas duas últimas reexposições quando comparados com a primeira. Entretanto, esse grupo não diferiu do grupo salina. Devido a essa diminuição, no experimento 4 foi utilizada também uma dose ainda menor, para garantir que pelo menos uma dose utilizada não apresentasse eficiência terapêutica, a fim de se observar um possível sinergismo das duas terapias.

São encontradas diversas discrepâncias na literatura em relação às doses eficazes de naltrexona, que podem ser devido a inúmeras variáveis experimentais, como o tipo de paradigma de autoadministração, as linhagens de animais utilizadas e até a via de administração do fármaco (Williams, Broadbridge, 2009). Dessa maneira mostrou-se relevante definir as doses sem eficácia para o nosso modelo de consumo.

Um resultado interessante no experimento 3, realizado para a definição da subdose de naltrexona, foi a observação da diminuição do consumo de etanol, na última semana de reexposição, pelos animais que receberam 1,0 mg/kg do fármaco, quando comparados ao grupo que recebeu apenas salina. O consumo nessa reexposição também foi menor ao observado nas semanas anteriores. Entretanto, surpreendentemente, o grupo que recebeu a maior dose de naltrexona, 4,0 mg/kg, não apresentou essa redução no consumo de etanol.

Estudos mostram que existem uma diferença na afinidade da naltrexona pelos receptores opioidérgicos atribuída à dose (Childers et al., 1979; Takemori, Portoghese, 1984; Tempel et al., 1985). Em baixas concentrações (até 1,0 mg/kg), a naltrexona se liga preferencialmente ao receptor μ , e em doses maiores essa

seletividade é perdida, passando a ocupar também receptores δ e κ (ver em Mhatre, Holloway, 2003).

Essa diferença na seletividade relacionada às doses parece refletir na eficácia da naltrexona em diminuir o consumo de álcool dos animais. Enquanto baixas doses, como 0,1 mg/kg, se mostraram eficazes na diminuição do consumo de etanol (Holter, Spanagel, 1999), injeções de doses mais elevadas, que variaram de 3 a 30 mg/kg não conseguiram reduzir o efeito reforçador do etanol (Bienkowski et al., 1999; Williams, 2007). Entretanto, há controvérsias na literatura em relação às doses terapêuticas. Um estudo realizado por Stromberg et al. (1998) demonstrou que com todas as doses testadas, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 3,0 e 10,0 mg/kg, o consumo de etanol, em ratos, diminuiu em relação ao grupo salina, entretanto a maior dose não promoveu um aumento significativo na supressão do consumo de etanol em relação às doses menores. Sugere-se que a aditiva contribuição do antagonismo de receptores δ , contribuiu para esse efeito. Ademais, o naltrindol, um antagonista δ - seletivo, falhou em suprimir a ingestão de etanol no modelo de consumo por eles utilizado.

Apesar de não apresentar diferença em relação ao grupo salina, o grupo 1.0 NTX, além de uma diminuição no consumo de etanol, também apresentou um comportamento de consumo reduzido da água e da ração na 4ª reexposição em relação às outras semanas, sugerindo que nessa dose, a naltrexona pode alterar comportamentos consumatórios não seletivos. De fato, o sistema de opióides endógenos parece desempenhar um importante papel nos processos que controlam também a ingestão de água e comida. Estudos pioneiros revelaram que o tratamento com antagonistas opioidérgicos reduziu significativamente esses comportamentos de ingestão (descrito em Cooper, 1983), efeitos considerados indesejáveis no tratamento do alcoolismo.

A naltrexona parece reduzir a ingestão de diversos fluidos, como etanol, água e solução de sacarina (Beczowska et al., 1992; Cooper, 1983). Além do consumo de líquidos, ela também é capaz de alterar a alimentação. Desde o final da década de 70 sabe-se que antagonistas opióides são capazes de reduzir a ingestão de alimento (Holtzman, 1979) e estudos subsequentes levaram à “hipótese da palatabilidade mediada pelo opióide”, que sugere que a liberação de opióides desempenha um papel importante na expressão da palatabilidade dos alimentos, que possuiu uma capacidade subjacente em estimular o apetite (Yeomans, Gray, 2002). Dessa maneira, o bloqueio dos receptores opioidérgicos seria capaz de reduzir a ingestão

dos alimentos e por isso então, a naltrexona passou a ser estudada também para o tratamento da obesidade (Caixàs et al., 2014; Yeomans, Gray, 1997). Como já citado (ver Introdução, página 16), essa alteração na palatabilidade é um dos mecanismos propostos também para a diminuição no consumo de etanol.

Pesquisas em animais sugerem que todos os tipos de receptores estão implicados nesse controle que a naltrexona parece exercer sobre a alimentação. Entretanto, alguns estudos mostraram que o β -funaltrexamina, antagonista seletivo de receptor μ , promove uma diminuição na alimentação (Ukai, Holtzman, 1988), enquanto o naltrindol, antagonista de receptor δ , não apresenta esse efeito (Portoghese et al., 1988). No presente estudo, a seletividade dependente da dose também pode ter causado essa alteração no consumo de alimento, assim como no de água e etanol. Moore et al. (2014) também encontraram uma diminuição no consumo da ração utilizando a mesma dose 1,0 mg/kg de naltrexona, sem alteração no consumo de água.

