UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

GABRIEL DE ARAÚJO COSTA

**Estudo do enriquecimento ambiental na modulação epigenética e no
consumo voluntário de etanol associado ao estresse crônico imprevisível**

São Paulo
2019

RESUMO

COSTA, Gabriel de Araújo. **Estudo do enriquecimento ambiental sobre a modulação epigenética e consumo voluntário de etanol associado ao estresse crônico imprevisível**. 2019. 92 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O enriquecimento ambiental (EA) consiste de uma condição ambiental caracterizada por contato social, novidade e complexidade no ambiente e exercício voluntário. O fortalecimento da conectividade sináptica e neuronal trazido pelo enriquecimento ajuda na explicação de como o EA pode tornar o encéfalo mais resiliente diante da exposição a situações aversivas no futuro, como por exemplo a fatores estressores severos, por meio de aumentos na expressão de BDNF. Diante disso este trabalho avaliou os efeitos do EA sobre a regulação epigenética do *Bdnf*, o comportamento tipo ansioso, a resposta bioquímica e consumo voluntário de etanol em animais C57/BL expostos ao ambiente enriquecido e ao estresse crônico imprevisível (EI). O ambiente enriquecido *per se* foi capaz de alterar a expressão gênica de éxons relacionados a expressão do BDNF. Quando o efeito do EA foi testado frente ao EI, os animais enriquecidos exibiram comportamento do tipo ansioso e maior concentração de corticosterona com relação aos não enriquecidos (NE). Ainda, o EI foi capaz de aumentar as concentrações de corticosterona, independente da habitação. Com relação ao consumo de etanol, animais EA expostos ao EI apresentaram maior consumo de etanol durante o estresse e após períodos de privação, revelando uma relação entre a privação e a busca pela droga e um efeito potencializador do EA sobre o consumo de etanol quando associado ao EI. Os achados deste trabalho abrem uma interpretação diferente do padrão comum na literatura com relação aos efeitos do EA frente ao consumo de drogas somente como um fator protetor. Portanto, o tipo e a intensidade do protocolo de estresse num contexto de consumo de etanol constitui um fator determinante sobre a interação do EA com o comportamento e o consumo da droga.

Palavras-chave: Enriquecimento ambiental (EA). Estresse crônico imprevisível (EI). Etanol.

ABSTRACT

COSTA, Gabriel de Araújo. **Environmental enrichment effects on epigenetic modulation and voluntary ethanol consumption associated to a chronic unpredictable stress model**. 2019.92 f. [Ph.D thesis (Pharmacology)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Environmental enrichment (EE) is an environmental condition characterized by social contact, novelty and complexity in the environment and voluntary exercise. The strengthening of synaptic and neuronal connectivity elicited by EE helps to explain how it can bring brain resilience facing aversive situations exposures in the future, such as severe stressors, through increases in BDNF expression. Thus, this study evaluated EE effects on *Bdnf* epigenetic regulation, anxiety-like behaviour, biochemical response and voluntary ethanol consumption in C57/BL male mice exposed to enriched housing and chronic unpredictable stress (CUS). Enriched environment itself altered BDNF-related exons expression. Tested against CUS enriched animals exhibited anxiety-like behaviour and enhanced corticosterone concentration compared to non-enriched (NE). Moreover, CUS exposure was able to increase corticosterone concentrations regardless of housing. Regarding ethanol consumption, EE mice CUS exposed showed higher ethanol consumption during stress period and after deprivation, revealing a relationship between withdrawal and drug seeking-like behaviour as well as a potentiating effect of EE on ethanol consumption when associated with CUS. These results open a different interpretation from the common pattern in the literature regarding EE effects on drug abuse only as a protective factor. Therefore, the stress protocol type and intensity in a context of ethanol consumption matters and can be determinant on EE and drug consumption.

Keywords: Environmental enrichment (EE). Chronic unpredictable stress (CUS). Ethanol.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e ações do etanol

Os transtornos decorrentes do uso abusivo de etanol possuem etiologia multifatorial e acredita-se que a interação de fatores de predisposição genética com o ambiente resulte em diferentes níveis de risco (Schuckit, 1998). O etanol é amplamente consumido em todo o mundo. Contudo, apesar de ser uma droga que possui um alto potencial de induzir dependência é visto pela população em geral como uma droga pouco nociva, talvez pelo fato de não ser classificado como ilícito, no que diz respeito à venda e consumo recreativos. Neste contexto, o uso nocivo de etanol é considerado um problema de amplitude social, de saúde pública e até econômica, uma vez que atinge o usuário, causando danos a sua saúde e convívio social, bem como às pessoas ao seu redor, no caso de episódios de violência e acidentes provocados por pessoas intoxicadas (WHO,2014).

