Mariana Beu Rae

Efeitos do enriquecimento ambiental sobre comportamentos induzidos pelo etanol em camundongos Swiss: envolvimento da circuitaria do estresse

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

São Paulo
2014

Mariana Beu Rae

Efeitos do enriquecimento ambiental sobre comportamentos induzidos pelo etanol em camundongos Swiss: envolvimento da circuitaria do estresse

Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Farmacologia

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

Versão Original

São Paulo
2014

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

reprodução não autorizada pelo autor

Rae, Mariana Beu.

Efeitos do enriquecimento ambiental sobre compartimentos induzidos pelo etanol em camundongos Swiss: envolvimento da circuitaria estresse / Mariana Beu Rae. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. 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: The effects of environmental enrichment on ethanol-related behaviors: involvement of the stress circuitry.

1. Enriquecimento Ambiental 2. Estresse 3. Etanol 4. Oxitocina 5. Dependência. I. Camarini, Profa. Dra. Rosana II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB028/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Mariana Beu Rae.

Título da Dissertação: Efeitos do enriquecimento ambiental sobre compartamentos induzidos pelo etanol em camundongos Swiss: envolvimento da circuitaria estresse.

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

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

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **132** nas fls. **110** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Rosana Camarini**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Efeitos do enriquecimento ambiental sobre modelos de recompensa ao etanol em camundongos Swiss"* do qual participam o(s) aluno(s) **Mariana Beu Rae, André Veloso Lima Rueda**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **24.10.2011, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 26 de outubro de 2011.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
---	--

Decl. CEUA.142/13.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 132/2011/CEUA, datado de 26.10.11, e por solicitação da Profa. Dra. **Rosana Camarini**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a **inclusão de um experimento** ao Projeto de Pesquisa "*Efeitos do enriquecimento ambiental sobre modelos de recompensa ao etanol em camundongos Swiss*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 18 de dezembro de 2013.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes

Vice- Coordenador da CEUA

ICB/USP

*Dedico este trabalho ao meu
pai por tudo que fez por mim.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a minha orientadora Rosana Camarini pela confiança em mim e por acreditar na minha capacidade de realizar esse projeto. Agradeço as conversas, apoio e ensinamentos que ela me proporcionou. Agradeço também pela oportunidade que ela me proporcionou de realizar um sonho antigo meu de estudar na Inglaterra. Além disso, o bom-humor e as risadas dela sempre tornam a convivência divertida e leve.

Agradeço ao André, Cris, Pri Marianno, Lucas, Priscila, Karina, Marcos, Jaqueline, Rodolfo, Bia, Rafa, Sabrina e Livia que se tornaram muito mais do que colegas de laboratório e viraram grandes amigos. Sinto-me privilegiada e sortuda de fazer parte de um laboratório com tantas pessoas talentosas e generosas. Vocês tornaram tudo mais fácil e mais leve só pelo fato de estarem comigo. Devo este trabalho em grande parte a vocês e a ajuda que todos vocês me deram, de uma forma ou de outra. Vocês são incríveis!

Agradeço aos técnicos Mateus e Manoel pela ajuda prestada nos momentos necessários e pelos cuidados com os animais.

Agradeço também a Rosana, do departamento de Estatística que me esclareceu muitas dúvidas sobre esse tema e me ajudou muito na interpretação dos resultados.

Agradeço ao professor Alexis Bailey que aceitou me receber em seu laboratório em Surrey, na Inglaterra e que demonstrou plena confiança em mim. Agradeço as palavras, as conversas e a oportunidade.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório de Surrey Panos, Polymnia e Helen a quem eu também já posso chamar de amigos. Tê-los lá tornou tudo muito mais fácil e divertido. Além disso, a ajuda de vocês foi fundamental para a realização do meu projeto. Agradeço muito a generosidade e a paciência.

Agradeço aos professores que colaboraram com o meu trabalho durante o meu exame de qualificação: Prof. Carolina Munhoz, Prof. Andrea Torrão e Prof. Isabel Quadros.

Agradeço os animais que se sacrificaram pela realização desse projeto. Espero que esses resultados mostrem que a vida deles não foi em vão.

Agradeço a CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro, sem o qual não teria sido possível realizar o projeto. Agradeço também ao Santander por ter me proporcionado a bolsa para viajar e estudar em Surrey, na Inglaterra.

Agradeço minha mãe, Rosa, pelo apoio incondicional no transcorrer desse trabalho. Obrigada por ter me incentivado a continuar e por acreditar que seria possível. Obrigada por se manter forte e por ser a pessoa que você é.

Agradeço ao meu irmão, Jeffrey, pelas conversas e discussões que sempre me enriquecem muito. Sem você e a minha mãe tenho certeza de que não teria conseguido fazer esse projeto. Só foi possível manter a força e seguir o meu caminho porque eu sabia que eu tinha vocês me apoiando. Obrigada por tudo! Amo muito vocês.

Agradeço ao meu pai, John, que em vida sempre me deu todo o apoio que um pai poderia dar, seja no âmbito pessoal como no profissional. Sem você eu não seria a pessoa que eu sou. Agradeço agora, da onde você estiver, por me iluminar, me abençoar e me proteger e continuar me dando a força necessária para trilhar meu caminho. Nunca vou conseguir expressar a minha gratidão por você. Esse trabalho é por você e para você. Te amo muito e o amor transcende o plano físico!

Agradeço ao Rodrigo pela paciência, apoio, carinho, companhia, amizade e amor. Saber que você está do meu lado faz toda diferença para mim. Obrigada por acreditar em mim mesmo quando eu não acreditei. Te amo, Rô.

Agradeço à minha família: avós, tias, tios e primos pelo incentivo e por estarem do meu lado em todos os momentos, me apoiando sempre. Sinto-me abençoada por ter vocês na minha vida. Amo muito todos vocês.

Agradeço a Fernanda, Amanda, Júlia, tia Gica e tio Deke, Matheus por serem uma segunda família pra mim. Obrigada pela diversão, risadas, conversas e por me aceitarem na vida de vocês! Amo vocês.

Agradeço aos meus amigos, principalmente Juliana, Fernanda, Filipe, Marcel, Anne, Viviane, Flávia, Dani, Érika e Mônica pelas conversas, pelas risadas e pelo apoio. Vocês tornaram tudo mais leve! Obrigada por fazerem parte da minha vida.

Meu muito obrigada a todos vocês que contribuíram de uma forma ou de outra para a realização desse trabalho.

“Só sei que nada sei, e o fato de saber isso me coloca em vantagem sobre aqueles que acham que sabem alguma coisa”

Sócrates

RESUMO

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

O enriquecimento ambiental (EA) apresenta efeitos positivos sobre a dependência ao etanol. Existe a hipótese de que atue como um estressor leve, ajudando o animal a lidar melhor com situações adversas, porém os mecanismos não são claros. Camundongos foram separados em três grupos: controle (CO), EA e estresse (ES). Foram estudados os efeitos do EA e ES no comportamento tipo ansiedade, memória episódica, preferência condicionada a lugar (CPP) com etanol, corticosterona e quantidade de receptor de oxitocina (OT). O EA diminuiu a latência de entrada no braço aberto, sugerindo efeito ansiolítico, ao contrário do ES. O teste de memória indicou menor exploração dos objetos pelos animais do grupo EA e o EA mostrou maior preferência condicionada ao etanol, comparado com CO. A corticosterona não diferiu entre os grupos. A autorradiografia apontou diminuição da ligação de OT nos núcleos olfatórios e córtex frontal dos animais EA e aumento da ligação de OT na amígdala do ES em relação ao CO, sugerindo maior comportamento pró-social e maior ansiedade, respectivamente. Concluimos que o ambiente é capaz de afetar circuitos cerebrais envolvidos no estresse e dependência.

Palavras-chaves: Enriquecimento ambiental. Estresse. Etanol. Oxitocina. Dependência.

ABSTRACT

Rae MB. Effects of environmental manipulations on ethanol-related behaviors: involvement of the stress circuitry. [Masters thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Environmental enrichment (EE) presents positive effects upon alcohol addiction. There is the hypothesis that EE acts as a mild stressor, which would help animal cope better with future stressful situations, however the mechanisms aren't clear. Mice were separated in three groups: control (CO), EE and stress (ST). We studied the effects of EE and ST on anxiety-like behavior, episodic memory, conditioned place preference (CPP) to ethanol, corticosterone and quantity of oxytocin receptor. EE decreased the latency to enter the open arm, suggesting an anxiolytic effect, unlike ST. Memory test indicated lower object exploration by animals from EE groups and EE demonstrated a higher preference to ethanol compared to CO. Corticosterone levels didn't differ among groups. Autoradiography showed decreased binding of OT in the olfactory nuclei and frontal cortex of EE animals and enhanced binding of OT in the amygdala of ST animals compared to CO, suggesting higher pro-social behavior and higher anxiety-like behavior, respectively. We conclude that the environment is capable of affecting important brain circuitries involved in stress and drug addiction.

Keywords: Environmental enrichment. Stress. Ethanol. Oxytocin. Addiction.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acb- Núcleo Accumbens

ACTH- Adrenocorticotropic Hormone (Hormônio Adrenocorticotrópico)

AMPC- Monofosfato de adenosina cíclico

Amy-Amígdala

ANOVA- Análise de Variância

AOL- Núcleo Olfatório Anterior Lateral

AOM- Núcleo Olfatório Anterior Medial

AOV- Núcleo Olfatório Anterior Ventral

AVE- acidente vascular encefálico

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

CEBRID- Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas

CEUA- Comitê de Ética no Uso de Animais

CgCx- Córtex Cingulado

CO- Controle

CPF- cortex pré-frontal

CPP- Preferência condicionada a lugar (*conditioned place preference*)

CPu- Núcleo Caudado-Putâmen

CRF- *Corticotropin-releasing Factor* (Fator Liberador de Corticotrofina)

D1- dia de tratamento 1

D17- dia de tratamento 17

D19- dia de tratamento 19

D20- dia de tratamento 20

D21- dia de tratamento 21

D31- dia de tratamento 31

D32- dia de tratamento 32

EA- Enriquecimento ambiental

ELISA- Enzyme-linked Immunosorbent Assay

EPM- Elevated Plus Maze (labirinto em cruz elevado)

ES- Estresse

FCx- Córtex Frontal

GABA- Ácido γ -aminobutírico

Hip- Hipotálamo

Hp- Tempo gasto no compartimento pareado no dia da habituação da CPP

HPA- hipotálamo-pituitária-adrenal

Hyp- Hipocampo

ICB-USP-Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

LS- Sépto Lateral

n- número de animais por grupo

Nac- Núcleo Accumbens

NMDA- N-metil D-aspartato

NSB- *Non-Specific Binding*

OMS- Organização Mundial da Saúde

OT- Oxitocina

OTR- Receptor de oxitocina

P- nível de significância estatístico

PirCx- Córtex Piriforme

POMC- pró-opiomelanocortina

PVN- Núcleo para-ventricular

RD- Razão de discriminação

SON- Núcleo supra-óptico

ST- estresse

Th-Tálamo

Tp- Tempo gasto no compartimento pareado no dia do teste da CPP

VTA- área ventral do tegmento mesencefálico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS GERAIS	25
3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Animais	27
4.2 Grupos	27
4.3 Droga	28
4.4 Dosagem de corticosterona	28
4.5 Enriquecimento Ambiental	29
4.6 Estresse por Imobilização	29
4.7 Labirinto em Cruz Elevado	29
4.8 Reconhecimento de Objetos	30
4.9 Preferência Condicionada por Lugar (CPP- Conditioned Place Preference)	31
4.10 Autorradiografia	32
4.10.1 Limpeza e preparo das lâminas de microscópio	32
4.10.2 Preparação do tecido	32
4.10.3 Ligação de receptor de OT por autorradiografia	33
4.10.4 Exposição ao filme autorradiográfico	33
4.10.5 Revelação do filme	33
4.10.6 Análise das imagens (Autorradiografia quantitativa)	34
4.11 Análise dos Resultados	34
5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	35
5.1 Experimento 1- Avaliação de Comportamento	35
5.2 Experimento 2 – Análise de Receptores (Autorradiografia)	36
6 RESULTADOS	37
6.1 Efeitos das condições ambientais sobre o comportamento tipo ansiedade, utilizando o labirinto em cruz elevado	37

6.1.1 Tempo de latência de entrada no braço aberto.....	37
6.1.2 Percentagem de tempo gasto nos braços abertos.....	37
6.1.3 Número de entradas e tempo de permanência nos braços fechados.....	38
6.2 Efeitos das condições ambientais sobre memória e motivação usando o teste de reconhecimento de objetos 1 hora e 24 horas depois da exposição.	39
6.2.1 Tempo de exploração dos objetos nas três fases do teste.....	39
6.2.2 Razão de discriminação.....	40
6.3 Influência das condições ambientais sobre a preferência condicionada por lugar induzida pelo etanol.....	40
6.3.1 Medida da preferência condicionada por lugar ao etanol.....	40
6.3.2 Medida da preferência condicionada por lugar induzida pela salina.....	42
6.4 Análise dos níveis de corticosterona.....	43
6.5 Análise quantitativa de receptores de oxitocina (OT).....	44
7 DISCUSSÃO.....	46
8 CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

A dependência é uma doença complexa, influenciada por fatores genéticos, ambientais e sociais (Kendler, 2001).

O abuso de etanol é tido como um dos principais problemas de Saúde Pública do mundo, com consequências socioeconômicas e de saúde. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o consumo de etanol está relacionado a mais de 60 doenças, entre elas câncer de esôfago e fígado, cirrose hepática e epilepsia além de causar 2,5 milhões de mortes (3,8% do total) mundialmente (*Global Status Report on Alcohol and Health*, 2011).

Já em países em desenvolvimento como o Brasil, as bebidas alcoólicas são um dos principais fatores de doença e mortalidade, com seu impacto deletério sendo considerado entre 8% e 14,9% do total de problemas de saúde dessas nações (SENAD, 2007). O alcoolismo é considerado a quarta causa de morte entre homens de 20 a 40 anos, oitava causa de incapacidade e terceira causa de absenteísmo no trabalho. Ainda representa 20% do total de suicídio e 40 % de separações conjugais (III Conferência Nacional de Saúde Mental, 2001).

Segundo dados do II Levantamento Domiciliar sobre Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil, realizado em 2005 pelo CEBRID houve um aumento dos dependentes de álcool de 11,2% em 2001 para 12,3% em 2005 (Carlini, 2005). Segundo dados do Grupo Interdisciplinar de Estudos de Álcool e Drogas (GREA), o uso abusivo de bebida alcoólica leva o país a gastar aproximadamente 7% do PIB para reparar os danos causados pela bebida, que variam desde tratamento do dependente, doenças relacionadas até a perda de produtividade (Mabuchi et al., 2007).

A dependência é caracterizada pelo uso compulsivo de droga e perda de controle sobre sua administração (Koob, 2008; Milton et al., 2012). De acordo com a teoria de George Koob e colaboradores (2009), a dependência consiste em três estágios: antecipação, intoxicação e abstinência. A impulsividade predomina nos primeiros estágios e está associada com mecanismos de reforço positivo. A procura compulsiva pela droga se deve principalmente ao seu reforço negativo, definido como um aumento na probabilidade de consumir a droga para aliviar um estado emocional negativo (Koob, Volkow, 2010). Na fase da abstinência, o estresse se

torna um fator poderoso na motivação pela busca da droga e seu uso compulsivo, uma vez que a dependência está associada à desregulação de regiões cerebrais que medeiam a recompensa e o estresse (Koob, 2008; Solinas et al., 2010).