Na parte do trabalho envolvendo a associação naltrexona - EA, não foram realizados testes com um evento estressor. Entretanto, a naltrexona, em doses eficazes, parece falhar no bloqueio do restabelecimento do consumo de etanol induzido por estressores (Lê et al., 1999), momento em que o EA tem mostrado um importante efeito “protetor”. Pode ser interessante avaliar os efeitos do EA associado à naltrexona após condições negativas, como o estresse, uma vez que, como mostrado neste estudo, o ambiente enriquecido promove uma menor reatividade a esses eventos.

Essa abordagem não-farmacológica que envolve diferentes formas de estimulação cerebral, tem apresentado um efeito benéfico sobre características da dependência mimetizadas no modelo animal. Sugere-se que a exposição ao EA depois do estabelecimento do consumo da droga pode facilitar a abstinência e reduzir a recaída (Solinas et al., 2010). Diversas abordagens comportamentais, com diferentes formas de estimulação, têm se mostrado importantes no tratamento da dependência em humanos e são usadas muitas vezes sozinhas ou como suporte de um tratamento medicamentoso (Schnabel, 2009). Essas terapias comportamentais cognitivas consistem em desenvolver estratégias para lidar melhor com o desejo pela droga (Carroll, Onken, 2005). Embora muita cautela deva ser tomada antes de extrapolar os resultados de modelos animais para a condição humana, diversos

estudos, incluindo este, sugerem que estimulações ambientais positivas podem ser benéficas e considerada uma possível parte no tratamento da dependência.

5 CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho mostraram que o EA, durante períodos de privação, foi capaz de reduzir o consumo de etanol após um estresse de contenção. Independente do tempo de exposição diária ao EA, 3 ou 24 h, os efeitos sobre o consumo foram semelhantes. Os dados sugerem que o EA, capaz de promover uma menor reatividade ao estresse, pode exercer efeitos benéficos sobre comportamentos relacionados à dependência, mesmo depois de já ter se estabelecido um consumo excessivo.

No nosso modelo de consumo, a dose 1,0 mg/kg de naltrexona se mostrou mais eficaz na redução do consumo de etanol, quando comparada a maior dose utilizada, 4,0 mg/kg. Entretanto, efeitos adversos como redução do consumo de água e comida também foram observados. Já a associação de baixas doses da naltrexona, (0,25 e 0,5 mg/kg) ao EA não foi eficaz na redução do consumo de etanol.

Diante dos resultados da diminuição no consumo do álcool após um evento estressante, o EA parece ser um alvo interessante de novas pesquisas para o desenvolvimento de tratamentos, farmacológicos ou não, mais eficazes para a dependência do álcool, e também de outras drogas, visando principalmente as diminuições de recaídas.

REFERÊNCIAS*

- Allgaier C. Ethanol sensitivity of NMDA receptors. *Neurochem Int.* 2002;41:377-82.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5th ed. 2013. 443 p.
- Anton RF, Moak DH, Waid LR, Latham PK, Malcolm RJ, Dias JK. Naltrexone and cognitive behavioral therapy for the treatment of outpatient alcoholics: results of a placebo-controlled trial. *Am J Psychiatry.* 1999;156(11):1758-64.
- Anton RF, O'Malley SS, Ciraulo DA, Cisler RA, Couper D, Donovan DM, Gastfriend DR, Hosking JD, Johnson BA, LoCastro JS, Longabaugh R, Mason BJ, Mattson ME, Miller WR, Pettinati HM, Randall CL, Swift R, Weiss RD, Williams LD, Zweben A. Combined pharmacotherapies and behavioral interventions for alcohol dependence: the COMBINE study: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2006;295(17):2003-17.
- Aron DC, Findling JW, Tyrrell BJ. Hypothalamus and pituitary gland. In: Gardner DG, Shoback D. *Greenspan's basic and clinical endocrinology.* McGraw Hill; 2007;8:113-56.
- Bardo MT, Bowling SL, Rowlett JK, Manderscheid P, Buxton ST, Dwoskin LP. Environmental enrichment attenuates locomotor sensitization, but not in vitro dopamine release, induced by amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav.* 1995;51:397-405.
- Bardo MT, Klebaur JE, Valone JM, Deaton C. Environmental enrichment decreases intravenous self-administration of amphetamine in female and male rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2001;155:278-84.
- Bardo MT, Robinet PM, Hammer RF Jr. Effect of differential rearing environments on morphine-induced behaviors, opioid receptors and dopamine synthesis. *Neuropharmacology.* 1997;36(2):251-9.
- Becker HC, Lopez MF, Doremus-Fitzwater, TL. Effects of stress on alcohol drinking: a review of animal studies. *Psychopharmacology (Berl).* 2011;218(1):131-56.
- Beczowska IW, Bowen WD, Bodnar RJ. Central opioid receptor subtype antagonists differentially alter sucrose and deprivation-induced water in rats. *Brain Res.* 1992;589(2):291-301.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Belda X, Fuentes S, Nadal R, Armario A. A single exposure to immobilization causes long-lasting pituitary-adrenal and behavioral sensitization to mild stressors. *Horm Behav.* 2008;54:654-61.