Em concordância com o relatório de 2014 citado acima, no levantamento mais recente publicado pela Organização Mundial da Saúde, o uso nocivo do álcool foi classificado entre os principais fatores de risco que levam à doença, incapacidade e morte em todo o mundo. Ainda, aproximadamente 13,5% do total de mortes entre adultos de 20 a 39 anos no mundo, foram atribuídas ao uso abusivo do álcool; segundo relatório do *Global status report on alcohol and health* (WHO, 2018).

No Brasil, dados da Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD) de 2005, numa parceria com o Centro Brasileiro de Informações de Drogas (CEBRID), apontam que 12,3% das pessoas entre 12 e 65 anos que participaram deste levantamento consomem álcool e foram considerados dependentes; adicionalmente, cerca de 75% dos pesquisados disseram já ter usado etanol pelo menos uma vez na vida. Dados mais recentes divulgados pelo CEBRID (2010) confirmam o contexto preocupante do cenário de dependência ao etanol, e mostram que esta é uma das drogas psicotrópicas mais prevalente de uso durante a vida, numa pesquisa feita com estudantes do ensino fundamental e médio, em todas as capitais do país. Outro dado a ser considerado no último relatório publicado pela organização mundial da saúde (WHO, 2018) indica que no levantamento feito em 2016 no Brasil cerca de

59% da população adulta referiu abstinência com relação ao consumo de etanol no últimos 12 meses.

O etanol atua em sítios de diferentes receptores no sistema nervoso central (SNC), sendo que facilita a atividade inibitória do GABA (Mihic, Harris, 1997) e antagoniza os receptores NMDA glutamatérgicos (Allgaier, 2002). Estas ações sobre as vias GABAérgicas e glutamatérgicas medeiam os efeitos ansiolíticos, sedativos e de ataxia causados pelo etanol. No que diz respeito aos efeitos como euforia e estímulo psicomotor, estão envolvidos os sistemas neuroquímicos dos opióides endógenos e da dopamina mesocorticolímbica (i.e. sistema de recompensa) (Spanagel, 2009). A ativação do sistema de recompensa, causada pelo aumento das concentrações de dopamina no *nucleus accumbens* (NAc) consiste do principal efeito das drogas de abuso, como o etanol. O uso crônico dessas substâncias causa uma ativação repetida e pode resultar na sensibilização deste sistema (Nestler, 2005), levando a um aumento nas concentrações de dopamina no encéfalo (Koob, Le Moal, 2001).

As interações do álcool com neurotransmissores do sistema de recompensa e do estresse são responsáveis pelos efeitos reforçadores do etanol. Os reforçadores positivos aumentam a probabilidade de reexposições (Gilpin, Koob, 2008), enquanto o reforço negativo é um fator crítico da motivação para o consumo de etanol na dependência. Durante a abstinência, ocorre uma procura compulsiva pela droga de modo a aliviar o estado aversivo (Koob, 2003). Essa busca pode ser iniciada por pistas ambientais relacionadas a essa droga ou até mesmo por situações de estresse. Neste sentido, experimentos com animais mostram resultados contraditórios, nos quais o estresse aumenta, diminui, ou não altera a ingestão de álcool (Becker et al., 2011). Todavia, em estudos epidemiológicos viu-se que indivíduos com maiores níveis de estresse apresentaram consumo de etanol igualmente maior (Keyes et al., 2012).

Os reforços positivos costumam ser estudados com a utilização de modelos animais de autoadministração de drogas, nos quais uma das abordagens é o consumo por livre escolha para água e etanol, que permite determinar a ingestão e a preferência pelo álcool. Já o reforço negativo do álcool é estudado durante os períodos de abstinência impostos após exposição crônica ao etanol (Sanchis-Segura, Spanagel, 2006). Modelos de autoadministração associados a períodos de

privação tentam mimetizar aspectos diferentes da adição, como o desejo persistente pelo álcool e a recaída (Spanagel, 2000), que é o retorno do uso do álcool aos mesmos níveis, ou até a níveis superiores consumidos antes da abstinência. Um aumento acentuado no consumo de etanol após um período de abstinência forçado é o que chamamos de “Efeito de privação do álcool” (*Alcohol Deprivation Effect - ADE*), e reflete a transição do uso controlado para o compulsivo.

Sabe-se que o consumo de etanol e o estresse estão relacionados. Além do consumo de etanol ser comum como uma prática para lidar melhor com o estresse (i.e. mecanismo de fuga social) o próprio estresse também induz ao consumo de etanol bem como a episódios de recaída, e esta relação se deve a fatores genéticos, moleculares e celulares (Sillaber et al., 2002).

