

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

GABRIEL DE ARAÚJO COSTA

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

Versão Original

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia
Orientadora: Profa. Dra. Rosana Camarini

São Paulo
2019

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Araújo Costa, Gabriel
Estudo do enriquecimento ambiental na modulação
epigenética e no consumo voluntário de etanol
associado ao estresse crônico imprevisível / Gabriel
de Araújo Costa; orientadora Rosana Camarini. --
São Paulo, 2019.
98 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Etanol. 2. Drogas de abuso. 3. Epigenética.
4. Enriquecimento ambiental. 5. Estresse. I.
Camarini, Rosana, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Gabriel de Araújo Costa

Título da Tese: Estudo do enriquecimento ambiental na modulação epigenética e no consumo voluntário de etanol associado ao estresse crônico imprevisível

Orientador: Profa. Dra. Rosana Camarini

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente:

Assinatura:

Nome:

Instituição:

À minha família, em especial à minha avó Lourdes; aos meus pais Maria e Sérgio; aos meus queridos padrinhos Edílson, Fátima, Jorge. Obrigado pela motivação e apoio incondicional, desde os primórdios da minha formação. A força do amor que nos une sempre me amparou na trajetória deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus por me permitir ocupar esta posição e me capacitar diariamente para superar meus limites, pelo cuidado e favor sobre a minha vida, em todos os momentos.

Aos animais de experimentação, que doam suas vidas em benefício da ciência. Com ética e respeito, simplesmente agradeço.

Ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia desta universidade, representado pela Profa. Dra. Carolina Demarchi Munhoz, por me oferecer apoio e condições físicas e materiais para a realização deste projeto.

À Profa. Dra. Rosana Camarini pela orientação e apoio para a realização deste trabalho, que desde o início me acolheu com humildade, respeito e confiança no laboratório. Ao longo dos anos a relação orientador-aluno transpôs as barreiras ditadas pelas regras e se transformou em amizade, risadas e boas conversas. Obrigado pela posição de humildade e pela proximidade com o aluno, isso faz muita diferença. Todas as experiências vividas neste percurso farão parte de mim para sempre. Obrigado.

À toda a equipe do laboratório de Neuroendocrinofarmacologia e Imunomodulação, por terem me acolhido com carinho e pelo apoio técnico, estrutura e respaldo na realização de experimentos em colaboração.

Ao Prof. Dr. Alexis Bailey da *St Georges University of London* Dra. Pritilata Chivers da *University of Surrey*, obrigado pela oportunidade de ter uma experiência acadêmica enriquecedora pessoal e profissionalmente fora do país, pela orientação e acolhimento em seus laboratórios.

Aos colegas de laboratório, que sempre foram companheiros e apoiadores nos melhores e nos piores momentos. Alguns me acolheram desde o início com muito respeito, carinho e troca de conhecimento: André, Cris, Pri Carrara, Mariana, Pri Marianno, Marcos, Lucas. Outros foram se juntando ao time ao longo do caminho: Marina, Nívea, Bruno, Olívia, Ariádne, Veridiana. Um carinho especial pela proximidade, parceria e lealdade: Pri, que me acompanha como parceira de laboratório há 10 anos, Marina e Nívea que se tornaram muito próximas e compartilharam longos finais de semana comigo na bancada.

À técnica Sônia, pelo suporte no trabalho e principalmente pelo amor e amizade. Obrigado por ser sempre solícita e me ajudar com carinho em tantos experimentos.

Ao técnico Manoel, que durante os primeiros anos cuidou com empenho e atenção dos animais do biotério.

Ao time da secretaria de Pós-Graduação: Mônica, Míriam, Camila, Rosa. O suporte administrativo e a solicitude em todos os momentos foram essenciais para o cumprimento de todas as etapas burocráticas deste trabalho.

À minha família e amigos próximos, que me doaram infinita compreensão e amor.

Aos órgãos de fomento pelo apoio financeiro: CAPES, FAPESP, CNPq.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e do CNPq – Processo 140052/2017-8.

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 cérebro 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 to 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.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo de caixa de enriquecimento ambiental e de caixa padrão utilizados	32
Figura 2: Desenho experimental - experimento 1	46
Figura 3: Desenho experimental - experimento 2	46
Figura 4: Desenho experimental - experimento 3 A	48
Figura 5: Desenho experimental - experimento 3 B	49
Figura 6: Parâmetros para o comportamento do tipo ansioso analisados no Labirinto em Cruz Elevado em animais expostos ao enriquecimento	50
Figura 7: Comparação da concentração corticosterona em animais expostos ao enriquecimento ambiental por 21 e 32 dias	51
Figura 8: Expressão gênica em diferentes éxons da região promotora do gene do <i>Bdnf</i>	52
Figura 9: Análise da metilação nas diferentes regiões CpG no éxon 4 do gene do <i>Bdnf</i>	53
Figura 10: Expressão proteica de BDNF no córtex pré-frontal	53
Figura 11: Expressão proteica de GR e pGR em animais expostos ou não ao enriquecimento na amígdala	55
Figura 12: Parâmetros para o comportamento do tipo ansioso analisados no Labirinto em Cruz Elevado em animais expostos ao enriquecimento e ao estresse imprevisível	57
Figura 13: Concentrações de corticosterona antes e depois do estresse nos grupos enriquecido e não enriquecido expostos ao estresse imprevisível	58
Figura 14: Expressão proteica de GR e pGR em animais expostos ou não ao enriquecimento ambiental e ao estresse crônico imprevisível	59
Figura 15: Consumo de etanol na fase de aquisição	60
Figura 16: Consumo de etanol e água – experimento 3A	62
Figura 17: Reexposições após período de privação – experimento 3A	64
Figura 18: Parâmetros para o comportamento do tipo ansioso analisados no Labirinto em Cruz Elevado em animais expostos ao enriquecimento, estresse e etanol	65

Figura 19: Concentrações de corticosterona antes e depois do estresse dos grupos enriquecido e não enriquecido expostos ao estresse imprevisível e ao consumo de etanol	66
Figura 20: Expressão proteica de GR e pGR em animais expostos ou não ao enriquecimento ambiental, estresse crônico imprevisível e consumo de etanol ..	67
Figura 21: Consumo de etanol na fase de aquisição – experimento 3B ...	68
Figura 22: Consumo de etanol e água – experimento 3B	69
Figura 23: Reexposições após períodos de privação – experimento 3B ..	71
Figura 24: Parâmetros para o comportamento do tipo ansioso analisados no Labirinto em Cruz Elevado em animais expostos ao enriquecimento, estresse e etanol	72
Figura 25: Influência do enriquecimento ambiental sobre a atividade locomotora em campo aberto.....	73
Figura 26: Influência do enriquecimento ambiental sobre o comportamento do tipo ansioso em caixa claro escuro	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Protocolo de estresse crônico imprevisível	35
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância
BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo
CA – Campo aberto
CCE – Caixa claro escuro
CPF – Córtex pré-frontal
DID – Drinking in the Dark
DNA - ácido desoxirribonucleico
EA – Enriquecimento ambiental
ET – Etanol
EI – Estresse Imprevisível
GR – Receptor de glicocorticóide
pGR – Receptor de glicocorticoide fosforilado
h – hora
KO – *knockout*, em referência a animais geneticamente modificados
LC – Lado claro
LE – Lado escuro
LCE – Labirinto em cruz elevado
ml – mililitro
NE – Não enriquecido
PCR – Reação de polimerase em cadeia
RNA – ácido ribonucleico
ST – Estresse
TLC – Tempo no lado claro
TLE – Tempo no lado escuro
WHO – Organização mundial da saúde
EI – Estresse Imprevisível
 μ – micrograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Epidemiologia e ações do etanol	17
1.2 Relação entre estresse e etanol	19
1.3 Enriquecimento ambiental	22
1.4 Enriquecimento ambiental e epigenética	27
1.5. Etanol, enriquecimento ambiental e estresse	29
2 OBJETIVO	31
2.1 Objetivo Geral.....	31
2.2 Objetivos Específicos.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Animais	31
3.2 Condições ambientais.....	32
3.3 Drogas	33
3.3.1 Solução de etanol a 20%	33
3.3.2 Protocolo do Consumo de Etanol	33
3.3.3 Cálculos do consumo de etanol e da preferência por etanol	34
4 Estresse Crônico Imprevisível (EI).....	34
5 Labirinto em cruz elevado.....	35
6 Campo aberto	36
7 Caixa claro escuro	37
8 Coleta de sangue para dosagem corticosterona	38
9 Coleta dos encéfalos dos animais	38
10 Análise Epigenética	38
10.1 Extração de DNA/RNA.....	39
10.2 Conversão por bissulfito, transcrição reversa e Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) em tempo real (RT- qPCR)	40
10.3 Sequenciamento e análise do perfil de metilação.....	42
11 Extração proteica e Western Blot	42
11.1 Análise da expressão de BDNF	42
11.2 Análise da expressão de receptor de glicocorticoide (GR) e fração fosforilada (pGR).....	43
12 Análise Estatística.....	45
13 Delineamento experimental	45

13.1 Experimento 1 - Efeitos do enriquecimento ambiental sobre o comportamento do tipo ansioso e alterações epigenéticas no gene <i>bdnf</i> no córtex pré-frontal.....	45
13.2 Experimento 2 - Efeitos do enriquecimento ambiental sobre o comportamento do tipo ansioso em animais expostos ao estresse crônico imprevisível	46
13.3 Experimento 3 A - Efeitos do enriquecimento ambiental sobre o consumo de etanol em animais expostos ao estresse crônico imprevisível	47
13.4 Experimento 3 B - Efeitos do enriquecimento ambiental sobre o consumo de etanol com privação da droga durante o estresse crônico imprevisível	48
14 RESULTADOS	49
14.1 Experimento 1 - Efeitos do enriquecimento ambiental sobre o comportamento do tipo ansioso e alterações epigenéticas no gene <i>bdnf</i> no córtex pré-frontal.....	49
14.1.1 Teste de Labirinto em Cruz Elevado.....	50
14.1.2 Concentração de Corticosterona	50
14.1.3 Expressão gênica	51
14.1.4 Status de metilação do gene do <i>Bdnf</i>	52
14.1.5 Expressão de BDNF no córtex pré-frontal	53
14.1.6 Expressão de receptores de glicocorticoides (GR) e sua fração fosforilada (pGR) na amígdala	54
14.2 Experimento 2 - Efeitos do enriquecimento ambiental sobre o comportamento do tipo ansioso em animais expostos ao estresse crônico imprevisível	56
14.2.1 Teste de Labirinto em Cruz Elevado.....	56
14.2.2 Concentração de Corticosterona	57
14.2.3 Expressão de receptores de glicocorticoides (GR) e sua fração fosforilada (pGR) na amígdala	58
14.3 Experimento 3 A - Efeitos do enriquecimento ambiental sobre o consumo de etanol durante e após exposição ao estresse crônico imprevisível.....	60
14.3.1 Consumo de Etanol	60
14.3.1.1 Aquisição	60
14.3.1.2 Consumo prolongado intermitente	61
14.3.1.3 Reexposições	63
14.3.2 Teste de Labirinto em Cruz Elevado.....	64
14.3.3 Concentração de Corticosterona	65
14.3.4 Expressão de receptores de glicocorticoides (GR) e sua fração fosforilada (pGR) na amígdala	66
14.4 Experimento 3 B - Estudo do comportamento do tipo ansioso e períodos de privação em animais enriquecidos e expostos ao estresse crônico imprevisível	

14.4.1 Consumo de Etanol	68
14.4.1.1 Aquisição	68
14.4.1.2 Consumo prolongado intermitente	69
14.4.1.3 Reexposições	70
14.4.2 Teste de Labirinto em Cruz Elevado	71
14.4.3 Teste de Campo Aberto	73
14.4.4 Teste de Caixa Claro Escuro	73
15 DISCUSSÃO	74
16 CONCLUSÃO	84
17 REFERÊNCIAS ¹	85
ANEXOS	98
ANEXO A – Certificado da comissão de ética no uso de animais	98

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 policarbonato com tampas de metal zincado, chão forrado com raras 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 (Mariano 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 conseqüentemente 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.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o impacto do enriquecimento ambiental e sua modulação sobre mecanismos epigenéticos que regulam a expressão do *Bdnf* e sobre o consumo voluntário de etanol em animais expostos ao estresse crônico imprevisível.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1- Avaliar alterações epigenéticas induzidas pelo EA no gene *Bdnf* no córtex pré-frontal.

2.2.2- Estudar os efeitos do EA sobre o comportamento do tipo ansioso de animais expostos a um modelo de estresse crônico imprevisível.

2.2.3 - Estudar os efeitos do EA sobre o consumo voluntário de etanol em animais expostos a um modelo de estresse crônico imprevisível.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados animais machos C57BL adultos, com idade entre 65 e 75 dias, provenientes do Biotério do Departamento de Farmacologia – Unidade II (biotério de camundongos) - Rede de Biotérios da Universidade de São Paulo. Todas as manipulações e manutenção foram realizadas de acordo com certificado aprovado pela CEUA ICB (número 5664120118) e normas estabelecidas pelo CONCEA.

Ao todo foram utilizados 105 animais com a seguinte distribuição:

- Experimento 1: 33 animais (18 EA e 15 NE, 2 mortos);
- Experimento 2: 28 animais (15 EA e 13 NE, 2 mortos);
- Experimento 3A: 17 animais (7 EA e 10 NE, 3 mortos);
- Experimento 3B: 20 animais (10 EA e 10 NE).