Estudos em animais sugerem que a exposição ao estresse facilita tanto a iniciação como a reinstalação do uso de etanol após um período de abstinência (Kreek, Koob, 1998). A busca pela droga depois de um período de abstinência pode ser eliciada pela própria droga ou objetos relacionados, pistas ambientais, estresse ou uma combinação desses fatores (Ron, Jurd, 2005). O cérebro de indivíduos dependentes responde de forma diferente ao estresse do que aqueles que não são dependentes (Cleck et al., 2008). Em relação ao etanol, em muitas situações esta droga é usada para aliviar a tensão associada com fatores estressantes do ambiente, como emprego, relacionamentos, abuso sexual ou para aliviar sintomas de ansiedade, irritabilidade e/ou depressão em indivíduos com distúrbio de estresse pós-traumático (Goeders, 2003). O efeito recompensador do etanol, especificamente nas situações de estresse, pode ser explicado pelas suas propriedades como regulador alostérico positivo do receptor ionotrópico do aminoácido GABA (ácido γ -aminobutírico) (receptor GABA_A) (Harris et al., 2008). Além do seu efeito no receptor GABA_A, o etanol também atua como um regulador alostérico negativo do receptor de glutamato NMDA (Fadda, Rossetti, 1998) e também é capaz de ativar o sistema dopaminérgico de recompensa. Esse sistema consiste de neurônios dopaminérgicos da área ventral do tegmento mesencefálico (VTA) que se projetam para regiões como núcleo accumbens (Nac), córtex pré-frontal (CPF), amígdala e hipocampo (Ron, Jurd, 2005).

As drogas de abuso utilizam de circuitaria neuronal geralmente envolvida em motivação, prazer e aprendizado (Robinson, Berridge, 2003). Em relação ao último, Milton et al. (2012) mostraram que a dependência pode ser vista como um distúrbio de aprendizagem aberrante na formação de memórias instrumentais que ligam ações de procura e consumo da droga expressas como hábitos persistentes em resposta a um estímulo. Dessa forma, estímulos ambientais neutros são associados com estados de euforia (ou de sintomas de abstinência) por condicionamento pavloviano. A formação desse tipo de memória seria responsável pela propensão a recaídas mesmo após um longo período sem o indivíduo fazer uso da droga. Neste caso, o indivíduo passa a formar memórias sobre pistas ambientais relacionadas a drogas ou estímulo condicionado, o que predispõe o indivíduo à procura/auto-

administração de drogas. Já foi mostrado que pistas associadas a recompensas podem ativar o circuito de recompensa, eventualmente de forma mais intensa que a própria recompensa (Schultz et al., 1998). Uma vez re-expostos às pistas ambientais associadas a drogas de abuso, o comportamento de busca pela droga pode ser reiniciado mesmo depois de anos de abstinência (Zhao et al., 2013).

Estudos apontam que o estresse pode atuar como uma pista ambiental que aumenta comportamentos relacionados à adição. Fox e colaboradores (2007) mostraram que a exposição de humanos dependentes de etanol às imagens relacionadas tanto a bebida como situações estressantes levaram a um aumento em fissura pela droga, ansiedade e emoções negativas e uma diminuição de emoções positivas (alegria, estado relaxado). Resultados similares foram observados para outras drogas, como opioides e cocaína (Hyman et al., 2007; Sinha et al., 2000). Outro dado interessante é de que o estresse não somente aumenta a busca pela droga, mas também facilita a associação de pistas ambientais relacionadas às drogas de abuso (Field, Powell, 2007).

Portanto, os estímulos ambientais têm grande influência sobre uso de drogas e estudar a interação ambiente x dependência se mostra relevante. Um modelo adequado para tal estudo é o do enriquecimento ambiental (EA), definido como “a combinação de complexos estímulos inanimados e sociais” (Rosenzweig et al., 1978).

Animais mantidos em um ambiente enriquecido são expostos a estímulos físicos e sociais maiores do que aqueles mantidos em caixas padrão, ou seja, o EA propicia estimulação sensorial, motora e cognitiva (Nithianantharajah e Hannan, 2006). Os animais ficam acondicionados em caixas maiores que as caixas padrões com objetos para exploração (cubos, brinquedos, túneis, casas) e atividade física voluntária, como rodas e escadas. Diversos estudos mostram que os animais expostos ao enriquecimento apresentam maior neuroplasticidade, o que inclui aumento do tamanho celular, maior neurogênese, ramificação dendrítica, gliogênese e aumento da formação de sinapses em diversas estruturas cerebrais, como córtex pré-frontal e hipocampo (Simpson et al., 2011; Van Praag et al., 2000). Além disso, o EA modifica os níveis de fatores neurotróficos, especialmente do fator neutrófico derivado do encéfalo (BDNF), altamente ligado a aprendizado e memória no hipocampo (Simpson et al., 2011). Outros trabalhos mostram a importância do EA para o estudo e desenvolvimento de tratamento de diversas patologias, como

doença de Huntington (Van Dellen et al., 2000), doença de Alzheimer (Arendash et al., 2004), acidente vascular encefálico (AVE) (Risedal et al., 2002), e câncer (Cao et al., 2010).

Os efeitos do EA sobre a dependência de drogas de abuso também tem sido estudados (para revisão, ver Stairs, Bardo, 2009) e tem apresentado resultados como a reversão da preferência condicionada a lugar e da sensibilização de cocaína (Solinas et al., 2008), diminuição da auto-administração de anfetamina (Bardo, 2001), bem como diminuição da sensibilização comportamental e bloqueio da preferência condicionada a lugar induzida por morfina (Xu et al., 2007). Em contrapartida, Thiriet et al. (2011) mostraram que o EA não foi capaz de reduzir a preferência por metanfetamina em ratos.

Mais especificamente em relação ao etanol, estudo no nosso laboratório demonstrou que o EA foi capaz de prevenir o desenvolvimento da sensibilização comportamental induzida pela droga assim como reverter a sensibilização já estabelecida previamente (Rueda et al., 2012).

Os mecanismos pelos quais o EA atua na dependência não estão totalmente esclarecidos. Uma hipótese é de que o ambiente enriquecido leve a diferenças no comportamento tipo ansioso, impulsividade e busca por novidade, comumente atribuídos como fatores de risco para início do uso de drogas (Solinas et al., 2010). Já foi mostrado que ratos classificados como mais respondentes a novidade (HR), ou seja, com maior atividade locomotora no ambiente novo, apresentaram maior preferência pela anfetamina, no teste de preferência condicionada por lugar do que animais menos respondentes à novidade (LR) (Klebaur et al., 1999). Além da busca por novidade, existem outros fatores de risco para uso de drogas, como a ansiedade e o estresse (Carroll et al., 2009). Piazza et al., (1989) mostram que estresse moderado é capaz de aumentar a atividade locomotora exploratória de ratos e que a exposição a um ambiente novo é capaz de elevar os níveis de corticosterona. Nessa mesma linha, eles observaram que os animais HR, apresentam níveis basais de corticosterona maiores que os LR. Esses resultados sugerem que o estresse tem um papel relevante na vulnerabilidade ao uso de drogas. Já em relação a ansiedade, um estudo mostrou que ratos categorizados como “ansiosos” baseados nos testes do labirinto em cruz elevado e da caixa claro/escuro, apresentaram maior preferência condicionada a lugar por cocaína, comparados aos animais “não ansiosos” (Pelloux et al., 2009).

Sistemas relacionados à aprendizagem e memória também estão relacionados com dependência e também podem ser alvos de atuação do EA. Um teste que consegue identificar as cinco fases do processo de memória (aquisição, consolidação, recuperação, reconsolidação e extinção) é a preferência condicionada a lugar, em inglês *conditioned place preference* (CPP) (Zhao et al., 2013). Esse modelo é usado para medir os efeitos recompensadores e aversivos de drogas de abuso e depende fundamentalmente da associação pavloviana entre ambiente e efeito da droga (Buccafusco, 2001). Portanto, é possível afirmar que a memória é um forte componente deste paradigma, tornando-o um modelo de escolha para estudar a interação ambiente x efeitos drogas de abuso.

Alguns pesquisadores atribuem ao EA um fator estressor positivo (“*eustress*”), que tem como característica importante a ativação suficiente, mas também um término controlado, da resposta ao evento estressor, uma vez que a homeostasia é reestabelecida (Engelmann et al., 2004). Os efeitos do *eustress* podem diferir dos estressores negativos (Selye, 1973) e aumentar a capacidade do indivíduo de lidar com situações mais aversivas. Isso levaria a uma variação menor entre os níveis de corticosterona basais e aqueles pós- estresse. Lehmann e Herkenham (2011) mostraram que o EA foi capaz de conferir resiliência ao estresse psicossocial. Estudos que avaliaram os efeitos do EA sobre o estresse têm apresentado resultados controversos. Moncek et al. (2004) mostraram que ratos mantidos em ambiente enriquecido apresentaram níveis basais de corticosterona maiores do que os dos animais mantidos em condições padrões, além de maior peso da glândula adrenal. Em contrapartida, segundo Belz et al. (2003), ratos criados em ambiente enriquecido têm menores níveis basais de corticosterona e ACHT comparados a ratos criados em ambiente não enriquecido. A resposta a eventos estressantes também é passível de sofrer modificações pelo ambiente. No estudo de Moncek et al. (2004), os animais enriquecidos apresentaram níveis menores de corticosterona e adrenalina em resposta à manipulação repetida por um experimentador. Ainda, Schrijver et al. (2002) relataram que o enriquecimento atenuou as respostas de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e corticosterona plasmática em ratos submetidos ao estresse. Segovia et al. (2009) também mostraram que animais expostos ao EA apresentaram uma redução na liberação de dopamina e acetilcolina no córtex pré-frontal sob situações de estresse moderado. Esse resultado sugere

que o EA diminui a resposta ao estresse dos sistemas dopaminérgico e colinérgico pré-frontais.

Porém, devido à falta de padronização e o uso de diferentes espécies, os resultados de trabalhos que estudam a influência do EA sobre o estresse são discrepantes (Simpson et. al, 2011).

A capacidade de eventos estressantes alterarem os efeitos recompensadores de drogas de abuso, medidos pela preferência condicionada de lugar e auto-administração tem recebido atenção. A exposição crônica a eventos estressores aumenta a preferência condicionada de lugar induzida pelas drogas de abuso, (Kreibich et al., 2009; Leão et al., 2009; Matsuzawa et al., 1998, 2000; Solinas et al., 2008; Yang et al., 2006), a qual pode ser revertida com antagonistas de receptor CRF1 ou enriquecimento ambiental (Kreibich et al., 2009; Solinas et al., 2008). Também há um aumento na auto-administração de anfetamina e cocaína em animais expostos ao estresse, como isolamento neonatal (Goeders, 2003), bem como aumento de consumo de álcool em várias linhagens de animais expostas a eventos estressores, sugerindo uma forte relação entre o estresse e a procura por um agente ansiolítico (Vengeliene et al., 2003). A administração periférica de etanol ativa o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) tanto em animais de laboratório quanto em humanos e a auto-administração desta droga é capaz de aumentar modestamente o nível de ACTH no sangue (Armario, 2010). Com base nesses trabalhos é possível perceber a importância do sistema de estresse no uso de drogas, seja na sua busca quanto na manutenção desse estado de dependência.

O estresse pode ser definido como uma resposta não específica que envolve percepção, interpretação, resposta e adaptação a eventos aversivos, ameaçadores e/ou desafiadores (Selye, 1973). A resposta ao estresse é responsável por permitir que o corpo faça as modificações metabólicas e fisiológicas necessárias para lidar com as exigências da perda de homeostasia (Goeders, 2003). O responsável pela regulação dessas respostas é o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), que é ativado pelo hormônio liberador de corticotrofina (CRF), que controla as respostas hormonais, simpáticas e comportamentais ao estresse (Koob, 2008).

O CRF presente no núcleo paraventricular do hipotálamo controla o funcionamento do eixo HPA (Koob, 2008). Quando este é liberado pelo hipotálamo atinge a hipófise anterior através do vaso portal hipofisário. A ligação do CRF com seu receptor CRF 1 leva à ativação da proteína Gs e da cascata de sinalização do

AMPC resultando na modulação da transcrição gênica e síntese de pró-opiomelanocortina (POMC) que é clivada para produção de diversos peptídeos menores, biologicamente ativos, sendo o mais importante o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que alcança a glândula adrenal por meio da circulação sanguínea, onde estimula a síntese de adrenocorticosteroides, entre eles a corticosterona (cortisol, em humanos). A corticosterona atua pelo mecanismo de *feedback* negativo, em que se liga a receptor de glicocorticoide localizados principalmente no núcleo paraventricular (Goeders, 2003; Koob, 2009; Smith, 2006; Uhart, 2009).

A oxitocina (OT) também é um neuropeptídeo envolvido na resposta ao estresse. É produzida nos núcleos supraóptico e paraventricular e liberado através de exocitose da neuro-hipófise e terminais nervosos em resposta a diversos estímulos fisiológicos (Viero et al., 2010). Há evidências de que a OT apresenta propriedade ansiolítica e é capaz de suprimir a resposta do eixo HPA ao estresse (Windle et al., 2004). Receptores de OT (OTR) acoplados a proteína G são encontrados em regiões cerebrais envolvidas na regulação de humor, comportamento social e processos de dependência, como VTA, amígdala, núcleo accumbens e pálido ventral e hipocampo (Gimpl, Fahrenholz, 2001).

A OT é um hormônio relacionado à amamentação, gravidez e ao instinto maternal, além de emoção, humor, comportamento sexual e social, bem como memória e aprendizado (Gimpl, Fahrenholz, 2001). Em particular, a OT promove contato e memória social bem e exerce efeito ansiolítico, anti-agressividade e antidepressivo em humanos e animais (Zanos et al., 2013). Este aspecto parece relevante no processo de dependência, uma vez que os usuários de drogas frequentemente se excluem do convívio social. Por outro lado, relacionamentos e interações sociais saudáveis, talvez devido a um maior nível de OT, poderiam ter um efeito protetor no processo de uso de drogas (McGregor, Bowen, 2012).

Um estudo feito com animais tratados com OT durante a adolescência mostrou que estes apresentaram menor consumo de etanol no protocolo de auto-administração de cerveja. Um tratamento agudo com OT depois de 25 dias de administração de cerveja teve um forte efeito inibitório agudo do consumo da droga, sem afetar o consumo de água (Bowen et al., 2011). Além disso, estudos realizados por Sarnyai et al. (1994) mostraram que a administração de OT foi capaz de atenuar o desenvolvimento da tolerância a heroína bem como diminuir o número de

pressões na barra no protocolo de auto-administração com cocaína, em ratos. Usando o protocolo da preferência condicionada por lugar com metanfetamina, Qi et al. (2009) mostraram que a administração de OT bloqueou a aquisição, facilitou a extinção e suprimiu a reinstalação da preferência induzida pelo estresse.

Tomados em conjunto, os estudos apontam para evidências de que o estresse e a regulação do eixo HPA, assim como o enriquecimento ambiental, podem alterar comportamentos induzidos pelo etanol. Sugere-se que o EA tenha efeitos benéficos relacionados à atenuação de respostas biológicas ao estresse, alterando a reatividade do eixo HPA. Várias perguntas sobre o envolvimento do EA na dependência permanecem sem respostas.

Objetivo 1. Examinar os efeitos do EA em medidas comportamentais relevantes em processos de dependência ao etanol.