Bezard E, Dovero S, Belin D, Duconger S, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Piazza PV, Gross CE, Jaber M. Enriched environment confers resistance to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and cocaine: involvement of dopamine transporter and trophic factors. *J Neurosci.* 2003;23(35):10999-1007.

Bienkowski P, Kostowski W, Koros E. Ethanol-reinforced behaviour in the rat: effects of naltrexone. *Eur J Pharmacol.* 1999;374:321-7.

Bouza C, Angeles M, Umñoz A, Amate JM. Efficacy and safety of naltrexone and acamprosate in the treatment of alcohol dependence: a systematic review. *Addiction.* 2004;99(7):811-28.

Caixàs A, Albert L, Capel I, Rigla M. Naltrexone sustained-release/bupropion sustained-release for the management of obesity: review of the data to date. *Drug Des Devel Ther.* 2014;18;8:1419-27.

Capriles N, Cancela LM. Effect of acute and chronic stress restraint on amphetamine-associated place preference: involvement of dopamine D(1) and D(2) receptors. *Eur J Pharmacol.* 1999;386:127-34.

Carlini EA. Epidemiologia do uso de álcool no Brasil. *Arq Med ABC.* 2006;2:4-7.

Carobrez AP, Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety - like behavior: the elevated plus - maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005;29(8):1193-205.

Carroll KM, Onken LS. Behavioral therapies for drug abuse. *Am J Psychiatry.* 2005;162:1452-60.

Chauvet C, Lardeux V, Goldberg SR, Jaber M, Solinas M. Environmental enrichment reduces cocaine seeking and reinstatement induced by cues and stress but not by cocaine. *Neuropsychopharmacology.* 2009;34(13):2767-78.

Childers SR, Creese I, Snowman AM, Snyder SH. Opiate receptor binding affected differentially by opiates and opioid peptides. *Eur J Pharmacol.* 1979;55:11-8.

Cloninger CR. Neurogenetic adaptive mechanisms in alcoholism. *Science.* 1987;236(4800):410-6.

Coonfield DL, Hill KG, Kaczmarek HJ, Ferraro III FM, Kiefer SW. Low doses of naltrexone reduce palability and consumption of ethanol in outbred rats. *Alcohol*. 2002;26:43-7.

Cooper SJ. Effects of opiate agonists and antagonists on fluid intake and saccharin choice in the rat. *Neuropharmacology*. 1983;22(3):323-8.

Cox BR, Olney JJ, Lowery-Gionta EG, Sprow GM, Rinker JA, Navarro M, Kash TL, Thiele TE. Repeated cycles of binge-like ethanol (EtOH) - drinking in male C57BL/6J mice augments subsequent voluntary EtOH intake but not other dependence-like phenotypes. *Alcohol Clin Exp Res*. 2013;37:1688-95.

Cozzoli DK, Tanchuck-Nipper MA, Kaufman MN, Horowitz CB, Finn DA. Environmental stressors influence limited-access ethanol consumption by C57BL/6J mice in a sex-dependent manner. *Alcohol*. 2014. doi: 10.1016/j.alcohol.2014.07.015.

Crabbe JC, Phillips TJ. Pharmacogenetic studies of alcohol self-administration and withdrawal. *Psychopharmacology (Berl)*. 2004;174:539-60.

Cunningham CL, Howard MA, Gill SJ, Rubinstein M, Low MJ, Grandy DK. Ethanol-conditioned place preference is reduced in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2000;67:693-9.

Darnaudery M, Maccari S. Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. *Brain Res Rev*. 2008;57(2):571-85.

Dawson G, Tricklebank MD. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol Sci*. 1995;16:33-6.

de Carvalho CR, Pandolfo P, Pamplona FA, Takahashi RN. Environmental enrichment reduces the impact of novelty and motivational properties of ethanol in spontaneously hypertensive rats. *Behav Brain Res*. 2010;208(1):231-6.

de Kloet ER, Joëls M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(6):463-75.

Deehan GA Jr, Palmatier MI, Cain ME, Kiefer SW. Differential rearing conditions and alcohol-preferring rats: consumption of and operant responding for ethanol. *Behav Neurosci*. 2011;2:184-93.

del Arco A, Segovia G, Canales JJ, Garrido P, de Blas M, Garcia-Verdugo JM, Mora F. Environmental enrichment reduces the function of D1 dopamine receptors in the prefrontal cortex of the rat. *J Neural Transm*. 2007;114:43-8.

del Rosario Capriles N, Cancela LM. Motivational effects mu- and kappa - opioid agonists following acute and chronic restraint stress: involvement of dopamine D(1) and D(2) receptors. *Behav Brain Res.* 2002;132:159-69.

Dole VP, Ho A, Gentry RT. Toward an analogue of alcoholism in mice: Criteria for recognition of pharmacologically motivated drinking. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985; 82:3469-71.

El Rawas R, Thiriet N, Lardeux V, Jaber M, Solinas M. Environmental enrichment decreases the rewarding but not the activating effects of heroin. *Psychopharmacology (Berl).* 2009;203:561-70.