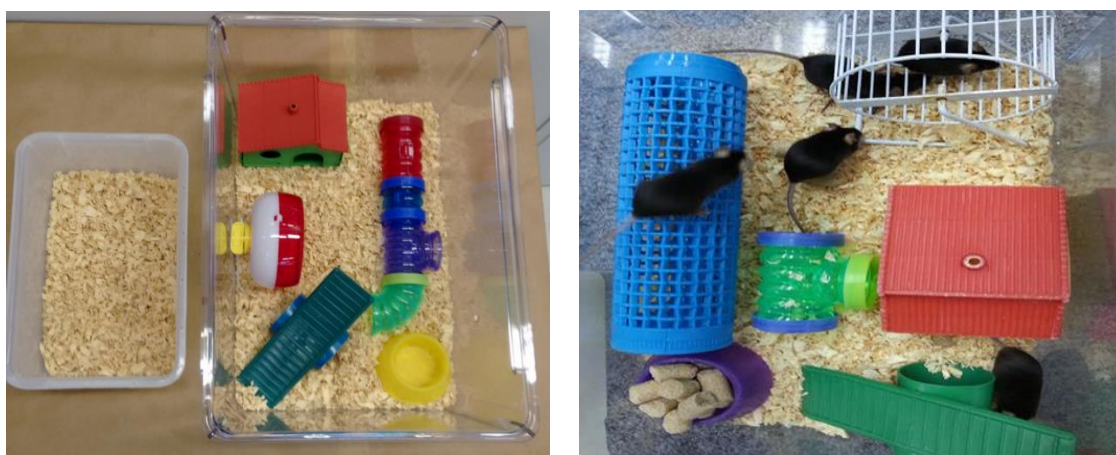
Os animais foram mantidos em grupos e alojados em gaiolas de policarbonato com alimento e água *ad libitum* e condições controladas de temperatura (24 ± 2 °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) na sala experimental de ciclo invertido, sendo o período escuro entre 10 horas e 22 horas. Antes do início dos experimentos os animais foram mantidos por no mínimo duas semanas nesta sala, para habituação. Luzes vermelhas foram utilizadas para lidar com os animais durante a fase escura.

3.2 Condições ambientais

Os animais do grupo não enriquecido (NE) foram alojados em condições de habitação padrão, ou seja, mantidos em gaiolas de policarbonato (27,5 cm de comprimento x 16,5 cm de largura x 13 cm de altura) forradas com maravalha (raspas de madeira), com comida e água à vontade. Já os animais do grupo enriquecimento ambiental (EA) foram alojados em gaiolas de policarbonato transparente maiores que as padrão (42 cm comprimento x 28 cm de largura x 21,5 cm de altura) também forradas com maravalha e com livre acesso à água e comida.

O EA foi constituído por objetos adicionados nas gaiolas como tubos de plástico, rodas de exercício, rampas, escadas, bolas e casas. Esses materiais foram substituídos ou trocados de posição 3 vezes por semana, para manter a novidade no ambiente. É importante salientar que o exercício foi voluntário e faz parte do rol de estímulos físicos da condição enriquecida.

Figura 1: Modelo de caixa de enriquecimento ambiental e de caixa padrão utilizados.



3.3 Drogas

3.3.1 Solução de etanol a 20%

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

3.3.2 Protocolo do Consumo de Etanol

O delineamento do consumo voluntário de etanol deste experimento foi baseado no padrão utilizado em estudos anteriores do nosso laboratório, e foram utilizados animais C57BL/6, já que são geneticamente predispostos a consumir voluntariamente etanol (Crabbe e Phillips, 2004; Finn et al., 2005). O consumo oral por livre escolha foi baseado no paradigma “Drinking in the Dark” (DID), realizado durante a fase escura do ciclo circadiano por se tratar do período de maior atividade dos animais, a fim de alcançar um maior consumo voluntário de etanol (Gill et al., 1986).

Estudos anteriores mostraram que a ingestão voluntária de etanol por C57BL/6 é mais elevada durante a fase escura e que o pico de consumo de fluido ocorre aproximadamente 3 horas após o início do período escuro (Goldstein e Kakihana, 1977; Rhodes et al., 2005). Sendo assim, este modelo foi utilizado por ser capaz de elevar a concentração sanguínea de etanol a níveis farmacologicamente significativos, ou seja, acima de 1,0 mg/ml, em apenas 2 horas. No modelo utilizado neste trabalho, os animais tiveram acesso a água e etanol, sendo este último apresentado de forma intermitente, como uma estratégia para aumentar voluntariamente o consumo (Khisti et al., 2006).

Durante o período de consumo, os animais permaneceram isolados e foram expostos a duas garrafas, uma contendo etanol a 20% e outra água da torneira, durante 2 horas, com início 3 horas após o início do ciclo escuro. Ao término deste período as garrafas foram retiradas e os animais alojados novamente em grupo. Ainda, as soluções foram trocadas e as posições das garrafas alternadas, diariamente, para evitar um viés de preferência por local.

Todas as garrafas foram pesadas antes e imediatamente após as sessões de consumo. As diferenças nos pesos das garrafas foram convertidas em volumes ingeridos através das densidades da solução de etanol e da água. Posteriormente

o volume de etanol ingerido foi então convertido em gramas de etanol/kg de peso do animal/2 h.

Em todas as sessões de consumo foi colocada uma gaiola, vazia, com duas garrafas controles para estimar o derramamento de líquido devido à manipulação ou evaporação. Um maior vazamento foi evitado utilizando um bico com duas esferas (Ancare Corp., Bellmore, NY, USA) e deixando apenas 2 cm do bico para fora da rolha, para que os animais não subissem nos bicos.

3.3.3 Cálculos do consumo de etanol e da preferência por etanol

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4 Estresse Crônico Imprevisível (EI)

A escolha do delineamento foi baseada num estudo da literatura que demonstrou que o modelo de estresse crônico imprevisível (EI) aumentava a atividade do eixo HPA, sendo um bom modelo de estresse, além de representar bem a condição humana de exposição a diferentes fatores estressantes diariamente (Muscat, Willner, 1992). Diante disto, o protocolo de EI foi realizado com base em estudos prévios, com algumas adaptações seguindo um modelo já utilizado em

nosso laboratório (Santos-Rocha et al., 2018) por meio da exposição a diferentes modalidades de estresse durante 11 dias consecutivos (Ortiz et al., 1996).

O protocolo utilizado está descrito no quadro abaixo:

Tabela 1: Protocolo de estresse crônico imprevisível.

Dia	Procedimento	Duração
1	Serragem úmida	12h
2	Imobilização	1h
3	Isolamento frio	45min
	Luz acesa	24h
4	Luz apagada	3h
	Nado forçado	4min
5	Serragem úmida	12h
	Privação de água e comida	12h
6	Nado forçado	4min
	Isolamento	12h
7	Isolamento frio	15min
	Luz apagada	2h
8	Serragem úmida + Luz acesa (juntos)	12h
9	Isolamento + Privação de água e comida (juntos)	12h
10	Imobilização	1h
	Luz acesa	24h
11	Nado forçado	4min
	Imobilização	1h

5 Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) é o principal teste empregado na avaliação de comportamento do tipo ansioso em roedores (Lister, 1987). O modelo consiste de um aparato com quatro braços, dois abertos (33,5 cm de comprimento x 7 cm de

largura), margeados por um anteparo de 0,5 cm de altura para evitar a queda dos animais, e dois fechados (33,5 cm de comprimento x 7 cm de largura, com paredes de 20 cm de altura), que ficam a uma altura de 50 cm do chão.

Neste estudo o teste foi realizado durante o período claro do ciclo, numa sala com iluminação de aproximadamente 100 lux (Komada et al., 2008) e com um sistema de câmera para filmar o comportamento do animal. Após cerca de 1 hora de habituação na sala de experimentação, o animal foi colocado no aparato, na interseção entre os braços fechados e abertos (plataforma central medindo 13,5 x 10 cm) com a cabeça voltada para o braço aberto oposto do qual se localiza o experimentador. Após 5 minutos de teste, o animal foi retirado do aparato e devolvido para outra caixa. Antes de ser realizado o teste seguinte, o aparato foi higienizado com álcool 5% de modo a evitar quaisquer pistas olfatórias.

Foram avaliados os seguintes parâmetros, com auxílio de um software específico para este tipo de análise (Plus MZ): número de entradas nos braços abertos, tempo nos braços abertos, número de entradas nos braços fechados, índice de ansiedade $[1 - (\text{frequência de entradas nos braços abertos} + \text{taxa de permanência nos braços abertos}) / 2]$ (Cohen et al., 2008). Foi considerado entrada quando o animal introduziu as quatro patas no respectivo braço do aparato.

6 Campo aberto

O teste de campo aberto (TCA) foi primariamente proposto como um teste para avaliar a emocionalidade em roedores (Hall, 1934; Christmas, Maxwell, 1970), além de ser amplamente empregado para avaliar atividade locomotora e exploratória.

Neste estudo foi utilizado um aparato para camundongos em acrílico (35cm de altura x 40cm de diâmetro), durante o período claro do ciclo numa sala com iluminação de aproximadamente 150 lux (Kuleskaya, Voikar, 2014) e com um sistema de câmera para filmar o comportamento do animal. Após 1h de habituação na mesma luminosidade do teste, o animal foi inserido no centro do aparato e sua atividade locomotora foi registrada durante 10 minutos. O animal foi devolvido para

outra caixa e o aparato foi higienizado com álcool 5% de modo a evitar quaisquer pistas olfatórias no próximo teste.

Foi contabilizada a distância percorrida por unidade de tempo (cm/s) nas zonas central e periférica do aparato e a frequência e tempo gasto no centro e na periferia (Ethovision XT[®], Noldus Information Technology, The Netherlands). Esses parâmetros podem ser considerados indiretamente como sugestivos de emocionalidade ou ansiedade, pois roedores apresentam aversão a ambientes novos; e, portanto, quando expostos ao ambiente desconhecido, aberto e iluminado do campo aberto tendem a entrar em conflito sobre explorar o aparato ou evitar situações perigosas (Choleris et al., 2001).

7 Caixa claro escuro

O teste da caixa claro escuro (CCE) é baseado na aversão natural dos roedores por ambientes iluminados, sendo comumente utilizado como indicativo de ansiedade e atividade locomotora (Crawley, Goodwin, 1980). Consiste de um aparato em acrílico, formado por 2 compartimentos de mesmo tamanho revestidos internamente de preto e branco e unidos por uma porta, no qual há um lado claro (LC) que recebe iluminação (aproximadamente 400 lux) e um lado escuro (LE) que não recebe iluminação (2 lux) (Takao, Miyakawa, 2006).

Após 1 hora de habituação, cada animal foi inserido na parte escura do aparato e permitido que ele explorasse livremente por 10 minutos. Em seguida foi devolvido para outra caixa e o aparato foi higienizado com álcool 5% de modo a evitar quaisquer pistas olfatórias. Este teste foi realizado no período claro do ciclo e as imagens foram gravadas e analisadas manualmente. Foram contabilizados o número total de transições (quantidade de vezes que o animal passou de um compartimento para o outro com as 4 patas), o tempo gasto em cada lado e a latência para entrar no lado claro (Takao, Miyakawa, 2006; Peters et al., 2014). Além disso, foi calculado a porcentagem de tempo no lado claro [%TLC = $TLC/(TLC+TLE)$] x 100] e porcentagem de tempo no lado escuro [%TLE = $TLE/(TLC+TLE)$] x 100].

8 Coleta de sangue para dosagem corticosterona

Para as dosagens plasmáticas, aproximadamente 250 µL de sangue da veia caudal foram coletados em microtubos com heparina (500 U/ml, na proporção de 10% do volume total de sangue coletado). Em seguida, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 2000 x g a 4 °C, para separar o plasma, e armazenados a - 80 °C até o momento da dosagem.

Para a dosagem de corticosterona foi utilizado o kit bioquímico (Enzo Life Sciences® - corticosterone ELISA kit) de acordo com as instruções do fabricante.

9 Coleta dos encéfalos dos animais

Após o deslocamento cervical devidamente realizado, os encéfalos dos animais foram cuidadosamente retirados e imediatamente mantidos em gelo seco, inteiros, para posteriormente serem armazenados em freezer -80°C, com exceção dos utilizados para as análises epigenéticas, que foram mantidos em gelo e dissecados a fresco.

Parte dos encéfalos foram dissecados para obtenção do córtex pré-frontal e parte para obtenção da amígdala. Os encéfalos foram dissecados com base no atlas de estruturas encefálicas (Paxinos, Franklin, 2012) e uma matriz para cérebro de camundongo (1mm; ASI-Instruments®, Houston, TX) como guias para a secção do córtex pré-frontal. Estas amostras foram divididas; uma parte foi enviada para a *University of Surrey* (Guildford, Reino Unido) para investigação epigenética e a outra mantida para investigação do BDNF por Western Blot. A amígdala foi obtida com a ajuda da matriz e de um *micropuncher* (1,2mm; Harris Micro-Punch, Ted Pella) e utilizada também para investigação dos receptores GR e pGR por Western Blot.

10 Análise Epigenética

Após a eutanásia, os encéfalos foram retirados e dissecados imediatamente, tendo o córtex pré-frontal (CPF) retirado, mantidos numa solução estabilizadora da degradação de RNA (RNA later stabilization solution – Sigma[®]) e armazenados em freezer -80°C. O envio das amostras para o Reino Unido foi feito por uma transportadora especializada (Bio Transportes[©]), devidamente armazenadas e mantidas em gelo seco durante todo o processo, mediante anuência do veterinário responsável do Instituto de Ciências Biomédicas, do diretor do instituto e do Ministério da Agricultura.

Foi realizada uma análise na expressão gênica de éxons específicos da região promotora do *Bdnf* bem como a amplificação e o sequenciamento destas regiões para o posterior estudo dos níveis de metilação. Além disso, foi verificada a expressão proteica do BDNF por western blot. O córtex pré-frontal foi escolhido para investigação, entre outros, por ser uma região importante no estudo da adição e da regulação emocional.

Uma análise da estrutura do gene *Bdnf* em roedores mostra que se trata de um gene muito complexo (Tsankova et al., 2007). Os éxons 1, 2, 4, 6 e 9 foram analisados, com base em estudos anteriores que apontaram estas sequências como importantes no processo de regulação da expressão gênica de *Bdnf* (Fuchikami et al., 2011; Karpova et al., 2014; Xu et al., 2018). O éxon 4 está entre os genes da região promotora mais estudados na literatura. Foi visto que mutações induzidas nesta região podem alterar a função hipocampal e do córtex pré-frontal. Ainda, este éxon contém um sítio de ancoragem para CREB. Em um estudo com animais mutantes que não expressam o éxon 4 na região promotora do *Bdnf* observou-se uma deficiência de interneurônios gabaérgicos no córtex pré-frontal. (Sakata et al., 2009). A transcrição do promotor do exon 4 é particularmente sensível à atividade neuronal (Martinowich et al., 2003) e rapidamente transcrito em resposta ao estresse (Marmigère et al., 2003).