Hipótese: Camundongos em condições de EA apresentarão melhor desempenho em testes de memória, menores índices de preferência condicionada de lugar e menores índices de ansiedade. Neste sentido, o EA estaria fortalecendo outros tipos de memória que não aqueles relacionados aos efeitos recompensadores da droga e/ou diminuindo a ansiedade, considerado um fator importante na procura pelo etanol.

Objetivo 2. Examinar se o EA representa um estresse leve/moderado.

Hipótese: Camundongos expostos ao EA apresentarão alterações semelhantes, porém mais atenuadas do que aqueles expostos a condições estressantes mais graves. Com isso testaremos se o EA pode ser considerado um estressor positivo (“*eustress*”). Os efeitos do *eustress* podem diferir dos estressores negativos (Selye, 1973) e aumentar a capacidade do indivíduo de lidar com situações mais aversivas.

2 OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos deste trabalho foram: a) avaliar os efeitos do EA sobre um comportamento recompensador induzido pelo etanol (usando a preferência condicionada de lugar – CPP- como paradigma), sob a hipótese de que animais com uma experiência em um ambiente enriquecido demonstrariam alteração na preferência pelo lado pareado com etanol comparados a animais vivendo em um ambiente controle ou um ambiente sob estresse; b) avaliar se o modelo de EA utilizado poderia ser considerado um estressor positivo (eustress).

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para tanto, foram avaliados:

- a preferência condicionada de lugar induzida pelo etanol em animais expostos aos diferentes ambientes (CO, EA e ES);
- o efeito do EA e do estresse sobre a memória, a partir do teste de reconhecimento de objetos, uma vez que a CPP depende de aprendizagem;
- o efeito do EA e do estresse sobre o comportamento tipo ansiedade, pelo teste do labirinto em cruz elevado, dado que a ansiedade pode aumentar a CPP induzida por drogas de abuso;
- verificar se o EA e o estresse (de acordo com os delineamentos experimentais deste trabalho) produzem alterações nos níveis de corticosterona, através da dosagem plasmática deste hormônio;
- avaliar e comparar os efeitos do EA e do estresse sobre a distribuição e quantificação do receptor de OT, um importante mediador do eixo HPA, por meio de autorradiografia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram usados camundongos Swiss machos, com 70 dias de idade, fornecidos pelo Biotério de Camundongos do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo. Os animais foram alojados em grupos de 5 em caixas que variam em tamanho e material de acordo com cada grupo. Foram mantidos no biotério sob temperatura constante ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), sob um ciclo claro/escuro de 12 horas (06:00/18:00hs), recebendo ração e água *ad libitum*. O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), registrado sob nº 132 nas fls. 110 do livro 02.

4.2 Grupos

Os animais foram distribuídos em três grupos, com $n=20/\text{grupo}$:

Os animais do grupo Controle (CO) foram mantidos em caixas de polipropileno pequenas (medindo 27,5 x 16,5 x 13 cm) forradas com maravalha durante todo o decorrer do experimento. Os animais eram manipulados três vezes por semana para pesagem e marcação da cauda.

Os camundongos do grupo Estresse (ES) também foram mantidos em caixas de polipropileno pequenas (medindo 27,5 x 16,5 x 13 cm) forradas com maravalha. Porém, além da manipulação para pesagem e marcação da cauda, esses animais foram expostos ao estresse de imobilização diária.

Os animais do grupo Enriquecimento ambiental (EA) foram alojados em caixas de policarbonato grandes (medindo 42 cm x 28 cm x 21,5 cm) também forradas com maravalha. Nesta caixa eram colocados objetos que serviram de estímulos sensoriais, motor, cognitivo e social, conforme descrito no item 3.5.

4.3 Droga

O etanol (Synth®) foi administrado em uma solução 20% (v/v), preparada com solução salina (NaCl 0,9%) a uma dose de 2,0g/Kg. A solução salina foi usada como controle. As injeções foram administradas intraperitonealmente.

4.4 Dosagem de corticosterona

A coleta de sangue para posterior dosagem de corticosterona foi realizada em dois momentos: 1º e 21º dias do experimento, no período da manhã (09:00 e 10:00hs) (ver protocolo na Figura 1). Para tal, foram recolhidos aproximadamente 50 µL de sangue da veia caudal, que foram colocados em tubos de microcentrífuga contendo 5 µL de citrato de sódio 0.1M. As amostras foram centrifugadas a 2000 x g por 10 minutos para separação do plasma que foi retirado e armazenado a -20 °C. A dosagem de corticosterona foi realizada por meio da técnica de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) com o Corticosterone ELISA Kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA), de acordo com as especificações do fabricante.

O plasma foi diluído no Tampão EIA 1:400. Em uma placa de 96 poços, 100 µL de Tampão EIA foi adicionado aos poços de ligação não específica (NSB), e 50 µL do mesmo tampão foi colocado nos poços de *Binding* máximo (B0). 50 µL de padrões de corticosterona EIA S1-S8 (5,000, 2,000, 800, 320, 128, 51.2, 20.5 e 8.2 pg/mL, respectivamente) foram acrescentados em duplicatas aos respectivos poços na placa.

Então, 50 µL de amostra diluída foram colocadas em duplicata nos poços correspondentes. Então, 50 µL do Tracer AChE de Corticosterona foi acrescentado em todos os poços, com exceção dos poços de Atividade Total (AT) e Branco (Blk), e 50 µL de Antiserum de Corticosterona EIA foi adicionado à todos os poços, exceto AT, Blk e NSB. A placa foi selada e incubada por duas horas, em temperatura ambiente em um agitador orbital.

Após a incubação, os poços foram lavados cinco vezes com o tampão de lavagem. Depois disso, 200 µL de Reagente de Ellman foi adicionado à cada poço e 5 µL de Tracer foi colocado no poço do TA. A placa foi selada novamente e incubada

por 45 minutos na sala escura, em temperatura ambiente, com as luzes apagadas em um agitador orbital.

A placa foi lida no comprimento de onda de 412 nm. Os cálculos e a análise dos dados foram feitos usando a planilha original fornecida pela Cayman (www.caymanchem.com/analysis/eia).

4.5 Enriquecimento Ambiental

Os animais desse grupo foram alojados em caixas de polycarbonato medindo 42 cm x 28 cm x 21,5 cm, com brinquedos, rodas de exercício, tubos, escadas, casas e blocos. Esses objetos permitem o estímulo sensorial, cognitivo, motor e visual dos animais. Duas vezes por semana os objetos foram limpos e trocados por novos, promovendo assim o estímulo à novidade. Os animais foram mantidos nessas condições por 32 dias, inclusive durante os testes do labirinto em cruz, reconhecimento de objetos e CPP.

4.6 Estresse por imobilização

Durante 21 dias, no período da manhã, os animais foram imobilizados por 1 hora em tubos de polipropileno com 3 cm de diâmetro e 11,5 cm de comprimento. Esse tubo contém pequenos furos em toda sua extensão permitindo a respiração do animal.

4.7 Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto contém quatro braços, dois deles abertos (33,5 cm de comprimento x 7 cm de largura) e dois fechados (33,5 cm de comprimento x 7 cm de largura, com paredes de 19 cm de altura). O aparato foi colocado a 50 cm do chão em uma sala com iluminação adequada e com um sistema de câmera para filmar o comportamento do animal. No início do teste o animal foi colocado com a cabeça virada para um dos braços abertos. Foi observada a quantidade de tempo que o animal permaneceu nos braços abertos e fechados, a latência de entrada nos braços abertos e o número de vezes que o animal entrou em cada braço, durante 5

minutos. Entrar no braço consiste no animal introduzir as quatro patas no braço. Após 5 minutos, o animal foi devolvido na sua caixa e o labirinto foi limpo usando álcool 5%. Esse teste foi realizado no período da tarde (14:00 e 15:00hs), para evitar efeitos de variação circadiana no comportamento dos animais.

4.8 Reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objeto sugere que os animais formam uma memória episódica de contexto de familiaridade com um objeto.

Aparato: o experimento foi realizado em uma caixa leitosa, medindo 35 x 29 x 16 cm.

Fase de habituação: os animais foram expostos à caixa durante 10 minutos por hora, durante 3 horas.

Fase de exposição: os animais, um por vez, foram colocados na caixa com dois objetos idênticos (A e B) separados a uma distância padrão. Eles foram filmados por 10 minutos e depois retirados e devolvidos às suas respectivas gaiolas.

Fase de Teste: O objeto já conhecido (B) é trocado por um objeto novo (C e D), 1 hora e 24 horas após o treino, respectivamente. Os animais foram filmados por 5 minutos.

A atividade exploratória foi definida como o tempo que o animal passar cheirando, lambendo, tocando o objeto com o focinho ou patas dianteiras ou quando o animal voltar o focinho ao objeto a um raio menor ou igual a 1 cm.

Entre os testes, o campo aberto e os objetos foram limpos com álcool 70% para eliminar possíveis pistas olfatórias.

O resultado foi analisado da seguinte forma: Razão de Discriminação = tempo de exploração de objeto novo / tempo total explorando ambos os objetos. Também foi calculado o tempo de exploração total de ambos os objetos. Quando o animal passa mais tempo explorando o objeto novo demonstra uma familiarização em relação ao objeto antigo.

4.9 Preferência condicionada por lugar (CPP-*Conditioned Place Preference*)

A CPP é uma forma de condicionamento pavloviano usado para medir os efeitos reforçadores de uma droga ou de experiências (Cunningham et. al, 2006), neste caso o etanol. A CPP foi conduzida depois de 21 dias de exposição ao EA. Esse período mostrou-se suficiente para reverter alguns efeitos induzidos pelo etanol (Rueda et al., 2012).

Os animais do grupo EA exibiram uma preferência inicial por um dos lados do aparato. Desta forma, a droga foi pareada com o lado de menor preferência no dia da habituação para cada animal de cada grupo.

Aparato: foi utilizada uma caixa retangular de 4,6 x 12,7 x 12,7 cm, com 3 divisões: um lado com paredes pretas com listras brancas e piso em barras; a parte central com paredes cinzas e piso liso e o outro lado com paredes brancas com listras pretas e piso em grade. Cada compartimento é separado por uma porta do tipo guilhotina.

O teste durou no total 10 dias, foi realizado no período da manhã (08:00 e 11:00hs) e dividido em 3 fases:

- *Habituação* (dia 1): Os animais receberam injeção de salina e foram colocados, um por vez, no compartimento central (neutro) da caixa, com livre acesso aos outros dois compartimentos. Após 15 minutos os animais foram retirados e devolvidos a sua caixa de origem.

- *Condicionamento* (dias 2-9): Os animais receberam injeção de etanol e salina em dias alternados e, foram pareados nos respectivos compartimentos. Os animais permaneceram por 5 minutos no compartimento e depois foram devolvidos às suas caixas.

- *Teste* (dia 10): Os animais foram colocados no compartimento central (neutro) da caixa, com livre acesso aos outros dois compartimentos, como na fase de habituação. Permaneceram por 15 minutos e depois foram devolvidos às suas caixas.

Todas as fases do teste foram filmadas para posterior medição da do tempo gasto no compartimento pareado com a droga em relação ao tempo total gasto nos dois compartimentos.

A análise da CPP foi feita da seguinte forma: diferença T_P e H_P e $Score = (T_P - T_{NP}) - (H_P - H_{NP})$, onde T_P = tempo passado no lado pareado durante teste; T_{NP} = tempo

passado no lado não pareado durante teste; H_P = tempo passado no lado pareado durante habituação; H_{NP} = tempo passado no lado não pareado durante habituação.

O mesmo protocolo foi repetido agora com animais recebendo apenas salina durante todos os dias do condicionamento, como forma de controle. Como a administração de salina não leva a inversão de preferência do lado não pareado pelo lado pareado, podemos sugerir que a inversão se dá pelos efeitos recompensadores do etanol.

4.10 Autorradiografia

Para essa etapa do experimento, um novo lote de 15 animais foi usado, sendo que destes: 5 animais do grupo EA passaram apenas pela gaiola enriquecida, 5 animais do grupo ES, apenas pela imobilização e 5 animais do grupo CO permaneceram nas caixas padrão. Esse protocolo durou 21 dias. Após eutanásia por deslocamento cervical, os encéfalos foram retirados integralmente e congelados imediatamente em isopentano à -20 °C, e posteriormente foram armazenados no freezer à -80 °C.

4.10.1 Limpeza e preparo das lâminas de microscópio: as lâminas foram deixadas imersas em *Decon*, um detergente a base de água, por uma noite. Então, foram enxaguados em água quente por 15 minutos e posteriormente, enxaguados novamente, desta vez com água fria por mais 15 minutos. As lâminas foram então imersas em uma solução de 10% de ácido clorídrico /90% etanol por 20 minutos e em seguida foram enxaguadas com água destilada por 15 minutos. As lâminas foram cobertas por uma imersão de 2 minutos em uma solução de 1% de gelatina/chrom-alum e deixados para secar antes do uso.

4.10.2 Preparação do tecido: os encéfalos foram retirados e imersos em isopentano por 30 segundos e depois foram mantidos à -80°C. Antes de serem seccionados, os encéfalos foram colocados no criostato (Zeiss Microm 505E, Hertfordshire, U.K.) à -21 °C e alinhados de forma coronal, fixando o cerebelo a uma placa usando um líquido fixador de plástico (composto O.C.T., BDH chemicals, Dorset, U.K.). Secções coronais adjacentes de 20 micrometros foram cortadas a 300 micrometros de distância e fixadas por descongelamento em lâminas gelatinadas geladas para definir os níveis de ligação de receptores das regiões frontal a posterior do encéfalo.

As lâminas foram armazenadas na geladeira a -4 °C a fim de evitar a formação de cristais de gelo nas fatias dos encéfalos e depois foram transferidas para o freezer a -20 °C por, no mínimo, uma semana antes do uso.

4.10.3 Ligação de receptor de OT por autorradiografia: ligação com OTR foi realizadas nas fatias dos encéfalos dos animais dos grupos CT, EA e ES de acordo com método previamente descrito (Jarrett et al., 2006), com pequenas modificações. As fatias foram enxaguadas duas vezes por 10 minutos em uma solução buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, temperatura ambiente) para retirar OT endógena. A ligação total foi determinada incubando os cortes com 50 pM [¹²⁵I]-vasotocin (OVTA) em um buffer de incubação médio (50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM ácido ethylenediaminetetraacético (EDTA), 0.1 % w/v soro de albumina bovina, 0.05 % w/v bacitracin; Sigma-Aldrich, Poole, UK, pH 7.4 a temperatura ambiente). Os cortes adjacentes foram incubadas com [¹²⁵I]OVTA (50 pM) na presença de 50µM unlabelled (Thr⁴,Gly⁷)-oxytocin (Bachem, Germany), para determinar ligação não-específica (NSB). Seguinte ao período de 60 minutos de ligação com radioligante, as lâminas foram enxaguadas por 5 minutos no buffer de enxágue gelado (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, pH 7.4) –processo repetido por 3 vezes-, seguido por uma lavagem de 30 minutos no buffer de enxágue gelado. Em seguida, as amostras foram lavadas por 2 segundos em água destilada gelada. As lâminas foram então secadas sob uma leve corrente de ar frio por 2 horas e armazenadas e seladas em containers com sulfato de cálcio anídrico (Drierite-BDH Chemicals, Dorset, U.K.) por 2 dias.

4.10.4 Exposição ao filme autorradiográfico: as lâminas foram colocadas sobre filme Kodak MR-1 (Sigma-Aldrich, UK) em Hipercassettes com microescalas autorradiográficas [¹⁴C] com concentração radioativa conhecida (GE Healthcare Life Sciences, Amersham, U.K.) durante 3 dias. Os cortes encefálicos de todos os grupos foram processados em paralelo e expostos ao mesmo filme, ao mesmo tempo.