1.2 Relação entre estresse e etanol

As respostas do organismo ao estresse incluem principalmente alterações psicológicas relacionadas ao comportamento, e estão ligadas a fatores genéticos e ambientais (Charney, 2004; Charney, Manji, 2004; Krishnan et al., 2007; Feder et al., 2009). A regulação endócrina da resposta do organismo ao estresse se dá basicamente pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), primariamente pela liberação hipotalâmica do fator liberador de corticotrofina (CRF) que estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH); este por sua vez atua nas adrenais promovendo a liberação de corticosterona em roedores. Pode-se dizer que de forma geral o CRF tem seu sinal transmitido com a ativação de receptores específicos como os CRF1. A desregulação do sistema CRF/CRF1 é causada por uma variedade de problemas psiquiátricos relacionados ao estresse, uma vez que este neuropeptídeo exerce papel fundamental nas redes neurais que interagem entre o estresse e o início, manutenção e recaída no uso de substâncias (Sarnyai, Shaham, Heinrichs, 2001).

Diferentes estudos comumente atribuem as principais respostas do organismo ao estresse ao CRF hipotalâmico, ativando o eixo HPA e elicitando a resposta primária de um organismo frente a uma situação de perturbação da sua

homeostase. Entretanto, há trabalhos que destacam a importância do CRF extrahipotalâmico, como um modulador de liberação de monoaminas, apontando a sinalização extrahipotalâmica de CRF como um fator base na modulação da motivação pela busca e uso de substâncias (Wise, 2004; Koob, Volkow, 2009; Holly, Miczek, 2016).

De acordo com a literatura, a desregulação do eixo HPA é capaz de alterar sistemas extra-hipotalâmicos após consumo crônico e retirada, que influenciam de maneira significativa a motivação para autoadministração de etanol (Koob, Le Moal, 2001). O fato da via dopaminérgica do sistema de recompensa também ser sensível ao estresse pode facilitar a atividade nos circuitos motivacionais (Piazza, Le Moal, 1998).

Em geral, os estudos no sistema CRF sugerem que o desenvolvimento de dependência ao etanol, em particular após repetidos ciclos de exposição ao etanol e retirada, está associado com o aumento da ansiedade e aumento da sensibilidade ao estresse nos animais. Estas alterações parecem ser resultado, pelo menos em parte, do aumento da liberação de CRF. As mudanças nesse sistema, em teoria, são responsáveis pela mudança na motivação para o consumo de álcool (Gilpin, Koob, 2008).

Um dos modelos de estresse ao qual animais de experimentação são submetidos é o estresse crônico imprevisível (EI) ou variável, que corresponde a uma sequência de eventos estressores, geralmente em dois momentos distintos do dia, em horários variados, numa ordem aleatória, por cerca de 10 dias consecutivos, podendo este período sofrer alteração de acordo com o protocolo. Estes eventos costumam incluir séries de nado forçado, luz acesa durante o período escuro, luzes apagadas durante o período claro, exposição ao frio, privação de água e comida, imobilização, maravalha molhada, entre outros (Ortiz et al., 1996; Liu et al., 2014). Um aspecto chave do estresse crônico imprevisível é o fato dele ser capaz de ativar o eixo HPA de forma contínua, provocando um estado de hiperatividade do eixo (Franco et al., 2016).

Tanto os efeitos aversivos de um estresse social de caráter imprevisível como o efeito recompensador das drogas de abuso, como o etanol, são capazes de ativar os sistemas dopaminérgicos mesocorticolímbicos. Neuroadaptações neste sistema podem ser responsáveis pela relação entre as respostas elicitadas pelo estresse e

o uso abusivo de substâncias, mostrando uma interação entre estes fatores. Sendo assim, os efeitos neuroplásticos advindos de um estresse social crônico podem gerar um comportamento de aumento de busca e consumo de drogas. Neuroadaptações no sistema de modulação de monoaminas por CRF na área tegmental ventral (VTA) são apontadas como mecanismos subjacentes importantes no aumento do consumo de drogas em situações de estresse (Newman et al., 2018).

De fato, em nosso laboratório já foi demonstrado que o estresse crônico imprevisível foi capaz de potencializar a sensibilização comportamental ao etanol, fenômeno chamado de sensibilização cruzada (Santos-Rocha et al., 2018). Também já foi relatado que um protocolo de 14 dias de estresse variável aplicado durante a adolescência resultou em aumento do consumo de etanol em camundongos adultos (Lopez et al., 2011). Além disso, um estudo recente com exposição ao estresse de derrota social, que assim como o EI mantém o eixo HPA num estado contínuo de ativação, mostrou que camundongos machos socialmente derrotados exibiram um comportamento do tipo ansioso e maior vulnerabilidade aos efeitos reforçadores do etanol (Macedo et al., 2018).