10.1 Extração de DNA/RNA

Foi utilizado um Kit de purificação simultânea de DNA genômico e RNA total de amostras biológicas (All Prep DNA/RNA kit – QIAGEN[®]). Inicialmente, as

amostras foram separadas em microtubos com esferas de metal e, com o tampão de lise fornecido pelo kit, processadas no disruptor de células e tecidos (TissueLyser II QIAGEN®).

O produto de lise foi então homogeneizado em tampão altamente desnaturante com isotiocianato de guanidina, que inativa as enzimas DNases e RNases. A seguir foi passado por uma coluna de rotação (DNA allprep – fornecida pelo kit) que, em combinação com o tampão, permitiu a ligação seletiva do DNA genômico. Após a lavagem da coluna o DNA puro foi finalmente eluído. Na sequência foi adicionado etanol ao fluxo da coluna de rotação, o que forneceu condições para a ligação do RNA. A amostra foi então passada por outra coluna de rotação (RNeasy – fornecida pelo kit) na qual o RNA total se ligou à membrana; após lavagem o RNA puro foi eluído em água.

O material resultante foi lido em um espectrofotômetro em nanoescala (NanoDrop® 2000 Thermo Scientific) que forneceu dados quantitativos com relação a concentração proteica dos extratos de DNA e RNA das amostras.

10.2 Conversão por bissulfito, transcrição reversa e Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) em tempo real (RT- qPCR)

A conversão por bissulfito de sódio é uma técnica que tem como alvo apenas as citosinas não metiladas em DNA de fita simples, que são convertidas em uracilas. Para isso foi feita uma sulfonação, que se deu pela adição do bissulfito, seguida de desaminação hidrolítica do derivado resultante de citosina-bissulfito e depois uma dessulfonação, pelo tratamento com um reagente alcalino, para obter um derivado uracil-bissulfito (Patterson et al., 2011). Foi utilizado um kit para conversão por bissulfito (Epitect Bisulfite kit – QIAGEN®) no qual o DNA se ligou a membrana de uma coluna de rotação, a seguir foi lavado, ocorrendo a dessulfonação do DNA ligado à membrana. Após outra lavagem para remover o agente de dessulfonação foi feita a eluição do DNA convertido, um produto adequado para todas as técnicas de análise da metilação do DNA, incluindo o pirosequenciamento.

Após a remoção do DNA genômico (seção anterior) as amostras de RNA foram submetidas à transcrição reversa com o mix de enzimas de transcrição reversa e primers de transcrição reversa (QuantiNova Reverse Transcription Mix; QuantiNova RT kit – QIAGEN®). Após um rápido aquecimento de 3 minutos a 25°C,

a reação ocorre a 45°C por 10 minutos e é inativada a 85°C. A enzima de transcrição reversa de alta afinidade pelo RNA permitiu a síntese de cDNA com alto rendimento. O DNA convertido (cDNA) foi então utilizado como molde para a amplificação. Este foi preparado para a reação de PCR em tempo real (QuantiNova Master Mix SYBR Green PCR– QIAGEN®) com a adição de primers específicos (F-Forward e R-Reverse) e depois amplificado em um equipamento de PCR quantitativa em tempo real (StepOne Plus qPCR-Applied Biosystems®). Cada amostra foi amplificada individualmente e duplicada, e a concentração relativa de RNAm foi determinada pelo método padrão *delta-ctct*, que utiliza *Gapdh* como controle interno.

Os seguintes primers foram utilizados (sentido 5´-3´):

Exon 1:

TGTCTCTCAGAATGAGGGCG - F; CATCCACCTTGGCGACTACA - R

Exon 2:

CATTGAGCTCGCTGAAGTTGG - F; CCCAGTATACCAACCCGGAG - R

Exon 4:

ATGGAGCTTCTCGCTGAAGG - F; CGAGTCTTTGGTGGCCGATA - R

Exon 6:

GCGTGACAACAATGTGACTCC - F; TCTGGCTCTCGCACTTAGC - R

Exon 9- Primer 1:

CGACATCACTGGCTGACT - F; CAAGTCCGCGTCCTTATGGT- R

Exon 9- Primer 2:

ATTAGCGAGTGGGTCACAGC - F; GCCTTTGGATACCGGGACTT – R

As sequências dos primers apresentadas acima foram desenhadas especificamente para este experimento, com base em sequências prévias da literatura (Xu et al., 2018), na tentativa de aprimorar as sequências alvo envolvidas na expressão gênica do *Bdnf*. Tais procedimentos foram realizados em parceria com a pesquisadora Dra. Pritilatta Chivers (*University of Surrey*, Guildford, Reino Unido), com expertise em genética e com o Dr. Alexis Bailey (*St Georges University of London*, Londres, Reino Unido) com os quais temos mantido colaboração em

estudos de biologia molecular. Além do éxon 4, amplamente citado na literatura e para o qual foi dada prioridade para a finalização dos experimentos, outros éxons que também fazem parte da região promotora do *Bdnf* foram investigados na tentativa de complementar os resultados obtidos.

10.3 Sequenciamento e análise do perfil de metilação

A partir das amostras amplificadas foi analisada a expressão gênica de cada éxon e, posteriormente, foi feito o processo de sequenciamento através da técnica de pirosequenciamento (PyroMark Q24 Advanced - QIAGEN®) de modo a quantificar as regiões metiladas nos éxons analisados.

O sequenciamento do DNA consiste de uma sequência de reações bioquímicas com o objetivo de determinar a ordem das bases nitrogenadas em uma amostra. O pirosequenciamento é um método baseado na detecção de raios luminosos emitidos pelos pirofosfatos inorgânicos liberados pela síntese de DNA. Para tal, o DNA alvo do processo é inicialmente fragmentado, aleatoriamente. Tais fragmentos são ligados a microesferas magnéticas (*beads*) que possuem em sua superfície sequências complementares aos fragmentos. As esferas são capturadas individualmente em gotículas oleosas onde a PCR em emulsão ocorre, produzindo milhares de cópias do fragmento alvo. Cada esfera, agora contém várias cópias de uma molécula única de DNA em fita simples, é então capturada por um poço do suporte ou lâmina de sequenciamento, juntamente com reagentes necessários para a sua amplificação. Assim, durante a síntese do DNA complementar, um sinal de luz é emitido e identificado pelo equipamento a cada base incorporada, em cada poço de sequenciamento. Em outras palavras, cada nucleotídeo incorporado é sequencialmente identificado, pela detecção de luz, que vem da liberação do pirofosfato inorgânico (Medini et al., 2008).

11 Extração proteica e Western Blot

11.1 Análise da expressão de BDNF

Às estruturas previamente extraídas do cortex pré-frontal foi adicionado um tampão de lise (Tris-HCl 1M pH 7.5, SDS 10%, glicerol, NaCl 3M, água deionizada, NaF 500mM, betaglicerolfosfato 500mM, coquetel inibidor de protease (Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail - Thermo Fisher Scientific, Inc) e mantidas em gelo. Em seguida as amostras foram sonicadas em amplitude de 50% por aproximadamente 5 segundos (Ultrasonic processor Vibra cell VC-505 - Sonics & Materials, Inc) incubadas em gelo por 20 minutos e centrifugadas a 4°C por 20 minutos a 13.000 g. O sobrenadante (extrato total) foi recolhido e a concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford (Biorad protein assay, Bio-Rad Laboratories, Inc) (Bradford, 1976).

A eletroforese foi realizada utilizando gel de poliacrilamida a 12,5% e o aparelho Mini-Protean® Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc). As proteínas presentes no extrato total foram combinadas ao tampão de Laemmli (Bio-Rad Laboratories, Inc, complementado com 5% de mercaptoetanol) e incubadas a 95 °C durante 5 min. As amostras de proteínas (2µg/µl) foram separadas por tamanho em gel de SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) a 90 V e depois transferidas para a membrana de Nitrocelulose (EMD Millipore Corporation). O método de Ponceau para imunoblot foi utilizado para assegurar a carga de proteínas iguais (Salinovich, Montelaro, 1986). O bloqueio da membrana foi feito com 5% de albumina de soro bovino (BSA) diluída em tampão TBS-T (Tris-HCL 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 a 0,1%, pH 7,5) e incubado durante a noite a 4°C. No dia seguinte as membranas foram incubadas com anticorpo BDNF (Santa Cruz Biotechnology) a uma diluição de 1: 1000 e deixado novamente durante a noite, a 4°C. No dia seguinte, a membrana foi sondada com um anticorpo secundário (diluição de 1:2000, anti-rabbit Ac, Santa Cruz Biotechnology) durante 2 h à temperatura ambiente e então revelado em fotodocumentador ChemiDoc MP (Bio-Rad Laboratories, Inc). As amostras foram digitalizadas e analisadas com o software ImageLab® (Bio-Rad Laboratories, Inc). A densidade relativa de cada banda foi normalizada ao valor da beta- actina (diluição de 1: 40000, Santa Cruz Biotechnology).

11.2 Análise da expressão de receptor de glicocorticoide (GR) e fração fosforilada (pGR)

As estruturas da amígdala foram retiradas a partir dos cérebros previamente armazenados a -80 °C, com a ajuda de uma matriz. Às estruturas foi adicionado um tampão de lise (Tris-HCl 20mM – pH 7.5, EDTA 1mM, DTT 1mM, PMSF 1mM, leupeptina 2µg/µl, pepstatina 1µM). As amostras foram mantidas em gelo e homogeneizadas mecanicamente com um homogeneizador *Dounce*. Em seguida foram centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 11200 g (10000 rpm) (Dos Santos et al., 2019). O sobrenadante do extrato total foi recolhido e a concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford (Biorad protein assay, Bio-Rad Laboratories, Inc) (Bradford, 1976).

A eletroforese foi realizada utilizando gel de poliacrilamida a 7,5% e o aparelho Mini-Protean® Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc). As proteínas presentes no extrato total foram combinadas ao tampão de Laemmli (Bio-Rad Laboratories, Inc, complementado com 5% de mercaptoetanol) e incubadas a 95 °C durante 5 min. As amostras de proteínas (2µg/µl) foram separadas por tamanho em gel de SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) a 90 V e depois transferidas para a membrana de PVDF Immobilon® (EMD Millipore Corporation). Para a transferência foi utilizado o equipamento Trans-Blot Turbo (Bio-Rad Laboratories, Inc). O método de Ponceau para imunoblot foi utilizado para assegurar a carga de proteínas iguais (Salinovich, Montelaro, 1986). O bloqueio da membrana foi feito com 5% de albumina de soro bovino (BSA) diluída em tampão TBS-T (Tris-HCL 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 a 0,1%, pH 7,5) durante 2h à temperatura ambiente e subsequentemente incubadas durante a noite a 4°C com anticorpo GR ou pGR (Santa Cruz Biotechnology) a uma diluição de 1: 1000. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi sondada com um anticorpo secundário (diluição de 1:2000, anti-rabbit Ac, Santa Cruz Biotechnology) durante 2 h à temperatura ambiente e então revelado em fotodocumentador ChemiDoc MP (Bio-Rad Laboratories, Inc). As amostras foram digitalizadas e analisadas com o software ImageLab® (Bio-Rad Laboratories, Inc). A densidade relativa de cada banda foi normalizada ao valor da beta- actina (diluição de 1: 40000, Santa Cruz Biotechnology).

A relação entre a expressão do receptor de glicocorticoide (GR) e expressão da fração fosforilada (pGR) será calculada como índice de translocação nuclear e, portanto, atividade do GR.

12 Análise Estatística

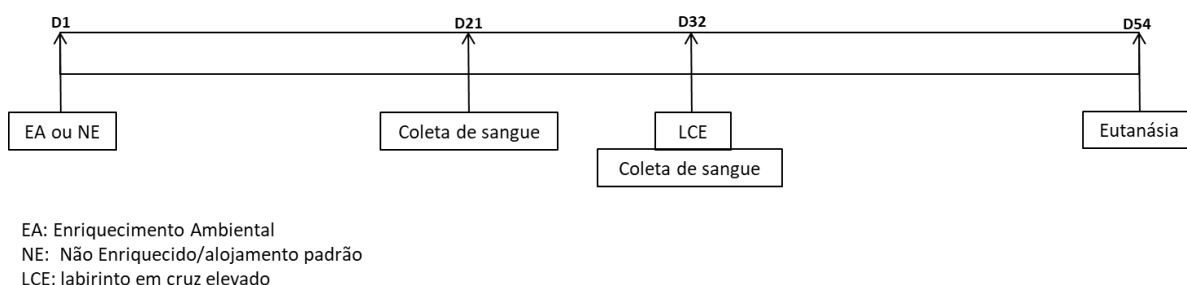
Inicialmente foram realizados teste de normalidade para as amostras (teste de Shapiro Wilk). Foram aplicadas análises paramétricas como teste t-Student e ANOVA de uma ou duas vias para medidas repetidas, dependendo do tipo de análise, e aplicado post hoc de Newman-Keuls ou Tukey, no caso de encontrar diferenças significantes. Aos dados que não apresentaram normalidade e/ou homogeneidade de variância foram aplicados testes não paramétricos, como teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) para os testes paramétricos e mediana para os não paramétricos e foi considerada estatisticamente significativa qualquer diferença com $p < 0,05$. Todas as análises foram feitas nos softwares Statistica 7.0 e os gráficos plotados no Prism 7.0.