4.10.5 Revelação do filme: A revelação do filme foi feita no escuro sob luzes vermelhas. Os filmes foram revelados em uma solução reveladora Kodak D19 de 50% (Sigma-Aldrich, Poole, UK) por 3 minutos. Os filmes foram então lavados em água destilada contendo ácido acético glacial por 30 segundos para interromper a reação de revelação, seguido pela etapa de fixação em uma solução Kodak rapid fix

(Sigma-Aldrich, Poole, UK), por 5 minutos. Finalmente, os filmes foram enxaguados em água gelada corrente por 20 minutos e deixados para secar em um exaustor.

4.10.6 Análise das imagens (Autorradiografia quantitativa): A análise autorradiográfica quantitativa de todas as estruturas foi realizada com referência em Franklin e Paxinos (2001) e a ligação foi analisada conforme descrito previamente (Kitchen et al., 1997), utilizando o analista de imagem MCID (Image Research, Ontario, Canada). Brevemente, os valores de densidade óptica, que foram quantificados por microescalas autorradiográficas [^{14}C] com concentração radioativa conhecida (GE Healthcare, UK), foram inseridos junto com seus valores de radioatividade correspondentes a uma tabela de calibração, e a relação entre radioatividade e densidade óptica foi determinada subsequentemente usando o software MCID. A ligação específica foi determinada subtraindo a ligação não específica (NSB) da ligação total nas imagens dos cortes dos encéfalos.

4.11 Análise dos Resultados

Para análise estatística foi utilizada a ANOVA, com teste post hoc Newman-Keuls. As análises estatísticas das autorradiografias foram realizadas com ANOVA seguida do teste post hoc Bonferroni.

Em todas as comparações realizadas, a probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada para determinar diferenças significantes e os dados representam média $\pm$ erro padrão.

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

5.1 Experimento 1 – Avaliação de comportamento

O delineamento experimental está ilustrado na figura 1.

No primeiro dia de experimento (D1; PND = 70) os animais foram divididos em três grupos experimentais: grupo controle (CO; $n = 20$), grupo enriquecido (EA; $n = 20$) e grupo estresse (ES; $n = 20$). Os camundongos dos grupos CO e ES foram mantidos durante todo o tratamento em condições padrão de moradia, enquanto os do grupo EA foram mantidos em um ambiente enriquecido, conforme descrito anteriormente. O grupo ES foi submetido a sessões diárias de estresse por imobilização entre D1 e D21.

Em D17, o comportamento tipo ansiedade foi avaliado, por meio do labirinto em cruz elevado. Neste experimento, foram avaliados os efeitos do EA e do ES sobre o comportamento tipo ansiedade. Em D19, os animais foram submetidos ao teste de reconhecimento de objeto (teste de memória) e em D20, durante o período da manhã, os camundongos foram testados quanto à retenção de memória de reconhecimento de objeto. A partir de D22 até D31 foi realizado o protocolo de preferência condicionada ao lugar, que permitiu a avaliação dos efeitos motivacionais recompensadores do etanol. Em D32, foi realizada a eutanásia. Amostras de sangue dos animais foram coletadas em D1, D21 e D32 para quantificação da corticosterona plasmática, um dos parâmetros utilizados para avaliação da resposta ao estresse.

Figura 1. Delineamento experimental 1

5.2 Experimento 2 - Análise de receptores (Autorradiografia)

O delineamento experimental está ilustrado na figura 2.

No primeiro dia de experimento (D1; PND = 70) os animais foram divididos em três grupos experimentais: grupo controle (CO; $n = 10$), grupo enriquecido (EA; $n = 10$) e grupo estresse (ES; $n = 10$). Os camundongos dos grupos CO e ES foram mantidos durante todo o tratamento em condições padrão de moradia, enquanto os do grupo EA foram mantidos em um ambiente enriquecido. O grupo ES foi submetido a sessões diárias de estresse por imobilização entre D1 e D21.

Em D21 foi realizada a eutanásia e retirada do encéfalo, que foi congelado imediatamente em isopentano e depois armazenado no freezer à -80°C para posterior quantificação de receptores através da autorradiografia. Os animais do grupo ES foram sacrificados 30 minutos após a imobilização.

Figura 2. Delineamento experimental 2

6 RESULTADOS

6.1 Efeitos das condições ambientais sobre o comportamento tipo ansiedade, utilizando o labirinto em cruz elevado.

6.1.1 Tempo de latência de entrada no braço aberto

Para avaliar se houve variação no tempo de latência foi realizada uma ANOVA-1 via que apresentou significância [$F(2,57) = 8,899$; $p < 0,05$]. Assim, a análise *post hoc* mostrou que animais do grupo ES tiveram um tempo de latência de entrada nos braços abertos maior do que os grupos CO e EA indicando maior comportamento tipo ansioso. Já os animais enriquecidos apresentaram um tempo de latência menor em relação ao grupo CO, sugerindo um efeito ansiolítico deste ambiente.

Figura 3. Percentagem de tempo nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado ($n=20$ /grupo).

* $p < 0,05$ vs. CO e # $p < 0,001$ vs. EA. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão.

6.1.2 Percentagem de tempo gasto nos braços abertos

A ANOVA- 1 via não apontou como significativo [$F(2,58) = 1,987$; $p = 0,146$] o efeito da condição ambiental na percentagem de tempo gasto nos braços abertos do aparato.

Figura 4. Tempo de latência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (n=20/grupo). Os dados representam a média $\pm$ erro padrão.

6.1.3 Número de entradas e tempo de permanência nos braços fechados

Foi realizada a ANOVA – 1 via que não revelou diferenças significantes no número de entrada nos braços fechados [$F(2,58) = 2,0801$; $p=0,134$] nem no tempo gasto nos braços fechados [$F(2,58) = 1,5845$; $p=0,213$]. Esses dados sugerem que não houve comprometimento locomotor dos animais durante a realização do teste.

Figura 5. A) Número de entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado (n=20/grupo). B) Tempo de permanência nos braços fechados (n=20/grupo). Os dados representam a média $\pm$ erro padrão.

6.2 Efeitos das condições ambientais sobre memória e motivação usando o teste de reconhecimento de objetos 1 hora e 24 horas depois da exposição

6.2.1 Tempo de exploração dos objetos nas três fases do teste

A ANOVA de medida repetida detectou como significantes os fatores grupos [$F(2,23) = 15,0203$; $p < 0,05$] e tempo [$F(2,23) = 29,6796$; $p < 0,05$] e a interação grupo x tempo [$F(4,46) = 7,6649$; $p < 0,05$]. A análise *post hoc* mostrou que os animais dos grupos CO e ES passaram mais tempo explorando ambos os objetos depois de 1 hora comparado ao período de exposição. Nos testes de 1 hora e de 24 horas os animais EA exploraram menos os objetos do que os demais grupos. Além disso, em relação ao grupo ES, a exploração depois de 24 horas é menor do que a exploração inicial na fase de exposição. Essas diferenças indicam que os animais do grupo EA passaram menos tempo explorando os objetos do que os grupos CO e ES, sugerindo que, depois do primeiro momento a novidade se tornou menos atraente para esses animais.

Figura 6. Tempo de exploração dos objetos no teste de reconhecimento de objetos ($n=10/\text{grupo}$). * $p < 0,05$ em relação ao mesmo grupo no dia da Exposição. # $p < 0,05$ em relação ao CO e ES nos mesmos momentos. + $p < 0,05$ em relação ao grupo ES em 1 hora. Os dados representam média $\pm$ erro padrão.

6.2.2 Razão de discriminação

A ANOVA de medida repetida não mostrou como significante nenhum dos fatores grupo [$F(2,23) = 1,488$; $p=0,246$], tempo [$F(1,23) = 3,788$; $p=0,639$] nem a interação grupo x tempo [$F(2,23) = 0,365$; $p=0,697$]. Essa análise mostra que os animais dos grupos CO, EA e ES discriminaram os objetos da mesma forma, em ambos os dias.

Figura 7. Razão de discriminação ([tempo explorando objeto novo] / tempo explorando ambos os objetos) 1 e 24 horas após primeira exposição aos objetos ($n=10$ /grupo). Os dados representam média $\pm$ erro padrão.

6.3 Influência das condições ambientais sobre a preferência condicionada por lugar induzida pelo etanol

6.3.1 Medida da preferência condicionada por lugar ao etanol

O tempo que o animal passou no lado pareado no dia do teste menos o tempo que o animal passou neste compartimento no dia da habituação mostra se houve um aumento da preferência por este compartimento, depois do tratamento. A ANOVA 1-via mostrou efeito de condição ambiental [$F(2,28)=4,75$; $p<0,05$]. A análise *post hoc* mostrou que os animais do grupo EA passaram mais tempo no lado pareado com etanol do que o grupo CO. O gráfico superior mostra a diferença entre o tempo gasto no lado pareado e no lado não pareado no dia da habituação e no dia do teste. A ANOVA de medida repetida apontou o fator dia [$F(1,28) = 28,399$; $p<0,05$] como significativo e o fator grupo [$F(2,28)=0,838$; $p=0,442$] e a interação

[$F(2,28)=2,893$; $p=0,072$] falharam em apresentar diferenças estatísticas. A análise dos dados sugere que houve uma inversão na preferência inicial do compartimento não pareado pelo compartimento pareado com etanol.

Figura 8. Diferença entre tempo gasto no compartimento pareado (tempo gasto no compartimento pareado no dia do teste (T_p) – tempo gasto no compartimento pareado no dia da habituação (H_p)) nos grupos CO, EA e ES ($n=10$ /grupo). * $p<0,05$ em relação ao grupo CO. O gráfico superior mostra o Score (tempo gasto do lado pareado – tempo gasto no lado não pareado) no dia da habituação e no dia do teste. Os dados representam média $\pm$ erro padrão.

6.3.2 Medida da preferência condicionada por lugar induzida pela salina

A CPP também foi realizada sem etanol, com a finalidade de se estudar se o aumento da preferência foi, de fato, devido aos efeitos recompensadores do etanol. Foi medida a diferença de tempo gasto no lado pareado com salina no dia do teste e da habituação

A ANOVA-1 via não apontou como significativa a diferença de tempo gasto no compartimento pareado com salina no dia do teste e no dia da habituação em nenhum dos grupos [$F(1,2)=1,107$; $p=0,345$]. Esse resultado sugere que a preferência foi semelhante entre os grupos. O gráfico superior mostra a diferença entre o tempo gasto no lado pareado e no lado não pareado no dia da habituação e no dia do teste. Neste caso, a ANOVA de medida repetida mostrou como significativa os fatores grupo [$F(2,27)=7,347$; $p<0,05$] e dia [$F(1,27)=10,576$; $p<0,05$], mas não a interação [$F(2,28)=0,528$; $p=0,595$]. Essa análise aponta que não houve inversão da preferência do lado não pareado pelo lado pareado após administração de salina, demonstrando que esta não foi capaz de alterar a preferência dos animais pelo compartimento não-pareado.

Figura 9. Diferença entre tempo gasto no compartimento pareado no dia do teste (T_p) e tempo gasto no compartimento pareado no dia da habituação (H_p) nos grupos CO, EA e ES que receberam salina ($n=10/\text{grupo}$). O gráfico superior mostra o Score (tempo gasto do lado pareado – tempo gasto no lado não pareado) no dia da habituação e no dia do teste. Os dados representam média $\pm$ erro padrão.

6.4 Análise dos níveis de corticosterona

A ANOVA de medida repetida não apontou diferença significativa para os fatores grupo [$F(2,15)=0,263$; $p=0,771$] e dia [$F(1,15)=0,254$; $p=0,875$], e nem para a interação desses fatores [$F(2,15)=0,206$; $p=0,206$]. A análise desse resultado sugere que os níveis de corticosterona não variaram entre os grupos e se assemelharam nesses dois momentos.

Figura 10. Percentagem dos níveis de corticosterona no dia 1 e no dia 21 do experimento nos animais dos grupos CO, EA e ES (n=10/grupo). Os dados representam média $\pm$ erro padrão.

6.5 Análise quantitativa de receptores de oxitocina (OT)

Foi estudado o efeito do enriquecimento ambiental e do estresse crônico previsível sobre o sistema oxitocinérgico dos camundongos. A ANOVA-1 via foi realizada e apontou como significativa o efeito do ambiente em diversas regiões encefálicas (tabela 1). Os animais enriquecidos apresentaram uma diminuição no nível de *binding* de OT nos núcleos olfatórios anteriores e no córtex frontal. Já os animais do grupo ES apresentaram um aumento do *binding* em comparação com o grupo CO na região da amígdala e no núcleo olfatório anterior lateral e no córtex pré-frontal comparado com animais EA.

Tabela 1 - Efeitos relevantes de dados autorradiográficos do *binding* de OT (ANOVA- 1 via).

Autorradiografia OTR	Fator 'Grupo'
FCx	$F_{(2,12)} = 21,821; p < 0,001$
AOM	$F_{(2,12)} = 7,490; p < 0,01$
AOL	$F_{(2,12)} = 9,151; p < 0,005$
AOV	$F_{(2,12)} = 8,576; p < 0,05$
Amy	$F_{(2,12)} = 4,964; p < 0,05$

Figura 11. Binding de receptores de oxitocina (OTR). a) Autorradiogramas representativos da ligação do análogo de OT $[^{125}\text{I}]\text{-OVTA}$ aos OTRs em fatias encefálicas coronais ao nível de núcleos olfatórios (primeira fileira), *striatum* (segunda fileira), *septum* (terceira fileira) e tálamo (quarta fileira). O nível de ligação é representado usando uma interpretação em pseudo-cor de imagens em preto e branco do filme revelado em fmol/mg de tecido equivalente. b) O gráfico mostra o nível de *binding* de oxitocina quantitativo em diversas regiões encefálicas onde OTR é expresso. * $p<0,05$, ** $p<0,005$ vs. CO; # $p<0,01$, ## $p<0,001$ vs. EA. **FCx**: córtex frontal, **AOM**: núcleo olfatório anterior medial, **AOV**: núcleo olfatório anterior ventral, **AOL**: núcleo olfatório anterior lateral, **CgCx**: córtex cingulado, **PirCx**: córtex piriforme, **Acb**: núcleo accumbens, **CPu**: núcleo caudado-putâmen, **LS**: septo lateral, **Hip**: hipocampo, **Th**: Tálamo, **Amy**: amígdala, **Hyp**: hipotálamo (n=5/grupo).

7 DISCUSSÃO

Neste trabalho, a exposição repetida ao EA: 1) diminuiu a latência da entrada do braço aberto no labirinto em cruz elevado, sugerindo menor comportamento “tipo ansiedade” nos animais, ao contrário do que foi observado no grupo ES; 2) não alterou a razão de discriminação entre os objetos no teste de reconhecimento de objetos; 3) induziu maior preferência condicionada ao etanol, demonstrado pelo paradigma da CPP; 4) modulou a OT em regiões associadas a comportamento social, como núcleos olfatórios e córtex frontal, favorecendo a preservação da memória social, como demonstrado pelos achados autorradiográficos dos receptores de OT. Já o estresse foi capaz de afetar a região da amígdala comprometendo o comportamento social e favorecendo o comportamento tipo medo e ansiedade.

O teste do labirinto em cruz elevado, usado para medir comportamentos tipo ansiedade, se baseia na tendência natural do animal preferir espaços fechados e escuros e um medo não condicionado de altura e espaços abertos (Walf et al., 2007). Drogas ansiogênicas diminuem o tempo gasto nos braços abertos do aparato, enquanto drogas ansiolíticas têm efeito oposto (Pellow et al., 1985).