Neste contexto, outro trabalho com animais geneticamente manipulados (“*knockout*” ou KO) que não expressam o receptor CRF1 mostrou que eles são mais vulneráveis ao consumo de etanol em condições basais ou quando expostos a eventos estressores. Nesta ocasião, a exposição ao estresse de derrota social foi responsável por um aumento progressivo e reforçado no consumo voluntário de etanol por estes animais, aplicado pelo modelo de livre escolha entre água e etanol. Mais detalhadamente, não houve diferença no consumo de etanol no experimento realizado durante a exposição ao estresse (3 dias consecutivos) quando comparado com o consumo basal nos animais selvagens e KO. Contudo, no consumo realizado três semanas após o estresse houve um aumento de consumo nos animais KO com relação ao seu consumo basal, sugerindo que há um efeito tardio do estresse que pode interagir com a busca e o consumo de etanol. Nessa fase pós-estresse, os animais KO consumiram quantidades muito maiores de etanol do que os selvagens. Houve resultado semelhante com o estresse de nado forçado, que apesar de ser um estresse físico também apresenta componente emocional (Sillaber et al., 2002).

Diante do que foi exposto, pode-se dizer que estímulos estressores eliciam no organismo respostas que parecem se relacionar a diversos fatores, incluindo o tipo de estresse, e afetando a busca por substâncias como o etanol. Além disso estes fatores também podem ter relação ao ambiente (Fernandez-Teruel et al., 2002). Com efeito, já foi demonstrado que as respostas comportamentais e endócrinas causadas pelo estresse e mediadas pelo eixo HPA parecem ser minimizadas pela exposição a um ambiente enriquecido (Fernandez-Teruel et al., 2002; Marianno, 2015).

1.3 Enriquecimento ambiental

O paradigma experimental de enriquecimento ambiental (EA) foi primariamente descrito na literatura por Donald Hebb (1947), em um estudo que comparou ratos que foram permitidos a andar livremente na sua casa, com outros que foram deixados em gaiolas de laboratório. Guardadas as limitações desta experiência, em relação aos controles das diversas variáveis, ela incluiu características primordiais do enriquecimento, uma vez que expôs os animais a uma condição com maior novidade e complexidade em relação às condições padrão da gaiola de laboratório. Desta maneira, o termo “enriquecimento” por vezes é permutado com outros como “complexidade” ou “novidade” quando se trata da descrição de condições de habitação (Nithianantharajah; Hannan, 2006). Com efeito, a novidade, o contato social e o exercício físico são citados como os três fatores principais do enriquecimento e todos possuem efeitos recompensadores, uma vez que estimulam a liberação de dopamina no *nucleus accumbens* (Louilot et al., 1986).

As chamadas condições de habitação padrão comumente consistem em gaiolas de polycarbonato com tampas de metal zincado, chão forrado com raspas de madeira, livre acesso a água e comida e geralmente os animais encontram-se alojados em grupos do mesmo sexo e da mesma ninhada. A variação nestes aspectos é de suma importância no estudo de enriquecimento, uma vez que diferenças no ambiente, sexo, linhagem e principalmente na acomodação em grupo ou individual influenciam nos efeitos do enriquecimento sobre os animais (Fox et al., 2006; Simpson, Kelly, 2011).

A condição de habitação enriquecida refere-se a gaiolas dotadas de brinquedos, rodas de exercício e convívio em grupo. Os roedores são animais sociais e em condições naturais permanecem mais em grupos do que aos pares ou isolados (McQuaid et al., 2013). Ainda, pode-se considerar que animais alojados em grupo são constantemente estimulados ou estressados, e dessa forma apresentam respostas menos intensas a estímulos estressores subsequentes em comparação com animais isolados, nos quais esta estimulação diária não está presente (Crofton et al., 2015).

A inclusão de modificações que permitem o exercício voluntário, brincadeiras e intensa exploração do ambiente, visam melhorar as funções sensoriais, cognitivas e motoras dos animais (Nithianantharajah, Hannan, 2006; Simpson, Kelly, 2011). Além dos estímulos somatossensoriais e visuais, que ativam regiões específicas no encéfalo, há também os estímulos cognitivos que envolvem a codificação de informações relacionadas ao espaço, reconhecimento de objetos e de novidade e regulação da atenção, que provavelmente ativam o hipocampo e outras áreas corticais. Já a atividade motora é representada por movimentos naturais exploratórios, incluindo o exercício físico voluntário, que estimulam áreas como o córtex motor e o cerebelo. As gaiolas enriquecidas costumam ser maiores que as gaiolas padrão, para que seja possível a contextualização de um ambiente mais complexo e variado, além do próprio aumento de espaço ser, por si só, um fator de enriquecimento (Nithianantharajah, Hannan, 2006).

