

ANDRÉ VELOSO LIMA RUEDA

**O ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL INIBE A SENSIBILIZAÇÃO  
COMPORTAMENTAL AO ETANOL EM CAMUNDONGOS: EFEITOS SOBRE  
O EGR-1 E A SINALIZAÇÃO DO BDNF**

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  
2011

ANDRÉ VELOSO LIMA RUEDA

**O ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL INIBE A SENSIBILIZAÇÃO  
COMPORTAMENTAL AO ETANOL EM CAMUNDONGOS: EFEITOS SOBRE O  
EGR-1 E A SINALIZAÇÃO DO BDNF**

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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosana Camarini

São Paulo  
2011

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

© reprodução total

Rueda, André Veloso Lima.

O enriquecimento ambiental inibe a sensibilização comportamental ao etanol em camundongos: efeitos sobre o Egr-1 e a sinalização do BDNF / André Veloso Lima Rueda. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Rosana Camarini.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Psicofarmacologia.

Versão do título para o inglês: Environmental enrichment blocks the behavioral sensitization to ethanol in mice: effects on Egr-1 and the BDNF signalling.

Descritores: 1. Dependência 2. Sensibilização comportamental 3. Etanol 4. Enriquecimento ambiental 5. BDNF/TrkB 6. Egr-1  
I. Camarini, Rosana II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB041/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): André Veloso Lima Rueda.

Título da Dissertação: O enriquecimento ambiental inibe a sensibilização comportamental ao etanol em camundongos: efeitos sobre o Egr-1 e a sinalização do BDNF.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup> Dra. Rosana Camarini.

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

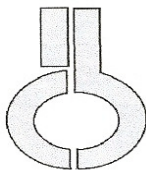
**Aprovado(a)**

**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 – telefax : (55) (011) 3091.7438  
e-mail: cep@icb.usp.br

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 149 nas fls. 39 do livro 2 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Rosana Camarini, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "***Influência do contexto ambiental em mecanismos moleculares e comportamentais da exposição repetida ao etanol***" do qual participou(aram) o(s) alunos **Sabrina L. Soares, Priscila C. do Nascimento, Jaqueline Rocha, Rulian R. Faria, André Rueda e os pesquisadores Cristóforo Scavone , Luiz Roberto G. de Britto**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **17.04.2007**.

São Paulo, 17 de abril de 2007.

Prof. Dr. **UBIRATAN FABRES MACHADO**  
Coordenador  
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. **PATRÍCIA GAMA**  
Secretária-Suplente  
CEEA - ICB/USP

*Ao Bruno e ao Fabrizio, meus sobrinhos  
amados,  
À Carine, minha irmã mais do que querida,  
Aos meus pais, Zito e Izabel, por  
absolutamente tudo o que sempre fizeram  
por mim, dedico este trabalho.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Profa. Dra. Rosana Camarini por ter me aceito em seu laboratório, ter me orientado desde a minha iniciação científica e me ensinado inúmeras coisas. Mas mais importante do que isso, para mim, é agradecer por sua amizade, por sua confiança e por acreditar em mim. Sei que posso contar com ela tanto para discutir uma ideia de projeto quanto para dar uma boa risada, e também para superar os momentos mais difíceis e fases ruins. Sua compreensão é um traço marcante em sua maneira de lidar com as pessoas, traço este que foi fundamental para a realização deste trabalho, e ao longo de toda a minha vida em seu laboratório. Obrigado é pouco para expressar o quanto eu sou grato por ter tido uma orientadora como ela!

Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Neuroquímica e Farmacologia Comportamental por terem a capacidade de converter um dia longo de trabalho, por vezes cansativo, em uma tarefa mais agradável. Por terem me ajudado a crescer. Por terem compartilhado comigo suas alegrias, suas tristezas, incontáveis momentos especiais. E por terem transformado outros tantos momentos, banais, em coisas significativas. E, aqui, eu incluo os amigos que estão, os que já saíram ou os que nunca foram do laboratório, mas que estiveram sempre tão presentes que certas formalidades deixaram de existir: Ana, Daniel, Diego, Jaqueline, Cristina, Marília, Mariana, Priscila, Rulian, Sabrina. Se eu agradecer a cada um por tudo o que fizeram por mim, ou por tudo que passamos juntos, essa dissertação precisaria de dois volumes – no mínimo.

Agradeço aos amigos e colegas do Departamento de Farmacologia, especialmente a Elisa, o João, a Lídia, o Lucas e a Simon, por terem sido solícitos sempre que precisei de ajuda! Incluo aqui também os funcionários Mateus e Manoel, que me ajudaram a cuidar dos camundongos e de diversos outros assuntos.

Agradeço às amigas da UNIFESP, Gabizinha, Andrezza, Francine, Suzi e Shirley, pelas ótimas conversas, trocas de presentes no Natal e de conhecimentos ao longo do resto do ano, e viagens inesquecíveis; além do trabalho na LASBRA!

Agradeço ao Prof. Dr. Luiz Roberto G. de Britto por ter permitido que eu utilizasse as dependências de seu laboratório para realizar os procedimentos de imuno-histoquímica, e também por sua gentileza. Agradeço ao Adilson e ao Daniel

pela imensa ajuda, e a todos os membros - oficiais ou visitantes - dos Laboratórios de Neurobiologia Celular e de Comunicação Neuronal pela ótima companhia.

Agradeço ao Prof. Dr. Mauricio Yonamine por ter realizado as dosagens de alcoolemia de meus experimentos. Muito obrigado!

Agradeço ao Prof. Dr. Cristóforo Scavone e à Larrissa por possibilitarem a utilização do Laboratório de Neurofarmacologia Molecular para que eu fizesse os extratos para o ensaio de ELISA.

Agradeço à Profa. Dra. Elizabeth Teodorov, à Cris e à Sá pela gigantesca ajuda que me deram para que eu realizasse os ensaios de Western Blot. MUITÍSSIMO obrigado!

Pelas observações muito construtivas durante meu exame de qualificação, agradeço à Profa. Dra. Silvana Chiavegatto, à Profa. Dra. Valquíria Dorce e ao Prof. Dr. José Ernesto Belizário. Agradeço ainda à Profa. Dra. Tânia Marcourakis e aos seus alunos, Larissa, Lívia e Raphael pelas dicas para a realização do meu exame.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro, sem o qual este trabalho não teria sido realizado.

Foi imprescindível para mim a companhia dos meus amigos ao longo do Mestrado, e faço questão de citar os que estiveram mais presentes: Alexandre Herman, Arion, Atique, Bia, Bruno, Camila, Carol S., Carol V., Cibele, Cin, Cintia, Clarissa, Dani B., Dudes, Edson, Elaine, Elza, Erika, Fábio, Fernando L., Fernanda P., Fernanda Sais, Gerson, Joice, Juliana P., Kallene, Karina, Lígia, Lorena, Lucas, Luciano, Maíra, Maneco, Mariana Bretas, Meire, Mel, Mônica, Rafael, Roberto, Rodrigo, Sofia, Sumô, Taarna, Taiane, Vitor, Vivi, Yumi, Zé (e algumas pessoas que já foram mencionadas anteriormente). Graças a vocês eu consegui chegar até aqui, quero que saibam o quanto são importantes para mim.

Agradeço à Luciana por toda a ajuda que me deu no último ano, sem a qual estas páginas não teriam sido escritas. MUITÍSSIMO obrigado!

Agradeço ao Lucas por me aguentar durante esse tempo todo! Por ser compreensivo quando não pude estar presente, ou por quando me atrasei quase uma hora. Agradeço por todas as vezes que me fez companhia, fosse para ir passear ou para ir ao laboratório tratar camundongos. Obrigado por tudo o que passamos juntos, por sempre me deixar mais tranquilo e confiante, e por deixar meus dias cada vez mais felizes.



Agradeço à minha família - meus pais, irmã, sobrinhos, tios, primos, madrinha - pelo apoio e pelo amor que sempre me deram. Especialmente, gostaria de agradecer aos meus pais, que se sacrificam para que seus filhos realizem seus sonhos. Agradeço pelo incentivo, pelo carinho, pela segurança, pela dedicação e pelo exemplo.

Muito obrigado!

*“Tudo, aliás, é a ponta de um mistério.  
Inclusive, os fatos. Ou a ausência deles.  
Duvida? Quando nada acontece, há um  
milagre que não estamos vendo.”*

João Guimarães Rosa

## RESUMO

RUEDA, A. V. L. **O enriquecimento ambiental inibe a sensibilização comportamental ao etanol em camundongos:** efeitos sobre o Egr-1 e a sinalização do BDNF. 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O uso de drogas de abuso pode levar a alterações neuroplásticas duradouras no encéfalo, entre elas a sensibilização comportamental (SC), um fenômeno relacionado à dependência. O enriquecimento ambiental (EA) permite estudar a influência do ambiente na resposta a diversas manipulações, entre elas o tratamento com drogas de abuso. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do EA sobre a SC ao etanol, e sobre a expressão de proteínas envolvidas nas respostas às drogas de abuso: BDNF, TrkB e Egr-1. Para tanto, camundongos foram expostos ao EA, e então tratados repetidamente com uma dose baixa (1,8 g/kg) de etanol. Outros grupos foram submetidos ao protocolo de SC e posteriormente expostos ao EA. O EA protegeu os animais de desenvolverem a SC ao etanol, bem como promoveu sua reversão. O EA diminuiu os níveis de BDNF no córtex pré-frontal e de TrkB no hipocampo, e aumentou a expressão de Egr-1 no córtex insular. O EA pode ser considerado uma estratégia útil para a reversão dos efeitos da SC, que está associada à fissura e a episódios de recaídas na dependência.

**Palavras-chave:** Dependência. Sensibilização comportamental. Etanol. Enriquecimento ambiental. BDNF. TrkB. Egr-1.

## ABSTRACT

RUEDA, A. V. L. **Environmental enrichment blocks the behavioral sensitization to ethanol in mice: effects on Egr-1 and the BDNF signalling.** 2011. 80 p. Masters thesis (Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The use of addiction drugs can lead to long-term neuroplastic changes on the brain, such as behavioral sensitization (BS), a phenomenon related to addiction. Environmental enrichment (EE) is a strategy used to study the environmental influence on the response to several manipulations, including the treatment with addiction drugs. The aim of this work was to evaluate the effects of EE on the BS to ethanol and on the expression of proteins related to the response to drugs of abuse, as BDNF, TrkB and Egr-1. Thus, mice were exposed to EE and then repeatedly treated with a low dose (1.8 g/kg) of ethanol. Other group of mice was first submitted to the BS protocol and then exposed to EE. EE protected the mice from developing the BS to ethanol, and promoted its reversion. EE decreased BDNF levels in the prefrontal cortex and TrkB in the hippocampus, and increased Egr-1 expression in the insular cortex. EE can be considered a useful strategy to block BS effects, a phenomenon related to craving and relapse.

**Keywords:** Addiction. Behavioral sensitization. Ethanol. Environmental enrichment. BDNF. TrkB. Egr-1.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Condições diferenciais de alojamento entre os grupos não enriquecidos e enriquecidos.....	32
<b>Figura 2.</b> Atividade locomotora total, registrada em campo-aberto (Experimento I)	46
<b>Figura 3.</b> Atividade locomotora total, registrada em campo-aberto, nos dias de habituação e tratamento (Experimento II).....	47
<b>Figura 4.</b> Atividade locomotora total registrada em campo-aberto no dia de desafio (D22) (Experimento II).....	48
<b>Figura 5.</b> Atividade locomotora total, registrada em campo-aberto (Experimento III).....	49
<b>Figura 6.</b> Níveis do fator neurotrófico derivado de encéfalo (BDNF) no córtex pré-frontal.....	51
<b>Figura 7.</b> Níveis do fator neurotrófico derivado de encéfalo (BDNF) no hipocampo.....	52
<b>Figura 8.</b> Expressão proteica de TrkB no córtex pré-frontal.....	53
<b>Figura 9.</b> Expressão proteica de TrkB no hipocampo.....	54
<b>Figura 10.</b> Contagem de núcleos marcados positivamente para Egr-1 no córtex pré-frontal medial dorsal.....	55
<b>Figura 11.</b> Contagem de núcleos marcados positivamente para Egr-1 no córtex pré-frontal medial ventral.....	56
<b>Figura 12.</b> Contagem de núcleos marcados positivamente para Egr-1 no córtex insular.....	56
<b>Figura 13.</b> Fotomicrografias de secções coronais ao nível do córtex insular.....	57
<b>Figura 14.</b> Contagem de núcleos marcados positivamente para Egr-1 no núcleo accumbens.....	58
<b>Figura 15.</b> Fotomicrografias de secções coronais ao nível do núcleo accumbens.	59
<b>Figura 16.</b> Contagem de núcleos marcados positivamente para Egr-1 no hipocampo.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPC – Monofostato de adenosina cíclico

ANOVA – Análise de Variância

BDNF – Brain-derived neurotrophic factor (fator neurotrófico derivado do encéfalo)

CEBRID – Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas

CRE – Elemento de resposta ao AMPC

CREB – Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPC

D1 – dia de tratamento 1

D8 – dia de tratamento 8

D15 – dia de tratamento 15

D22 – dia de tratamento 22 (dia de desafio)

DSM-IV – Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – Fourth Edition

EA – Enriquecimento Ambiental

Egr-1 – Early growth response protein – 1

*egr-1* – Early growth response gene – 1

ELISA – Enzyme-linked Immunosorbent Assay

GABA – Ácido  $\gamma$ -aminobutírico

H1 – dia de habituação 1

H2 – dia de habituação 2

i.p. – intraperitoneal

LORR – Loss of righting response (perda de reflexo postural)

LPS - Lipopolissacarídeo

LTP – Long term potentiation (potenciação de longa duração)

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno

NF- $\kappa$ B – Nuclear factor kappa B (fator nuclear kappa B)

NGF – Fator de crescimento do nervo

NMDA – N-metil-D-aspartato

PFA – paraformaldeído

PI3K – Fosfatidilinositol-3 – quinase

PKA – Proteína quinase A

RACK-1 – Receptor for activated protein kinase C

RNA<sub>m</sub> – Ácido ribonucleico mensageiro

SENAD – Secretaria Nacional Antidrogas

TrkB – Tropomyosin-related kinase – B

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1 <i>Etanol: mecanismos de ação e sensibilização comportamental</i> .....	20
1.2 <i>Enriquecimento ambiental e dependência</i> .....	23
1.3 <i>Relações entre EA, dependência e a sinalização do BDNF</i> .....	24
1.4 <i>Relações entre EA, dependência e a expressão de Egr-1</i> .....	27
<b>2 OBJETIVOS GERAIS</b> .....	29
<b>3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	30
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
4.1 <i>Sujeitos experimentais</i> .....	31
4.2 <i>Condições ambientais</i> .....	31
4.3 <i>Drogas</i> .....	33
4.4 <i>Testes comportamentais</i> .....	33
4.5 <i>Alcoolemia</i> .....	33
4.6 <i>Extração de proteínas para detecção do BDNF</i> .....	34
4.7 <i>Avaliação da expressão de BDNF por ELISA</i> .....	34
4.8. <i>Extração de proteínas para detecção do receptor TrkB</i> .....	35
4.9 <i>Avaliação da expressão de TrkB por Western Blot</i> .....	36
4.10 <i>Preparação das amostras para imuno-histoquímica</i> .....	38
4.11 <i>Imuno-histoquímica para Egr-1</i> .....	38
4.12 <i>Análise microscópica</i> .....	39
4.13 <i>Delineamentos Experimentais</i> .....	39
4.13.1 <u>Experimento I - Efeito do enriquecimento ambiental sobre a atividade locomotora no tratamento repetido de etanol</u> .....	39
4.13.2 <u>Experimento II - Efeito do enriquecimento ambiental durante o período de abstinência sobre a atividade locomotora em animais tratados previamente com etanol</u> .....	40
4.13.3 <u>Experimento III – Controle da condição de enriquecimento ambiental sobre a atividade locomotora no tratamento repetido de etanol</u> .....	41
4.14 <i>Análise estatística dos dados</i> .....	41
<b>5 RESULTADOS</b> .....	43
5.1 <i>Experimento I - Efeito do enriquecimento ambiental sobre a atividade locomotora no tratamento repetido de etanol</i> .....	43



<i>5.2 Experimento II - Efeito do enriquecimento ambiental durante o período de abstinência sobre a atividade locomotora em animais tratados previamente com etanol.....</i>	<i>44</i>
<i>5.3 Experimento III – Controle da condição de enriquecimento ambiental sobre a atividade locomotora no tratamento repetido de etanol.....</i>	<i>45</i>
<i>5.3 Alcoolemia.....</i>	<i>49</i>
<i>5.4 Detecção dos níveis de BDNF.....</i>	<i>49</i>
<i>5.5 Detecção dos níveis de TrkB.....</i>	<i>50</i>
<i>5.6 Avaliação da expressão de Egr-1 por imuno-histoquímica.....</i>	<i>54</i>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Em pesquisa realizada pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) em colaboração com a SENAD (Secretaria Nacional Antidrogas), envolvendo uma amostra de 7.939 brasileiros, com idade entre 12 e 65 anos, de 108 cidades com mais de 200 mil habitantes, foi estimado que 22,8% da população já haviam feito uso de drogas ao longo da vida, exceto álcool e tabaco. Em relação ao álcool, 74,6% dos indivíduos eram usuários de bebidas alcoólicas, sendo que 12,3% dos entrevistados foram considerados dependentes. Isso resulta numa população de 5.799.005 habitantes (CEBRID e SENAD, 2005).

Além das perdas de ordem da saúde pública, a dependência traz sérios prejuízos aos indivíduos acometidos por esta doença, que sofrem com problemas médicos graves, com estigmas sociais e com dificuldades para exercer seu papel na família, nos ambientes de trabalho e recreativo (VOLKOW e LI, 2005; ROSS e PESELOW, 2009).

A dependência a drogas, de acordo com o DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - Fourth Edition*), é definida como um padrão mal adaptado do uso de uma dada substância, a despeito de suas consequências negativas. É considerada uma doença neurobiológica crônica decorrente de interações complexas entre a exposição repetida a drogas, fatores biológicos e ambientais (VOLKOW e LI, 2005). É um quadro que vem sendo entendido como resultante de formação de memória e aprendizado aberrantes, com corrupção da circuitaria neuronal relacionada à recompensa e a comportamentos adaptativos como resultado do uso repetido de drogas (ROSS e PESELOW, 2009).

O consumo repetido de drogas de abuso leva a neuroadaptações que, juntamente com as propriedades de reforço da droga, contribuem para o processo de dependência. O reforço se refere ao potencial da droga em induzir um aumento na probabilidade de resposta (uso contínuo da droga apesar das consequências deletérias). A neuroadaptação se refere ao processo pelo qual os efeitos iniciais da droga são aumentados (sensibilização) ou atenuados (tolerância) após exposição repetida, bem como às alterações que levam à manifestação dos sintomas da síndrome de abstinência característicos de uma dada substância (ROBINSON e BERRIDGE, 2003).

Fatores genéticos (como variantes de enzimas metabolizadoras), ambientais (como estresse) e intrínsecos à substância de abuso (como via de administração e lipossolubilidade) contribuem para que um indivíduo desenvolva ou não a dependência (VOLKOW, 2008).

Dada essa variedade de fenômenos envolvidos, o desenvolvimento de modelos de estudo para a dependência se torna uma tarefa igualmente complexa: cada um dos modelos existentes permite que sejam avaliados apenas alguns aspectos da dependência. Por exemplo, o modelo de preferência condicionada ao lugar é utilizado para se avaliar as propriedades de recompensa e reforço da droga, enquanto que o modelo de perda de reflexo postural (*loss of righting reflex* – LORR) é utilizado para estudar as propriedades sedativas e hipnóticas de um fármaco depressor do Sistema Nervoso Central como o etanol (YAKA et al., 2003).

Sabe-se que a administração repetida de drogas psicoestimulantes, opioides e etanol pode levar a um aumento progressivo de seus efeitos locomotores, e inúmeros estudos têm usado este fenômeno, conhecido como sensibilização comportamental, como modelo de neuroadaptação que permeia a dependência (MASUR e BOERNGEN, 1980; LEITH e KUCZENSKI, 1981; CAMARINI; ANDREATINI; MONTEIRO, 1995; FARIA et al., 2008). A sensibilização é acompanhada por alterações neurobiológicas que se correlacionam com um estado de incentivo motivacional descrito como “desejo”, “compulsão”, “fissura”, o qual aumenta progressivamente com o uso contínuo ou intermitente da droga. As neuroadaptações subjacentes à sensibilização alteram o funcionamento do circuito neural envolvido em motivação, induzindo uma saliência dos efeitos da droga, ou, em outras palavras, estes efeitos tornam-se cada vez mais atraentes (ROBINSON e BERRIDGE, 2008).

A sensibilização comportamental parece ser mediada principalmente pelo sistema dopaminérgico mesolímbico/mesocortical, composto por neurônios cujos corpos celulares localizam-se na área ventral do tegmento mesencefálico e que se projetam para áreas límbicas como o núcleo accumbens, principalmente, mas também para a amígdala, hipocampo, tubérculo olfatório e septo lateral e áreas do córtex frontal, como córtex cingulado, córtex orbitofrontal e córtex pré-frontal medial (KALIVAS; SORG; HOOKS, 1993; CADOR; BJIJOU; STINUS, 1995). Este fenômeno apresenta dois componentes: o desenvolvimento e a expressão. Define-se *desenvolvimento* como um termo operacional referente aos efeitos moleculares e/ou

celulares imediatos que induzem a sensibilização, e *expressão* refere-se às consequências prolongadas desses efeitos. Os corpos celulares dopaminérgicos localizados na área ventral do tegmento mesencefálico são os centros anatômicos responsáveis pelo desenvolvimento da sensibilização, enquanto os botões terminais prosencefálicos, sobretudo aqueles localizados no núcleo accumbens, por sua expressão (KALIVAS e STEWART, 1991).