Epstein DH, Willner-Reid J, Vahabzadeh M, Mezghanni M, Lin JL, Preston KL. Real-time electronic diary reports of cue exposure and mood in the hours before cocaine and heroin craving and use. *Arch Gen Psychiatry.* 2009;66:88-4.

Espejo EF. Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice. *Behav Brain Res.* 1997;87(2):233-8.

Fernández-Teruel A, Giménez-Llort L, Escorihuela RM, Gil L, Aguilar R, Steimer T, Tobenã A. Early-life handling stimulation and environmental enrichment. Are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacol Biochem Behav.* 2002;73:233-45.

Finn DA, Snelling C, Fretwell AM, Tanchuck MA, Underwood L, Cole M, Crabbe JC, Roberts AJ. Increased drinking during withdrawal from intermittent ethanol exposure is blocked by the CRF receptor antagonist D-Phe-CRF(12-41). *Alcohol Clin Exp Res.* 2007; 31:939-49.

Food and Drug Administration (FDA). 2013. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DrugSafety/UCM206669.pdf>. Acesso: 23 nov 2013.

Fox C, Merali Z, Harrison C. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. *Behav Brain Res.* 2006;175:1-8.

Francis DD, Diorio J, Plotsky PM, Meaney MJ. Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. *J Neurosci.* 2002;22 (18):7840-3.

Froehlich JC, Li TK. Opioid involvement in alcohol drinking. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;739:156-67.

Froehlich JC. The neurobiology of ethanol- opioid interactions in ethanol reinforcement. *Alcohol Clin Exp Res*. 1996;20:181-6.

Funk CK, O'Dell LE, Crawford EF, Koob GF. Corticotropin-releasing factor within the central nucleus of the amygdala mediates enhanced ethanol self-administration in withdrawn, ethanol-dependent rats. *J Neurosci*. 2006;26(44):11324-32.

George SR, Fan T, Ng G, Jung SY, O'Dowd BF, Naranjo CA. Low endogenous dopamine function in brain predisposes high alcohol preference and consumption: Reversal by increasing synaptic dopamine. *J Pharmacol Exp Therapeut*. 1995;273:373-9.

Gianoulakis C, Krishnan B, Thavundayil J. Enhanced sensitivity of pituitary β -endorphin to ethanol in subjects at high risk of alcoholism. *Arch Gen Psychiatry*. 1996;53(3):250-7.

Gill K, France C, Amit Z. Voluntary ethanol consumption in rats: an examination of blood/brain ethanol levels and behavior. *Alcohol Clin Exp Res*. 1986;10(4):457-62.

Gilpin NW, Koob GF. Neurobiology of alcohol dependence. *Alcohol Res Health*. 2008;31(3):185-95.

Goeders NE, Guerin GF. Non-contingent electric footshock facilitates the acquisition of intravenous cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 1994;114(1):63-70.

Goeders NE. Stress and cocaine addiction. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;301:785-9.

Golde WT, Collobin P, Rodriguez, DVM. A rapid, simple, humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab Animal*. 2005;34: 39-43.

Goldstein DB, Kakihana R. Circadian rhythms of ethanol consumption by mice: a simple computer analysis for chronopharmacology. *Psychopharmacology (Berl)*. 1977;52:41-5.

Green TA, Cain ME, Thompson M, Bardo MT. Environmental enrichment decreases nicotine-induced hyperactivity in rats. *Psychopharmacology*. 2003;170(3):235–41.

Groblewski PA, Bax LS, Cunningham CL. Reference- dose place conditioning with ethanol in mice: empirical and theoretical analysis. *Psychopharmacology*. 2008;201:97-106.

Hadley ME, Haskell-Luevano C. The proopiomelanocortin system. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;885:1-21.

Herman JP, Cullinan WE. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* 1997;20(2):78-84.

Heyser CJ, Roberts AJ, Schulteis G, Koob GF. Central administration of an opiate antagonist decreases oral ethanol self-administration in rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 1999;23(9):1468-76.

Hill KG, Kiefer SW. Naltrexone treatment increases the aversiveness of alcohol for outbred rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;21:637-41.

Hoffman PL, Rabe CS, Moses F, Tabakoff B. N-methyl-D-aspartate receptors and ethanol: inhibition of calcium flux and cyclic GMP production. *J Neurochem.* 1989;52:1937-40.

Holter SM, Spanagel R. Effects of opiate antagonist treatment on the alcohol deprivation effect in longterm ethanol-experienced rats. *Psychopharmacology (Berl).* 1999;145:360-9.

Holtzman SG. Suppression of appetitive behavior in the rat by naloxone: lack of effect of prior morphine dependence. *Life Sci.* 1979; 24:219-26.

Horikawa S, Takai T, Toyosato M, Takahashi H, Noda M, Kakidani H, Kubo T, Hirose T, Inayama S, Hayashida H, Miyata T, Numa S. Isolation and structural organization of the human preproenkephalin B gene. *Nature.* 1983;306(5943):611-4.

Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci.* 2006;29:565-98.