Os animais que passaram pelo estresse crônico previsível (imobilização) (ES) apresentaram maior comportamento tipo ansioso, demonstrado pelo maior tempo de latência de entrada nos braços abertos do aparato. A análise dos dados apontou que os animais do grupo EA tiveram um tempo de latência menor e os animais do grupo ES tiveram tempo de latência maior, comparado ao CO, sugerindo propriedades “ansiolíticas” do ambiente enriquecido e características ansiogênicas do estresse prolongado. O tempo gasto nos braços abertos do aparato reflete um conflito entre a preferência do animal de permanecer em local seguro (braço fechado, por exemplo) e a sua motivação inata de explorar ambientes novos (Walf, Frye, 2007). Da mesma forma o tempo de latência de entrada no braço aberto também é usado como medida de ansiedade, porém está mais relacionado com avaliação de risco (Binder et al., 2004; Françolim-Silva, Almeida, 2004).

A ansiedade é uma consequência frequente da exposição ao estresse (Rogerio et. al, 1991; Walf et. al, 2007). O comportamento ansioso observado no grupo ES pode ser decorrente da ativação do eixo HPA, culminando na liberação de

corticosterona, conforme será discutido posteriormente. Já foi previamente mostrado que uma maior interação de corticosterona com receptor glicocorticoide depois de um evento estressor produz um estado de ansiedade aumentado, observado pela diminuição de tempo no braço aberto (Korte et al., 2003).

Em relação ao grupo EA, a latência de entrada no braço aberto foi menor do que a do grupo CO, o que sugere um efeito “ansiolítico” do enriquecimento. Diversos estudos demonstram o papel ansiolítico do EA, com maior tempo gasto nos braços abertos do EPM (Galani et al., 2007; Peña et al., 2006; Pritchard et al., 2013; Sampedro-Piquero et al., 2013), embora alguns autores considerem o EA um fator gerador de estresse moderado em ratos (Moncek et al., 2004). Os resultados deste estudo apontam uma diferença evidente de comportamento tipo ansioso entre os grupos ES e EA, com aumento de ansiedade no primeiro e diminuição no segundo, nos parâmetros estudados.

No presente estudo usamos o teste de reconhecimento de objetos como medida de memória episódica (“o quê, quando e onde”) de curto e longo prazo dos animais (Antunes, Biala, 2012; DeVito, Eichenbaum, 2010). Além do uso de objetos permitir testar aspectos cognitivos (aprendizagem e memória) também possibilita testar aspectos motivacionais (busca por novidade) (Zimmermann et al., 2001).

Motivação é o estado que guia o comportamento em relação a mudanças no ambiente (Hebb, 1949), e o teste de reconhecimento de objetos se baseia na motivação natural do animal em explorar novidades em um ambiente conhecido (Kazlauckas et al., 2010).

Os resultados do teste de reconhecimento de objetos, mostraram que os animais de todos os grupos apresentaram índices semelhantes de razão de discriminação (RD) dos objetos familiares nos testes realizados 1 e 24 horas após o treino, indicando reconhecimento do objeto antigo (memória de curto prazo) e manutenção desse reconhecimento durante um período mais longo (memória de longo prazo).

Em relação ao grupo EA, o resultado deste trabalho vai de encontro com os apresentados na literatura, que mostram que o ambiente enriquecido gera benefícios sobre a cognição (Leger et al., 2012, Rampon et al., 2000, Rosenzweig et al., 1996,

Schrijver et al., 2002). A forma como se dá a interação memória x ambiente ainda não está totalmente esclarecida, mas estudos apontam que o enriquecimento é capaz de promover aumento de volume, arborização dendrítica e maior número de células gliais no hipocampo, região altamente ligada à formação de memória (Bruehl-Jungerman et al., 2005; Kempermann et al., 1997). Mais especificamente, em relação ao teste de reconhecimento de objetos e EA, os resultados da literatura são distintos (Kazlauskas et al., 2010; Mesa-Gresa et al., 2013; Viola et al., 2010; Zimmermann et al., 2001). Essas diferenças podem ser explicadas pelo protocolo do EA, espécies e linhagens de animais utilizadas e protocolo do próprio teste de reconhecimento de objeto.

Neste trabalho, o grupo ES não apresentou diferença nos valores de discriminação comparado aos demais grupos. De acordo com este teste, o estresse por imobilização parece não ter afetado a memória dos animais. Os dados da literatura também divergem quanto aos efeitos do ES sobre a memória episódica. Enquanto o estresse crônico pode afetar negativamente processos cognitivos, quando induz alta liberação de hormônios ligados ao estresse (glicocorticoides, por exemplo) (Larsson et al., 2002), um estudo mostra que animais submetidos ao estresse de imobilização por 28 dias apresentaram melhores índices nos testes do labirinto de Morris e de reconhecimento de objetos, associados a um aumento de neurogênese hipocampal (Parihar et al., 2011). Essa diferença pode ser explicada pela diferença na liberação de corticosterona produzida pelos diferentes tipos de estresse, resultado da habituação do eixo HPA, conforme será discutido posteriormente.

O tempo de exploração dos objetos no teste de 24 horas relativo ao teste de 1 hora diferiu entre os grupos. Enquanto os animais CO e do grupo ES apresentaram um aumento no tempo de exploração no teste realizado 1 hora depois da primeira exposição aos objetos e uma diminuição da exploração no teste de 24 horas em comparação ao de 1 hora, o grupo EA não apresentou variação significativa no decorrer do teste, ou seja, os animais exploraram os objetos da mesma forma em todas as fases. Além disso, nos dois momentos dos testes o tempo de exploração dos objetos do grupo EA é significativamente menor que os dos demais grupos.

O tempo de exploração dos objetos na fase de exposição aos objetos idênticos (fase de familiarização) não apresentou diferença significativa entre os grupos, ou seja, os animais passaram aproximadamente o mesmo tempo explorando os objetos. Isso sugere que, apesar da convivência diária com estímulos variados, a apresentação de novos objetos suscitou exploração à novidade em um primeiro momento.

Entretanto, a repetição da exposição a objetos novos num ambiente já familiar (campo aberto) não despertou interesse à exploração dos objetos novos no mesmo nível observado nos demais grupos. Esses resultados sugerem que a novidade pode ser menos atraente para os animais EA como demonstrado por Viola e colaboradores(2010). Uma possível interpretação dos resultados pode estar relacionada com uma diminuição de motivação por estímulos novos. Esse resultado vai ao encontro de dados da literatura que apontam que animais criados em ambiente enriquecido tendem a reagir menos à novidade, mostrado pela menor locomoção no campo aberto (de Carvalho et al., 2010; Hughes, Collins, 2010; Kobiló et al., 2013).

Em contrapartida, o resultado do grupo ES sugere que os animais se interessaram mais em explorar os objetos e que esse interesse foi diminuído 24 horas depois. Esse dado é interessante, pois o estresse crônico é apontado como fator que induz estado de anedonia (Poulin et al., 2014; Tynan et al., 2010). Por outro lado, trabalhos na literatura mostram que animais que passaram pela imobilização crônica tiveram a mesma atividade locomotora no campo aberto que animais do grupo controle, sugerindo mesma reação à novidade (Chiba et al., 2012; Liu et al., 2013b) e o trabalho de Parihar e colaboradores (2011) citado anteriormente, também mostrou que os animais estressados passaram mais tempo explorando os objetos que os animais do grupo controle. Os nossos resultados mostraram que grupo ES não diferiu do CO no teste de 1 hora, evidenciando níveis semelhantes de resposta do animal à novidade. Entretanto, a atração pela novidade não foi duradoura no grupo ES, uma vez que o tempo de exploração pelo objeto novo foi menor do que o do grupo CO, no teste de 24 horas.

O teste de reconhecimento de objeto depende fundamentalmente da exploração dos objetos pelos sujeitos. No caso deste trabalho, essa exploração se

deu de forma desigual durante o decorrer do teste, mostrado pelo fator grupo na ANOVA de medida repetida. Analisando o gráfico do tempo de exploração dos objetos (figura 5) é possível perceber que de maneira geral os animais enriquecidos exploraram menos os objetos do que os demais grupos, prejudicando a avaliação do teste. Essa observação estaria de acordo com dado da literatura que mostra que animais enriquecidos apresentaram uma redução no tempo de contato com o objeto (Van Wass, Sofieé, 1995).

Desta forma, não é possível afirmar que não houve diferença de memória entre esses grupos, apesar da razão de discriminação não ter apresentado diferença significativa. Baseado nisso, um grupo de autores considera esse resultado como uma possível melhora na memória dos animais promovida pelo enriquecimento, uma vez que, com menos tempo de exploração, eles foram capazes de discriminar os objetos da mesma forma que o grupo controle (Viola et al., 2010).

Situações aversivas como o estresse podem aumentar a preferência condicionada por drogas de abuso (Bahi, 2013; Schindler et al., 2012; Smith et al., 2012), em contrapartida, situações ambientais positivas, dentre elas o EA podem diminuir comportamentos relacionados à dependência (Chauvet et al., 2011; Solinas et al., 2008; Starosciak et al., 2012). O teste da CPP é um método de condicionamento pavloviano no qual um primeiro conjunto de pistas ambientais é pareado com a droga - administrada de forma passiva- e um segundo conjunto com veículo, então a preferência por um dos ambientes é usada para medir efeitos recompensadores ou aversivos da droga (Grolewski et al., 2008) e é útil para estudar os efeitos das pistas ambientais associadas à experiência com drogas (Cunningham et al., 2006).

No teste da CPP realizado neste presente estudo, todos os grupos apresentaram uma preferência pelo lado pareado com o etanol, mostrando o efeito recompensador desta droga, conforme reportado anteriormente (Risinger et al., 1996). Entretanto, a análise dos dados indicou que os animais do grupo EA apresentaram maiores níveis de CPP comparados ao CO. O grupo ES, por sua vez, não diferiu do CO.

Os resultados do enriquecimento ambiental sobre a preferência de drogas têm se mostrado controversos. Solinas et al. (2008) mostrou que o EA foi capaz de

reverter a preferência por cocaína em camundongos, e Carvalho et al. (2010) observaram que ratas criadas em ambiente enriquecido não apresentaram preferência pelo etanol. Em contrapartida, trabalhos de Thiriet et al. (2011) e Bowling et al. (1994) revelaram que o ambiente enriquecido não foi capaz de reduzir a preferência à metanfetamina e anfetamina, respectivamente.

Estudos com etanol mostram que o enriquecimento é capaz de reverter e prevenir a sensibilização (Rueda et al., 2012), diminuir o consumo (Carvalho et al., 2010) e a auto-administração (Deehan et al., 2011). Neste último, cabe observar que a diminuição foi em comparação a animais criados de forma isolada, o que não caracteriza um controle padrão. Em uma comparação entre CPP e sensibilização com heroína, Rawas et al. (2008) observaram que o EA foi capaz de reduzir a preferência, mas não a sensibilização comportamental em camundongos. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho com a CPP mostraram que o EA não foi capaz de impedir ou diminuir a preferência pelo etanol. Pelo contrário, observamos que os animais enriquecidos tiveram uma preferência aumentada pelo compartimento pareado com etanol quando comparados com os animais do grupo controle.

Esse resultado poderia sugerir um aumento do efeito recompensador da droga, porém, existem outros fatores que devem ser considerados. Primeiro, considerando o teste de reconhecimento de objetos inconclusivo, não podemos descartar a hipótese de que a memória dos animais enriquecidos esteja modificada, permitindo a associação mais intensa entre efeito recompensador da droga e as pistas do ambiente. De fato, no teste da CPP a memória é um componente fundamental para que a associação droga/compartimento ocorra, uma vez que a administração de drogas amnésicas como a escopolamina e o biperideno bloqueiam a expressão do condicionamento (Ramos et al., 2012; Itzhak et al., 2000). A associação entre pistas ambientais e efeito recompensador da droga é um dos fatores fundamentais no processo do desenvolvimento da dependência e é vinculado à memória e aprendizado (Taylor et al., 2009).

A literatura mostra diferenças entre os resultados apresentados em estudos que utilizam CPP e auto-administração com relação aos efeitos do EA sobre os

efeitos reforçadores não apenas do etanol, mas também de anfetamina (Stairs et al., 2006, Stairs, Bardo, 2009; Thiriet et al., 2011) e cocaína (Green et al., 2010).

Essa discrepância sugere que o tipo de teste é um fator importante a ser considerado, uma vez que a CPP e a auto-administração operante avaliam fundamentalmente processos distintos (Bardo et al., 2000). A primeira, conforme descrita acima é uma forma de condicionamento pavloviano em que um conjunto de pistas se torna associado aos efeitos da droga, que é administrada de forma passiva (Cunningham et al., 2006). Já a auto-administração é um processo operante que é reforçado e mantido pelo recebimento da droga ao pressionar uma barra e o efeito recompensador é medido através do número de pressões. O modelo de auto-administração operante se assemelha mais ao padrão de uso de drogas de abuso em humanos (Buccafusco, 2001).

O número de exposições à droga é consideravelmente superior no protocolo de auto-administração do que na CPP, em que os animais recebem etanol quatro vezes, em dias alternados com salina. Em uma revisão de 2009, Stairs e Bardo discutem que é possível que os animais enriquecidos apresentem uma maior sensibilidade aos efeitos recompensadores da droga seguidos de uma exposição inicial, mas eles desenvolvem uma tolerância rápida a esse efeito com exposições repetidas, ou seja, animais criados em ambiente enriquecido podem estar mais sensíveis aos efeitos recompensadores do etanol quando o número de exposições é baixo, como na CPP.

Outro estudo comparando CPP e auto-administração com cocaína mostrou que ratos criados em ambiente enriquecido se auto-administraram menos do que animais criados de forma isolada, mas não apresentaram diferença no condicionamento. Neste trabalho, os autores levantam a hipótese de que a ativação repetida das vias de recompensa pela novidade, exercício e contato social torna o animal enriquecido menos vulnerável à auto-administração de forma compulsiva (Green et al., 2010).

O sistema mesolímbico dopaminérgico compreende a área ventral do tegmento mesencefálico (VTA) e o núcleo accumbens e tem papel crucial na recompensa a drogas de abuso. Porém, o sistema mesocortical, que envolve VTA e

córtex pré-frontal também contribui com a recompensa às drogas e dependência (Volkow, Baler, 2014).

Um estudo realizado por Segovia e colaboradores (2010) utilizando microdiálise mostrou que ratos criados em ambiente enriquecido apresentaram maior concentração de dopamina no núcleo accumbens quando comparados aos animais criados de maneira isolada, sugerindo uma sensibilização dopaminérgica no sistema mesolímbico induzida pelo EA. Portanto, é possível levantar a hipótese de que o EA seja capaz de atuar diretamente nessa via, sensibilizando-a. Desta forma, os animais seriam mais susceptíveis ao efeito recompensador induzido pelo baixo número de exposições não voluntária ao etanol, como ocorre no paradigma da CPP. A sensibilização dopaminérgica nessa região, induzida pelo EA, pode ter contribuído para o maior condicionamento ao etanol observado no presente estudo.

Baker e colaboradores (1998) mostraram que a administração intra-accumbens do antagonista D1 seletivo SCH-23390 preveniu a expressão do condicionamento à cocaína. Pina e Cunningham (2013) mostraram que o bloqueio de receptores D1 pelo mesmo antagonista comprometeu o condicionamento ao etanol, o que não aconteceu com a administração do antagonista de receptor do tipo D2, indicando que a dopamina nessa região tem um papel importante na expressão da CPP.