A sensibilização comportamental é considerada um fenômeno intrínseco à perda de controle sobre o consumo de drogas, provavelmente por representar um reforço positivo para o dependente. A sensibilização também estaria associada aos episódios de recaídas, uma vez que os circuitos neuronais responsáveis pela transição do “gostar” para o “querer” a droga mantêm-se em um estado sensibilizado por meses e até anos, podendo ser disparados por pistas ambientais associadas ao consumo da droga, levando a um incentivo motivacional para a busca da mesma (ROBINSON e BERRIDGE, 2008).

O alto risco de recaídas, mesmo depois de longos períodos após o último uso e dos últimos sintomas de síndrome de abstinência terem se apresentado, é uma das características marcantes da dependência e é considerado a principal dificuldade para o tratamento desta doença (HYMAN, 2005).

### *1.1 Etanol: mecanismos de ação e sensibilização comportamental*

O mecanismo de ação do etanol envolve múltiplos sítios subcelulares no sistema nervoso central e, assim, ele influencia o funcionamento de muitos, se não de todos, os sistemas neuronais nos níveis molecular, celular e de sistema (FADDA e ROSSETTI, 1998). Entretanto, suas ações mais pronunciadas se dão como regulador alostérico positivo do receptor ionotrópico do aminoácido GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) (receptor GABA<sub>A</sub>) e como regulador alostérico negativo do receptor de glutamato do tipo NMDA, sendo classificado como um fármaco majoritariamente depressor do Sistema Nervoso Central.

Quando em altas doses, o etanol atuaria preferencialmente nos receptores GABA<sub>A</sub> pós-sinápticos e inibiria os receptores do tipo NMDA de glutamato, contribuindo para a hiperpolarização da célula, sendo este fenômeno responsável pelos efeitos depressores (sedativos e disfóricos) do álcool (HOFFMAN e TABAKOFF, 1993; FADDA e ROSSETTI, 1998).

No sistema de recompensa (vias dopaminérgicas mesolímbica e mesocortical), o etanol atua, quando em baixas doses, em receptores GABA<sub>A</sub> pré-sinápticos presentes em interneurônios gabaérgicos na área ventral do tegmento mesencefálico. Estes interneurônios, uma vez inibidos em decorrência da ação do etanol, permitem que os neurônios dopaminérgicos presentes na pós-sinapse sejam ativados (devido à retirada da inibição), levando à liberação de dopamina no núcleo accumbens. De maneira similar, o etanol também inibe neurônios do núcleo accumbens que oferecem uma alça de *feedback* negativo sobre os corpos celulares dopaminérgicos presentes na área ventral do tegmento mesencefálico. O efeito depressor do etanol sobre a inibição dos neurônios dopaminérgicos também colabora para o aumento nos níveis de dopamina no núcleo accumbens (SPANAGEL e WEISS, 1999; SPANAGEL, 2009).

Outra hipótese para o mecanismo de ação do etanol no sistema de recompensa considera o papel de projeções glutamatérgicas excitatórias sobre os interneurônios gabaérgicos da área ventral do tegmento mesencefálico. Com a presença do etanol, a transmissão glutamatérgica via NMDA estaria bloqueada no interneurônio gabaérgico, impedindo a sua função e, assim, permitindo a ativação dos neurônios dopaminérgicos, culminando na liberação de dopamina no núcleo accumbens (FADDA e ROSSETTI, 1998).

A maior disponibilidade de dopamina na fenda sináptica leva a uma maior ativação de seus receptores, especialmente do tipo D<sub>1</sub>. Este receptor é do tipo metabotrópico, acoplado à proteína G estimulatória, e pode, portanto, aumentar os níveis intracelulares do segundo mensageiro AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) pela estimulação da enzima adenilil ciclase. Os níveis aumentados de AMPc levam à ativação da proteína quinase A (PKA), cujas subunidades catalíticas translocam para o núcleo e fosforilam o CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc), que, por sua vez, modula a transcrição de diversos genes. Entre estes genes há alguns responsáveis por efeitos imediatos e outros pelos efeitos duradouros da droga (NESTLER, 2004).

O aumento dos níveis de dopamina no núcleo accumbens está associado aos efeitos de euforia e desinibição do etanol, bem como de outras drogas de abuso, e é um dos processos passíveis de sofrer sensibilização após um tratamento repetido com a droga, inclusive em humanos (DI CHIARA, 1999; ROBINSON e BERRIDGE, 2008; VEZINA e LEYTON, 2009).

A perda do controle do consumo de bebidas alcoólicas é um aspecto fundamental da dependência ao álcool. Entretanto, o processo que delimita a transição do beber controlado para a dependência ainda é desconhecido, mas está sujeito a fatores genéticos, ambientais e psicológicos. A sensibilização comportamental é considerada um fenômeno intrínseco a essa perda de controle, bem como aos episódios de recaídas (ROBINSON e BERRIDGE, 2008).

Embora a sensibilização comportamental ao etanol não seja consistentemente ligada ao contexto ambiental (DIDONE et al., 2008), tem-se demonstrado que fatores ambientais modulam a estimulação comportamental induzida pelo etanol e também o desenvolvimento da sensibilização comportamental (CUNNINGHAM e NOBLE, 1992; BOEHM et al., 2008; MEYER et al., 2005; PASTOR; MIQUEL; ARAGON, 2005; VEZINA e LEYTON, 2009). Por exemplo, se o animal recebe a droga repetidamente em um mesmo ambiente, ele é capaz de associar as pistas com os efeitos farmacológicos da droga. Essas pistas eliciam respostas antecipatórias que podem modular o comportamento do animal e contribuir para o desenvolvimento da tolerância ou sensibilização (SIEGEL, 1999; STEWART; DE WITT; EIKELBOOM, 1984).

Sabe-se que o aprendizado associativo é dependente de glutamato via receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), os quais estão envolvidos em processos de plasticidade neuronal (TRUJILLO e AKIL, 1995). Já foi verificado que antagonistas do receptor NMDA bloqueiam o desenvolvimento da sensibilização comportamental ao etanol, o que corrobora a hipótese de que exista um fator de associação com o ambiente no desenvolvimento deste fenômeno (CAMARINI et al., 2000). Apesar dos inúmeros trabalhos mostrando a importância do contexto ambiental nos processos adaptativos que permeiam a sensibilização, não existem estudos que mostrem se um ambiente enriquecido pode também alterar a sensibilização aos efeitos estimulantes locomotores do etanol.

## *1.2 Enriquecimento ambiental e dependência*

O enriquecimento ambiental (EA) consiste na exposição de roedores a estímulos como brinquedos, rodas de exercício e interações sociais com outros indivíduos e tem sido utilizado para demonstrar mudanças que ocorrem no encéfalo em resposta à interação com o ambiente (VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000). É um método empregado para fornecer uma estimulação ambiental suplementar em estudos de plasticidade comportamental e neurobiológica. Este modelo mostrou-se capaz de gerar mudanças morfofisiológicas em áreas encefálicas críticas para a memória e aprendizado, tais como o aumento de ramificações dendríticas, contatos sinápticos e neurotransmissão (GREEN; GREENOUGH; SCHLUMPF, 1983; GREEN e GREENOUGH, 1986), tamanho neuronal (DIAMOND, 1967), aumento da potenciação de longa duração (LTP) (DUFFY; CRADDOCK; NGUYEN, 2001) e da neurogênese (BROWN et al., 2003; SEGOVIA et al., 2006).

Mudanças moleculares e neuroquímicas também puderam ser observadas, como aumento nos níveis de sinaptofisina no hipocampo e neocórtex de camundongos (LAMBERT; FERNANDEZ; FRICK, 2005), aumento da expressão de CREB no hipocampo de camundongos (WILLIAMS et al., 2001) e RNAm de neurotrofinas, como o NGF (fator de crescimento do nervo) no hipocampo de ratos (TORASDOTTER et al., 1996; TORSDOTTER et al., 1998). A transmissão glutamatérgica induzida por anfetamina também se encontra aumentada no núcleo accumbens de ratos expostos a um ambiente enriquecido (RAHMAN e BARDO, 2008). Além disso, foi observada melhora no desempenho em testes de memória e aprendizado e reversão do prejuízo de memória em roedores idosos (LAMBERT et al., 2005; BENNETT et al., 2006).

Também foram encontrados efeitos do EA sobre a resposta de roedores a diversas drogas de abuso (para revisão, ver STAIRS e BARDO, 2009), como o menor consumo de anfetamina exibido por ratos crescidos em um ambiente enriquecido (BARDO et al., 2001) e a reversão da sensibilização comportamental e da preferência condicionada ao lugar induzidas por cocaína (SOLINAS et al., 2008). Em contrapartida, Green et al. (2010) encontraram, em ratos expostos ao EA, uma maior preferência condicionada ao lugar induzida por cocaína, apesar dos mesmos animais apresentarem menor auto-administração da droga. Este quadro

comportamental está associado a uma menor ativação de CREB no núcleo accumbens destes animais (GREEN et al., 2010).

Em relação ao etanol, os efeitos do EA também são controversos. Rockman, Gibson e Benarroch (1989) encontraram um aumento no consumo voluntário de etanol em ratos criados em condições enriquecidas, enquanto que Deehan, Cain e Kiefer (2007) observaram que ratos criados isoladamente preferiam beber solução de etanol 10% a beber água, ao contrário daqueles criados em ambiente enriquecido.

De um modo geral, tem-se proposto que o EA possa reduzir o impacto de pistas ambientais associadas aos efeitos das drogas de abuso e, desta forma, representar uma intervenção útil na atenuação da fissura eliciada por estas pistas.

Os mecanismos pelos quais o EA promove todas estas alterações ainda não estão claramente definidos (ROSSI et al., 2006), mas já são conhecidos mediadores implicados em alguns dos fenômenos observados. Entre estes mediadores está o fator neurotrófico derivado de encéfalo (BDNF) e seu receptor TrkB, cuja importância na neurogênese hipocampal foi demonstrada por Rossi et al. (2006) e na dependência por Corominas et al. (2007).

### *1.3 Relações entre EA, dependência e a sinalização do BDNF*

O BDNF é uma proteína do grupo das neurotrofinas, peptídeos importantes no desenvolvimento do sistema nervoso e na manutenção da integridade neuronal e plasticidade em indivíduos jovens. As neurotrofinas ligam-se a receptores p75 e sabe-se do seu papel associado a processos que levam à morte celular e apoptose (HEMPSTEAD e SALZER, 2002). Algumas neurotrofinas se ligam a receptores da família da tirosina quinase (Trk – *tropomyosin-related kinases*) e estão envolvidas em processo de sobrevivência celular (CONNOR e DRAGUNOW, 1998). Por exemplo, o NGF se liga a receptores TrkA e o BDNF, a receptores TrkB, e iniciam uma cascata de transdução de sinais intracelulares que leva, em particular, à ativação do elemento responsivo ao AMPc (CRE) na região promotora do gene alvo.

Quando as neurotrofinas se ligam a receptores Trk, acredita-se que induzem a dimerização do receptor e subsequente mudança na conformação de suas proteínas, levando à ativação da tirosina quinase intracelular (HUANG e REICHARDT, 2003; PATTARAWARAPAN e BURGESS, 2003). O domínio ativador



da fosforilação da tirosina quinase causa ativação de múltiplas cascatas de transdução de sinais como RAS/proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e fosfolipase C (ENCINAS et al.,1999). Várias destas cascatas convergem na regulação de genes-alvo que podem modular a atividade de fatores de transcrição comuns.

O BDNF é um gene induzido pelo AMPc, sendo regulado pelo CREB. É considerado um fator neurotrófico envolvido na modulação da transmissão sináptica, na regulação da LTP (SOULÉ; MESSAOUDI; BRAHAM, 2006) e em modelos animais de aprendizagem e memória (HELDT et al., 2007). O aumento da transmissão sináptica rápida, regulado pelo BDNF, está relacionado com a facilitação da liberação de neurotransmissores (SCHINDER e POO, 2000). Nesse sentido, o BDNF modula canais iônicos pós sinápticos (SCHINDER e POO, 2000), a atividade de receptores NMDA (LEVINE et al., 1998) e tem papel importante na LTP.

Sabe-se que a expressão de BDNF aumenta em resposta a vários tipos de injúria neuronal, como efeito compensatório após o dano cerebral (HICKS et al.,1999).

O BDNF é um fator de crescimento envolvido em plasticidade neuronal, sendo capaz de modular o desenvolvimento de sistemas de neurotransmissão, incluindo o sistema dopaminérgico (MAMOUNAS et al., 2000; SOKOLOFF et al., 2002).

Na década de 90, vários investigadores passaram a estudar o papel do BDNF nas respostas comportamentais, neuroquímicas e neuroadaptativas às drogas de abuso e a relação com o sistema dopaminérgico mesolímbico. Em uma recente revisão sobre este fator neurotrófico, os estudos sugerem que o envolvimento do BDNF na facilitação ou inibição dos comportamentos de consumo das drogas depende do tipo da droga, do sítio encefálico, da fase da dependência (início, manutenção ou abstinência) e de fatores relacionados à administração da droga (GHITZA et al., 2009). Alguns exemplos seguem abaixo.

Estudos comportamentais mostram que a infusão de BDNF em áreas mesolímbicas dopaminérgicas aumenta os efeitos locomotores da cocaína (SOKOLOFF et al., 2001). Por outro lado, camundongos *knock-out* para BDNF mostram uma redução na hiperatividade induzida por cocaína (HALL et al., 2003), na sensibilização motora (HORGGER et al., 1999) e na preferência condicionada ao lugar (HALL et al., 2003). Tanto a administração aguda quanto crônica de cocaína aumentam os níveis de RNAm de BDNF no núcleo accumbens de ratos.

De fato, o BDNF está envolvido na resposta a diversas drogas de abuso, incluindo os efeitos agudos do etanol (KERNS et al., 2005) e sensibilização comportamental à cocaína (FILIP et al., 2006). Esses efeitos devem-se à regulação de receptores dopaminérgicos pelo BDNF e à modulação da plasticidade de neurônios dopaminérgicos da via mesolímbica do sistema de recompensa associado aos processos de dependência (GUILLIN et al., 2003; KERNS et al., 2005; JEANBLANC et al., 2006).

A administração de etanol aumenta a expressão de BDNF, provavelmente por causar a translocação nuclear de um mediador de sua transcrição, a proteína de ancoragem RACK1. Esta proteína, quando injetada *in vivo*, é capaz de aumentar a expressão de BDNF no estriado de camundongos, e reduzir o consumo e a sensibilização comportamental ao etanol. Esses dados sugerem que a via RACK1-BDNF contribui para a regulação negativa dos efeitos do etanol, e se oporia às adaptações que levam ao desenvolvimento da dependência ao álcool (MCGOUGH et al., 2004). O aumento nos níveis de BDNF leva a um aumento da sinalização via TrkB, e a uma maior ativação de genes efetores, como do receptor dopaminérgico D3 e do peptídeo opioide dinorfina (JEANBLANC et al., 2006; LOGRIP; JANAK; RON, 2008).

O EA, por sua vez, tem se mostrado capaz de alterar os níveis de BDNF em vários modelos, como em tarefas de memória e aprendizagem, prejuízos cognitivos relacionados com o envelhecimento (O'CALLAGHAN; GRIFFIN; KELLY, 2009), depressão (CHOURBAJI; BRANDWEIN; GASS, 2008), doença de Huntington (ZAJAC et al., 2010) e dependência à cocaína (THIRIET et al., 2008). O EA atenua os efeitos comportamentais e neuroquímicos da prole de animais expostos à cocaína no período pré-natal (NEUGEBAUER et al., 2004). Isso mostra a importância das condições ambientais como um fator desencadeante da dependência.

O BDNF também exerce um papel importante nos efeitos benéficos do EA sobre o crescimento de tumores. Além da correlação entre a redução de tumores e aumento de BDNF no hipotálamo com a exposição ao EA, a superexpressão de BDNF no hipotálamo mediada por vetores virais mimetiza os efeitos induzidos pelo EA. Ainda mais, a redução nos níveis dessa proteína no hipotálamo por meio da técnica de interferência por RNA bloqueia os efeitos benéficos do EA (CAO et al., 2010).

#### 1.4 Relações entre EA, dependência e a expressão de Egr-1

Além do BDNF, um gene também modulado pelo CREB é o do fator de transcrição Egr-1 (*Early growth response protein 1*). Egr-1 é um dos genes imediatos precoces (*immediate early genes*), induzível por uma série de diferentes estímulos (HERDEGEN e LEAH, 1998). Uma das vantagens em se estudar o Egr-1 em detrimento de outros fatores de transcrição como o c-Fos, é que ao contrário do c-Fos, o Egr-1 apresenta uma expressão basal alta no encéfalo (WORLEY et al., 1991), sendo passível de sofrer tanto aumento quanto diminuição de expressão em seus níveis basais.

Esta proteína está envolvida em processos de plasticidade, aprendizagem e tem um papel na reconsolidação de memória. Como sua expressão é induzível por atividade neuronal, a avaliação dos níveis de Egr-1 pode ser utilizada para detectar regiões mais ou menos ativas no sistema nervoso central (IZQUIERDO e CAMMAROTA, 2004; KNAPSKA e KACZMAREK, 2004).

A exposição de animais ao EA induz uma robusta expressão de Egr-1, especialmente no córtex sensorial, onde a maior densidade de mudanças morfológicas ocorre em função de experiências (WALLACE et al., 1995; PINAUD, 2004).

O Egr-1 faz parte da via de transdução do sinal do cálcio (COLE et al., 2003) e é considerado um componente chave na cascata de eventos envolvidos em processos de plasticidade neuronal. Neste sentido, algumas formas de neuroplasticidade, como a LTP e a sensibilização comportamental alteram a expressão desses fatores de transcrição, incluindo o Egr-1. Relata-se também que sua expressão é induzida pelo tratamento com drogas de abuso como metanfetamina, cocaína e morfina (TORRES e HOROWITZ, 1996). A inibição da fosforilação da ERK (*extracellular regulated-kinase*) pelo composto SL327, capaz de abolir a indução da preferência condicionada ao lugar pelo *ecstasy* (3,4-metilenodioximetanfetamina – MDMA), também diminui a expressão de Egr-1 no caudado-putâmen de camundongos, mostrando a relação entre a via de sinalização das MAPK, seus genes *downstream* (como *egr-1*) e as propriedades de reforço de drogas de abuso (SALZMANN et al., 2003).

Estudos de nosso laboratório mostraram que o tratamento agudo de etanol aumentou a expressão de Egr-1, enquanto que a administração prolongada de

etanol pareada com pistas ambientais eliciou uma supressão da expressão basal de Egr-1 (FARIA et al., 2008).

## **2 OBJETIVOS GERAIS**

Este trabalho teve como objetivo testar se o EA seria capaz de alterar o padrão comportamental e neuroquímico resultante da administração de etanol em camundongos. Para tanto, foram avaliados os efeitos do EA no desenvolvimento e na expressão da sensibilização comportamental ao etanol, bem como na expressão de proteínas que medeiam tanto os efeitos neuroplásticos induzidos pelo EA quanto a resposta a drogas de abuso em camundongos.

### 3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

1. Verificar os efeitos da exposição ao EA, concomitante ao tratamento repetido de etanol, sobre o desenvolvimento e a expressão da sensibilização comportamental ao etanol em camundongos.
2. Estudar os efeitos da exposição ao EA, após o desenvolvimento da sensibilização comportamental ao etanol, sobre a expressão da mesma em camundongos.
3. Avaliar o efeito do EA sobre os níveis de BDNF e seu receptor de alta afinidade, TrkB, em camundongos após tratamento agudo e repetido com etanol.
4. Avaliar o efeito do EA sobre a expressão de Egr-1 em camundongos tratados aguda e repetidamente com etanol.
5. Examinar possíveis alterações farmacocinéticas no metabolismo do etanol decorrentes da exposição ao EA em camundongos tratados aguda e repetidamente com etanol.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Sujeitos experimentais

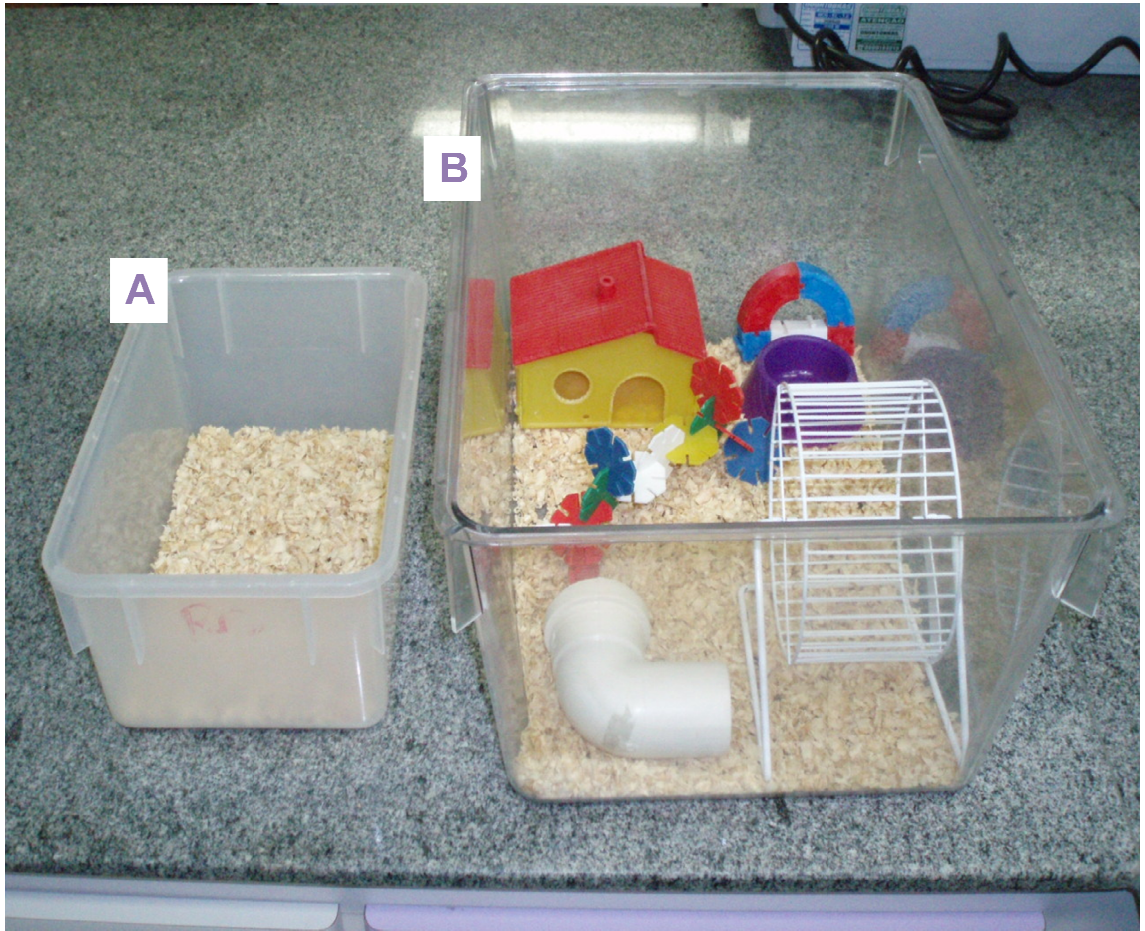
Camundongos Swiss-Webster machos, com 21-25 dias de idade no início do experimento, foram alojados em grupos de cinco indivíduos em uma sala com um ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 7 h), sob temperatura constante ( $21\pm 1$  °C), com água e comida fornecidas *ad libitum*. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

### 4.2 Condições ambientais

Os grupos não-enriquecidos permaneceram em condições padrão de alojamento, sendo mantidos em caixas de polipropileno pequenas (27,5 cm x 16,5 cm x 13 cm) cobertas pro maravalha.