13 Delineamento experimental

13.1 Experimento 1 - Efeitos do enriquecimento ambiental sobre o comportamento do tipo ansioso e alterações epigenéticas no gene *bdnf* no córtex pré-frontal

Após um período de aclimação no biotério, os animais foram divididos randomicamente em 2 grupos, um exposto ao ambiente enriquecido, grupo EA (n = 18), e o outro em alojamento não enriquecido, grupo NE (n = 15), permanecendo nesta condição até o final do experimento. Após 21 dias de enriquecimento ambiental foi feita uma coleta sanguínea (D21). A seguir, após 11 dias, foi executado o teste de labirinto em cruz elevado pela manhã e, pós teste, uma nova coleta sanguínea (D32). Os animais permaneceram em ambiente enriquecido e, então, pela manhã do dia 54 houve a eutanásia por deslocamento cervical.

Figura 2: Desenho experimental - experimento 1.

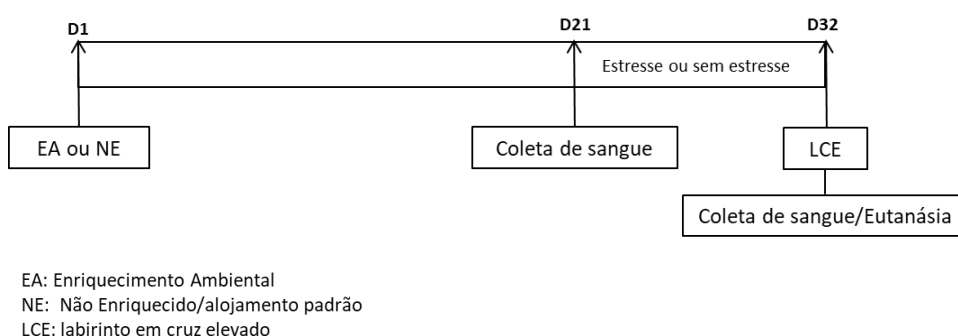


EA: enriquecimento ambiental; NE: não enriquecido ou alojamento padrão; LCE: labirinto em cruz elevado.

13.2 Experimento 2 - Efeitos do enriquecimento ambiental sobre o comportamento do tipo ansioso em animais expostos ao estresse crônico imprevisível

Após um período de aclimação, os animais foram divididos randomicamente em 2 grupos, um exposto ao EA (n =15), e o outro ao NE (n = 13) permanecendo nesta condição até o final do experimento. Após 21 dias de enriquecimento ambiental foi feita uma coleta sanguínea (D21). A partir do dia 22, os animais foram expostos ao protocolo de estresse crônico imprevisível por 11 dias subsequentes, conforme Quadro 1 (ver Material e Métodos – Estresse crônico imprevisível). No dia seguinte ao final do período de estresse (D32) foi executado o teste de labirinto em cruz elevado (LCE) pela manhã e, após o teste, houve a eutanásia por deslocamento cervical.

Figura 3: Desenho experimental - experimento 2.



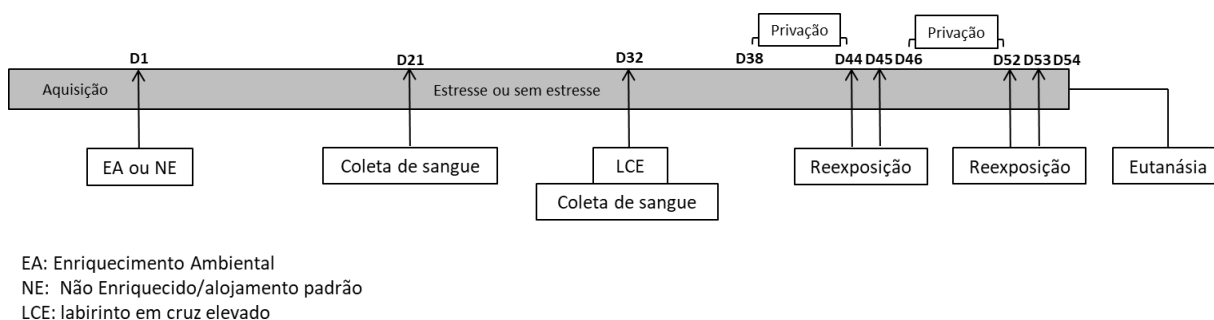
EA: enriquecimento ambiental; NE: não enriquecido ou alojamento padrão; LCE: labirinto em cruz elevado.

13.3 Experimento 3 A - Efeitos do enriquecimento ambiental sobre o consumo de etanol em animais expostos ao estresse crônico imprevisível

Após um período de aclimação, os animais foram submetidos ao procedimento de livre escolha entre duas garrafas, uma contendo água e outra etanol 20%, por 15 dias não contínuos para estabilização do consumo, período chamado de fase de aquisição. Nessa condição, foram expostos ao consumo por 2h diárias e houve períodos curtos de privação do etanol (2 dias), como ferramenta para aumentar o consumo e acelerar a estabilização, conforme Marianno et al., 2017. A seguir, foram divididos randomicamente em 2 grupos, um exposto ao EA (n =7), e o outro ao NE (n = 10) permanecendo nesta condição até o final do experimento. Os animais do EA só foram retirados do enriquecimento durante o período de consumo de etanol. Após 21 dias de enriquecimento ambiental foi feita uma coleta sanguínea para dosagem de corticosterona (D21). A partir do dia 22, foram expostos ao protocolo de estresse imprevisível por 11 dias consecutivos, mantendo o consumo diário de etanol. No dia seguinte ao final do período de estresse, foi executado o teste de labirinto em cruz elevado (LCE) pela manhã e posterior coleta sanguínea para a segunda dosagem de corticosterona (D32). O consumo de etanol se manteve por 7 dias após o final do estresse, já que este pode interferir na busca pela droga diminuindo o consumo de etanol (Norman et al., 2015).

Em seguida, os animais foram privados de etanol por 2 ciclos de 6 dias, seguidos de reexposições, com o intuito de avaliar o efeito da privação alcóolica (*alcohol deprivation effect*), o qual induz aumento de consumo e mimetiza uma recaída (Vengeliene, Bilbao, Spanagel, 2014). Em cada reexposição, três horas após o início da fase escura, os animais foram reexpostos às duas garrafas (água e etanol 20%) por 2 horas. Após contabilização deste consumo, permaneceram com acesso ao etanol pelas 22 horas seguintes, totalizando 24h de exposição. Após este período foi realizada eutanásia por deslocamento cervical.

Figura 4: Desenho experimental - experimento 3 A.



EA: enriquecimento ambiental; NE: não enriquecido ou alojamento padrão; LCE: labirinto em cruz elevado.

13.4 Experimento 3 B - Efeitos do enriquecimento ambiental sobre o consumo de etanol com privação da droga durante o estresse crônico imprevisível

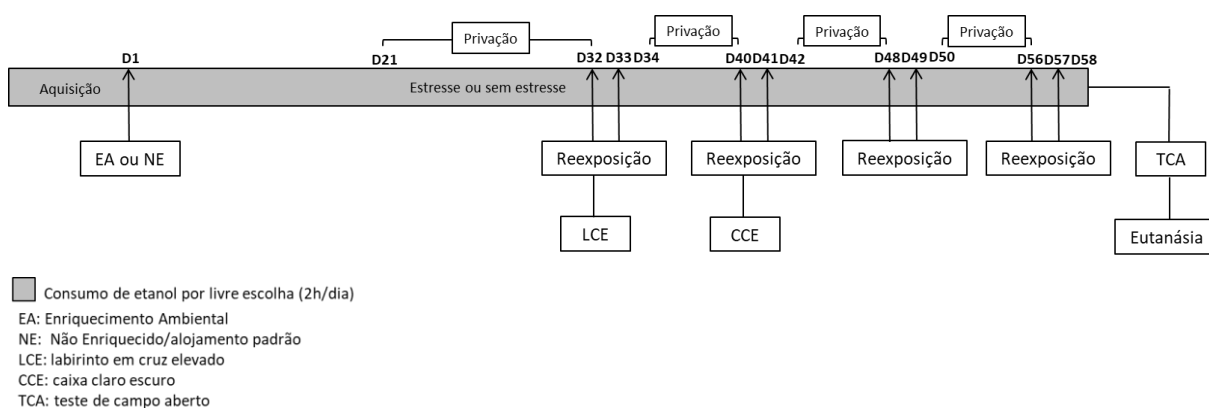
O protocolo deste experimento é semelhante ao 3 A, com poucas modificações.

Após aclimatação os animais foram submetidos ao procedimento de livre escolha entre duas garrafas, uma contendo água e outra etanol 20%, por 15 dias não contínuos para estabilização do consumo, período chamado de fase de aquisição. Nessa condição, foram expostos ao consumo por 2 horas diárias e houve períodos curtos de privação do etanol (2 dias), como ferramenta para aumentar o consumo e acelerar a estabilização (Marianno et al, 2017). A seguir, foram divididos aleatoriamente em 2 grupos, um exposto ao EA (n =10), e o outro ao NE (n = 10) permanecendo nesta condição até o final do experimento. Os animais do EA só foram retirados do enriquecimento durante o período de consumo de etanol. Após 21 dias de enriquecimento ambiental foi feita uma coleta sanguínea para dosagem de corticosterona (D21). A partir do dia 22, foram expostos ao protocolo de estresse imprevisível por 11 dias consecutivos, mas ao contrário do experimento 3A, os animais foram privados do consumo de etanol durante o estresse. No dia seguinte ao final do período de estresse (D32) foi executado o teste de labirinto em cruz elevado (LCE) pela manhã e três horas após o início da fase escura, os animais foram reexpostos às duas garrafas (água e etanol 20%) por 2 horas. Após contabilização deste consumo, permaneceram com acesso ao etanol pelas 22 horas seguintes (D33), totalizando 24h de exposição. Os animais foram privados de

consumo de etanol por 6 dias e, no dia seguinte (D40), foi realizado o teste da caixa claro escuro (CCE) pela manhã. Três horas após o CCE, houve a segunda reexposição ao etanol por 2 e 24 horas. O experimento seguiu com mais dois ciclos de privação e reexposição (D48-49, D56-57) seguindo o mesmo modelo. No dia seguinte pela manhã (D58) foi realizado o teste de campo aberto (TCA) e posteriormente a eutanásia por deslocamento cervical.

Como este experimento possui delineamento semelhante ao experimento 3A, não foram feitas coletas sanguíneas, uma vez que a análise das concentrações de corticosterona já foi mensurada no outro experimento. Como as diferenças de consumo entre os grupos experimentais durante o estresse não forneceram uma resposta conclusiva, o etanol foi retirado durante este período para avaliarmos um período maior de privação de etanol. O aumento do período de privação pode levar a um efeito exacerbado no consumo (Heyser et al., 1997). Portanto, o objetivo principal deste experimento foi fornecer um resultado adicional ao estudo do comportamento do tipo ansioso e busca pela droga em períodos de privação.

Figura 5: Desenho experimental - experimento 3 B.



EA: enriquecimento ambiental; NE: não enriquecido ou alojamento padrão; LCE: labirinto em cruz elevado; CCE: caixa claro escuro; TCA: teste de campo aberto.

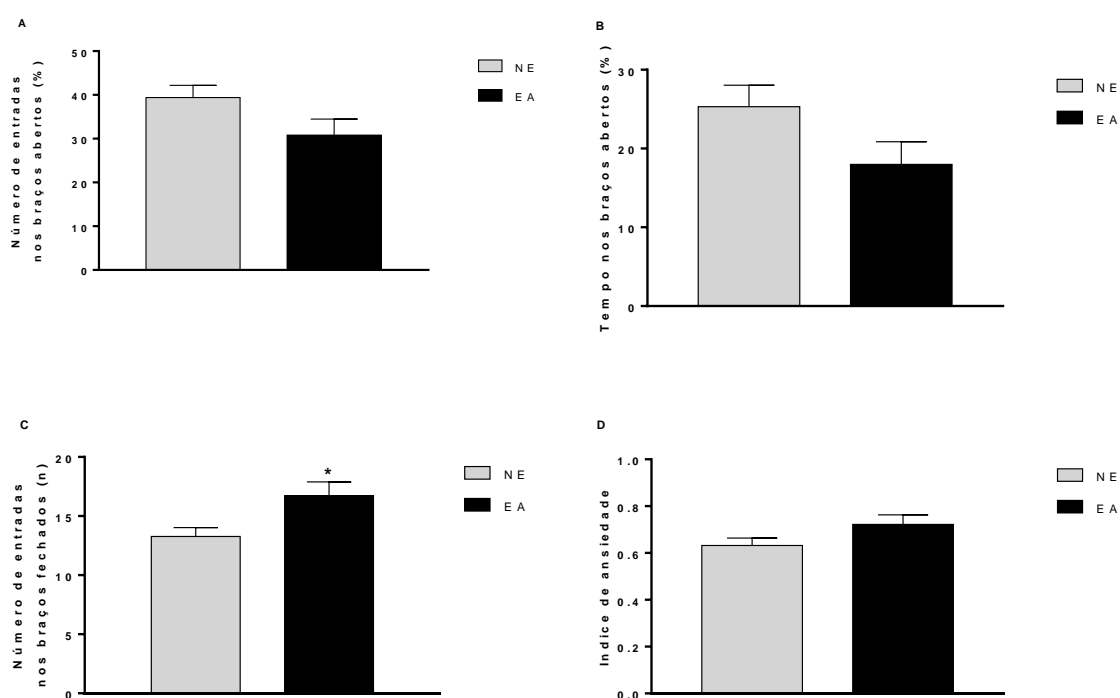
14 RESULTADOS

14.1 Experimento 1 - Efeitos do enriquecimento ambiental sobre o comportamento do tipo ansioso e alterações epigenéticas no gene *bdnf* no córtex pré-frontal

14.1.1 Teste de Labirinto em Cruz Elevado

A análise dos parâmetros no labirinto em cruz elevado pelo teste t-Student mostra que os animais do grupo EA apresentaram valores semelhantes ao NE, com exceção do número de entradas nos braços fechados, que foi maior nos animais enriquecidos.

Figura 6: Parâmetros para o comportamento do tipo ansioso analisados no Labirinto em Cruz Elevado em animais expostos ao enriquecimento.