Kamdar NK, Miller SA, Syed YM, Bhayana R, Gupta T, Rhodes JS. Acute effects of naltrexone and GBR 12909 on ethanol drinking-in-the-dark in C57BL/6J mice. *Psychopharmacology (Berl).* 2007;192(2):207-17.

Kauer JA, Malenka RC. Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(11):844-58.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature.* 1997;386(6624):493-5.

Keyes KM, Hatzenbuehler ML, Grant BF, Hasin DS. Stress and alcohol: epidemiologic evidence. *Alcohol Res.* 2012;34(4):391-400.

Khisti RT, Wolstenholme J, Shelton KL, Miles MF. Characterization of the ethanol-deprivation effect in substrains of C57BL/6 mice. *Alcohol.* 2006;40(2):119-26.

Kiefer F, Jahn H, Tarnaske T, Helwig H, Briken P, Holzbach R, Kämpf P, Stracke R, Baehr M, Naber D, Wiedemann K. Comparing and combining naltrexone and acamprosate in relapse prevention of alcoholism: a double-blind, placebocontrolled study. *Arch Gen Psychiatry*. 2003;60(1):92-9.

Koob G, Kreek MJ. Stress, dysregulation of drug reward pathways, and the transition to drug dependence. *Am J Psychiatry*. 2007;164(8):1149-59.

Koob G. Drug addiction. *Neurobiol Dis*. 2000;7(5):543-5.

Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacol*. 2010;35:217-38.

Koob GF, Le Moal M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology*. 2001;24(2):97-129.

Koob GF. Alcoholism: Allostasis and beyond. *Alcohol Clin Exp Res*. 2003; 27:232-43.

Kosten TA, Miserendino MJ, Kehoe P. Enhanced acquisition of cocaine self-administration in adult rats with neonatal isolation stress experience. *Brain Res*. 2000;875(1-2):44-50.

Kreek MJ, Nielsen DA, Butelman ER, LaForge KS. Genetic influences on impulsivity, risk taking, stress responsivity and vulnerability to drug abuse and addiction. *Nat Neurosci*. 2005;8:1450-7.

Larsson F, Winblad B, Mohammed AH. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002;73:193-207.

Lê AD, Poulos CX, Harding S, Watchus J, Juzysch W, Shaham Y. Effects of naltrexone and fluoxetine on alcohol self-administration and reinstatement of alcohol seeking induced by priming injections of alcohol and exposure to stress. *Neuropsychopharmacology*. 1999;21(3):435-44.

Lê AD, Poulos CX, Quan B, Chow S. Alcohol consumption by C57BW6, BALBk, and DBN2 mice in a limited access paradigm. *Pharmacol Biochem Behav*. 1993;47:375-8.

Lê AD, Quan B, Juzytch W, Fletcher PJ, Joharchi N, Shaham Y. Reinstatement of alcohol-seeking by priming injections of alcohol and exposure to stress in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 1998;135(2):169-74.

Lee MY, Yu JH, Kim JY, Seo JH, Park ES, Kim CH, Kim H, Cho SR. Alteration of synaptic activity-regulating genes underlying functional improvement by long-term exposure to an enriched environment in the adult brain. *Neurorehabil Neural Repair*. 2013;27(6):561-74.

Lehmann ML, Herkenham M. Environmental enrichment confers stress resiliency to social defeat through an infralimbic cortex-dependent neuroanatomical pathway. *J Neurosci*. 2011;31:6159-73.

Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)*. 1987;92(2):180-5.

Lovinger DM, White G, Weight FF. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science*. 1989;243(4899):1721-4.

Lu L, Shepard JD, Hall FS, Shaham Y. Effect of environmental stressors on opiate and psychostimulant reinforcement, reinstatement and discrimination in rats: a review. *Neurosci Biobehav Rev*. 2003;5:457-91.

Marashi V, Barnekow A, Ossendorf E, Sachser N. Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. *Horm Behav*. 2003;43(2):281-92.

Marinelli PW, Quirion R, Gianoulakis C. A microdialysis profile of β -endorphin and catecholamines in the rat nucleus accumbens following alcohol administration. *Psychopharmacology*. 2003;169:60-7.

Marlatt GA, Somers JM, Tapert SF. Harm reduction: application to alcohol abuse problems. *NIDA Res Monogr*. 1993;137:147-66.

McKinley MJ, Johnson AK. The physiological regulation of thirst and fluid intake. *News Physiol Sci*. 2004;19:1-6.

McKinzie DL, Nowak KL, Murphy JM, Li TK, Lumeng L, McBride WJ. Development of alcohol drinking behavior in rat lines selectively bred for divergent alcohol preference. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998;22(7):1584-90.

McLaughlin JP, Marton-Popovici M, Chavkin C. Kappa opioid receptor antagonism and prodynorphin gene disruption block stress-induced behavioral responses. *J. Neurosci*. 2003;23:5674-83.

Melendez RI, Middaugh LD, Kalivas PW. Development of an alcohol deprivation and escalation effect in C57BL/6J mice. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006;30(12):2017-25.

Mhatre M, Holloway F. Micro1-opioid antagonist naloxonazine alters ethanol discrimination and consumption. *Alcohol*. 2003;29(2):109-16.