Os grupos submetidos ao EA ficaram alojados em caixas transparentes de policarbonato maiores do que as caixas padrão (42 cm x 28 cm x 21,5 cm), cobertas por maravalha e com comida e água à vontade, nas quais estavam presentes estímulos cognitivos, sensoriais e motores para os camundongos explorarem (fig. 1).

Os estímulos constam de rodas de exercício, tubos de PVC, casinhas, gangorras e diversos objetos de plástico, em diferentes cores e texturas. Nos grupos submetidos ao EA diário, a composição dessas caixas era alterada diariamente, enquanto que nos grupos submetidos ao EA contínuo os objetos eram trocados e rearranjados semanalmente. Após cada sessão de EA diário as caixas e objetos foram lavados com água e sabão, enquanto que no EA contínuo este procedimento foi realizado ao final de cada semana.



**Figura 1.** Condições diferenciais de alojamento entre os grupos não enriquecidos e enriquecidos. **A.** Os grupos não enriquecidos foram mantidos em suas caixas-moradia, em condições padrão. **B.** Os animais dos grupos enriquecidos passaram por sessões diárias de 3 horas de enriquecimento ambiental (EA diário) ou permaneceram em condições enriquecidas de alojamento durante todo o experimento (EA contínuo). Os animais pertencentes aos grupos enriquecidos durante a abstinência foram submetidos às condições enriquecidas de alojamento apenas durante o período de abstinência (entre D15 e D22), 24 horas por dia.



### 4.3 Drogas

O etanol (95%; Labsynth®, Diadema, SP, Brasil) foi administrado em solução 20% (v/v), preparada com solução salina (0,9% de NaCl em água destilada), na dose de 1,8 g/kg, por via intraperitoneal (i.p.). Os animais do grupo controle foram tratados com injeções isovolumétricas de solução salina por via i.p.

### 4.4 Testes comportamentais

Todos os procedimentos comportamentais foram realizados durante a fase de claro do ciclo claro/escuro. A atividade locomotora horizontal total foi avaliada no campo-aberto (arena de 40 cm de diâmetro, rodeada por uma parede de 50 cm de altura), 5 min após as injeções de etanol ou salina, por um período de 5 min. O registro da atividade foi realizado com uma câmera digital e um sistema de captura de vídeo (Canopus®). O *software* EthoVision® (Noldus, The Netherlands) foi usado para quantificar a distância percorrida por cada animal.

### 4.5 Alcoolemia

Imediatamente após os testes comportamentais em no último dia de experimento (D22), os animais do Experimento I tratados com etanol ( $n=5$  animais por grupo) foram anestesiados e uma amostra de 0,5 ml de sangue foi coletada do plexo braquial para a determinação da concentração sanguínea de etanol. Como não foi possível realizar a coleta do sangue dos grupos que passaram pelo EA diário e contínuo no mesmo dia, quando a coleta foi feita para cada um deles havia um grupo não enriquecido como controle.

Em um tubo de vidro de 10 ml, um alíquota de 0,5 ml de sangue foi adicionada a 1 ml de n-butanol 0,6 g/l (controle interno). O tubo foi selado e incubado por 30 min a 70 °C. A seguir, uma alíquota de 0,25 ml de vapor foi retirada (técnica *headspace*) e analisada em um cromatógrafo a gás (Agilent, Palo Alto, CA, EUA).

Estes procedimentos foram realizados em colaboração com o professor Mauricio Yonamine da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

#### 4.6 Extração de proteínas para detecção do BDNF

Para a avaliação dos níveis de BDNF foram utilizados camundongos dos grupos não-enriquecidos, enriquecidos diariamente e continuamente (Experimento I – seção 4.13.1) e enriquecidos durante a abstinência (Experimento II – seção 4.13.2).

Uma hora após o teste comportamental no último dia de experimento (D22), parte dos animais ( $n=6$  animais por grupo) foi sacrificada por deslocamento cervical, e suas estruturas encefálicas (córtex pré-frontal e hipocampo) foram retiradas e rapidamente congeladas em gelo seco, e posteriormente mantidas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

O protocolo de extração de proteínas para detecção de BDNF por ELISA foi adaptado de Szapacs et al. (2004).

As amostras de tecido armazenadas foram pesadas. Adicionou-se 1 ml de tampão de lise (100 mM PIPES (pH 7), 500 mM NaCl, 0,2% Triton X-100, 0,1%  $\text{NaN}_3$ , 2% BSA, 2 mM  $\text{EDTA.Na}_2.2\text{H}_2\text{O}$ , 200  $\mu\text{M}$  PMSF, 10  $\mu\text{M}$  leupeptina, 1  $\mu\text{M}$  antipainá e 1  $\mu\text{M}$  pepstatina) a cada tubo e as amostras foram sonicadas por cerca de 15 s. Foram adicionados mais 3 ml de tampão de lise e as amostras foram ressonicadas por mais 15 s. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 16000 g por 30 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Os sobrenadantes foram guardados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a realização do ELISA.

#### 4.7 Avaliação da expressão de BDNF por ELISA

Os níveis de BDNF foram avaliados com o BDNF  $E_{\text{max}}^{\circledR}$  ImmunoAssay System (Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com as especificações do fabricante.

Inicialmente, cada poço de uma microplaca de ELISA foi coberto com 100  $\mu\text{l}$  de anticorpo monoclonal anti-BDNF diluído 1:1000 em tampão carbonato (25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 25 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH 9,7). A placa foi selada e incubada *overnight* a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Lavou-se a placa com tampão de lavagem TBST (20 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,05% Tween $^{\circledR}$  20) e a seguir ela foi selada e incubada por 1 h à temperatura ambiente com 200  $\mu\text{l}$ /poço de tampão de bloqueio. Lavou-se a placa três vezes e ela foi selada e incubada por 2 h à temperatura ambiente sob agitação (cerca de 400 rpm) com 100  $\mu\text{l}$ /poço das amostras diluídas em tampão de lise (1:4 para córtex pré-

frontal e 1:8 para hipocampo) ou com a curva-padrão, realizada com um padrão de BDNF diluído 1:2000 em tampão de bloqueio e diluições seriadas 1:2 a partir desta concentração inicial, variando entre 500 pg/ml a 0. Foram feitas duplicatas tanto da curva-padrão quanto de cada uma das amostras.

Após este passo, a placa foi lavada cinco vezes, e incubou-se cada poço com 100 µl de anticorpo policlonal para BDNF diluído 1:500 em tampão de bloqueio por 4 horas à temperatura ambiente, sob agitação.

Novamente, a placa foi lavada cinco vezes, e seguiu-se a incubação com anticorpo secundário anti-IgY conjugado à enzima HRP (*horse radish peroxidase*) diluído 1:200 em tampão de bloqueio (100 µl/poço), por um período de 1 h, à temperatura ambiente, sob agitação e protegida da luz.

Ao término desta incubação, a placa foi lavada mais cinco vezes e adicionou-se a cada poço 100 µl da solução TMB One (tetrametilbenzidina), que é o substrato da enzima HRP. A placa foi incubada por 10 min à temperatura ambiente sob agitação, e uma coloração azul foi formada.

Ao final desta etapa, a reação foi terminada adicionando-se 100 µl de HCl 1 N a cada poço, na mesma ordem em que o substrato foi adicionado, mudando-se a coloração de azul para amarelo. A leitura espectrofotométrica foi realizada a um comprimento de onda de 450 nm.

#### 4.8 Extração de proteínas para detecção do receptor *TrkB*

Para a avaliação dos níveis de *TrkB* foram utilizados camundongos dos grupos não-enriquecidos e enriquecidos continuamente (Experimento I – seção 4.13.1) e enriquecidos durante a abstinência (Experimento II – seção 4.13.2).

Uma hora após o teste comportamental no último dia de experimento, parte dos animais foi sacrificada ( $n=5$  animais por grupo) por deslocamento cervical, e suas estruturas encefálicas (córtex pré-frontal e hipocampo) foram retiradas e rapidamente congeladas em gelo seco, e posteriormente mantidas a -80 °C.

As amostras armazenadas foram pesadas e, mantidas em gelo, foram homogeneizadas com pistilo em tampão de amostra 2x (120 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol), na proporção de 10 µl de tampão a cada 1 mg de tecido.

Após a homogeneização, foi acrescentado volume igual de *working solution* (tampão de amostra 1x acrescido de 100 mM DTT e 1 mM PMSF. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 15 min a 4 °C.

Os sobrenadantes foram retirados e armazenados a -20 °C até o momento da quantificação.

A dosagem da concentração de proteínas foi realizada através do método de Bradford (1976), cujo princípio consiste na adição de um corante ácido a uma solução de proteínas, e subsequente medição da absorbância no comprimento de onda de 595 nm em uma leitora de microplacas. A comparação com uma curva padrão de soro albumina bovina (BSA) fornece a concentração de proteínas presentes nas amostras.

Assim, 40 µl de amostra (extrato proteico diluído na proporção 1:50 em água deionizada) foram aplicados por poço de uma microplaca de ELISA, juntamente com 200 µl/poço de corante de Bradford diluído 1:5 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA). A curva padrão de BSA, com concentrações variando entre 200 e 6,25 ng de proteína/µl, também foi aplicada à placa (40 µl de solução de BSA para cada uma das diferentes concentrações, mais 200 µl de corante de Bradford diluído 1:5 por poço). Após 10 min de incubação foi realizada a leitura espectrofotométrica a 595 nm.

#### *4.9 Avaliação da expressão de TrkB por Western Blot*

O sobrenadante recolhido durante a preparação do extrato, descrito anteriormente (item 4.7), foi utilizado no ensaio de Western Blot. A concentração de proteínas foi ajustada para cada amostra com água deionizada e tampão de amostra (60 mM Tris-base, 25% glicerol, 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol pH 6,8) totalizando um volume de 15 µl. As amostras foram fervidas por 5 min a 95 °C e aplicadas em gel de SDS-poliacrilamida 10% (acrilamida/bisacrilamida (37,5:1), 10% SDS). O gel foi submetido a eletroforese em tampão de corrida (25 mM Tris-base, 96 mM glicina e 1% SDS) por 1 h a 100 V. As proteínas separadas e contidas no gel foram transferidas eletroforeticamente para uma membrana de nitrocelulose por 1 h a 100 V, em tampão de transferência (25 mM Tris-base, 190 mM glicina, 10% metanol).

As membranas foram lavadas rapidamente com TTBS (TBS (10 mM Tris-base, 150 mM NaCl pH 8,0), 0,05% Tween® 20) e incubadas por 1 h à temperatura ambiente com 50 ml de tampão de bloqueio (5% leite desnatado em TTBS) sob agitação. Novamente, as membranas foram lavadas rapidamente com TTBS e foram seladas, juntamente com o anticorpo primário anti-TrkB feito em coelho (Millipore, Temecula, CA, EUA) diluído 1:1000 em 3% leite desnatado com TTBS. As membranas foram incubadas sob agitação, *overnight*, a 4 °C.

Após essa etapa, as membranas foram lavadas 2 vezes em TTBS por 10 min sob agitação e à temperatura ambiente. Foram seladas e incubadas por 1 h à temperatura ambiente sob agitação com o anticorpo secundário anti-coelho (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, EUA) diluído 1:50000 em 3% leite desnatado em TTBS. Após esta etapa, as membranas foram lavadas 2 vezes em TTBS e uma vez em TBS por 10 min sob agitação e à temperatura ambiente.

A revelação foi feita com o kit de quimioluminescência ECL-Pierce® (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). As mesmas membranas foram incubadas com anticorpo anti  $\alpha$ -Tubulina e reveladas, para avaliar a expressão basal de proteínas e para que fosse possível fazer a normalização dos níveis de TrkB encontrados em função da quantidade de proteínas no gel. Para isso, após a revelação com ECL, as membranas foram lavadas uma vez com ácido acético 5% e 2 vezes com TTBS, por 10 min, sob agitação e à temperatura ambiente.

Em seguida, as membranas foram incubadas com tampão de bloqueio por 1 h à temperatura ambiente sob agitação, lavadas rapidamente com TTBS e incubadas por 1 h à temperatura ambiente sob agitação com anticorpo primário anti- $\alpha$ -Tubulina feito em camundongo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluído 1:10000 em 1% BSA com TTBS. As membranas foram então lavadas 2 vezes com TTBS por 10 min sob agitação e à temperatura ambiente e incubadas com anticorpo secundário anti-camundongo (GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido) diluído 1:6000 em 1% BSA em TTBS por 45 min, à temperatura ambiente, sob agitação.

As membranas foram, então, lavadas 2 vezes em TTBS e uma vez em TBS por 10 min à temperatura ambiente sob agitação e reveladas com o kit de quimioluminescência ECL-Pierce®.

Os filmes de cada uma das membranas foram escaneados e a quantificação da densidade óptica foi realizada com o *software* ImageJ (NIH ImageJ versão

1.43u), normalizando-se os valores de densidade óptica de TrkB pelos valores de densidade óptica da  $\alpha$ -Tubulina.

#### 4.10 Preparação das amostras para imuno-histoquímica

Para a imuno-histoquímica, foram utilizados camundongos dos grupos não-enriquecidos e enriquecidos diariamente (Experimento I – seção 4.13.1).

Uma hora após a análise do comportamento no último dia de experimento (D22), um lote de camundongos ( $n=6$  animais por grupo) foi anestesiado com 0,05 g/kg de xilazina e 0,05 g/kg de quetamina e perfundido transcardialmente com 50 ml de 0,9% NaCl e 300 ml de paraformaldeído 4% (PFA), ambos diluídos em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4).

Os encéfalos fixados foram retirados e mantidos na solução de 4% PFA por 4 h (pós-fixação) e subsequentemente armazenados em uma solução de sacarose a 30% em tampão fosfato 0,1 M até a realização da imuno-histoquímica.

#### 4.11 Imuno-histoquímica para *Egr-1*

Os encéfalos fixados foram congelados e seccionados coronalmente a 40 $\mu$ m de espessura em um micrótomo.

Os cortes foram incubados *overnight* à temperatura ambiente com anticorpo monoclonal anti *Egr-1* feito em coelho (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) diluído 1:3000 em solução composta de tampão fosfato 0,1 M, 0,3% Triton X-100 e 5% soro de asno (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA).

O tecido foi então incubado por 2 h à temperatura ambiente com anticorpo secundário biotilado anti-coelho feito em asno (Jackson Laboratories, West Grove, PA, EUA) diluído 1:200 em solução de tampão fosfato 0,1M e 0,03% Triton X-100.

A seguir, os cortes foram incubados por 2 h com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Kit ABC Elite; Vector Labs, Burlingame, CA, EUA).

Finalmente, realizou-se a reação com solução de 0.05% 3,3'-diaminobenzidina (DAB) com 3  $\mu$ l de 0.01% peróxido de hidrogênio em tampão fosfato 0,1 M por 4 a 6 min, a qual foi intensificada com 0,05% OsO<sub>4</sub>.

Os cortes foram lavados três vezes com tampão fosfato 0,1 M por 10 min antes de cada um desses passos e foram montados em lâminas gelatinizadas,

desidratados em série de alcoóis e cobertos com Permount (Fisher, Pittsburgh, PA, EUA).

A imuno-histoquímica foi realizada em colaboração com o Prof. Luiz Roberto G. de Britto, do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

#### *4.12 Análise microscópica*

A contagem dos núcleos marcados positivamente para Egr-1 foi realizada com o uso de um microscópio Aristoplan (Leitz) equipado com uma câmera CCD-72S (Dage-MTI, Michigan City, IN, EUA).

As regiões encefálicas foram identificadas de acordo com Paxinos e Franklin (2001), e no mínimo 5 cortes de cada estrutura de cada animal foram examinados. As estruturas analisadas foram: córtex pré-frontal medial (Bregma 2,68 mm a 2,10 mm, dividido em dorsal e ventral), córtex insular (Bregma 1,94 mm a 0,74 mm), núcleo accumbens (Bregma 1,94 mm a 0,86 mm) e área CA1 do hipocampo (Bregma -1,70 mm a -2,30 mm).

Um limiar para a contagem de células marcadas foi definido com base na marcação de fundo, e células exibindo densidade óptica ao mínimo três vezes maior que aquela do limiar foram contadas.

Tanto a quantificação da imunorreatividade de núcleos no córtex pré-frontal medial (ventral e dorsal), córtex insular, núcleo accumbens e hipocampo quanto as medidas de área foram conduzidas com o software NIH Image (RASBAND e BRIGHT, 1995).

#### *4.13 Delineamentos Experimentais*

##### 4.13.1 Experimento I - Efeito do enriquecimento ambiental sobre a atividade locomotora no tratamento repetido de etanol

Os camundongos foram divididos em nove grupos experimentais: não-enriquecido salina ( $n=24$ ), não-enriquecido etanol agudo ( $n=24$ ), não-enriquecido etanol repetido ( $n=33$ ), EA diário salina ( $n=23$ ), EA diário etanol agudo ( $n=23$ ), EA

diário etanol repetido ( $n=26$ ), EA contínuo salina ( $n=19$ ), EA contínuo etanol agudo ( $n=19$ ), EA contínuo etanol repetido ( $n=20$ ).

Os grupos do EA diário passaram por sessões de EA, com duração de 3 horas, realizadas no período da manhã (entre 8 h 30 min e 12 h). Os grupos do EA contínuo permaneceram em um ambiente enriquecido durante todo o experimento.

Após as 14 primeiras sessões de EA (pré-tratamento) iniciaram-se os testes comportamentais (protocolo de sensibilização comportamental). Antes de iniciar o tratamento com etanol, os animais foram habituados ao campo-aberto por dois dias (H1 e H2), nos quais todos os animais foram injetados com solução salina e tiveram sua atividade locomotora avaliada. A habituação minimiza os efeitos da novidade do aparato de teste. Um dia após o período de habituação (D1) iniciou-se o tratamento com etanol nos grupos tratados repetidamente com etanol, enquanto que os grupos salina e etanol agudo receberam injeções isovolumétricas de solução salina. Os animais foram tratados, de acordo com seu grupo, por 15 dias (D1-D15), durante o período da tarde (entre 13 h e 17 h 30 min).

Entre o 16º e o 21º dia (D16-D21), os animais tratados com etanol passaram por um período de abstinência. Esse período de abstinência é importante para avaliar se as mudanças comportamentais induzidas pela administração repetida de etanol foram duradouras. No 22º dia de tratamento com as drogas (D22) os grupos tratados repetidamente com etanol e os grupos etanol agudo receberam uma injeção “desafio” de etanol; enquanto os grupos salina receberam injeções isovolumétricas de solução salina.

A avaliação locomotora foi realizada nos dias H1, H2, D1, D8, D15 e D22.

#### 4.13.2 Experimento II - Efeito do enriquecimento ambiental durante o período de abstinência sobre a atividade locomotora em animais tratados previamente sensibilizados aos efeitos estimulantes do etanol.

Os camundongos (com 21-25 dias de idade) foram alojados em grupos de 5 em caixas de polipropileno pequenas (27,5 cm x 16,5 cm x 13 cm) e permaneceram sem tratamento por duas semanas, quando foi iniciado o protocolo de sensibilização comportamental ao etanol, conforme descrito para o Experimento I.

Após essas duas semanas, os animais foram aleatoriamente distribuídos nos grupos salina, etanol agudo e etanol repetido. Nos dois primeiros dias (H1 e H2),



todos os animais foram injetados com solução salina i.p. e tiveram sua atividade locomotora avaliada no campo-aberto. Um dia após a habituação (D1) foi iniciado o tratamento (solução salina para os grupos salina e etanol agudo, e etanol para o grupo etanol repetido), que seguiu consecutivamente por 15 dias (D1-D15), durante o período da tarde.