Um bom funcionamento do modelo de enriquecimento exige uma complexidade ambiental dinâmica, ou seja, a reorganização dos objetos e da ração, o que favorece a aprendizagem e a formação de novos mapas espaciais (Nithianantharajah, Hannan, 2006; van Praag et al., 2000), bem como a substituição desses objetos para estimular o comportamento exploratório, curiosidade e atenção (Sale et al., 2014). Outro parâmetro que tem ampla influência é a duração da exposição dos animais a este tipo de ambiente. Neste sentido, em estudos anteriormente realizados em nosso laboratório a permanência neste modelo de habitação por 21 dias foi o suficiente para causar alterações comportamentais significativas nos animais, em relação, por exemplo, a comportamentos exploratórios (Rae, 2014), e na sensibilização comportamental induzida por etanol (Rueda et al., 2012).

Estudos comportamentais, celulares e moleculares revelaram efeitos significativos do EA na promoção de mudanças morfológicas, moleculares e neuroquímicas em diferentes áreas cerebrais em roedores (Sale et al., 2009). A literatura mostra que o enriquecimento aumenta as ramificações e o comprimento, bem como o número de espinhas dendríticas e os eventos sinápticos em algumas populações de neurônios (Greenough, Volkmar, 1973; Greenough et al., 1973; Connor et al., 1982; Leggio et al., 2005). Também aumenta a neurogênese hipocampal e a integração destas novas células aos circuitos funcionais já existentes (van Praag et al., 2000; Kempermann et al., 1997). Sugere-se que este aumento da neurogênese possa ser mediado por mecanismos que se relacionam com o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (During, Cao, 2006) e com o recrutamento de células T e ativação de células da microglia (Ziv et al., 2006). Ainda, é sabido que o EA pode aumentar os níveis de fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), que desempenha papel integral na sinalização neuronal (Pham et al., 1999; Ickes et al., 2000) e induzir alterações na expressão de subunidades dos receptores de NMDA (N-metil-D-aspartato) e AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxapropionico), os quais possuem papel crucial na sinalização glutamatérgica (Tang et al., 2001; Naka et al., 2005).

O fortalecimento da conectividade sináptica e neuronal trazido pelo enriquecimento confere um mecanismo que capacita o encéfalo a utilizar com melhor propriedade redes neuronais já existentes, bem como a convocar novas redes quando necessário (Nithianantharajah, Hannan, 2006). Tal mecanismo é extremamente relevante para a teoria da chamada reserva cognitiva (Stern, 2002), sendo útil no esclarecimento de como o enriquecimento pode tornar o encéfalo mais resiliente no caso de distúrbios cerebrais como danos e degeneração. Tais danos podem ser causados, por exemplo, pela exposição a eventos de estresse.

Neste contexto, tem-se que, além de alterações neurobiológicas e comportamentais também ocorrem modificações em vários marcadores imunológicos, como em células gliais, em roedores tratados com diferentes modelos de enriquecimento. O exercício físico, um dos estímulos do EA, ativa efeitos anti-inflamatórios e modulatórios, por exemplo pela diminuição da expressão de receptores TLRs em monócitos e macrófagos. Além disso, tem-se que a produção e expressão de fatores anti-inflamatórios pós-exercício aumenta tanto na circulação

sistêmica como no cérebro. Isso posteriormente reduz o nível de outros fatores pró-inflamatórios (Singhal et al., 2014). Cabe dizer, portanto, que o EA promove efeitos anti-inflamatórios sobre a resposta imunológica, sendo este mais um fator que denota a importância do estudo deste modelo.

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

Um estudo com exposição ao EA previamente ao estresse de derrota social, que é semelhante ao estresse crônico imprevisível no que tange a ativação contínua do eixo HPA (Covington, Miczek, 2005) mostrou que o EA confere resiliência ao desenvolvimento de efeitos deletérios (e.g. comportamentos depressivos e de evitação social) e que este efeito é conferido pela região infralímbica do córtex pré-frontal (Lehmann, Herkenham, 2011).

Em estudos com EA geralmente os animais são expostos a ele antes da exposição a drogas (no caso de investigação de adição) ou estresse (no caso de pesquisa de depressão), a fim de verificar um efeito protetor, uma vez que o EA parece atenuar os efeitos reforçadores de drogas (Brenes et al., 2008; Brenes Saenz et al., 2006). Uma das explicações desta hipótese sugere que este ambiente é visto como um estresse crônico leve, causado por viver num ambiente complexo, interagir socialmente e ser exposto a uma variedade de estímulos (Crofton et al., 2015). Dessa forma, a presença da novidade e exploração constantes são comparados com exposições leves repetidas a fatores estressantes (Larsson et al., 2002) e acredita-se que isso ajude o animal a lidar melhor com situações aversivas mais severas (Lehmann, Herkenham, 2011).