Já no córtex pré-frontal, o EA é capaz de diminuir a densidade de receptores D1 nessa região, em comparação com animais criados de forma isolada. Além disso, o grupo EA foi capaz de reduzir os efeitos da administração do agonista de receptor D1, como aumento espontâneo de atividade motora e liberação local de acetilcolina, conforme observados nos animais isolados, afetando o comportamento motor (Del Arco et al., 2007).

Em contrapartida, outro estudo mostrou que animais criados em ambiente enriquecido tiveram uma diminuição dos níveis do transportador de dopamina na superfície de células do córtex pré-frontal medial, comparado com animais controle e criados de forma isolada, sugerindo um aumento de dopamina nessa região (Zhu et al., 2005).

Esses resultados sugerem que o EA produz mudanças relevantes na função deste neurotransmissor em áreas específicas do encéfalo que podem contribuir para as respostas comportamentais dos animais. A dopamina e o seu receptor D1 tem se mostrado relevantes tanto pelo aspecto motor estudado através da resposta comportamental ao ambiente novo (Giros et al., 1996) e atividade locomotora no campo aberto (Chefer et al., 2003) como no processo da dependência química. Como já discutido acima, o estresse crônico previsível levou a um comportamento tipo-ansiedade (por ter tido maior latência para os braços abertos do que o controle), mas não produziu um condicionamento ao etanol maior do que o grupo CO, como seria esperado, uma vez que o estresse pode aumentar a preferência condicionada por drogas de abuso (Bahi, 2013; Schindler et al., 2012; Smith et al., 2012) e é um fator de risco para abuso de drogas e transtornos de ansiedade (Bahi, 2013). No entanto, as respostas à administração de drogas variam de acordo com o tipo de estresse a que os animais são submetidos. Burke et al. (2013) realizaram um experimento com ratos comparando o estresse social com o estresse por choque em adolescentes e observaram que apenas o primeiro levou ao aumento da preferência por anfetamina na CPP, da mesma forma que Bahi (2013) mostrou que camundongos submetidos ao estresse psicossocial passaram mais tempo no lado pareado com etanol e consumiram mais a droga no teste de consumo não forçado. Visando a comparação entre estresse crônico previsível e imprevisível, Haile et al., 2001, observaram que o estresse previsível não alterou a preferência de ratos pelo compartimento pareado com cocaína, enquanto que o imprevisível apresentou aumento. A imobilização aguda em ratos foi capaz de levar a um aumento do efeito de recompensa da anfetamina, mas a imobilização crônica não (Capriles et al., 1999).

Ainda são necessários mais estudos para elucidar o mecanismo de ação do EA sobre a CPP, e possivelmente explicar a discrepância entre os resultados obtidos com os diferentes modelos usados para estudar aspectos da dependência.

Um dos objetivos deste trabalho era examinar se o EA representa um estresse positivo (“eustress”).

A dosagem de corticosterona não apresentou diferenças significativas entre os grupos nos dias D1 e D22, sugerindo uma habituação do eixo aos efeitos do

ambiente enriquecido e do estresse prolongado, além de não apresentar uma diferença de resposta entre o tipo de condição ambiental. Em relação ao EA, não existe consenso quanto a sua ação sobre a concentração de corticosterona plasmática. Enquanto alguns trabalhos mostraram que o ambiente enriquecido aumentou o nível de corticosterona em animais (Fairhurst et al., 2011; Konkle et al., 2010; Marashi et al., 2002; Moncek et al., 2004), um estudo realizado por Belz et al. (2003) mostrou efeito contrário. Stairs e colaboradores (2011) mostraram um aumento plasmático de corticosterona em roedores criados de forma isolada, mas não mostraram diferença entre os roedores criados no EA e no controle padrão. Da mesma forma, Leal-Galicia e colaboradores (2007) não encontraram diferenças na corticosterona plasmática entre animais enriquecidos e controle.

Outros estudos são feitos em animais criados em ambiente enriquecido e que passam por um evento estressor agudo. Mesmo nessa situação, os resultados se mantêm diversos. Em nosso laboratório, animais enriquecidos apresentaram menores níveis de corticosterona depois de passarem pelo estresse de imobilização agudo comparados com o grupo controle (Rueda, 2013, comunicação pessoal). Ratos criados em ambiente enriquecido expostos ao odor de urina de gato de forma aguda apresentaram um aumento mais expressivo da concentração plasmática de corticosterona do que animais controle (Mitra, Sapolsky, 2012). Finalmente, Benaroya- Milshtein e colaboradores (2010) mostraram que não houve variação nos níveis de corticosterona de camundongos submetidos a um protocolo de estresse forte (choque).

Em relação ao grupo ES, o resultado sugere que houve uma habituação do eixo HPA, por se tratar de estresse crônico previsível. É sabido que a exposição repetida a um mesmo agente estressor pode levar tanto a uma habituação (diminuição), como a uma sensibilização (aumento) à resposta àquele estímulo estressor e que a duração e o tipo de estresse são relevantes para determinar esse tipo de resposta (Pitman et al., 1988). A habituação é observada quando os níveis dos hormônios relacionados ao estresse retornam aos níveis basais (Zamora-Gonzalez et al., 2013). No presente estudo, o tempo de exposição ao estresse (1 hora/dia por 21 dias) e o tipo de estresse (estresse crônico previsível leve) foram importantes para influenciar o comportamento do hormônio e a habituação do eixo HPA. Utilizando o protocolo de imobilização, Rogers e colaboradores (2002)

mostraram em estudo feito com ratos, que após 12 dias de estresse diário, os níveis de corticosterona plasmática permaneceram inalterados, quando comparados com os níveis basais, sugerindo habituação do eixo HPA ao agente estressor. Por outro lado, usando um protocolo de imobilização de 6 horas por dia, durante 21 dias, Liu e colaboradores (2013a) não encontraram habituação, e sim um aumento nos níveis de corticosterona ao fim do experimento.

Entretanto, no teste do labirinto em cruz elevado o grupo ES apresentou comportamento tipo-ansioso quando comparado ao CO sugerindo que, apesar da manutenção dos níveis plasmáticos de corticosterona, outros componentes da circuitaria relacionada ao estresse e a ansiedade devem estar alterados. Um estudo realizado em porcos mostrou que apesar de serem submetidos a sessões de choques diárias, os níveis de corticosterona plasmática permaneceram os mesmos, porém os animais ainda reagiam àquela situação com agitação seguida de inibição, sugerindo que eles permaneciam continuamente estressados (Mormède et al., 2007).

Além da corticosterona, a OT também é um dos hormônios envolvidos na resposta ao estresse. Estudos apontam que estressores agudos e crônicos liberam OT tanto em machos quanto em fêmeas (Carter, 2013) e que tanto em animais quanto em humanos a amígdala é um alvo importante da OT, devido ao papel bem conhecido dessa estrutura em comportamento relacionados a estresse, medo e sociabilidade (Sripada et al., 2013).

Em nosso estudo, a autorradigrafia realizada no encéfalo dos camundongos mostrou *up-regulation* de *binding* de receptores de OT na amígdala dos animais do grupo ES, comparado ao grupo CO, mas não no grupo EA, sugerindo que o EA não se comporta como o ES nesse parâmetro.

A amígdala é um dos sítios de ação ansiolítica da OT (Onaka et al., 2012) e nesta região um número considerável de fibras oxitocinérgicas e receptores de OT foram encontrados, principalmente na amígdala central e medial (Ebner et al., 2005).

Os efeitos da OT sobre estresse e agressividade são mais bem estabelecidos em fêmeas do que em machos, uma vez que esse neuropeptídeo tem ação mais

proeminente na modulação de comportamento maternal, que compreende também o período de gestação e lactação.

Neumann (2008) discute que os efeitos do bloqueio dos receptores de OT na amígdala central só produziram efeitos sobre comportamentos relacionados à ansiedade em ratas fêmeas grávidas ou lactantes, mas não em ratas fêmeas virgens ou em ratos machos. Em contrapartida, Ebner e colaboradores (2005) apontaram que a administração de antagonista de OT na amígdala central levou a uma diminuição no tempo que ratos machos flutuaram no teste do nado forçado, sugerindo que a OT endógena estaria relacionada com um comportamento mais passivo perante o estresse, prevenindo uma resposta excessiva ao agente estressor. Da mesma forma, Viviani e colaboradores (2011) mostram que a OT diminui o comportamento de *freezing* em ratos, em decorrência da inibição de neurônios na amígdala central.

Esses efeitos ansiolíticos também são observados em humanos. Por exemplo, existe estudo realizado em homens saudáveis que mostra que após receberem OT de maneira intranasal, a atividade da amígdala desses indivíduos estava diminuída quando apresentados a fotos de expressões faciais ou de situações estressantes, em comparação àqueles homens do grupo placebo (Kirsch et al., 2005).

Traçando um paralelo entre o resultado encontrado na autorradiografia, o teste do labirinto em cruz elevado e os dados encontrados na literatura, é possível supor que a diminuição no nível de OT na amígdala seja responsável, pelo menos em parte, pelo comportamento tipo ansioso apresentado pelos animais do grupo ES. Já os níveis de OT na amígdala dos animais EA não diferiram do grupo CO, assim como o teste do labirinto sugere menor efeito tipo ansiedade. Até o momento, esses resultados sugerem que o EA não representa um fator estressante ao animal.

A análise autorradiográfica também mostrou uma *down-regulation* de receptores de OT no córtex frontal de animais do grupo EA comparado com o controle, sugerindo, portanto um aumento de OT nessa região, a qual tem sido associada a comportamento social. Em estudo feito com crianças autistas, a administração de OT nasal aumentou a atividade de diversas regiões encefálicas, inclusive do córtex pré-frontal, quando foram apresentadas imagens de rostos,

demonstrando algum tipo de emoção (Gordon et al., 2013). Ninan (2011) observou que em roedores a OT modula a neurotransmissão glutamatérgica no córtex pré-frontal infra límbico, resultando na inibição ou ativação da amígdala. Esse seria um dos mecanismos pelo qual a OT, através do córtex pré-frontal, atuaria regulando o comportamento social. Uma revisão feita por De Dreu (2012), aponta que regiões como o córtex pré-frontal estão relacionadas a sentimentos como preocupação e compaixão com o próximo, dois estados experimentados somente no convívio social e que reforçam esse tipo de comportamento.

O córtex pré-frontal também possui papel importante no aprendizado social, que é importante para interação social adequada. Danos nessa região podem levar a perda da distinção entre certo e errado, comprometendo o convívio social. Em dependentes químicos, o córtex pré-frontal muitas vezes está comprometido, e os laços sociais não conseguem ser mantidos, contribuindo para a exclusão social do indivíduo (Volkow et al., 2011). É possível que a OT no córtex pré-frontal tenha efeitos pró-sociais protetores, que facilitem a manutenção dos laços afetivos.

Outro resultado obtido nesse trabalho mostrou que houve *down-regulation* de receptores de OT nos núcleos olfatórios dos animais do grupo EA comparados ao grupo CO.

A OT também possui ação pró-social bem conhecida e no caso de roedores, informações olfativas tem um papel fundamental no controle de comportamento social (Onaka et al., 2012).

O processamento olfatório envolve o bulbo olfatório principal que divide conexões com núcleo olfatório anterior e córtex piriforme, duas estruturas envolvidas no processamento e transmissão de sinais olfatórios (Wacker, Ludwig, 2012) e também a amígdala central e medial (Onaka et al., 2012).

Ratos, quando receberam OT através de cânula inserida no bulbo olfatório minutos antes do teste, apresentaram maior duração de resposta de reconhecimento (Dluzen et al., 1998). Nesta mesma linha, ratos que receberam antagonista de OT através de cânula diretamente no bulbo olfatório não foram capazes de discriminar entre animais conhecidos e não conhecidos no teste social (Dluzen et al., 2000).

Neste último trabalho, também é mostrado o papel da noradrenalina nesse processo de reconhecimento social, e que a OT é capaz de modular esse neurotransmissor.

Na maternidade, hormônios da gravidez estimulam a produção de receptores de OT nas projeções olfatórias centrais, incluindo o bulbo olfatório. Esse processo é fundamental para o reconhecimento olfatório dos filhotes pela mãe (Keverne, Curley, 2004).

Em contrapartida, um estudo mostrou que animais *knockout* para receptores de OT apresentaram déficit de memória social, porém a habituação para estímulos olfatórios não sociais se manteve intacta, sugerindo que o comprometimento da memória social não se deu através do bulbo olfatório (Ferguson et al., 2000).

A *down-regulation* de receptores de OT encontrada neste trabalho sugere que o EA modificou esse sistema e que desta forma poderia afetar a sociabilidade dos animais. Um dos aspectos pelo qual o EA atua é promovendo a interação social (Lee et al., 2013) e já foi previamente mostrado que o EA aumenta o tempo que o animal passa explorando o animal novo no teste de sociabilidade (Mesa-Gresa et al., 2013).

A amígdala medial e amígdala cortical medial posterior processam pistas feromoniais provenientes do sistema olfatório acessório (Brennan e Zufall, 2006). Lesões nessa região afetam a liberação de OT após interação social, sugerindo que a amígdala tem papel no controle da liberação de OT frente ao estímulo social (Onaka et al., 2012).

Ferguson e colaboradores (2001) usaram imunorreatividade c-Fos como marcador de atividade neuronal, e observaram que animais *knockout* para receptores de OT apresentavam atividade neuronal similar nas diversas regiões envolvidas com o processamento de informações olfatórias quando comparados ao controle. Entretanto, essa ativação se mostrou diminuída na amígdala medial dos animais *knockout*, sugerindo que a informação olfatória é processada normalmente até atingir amígdala, onde existe uma falha no processo de ativá-la. Da mesma forma, antagonista de OT injetado na amígdala medial de animais selvagens resultou no mesmo déficit de memória social.

Os resultados deste trabalho sugerem que além do estresse crônico previsível atuar sobre o comportamento tipo ansioso, também prejudicaria a sociabilidade dos

animais. A sociabilidade é essencial para a manutenção e preservação da espécie, favorecendo reprodução e proteção contra predadores e mudanças ambientais, e desenvolvimento cerebral (Viero et al., 2010).

É possível que drogas de abuso causem modificações nesse sistema relacionado à sociabilidade, muitas vezes tornando o dependente químico isolado do contato social. Por outro lado, relações sociais estáveis, possivelmente associadas a maiores níveis de OT, podem ter efeito protetor contra a dependência (McGregor, Bowen, 2012). Além disso, um aspecto fundamental do tratamento da dependência de drogas se dá por meio de grupos de igreja e de narcóticos/alcoólicos anônimos ou pela integração dos dois. Um dos efeitos exercidos pelos encontros é o aumento da interação social, que permite que os membros aprendam, aos poucos, como se conectar uns aos outros, sem a intervenção da droga como desinibidor social (Koerner, 2010). Baseado nisso, os dados deste trabalho sugerem que o EA pode desempenhar um papel importante no processo da dependência química, atuando no aspecto social deste transtorno.