Do 16º ao 21º dia (D16-D21), os animais passaram por um período de abstinência, durante o qual metade dos animais de cada grupo foi exposta ao EA continuamente. No 22º dia de tratamento com as drogas (D22) os grupos etanol agudo e etanol repetido receberam uma injeção “desafio” de etanol, enquanto os grupos salina receberam injeções isovolumétricas de solução salina. Desta maneira, foram formados os grupos: salina não-enriquecido ( $n=15$ ), etanol agudo não-enriquecido ( $n=17$ ), etanol repetido não-enriquecido ( $n=19$ ), salina enriquecido ( $n=19$ ), etanol agudo enriquecido ( $n=15$ ) e etanol repetido enriquecido ( $n=23$ ). A atividade locomotora foi avaliada nos dias H1, H2, D1, D8, D15 e D22.

#### 4.13.3 Experimento III – Controle da condição de enriquecimento ambiental sobre a atividade locomotora no tratamento repetido de etanol

Como controle da exposição ao EA, outro lote de camundongos foi mantido sob as mesmas condições descritas para o Experimento I (seção 4.13.1), em caixas de polipropileno grandes (41 cm x 34 cm x 16 cm), mas sem os estímulos ambientais. Estes camundongos foram submetidos ao tratamento agudo ( $n=15$ ) ou repetido ( $n=12$ ) de etanol, conforme descrito anteriormente, e tiveram sua atividade locomotora avaliada em campo-aberto nos dias H1, H2, D1, D8, D15 e D22.

#### *4.14 Análise estatística dos dados*

Quanto aos parâmetros comportamentais, foi usada a análise de variância (ANOVA) de 3 vias para medidas repetidas (ENRIQUECIMENTO X TRATAMENTO X DIA), considerando o fator DIA a medida repetida, para comparar as diferenças entre os dias H1 e H2 e entre os dias D1, D8 e D15. Quando necessário, foi realizada uma ANOVA-1 via para medidas repetidas para verificar o desenvolvimento da sensibilização comportamental intra-grupo. A ANOVA-2 vias (ENRIQUECIMENTO X TRATAMENTO) foi usada para comparar a atividade

locomotora dos grupos no dia D22. O teste de Newman-Keuls foi usado para comparações *a posteriori*.

A ANOVA de 2 vias (ENRIQUECIMENTO X TRATAMENTO) seguida de Newman-Keuls foi utilizada para as análises dos resultados provenientes do ELISA para BDNF, do Western Blot para TrkB e da imuno-histoquímica para Egr-1. A ANOVA-1 via foi utilizada para comparar os níveis de BDNF no córtex pré-frontal entre os grupos tratados repetidamente com etanol.

O teste *t*-Student para medidas independentes foi utilizado para comparar as diferenças na alcoolemia entre os grupos tratados com etanol (não-enriquecido X enriquecido). A dosagem da alcoolemia foi realizada para os animais do Experimento I, que passaram por um período de enriquecimento mais longo.

Em todas as comparações realizadas, a probabilidade  $p < 0,05$  foi considerada para determinar diferenças estatisticamente significantes. Os dados são apresentados como a média  $\pm$  erro padrão.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Experimento I - Efeito do enriquecimento ambiental sobre a atividade locomotora no tratamento repetido de etanol

A figura 2 mostra a atividade locomotora dos animais submetidos ao tratamento repetido com etanol ou salina, e desafiados com etanol ou salina, ao longo de todo o Experimento I. A ANOVA-3 vias para medidas repetidas mostrou que houve significância estatística do fator DIA para o período de habituação [ $F_{(1,202)} = 407,43$ ,  $p < 0,001$ ], sendo que em H2 os animais apresentaram menor atividade locomotora do que em H1 ( $p < 0,001$ ), sugerindo efeito de habituação ao aparato.

A ANOVA-3 vias para medidas repetidas realizada para D1, D8 e D15 mostrou significância do fator TRATAMENTO [ $F_{(2,202)} = 123,77$ ,  $p < 0,001$ ] e da interação entre os fatores ENRIQUECIMENTO e TRATAMENTO [ $F_{(4,202)} = 2,87$ ,  $p < 0,05$ ]. Assim, a análise *post hoc* para a interação indicou que o grupo não-enriquecido tratado repetidamente com etanol apresentou atividade locomotora maior que o grupo tratado repetidamente com etanol submetido ao EA contínuo ( $p < 0,01$ ), mas não diferiu daquele submetido ao EA diário ( $p > 0,05$ ).

A desconstrução da ANOVA-3 vias em ANOVA-1 via para medidas repetidas (D1 X D8 X D15) para cada grupo experimental mostrou que a atividade locomotora do D15 foi maior do que a do D1 no grupo não enriquecido tratado repetidamente com etanol [ $F_{(2,64)} = 5,56$ ,  $p < 0,01$ ], enquanto que não foram encontradas diferenças entre esses dias nos grupos enriquecidos [ $F_{(2,38)} = 0,51$ ,  $p > 0,05$  para o grupo EA contínuo etanol repetido;  $F_{(2,50)} = 2,01$ ,  $p > 0,05$  para o grupo EA diário etanol repetido]. Esses dados sugerem que o enriquecimento preveniu o desenvolvimento da sensibilização comportamental.

Quanto ao dia de desafio, a ANOVA-2 vias mostrou significância estatística quanto aos fatores ENRIQUECIMENTO [ $F_{(2,202)} = 13,42$ ,  $p < 0,001$ ] e TRATAMENTO [ $F_{(2,202)} = 95,87$ ,  $p < 0,001$ ], e para a interação entre ambos fatores [ $F_{(4,202)} = 5,30$ ,  $p < 0,001$ ]. A análise *post hoc* não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tratados com etanol agudo ou repetido, tanto para os grupos não-enriquecidos, quanto para os grupos submetidos ao EA contínuo; entretanto, o grupo

tratado repetidamente com etanol submetido ao EA diário exibiu atividade locomotora menor do que aquele tratado agudamente com etanol ( $p < 0,001$ ).

### *5.2 Experimento II - Efeito do enriquecimento ambiental durante o período de abstinência sobre a atividade locomotora em animais tratados previamente com etanol*

A figura 3 mostra a atividade locomotora no período de habituação (H1 e H2) e tratamento (D1-D15) com etanol ou salina. A ANOVA-2 vias para medidas repetidas (TRATAMENTO X DIA) revelou significância estatística do fator DIA [ $F_{(1, 105)} = 139,26$ ,  $p < 0,001$ ] para o período de habituação. Em H2, a atividade locomotora de todos os animais foi menor que em H1 ( $p < 0,001$ ), indicando que houve habituação ao campo-aberto.

A análise da atividade locomotora durante o período de tratamento (fig. 3) pela ANOVA-2 vias para medidas repetidas revelou que o fator TRATAMENTO apresentou significância estatística [ $F_{(2,105)} = 18,56$ ,  $p < 0,001$ ], bem como a interação entre os fatores TRATAMENTO e DIA [ $F_{(4, 210)} = 4,33$ ,  $p < 0,01$ ]. As comparações *a posteriori* indicaram que o tratamento com etanol aumentou a atividade locomotora dos animais ( $p < 0,001$ ), confirmando que a dose usada é estimulante; e que os animais tratados repetidamente com etanol apresentaram maior atividade locomotora no último dia de tratamento (D15), quando comparados ao seu primeiro dia de tratamento (D1;  $p < 0,01$ ), confirmando desenvolvimento da sensibilização comportamental.

Em D22, dia do desafio (Fig. 4), a ANOVA-2 vias (ENRIQUECIMENTO X TRATAMENTO) revelou significância estatística para os fatores TRATAMENTO [ $F_{(2,102)} = 27,92$ ,  $p < 0,001$ ] e para a interação entre ambos fatores [ $F_{(2, 102)} = 11,43$ ,  $p < 0,001$ ]. Os animais que receberam uma dose aguda de etanol apresentaram um aumento na atividade locomotora quando comparados aos animais que receberam salina, revelando o efeito estimulante do etanol ( $p < 0,001$ ). O grupo salina exposto ao EA durante a abstinência apresentou atividade locomotora semelhante à do grupo que recebeu o mesmo tratamento, mas que foi mantido em condições padrão de alojamento; o mesmo ocorreu entre os grupos tratados agudamente com etanol. Porém, os animais tratados repetidamente com etanol submetidos ao EA apresentaram uma atividade locomotora menor do que a dos animais que não

passaram por um ambiente enriquecido ( $p < 0,001$ ), indicando a reversão da sensibilização comportamental pelo EA.

### *5.3 Experimento III – Controle da condição de enriquecimento ambiental sobre a atividade locomotora no tratamento repetido de etanol*

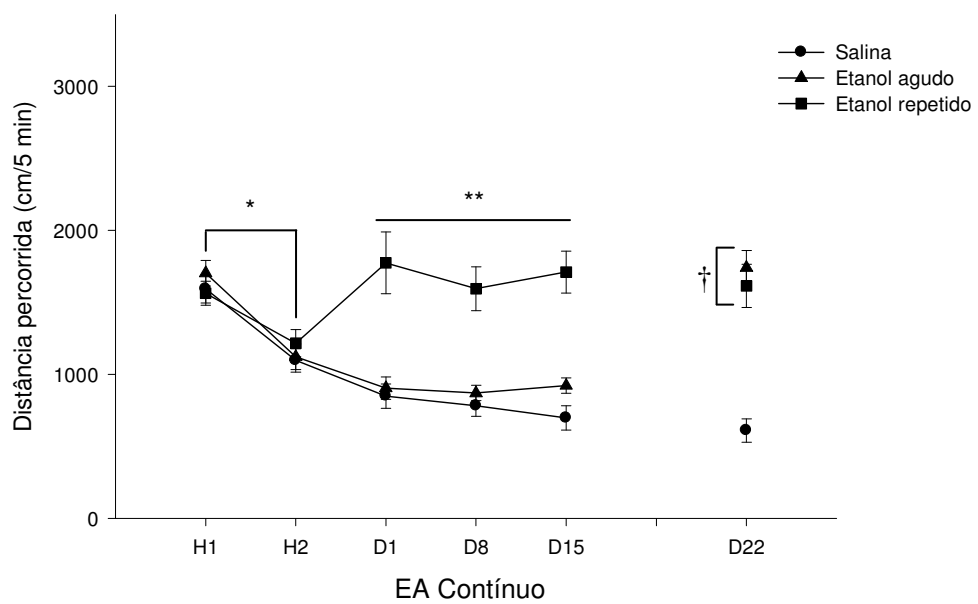
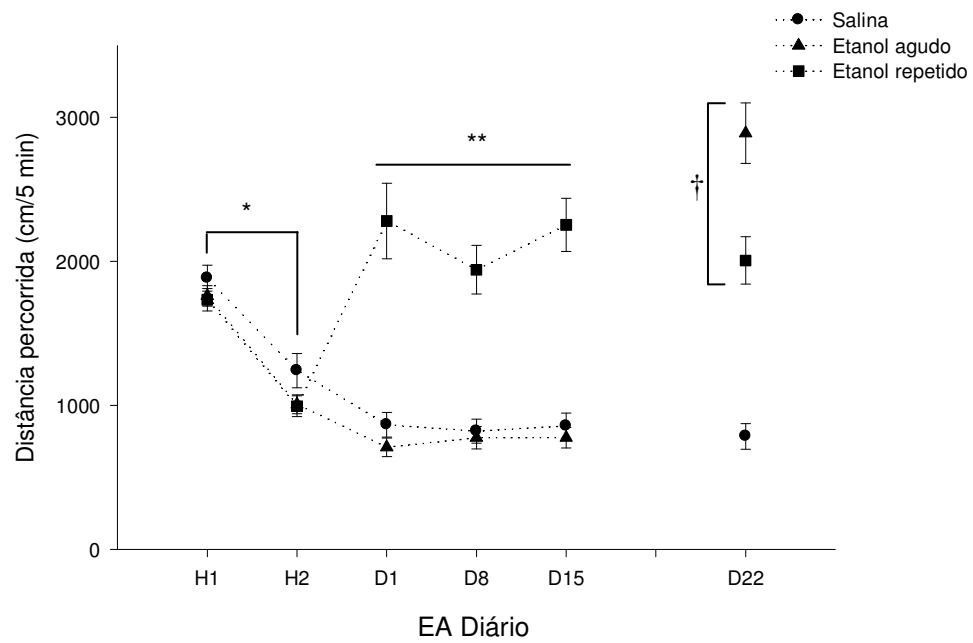
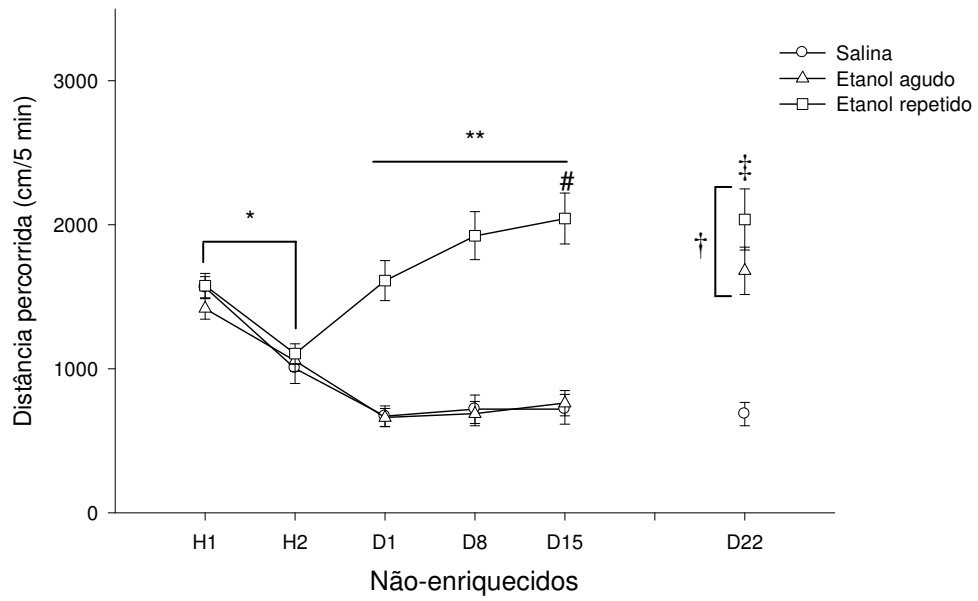
A figura 5 mostra a atividade locomotora dos animais submetidos ao tratamento agudo ou repetido com etanol ou salina, ao longo de todo o Experimento III, em que foram mantidos em caixas de polipropileno grandes, mas sem a presença de estímulos ambientais.

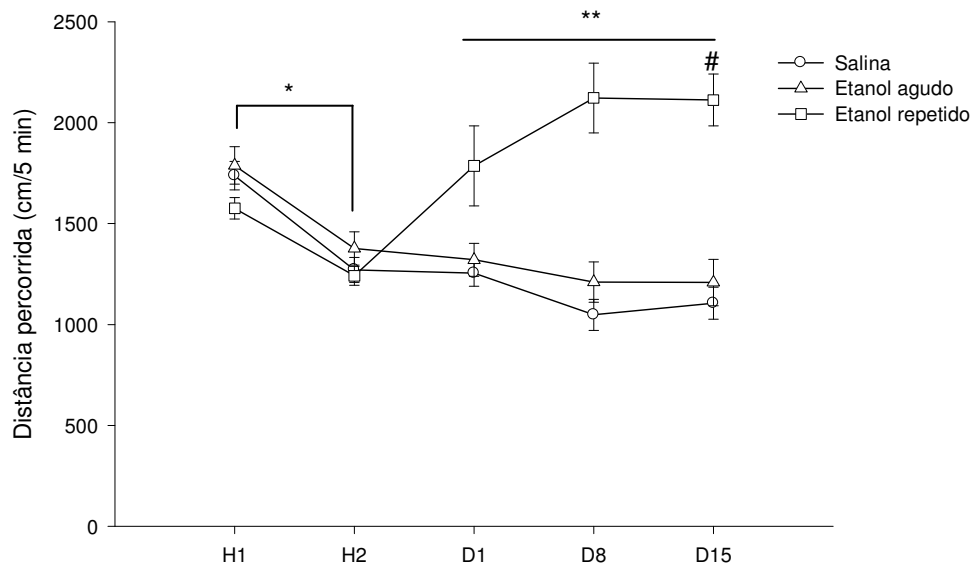
A ANOVA-2 vias (TRATAMENTO X DIA) para medidas repetidas mostrou que houve significância estatística do fator DIA para o período de habituação [ $F_{(1,25)} = 50,22$ ,  $p < 0,001$ ], sendo que em H2 os animais apresentaram menor atividade locomotora do que em H1 ( $p < 0,001$ ), sugerindo efeito de habituação ao aparato.

A ANOVA-2 vias para medidas repetidas realizada para D1, D8 e D15 mostrou significância do fator TRATAMENTO [ $F_{(1,25)} = 13,09$ ,  $p < 0,01$ ], do fator DIA [ $F_{(2,50)} = 4,63$ ,  $p < 0,05$ ] e da interação entre os fatores TRATAMENTO e DIA [ $F_{(2,50)} = 11,58$ ,  $p < 0,001$ ]. Assim, a análise *post hoc* para a interação indicou que a atividade locomotora em D15 foi maior do que a em D1 para grupo mantido em caixas grandes e tratado repetidamente com etanol ( $p < 0,01$ ), indicando o desenvolvimento da sensibilização comportamental. Não foi verificado o efeito estimulante agudo do etanol em D1 para o grupo tratado repetidamente com etanol, mas ao longo do tratamento este efeito estimulante foi verificado ( $p < 0,01$ ).

Em D22, a ANOVA-1 via (fator TRATAMENTO) não revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos [ $F_{(1,25)} = 3,01$ ,  $p > 0,05$ ].

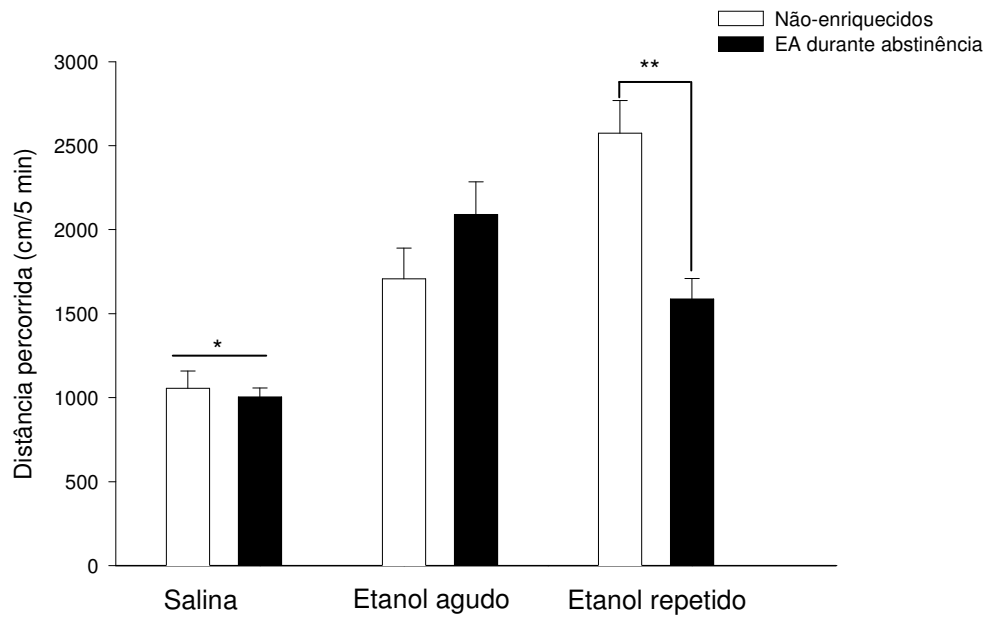
**Figura 2.** Atividade locomotora total, registrada em campo-aberto. **A.** Grupos não-enriquecidos, submetidos às condições padrão de alojamento. **B.** Grupos submetidos ao enriquecimento ambiental diário (sessões de 3 horas por dia). **C.** Grupos submetidos ao enriquecimento ambiental contínuo (24 horas por dia em um ambiente enriquecido). H1 e H2 = período de habituação; D1, D8 e D15 = dias do período de tratamento em que a atividade locomotora foi quantificada; D22 = dia do “desafio” com etanol. \* - atividade locomotora de H2 menor que em H1 ( $p < 0,001$ ). \*\* - atividade locomotora dos grupos tratados repetidamente com etanol é maior que a dos grupos etanol agudo e salina entre D1 e D15 ( $p < 0,001$ ). # - atividade locomotora em D15 é maior que em D1 ( $p < 0,01$ ). † - atividade locomotora dos grupos desafiados com etanol é maior do que a do grupo salina ( $p < 0,001$ ). ‡ - atividade locomotora do grupo etanol agudo é maior que a do grupo etanol repetido ( $p < 0,001$ ). Dados representam média  $\pm$  erro padrão da média.