A: NE: grupo não enriquecido (n=15), EA: Grupo enriquecimento ambiental (n=18), dados em porcentagem. **B:** NE: grupo não enriquecido (n=15), EA: Grupo enriquecimento ambiental (n=18), dados em porcentagem. **C:** NE: grupo não enriquecido (n=15), EA: Grupo enriquecimento ambiental (n=18), dados em número absoluto. **D:** NE: grupo não enriquecido (n=15), EA: Grupo enriquecimento ambiental (n=18), dados expressos pelo índice de ansiedade = $[1 - (\text{frequência de entradas nos braços abertos} + \text{tempo de permanência nos braços abertos}) / 2]$. **A – D:** Teste t-Student não pareado; *p<0,05.

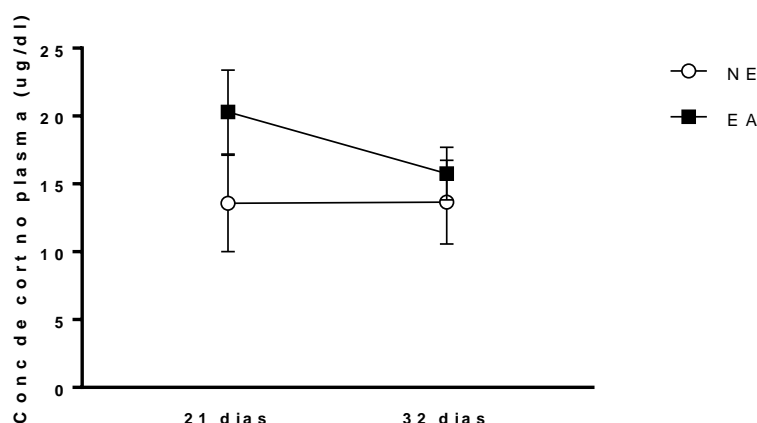
14.1.2 Concentração de Corticosterona

A corticosterona no plasma dos animais foi medida após 21 e 32 dias de exposição ao enriquecimento. Analisados isoladamente neste experimento esses valores fornecem um panorama do efeito do enriquecimento ambiental sobre o eixo

HPA destes animais. Como esses dias equivalem aos períodos antes e depois do estresse (Experimento 2), podemos usar essas medidas como controles da variável enriquecimento, quando há exposição ao estresse (Experimento 2).

A presença do enriquecimento não alterou as concentrações de corticosterona pelo teste ANOVA de 2 vias ($F(1,10) = 3,86$; $p > 0.05$), também não houve alteração nos diferentes dias de análise ($F(1,10) = 0,27$; $p > 0.05$) e nem interação entre os fatores ambiente x dia ($F(1,10) = 0,29$; $p > 0.05$).

Figura 7: Comparação da concentração corticosterona em animais expostos ao enriquecimento ambiental por 21 e 32 dias.



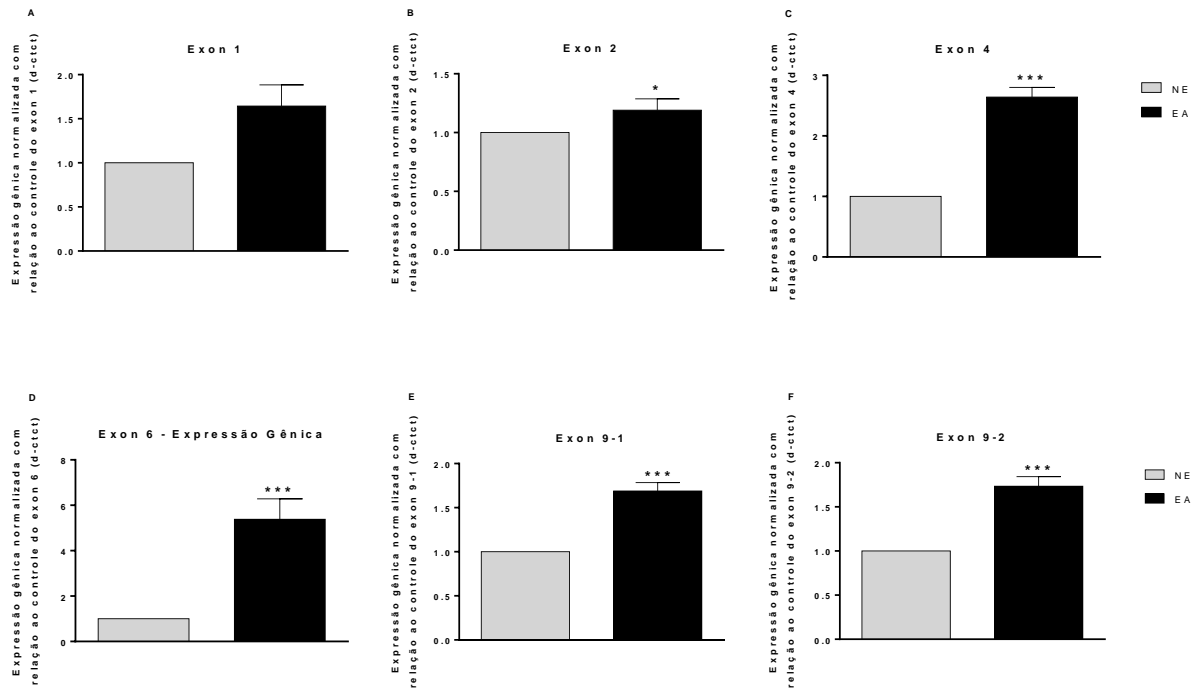
NE: grupo não enriquecido (n=5), EA: grupo enriquecido (n=8), dados em média \pm EPM. Teste ANOVA 2 vias para medidas repetidas.

14.1.3 Expressão gênica

Para avaliar se o EA pode induzir modificações epigenéticas no gene *Bdnf* no córtex pré-frontal, foram escolhidos éxons específicos na região promotora do gene do *Bdnf*, entre eles os éxons 1,2,4,6 e em duas regiões do éxon 9 (9-1 e 9-2).

A análise da expressão gênica pelo teste de Mann-Whitney revelou aumento significativo na expressão dos éxons 4, em duas regiões do éxon 9, no éxon 2 e no éxon 6 para os animais do grupo enriquecido quando comparados com os animais não enriquecidos.

Figura 8: Expressão gênica em diferentes éxons da região promotora do gene do *Bdnf*.

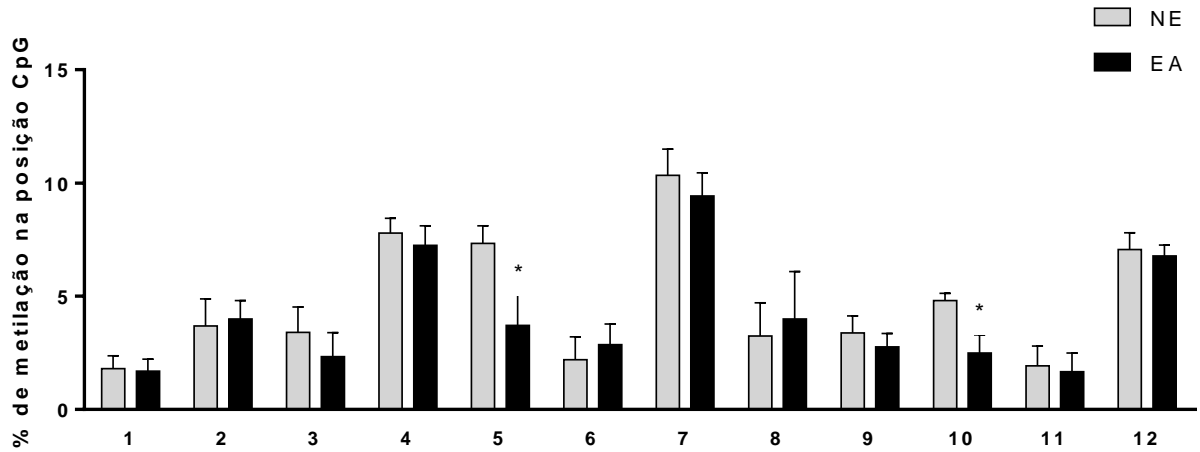


A - F: NE: grupo não enriquecido (n=6), EA: grupo enriquecido (n=6), dados em média \pm EPM. Teste Mann Whitney, *p<0,05 ***p,0,001.

14.1.4 Status de metilação do gene do *Bdnf*

O aumento da expressão gênica do éxon 4 do *Bdnf* nos levou a especular o perfil de metilação de sítios de ilhas CpG. A metilação nas demais regiões promotoras e não-promotoras do gene *Bdnf* serão investigadas futuramente. A comparação entre EA e NE dos níveis de metilação nas 12 ilhas CpG do éxon 4 que foram analisadas por múltiplos teste t-Student revelou diminuição na metilação nas posições CpG 5 e 10 nos animais enriquecidos, em relação aos NE.

Figura 9: Análise da metilação nas diferentes regiões CpG no éxon 4 do gene do *Bdnf*.

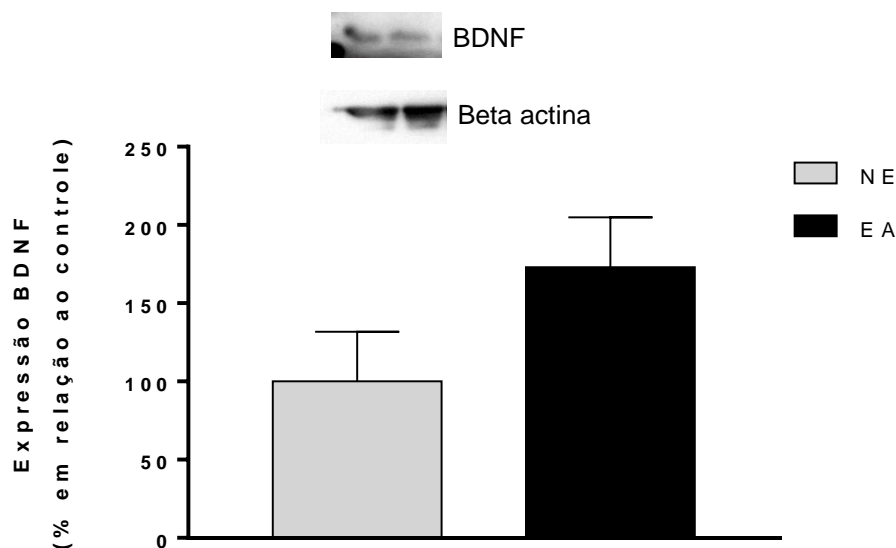


Dados em porcentagem. NE: grupo não enriquecido (n=6), EA: grupo enriquecido (n=6). Teste t-Student, *p<0,05.

14.1.5 Expressão de BDNF no córtex pré-frontal

A expressão proteica de BDNF foi analisada por teste t-Student. Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos NE e EA.

Figura 10: Expressão proteica de BDNF no córtex pré-frontal.



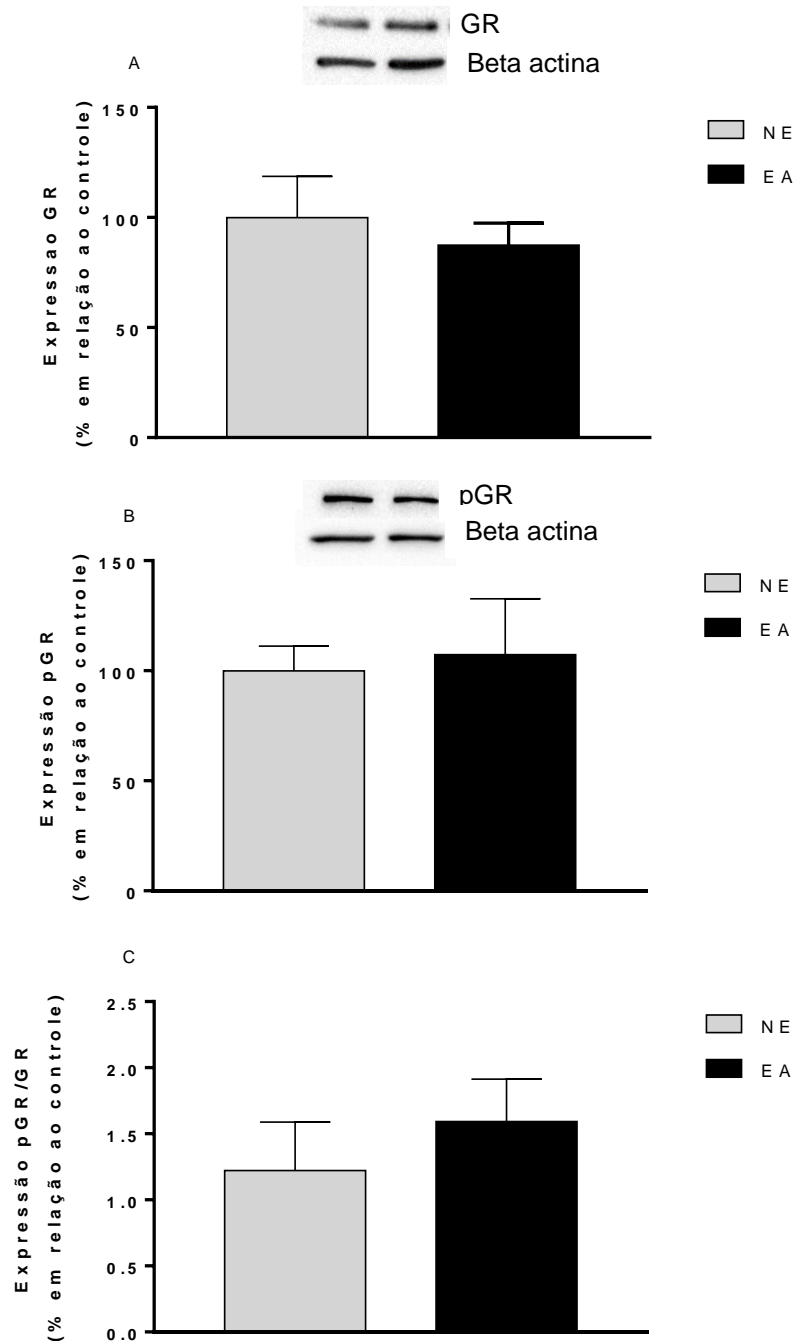
Dados em média \pm EPM, expressos em porcentagem corrigida em relação ao grupo controle, NE: grupo não enriquecido (n=5), EA: grupo enriquecido(n=6). Teste t-Student.