No contexto de comportamento há estudos em que o EA parece provocar efeitos opostos aos do estresse, por exemplo diminuindo o comportamento do tipo ansioso. No trabalho de McQuaid et al. (2013) animais enriquecidos se mostraram menos ansiosos no teste de labirinto em cruz elevado, tendo menor número de entradas e permanecendo um menor tempo nos braços abertos. Outro estudo mostrou que o enriquecimento reverteu os efeitos ansiogênicos causados pelo estresse de separação materna (Francis et al., 2002) causando uma redução nos

níveis de corticosterona plasmática e um aumento nos comportamentos exploratórios e de alimentação. Recentemente, foi descrito também que o enriquecimento aumenta a sociabilidade; mais especificamente, quando observados num teste de interação social os animais enriquecidos passaram mais tempo interagindo com um animal desconhecido em comparação com os controles (Rae et al., 2018).

No contexto da dependência, um estudo com cocaína mostrou que ratos expostos ao enriquecimento durante os períodos de privação da droga reduziram o restabelecimento da autoadministração induzido por um estressor farmacológico (Chauvet et al., 2009). Isto sugere um efeito do ambiente enriquecido em facilitar a abstinência após um evento estressante. Resultado semelhante foi encontrado em um estudo conduzido em nosso laboratório, no qual a exposição ao EA durante os períodos de privação causou diminuição no consumo voluntário de etanol após estresse de contenção (Marianno et al., 2017).

Embora os mecanismos pelos quais o EA atua na dependência não estejam completamente esclarecidos, acredita-se que ele é capaz de alterar comportamentos como a procura por novidades, a impulsividade e o comportamento tipo ansioso, fatores que facilitam o início e continuação do consumo das drogas (Stairs, Bardo, 2009). Estudos sugerem que o EA reduz os efeitos reforçadores de drogas psicoativas, como cocaína (Solinas et al., 2008), anfetamina (Bardo et al., 2001), nicotina (Green et al., 2003).

Deehan et al. (2011) demonstraram que a exposição de ratos a um ambiente enriquecido, imediatamente após o desmame, reduziu o consumo, a preferência e a motivação para a obtenção de etanol em um modelo de autoadministração operante. Entretanto, Rockman et al. (1989) encontraram um aumento no consumo voluntário de etanol em ratos criados no EA. Vale citar que a maneira como ocorre essa exposição pode desencadear ou não os efeitos protetores sobre o consumo de drogas, uma vez que os protocolos de enriquecimento variam muito entre os pesquisadores. As diferenças vão desde aspectos menores como os tipos e quantidade de objetos utilizados até aspectos chaves como idade dos animais e tempo de exposição, tipos de controles (individuais ou em grupos) e linhagens diferentes (Simpson, Kelly, 2011).

Em nosso laboratório, demonstramos um efeito protetor do enriquecimento sobre o desenvolvimento da sensibilização comportamental por etanol (Rueda et al., 2012), que é caracterizada pelo aumento da atividade locomotora após a administração repetida da droga e usada como uma ferramenta que permite estudar a neuromodulação decorrente da sua administração (Steketee, Kalivas, 2011). Além disso, o EA também foi associado com diminuição do BDNF no córtex pré-frontal. Num protocolo de sensibilização ao etanol, animais enriquecidos que receberam repetidas administrações de etanol exibiram menores níveis de BDNF comparados com os não enriquecidos (Rueda et al., 2012).

1.4 Enriquecimento ambiental e epigenética

Vários estímulos ambientais levam ao controle epigenético a longo prazo da expressão do *Bdnf*. As variações nos níveis de BDNF que ocorrem entre os indivíduos em decorrência de uma doença ou resposta a um estímulo ou a um tratamento farmacológico podem ser resultantes não somente do polimorfismo genético, mas também de uma programação epigenética alterada. Modificações epigenéticas podem ser definidas como “memórias” moleculares e celulares que produzem mudanças no padrão de expressão gênica sem que haja alterações na sequência primária de DNA. Sabe-se atualmente que estímulos ambientais induzem alterações diversas na estrutura da cromatina, dentre as quais podemos destacar os mecanismos de metilação de DNA e de acetilação, metilação e fosforilação de histonas (Jiang et al, 2008). Estes mecanismos são adições covalentes que regulam o acesso da maquinaria transcricional ao DNA, e dependendo do sítio acceptor e do radical adicionado, pode haver ativação ou inibição da atividade transcricional. Por exemplo, a acetilação de histonas neutraliza a carga positiva dos aminoácidos positivamente carregados que formam as histonas, e desta forma, diminui a atração eletrostática entre a carga negativa proveniente dos grupos fosfato do DNA e a carga positiva dos grupos amino dos resíduos de lisina localizados nas caudas das histonas. Assim, a configuração estrutural da cromatina torna-se mais relaxada, facilitando o acesso da maquinaria de transcrição ao DNA. Já o processo de metilação do DNA, no qual um grupo metil é transferido para as citosinas em regiões