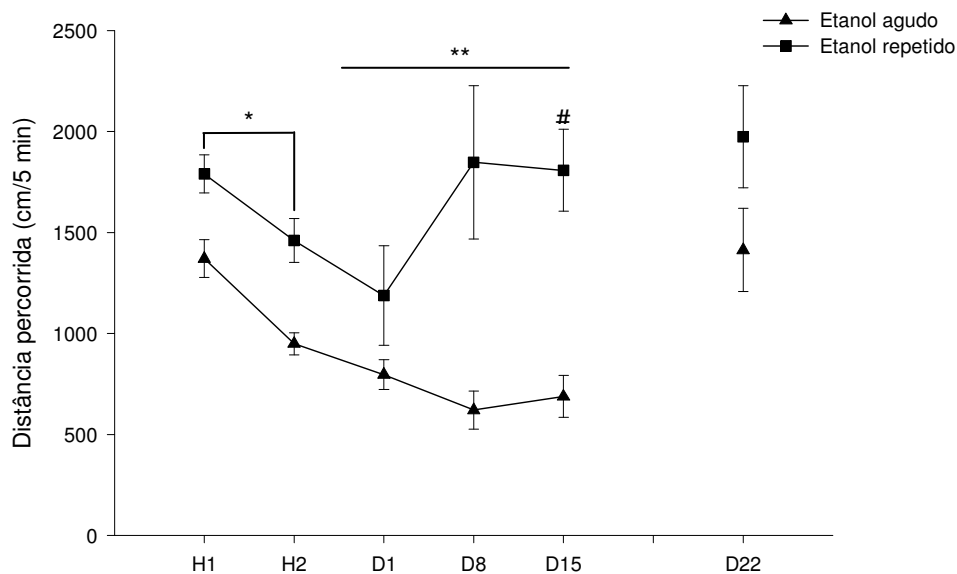


**Figura 3.** Atividade locomotora total, registrada em campo-aberto, nos dias de habituação e tratamento, para os animais que passariam ou não pelo EA no período de abstinência. \* - atividade locomotora em H2 é menor que em H1 para todos os grupos ( $p < 0,001$ ). \*\* - tratamento com etanol aumenta a atividade locomotora ( $p < 0,001$ ). # - atividade locomotora em D15 é maior que em D1 para os animais tratados repetidamente com etanol ( $p < 0,01$ ). Dados representam média  $\pm$  erro padrão da média.





**Figura 4.** Atividade locomotora total registrada em campo-aberto no dia de desafio (D22), para os animais que foram ou não submetidos ao enriquecimento ambiental durante o período de abstinência. \* - os grupos tratados com salina apresentaram atividade locomotora menor do que os grupos tratados com etanol agudo ou repetido ( $p < 0,001$ ). \*\* - o grupo tratado repetidamente com etanol submetido ao enriquecimento ambiental durante a abstinência exibiu atividade locomotora menor do que o grupo que recebeu o mesmo tratamento, mas que permaneceu sob condições padrão ( $p < 0,001$ ). Dados representam média + erro padrão da média.



**Figura 5.** Atividade locomotora total, registrada em campo-aberto, para os grupos mantidos em caixas grandes e tratados aguda ou repetidamente com etanol. \* - atividade locomotora em H2 é menor que em H1 ( $p < 0,001$ ). \*\* - atividade locomotora entre D1 e D15 é maior no grupo tratado repetidamente com etanol do que no grupo que seria desafiado com uma dose aguda de etanol ( $p < 0,01$ ). # - atividade locomotora em D15 é maior que em D1 para o grupo tratado repetidamente com etanol ( $p < 0,01$ ). Dados representam média  $\pm$  erro padrão da média.

### 5.3 Alcoolemia

As concentrações de etanol no sangue, após administração aguda, não diferiram entre os grupos que passaram ou não pelo enriquecimento, tanto diário ( $t = 0,97$ ,  $p = 0,35$ ) quanto contínuo ( $t = -1,24$ ,  $p = 0,24$ ). O EA, diário ou contínuo, também não alterou as concentrações de etanol no sangue, quando comparado com os grupos não enriquecidos ( $t = -0,02$ ,  $p = 0,98$ ;  $t = -1,41$ ,  $p = 0,19$ , respectivamente).

### 5.4 Detecção dos níveis de BDNF

A ANOVA-2 vias (ENRIQUECIMENTO X TRATAMENTO) seguida por Newman-Keuls mostrou que houve diminuição da expressão de BDNF no córtex pré-frontal (Fig. 6) dos camundongos pertencentes aos grupos que passaram pelo EA, uma vez que o fator ENRIQUECIMENTO mostrou-se estatisticamente significativo [ $F_{(3,54)} = 13,74$ ,  $p < 0,001$ ]. O fator TRATAMENTO também apresentou significância estatística [ $F_{(2,54)} = 9,41$ ,  $p < 0,001$ ]. Entretanto, o mesmo não foi verificado para a interação entre os fatores [ $F_{(6,54)} = 0,79$ ,  $p > 0,05$ ]. Os animais

tratados repetidamente com etanol apresentaram menores níveis de BDNF quando comparados aos animais que receberam salina ( $p < 0,001$ ) ou tratados agudamente com etanol ( $p < 0,01$ ).

A desconstrução da ANOVA-2 vias em ANOVA-1 via (fator ENRIQUECIMENTO) seguida de Newman-Keuls para os grupos tratados repetidamente com etanol mostrou que os níveis de BDNF encontrados no grupo não enriquecido foram maiores que nos grupos enriquecidos [ $F_{(3,18)} = 22,57$ ,  $p < 0,001$ ]. Ou seja, o EA parece exercer no córtex pré-frontal um efeito de diminuição dos níveis de BDNF sobressalente à diminuição causada pelo tratamento repetido com o etanol.

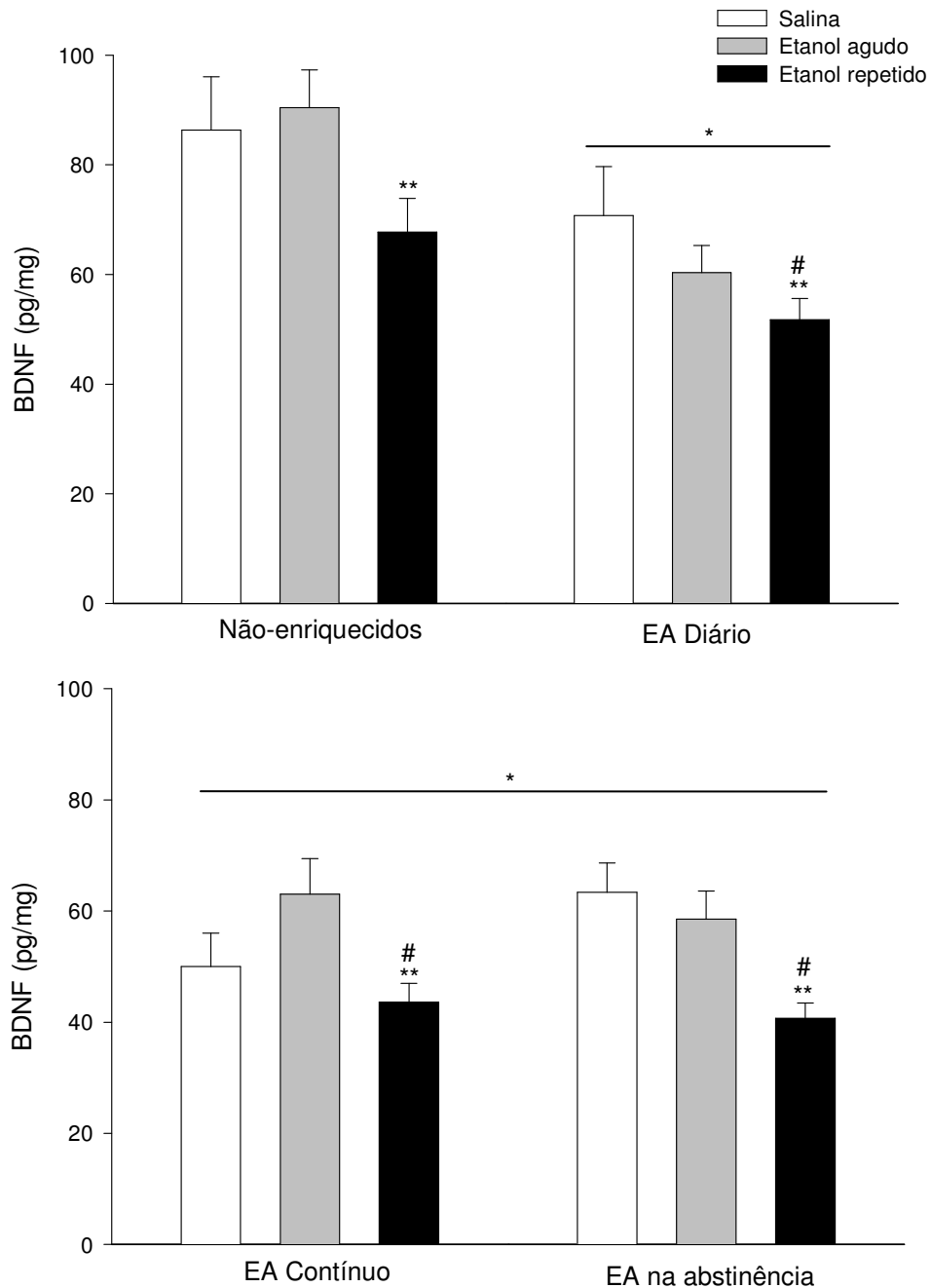
Já no hipocampo (Fig. 7) não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre grupos, para nenhum dos fatores: fator ENRIQUECIMENTO [ $F_{(3,54)} = 1,79$ ,  $p > 0,05$ ]; fator TRATAMENTO [ $F_{(2,54)} = 1,41$ ,  $p > 0,05$ ]; e interação [ $F_{(6,54)} = 1,37$ ,  $p > 0,05$ ].

### 5.5 Detecção dos níveis de TrkB

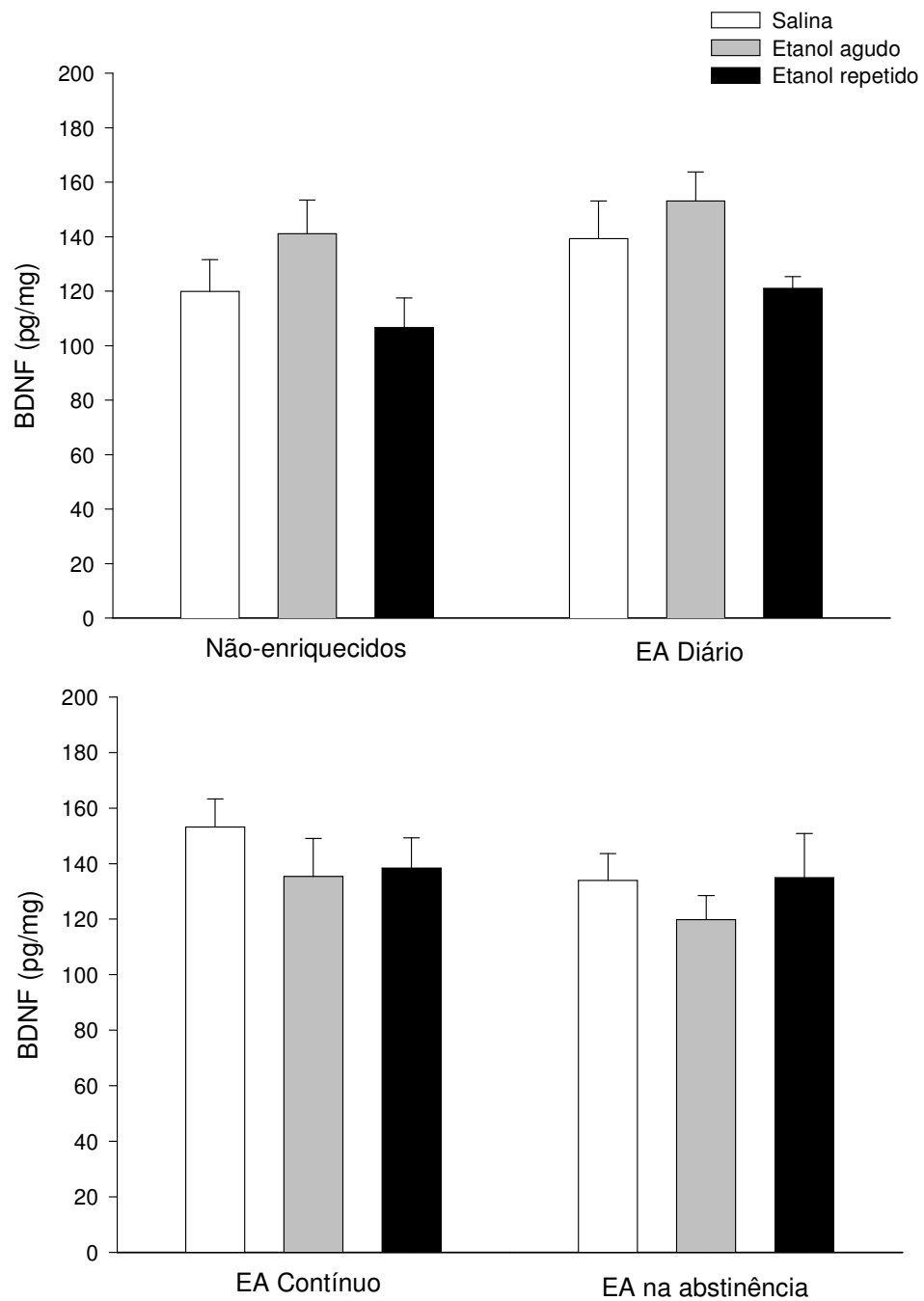
A figura 8 mostra os níveis de TrkB no córtex pré-frontal de camundongos dos grupos não-enriquecidos, enriquecidos diariamente e enriquecidos durante a abstinência.

A ANOVA-2 vias (ENRIQUECIMENTO X TRATAMENTO) mostrou que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os níveis de TrkB nos diferentes grupos, para nenhum dos fatores: fator ENRIQUECIMENTO [ $F_{(2,25)} = 1,26$ ,  $p > 0,05$ ]; fator TRATAMENTO [ $F_{(2,25)} = 0,11$ ,  $p > 0,05$ ]; e interação [ $F_{(4,25)} = 0,50$ ,  $p > 0,05$ ].

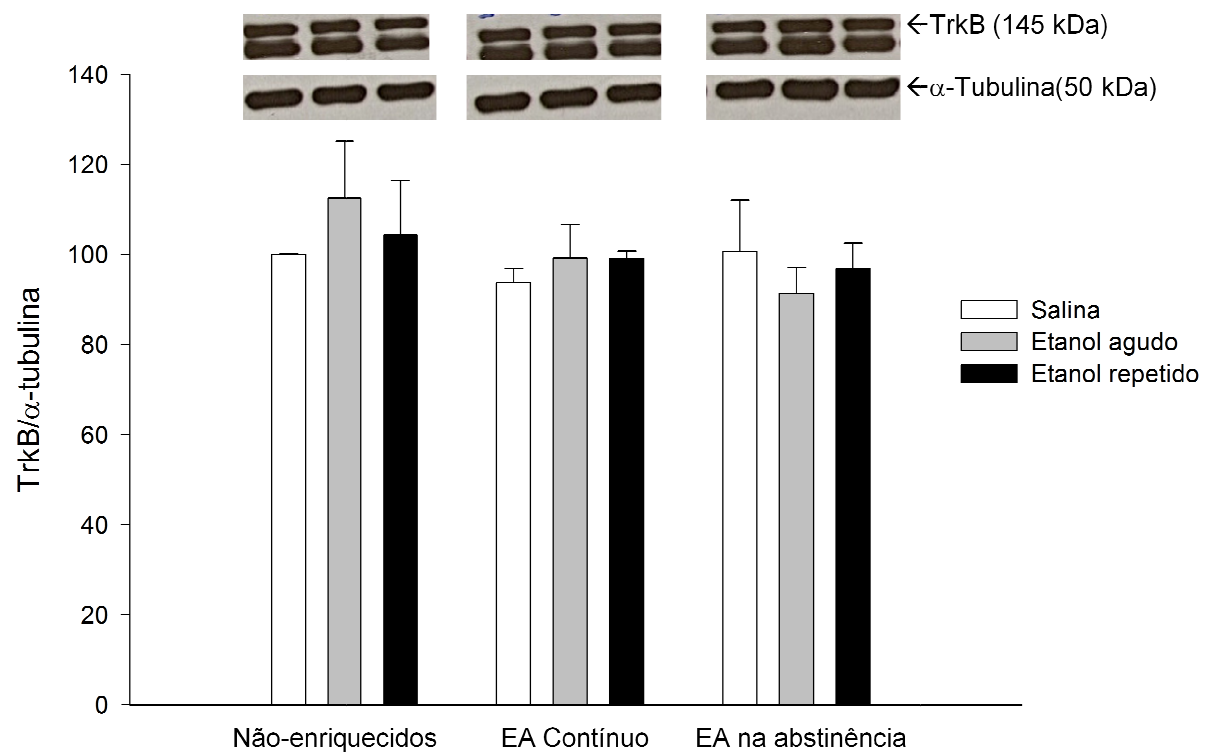
Já para o hipocampo (Fig. 9), a ANOVA-2 vias indicou significância estatística para o fator ENRIQUECIMENTO [ $F_{(2,20)} = 4,01$ ,  $p < 0,05$ ]. A análise *post-hoc* mostrou que houve decréscimo nos níveis de TrkB no hipocampo dos grupos expostos ao EA durante a abstinência, independentemente do tratamento, em relação aos grupos expostos ao EA contínuo ou aos grupos mantidos em condições padrão de alojamento ( $p < 0,05$ ).



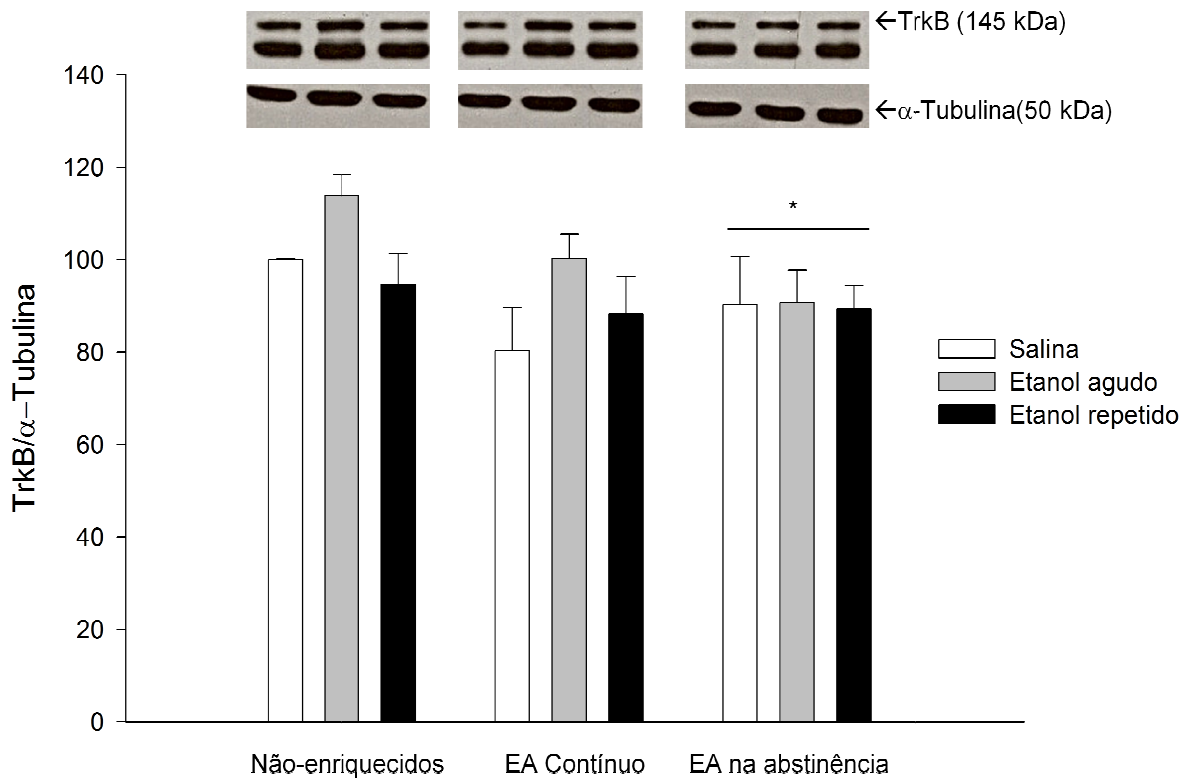
**Figura 6.** Níveis do fator neurotrófico derivado de encéfalo (BDNF) no córtex pré-frontal, expressos como pg de BDNF por mg de tecido. Os grupos que passaram pelo enriquecimento ambiental (diário, contínuo ou apenas durante a abstinência) apresentaram menores níveis de BDNF (\* -  $p < 0,001$ ). O tratamento repetido de etanol (de maneira independente do grupo) também diminuiu os níveis de BDNF comparado com o grupo salina e etanol agudo (\*\* -  $p < 0,001$ ). Os grupos tratados repetidamente com etanol que passaram pelo enriquecimento apresentaram menores níveis que o grupo não enriquecido (# -  $p < 0,001$ ). Dados representam média + erro padrão da média.



**Figura 7.** Níveis do fator neurotrófico derivado de encéfalo (BDNF) no hipocampo, expressos como pg de BDNF por mg de tecido. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Dados representam média + erro padrão da média.



**Figura 8.** Expressão proteica de TrkB no córtex pré-frontal. Gel representativo do Western Blot para TrkB e  $\alpha$ -Tubulina e níveis do receptor TrkB, normalizados pelos níveis de  $\alpha$ -Tubulina, expressos como porcentagem do valor do grupo controle (grupo salina não-enriquecido). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Dados representam média + erro padrão da média.



**Figura 9.** Expressão proteica de TrkB no hipocampo. Gel representativo do Western Blot para TrkB e  $\alpha$ -Tubulina e níveis do receptor TrkB, normalizados pelos níveis de  $\alpha$ -Tubulina, expressos como porcentagem do valor do grupo controle (grupo salina não-enriquecido). Os grupos expostos ao enriquecimento ambiental durante a abstinência apresentaram níveis mais baixos de conteúdo proteico de TrkB (\* -  $p < 0,05$ ) quando comparados os grupos mantidos em condições padrão de alojamento ou expostos ao EA contínuo. Dados representam média + erro padrão da média.