Concluindo, os resultados deste trabalho mostraram que o EA não inibiu a preferência condicionada pelo etanol, mas ao contrário, os animais enriquecidos exibiram maior preferência condicionada ao etanol, apesar de apresentarem menor comportamento tipo-ansioso quando comparado com o CO. Entretanto, os dados relacionados com memória, que poderiam fortalecer a hipótese de que o EA reforçou os processos de aprendizagem, e, portanto, a CPP, são inconclusivos, uma vez que os animais não diferiram na avaliação da razão do teste de discriminação do reconhecimento de objetos. Esse teste também sugere que os animais do grupo EA estão menos “motivados” à novidade. Esse dado, por si, é um indício de que o EA possa diminuir a busca pela novidade. Em humanos, um dos traços de personalidade mais estudados em relação à susceptibilidade à dependência tem sido a motivação pela novidade ou procura por novas sensações. Já os resultados da autorradiografia apontam um menor *binding* de OT na região do córtex frontal e dos núcleos olfatórios, regiões associadas com sociabilidade, um dos estímulos enfatizados pelo EA. Em relação ao ES, os dados da autorradiografia que mostram aumento do *binding* de OT na amígdala, comparado com o CO, sugerem aumento de comportamento tipo “ansioso”, o que vai ao encontro dos resultados do teste do labirinto em cruz elevado.

Estava previsto para este trabalho o estudo dos receptores de vasopressina V1a, V1b e V2 e de CRF1 e CRF2 através da técnica da autorradiografia. Porém, como esse estudo depende de uma colaboração, ainda não foi possível obter os resultados dessas análises.

Acredita-se que esses dados contribuirão para elucidar a influência do ambiente enriquecido sobre a circuitaria completa do estresse.

8 CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que o EA possui efeitos “ansiolíticos”, ao contrário do estresse prolongado que mostrou efeito oposto.

Quanto ao teste de reconhecimento de objeto, os resultados mostraram que o ambiente enriquecido não teve efeito claro sobre a memória episódica, mas sugerem uma menor busca pela novidade.

O EA aumentou a preferência condicionada a lugar pelo etanol e o estresse crônico não apresentou diferença. Apesar de o teste de reconhecimento de objeto não ter apontado diferenças, não se pode excluir a possibilidade de que o EA exerça efeitos sobre outros tipos de memórias, o que poderia explicar a maior associação entre o efeito da droga e o pareamento com o ambiente. Além disso, é possível que o enriquecimento atue sensibilizando a via de recompensa, tornando os animais mais sensíveis aos efeitos recompensadores do etanol medidos pela CPP. O ambiente enriquecido também se mostrou capaz de modular o sistema oxitocinérgico em vias relevantes no comportamento pró-social, como córtex frontal e núcleos olfatórios. O estresse crônico previsível também é capaz de modular esse sistema, porém em regiões associadas a comportamentos ligados ao medo e a ansiedade.

Frente aos resultados, fica evidente que o EA possui papel importante na modulação de vias relacionadas com aspectos sociais e comportamentais frequentemente associados com a dependência e se mostra um importante alvo de estudo na busca de tratamento dessa doença.

REFERÊNCIAS*

- Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process*. 2012; 13(2): 93-110.
- Arendash GW, Garcia MF, Costa DA, Cracchiolo JR, Wefes IM, Potter H. Environmental enrichment improves cognition in aged Alzheimer's transgenic mice despite stable beta-amyloid deposition. *Neuroreport*. 2004; 15(11):1751-4.
- Armario, A. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by addictive drugs: different pathways, common outcome. *Trends Pharmacol Sci*. 2010; 31: 318-25.
- Bahi A. Increased anxiety, voluntary alcohol consumption and ethanol-induced place preference in mice following chronic psychosocial stress. *Stress*. 2013; 16(4): 441-51.
- Baker DA, Fuchs RA, Specio SE, Khroyan TV, Neisewander JL. Effects of intraacumbens administration of SCH-23390 on cocaine-induced locomotion and conditioned place preference. *Synapse*. 1998; 30(2):181-93.
- Bardo MT, Bevins RA. Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology*. 2000; 153:31-43.
- Bardo MT, Klebaur JE, Valone JM, Deaton C. Environmental enrichment decreases intravenous self-administration of amphetamine in female and male rats. *Psychopharmacology*. 2001; 155(3):278-84.
- Belz EE, Kennell JS, Czambel RK, Rubin RT, Rhodes ME. Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2003; 76(3-4): 481-6.
- Benaroya-Milshtein N, Hollander N, Apter A, Kukulansky T, Raz N, Wilf A, Yaniv I, Pick CG. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cells activity. *Eur J Neurosci*. 2004; 20:1341-7.
- Binder E, Droste SK, Ohl F, Reul JM. Regular voluntary exercise reduces anxiety-related behavior and impulsiveness in mice. *Behav Brain Res*. 2004; 155: 197-206.
- Bowen MT, Carson DS, Spiro A, Arnold JC, McGregor IS. Adolescent oxytocin exposure causes persistent reductions in anxiety and alcohol consumptions and enhances sociability in rats. *PLoS One*. 2011; 6 (11): e27237
- Bowling SL, Bardo MT. Locomotor and rewarding effects of amphetamine in enriched, social, and isolated reared rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1994; 48(2): 459-64.

Brennan PA, Zufall F. Pheromonal communication in vertebrates. *Nature*. 2006; 444 (7117): 308-15.

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

Bruel-Jungerman E, Laroche S, Rampon C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur J Neurosci*. 2005; 21:513-21.

Buccafusco JJ. *Methods of behavior analysis in neuroscience*. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press; 2009; Chapter 4. 360 p.

Burke AR, Forster GL, Novick AM, Roberts CL, Watt MJ. Effects of adolescent social defeat on adult amphetamine-induced locomotion and corticoaccumbal dopamine release in mice. *Neuropharmacology*. 2013; 67: 359-69.

Cao L, Liu X, Lin EJ, Wang C, Choi EY, Riban V, Lin B, During MJ. Environmental and genetic activation of a brain-adipocyte BDNF/leptin axis causes cancer remission and inhibition. *Cell*. 2010; 142: 52-64.

Capriles N, Cancela LM. Effect of acute and chronic stress restraint on amphetamine-associated place preference: involvement of dopamine D1 and D2 receptors. *Eur J Pharmacol*. 1999;386:127-34.

Carlini E. *Il Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil-2005*. São Paulo: Páginas & Letras Editora e Gráfica Ltda, 2006.

Carroll ME, Anker JJ, Perry JL. Modeling risk factors for nicotine and other drugs abuse in the preclinical laboratory. *Drug Alcohol Depend*. 2009;104S:S70-8.

Carter CS. Oxytocin pathways and the evolution of human behavior. *Annu Rev Psychol*. 2013. In press.

Chauvet C, Lardeux V, Jaber M, Solinas M. Brain regions associated with the reversal of cocaine conditioned place preference by environmental enrichment. *Neuroscience*. 2011;184:88-96.

Chefer VI, Zakharova I, Shippenberg TS. Enhanced responsiveness to novelty and cocaine is associated with decreased basal dopamine uptake and release in the nucleus accumbens: quantitative microdialysis in rats under transient conditions. *J Neurosci*. 2003; 23(7):3076-84.

Chiba S, Numakawa T, Ninomiya M, Richards MC, Wakabayashi C, Kunugi H. Chronic restraint stress causes anxiety – and depression- like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012; 39: 112-19.

Cleck JN, Blendy JA. Making a bad thing worse: adverse effects of stress on drug addiction. *J Clin Invest*. 2008; 118: 454-61.

- Cunningham CL, Gremel CM, Groblewski PA. Drug-induced conditioned place preference and aversion in mice. *Nature Protocols*. 2006; 1: 1662-70.
- De Carvalho CR, Pandolfo P, Pamplona FA, Takahashi RN. Environmental enrichment reduces the impact of novelty and motivational properties of ethanol in spontaneously hypertensive rats. *Behav Brain Res*. 2010; 208: 231-6.
- De Dreu CKW. Oxytocin modulates cooperation within and competition between groups: an integrative review and research agenda. *Horm Behav*. 2012; 61: 419-28.
- Deehan GA, Palmatier MI, Cain ME, Kiefer SW. Differential rearing conditions and alcohol-preferring rats: consumption of and operant responding for ethanol. *Behav Neurosci*. 2011; 125(2): 184-93.
- Del Arco A, Segovia G, Canales JJ, Garrido P, de Blas M, García-Verdugo JM, Mora F. Environmental enrichment reduces the function of D1 receptors in the prefrontal cortex of the rat. *J Neural Transm*. 2007; 114: 43-8.
- DeVito LM, Eichenbaum H. Distinct contributions of the hippocampus and medial prefrontal cortex to the “what-where-when” components of episodic-like memory in mice. *Behav Brain Res*. 2010; 215(2):318-25.
- Dluzen DE, Muraoka S, Engelmann M, Ebner K, Landgraf R. Oxytocin induces preservation of social recognition in male rats by activating α -adrenoceptors of the olfactory bulb. *Eur J Neurosci*. 2000; 12: 760-6.
- Dluzen DE, Muraoka S, Engelmann M, Ebner K, Landgraf R. The effects of infusion of arginine vasopressin, oxytocin, or their antagonists into the olfactory bulb upon social recognition responses in male rats. *Peptides*. 1998; 19(6): 999-1005.
- Ebner K, Bosch OJ, Krömer SA, Singewald N, Neumann ID. Release of oxytocin in the rat central amygdala modulates stress-coping behavior and the release of excitatory amino acids. *Neuropsychopharmacology*. 2005; 30: 223-30.
- Engelmann M, Landgraf R, Wotjak CT. The hypothalamic-neurohypophyseal system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol*. 2004; 25(3-4):132-49.
- Fadda F, Rossetti ZL. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Prog Neurobiol*. 1998; 56: 385-431.
- Fairhurst GD, Frey MD, Reichert JF, Szelest I, Kelly DM, Bortolotti GR. Does environmental enrichment reduce stress? An integrated measure of corticosterone from feathers provides a novel perspective. *PLoS One*. 2011; 6(3):e17663.
- Ferguson JN, Aldag JM, Insel TR, Young LJ. Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. *J Neurosci*. 2001; 21(20): 8278-85.
- Ferguson JN, Young LJ, Hearn EF, Matzuk MM, Insel TR, Winslow JT. Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. *Nat Genet*. 2000; 25(3): 284-8.
- Field M, Powell H. Stress increases attentional bias for alcohol cues in social drinkers who drink to cope. *Alcohol Alcohol*. 2007; 42(6):560-6.

Fox HC, Bergguist KL, Hong KI, Sinha R. Stress-induced and alcohol cue-induced craving in recently abstinent alcohol-dependent individuals. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007; 31(3):395-403.

Françolim-Silva AL, Almeida SS. The interaction of housing condition and acute immobilization stress on the elevated plus-maze behaviors of protein-malnourished rats. *Braz J Med Biol Res*. 2004; 37: 1035-42.

Galani R, Berthel MC, Lazarus C, Majchrzak M, Barbelivien A, Kelche C, Cassel JC. The behavioral effects of enriched housing are not altered by serotonin depletion but enrichment alters hippocampal neurochemistry. *Neurobiol Learn Mem*. 2007; 88: 1-10.

Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev*. 2001; 81(2): 629-83.

Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine receptor. *Nature*. 1996; 379(6566):606-12.

Global status report on alcohol and health. Switzerland: WHO; 2011.

Goeders NE. The impact of stress on addiction. *Eur Neuropsychopharmacology*. 2003; 13:435-41.

Gordon I, Wyk BCV, Bennett RH, Cordeaux C, Lucas MV, Eilbott JA, Zagoory-Sharon O, Leckman JF, Feldman R, Pelphrey KA. Oxytocin enhances brain function in children with autism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110(52): 2953-8.

Green TA, Alibhai IN, Roybal CN, Winstanley CA, Theobald DEH, Birnbaum SG, Graham AR, Unterberg S, Graham DL, Vialou V, Bass CE, Terwilliger EF, Bardo MT, Nestler EJ. Environmental enrichment produces a behavioral phenotype mediated by low cyclic adenosine monophosphate response element binding (CREB) activity in the nucleus accumbens. *Biol Psychiatry*. 2010; 67(1): 28-35.

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

Haile CN, GrandPre T, Kosten TA. Chronic unpredictable stress, but not chronic predictable stress, enhances the sensitivity to the behavioral effects of cocaine in rats. *Psychopharmacology*. 2001; 154:213-20.

Harris RA, Trudell JR, Mihic SJ. Ethanol's molecular targets. *Sci Signal*. 2008; 1:re7.

Hebb DO. The organization of behavior: a neuropsychological theory. New York: Wiley; 1949. 335p.

Hughes RN, Collins MA. Enhanced habituation and decreased anxiety by environmental enrichment and possible attenuation of these effects by chronic α -tocopherol (vitamin E) in aging male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2010; 94: 534-42.

Hyman SM, Fox H, Hong KI, Doebrick C, Sinha R. Stress and cue-induced craving in opioid-dependent individuals in naltrexone treatment. *Exp Clin Psychopharmacol.* 2007; 15(2): 134-43.

I Levantamento Nacional sobre os padrões de consumo e álcool na população brasileira/ Elaboração, redação e organização: Ronaldo Laranjeira... [et al.]; Revisão técnica científica: Paulina do Carmo Arruda Vieira Duarte. Brasília: Secretaria Nacional Antidrogas, 2007.

Itzhak Y, Martin JL. Scopolamine inhibits cocaine-conditioned but not unconditioned stimulants effects in mice. *Psychopharmacology.* 2000; 152: 216-23.

Jarrett TM, Mc Murray MS, Walker CH, Johns JM. Cocaine treatment alters oxytocin receptor binding but not mRNA production in postpartum rat dams. *Neuropeptides.* 2006; 40(3): 161-7.

Kazlauckas V, Pagnussat N, Mioranza S, Kakinine E, Nunes F, Pettenuzzo L, Souza DO, Portela LV, Porciúncula LO, Lara DR. Enriched environment effects on behavior, memory and BDNF in low and high exploratory mice. *Physiol Behav.* 2010; 102: 475-80.

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

Kendler KS. Twin studies of psychiatric illness: an update. *Arch Gen Psychiatry.* 2001; 58: 1005-14.

Keverne EB, Curley JP. Vasopressin, oxytocin and social behavior. *Curr Opin Neurobiol.* 2004; 14(6):777-83.

Kirsch P, Esslinger C, Chen Q, Mier D, Lis S, Siddhanti S, Gruppe H, Mattay VS, Gallhofer B, Meyer-Lindenberg A. Oxytocin modulates neural circuitry for social cognition and fear in humans. *J Neurosci.* 2005; 25(49): 11489-93.

Kitchen I, Slowe SJ, Matthes HW, Kieffer B. Quantitative autoradiographic mapping of mu-, delta-, and kappa-opioid receptors in knockout mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Brain Res.* 1997; 778(1): 73-88.

Klebaue JE, Bardo MT. Individual differences in novelty seeking on the playground maze predict amphetamine conditioned place preference. *Pharmacol Biochem Behav.* 1999; 63: 131-6.

Kobilo T, Liu QR, Gandhi K, Mughal M, Shaham Y, van Praag H. Running is the neurogenic and neurothrophic stimulus in environmental enrichment. *Learn Mem.* 2013; 18(9): 605-9.

Koerner BI. Secret of AA: after 75 years, we don't know how it works. *Wired.* 2010.

Konkle ATM, Kentner AC, Baker SL, Stewart A, Bielajew C. Environmental-enrichment-related variations in behavioral, biochemical, and physiologic responses of Sprague-Dawley and Long Evans rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2010; 49(4): 427-36.

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

Koob GF. A role for brain stress systems in addiction. *Neuron*. 2008; 59:11-34.

Koob GF. Dynamics of neuronal circuits in addiction: reward, antireward, and emotional memory. *Pharmacopsychiatry*. 2009; 42:S32-S41.

Korte SM, De Boer SF. A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behavior in the elevated plus-maze. *Eur J Pharmacol*. 2003; 463: 163-75.

Kreek MJ, Koob GF. Drug dependence: stress and dysregulation of brain reward pathway. *Drug Alcohol Depend*. 1998; 51: 23-47.