Michajlovskij N, Lichardus B, Kvetnanský R, Ponec J. Effect of acute and repeated immobilization stress on food and water intake, urine output and vasopressin changes in rats. *Endocrinol Exp*. 1988;22(3):143-57.

Middaugh LD, Bandy AL. Naltrexone effects on ethanol consumption and response to ethanol conditioned cues in C57BL/6 mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2000;151(4):321-7.

Mihic SJ, Harris, RA. GABA and the GABAA receptor. *Alcohol Health Res World*. 1997;21:127-31.

Mitchell JE. Naltrexone and hepatotoxicity. *Lancet*. 1986; 24:1(8491):1215.

Mitchell JM, Bergren LJ, Chen KS, Rowbotham MC, Fields HL. (2009). Naltrexone aversion and treatment efficacy are greatest in humans and rats that actively consume high levels of alcohol. *Neurobiol Dis*. 2009;33(1):72-80.

Moncek F, Duncko R, Johansson BB, Jezova D. Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. *J Neuroendocrinol*. 2004;16:423-31.

Moore CF, Protzuk OA, Johnson BA, Lynch WJ. The efficacy of a low dose combination of topiramate and naltrexone on ethanol reinforcement and consumption in rat models. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014;116:107-15.

Mora F, Segovia G, del Arco A. Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Res Rev*. 2007;55(1):78-88.

Morley-Fletcher S, Rea M, Maccari S, Laviola G. Environmental enrichment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play behaviour and HPA axis reactivity in rats. *Eur J Neurosci*. 2003;18(12):3367-74.

Nader J, Chauvet C, Rawas RE, Favot L, Jaber M, Thiriet N, Solinas M. Loss of environmental enrichment increases vulnerability to cocaine addiction. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37(7):1579-87.

Nestler EJ. Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci*. 2005;8(11):1445-9.

Nestler EJ. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(2):119-28.

Nithianantharajah J, Hannan AJ. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7:697-709.

Novaes LS. Proteção conferida pelo enriquecimento ambiental na ansiedade induzida por estresse: a importância da sinalização via GR, ERK e CREB no complexo amigdalóide basolateral de ratos [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2013.

Olive MF, Koenig HN, Nannini MA, Hodge CW. Stimulation of endorphin neurotransmission in the nucleus accumbens by ethanol, cocaine, and amphetamine. *J Neurosci.* 2001; 21(23):184.

O'Malley SS, Jaffe AJ, Chang G, Rode S, Schottenfeld R, Meyer RE, Rounsaville B. Six-month follow-up of naltrexone and psychotherapy for alcohol dependence. *Arch Gen Psychiatry.* 1996;53(3):217-24.

O'Malley SS, Jaffe AJ, Chang G, Schottenfeld RS, Meyer RE, Rounsaville B. Naltrexone and coping skills therapy for alcohol dependence. A controlled study. *Arch Gen Psychiatry.* 1992;49(11):881-7.

Oncken C, van Kirk J, Kranzler HR. (2001) Adverse effects of oral naltrexone: analysis of data from two clinical trials. *Psychopharmacology (Berl).* 2001;154(4):397-402.

Pacak K, Palkovits M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev.* 2001;22:502-48.

Pang TY, Du X, Catchlove WA, Renoir T, Lawrence AJ, Hannan AJ. Positive environmental modification of depressive phenotype and abnormal hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in female C57BL/6J mice during abstinence from chronic ethanol consumption. *Front Pharmacol.* 2013; 23:4:93.

Phillips TJ, Wenger CD, Dorow JD. Naltrexone Effects on Ethanol Drinking Acquisition and on Established Ethanol Consumption in C57BL/6J Mice. *Alcohol Clin Exp Res.* 1997;21(4):691-702.

Piazza PV, Le Moal ML. Pathophysiological basis of vulnerability to drug abuse: role of an interaction between stress, glucocorticoids, and dopaminergic neurons. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1996;36:359-78.

Piazza PV, Deminiere JM, le Moal M, Simon H. Stress- and pharmacologically-induced behavioral sensitization increases vulnerability to acquisition of amphetamine self-administration. *Brain Res.* 1990;514(1):22-6.

Piazza PV, Le Moal M. The role of stress in drug self-administration. *Trends Pharmacol Sci.* 1998;19(2):67-74.

Pohorecky LA. Interaction of ethanol and stress: Research with experimental animals - an update. *Alcohol Alcohol.* 1990;25(2-3):263-76.

Portoghese PS, Sultana M, Takemori AE. Naltrindole, a highly selective and potent non-peptide delta opioid receptor antagonist. *Eur J Pharmacol.* 1988;146:185-86.

Rae MB. Efeitos do enriquecimento ambiental sobre comportamentos induzidos pelo etanol em camundongos Swiss: envolvimento da circuitaria do estresse [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2014.

Rasmussen DD, Bryant CA, Boldt BM, Colasurdo EA, Levin N, Wilkinson CW. Acute alcohol effects on opiomelanocortinergic regulation. *Alcohol Clin Exp Res.* 1998; 22(4):789-801.