O estudo na expressão da proteína BDNF na mesma região do encéfalo na qual foram estudados os mecanismos epigenéticos (região do córtex pré-frontal) pode fornecer um parâmetro interessante de comparação, já que a princípio, teoricamente quando há uma diminuição da metilação na região promotora de uma proteína pode haver um aumento na expressão da mesma proteína.

14.1.6 Expressão de receptores de glicocorticoides (GR) e sua fração fosforilada (pGR) na amígdala

A expressão proteica de GR, pGR e a medida da translocação do receptor (pGR/GR) foram analisados pelo teste t-Student, sem diferença significativa para os parâmetros.

Figura 11: Expressão proteica de GR e pGR em animais expostos ou não ao enriquecimento na amígdala.



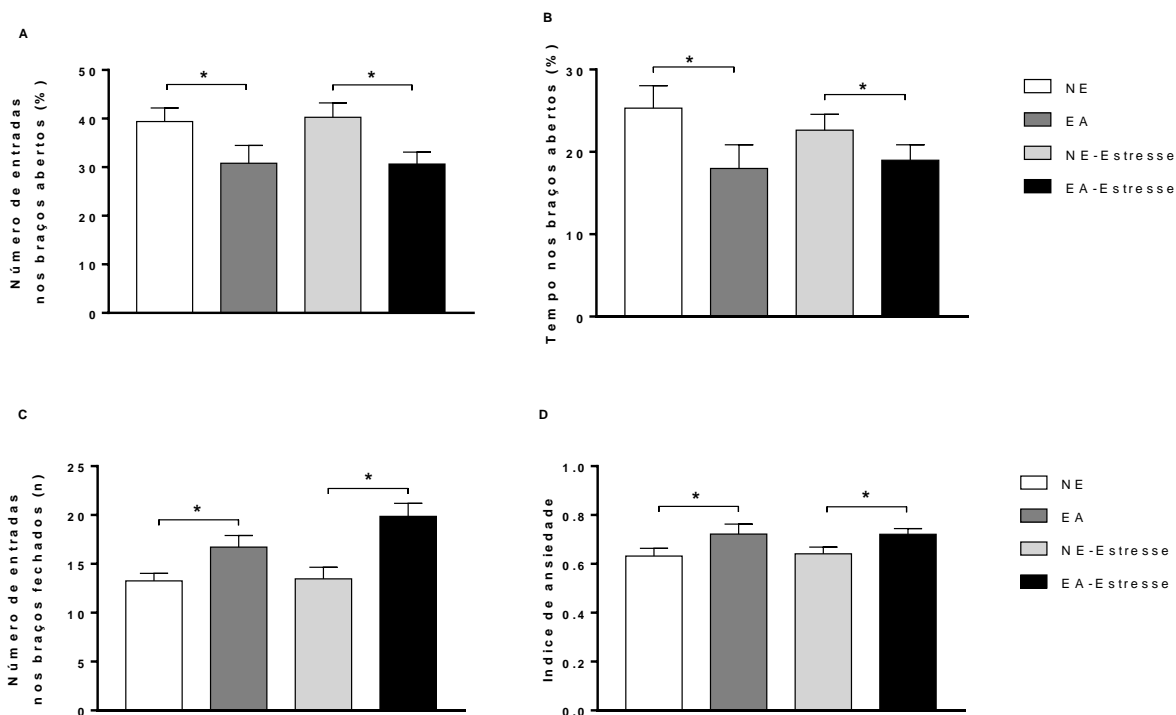
A – C: dados em média±EPM expressos em % corrigida em relação ao controle NE. **A:** Expressão de GR, NE: grupo não enriquecido (n=5), EA: grupo enriquecido (n=5). Teste t-Student. **B:** Expressão de pGR, NE: grupo não enriquecido (n=5), EA: grupo enriquecido (n=5). Teste t-Student. **C:** Expressão da razão pGR/GR, NE: grupo não enriquecido (n=5), EA: grupo enriquecido (n=5). Teste t-Student.

14.2 Experimento 2 - Efeitos do enriquecimento ambiental sobre o comportamento do tipo ansioso em animais expostos ao estresse crônico imprevisível

14.2.1 Teste de Labirinto em Cruz Elevado

A figura 12 apresenta os parâmetros avaliados para análise do comportamento do tipo ansioso. O número de entradas nos braços abertos foi analisado pela ANOVA-2 vias (ambiente X estresse) e revelou efeito significativo para o fator ambiente [$F_{(1,57)} = 4,77$; $p < 0.05$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls indicou menor entrada nos braços abertos do grupo EA em relação ao NE. Não foram encontradas diferenças para o fator estresse [$F_{(1,57)} = 0,11$; $p > 0.05$] ou interação entre eles [$F_{(1,57)} = 0,53$; $p > 0.05$]. A percentagem de tempo nos braços abertos foi analisada pela ANOVA-2 vias (ambiente X estresse) e revelou efeito significativo para o fator ambiente [$F_{(1,57)} = 8,47$; $p < 0.05$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls confirmou menor frequência nos braços abertos do grupo EA em relação ao NE. Não foram encontradas diferenças para o fator estresse [$F_{(1,57)} = 0,011$; $p > 0.05$] ou interação entre eles [$F_{(1,57)} = 0,03$; $p > 0.05$]. O número de entradas nos braços fechados foi analisado pela ANOVA-2 vias (ambiente X estresse) e revelou efeito significativo para o fator ambiente [$F_{(1,57)} = 18,36$; $p < 0.05$]. A análise *post hoc* de Newman-Keuls apontou maior número de entradas nos braços fechados do grupo EA em relação ao NE. Não foram encontradas diferenças para o fator estresse [$F_{(1,57)} = 2,11$; $p > 0.05$] ou interação entre eles [$F_{(1,57)} = 1,64$; $p > 0.05$]. O índice de ansiedade foi analisado pela ANOVA-2 vias (ambiente X estresse) e revelou efeito significativo para o fator ambiente [$F_{(1,57)} = 6,53$; $p < 0.05$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls confirmou maior índice de ansiedade do grupo EA em relação ao NE. Não foram encontradas diferenças para o fator estresse [$F_{(1,57)} = 0,018$; $p > 0.05$] ou interação entre eles [$F_{(1,57)} = 0,022$; $p > 0.05$].

Figura 12: Parâmetros para o comportamento do tipo ansioso analisados no Labirinto em Cruz Elevado em animais expostos ao enriquecimento e ao estresse imprevisível.



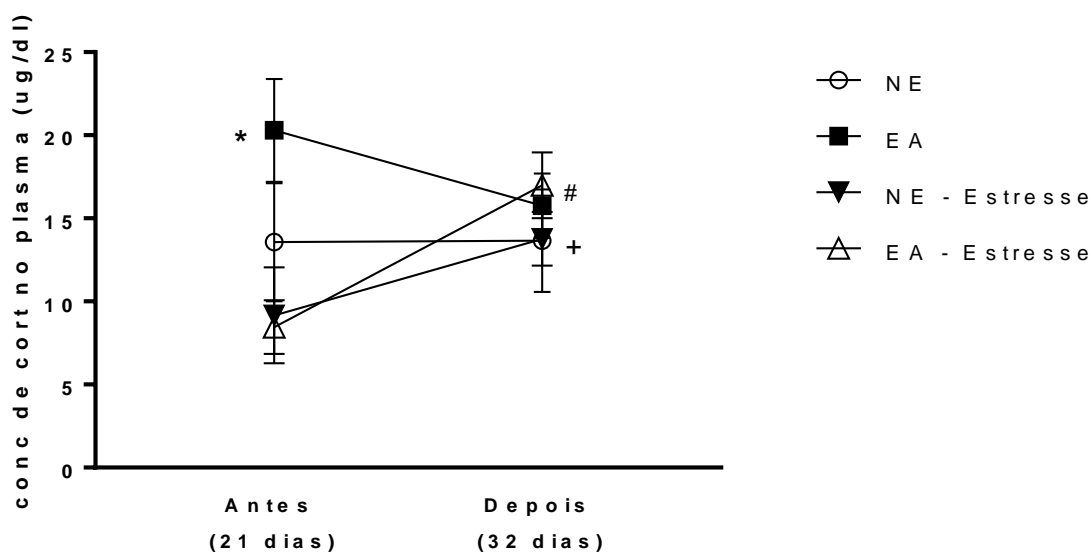
A: NE: grupo não enriquecido (n=15), EA: Grupo enriquecimento ambiental (n=18), dados em porcentagem. **B:** NE: grupo não enriquecido (n=15), EA: Grupo enriquecimento ambiental (n=18), dados em porcentagem. **C:** NE: grupo não enriquecido (n=15), EA: Grupo enriquecimento ambiental (n=18), dados em número absoluto. **D:** NE: grupo não enriquecido (n=15), EA: Grupo enriquecimento ambiental (n=18), dados expressos pelo índice de ansiedade = $[1 - (\text{frequência de entradas nos braços abertos} + \text{tempo de permanência nos braços abertos}) / 2]$. **A - D:** ANOVA de 2 vias de medidas repetidas, * $p < 0.05$ EA x NE fator ambiente.

14.2.2 Concentração de Corticosterona

A Figura 13 apresenta os efeitos do EA e do EA associado ao estresse e respectivos controles não enriquecido e não estressado sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona. Os resultados foram submetidos à ANOVA de 3 vias com medidas repetidas considerando-se os fatores: ambiente, estresse e tempo (antes e após estresse). Foram encontradas diferenças para os fatores ambiente [$F_{(1,25)} = 4,41$; $p < 0.05$], estresse [$F_{(1,25)} = 7,34$; $p < 0.05$] e interação tempo X estresse [$F_{(1,25)} = 4,25$; $p < 0.05$]. Não foi encontrada diferença para a interação entre

os fatores ambiente X estresse X tempo. O teste post hoc de Newman-Keuls para o fator ambiente apontou que os animais EA apresentaram maiores concentrações plasmáticas de corticosterona comparados aos NE. O teste post hoc para a interação tempo X estresse revelou aumento de corticosterona após o estresse.

Figura 13: Concentrações de corticosterona antes e depois do estresse nos grupos enriquecido e não enriquecido expostos ao estresse imprevisível.

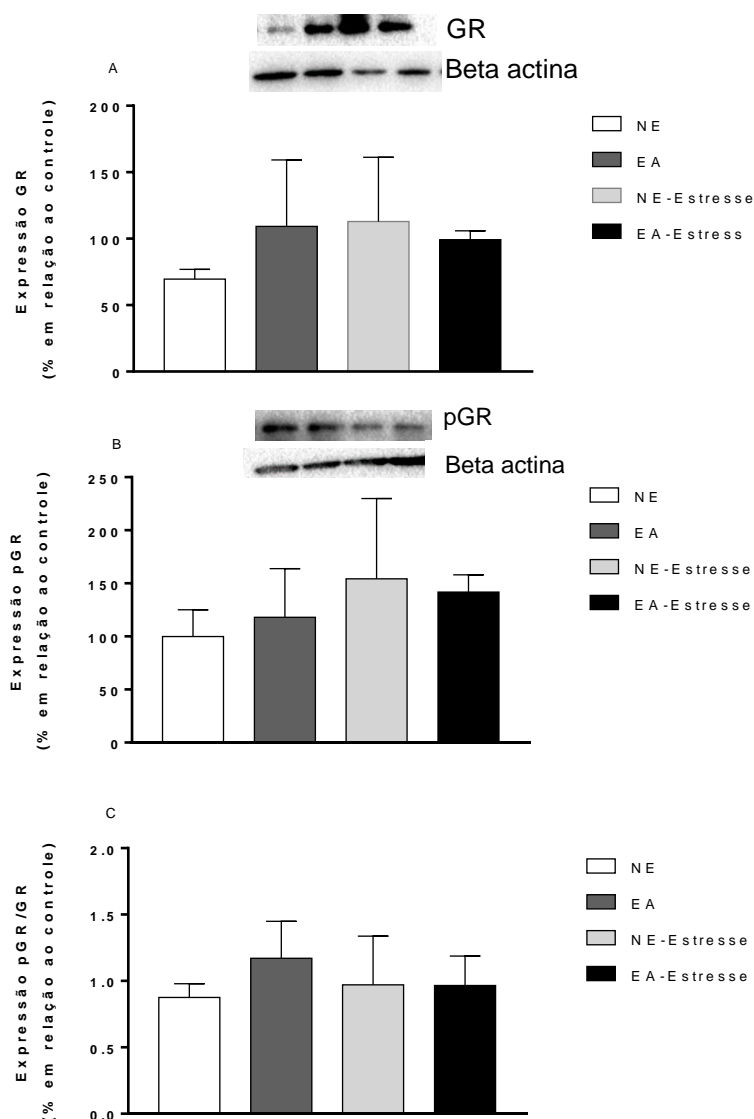


NE: grupo não enriquecido (n=5), EA: grupo enriquecido (n=8), NE-Estresse: grupo não enriquecido e estressado (n=8), EA-Estresse: grupo enriquecido e estressado (n=8). Teste ANOVA de três vias. *p<0.05, EA x NE; + p<0.05 NE-Estresse antes x NE-Estresse depois. # p<0.05, EA-Estresse antes x EA-Estresse depois.

14.2.3 Expressão de receptores de glicocorticoides (GR) e sua fração fosforilada (pGR) na amígdala

De acordo com a ANOVA de uma via (fator grupo) não houve diferença para a expressão de GR [F (3,15) = 0,78; p>0,05], pGR [F (3,15) = 0,23; p>0,05] e nem para a razão pGR/GR [F (3,15) = 0,20; p>0,05] que representa a translocação do receptor do núcleo para a membrana.

Figura 14: Expressão protéica de GR e pGR em animais expostos ou não ao enriquecimento ambiental e ao estresse crônico imprevisível.