Kreibich AS, Briand L, Cleck JN, Ecke L, Rice KC, Blendy JA. Stress-induced potentiation of cocaine reward: a role for CRF R1 and CREB. *Neuropsychopharmacology*. 2009; 34:2609-17.

Larsson F, Winblad B, Mohammed AH. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002;73(1):193-207.

Leal-Galicia P, Saldívar-González A, Morimoto S, Arias C. Exposure to environmental enrichment elicits differential hippocampal cell proliferation: role of individual responsiveness to anxiety. *Dev Neurobiol*. 2007; 67(4): 395-405.

Leão RM, Cruz FC, Planeta CS. Exposure to acute restraint stress reinstates nicotine-induced place preference in rats. *Behav Pharmacol*. 2009; 20:109-13.

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

Leger M, Quiedeville A, Paizanis E, Natkunarajah S, Freret T, Boulouard M, Schumman-Bard P. Environmental enrichment enhances episodic –like memory in association with a modified neuronal activation profile in adult mice. *PLoS One*. 2012; 7 (10): e48043.

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

Liu X, Wu R, Tai F, Ma L, Wei B, Yang X, Zhang X, Jia R. Effects of group housing on stress induced emotional and neuroendocrine alterations. *Brain Res*. 2013 (a); 1502: 71-80.

Liu Y, Zhuang X, Gou L, Ling X, Tian X, Liu L, Zheng Y, Zhang L, Yin X. Protective effects of nifedipine administration on the cognitive impairments induced by chronic restraint stress in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2013 (b); 103(3): 474-80.

Mabuchi AS, Oliveira DF, de Lima MP, Conceição MB, Fernandes H. Uso de bebidas alcoólicas por trabalhadores do serviço de coleta de lixo. *Rev Latino-Am Enfermagem*. 2007;15(3):1-7.

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

Matsuzawa S, Suzuki T, Misawa M. Conditioned fear stress induces ethanol-associated place preference in rats. *Eur J Pharmacol.* 1998; 12:127-30.

Matsuzawa S, Suzuki T, Misawa M. Ethanol, but not the anxiolytic drugs buspirone and diazepam, produces a conditioned place preference in rats exposed to conditioned fear stress. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000; 65:281-8.

McGregor IS, Bowen MT. Breaking the loop: oxytocin as a potential treatment for drug addiction. *Horm Behav.* 2012. In press.

Mesa-Gresa P, Pérez-Martínez A, Redolat R. Environmental enrichment improves novel object recognition and enhances agonistic behavior in male mice. *Agress Behav.* 2013; 39(4): 269-79.

Milton AL, Everitt BJ. The persistence of maladaptive memory: addiction, drug memories and anti-relapse treatments. *Neurosci Biobehav R.* 2012; 36: 1119-39.

Mitra R, Sapolsky RM. Short-term enrichment makes male rats more attractive, more defensive and alters hypothalamic neurons. *PLoS One.* 2012; 7(5): e36092. doi: 10.1371/journal.pone.0036092. Epub

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

Mormède P, Andanson S, Aupérin B, Beerda B, Guémené D, Mamlkvist J, Manteca X, Manteuffel G, Prunet P, van Reenen CG, Richard S, Veissier I. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol Behav.* 2007; 92(3): 317-39.

Neumann ID. Brain oxytocin: a key regulator of emotional and social behaviors in both females and males. *J Neuroendocrinol.* 2008; 20(6): 858-65.

Ninan I. Oxytocin suppresses basal glutamatergic transmission but facilitates activity-dependent synaptic potentiation in the medial prefrontal cortex. *J Neurochem.* 2011; 119: 324-31.

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

Onaka T, Takayanagi Y, Yoshida M. Roles of oxytocin neurons in the controle of stress, energy metabolism, and social behavior. *J Neuroendocrinol.* 2012; 24: 587-98.

Parihar VK, Hattiangady B, Kuruba R, Shuai B, Shetty AK. Predictable chronic mild stress improves mood, hippocampal neurogenesis and memory. *Mol Psychiatry.* 2011;16(2): 171-83.

Paxinos G, Franklin KBJ. The mouse brain in stareotaxic coordinates. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 2001. v. 1.

Pelloux Y, Costentin J, Duterte-Boucher D. Anxiety increases the place conditioning induced by cocaine in rats. *Behav Brain Res.* 2009;197(2):311-6.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in rats. *J Neurosci Methods.* 1985; 14: 149-67.

Peña Y, Prunell M, Dimitsantos V, Nadal R, Escorihuela RM. Environmental enrichment effects in social investigation in rats are gender dependent. *Behav Brain Res.* 2006; 174: 181-7.

Piazza PV, Deminière JM, Le Moal M, Simon H. Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science.* 1989; 245: 1511-3.

Pina MM, Cunningham CL. Effects of dopamine receptor antagonists on the acquisition of ethanol-induced conditioned place preference in mice. *Psychopharmacology (Berl.).* 2013. In press.

Pitman DL, Ottenweller JE, Natelson BH. Plasma corticosterone levels during repeated presentation of two intensities of restraint stress: chronic stress and habituation. *Physiol Behav.* 1988; 43(1): 47-55.

Poulin JF, Laforest S, Drolet G. Enkephalin downregulation in the nucleus accumbens underlies chronic stress-induced anhedonia. *Stress;* 2014; 17(1): 88-96.

Pritchard LM, Van Kempen TA, Zimmerberg B. Behavioral effects of repeated handling differ in rats reared in social isolation and environmental enrichment. *Neurosci Lett.* 2013; 536: 47-51.

Qi J, Yang JY, Wang F, Zhao YN, Song M, Wu CF. Effects of oxytocin on methamphetamine-induced conditioned place preference and possible role of glutamatergic neurotransmission in the medial prefrontal cortex of mice in reinstatement. *Neuropharmacology.* 2009; 56(5): 856-65.

Ramos AC, Andersen ML, Oliveira MGM, Soeiro AC, Galduróz JCF. Biperiden (M₁ antagonist) impairs the expression of cocaine conditioned place preference but potentiates the expression of cocaine induced behavioral sensitization. *Behav Brain Res.* 2012; 231: 213-16.

Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kiyin M, Tsien JZ. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci.* 2000; 3(3):238-44.

Rawas REL, Thiriet N, Lardeux V, Jaber M, Solinas M. Environmental enrichment decreases the rewarding but not the activating effects of heroin. *Psychopharmacology.* 2008; 203: 561-70.

Risedal A, Mattsson B, Dahlgvist P, Nordborg C, Olsson T, Johansson BB. Environmental influences on functional outcome after a cortical infarct in the rat. *Brain Res. Bull.* 2002; 58:315-21.

Risinger FO, Oakes RA. Dose-and conditioning trial-dependent ethanol-induced conditioned place preference in Swiss-Webster mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996; 55:117-23.

- Robinson TE, Berridge KC. Addiction. *Annu Rev Psychol.* 2003; 54:25-53.
- Rogério R, Takahashi RN. Anxiogenic properties of cocaine in the rat evaluated with the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav.* 1992;43:631-3.
- Rogers TD, Gades NM, Kearby JD, Virgous CK, Dalton JT. Chronic restraint via tail immobilization of mice: effects on corticosterone levels and other physiologic indices of stress. *Contemp Top Lab Anim Sci.* 2002; 41(1): 46-50.
- Ron D, Jurd R. The “ups and downs” of signaling cascades in addiction. *Science.* 2005; 309: re14.
- Rosenzweig MR, Bennett EL, Hebert M, Morimoto H. Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. *Brain Res.* 1978; 153:563-76.
- Rosenzweig MR, Bennett EL. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav Brain Res.* 1996; 78: 57-65.
- Rueda AVL, Teixeira AMA, Yonamine M, Camarini R. Environmental enrichment blocks ethanol-induced locomotor sensitization and decreases BDNF levels in the prefrontal cortex in mice. *Addict Biol.* 2012; 17(4):736-45.
- Sampedro-Piquero P, Zancada-Menendez C, Begega A, Rubio S, Arias JL. Effects of environmental enrichment on anxiety responses, spatial memory and cytochrome c oxidase activity in adult rats. *Brain Res Bull.* 2013; 98: 1-9.
- Sarnyai Z, Kovács GL. Role of oxytocin in the neuroadaptation to drugs of abuse. *Psychoneuroendocrinology.* 1994; 19:85-117.
- Schindler AG, Messinger DI, Smith JS, Shankar H, Gustin RM, Schattauer SS, Lemos JC, Chavkin NW, Hagan CE, Neumaier JF, Chavkin C. Stress produces aversion and potentiates cocaine reward by releasing endogenous dynorphins in the ventral striatum to locally stimulate serotonin reuptake. *J Neurosci.* 2012; 32(49): 17582-96.
- Schrijver NCA, Bahr NI, Weiss IC, Würbel H. Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002; 73(1): 209-24.
- Schultz W. Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol.* 1998; 80: 1-27.
- Segovia G, Del Arco A, De Blas M, Garrido P, Mora F. Environmental enrichment increases the in vivo extracellular concentration of dopamine in the nucleus accumbens: a microdialysis study. *J Neural Transm.* 2010; 117(10):1123-30.
- Segovia G, del Arco A, Mora F. Environmental enrichment, prefrontal cortex, stress, and aging of the brain. *J Neural Transm.* 2009; 116:1007-16.
- Selye H. The evolution of the stress concept. *Am Sci.* 1973; 61:692-9.
- Simpson J, Kelly JP. The impact of environmental enrichment in laboratory rats- Behavioural and neurochemical aspects. *Behavioural Brain Res.* 2011; 222:246-64.

Sistema Único de Saúde. III Conferência Nacional de Saúde Mental. Brasília: Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde; 2002. 213p.

Sinha R, Fuse T, Aubin LR, O'Malley SS. Psychological stress, drug-related cues and cocaine craving. *Psychopharmacology*. 2000; 152(2):140-8.

Smith JS, Schindler AG, Martinelli E, Gustin RM, Bruchas MR, Chavkin C. Stress-induced activation of dynorphin/ κ -opioid receptor system in the amygdala potentiates nicotine conditioned place preference. *J Neurosci*. 2012; 32(4): 1488-95.

Smith SM, Vale WW. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci*. 2006; 8:383-95.

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.*, 2008; 105:17145-50.

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

Sripada CS, Phan KL, Labuschagne I, Welsh R, Nathan PJ, Wood AG. Oxytocin enhances resting-state connectivity between amygdala and medial frontal cortex. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013; 16(2): 255-60.

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

Stairs DJ, Klein ED, Bardo MT. Effects of environmental enrichment on extinction and reinstatement of amphetamine self-administration and sucrose-maintained responding. *Behav Pharmacol*. 2006; 17:597-604.

Stairs DJ, Prendergast MA, Bardo MT. Environmental-induced differences in corticosterone and glucocorticoid receptor blockade of amphetamine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl.)*. 2011; 218(1): 293-301.

Starosciak AK, Zakharova E, Stagg M, Matos J, Izenwasser S. Differential alteration of the effects of MDMA (ecstasy) on locomotor activity and cocaine conditioned place preference in male adolescents rats by social and environmental enrichment. *Psychopharmacology (Berl.)*. 2012; 224: 101-8.

Taylor JR, Olausson P, Quinn JJ, Torregrossa MM. Targeting extinction and reconsolidation mechanism to combat the impact of drug cues on addiction. *Neuropharmacology*. 2009; 56 Suppl 1: 186-195.

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

Tynan RJ, Naicker S, Hinwood M, Nalivaiko E, Buller KM, Pow DV, Day TA, Walker FR. Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions. *Brain Behav Immun*. 2010; 24(7): 1058-68.

Uhart M, Wand GS. Stress, alcohol and drug interaction: an update on human research. *Addict Biol*. 2009; 14:43-64.

- Van Dellen A, Blakemore C, Deacon R, York D, Hannan AJ. Delaying onset of Huntington's in mice. *Nature*. 2000; 404:721-2.
- Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat. Rev. Neurosci*. 2000; 1:191-8.
- Van Wass M, Soffié M. Differential environmental modulations on locomotor activity, exploration and spatial behavior in young and old rats. *Physiol Behav*. 1995; 59(2): 265-71.
- Vengeliene V, Siegmund S, Singer MV, Sinclair JD, Li TK, Spanagel R. A comparative study on alcohol-preferring rat lines: effects of deprivation and stress phases on voluntary alcohol intake. *Alcohol Clin Exp Res*. 2003; 27(7): 1048-54.
- Viero C, Shibuya I, Kitamura N, Verkhatsky A, Fujihara H, Katoh A, Ueta Y, Zingg HH, Chvatal A, Sykova E, Dayanithi G. Oxytocin: crossing the bridge between basic science and pharmacotherapy. *CNS Neurosci Ther*. 2010; 16(5): e138-56.
- Viola GG, Botton PH, Moreira JD, Ardais AP, Oses JP, Souza DO. Influence of environmental enrichment on an object recognition task in CF1 mice. *Physiol Behav*. 2010; 99(1):17-21.
- Viviani D, Charlet A, van de Burg E, Robinet C, Hurni N, Abatis M, Magara F, Stoop R. Oxytocin selectively gates fear responses through distinct outputs from the central amygdala. *Science*. 2011; 333(6038): 104-7.
- Volkow ND, Baler RD, Goldstein RZ. Addiction: Pulling at the neural threads of social behaviors. *Neuron*. 2011; 69(4): 599-602.
- Volkow ND, Baler RD. Addiction science: uncovering neurobiological complexity. *Neuropharmacology*. 2014; 76: 235-49.
- Wacker DW, Ludwig M. Vasopressin, oxytocin, and social odor recognition. *Horm Behav*. 2012; 61(3):259-65.
- Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*. 2007; 2(2):322-8.
- Weiss F, Koob G. Drug addiction: functional neurotoxicity of the brain reward systems. *Neurotox Res*. 2000; 3: 145-56.
- Windle RJ, Kershaw YM, Shanks N, Wood SA, Lightman SL, Ingram CD. Oxytocin attenuates stress-induced c-fos mRNA expression in specific forebrain regions associated with modulation of hypothalamo-pituitary-adrenal activity. *J Neurosci*. 2004; 24:2974-82.
- Xu Z, Hou B, Gao Y, He F, Zhang C. Effects of enriched environment on morphine-induced reward in mice. *Exp Neurol*. 2007; 204:714-9.
- Yang J, Li W, Liu X, Li Z, Yang G, Xu L, Li L. Enriched environment treatment counteracts enhanced addictive and depressive-like behavior induced by prenatal chronic stress. *Brain Res*. 2006; 1125:132-7.

Zamora-González EO, Santerre A, Palomera-Avalos V, Morales-Villagrán A. A chronic combinatory stress model that activates the HPA axis and avoids habituation in BALB/C mice. *J Neurosci Methods*. 2013; 213(1): 70-75.

Zanos P, Georgiou P, Wright SR, Hourani SM, Kitchen I, Winsky-Sommerer R, Bailey A. The oxytocin analogue carbetocin prevents emotional impairment and stress-induced reinstatement of opioid-seeking in morphine abstinent mice. *Neuropsychopharmacology*. 2013. doi: 10.1038/npp.2013.285. In Press.

Zhao X, Yun K, Seese RR, Wang Z. Galnol facilitates extinction of morphine-conditioned place preference but also potentiates the consolidation process. *PLoS One*. 2013;8(10):e76395.

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

Zhu SW, Yee BK, Nyffeler M, Winblad B, Feldon J, Mohammed AH. Influence of differential housing on emotional behavior and neurotrophin levels in mice. *Behav Brain Res*. 2006; 169:10-20.

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