Rassnick S, Heinrichs SC, Britton KT, Koob GF. Microinjection of a corticotropin-releasing factor antagonist into the central nucleus of the amygdala reverses anxiogenic-like effects of ethanol withdrawal. *Brain Res.* 1993;605(1):25-32.

Rhodes JS, Best K, Belknap JK, Finn DA, Crabbe JC. Evaluation of a simple model of ethanol drinking to intoxication in C57BL/6J mice. *Physiol Behav.* 2005; 84:53-63.

Rhodes JS, Ford MM, Yu CH, Brown LL, Finn DA, Garland TJr, Crabbe JC. Mouse inbred strain differences in ethanol drinking to intoxication. *Genes Brain Behav.* 2007;6:1-18.

Richardson HN, Lee SY, O'Dell LE, Koob GF, Rivier CL. Alcohol selfadministration acutely stimulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, but alcohol dependence leads to a dampened neuroendocrine state. *Eur J Neurosci.* 2008;28(8):1641-53.

Rockman GE, Gibson JE, Benarroch A. Effects of environmental enrichment on voluntary ethanol intake in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1989;34(3):487-90.

Rodd-Henricks ZA, Mckinzie DL, Murphy JM, McBride WJ, Lumeng L, Li TK. The expression of an alcohol deprivation effect in the high-alcohol-drinking replicate rat lines is dependent on repeated deprivations. *Alcohol Clin Exp Res.* 2000;24(6):747-53.

Rodgers RJ, Johnson NJ. Factor Analysis of Spatiotemporal and Ethological Measures in the Murine Elevated Plus-Maze Test of Anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 1995;52(2):297-303.

Roy V, Belzung C, Delarue C, Chapillon P. Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. *Physiol Behav.* 2001;74:313-20.

Rueda AV, Teixeira AM, Yonamine M, Camarini R. Environmental enrichment blocks ethanol-induced locomotor sensitization and decreases BDNF levels in the prefrontal cortex in mice. *Addict Biol.* 2012;17(4):736-45.

Sale A, Berardi N, Maffei L. Environment and brain plasticity: towards an endogenous pharmacotherapy. *Physiol Rev.* 2014;94(1):189-234.

Sanchis-Segura C, Spanagel R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol.* 2006;11(1): 2-38.

Schlesinger K. Genetic and biochemical determinants of alcohol preference and alcohol metabolism in mice. *Am J Psychiatry* 1966;122:767-73.

Schnabel J. Neuroscience: rethinking rehab. *Nature.* 2009;458:25-7.

Schrijver NC, Bahr NI, Weiss IC, Würbel H. Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002;73:209-24.

Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas (SENAD), Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID). VI Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio das Redes Pública e Privada de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras. 2010. 25 p.

Segovia G, del Arco A, de Blas M, Garrido P, Mora F. Effects of an enriched environment on the release of dopamine in the prefrontal cortex produced by stress and on working memory during aging in the awake rat. *Behav Brain Res.* 2008;187:304-11.

Segovia G, del Arco A, Mora F. Environmental enrichment, prefrontal cortex, stress, and aging of the brain. *J Neural Transm.* 2009;116:1007-16.

Selye H. The evolution of the stress concept. *Am Sci.* 1973;61:692-9.

Selye H. What is stress? *Metabolism.* 1956;5:525-30.

Simpson J, Kelly JP. The impact of environmental enrichment in laboratory rats - Behavioural and neurochemical aspects. *Behavioural Brain Res.* 2011;222:246-64.

Sinclair JD. Evidence about the use of naltrexone and for different ways of using it in the treatment of alcoholism. *Alcohol Alcohol.* 2001;36(1):2-10.

Sinclair JD, Li TK. Long and short alcohol deprivation: effects on AA and P alcohol preferring rats. *Alcohol.* 1989;6(6):505-9.

Sinclair JD, Walker S, Jordan W. Behavioral and physiological changes associated with various durations of alcohol deprivation in rats. *Q J Stud Alcohol.* 1973;34(3):744-57.

Solinas M, Chauvet C, Thiriet N, El Rawas R, Jaber M. Reversal of cocaine addiction by environmental enrichment. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008b;105 (44):17145-50.

Solinas M, Thiriet N, Chauvet C, Jaber M. Prevention and treatment of drug addiction by environmental enrichment. *Prog Neurobiol.* 2010;92(4):572-92.

Solinas M, Thiriet N, Rawas RE, Lardeux V, Jaber M. Environmental enrichment during early stages of life reduces the behavioral, neurochemical, and molecular effects of cocaine. *Neuropsychopharmacol.* 2008a;34(5):1102-11.

Spanagel R. Alcoholism: A systems approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiol Rev.* 2009; 89(2):649–705.

Spanagel R, Höltter SM. Long-term alcohol self-administration with repeated alcohol deprivation phases: an animal model of alcoholism? *Alcohol Alcohol.* 1999;34(2):231-43.

Spanagel, R. Recent animal models of alcoholism. *Alcohol Res Health.* 2000; 24(2):124-31.

Stairs DJ, Bardo M. Neurobehavioral effects of environmental enrichment and drug abuse vulnerability. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009;92(3):377-82.