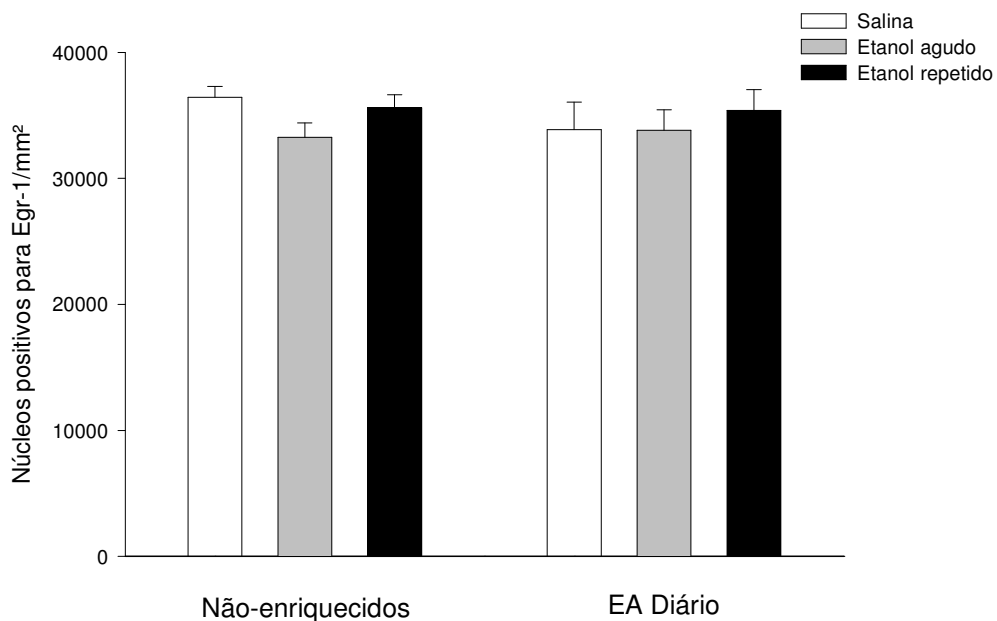
### 5.6 Avaliação da expressão de *Egr-1* por imuno-histoquímica

Entre as estruturas analisadas [córtex pré-frontal medial - dividido em dorsal (Fig. 10) e ventral (Fig. 11) -, córtex insular (Fig. 12 e 13), núcleo accumbens (Fig. 14 e 15), e área CA1 do hipocampo (Fig. 16)], foram encontradas diferenças estatisticamente significantes no córtex insular e no núcleo accumbens.

No córtex insular, a ANOVA-2 vias indicou significância estatística da interação entre os fatores ENRIQUECIMENTO e TRATAMENTO [ $F_{(2,31)} = 9,27$ ,  $p < 0,001$ ]. A análise *post-hoc* revelou que houve um decréscimo na expressão de *Egr-1* nos animais submetidos ao EA tratados agudamente com etanol, quando comparados ao grupo não-enriquecido correspondente, quando comparados ao grupo salina exposto ao EA e quando comparados ao grupo exposto ao EA e tratado repetidamente com etanol ( $p < 0,05$ ). O grupo tratado repetidamente com etanol exposto ao EA apresentou, por sua vez, níveis mais elevados de expressão de *Egr-1*.

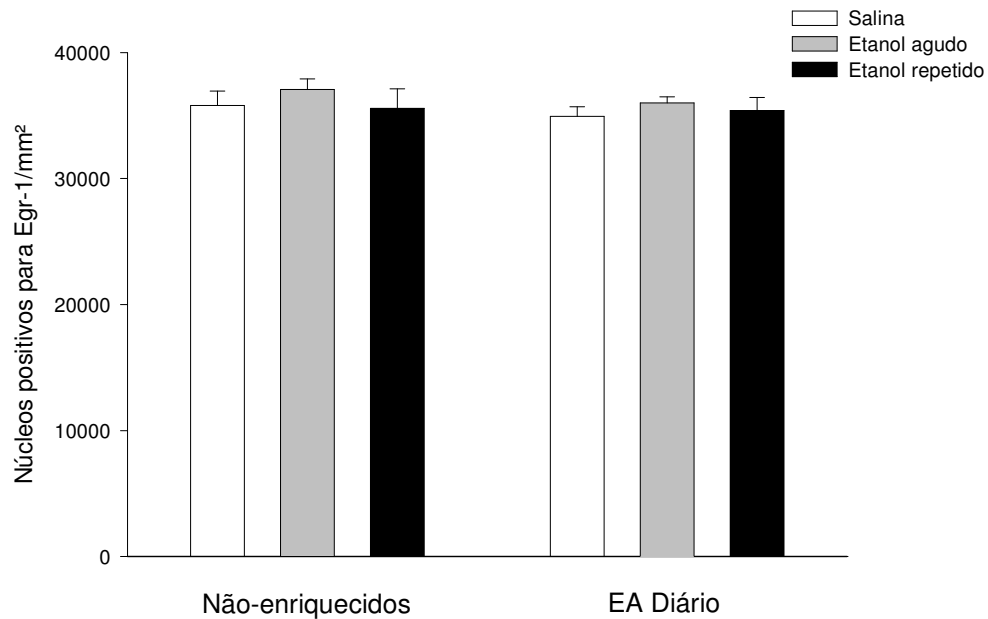
1, quando comparados ao grupo não-enriquecido correspondente, ou ao grupo exposto ao EA e tratado agudamente com etanol ( $p < 0,05$ ).

No núcleo accumbens, o fator TRATAMENTO mostrou-se estatisticamente significativo na ANOVA-2 vias [ $F_{(2,29)} = 6,84$ ,  $p < 0,01$ ]. Os grupos tratados repetidamente com etanol exibiram um aumento nos níveis de Egr-1 nesta estrutura, independentemente da exposição ou não ao EA.

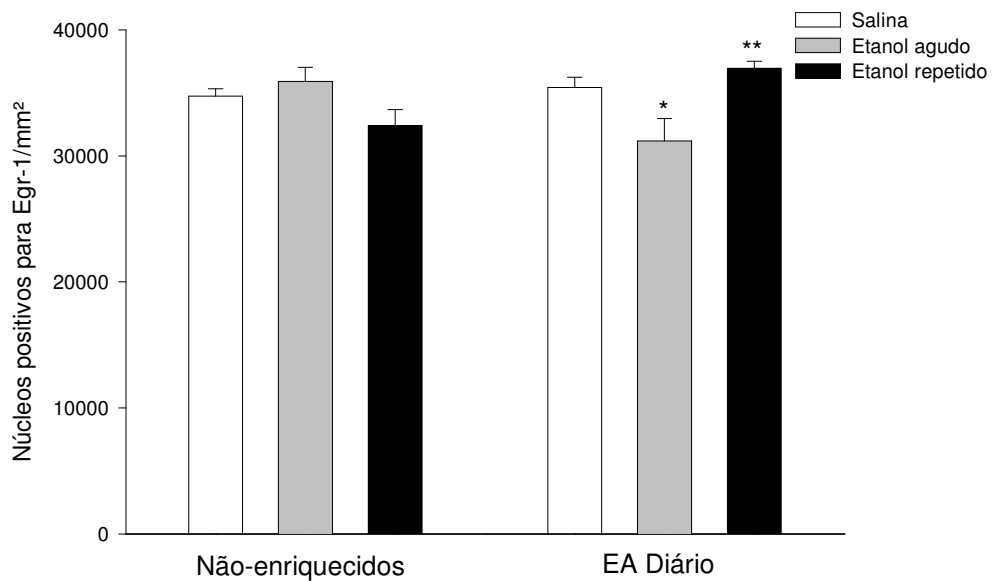


**Figura 10.** Contagem de núcleos marcados positivamente para Egr-1 no córtex pré-frontal medial dorsal. Não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos. Os resultados são expressos como a média do número de núcleos marcados/mm<sup>2</sup> + erro padrão da média.

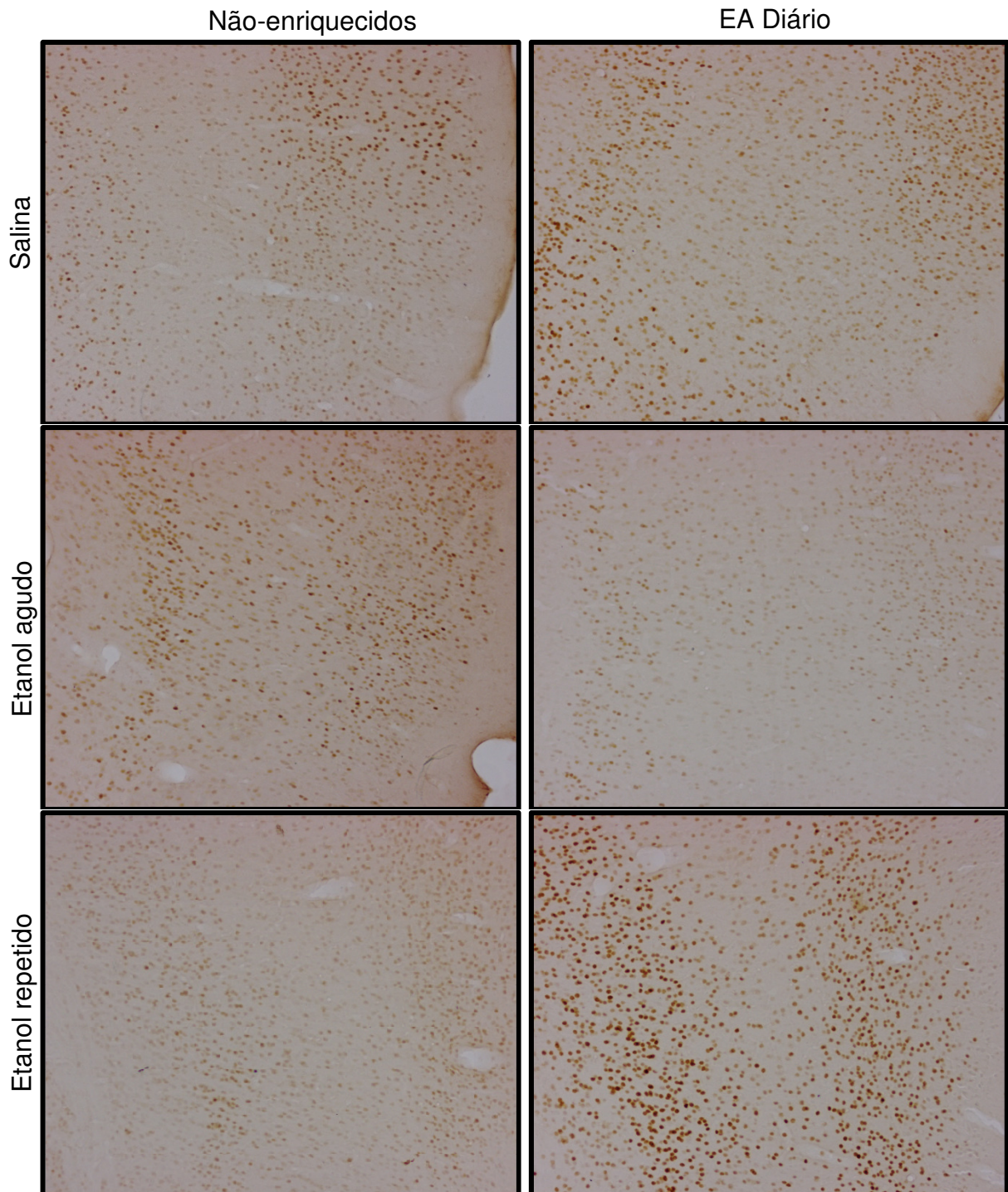




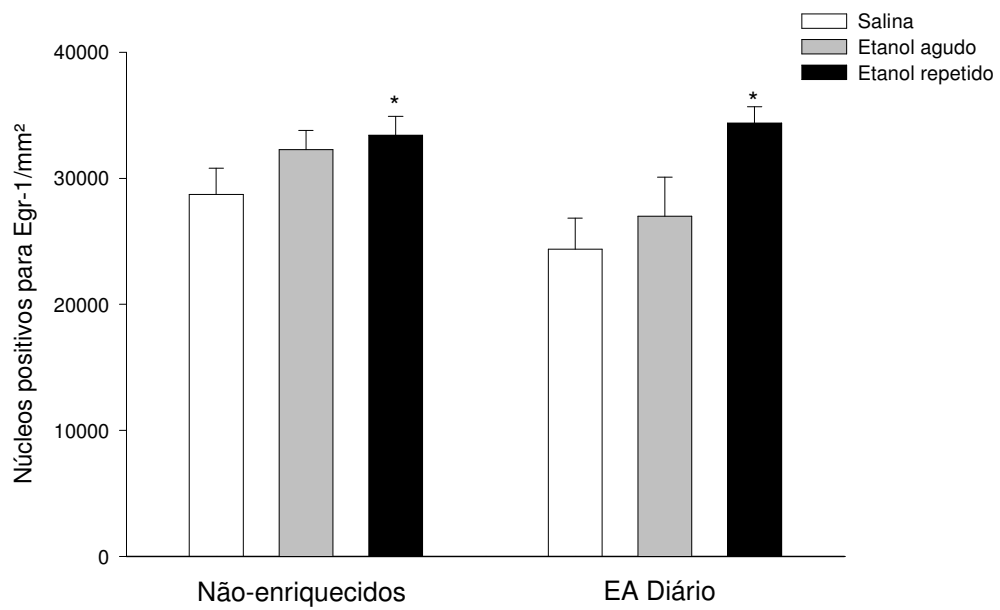
**Figura 11.** Contagem de núcleos marcados positivamente para Egr-1 no córtex pré-frontal medial ventral. Não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos. Os resultados são expressos como a média do número de núcleos marcados/mm<sup>2</sup> + erro padrão da média.



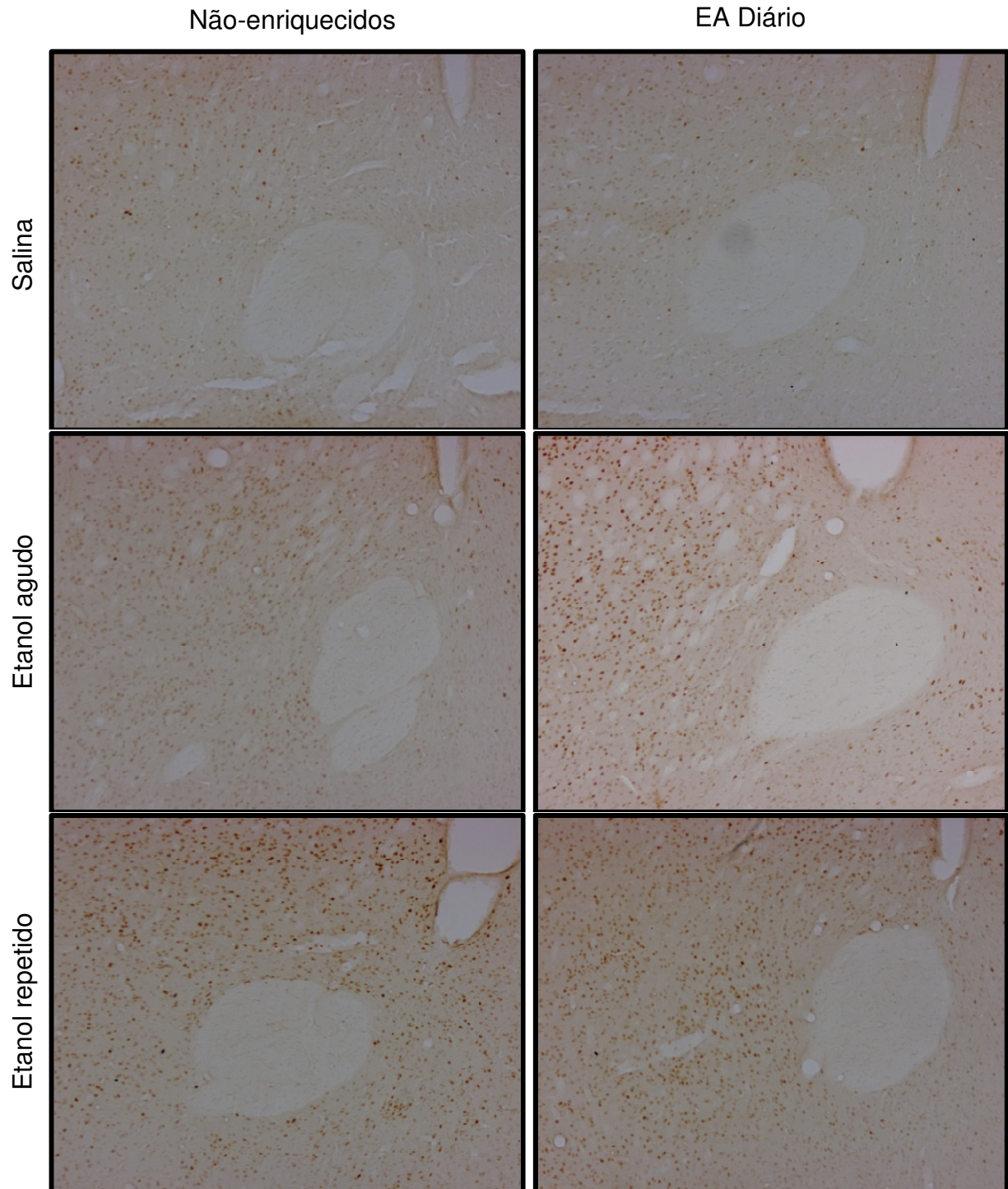
**Figura 12.** Contagem de núcleos marcados positivamente para Egr-1 no córtex insular. O grupo exposto ao enriquecimento ambiental tratado agudamente com etanol apresentou decréscimos na expressão de Egr-1 quando comparado ao grupo não-enriquecido que recebeu o mesmo tratamento e com os grupos salina e etanol repetido expostos ao enriquecimento (\* -  $p < 0,05$ ). O grupo exposto ao enriquecimento ambiental tratado repetidamente com etanol exibiu um aumento na expressão de Egr-1 quando comparado ao grupo não-enriquecido que recebeu o mesmo tratamento e ao grupo tratado agudamente com etanol exposto ao enriquecimento (\*\* -  $p < 0,05$ ). Os resultados são expressos como a média do número de núcleos marcados/mm<sup>2</sup> + erro padrão da média.



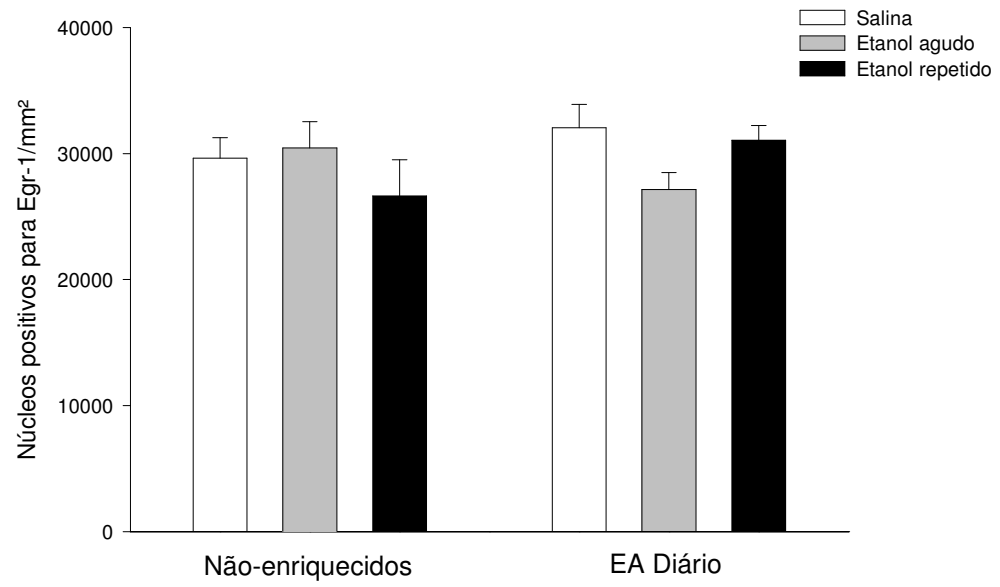
**Figura 13.** Fotomicrografias de seções coronais ao nível do córtex insular de camundongos mantidos em condições padrão de alojamento ou expostos ao enriquecimento ambiental. Aumento de 10x.



**Figura 14.** Contagem de núcleos marcados positivamente para Egr-1 no núcleo accumbens. Os grupos tratados repetidamente com etanol apresentaram aumento nos níveis de Egr-1, independentemente da exposição ao enriquecimento ambiental (\* -  $p < 0,01$ ). Os resultados são expressos como a média do número de núcleos marcados/mm<sup>2</sup> + erro padrão da média.



**Figura 15.** Fotomicrografias de secções coronais ao nível do núcleo accumbens de camundongos mantidos em condições padrão de alojamento ou expostos ao enriquecimento ambiental. Aumento de 10x.



**Figura 16.** Contagem de núcleos marcados positivamente para Egr-1 no hipocampo. Não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos. Os resultados são expressos como a média do número de núcleos marcados/mm<sup>2</sup> + erro padrão da média.

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram, pela primeira vez, que o EA preveniu o desenvolvimento da sensibilização comportamental ao etanol, uma vez que a atividade locomotora dos animais tratados repetidamente com etanol e alojados em ambiente enriquecido não apresentou um aumento gradativo no decorrer do tratamento.