genômicas ou ao redor de promotores de genes ricos em nucleotídeos citosina-guanina, está associado à repressão transcricional, sendo considerado um mecanismo epigenético fundamental para o silenciamento de genes (Bird, 2002).

A histona acetiltransferase (HATs) com seu cofator (acetil-coenzima A) catalisa a acetilação da lisina que neutraliza as cargas das interações DNA-histona. Por outro lado, as histonas deacetilases (HDACs) medeiam a remoção da acetilação, resultando na formação do DNA mais acessível a fatores de transcrição (Kouzarides, 2007).

As substâncias passíveis de uso abusivo podem afetar a atividade neuronal por meio de mecanismos epigenéticos. Por exemplo, no trabalho de Kumar et al (2005) foi mostrado acetilação de histonas em resposta à administração aguda ou crônica de cocaína. A administração aguda de cocaína aumentou a acetilação de histona H4 nos promotores de cFos e FosB, enquanto a cocaína crônica induziu uma acetilação sustentada de histona H3 nos promotores de *Bdnf* e *Cdk5* no estriado de ratos.

De forma geral, fatores capazes de alterar a atividade neuronal podem induzir mudanças na metilação do DNA em regiões do gene *Bdnf* e consequentemente em sua expressão gênica. Por exemplo, experiências traumáticas, como estresse psicossocial contínuo, induzem hipermetilação na região IV do *Bdnf* e reduz a expressão do *Bdnf* na área CA1 dorsal do hipocampo em ratos (Roth et al., 2011). Também foi visto que modificações na expressão gênica observadas após experiências positivas ou negativas podem envolver vias epigenéticas e alterar a forma com que os indivíduos lidam com estímulos estressores. Por exemplo, o comportamento agressivo maternal na prole, durante os dias pós-natal 1-7 tem sido associado com aumento de metilação do DNA da região promotora do gene *Bdnf* (Roth et al., 2009).

Em um trabalho recente do nosso grupo em colaboração com o Dr. Alexis Bailey e Dra. Pritilatta Chivers (*University of Surrey*, Reino Unido) mostrou que o EA por 21 dias aumentou a expressão do RNAm de *Bdnf* de uma forma geral e alterou o perfil de metilação do *Bdnf* no córtex pré-frontal (dados não publicados). Além do BDNF o ambiente enriquecido mostrou interação com outros genes como o da ocitocina, alterando levemente a metilação do gene no córtex pré-frontal (Rae et al., 2018).

Sabe-se que o estresse, agudo e crônico, pode promover alterações na expressão de BDNF levando a sua diminuição (Nibuya et al., 1995; Smith et al., 1995; Schaaf et al., 1998; Pizarro et al., 2004). De fato, foi descrito que modalidades de estresse crônico, como o de derrota social, podem alterar a expressão gênica de BDNF no hipocampo por meio de modificações relacionadas com a remodelação da cromatina no gene do *Bdnf* alterações na metilação de histonas (Tsankova et al., 2006).

Todavia, os mecanismos regulatórios que medeiam estas alterações na expressão do BDNF ainda não são completamente claros na literatura, uma vez que a estrutura do gene do *Bdnf* em roedores é bastante complexa. Em outras palavras, este gene contém cinco éxons curtos não codificantes e cada um deles pode ser alternadamente combinado um éxon codificante vindo a formar diversos transcritos de RNAm, todos resultando numa proteína idêntica de BDNF (Timmusk et al., 1993; Tsankova et al., 2007).

Por fim, uma vez que o BDNF integra diversas vias de sinalização cerebral, sugere-se que sua deficiência nos circuitos neuronais pode estar associada ao desenvolvimento de várias doenças psiquiátricas, incluindo o alcoolismo (Tsankova et al., 2007; Kyzar, Pandey 2015; Pandey, 2016).

Diante do exposto, pode-se inferir que uma desregulação na metilação do DNA, especificamente alterações na regulação da transcrição do *Bdnf*, podem ter relação direta com o desenvolvimento de alterações comportamentais. Diante disso, se mostra válido investigar o status de metilação do gene *Bdnf* no contexto deste estudo.