A – C: dados em média±EPM expressos em % corrigida em relação ao controle NE. **A:** Expressão de GR, NE: grupo não enriquecido (n=4), EA: grupo enriquecido (n=5), NE-Estresse: grupo não enriquecido e estressado (n=5), EA-Estresse: grupo enriquecido e estressado (n=5), ANOVA de 1 via. **B:** Expressão de pGR, NE: grupo não enriquecido (n=4), EA: grupo enriquecido (n=5), NE-Estresse: grupo não enriquecido e estressado (n=5), EA-Estresse: grupo enriquecido e estressado (n=5), ANOVA de 1 via. **C:** Expressão da razão pGR/GR, NE: grupo não enriquecido (n=4), EA: grupo enriquecido (n=5), NE-Estresse: grupo não enriquecido e estressado (n=5), EA-Estresse: grupo enriquecido e estressado (n=5), ANOVA de 1 via.

14.3 Experimento 3 A - Efeitos do enriquecimento ambiental sobre o consumo de etanol durante e após exposição ao estresse crônico imprevisível

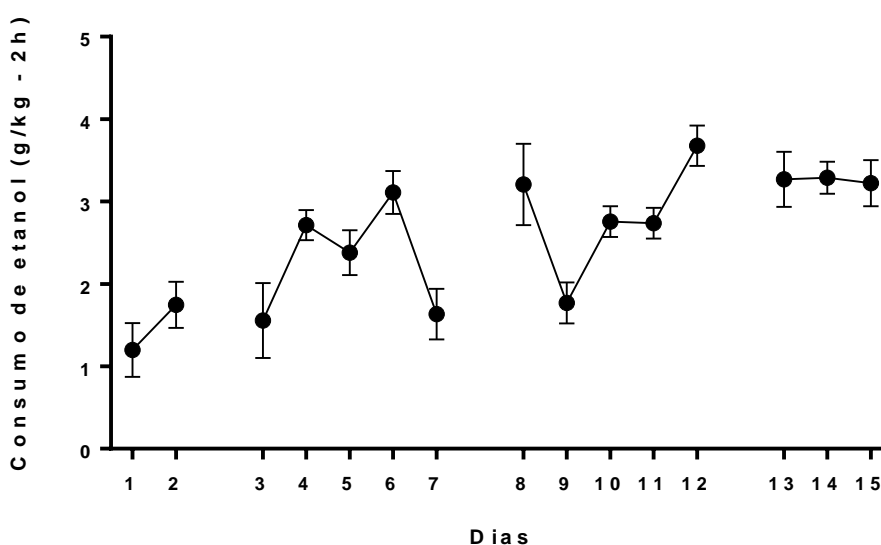
14.3.1 Consumo de Etanol

14.3.1.1 Aquisição

O período de aquisição (15 dias) é feito no início do delineamento de consumo intermitente de etanol com o intuito de estabilizar o consumo dos animais no período de 2h, de forma que os animais tenham um padrão já estabelecido de consumo, antes de outras intervenções relacionadas ao delineamento.

Como mostra a figura abaixo, o consumo de etanol varia ao longo dos dias, no início da aquisição. A variação se minimiza nos últimos dias, quando os animais passam a apresentar um certo padrão de menor amplitude de variação entre os dias. De acordo com a ANOVA de uma via para medidas repetidas [$F_{(1,15)} = 16,49$; $p > 0,05$] não há diferença significativa no consumo ao longo dos dias. Vale ressaltar que nesta etapa do delineamento os animais ainda não foram separados em grupos (enriquecido e não enriquecido). Sendo assim, nesta fase de aquisição é mostrada a média geral de consumo de todos os animais.

Figura 15: Consumo de etanol na fase de aquisição.



Dados em média \pm EPM de consumo, por dia, de todos os animais ($n=17$). Teste ANOVA 1 via.

14.3.1.2 Consumo prolongado intermitente

A Figura 16 mostra o consumo crônico de etanol e água de animais expostos em EA ou NE ao longo de 33 dias, sendo que entre os dias 16 e 26 (área sombreada em cinza no gráfico) os animais foram expostos ao estresse crônico imprevisível.

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas (ambiente e dias) não mostrou diferença significativa para o fator ambiente (consumo entre os grupos NE e EA) durante todo o período analisado [$F_{(1,15)} = 0,78$; $p > 0,05$]. Porém, houve diferença de consumo entre os dias [$F_{(32,480)} = 14,29$; $p < 0,001$] e também houve interação entre os fatores ambiente x dias [$F_{(32,480)} = 1,89$; $p < 0,01$]. O teste de post-hoc Newman Keuls mostrou aumento no consumo de etanol em ambos os grupos no dia seguinte ao último estresse imprevisível. Além disso, o EA exibiu um consumo mais elevado comparado ao NE.

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas realizada para comparação do consumo de etanol entre os grupos NE e EA antes do estresse (dias 1 até 15) revelou diferenças entre os dias [$F_{(14, 210)} = 2,15$; $p < 0,05$]. Não foram encontradas diferenças entre os grupos [$F_{(1,15)} = 0,62$; $p > 0,05$].

Se analisarmos somente o período de estresse crônico imprevisível (dias 16 a 26, sombreado em cinza, figura 13), o teste de ANOVA de duas vias para medidas repetidas mostra diferença significativa para o fator grupo [$F_{(1,15)} = 5,24$; $p < 0,05$] e para o fator dias [$F_{(10,150)} = 9,30$; $p < 0,001$]. Não houve interação entre os fatores. A análise a posteriori revelou que o grupo EA consumiu mais etanol comparado com o grupo NE. O consumo também variou de acordo com os diferentes tipos de estresse.

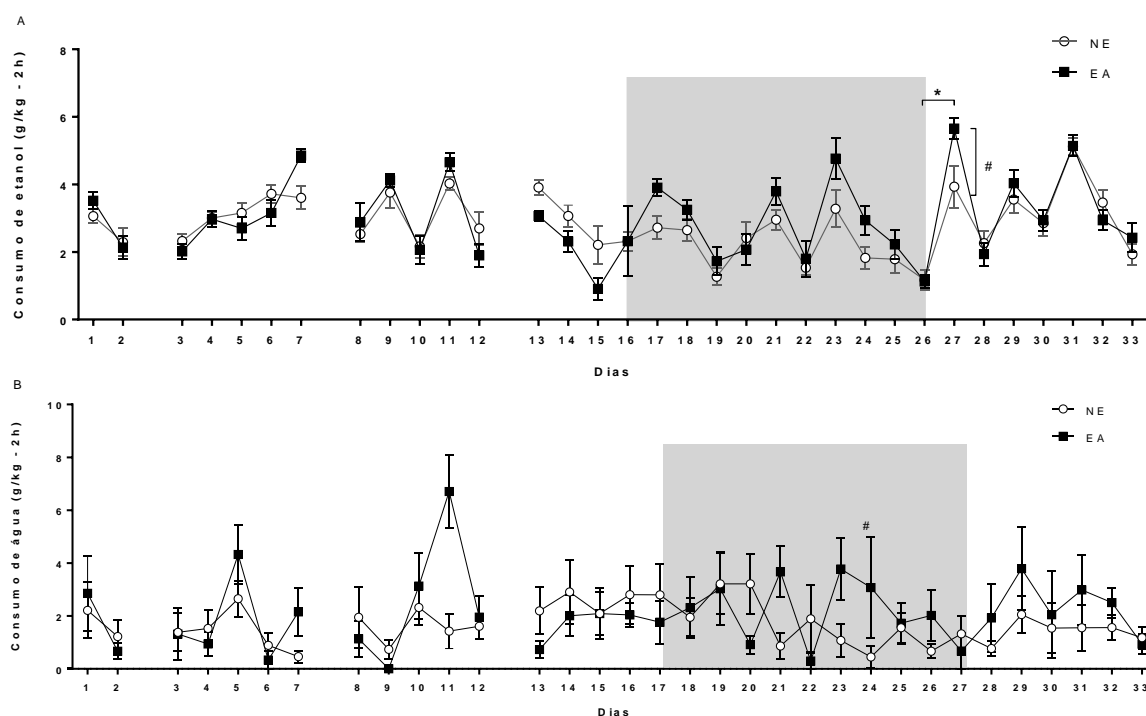
A ANOVA de duas vias para medidas repetidas realizada para os resultados de consumo após o estresse revelou diferenças para o fator dias ($F_{(6,90)} = 21,41$; $p < 0,001$). Não foram encontradas diferenças para o fator grupo ($F_{(1,15)} = 0,87$; $p > 0,05$) ou interação entre os fatores ($F_{(6,90)} = 2,06$; $p > 0,05$). Houve variação entre os dias após consumo, provavelmente decorrente do efeito pós-estresse.

Na análise do consumo de água a ANOVA de duas vias para medidas repetidas (ambiente e dias) para todo o intervalo analisado não mostrou diferença significativa para o fator ambiente (consumo entre os grupos NE e EA) durante todo o período analisado [$F_{(1,14)} = 1,08$; $p > 0,05$], assim como não houve diferença de

consumo entre os dias [$F_{(32,448)} = 0,86$; $p > 0,05$] e também não houve interação entre os fatores [$F_{(32,448)} = 1,14$; $p > 0,05$].

Se analisarmos o consumo de água apenas durante o período de estresse a ANOVA de duas vias para medidas repetidas mostra que não houve diferença de consumo entre os grupos (fator ambiente) [$F_{(1,15)} = 4,02$; $p > 0,05$] nem entre os dias [$F_{(10,150)} = 1,61$; $p > 0,05$]; contudo, houve interação entre os fatores (ambiente X dias) [$F_{(10,150)} = 3,05$; $p < 0,001$]. O post-hoc de Newman Keuls mostrou uma diferença de consumo entre os dias 22 e 23 no grupo EA.

Figura 16: Consumo de etanol e água – experimento 3A.



A: Consumo de etanol, NE: grupo não enriquecido (n=10), EA: Grupo enriquecimento ambiental (n=7), Dados em média \pm EPM de consumo, por dia, ANOVA duas vias, $p < 0,05$; *Aumento no consumo de etanol do dia 26 para o 27 em ambos os grupos; # aumento no consumo de etanol, EA x NE. A área sombreada em cinza destaca os dias nos quais os animais foram expostos ao estresse crônico imprevisível. **B:** Consumo de água, NE: grupo não enriquecido (n=10), EA: Grupo enriquecimento ambiental (n=7), Dados em média \pm EPM de consumo, por dia, ANOVA duas vias, $p < 0,05$; # aumento no consumo de água EA dia 22 x EA dia 23. A área sombreada em cinza destaca os dias nos quais os animais foram expostos ao estresse crônico imprevisível.

14.3.1.3 Reexposições

As duas reexposições foram feitas após períodos de 6 dias de privação ao etanol, em que as duas garrafas foram oferecidas por 24 horas, sendo que a quantidade de álcool e de água consumida foi avaliada após 2 e 24 horas da reexposição.

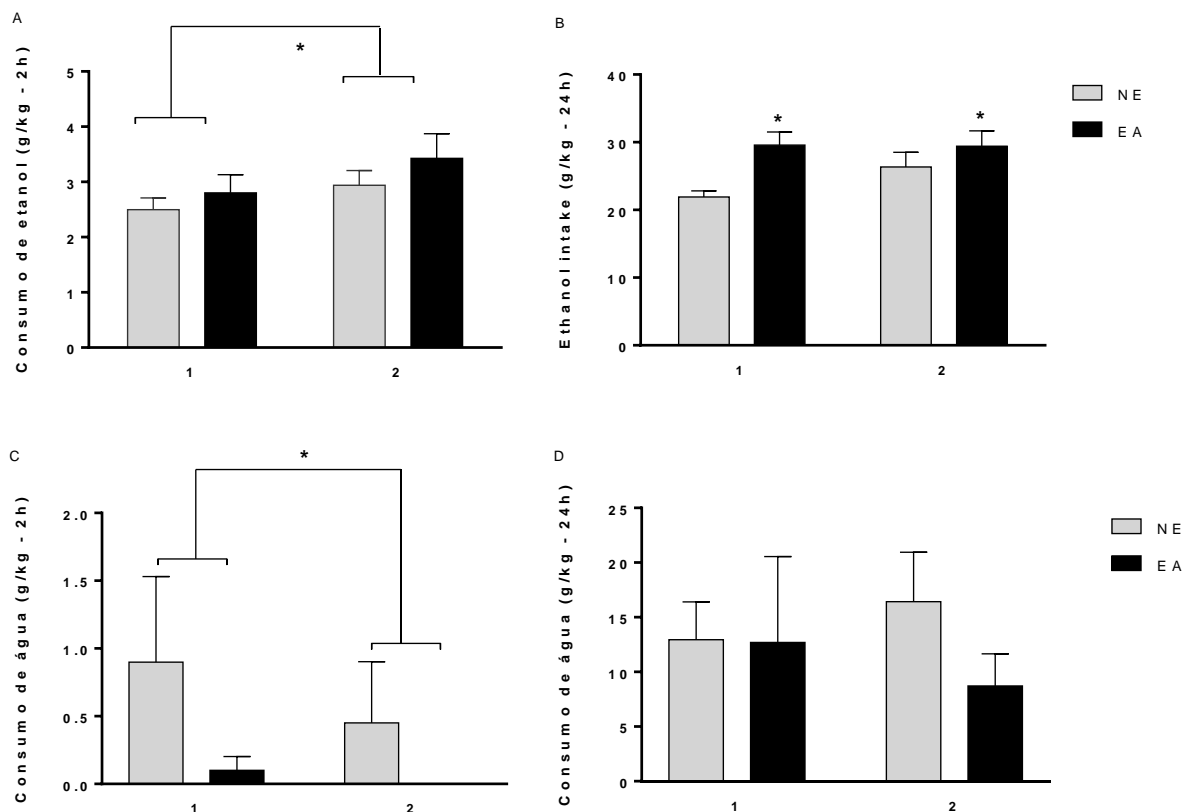
A ANOVA de duas vias para medidas repetidas (ambiente X reexposição) do consumo de 2 horas revelou diferença para o fator reexposição [$F_{(1,15)} = 2,33$; $p < 0,05$]. Não foram encontradas diferenças para o fator ambiente [$F_{(1,15)} = 1,06$; $p > 0,05$] ou interação entre os fatores [$F_{(1,15)} = 0,07$; $p > 0,05$]. A análise a posteriori revelou que os animais consumiram mais etanol na segunda reexposição, revelando um efeito de privação de etanol.