Este dado corrobora a literatura, uma vez que este efeito inibitório do EA sobre a sensibilização já foi verificado para outras drogas de abuso, como anfetamina (BARDO et al., 1995), nicotina (GREEN et al., 2003) e cocaína (SOLINAS et al., 2009).

O bloqueio do desenvolvimento da sensibilização pelo EA não pode ser atribuído a alterações farmacocinéticas, já que não foram encontradas diferenças entre as concentrações de etanol no sangue dos animais submetidos ao EA e as dos criados em condições padrão. É provável que o efeito inibitório seja devido a outros mecanismos, como por exemplo, processos de neuroplasticidade promovidos pelo EA em áreas encefálicas críticas para o desenvolvimento da sensibilização comportamental.

Um resultado interessante foi que o enriquecimento não só preveniu como também reverteu a sensibilização comportamental induzida pelo tratamento repetido com etanol. Animais que desenvolveram sensibilização comportamental tiveram a atividade locomotora diminuída em resposta ao etanol, após serem alojados em ambiente enriquecido, comparados aos que permaneceram em condições padrão de alojamento.

Acredita-se que a sensibilização comportamental seja a manifestação psicomotora de uma sensibilização em vias neuronais envolvidas em comportamentos motivados, mais especificamente, a via dopaminérgica mesolímbica/mesocortical. A sensibilização desta via seria o fenômeno responsável pela transição do “gostar” para o “querer” e o “necessitar” da droga (ROBINSON e BERRIDGE, 2008). Daí a importância em se desvendar os mecanismos responsáveis por esse fenômeno, assim como encontrar formas de inibição ou prevenção.

Os efeitos do tratamento repetido com a droga são prolongados, pois levam a mudanças na expressão gênica que culminam em alterações neuroplásticas

(NESTLER, 2004). Sabe-se que a sensibilização é um fenômeno duradouro, e durante a abstinência da droga os sistemas neuronais permanecem em um estado sensibilizado; por mais que não haja contato direto com a droga, pistas ambientais podem deflagrar a sua busca, e eliciar a “fissura” (*craving*), em que pacientes relatam que há o desejo pela droga quando apresentados a pistas relacionadas ao consumo da mesma (ROBINSON e BERRIDGE, 2003; ROBINSON e BERRIDGE, 2008).

No presente estudo, o EA não apenas preveniu o desenvolvimento da sensibilização, mas também reverteu este quadro, bloqueando a expressão. Se os efeitos psicomotores refletem um estado neuronal sensibilizado, o EA pode ser uma estratégia interessante para se estudar como o ambiente é capaz de modular a sensibilização. A estimulação sensório-motora proporcionada pelo EA parece se contrapor aos efeitos da droga, ou à associação destes efeitos com os estímulos condicionados à tomada da droga.

A perda do controle do uso da droga e a propensão às recaídas podem ser precipitadas pela exposição a estímulos associados à droga. Em humanos, estímulos ambientais neutros, como a parafernália usada para administração de drogas (seringa, copo, espelho, etc.), são associados aos efeitos das mesmas, através do condicionamento Pavloviano. Em pacientes dependentes, a fissura pode ser evocada após exposição a imagens e outros estímulos ligados à droga. Nestes estudos, a amígdala, o córtex cingulado anterior e o córtex pré-frontal orbital estão mais ativados (GRANT et al., 1996; MAAS et al., 1998; CHILDRESS et al., 1999, WANG et al., 1999). Em animais experimentais, o pareamento de estímulos ou de pistas ambientais com cocaína ou anfetamina resulta em resposta locomotora condicionada quando o estímulo é apresentado na ausência da droga, o qual é acompanhado por aumento da expressão de c-Fos no córtex pré-frontal, córtex cingulado anterior, amígdala basolateral e núcleo accumbens (BROWN, ROBERTSON; FIBIGER, 1992; MEAD et al., 1999; FRANKLIN e DRUHAN, 2000; HOTSENPILLER; HORAK; WOLF, 2002), sugerindo a participação dessas estruturas nos processos de aprendizagem e condicionamento.

A associação de pistas ambientais com os efeitos da droga pode ser determinante para o desenvolvimento da sensibilização. O estudo de Grimm et al. (2001) mostrou que períodos longos de abstinência aumentam a fissura, especialmente quando pistas associadas à droga estão presentes, sugerindo que as

pistas ambientais disparam os mecanismos motivacionais envolvidos na dependência. É plausível supor que o EA reduziu o impacto dos estímulos ambientais associados ao etanol, ou que atenuou as neuroadaptações do sistema motivacional encefálico produzidas pela exposição repetida ao etanol. Dessa forma, o EA pode ser uma estratégia de atenuação da fissura eliciada por pistas ambientais ou pela droga em si.

No que se refere aos mecanismos do bloqueio da sensibilização exercida pelo EA, o presente trabalho investigou a participação de três proteínas envolvidas tanto com os efeitos do etanol quanto com processos neuroquímicos desencadeados pelo EA: o BDNF e seu receptor, TrkB, e o fator de transcrição Egr-1.

Quanto ao BDNF, os resultados mostraram redução dos níveis de BDNF em animais expostos ao EA no córtex pré-frontal, comparados àqueles alojados em condições padrão, independente do tratamento que receberam (salina, etanol agudo ou repetido). Níveis elevados desta proteína foram associados ao aumento da atividade locomotora (sensibilização comportamental) induzida por cocaína (HORGHER et al., 1999) o que pode sugerir alguma relação positiva entre sensibilização e níveis de BDNF. No presente trabalho, a administração repetida de etanol diminuiu os níveis de BDNF, independente da condição ambiental; entretanto, essa atenuação foi mais proeminente nos animais expostos ao EA, ou seja, aqueles que não sensibilizaram. O BDNF é uma molécula comumente associada a eventos neuroprotetores (CAO et al., 2010; ALBERCH et al., 2002; LINDVALL et al., 1994), inclusive dos efeitos do etanol (RON e JURD, 2005). Considerando esse dado, é plausível supor que o EA esteja mimetizando os efeitos do BDNF por meio da modulação de sistemas *downstream* regulados pelo BDNF. Desta forma, os níveis desta proteína se mantêm baixos em animais expostos ao EA, como forma de compensação. Essa hipótese precisaria ser testada em trabalhos futuros.

Entretanto, outros modelos também encontraram benefícios do EA promovidos de maneira não relacionada ao BDNF (PEREIRA et al., 2009). De toda forma, a redução nos níveis de TrkB encontrada no hipocampo vai ao encontro dos resultados obtidos para o BDNF no córtex pré-frontal, no sentido da diminuição da sinalização do BDNF.

De modo geral, o BDNF está bastante envolvido em vários efeitos do etanol; por exemplo, o consumo de etanol pode ser aumentado com a administração de oligonucleotídeos antisense para o RNAm do BDNF na amígdala de ratos, e a via de



sinalização mediada por BDNF e TrkB está alterada nos processos de neurodegeneração induzidos pelo etanol e no espectro de desordens causadas pela Síndrome do Alcoolismo Fetal (DAVIS, 2008; MOONAT et al., 2010). E há a possibilidade de que a regulação do BDNF por esta droga seja afetada pelo EA. Garcia et al. (2003) observaram que lesões induzidas farmacologicamente nos sistemas noradrenérgico e serotoninérgico, respectivamente, alteram as variantes de *splicing* do RNAm do BDNF que são expressas nas diferentes regiões do hipocampo, após atividade física voluntária em ratos. Assim, estratégias que avaliam a expressão dos diferentes éxons do gene do BDNF poderiam prover novas informações sobre um possível papel desta neurotrofina na atenuação da sensibilização induzida por etanol.

Há uma contradição aparente em relação ao fato de alguns dos efeitos do EA terem sido no mesmo sentido que os efeitos do tratamento repetido de etanol, como, por exemplo, a diminuição dos níveis de BDNF no córtex pré-frontal observada neste trabalho. Contudo, vale lembrar que a dose de etanol usada no presente trabalho é uma dose baixa. No sistema periférico, estudos com animais, pacientes saudáveis e diabéticos mostraram que doses baixas de etanol são benéficas para o sistema cardiovascular (NAPOLI et al., 2008; MARTIN et al., 2010; SCHALLER et al., 2010). No Sistema Nervoso Central, a associação de cafeína e etanol em doses baixas reduziu a perda de tecido cortical e melhorou a memória de trabalho em ratos com lesão cerebral (DASH et al., 2004). Apesar de ser uma questão polêmica, uma revisão da literatura mostrou que quantidades moderadas de etanol podem ser benéficas na redução do estresse e podem melhorar certos tipos de desempenho cognitivo, como memória de curta duração e habilidade para resolver problemas (BAUM-BAICKER, 1985). Entretanto, se considerarmos que esse seja um efeito contraditório, o mesmo também foi encontrado no trabalho de Cao et al. (2010), em que o BDNF reduziu a formação de tumores via promoção da ativação simpática pelo hipotálamo, que resultou em aumento nos níveis circulantes de corticosterona e noradrenalina. Esta, por sua vez, atuou sobre adipócitos diminuindo a liberação de leptina, a responsável, em última análise, pela formação de tumores (CAO et al., 2010).

A ativação simpática promovida pelo aumento do BDNF após a exposição ao EA, contudo, também ocorre após a exposição ao estresse crônico. Esta manipulação, de maneira similar ao EA, leva ao aumento dos níveis de BDNF.

Porém, apesar de empregar mediadores químicos semelhantes, o estresse crônico leva ao aumento da formação de tumores, efeito oposto ao descrito anteriormente (KAPPELER e MEANEY, 2010). Sendo assim, propõe-se que manipulações ambientais com efeitos complexos, como o EA ou estresse crônico, podem levar a efeitos opostos empregando mediadores semelhantes ao alterar os mecanismos intracelulares da sinalização, como o estado de ativação de fatores de transcrição (KAPPELER e MEANEY, 2010).

Situação semelhante foi encontrada no modelo de neuroinflamação, em que o estresse crônico imprevisível aumentou a ativação do NF- $\kappa$ B promovida pelo lipopolissacarídeo (LPS) via secreção de glicocorticóides, hormônios tipicamente associados a efeitos anti-inflamatórios (MUNHOZ et al., 2010).

Em relação ao Egr-1, encontramos aumento da expressão de Egr-1 no núcleo accumbens após tratamento repetido com etanol, independente da condição ambiental. Esse achado difere daquele encontrado anteriormente em nosso laboratório (FARIA et al., 2010). Entretanto, a dose utilizada naquele trabalho era diferente (2,0 g/kg), bem como o protocolo de tratamento. Diferenças dependentes de dose e da região encefálica analisada para a expressão de Egr-1 já foram relatadas (DEPAZ; GOODENOUGH; WILCE, 2000; RYABININ et al., 1997;). Além disso, alterações na atividade de transcrição do Egr-1 podem ser encontradas apesar de não haver diferenças nos níveis proteicos, uma vez que os domínios *zinc finger* do Egr-1 podem ser modulados por outros fatores, como o estado redox celular (DEPAZ; GOODENOUGH; WILCE, 2000).

No córtex insular foi encontrada diminuição da imunorreatividade do Egr-1 após uma única injeção de etanol, e aumento de Egr-1 após administração repetida em camundongos expostos ao EA. Este aumento neuroadaptivo em resposta à administração repetida de etanol pode estar relacionado à proteção do EA frente à sensibilização comportamental. Já foi relatada diminuição da matéria cinzenta em regiões encefálicas como o córtex orbitofrontal medial, córtex cingulado anterior e o próprio córtex insular, em sua porção anteroventral, em pacientes dependentes de cocaína (FRANKLIN et al., 2002). Estes autores propõem que estas alterações podem explicar a hipoatividade metabólica e a diminuição do fluxo sanguíneo encontrado em pacientes dependentes de cocaína (FRANKLIN et al., 2002). Assim, como o incremento da imunorreatividade de Egr-1 está relacionado a aumentos da atividade neuronal, o EA pode ter eliciado uma resposta compensatória nesta região

encefálica frente a um quadro relacionado à dependência, a sensibilização comportamental, bloqueando seu desenvolvimento e sua expressão. A ínsula é uma região encefálica relacionada à tomada de decisões e à atribuição da valência emocional a estímulos. Apesar de haver estudos mostrando a ativação de áreas encefálicas, incluindo o córtex insular, em pacientes com *craving* induzido por pistas associadas à cocaína (WANG et al., 1999), é possível especular que a atribuição de valência emocional aos efeitos do etanol pode ter sido alterada nos camundongos expostos ao EA, impedindo o desenvolvimento da sensibilização.

## 7 CONCLUSÕES

O EA foi capaz de prevenir o desenvolvimento e bloquear a expressão da sensibilização ao etanol.

Apesar de as alterações na expressão de BDNF e TrkB nos grupos expostos ao EA não terem sido específicas para o grupo tratado repetidamente com etanol, elas podem contribuir para os efeitos do EA sobre a sensibilização comportamental a esta droga, bem como o aumento da expressão de Egr-1, especialmente no córtex insular.

Independente dos mecanismos moleculares, que necessitam ser melhor explorados, o EA representa um campo de estudo promissor para a busca de estratégias eficazes quanto à prevenção e o tratamento da dependência.

**REFERÊNCIAS\***

ALBERCH, J.; PÉREZ-NAVARRO, E.; CANALS, J. M. Neuroprotection by neurotrophins and GDNF family members in the excitotoxic model of Huntington's disease. **Brain Res. Bull.**, v. 57, n. 6, p. 817-822, 2002.

BARDO, M. T.; BOWLING, S. L.; ROWLETT, J. K.; MANDERSCHIED, P.; BUXTON, S. T.; DWOSKIN, L. P. Environmental enrichment attenuates locomotor sensitization, but not in vitro dopamine release, induced by amphetamine. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 51, n. 2-3, p. 397-405, 1995.

BARDO, M. T.; KLEBAUR, J. E.; VALONE, J. M.; DEATON, C. Environmental enrichment decreases intravenous self-administration of amphetamine in female and male rats. **Psychopharmacology**, v. 155, n. 3, p. 278-284, 2001.

BAUM-BAICKER, C. The psychological benefits of moderate alcohol consumption: a review of the literature. **Drug. Alcohol. Depend.**, v. 15, n. 4, p. 305-322, 1985.

BENNETT, J. C.; MCRAE, P. A.; LEVY, L. J.; FRICK, K. M. Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice. **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 85, p. 139-152, 2006.

BOEHM, S. L. 2ND; GOLDFARB, K. J.; SERIO, K. M.; MOORE, E. M.; LINSENBARDT, D. N. Does context influence the duration of locomotor sensitization to ethanol in female DBA/2J mice? **Psychopharmacology (Berl.)**, v. 197, n. 2, p. 191-201, 2008.

BROWN, E. E.; ROBERTSON, G. S.; FIBIGER, H. C. Evidence for conditional neuronal activation following exposure to a cocaine-paired environment: role of forebrain limbic structures. **J. Neurosci.**, v. 12, n. 10, p. 4112-4121, 1992.

BROWN, J.; COOPER-KUHN, C. M.; KEMPERMANN, G.; VAN PRAAG, H.; WINKLER, J.; GAGE, F. H.; KUHN, H. G. Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. **Eur. J. Neurosci.**, v. 17, n. 10, p. 2042-2046, 2003.

CADOR, M.; BJIJOU, Y.; STINUS, L. Evidence of a complete independence of the neurobiological substrates for the induction and expression of behavioral sensitization to amphetamine. **Neuroscience**, v. 65, n. 2, p. 385-395, 1995.

---

\* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS: **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CAMARINI, R.; ANDREATINI, R.; MONTEIRO, M. G. Prolonged treatment with carbamazepine increases the stimulatory effects of ethanol in mice. **Alcohol**, v. 12, p. 305-308, 1995.

CAMARINI, R.; FRUSSA-FILHO, R.; MONTEIRO, M. G.; CALIL, H. M. MK-801 blocks the development of behavioral sensitization to the ethanol. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v. 24, p. 285-290, 2000.

CAO, L.; LIU, X.; LIN, E. J.; WANG, C.; CHOI, E. Y.; RIBAN, V.; LIN, B.; DURING, M. J. Environmental and genetic activation of a brain-adipocyte BDNF/leptin axis causes cancer remission and inhibition. **Cell**, v. 142, p. 52-64, 2010.

CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS; SECRETARIA NACIONAL ANTIDROGAS. **II Levantamento domiciliar sobre uso de drogas psicotrópicas no Brasil: Estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país: 2005.** São Paulo: Páginas & Letras Editora e Gráfica Ltda., 2006. 468 p.

CHILDRESS, A. R.; MOZLEY, P. D.; MCELGIN, W.; FITZGERALD, J.; REIVICH, M.; O'BRIEN, C. P. Limbic activation during cue-induced cocaine craving. **Am. J. Psychiatry.**, v. 156, n. 1, p. 11-18, 1999.

CHOURBAJI, S.; BRANDWEIN, C.; GASS, P. Altering BDNF expression by genetics and/or environment: Impact for emotional and depression-like behavior in laboratory mice. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 35, n. 3, p. 599-61, 2011.

COLE A. J.; SAFFEN D. W.; BARABAN J. M.; WORLEY P. F. Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation. **Nature**, v. 340, p. 474-476, 1989.

CONNOR, B.; DRAGUNOW, M. The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. **Brain Res. Brain Res. Rev.**, v. 27, n. 1, p. 1-39, 1998.

COROMINAS, M.; RONCERO, C.; RIBASES, M.; CASTELLS, X.; CASAS, M. Brain-derived neurotrophic factor and its intracellular signaling pathways in cocaine addiction. **Neuropsychobiology**, v. 55, n. 1, p. 2-13, 2007.

CUNNINGHAM, C. L.; NOBLE, D. Conditioned activation induced by ethanol: role in sensitization and conditioned place preference. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 43, n. 1, p. 307-313, 1992.

DAVIS, M. I. Ethanol-BDNF interactions: still more questions than answers. **Pharmacol. Ther.**, v. 118, n. 1, p. 36-57, 2008.

DASH, P. K.; MOORE, A. N.; MOODY, M. R.; TREADWELL, R.; FELIX, J. L.; CLIFTON, G. L. Post-trauma administration of caffeine plus ethanol reduces contusion volume and improves working memory in rats. **J. Neurotrauma.**, v. 21, n. 11, p. 1573-1583, 2004.

DEEHAN, G. A. JR; CAIN, M. E.; KIEFER, S. W. Differential rearing conditions alter operant responding for ethanol in outbred rats. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v. 31, n. 10, p. 1692-1698, 2007.

DEPAZ, I. M.; GOODENOUGH, S., WILCE, P. A. Chronic ethanol has region-selective effects on Egr-1 and Egr-3 DNA-binding activity and protein expression in the rat brain. **Neurochem. Int.**, v. 37, n. 5-6, p.473-48, 2000.

DIAMOND, M. C. Extensive cortical depth measures and neuron size increases in the cortex of environmentally enriched rats. **Journal of Comparative Neurology**, v. 123, p. 357-364, 1967.

DI CHIARA, G. Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 375, n. 1-3, p. 13-30, 1999.

DIDONE, V.; QUOILIN, C.; TIRELLI, E.; QUERTEMONT, E. Parametric analysis of the development and expression of ethanol-induced behavioral sensitization in female Swiss mice: effects of dose, injection schedule, and test context. **Psychopharmacology (Berl.)**, v. 201, n. 2, p. 249-260, 2008.

DUFFY, S. N.; CRADDOCK, K. J.; NGUYEN, P. V. Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP and improves hippocampus-dependent memory. **Learn. Mem.**, v. 8, n. 1, p. 26-34, 2001.

ENCINAS, M.; IGLESIAS, M.; LLECHA, N.; COMELLA, J. X. Extracellular-regulated kinases and phosphatidylinositol 3-kinase are involved in brain-derived neurotrophic factor-mediated survival and neuritogenesis of the neuroblastoma cell line SH-SY5Y. **J. Neurochem.**, v. 73, n. 4, p. 1409-1421, 1999.

FADDA, F.; ROSSETTI, Z. L. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. **Prog. Neurobiol.**, v. 56, n. 4, p. 385-431, 1998.

FARIA, R. R.; RUEDA, A. V. L.; SAYURI, C.; SOARES, S. L.; MALTA, M. B.; CARRARA-NASCIMENTO, P. F.; ALVES, A. S.; MARCOURAKIS, T.; YONAMINE, M.; SCAVONE, C.; BRITTO, L. R. G.; CAMARINI, R. Environmental modulation of ethanol-induced locomotor activity: Correlation with neuronal activity in distinct brain regions of adolescent and adult Swiss mice. **Brain Res.**, v. 1239, p. 127-140, 2008.

FILIP, M.; FARON-GORECKA, A.; KUSMIDER, M.; GOLDA, A.; FRANKOWSKA, M.; DZIEDZICKA-WASYLEWSKA, M. Alterations in BDNF and TrkB mRNAs following acute or sensitizing cocaine treatments and withdrawal. **Brain Res.**, v. 1071, p. 218-225, 2006.

FRANKLIN, T. R.; DRUHAN, J. P. Expression of Fos-related antigens in the nucleus accumbens and associated regions following exposure to a cocaine-paired environment. **Eur. J. Neurosci.**, v. 12, n. 6, p. 2097-2106, 2000.

FRANKLIN, T. R.; ACTON, P. D.; MALDJIAN, J. A.; GRAY, J. D.; CROFT, J. R.; DACKIS, C. A.; O'BRIEN, C. P.; CHILDRESS, A. R. Decreased gray matter concentration in the insular, orbitofrontal, cingulate, and temporal cortices of cocaine patients. **Biol. Psychiatry.**, v. 51, n. 2, p. 134-142, 2002.