Stromberg MF, Casale M, Volpicelli L, Volpicelli JR, O'Brien CP. A comparison of the effects of the opioid antagonists naltrexone, naltrindole, and beta-funaltrexamine on ethanol consumption in the rat. *Alcohol.* 1998;15(4):281-9.

Sztainberg Y, Kuperman Y, Tsoory M, Lebow M, Chen A. The anxiolytic effect of environmental enrichment is mediated via amygdalar CRF receptor type 1. *Mol Psychiatry.* 2010;15:905-17.

Takemori AE, Portoghese PS. Comparative antagonism by naltrexone and naloxone of mu, kappa, and delta agonists. *Eur J Pharmacol.* 1984;104(1-2):101-4.

Tarragón E, Baliño P, Aragon CM, Pastor R. Ethanol drinking-in-the-dark facilitates behavioral sensitization to ethanol in C57BL/6J, BALB/cByJ, but not in mu-opioid receptor deficient CXBK mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2012;101(1):14-23.

Tempel A, Gardner EL, Zukin RS. Neurochemical and functional correlates of naltrexone-induced opiate receptor up-regulation. *J Pharmacol Exp Ther.* 1985;232(2):439-44.

Thiriet N, Gennequin B, Lardeux V, Chauvet C, Decressac M, Janet T, Jaber M, Solinas M. Environmental enrichment does not reduce the rewarding and neurotoxic effects of methamphetamine. *Neurotox Res.* 2011;19:172-82.

Ukai M, Holtzman SG. Effect of beta-funaltrexamine on ingestive behaviors in the rat. *Eur J Pharmacol.* 1988;153(2-3):161-5.

Ungless MA, Singh V, Crowder TL, Yaka R, Ron D, Bonci A. Corticotropin-releasing factor requires CRF binding protein to potentiate NMDA receptors via CRF receptor 2 in dopamine neurons. *Neuron.* 2003;39:401-7.

van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci.* 2000;1:191-8.

Vendruscolo LF, Barbier E, Schlosburg JE, Misra KK, Whitfield TW Jr, Logrip ML, Rivier C, Repunte-Canonigo V, Zorrilla EP, Sanna PP, Heilig M, Koob GF. Corticosteroid-dependent plasticity mediates compulsive alcohol drinking in rats. *J Neurosci.* 2012;32(22):7563-71.

Vengeliene V, Bilbao A, Molander A, Spanagel R. Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br J Pharmacol.* 2008;154(2):299-315.

Vengeliene V, Siegmund S, Singer MV, Sinclair JD, Li TK, Spanagel R. A comparative study on alcohol-preferring rat lines: effects of deprivation and stress phases on voluntary alcohol intake. *Alcohol Clin Exp Res.* 2003;27(7):1048-54.

Volpicelli JR, Alterman AI, Hayashida M, O'Brien CP. Naltrexone in the treatment of alcohol dependence. *Arch Gen Psychiatry.* 1992;49(11):876-80.

Welberg L, Thrivikraman KV, Plotsky PM. Combined pre- and postnatal environmental enrichment programs the HPA axis differentially in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology.* 2006;31(5):553-64.

Williams KL, Broadbridge CL. Potency of naltrexone to reduce ethanol self-administration in rats is greater for subcutaneous versus intraperitoneal injection. *Alcohol*. 2009;43(2):119-26.

Williams KL. Development of naltrexone supersensitivity during food-maintained responding enhances naltrexone's ability to reduce ethanol-maintained responding. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007;31(1):39-47.

Wise RA, Bozarth MA. A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev*. 1987; 94(4):469-92.

Wolffgramm J, Heyne A. From controlled drug intake to loss of control: the irreversible development of drug addiction in the rat. *Behav Brain Res*. 1995;70(1):77-94.

World Health Organization (WHO). Global status report on alcohol and health. Geneva: World Health Organization; 2011. 286 p.

World Health Organization (WHO). Global status report on alcohol and health. Geneva: World Health Organization; 2014. 86 p.

Yeomans MR, Gray RW. Effects of naltrexone on food intake and changes in subjective appetite during eating: evidence for opioid involvement in the appetiser effect. *Physiol Behav* 1997;62:15-21.

Yeomans MR, Gray RW. Opioid peptides and the control of human ingestive behaviour. *Neurosci Biobehav Rev*. 2002;26(6):713-28.

Young D, Lawlor PA, Leone P, Dragunow M, During MJ. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nat Med*. 1999;5(4):448-53.

Zalewska-Kaszubska J, Gorska D, Dyr W, Czarnecka E. Effect of acute administration of ethanol on beta-endorphin plasma level in ethanol preferring and non-preferring rats chronically treated with naltrexone. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;85:155-9.

Zhu J, Apparsundaram S, Bardo MT, Dwoskin LP. Environmental enrichment decreases cell surface expression of the dopamine transporter in rat medial prefrontal cortex. *J Neurochem*. 2005;93:1434-43.

Zimmermann A, Stauffacher M, Langhans W, Wurbel H. Enrichment-dependent differences in novelty exploration in rats can be explained by habituation. *Behav Brain Res*. 2001;121:11-20.