1.5. Etanol, enriquecimento ambiental e estresse

Retomando brevemente tudo o que foi discutido até aqui, tem-se que a dependência ao etanol é um problema sério de ampla abrangência no cenário mundial e as consequências são sérias e variadas, como problemas graves de saúde e distúrbios psicológicos e de convívio social (WHO, 2018). No Brasil o contexto também é preocupante, uma vez que o etanol é uma das drogas

psicotrópicas com maior prevalência de uso durante a vida, e este uso geralmente começa na infância e adolescência. (CEBRID, 2010).

Por outro lado, existem na literatura uma série de resultados que demonstram efeitos benéficos do modelo de EA em vários aspectos, como no desenvolvimento de resiliência a eventos estressores futuros, ganhos sobre a fisiologia cerebral (Lehmann, Herkenham, 2011; Sale et al., 2009; Crofton et al., 2015) e, principalmente, diminuição de efeitos reforçadores para o consumo de drogas (Stairs, Bardo, 2009; Solinas et al., 2010), inclusive de etanol (Deehan et al., 2011).

O resultado de um trabalho no qual a exposição ao EA durante o período de abstinência atenuou comportamentos de sensibilização e preferência condicionada por lugar da cocaína em camundongos, sugere que estímulos ambientais podem ser importantes no tratamento a longo prazo da dependência (Solinas et al., 2008b). Levando em conta que o EA pode reduzir os efeitos reforçadores de drogas, ao contrário, intervenções ambientais que expõem animais a situações de estresse parecem aumentar os efeitos de reforço das drogas e desempenhar um papel importante na determinação da vulnerabilidade para desenvolvimento da dependência (Goeders, 2002). Como exemplo, um estudo demonstrou que a exposição a choques elétricos nas patas, apenas antes dos testes, restabeleceu o comportamento de busca pelo álcool, que estava extinto (Lê et al., 1998).

Diante dos possíveis efeitos protetores do EA ao desenvolvimento de comportamentos do tipo ansioso decorrente de estresse e de comportamentos relacionados à dependência, vale avaliar se a exposição a esta estratégia ambiental, previamente e durante a exposição ao estresse crônico imprevisível será capaz de interferir com um consumo de etanol já estabelecido e como será manifestada esta interferência.

Ainda, é razoável sugerir que o EA pode ser visto como uma ferramenta muito útil no contexto de possíveis tratamentos para uso abusivo de etanol. Conclusivamente, estratégias ambientais podem ser aliadas importantes no controle e cessação do uso abusivo de drogas, como modelo alternativo ou como suporte ao tratamento farmacológico. O enriquecimento ambiental, enquanto uma terapia não medicamentosa, parece ser útil para atuar como coadjuvante do tratamento de numerosas doenças relacionadas com o estresse, inclusive a adição.

Por conseguinte, investigações acerca da interação entre os fatores ambientais e a dependência se mostram extremamente relevantes.

16 CONCLUSÃO

O enriquecimento ambiental foi capaz de aumentar a expressão gênica do *Bdnf*, associado a diminuição da metilação do exon 4, no córtex pré-frontal, o que pode caracterizá-lo como uma ferramenta promissora para mediar respostas ao uso abusivo de drogas.

Entretanto, o animal enriquecido é mais susceptível a estresses crônicos imprevisíveis, o que pode sugerir que o enriquecimento não é capaz de induzir um comportamento protetor frente a estresses severos prolongados, uma vez que o enriquecimento ambiental, em combinação com a exposição a um estresse crônico imprevisível, elicitou um fenótipo de caráter ansioso nos animais.

Já quando o enriquecimento foi analisado no contexto de animais que consumiram etanol e foram expostos ao estresse, concomitantemente, foi visto que os animais enriquecidos exibiram um aumento na busca pela droga e consumiram maiores quantidades de etanol em comparação com os não enriquecidos. Ainda, investigando a influência de períodos de privação ao etanol, seguidos de reexposições à droga, novamente vimos que os animais enriquecidos apresentaram um aumento no consumo de etanol nas reexposições com relação ao grupo não enriquecido.

De certa forma, os achados deste estudo abrem possibilidades para a interpretação da estratégia de EA como um procedimento que pode desencadear respostas muito variadas tanto sobre o comportamento do tipo ansioso como sobre comportamentos de busca e consumo de drogas, enfrentando a hipótese clássica muito difundida pela literatura de que o EA atua somente como fator protetor frente a estes estímulos. De forma destacada, vale comentar que o tipo e a intensidade do estresse, dentro de um contexto de consumo crônico de etanol, se apresenta como um fator determinante sobre a interação do EA com o comportamento.