GARCIA, C.; CHEN, M. J.; GARZA, A. A.; COTMAN, C. W.; RUSSO-NEUSTADT, A. The influence of specific noradrenergic and serotonergic lesions on the expression of hippocampal brain-derived neurotrophic factor transcripts following voluntary physical activity. **Neuroscience**, v. 119, n. 3, p. 721-732, 2003.

GHITZA, U. E.; ZHAI, H.; WU, P.; AIRAVAARA, M.; SHAHAM, Y.; LU, L. Role of BDNF and GDNF in drug reward and relapse: A review. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 35, n. 2, p. 157-171, 2010.

GRANT, S.; LONDON, E. D.; NEWLIN, D. B.; VILLEMAGNE, V. L.; LIU, X.; CONTOREGGI, C.; PHILLIPS, R. L.; KIMES, A. S.; MARGOLIN, A. Activation of memory circuits during cue-elicited cocaine craving. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 93, n. 21, p. 12040-12045, 1996.

GREEN, E. J.; GREENOUGH, W. T.; SCHLUMPF, B. E. Effects of complex or isolated environments on cortical dendrites of middle-aged rats. **Brain Research**, v. 264, p. 233-240, 1983.

GREEN, E. J.; GREENOUGH, W. T. Altered synaptic transmission in dentate gyrus of rats reared in complex environments: Evidence from hippocampal slices maintained in vitro. **Journal of Neurophysiology**, v. 55, p. 739-750, 1986.



GREEN, T. A.; CAIN, M. E.; THOMPSON, M.; BARDO, M. T. Environmental enrichment decreases nicotine-induced hyperactivity in rats. **Psychopharmacology (Berl.)**, v. 170, n. 3, p. 235-241, 2003.

GREEN, T. A.; ALIBHAI, I. N.; ROYBAL, C. N.; WINSTANLEY, C. A.; THEOBALD, D. E.; BIRNBAUM, S. G.; GRAHAM, A. R.; UNTERBERG, S.; GRAHAM, D. L.; VIALOU, V.; BASS, C. E.; TERWILLIGER, E. F.; BARDO, M. T.; NESTLER, E. J. Environmental enrichment produces a behavioral phenotype mediated by low cyclic adenosine monophosphate response element binding (CREB) activity in the nucleus accumbens. **Biol. Psychiatry**, v. 67, n. 1, p. 28-35, 2010.

GRIMM, J. W.; HOPE, B. T.; WISE, R. A.; SHAHAM, Y. Neuroadaptation. Incubation of cocaine craving after withdrawal. **Nature**, v. 412, n. 6843, p. 141-142, 2001.

GUILLIN, O.; GRIFFON, N.; BEZARD, E.; LERICHE, L.; DIAZ, J.; GROSS, C.; SOKOLOFF, P. Brain-derived neurotrophic factor controls dopamine D3 receptor expression: therapeutic implications in Parkinson's disease. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 480, n. 1-3, p. 89-95, 2003.

HALL, F. S.; DRGONOVA, J.; GOEB, M.; UHL, G. R. Reduced behavioral effects of cocaine in heterozygous brain-derived neurotrophic factor (BDNF) knockout mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 8, p. 1485-1490, 2003.

HELDT, S. A.; STANEK, L.; CHHATWAL, J. P.; RESSLER, K. J. Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. **Mol. Psychiatry**, v. 12, n. 7, p. 656-670, 2007.

HEMPSTEAD, B. L.; SALZER, J. L. Neurobiology. A glial spin on neurotrophins. **Science**, v. 298, n. 5596, p. 1184-1186, 2002.

HERDEGEN, T.; LEAH, J. D. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. **Brain Res. Brain Res. Rev.**, v. 28, n. 3, p. 370-490, 1998. Review.

HICKS, R. R.; MARTIN, V. B.; ZHANG, L.; SEROOGY, K. B. Mild experimental brain injury differentially alters the expression of neurotrophin and neurotrophin receptor mRNAs in the hippocampus. **Exp. Neurol.**, v. 160, n. 2, p. 469-478, 1999.

HOFFMAN, P. L.; TABAKOFF, B. Ethanol, sedative hypnotics and glutamate receptor function in brain and cultured cells. **Alcohol. Alcohol. Suppl.**, v. 2, p. 345-351, 1993.

HORGER, B. A.; IYASERE, C. A.; BERHOW, M. T.; MESSER, C. J.; NESTLER, E. J.; TAYLOR, J. R. Enhancement of locomotor activity and conditioned reward to cocaine by brain-derived neurotrophic factor. **J. Neurosci.**, v. 19, n. 10, p. 4110-4122, 1999.

HOTSENPILLER, G.; HORAK, B. T.; WOLF, M. E. Dissociation of conditioned locomotion and Fos induction in response to stimuli formerly paired with cocaine. **Behav. Neurosci.**, v. 116, n. 4, p. 634-645, 2002.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem.*, v. 72, p. 609-642, 2003.

IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Neuroscience. Zif and the survival of memory. **Science**, v. 304, n. 5672, p. 829-830, 2004.

JEANBLANC, J.; HE, D. Y.; MCGOUGH, N. N.; LOGRIP, M. L.; PHAMLUONG, K.; JANAK, P. H.; RON, D. The dopamine D3 receptor is part of a homeostatic pathway regulating ethanol consumption. **J. Neurosci.**, v. 26, n. 5, p. 1457-1464, 2006.

KALIVAS, P. W.; STEWART, J. Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. **Brain Res. Brain Res. Rev.**, v. 16, n. 3, p. 223-244, 1991.

KALIVAS, P. W.; SORG, B. A.; HOOKS, M. S. The pharmacology and neural circuitry of sensitization to psychostimulants. **Behav. Pharmacol.**, v. 4, n. 4, p. 315-334, 1993.

KNAPSKA, E.; KACZMAREK, L. A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK? **Prog. Neurobiol.**, v. 74, n. 4, p. 183-211, 2004.

KERNS, R. T.; RAVINDRANATHAN, A.; HASSAN, S.; CAGE, M. P.; YORK, T.; SIKELA, J. M.; WILLIAMS, R. W.; MILES, M. F. Ethanol-responsive brain region expression networks: implications for behavioral responses to acute ethanol in DBA/2J versus C57BL/6J mice. **J. Neurosci.**, v. 25, n. 9, p. 2255-2266, 2005.

LAMBERT, T. J.; FERNANDEZ, S. M.; FRICK, K. M. Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 83, p. 206–216, 2005.

LEITH, N. J.; KUCZENSKI, R. Chronic amphetamine: tolerance and reverse tolerance reflect different behavioral actions of the drug. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 15, p. 399-404, 1981.

LEVINE, E. S.; CROZIER, R. A.; BLACK, I. B.; PLUMMER, M. R. Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing N-methyl-D-aspartic acid receptor activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 95, n. 17, p.10235-10239, 1998.

LOGRIP, M. L.; JANAK, P. H.; RON, D. Dynorphin is a downstream effector of striatal BDNF regulation of ethanol intake. **FASEB J.**, v. 22, n. 7, p. 2393-2404, 2008.

LINDVALL, O.; KOKAIA, Z.; BENGZON, J.; ELMÉR, E.; KOKAIA, M. Neurotrophins and brain insults. **Trends. Neurosci.**, v. 17, n. 11, p. 490-496, 1994.

MAAS, L. C.; LUKAS, S. E.; KAUFMAN, M. J.; WEISS, R. D.; DANIELS, S. L.; ROGERS, V. W.; KUKES, T. J.; RENSHAW, P. F. Functional magnetic resonance imaging of human brain activation during cue-induced cocaine craving. **Am. J. Psychiatry**, v. 155, n. 1, p. 124-126, 1998.

MASUR, J.; BOERNGEN, R. The excitatory component of ethanol in mice: a chronic study. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 13, p. 777-780, 1980.

MAMOUNAS, L. A.; ALTAR, C. A.; BLUE, M. E.; KAPLAN, D. R.; TESSAROLLO, L.; LYONS, W. E. BDNF promotes the regenerative sprouting, but not survival, of injured serotonergic axons in the adult rat brain. **J. Neurosci.**, v. 20, n. 2, p. 771-782, 2000.

MARTIN, C. G.; AGAPITO, V. V.; OBESO, A.; PRIETO-LLORET, J.; BUSTAMANTE, R.; CASTAÑEDA, J.; AGAPITO, T.; GONZALEZ, C. Moderate ethanol ingestion, redox status, and cardiovascular system in the rat. **Alcohol**, 2010. In press.

MCGOUGH, N. N.; HE, D. Y.; LOGRIP, M. L.; JEANBLANC, J.; PHAMLUONG, K.; LUONG, K.; KHARAZIA, V.; JANAK, P. H.; RON, D. RACK1 and brain-derived neurotrophic factor: a homeostatic pathway that regulates alcohol addiction. **J. Neurosci.**, v. 24, n. 46, p. 10542-10552, 2004.

MEAD, A. N.; VASILAKI, A.; SPYRAKI, C.; DUKA, T.; STEPHENS, D. N. AMPA-receptor involvement in c-fos expression in the medial prefrontal cortex and amygdala dissociates neural substrates of conditioned activity and conditioned reward. **Eur. J. Neurosci.**, v. 11, n. 11, p. 4089-4098, 1999.

MEYER, P. J.; PALMER, A. A.; MCKINNON, C. S.; PHILLIPS, T. J. Behavioral sensitization to ethanol is modulated by environmental conditions, but is not associated with cross-sensitization to allopregnanolone or pentobarbital in DBA/2J mice. **Neuroscience**, v. 131, n. 2, p. 263-273, 2005.

MOONAT, S.; STARKMAN, B. G.; SAKHARKAR, A.; PANDEY, S. C. Neuroscience of alcoholism: molecular and cellular mechanisms. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 67, n. 1, p. 73-88, 2010.

MUNHOZ, C. D.; SORRELLS, S. F.; CASO, J. R.; SCAVONE, C.; SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoids exacerbate lipopolysaccharide-induced signaling in the frontal cortex and hippocampus in a dose-dependent manner. **J. Neurosci.**, v. 30, n. 41, p. 13690-13698, 2010.

NAPOLI, C.; BALESTRIERI, M. L.; SICA, V.; LERMAN, L. O.; CRIMI, E.; DE ROSA, G.; SCHIANO, C.; SERVILLO, L.; D'ARMIENTO, F. P. Beneficial effects of low doses of red wine consumption on perturbed shear stress-induced atherogenesis. **Heart Vessels**, v. 23, n. 2, p. 124-133, 2008.

NESTLER, E. J. Molecular mechanisms of drug addiction. **Neuropharmacology**, v. 47, n. 1, p. 24-32, 2004.

NEUGEBAUER, N. M.; CUNNINGHAM, S. T.; ZHU, J.; BRYANT, R. I.; MIDDLETON, L. S.; DWOSKIN, L. P. Effects of environmental enrichment on behavior and dopamine transporter function in medial prefrontal cortex in adult rats prenatally treated with cocaine. **Brain Res. Dev. Brain Res.**, v. 153, n. 2, p. 213-223, 2004.

O'CALLAGHAN, R. M.; GRIFFIN, E. W.; KELLY, A. M. Long-term treadmill exposure protects against age-related neurodegenerative change in the rat hippocampus. **Hippocampus**, v. 19, p. 1019-102, 2009.

PATTARAWARAPAN, M.; BURGESS, K. Molecular basis of neurotrophin-receptor interactions. **J. Med. Chem.**, v. 46, n. 25, p. 5277-5291, 2003.

PASTOR, R.; MIQUEL, M.; ARAGON, C. M. Habituation to test procedure modulates the involvement of dopamine D2- but not D1-receptors in ethanol-induced locomotor stimulation in mice. **Psychopharmacology (Berl.)**, v. 182, n. 3, p. 436-446, 2005.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press, 2001.

PEREIRA, L. O.; NABINGER, P. M.; STRAPASSON, A. C.; NARDIM, P.; GONÇALVES, C. A.; SIQUEIRA, I. R.; NETTO, C. A. Long-term effects of environmental stimulation following hypoxia-ischemia on the oxidative state and BDNF levels in rat hippocampus and frontal cortex. **Brain Res.**, v. 1247, p. 188-195, 2009.

PINAUD, R. Experience-dependent immediate early gene expression in the adult central nervous system: evidence from enriched-environment studies. **Int. J. Neurosci.**, v. 114, n. 3, p. 321-333, 2004.

RAHMAN, S.; BARDO, M. T. Environmental enrichment increases amphetamine-induced glutamate neurotransmission in the nucleus accumbens: A neurochemical study. **Brain Res.**, v. 1197, p. 40-46, 2008.

RASBAND, W. S.; BRIGHT, D. S. NIH Image: a public domain image processing program for the Macintosh. **Microbeam Anal.**, v. 4, p. 137-149, 1995.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. **Addiction. Annu. Rev. Psychol.**, v. 54, p. 25-53, 2003.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. **Phil. Trans. R. Soc. B.**, v. 363, p. 3137-3146, 2008.

ROCKMAN, G. E.; GIBSON, J. E.; BENARROCH, A. Effects of environmental enrichment on voluntary ethanol intake in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 34, n. 3, p. 487-490, 1989.

RON, D.; JURD, R. The “ups and downs” of signaling cascades in addiction. **Sci. STKE.**, n. 309, p. re14, 2005.

ROSSI, C.; ANGELUCCI, A.; COSTANTIN, L.; BRASCHI, C.; MAZZANTINI, M.; BABBINI, F.; FABBRI, M. E.; TESSAROLLO, L.; MAFFEI, L.; BERARDI, N.; CALEO, M. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. **Eur. J. Neurosci.**, v. 24, n. 7, p. 1850-1856, 2006.

ROSS, S; PESELOW, E. The neurobiology of addictive disorders. **Clin. Neuropharmacol.**, v. 32, n. 5, p. 269-276, 2009.

RYABININ, A. E.; CRIADO, J. R.; HENRIKSEN, S. J.; BLOOM, F. E.; WILSON, M. C. Differential sensitivity of c-Fos expression in hippocampus and other brain regions to moderate and low doses of alcohol. **Mol. Psychiatry**, v. 2, p. 32–43, 1997.

SALZMANN, J.; MARIE-CLAIRE, C.; LE GUEN, S.; ROQUES, B. P.; NOBLE, F. Importance of ERK activation in behavioral and biochemical effects induced by MDMA in mice. **Br. J. Pharmacol.**, v. 140, n. 5, p. 831-838, 2003.

SCHALLER, G.; KRETSCHMER, S.; GOUYA, G.; HAIDER, D. G.; MITTERMAYER, F.; RIEDL, M.; WAGNER, O.; PACINI, G.; WOLZT, M.; LUDVIK, B. Alcohol acutely increases vascular reactivity together with insulin sensitivity in type 2 diabetic men. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**, v. 118, n. 1, p. 57-60, 2010.

SCHINDER, A. F.; POO, M. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. **Trends Neurosci.**, v. 23, n. 12, p. 639-645, 2000.

SEGOVIA, G.; YAGÜE, A. G.; GARCÍA-VERDUGO, J. M.; MORA, F. Environmental enrichment promotes neurogenesis and changes the extracellular concentrations of glutamate and GABA in the hippocampus of aged rats. **Brain. Res. Bull.**, v. 70, n. 1 p. 8-14, 2006.

SIEGEL, S. Drug anticipation and drug addiction. The 1998 H. David Archibald Lecture. **Addiction**, v. 94, n. 8, p. 1113-1124, 1999.

SOKOLOFF, P.; LE FOLL, B.; PERACHON, S.; BORDET, R.; RIDRAY, S.; SCHWARTZ, J. C. The dopamine D3 receptor and drug addiction. **Neurotox. Res.**, v. 3, n. 5, p. 433-441, 2001.

SOKOLOFF, P.; GUILLIN, O.; DIAZ, J.; CARROLL, P.; GRIFFON, N. Brain-derived neurotrophic factor controls dopamine D3 receptor expression: implications for neurodevelopmental psychiatric disorders. **Neurotox. Res.**, v. 4, n. 7-8, p. 671-678, 2002.

SOLINAS, M.; CHAUVET, C.; THIRIET, N.; EL RAWAS, R.; JABER, M. Reversal of cocaine addiction by environmental enrichment. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 105, n. 4, p. 17145-17150, 2008.

SOLINAS, M.; THIRIET, N.; EL RAWAS, R.; LARDEUX, V.; JABER, M. Environmental enrichment during early stages of life reduces the behavioral, neurochemical, and molecular effects of cocaine. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 5, p. 1102-1111, 2009.

SOULÉ, J.; MESSAOUDI, E.; BRAMHAM, C. R. Brain-derived neurotrophic factor and control of synaptic consolidation in the adult brain. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 34, n. 4, p. 600-604, 2006.

SPANAGEL, R.; WEISS, F. The dopamine hypothesis of reward: past and current status. **Trends Neurosci.**, v. 22, p. 521–527, 1999.

SPANAGEL, R. Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior. **Physiol. Rev.**, v. 89, p. 649–705, 2009.

STAIRS, D. J.; BARDO, M. T. Neurobehavioral effects of environmental enrichment and drug abuse vulnerability. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 92, n. 3, p. 377-382, 2009.

STEWART, J.; DE WITT, H.; EIKELBOOM, R. Role of unconditioned and conditioned drug effects in the self-administration behavior. **Psychol. Rev.**, v. 91, p. 251-268, 1984.

SZAPACS, M. E.; MATHEWS, T. A.; TESSAROLLO, L.; ERNEST LYONS, W.; MAMOUNAS, L. A.; ANDREWS, A. M. Exploring the relationship between serotonin and brain-derived neurotrophic factor: analysis of BDNF protein and extraneuronal 5-HT in mice with reduced serotonin transporter or BDNF expression. **J. Neurosci. Methods.**, v. 140, n. 1-2, p. 81-92, 2004.

THIRIET, N.; AMAR, L.; TOUSSAY, X.; LARDEUX, V.; LADENHEIM, B.; BECKER, K. G.; CADET, J. L.; SOLINAS, M.; JABER, M. Environmental enrichment during adolescence regulates gene expression in the striatum of mice. **Brain Res.**, v. 1222, p. 31-41, 2008.

TORASDOTTER, M.; METSIS, M.; HENRIKSSON, B. G.; WINBLAD, B.; MOHAMMED, A. H. Expression of neurotrophin-3 mRNA in the rat visual cortex and hippocampus is influenced by environmental conditions. **Neurosci. Lett.**, v. 218, n. 2, p. 107-110, 1996.

TORASDOTTER, M.; METSIS, M.; HENRIKSSON, B. G.; WINBLAD, B.; MOHAMMED, A. H. Environmental enrichment results in higher levels of nerve growth factor mRNA in the rat visual cortex and hippocampus. **Behav. Brain. Res.**, v. 93, n. 1-2, p. 83-90, 1998.

TORRES, G.; HOROWITZ, J. M. Individual and combined effects of ethanol and cocaine on intracellular signals and gene expression. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 20, n. 4, p. 561-596, 1996.

TRUJILLO, K. A.; AKIL, H. Excitatory amino acids and drugs of abuse: a role for N-methyl-D-aspartate receptors in drug tolerance, sensitization and physical dependence. **Drug. Alcohol. Depend.**, v. 38, n. 2, p. 139-154, 1995.

VAN PRAAG, H., KEMPERMANN, G., GAGE, F. H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 1, n. 3, p. 191-198, 2000.

VEZINA, P.; LEYTON, M. Conditioned cues and the expression of stimulant sensitization in animals and humans. **Neuropharmacology**, v. 56, n. 1, p. 160-168, 2009.

VOLKOW, N.D.; LI, T. K. Drugs and alcohol: treating and preventing abuse, addiction and their medical consequences. **Pharmacol. Ther.**, v. 108, n. 1, p. 3-17, 2005.

VOLKOW, N. D. Addiction Reviews. Introduction. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1141, p. xi-xii, 2008.

WALLACE, C. S.; WITHERS, G. S.; WEILER, I. J.; GEORGE, J. M.; CLAYTON, D. F.; GREENOUGH, W. T. Correspondence between sites of NGFI-A induction and sites of morphological plasticity following exposure to environmental complexity. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, v. 32, n. 2, p. 211-220, 1995.

WANG, G. J.; VOLKOW, N. D.; FOWLER, J. S.; CERVANY, P.; HITZEMANN, R. J.; PAPPAS, N. R.; WONG, C. T.; FELDER, C. Regional brain metabolic activation during craving elicited by recall of previous drug experiences. **Life Sci.**, v. 64, n. 9, p. 775-784, 1999.



WILLIAMS, B. M.; LUO, Y.; WARD, C.; REDD, K.; GIBSON, R.; KUCZAJ, S. A.; MCCOY, J. G. Environmental enrichment: effects on spatial memory and hippocampal CREB immunoreactivity. **Physiol. Behav.**, v. 73, n. 4, p. 649-658, 2001.

WORLEY, P. F.; CHRISTY, B. A.; NAKABEPPU, Y.; BHAT, R. V.; COLE, A. J.; BARABAN, J. M. Constitutive expression of zif268 in neocortex is regulated by synaptic activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 88, n. 12, p. 5106-5110, 1991.

YAKA, R.; KA-CHOI, T.; CAMARINI, R.; JANAK, P. H.; RON, D. Fyn kinase and NR2B-containing NMDA receptors regulate acute ethanol sensitivity but not ethanol intake or conditioned reward. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v. 27, n. 11, p. 1736-1742, 2003.

ZAJAC, M. S.; PANG, T. Y.; WONG, N.; WEINRICH, B.; LEANG, L. S.; CRAIG, J. M.; SAFFERY, R.; HANNAN, A. J. Wheel running and environmental enrichment differentially modify exon-specific BDNF expression in the hippocampus of wild-type and pre-motor symptomatic male and female Huntington's disease mice. **Hippocampus**, v. 20, p. 621-636, 2010.