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas (ambiente X reexposição) do consumo de 24 h revelou diferença para o fator ambiente [$F_{(1,15)} = 6,36$; $p < 0,05$]. Não foram encontradas diferenças para o fator reexposição [$F_{(1,15)} = 1,86$; $p > 0,05$] ou interação entre os fatores [$F_{(1,15)} = 2,13$; $p > 0,05$]. A análise a posteriori revelou que os animais do grupo EA consumiram mais etanol do que os NE.

Na análise do consumo de água de 2 horas, na ANOVA de duas vias para medidas repetidas (ambiente X reexposição) houve diferença para o fator reexposição [$F_{(1,15)} = 10,16$; $p < 0,01$] mas não para o fator ambiente [$F_{(1,15)} = 0,01$; $p > 0,05$] e para a interação entre os fatores [$F_{(1,15)} = 0,00$; $p > 0,05$]. De acordo com o post-hoc de Newman Keuls as reexposições 1 e 2 são diferentes entre si, com menor consumo na 2.

Por fim, no consumo de água de 24 horas a ANOVA de duas vias para medidas repetidas (ambiente X reexposição) não mostrou diferença o fator ambiente [$F_{(1,15)} = 0,67$; $p > 0,05$] e nem para o fator reexposição [$F_{(1,15)} = 0,00$; $p > 0,05$]. Também não houve interação entre os fatores [$F_{(1,15)} = 0,57$; $p > 0,05$].

Figura 17: Reexposições após período de privação – experimento 3A.

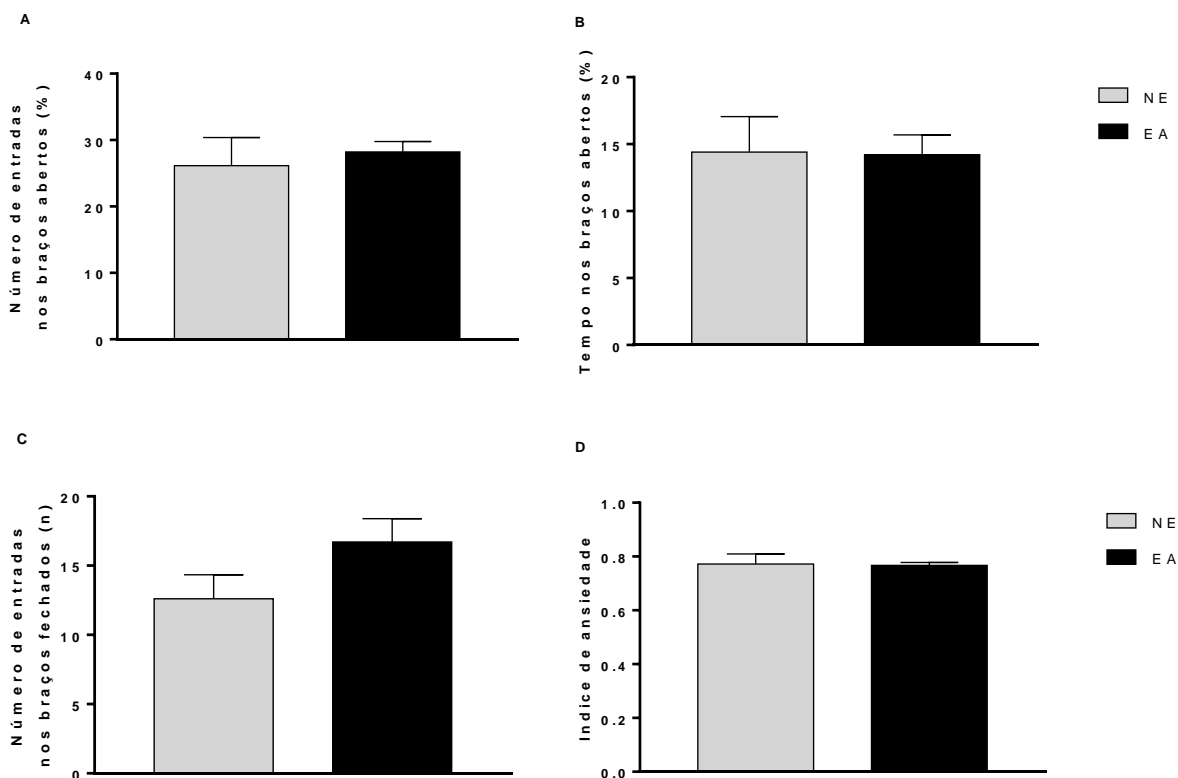


A: Consumo de etanol, NE: grupo não enriquecido (n=10). EA: Grupo enriquecimento ambiental (n=7), dados em média \pm EPM de consumo por 2h, ANOVA 2 vias de medidas repetidas. * $p < 0.05$, reexposição 2 x reexposição 1. **B:** Consumo de etanol NE: grupo não enriquecido (n=10), EA: Grupo enriquecimento ambiental (n=7), dados em média \pm EPM de consumo por 24h, ANOVA 2 vias de medidas repetidas. * $p < 0.05$, EA x NE. **C:** Consumo de água, NE: grupo não enriquecido (n=10), EA: Grupo enriquecimento ambiental (n=7), dados em média \pm EPM de consumo por 24h, ANOVA 2 vias de medidas repetidas. * $p < 0.05$, reexposição 2 x reexposição 1. **D:** Consumo de água, NE: grupo não enriquecido (n=10), EA: Grupo enriquecimento ambiental (n=7), dados em média \pm EPM de consumo por 24h, ANOVA 2 vias de medidas repetidas.

14.3.2 Teste de Labirinto em Cruz Elevado

A análise pelo teste t-Student não mostrou diferenças entre os grupos para nenhum dos parâmetros analisados.

Figura 18: Parâmetros para o comportamento do tipo ansioso analisados no Labirinto em Cruz Elevado em animais expostos ao enriquecimento, estresse e etanol.

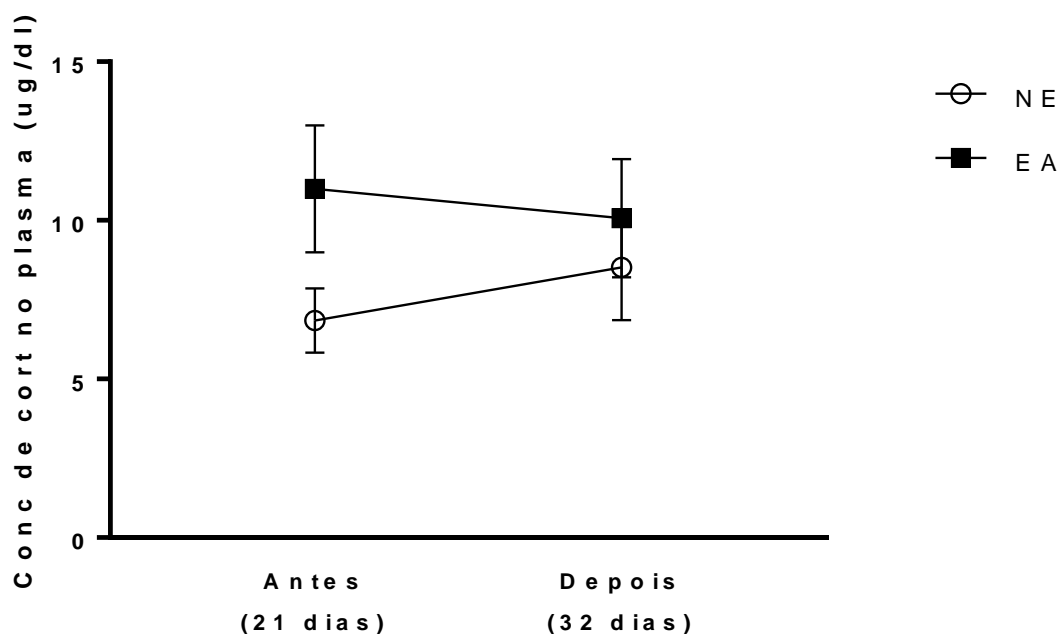


A: NE: grupo não enriquecido (n=10), EA: Grupo enriquecimento ambiental (n= 7), dados em porcentagem. **B:** EA: Grupo enriquecimento ambiental (n= 7), NE: grupo não enriquecido (n=10), dados em porcentagem. **C:** EA: Grupo enriquecimento ambiental (n= 7), NE: grupo não enriquecido (n=10), dados em número absoluto. **D:** EA: Grupo enriquecimento ambiental (n= 7), NE: grupo não enriquecido (n=10), dados expressos pelo índice de ansiedade = $[1 - (\text{frequência de entradas nos braços abertos} + \text{tempo de permanência nos braços abertos}) / 2]$. **A – D:** Teste t-Student.

14.3.3 Concentração de Corticosterona

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas (ambiente X dia) não mostrou diferença significativa para os fatores ambiente [$F_{(1,16)} = 2,06$; $p > 0,05$] e dia [$F_{(1,16)} = 0,04$; $p > 0,05$]. Não houve interação entre os fatores [$F_{(1,16)} = 0,52$; $p > 0,05$].

Figura 19: Concentrações de corticosterona antes e depois do estresse dos grupos enriquecido e não enriquecido expostos ao estresse imprevisível e ao consumo de etanol.

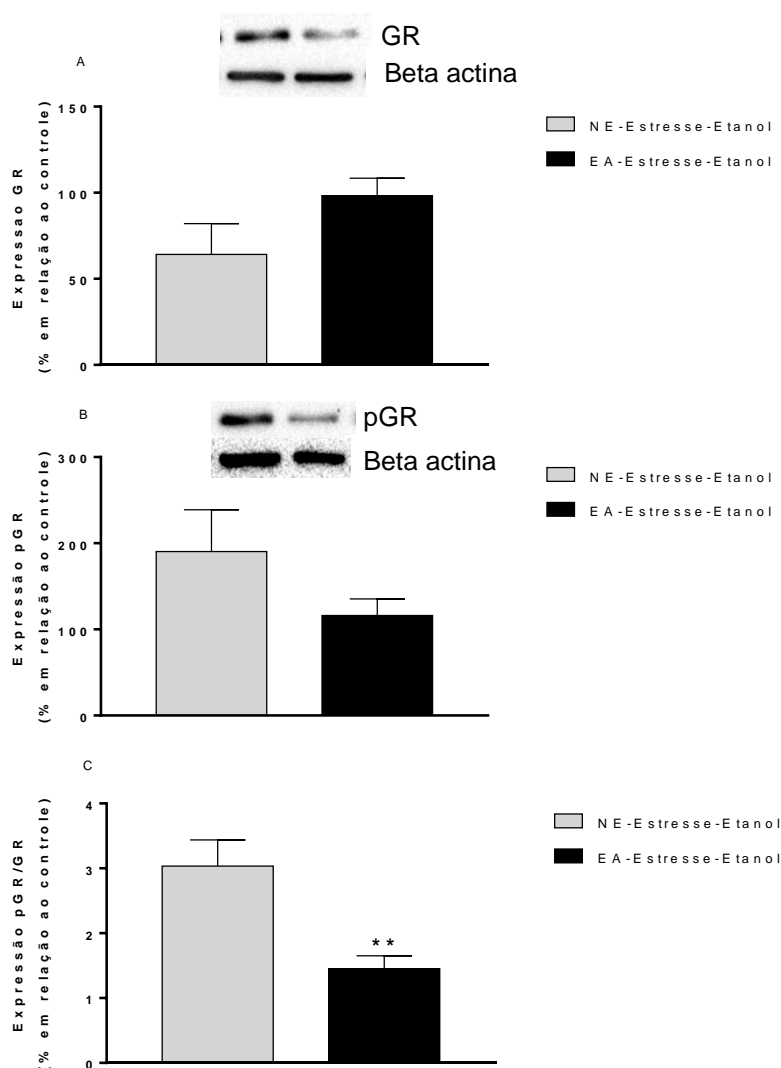


Dados em média \pm EPM. NE: grupo não enriquecido (n=7); EA: grupo enriquecido (n=11). ANOVA de duas vias de medidas repetidas.

14.3.4 Expressão de receptores de glicocorticoides (GR) e sua fração fosforilada (pGR) na amígdala

A análise pelo teste t-Student não mostrou diferença para a expressão de GR e pGR entre os grupos. Porém, o parâmetro pGR/GR, que representa a translocação do receptor, foi menor no grupo enriquecido (NE-Estresse-Etanol: $3,03 \pm 0,9$; EA-Estresse-Etanol: $1,45 \pm 0,44$; $p < 0,01$).

Figura 20: Expressão proteica de GR e pGR em animais expostos ou não ao enriquecimento ambiental, estresse crônico imprevisível e consumo de etanol.



A – C: dados em média±EPM expressos em % corrigida em relação ao controle NE. **A:** Expressão de GR, NE-Estresse-Etanol: grupo não enriquecido exposto ao estresse e ao consumo voluntário de etanol (n=5), EA-Estresse-Etanol: grupo enriquecido e exposto ao estresse e ao consumo voluntário de etanol (n=5), teste t-Student. **B:** Expressão de pGR, NE-Estresse-Etanol: grupo não enriquecido exposto ao estresse e ao consumo voluntário de etanol (n=5), EA-Estresse-Etanol: grupo enriquecido e exposto ao estresse e ao consumo voluntário de etanol (n=5), teste t-Student. **C:** Expressão da razão pGR/GR, NE-Estresse-Etanol: grupo não enriquecido exposto ao estresse e ao consumo voluntário de etanol (n=5), EA-Estresse-Etanol: grupo enriquecido e exposto ao estresse e ao consumo voluntário de etanol (n=5), teste t-Student, **p<0,01.

14.4 Experimento 3 B - Estudo do comportamento do tipo ansioso e períodos de privação em animais enriquecidos e expostos ao estresse crônico imprevisível

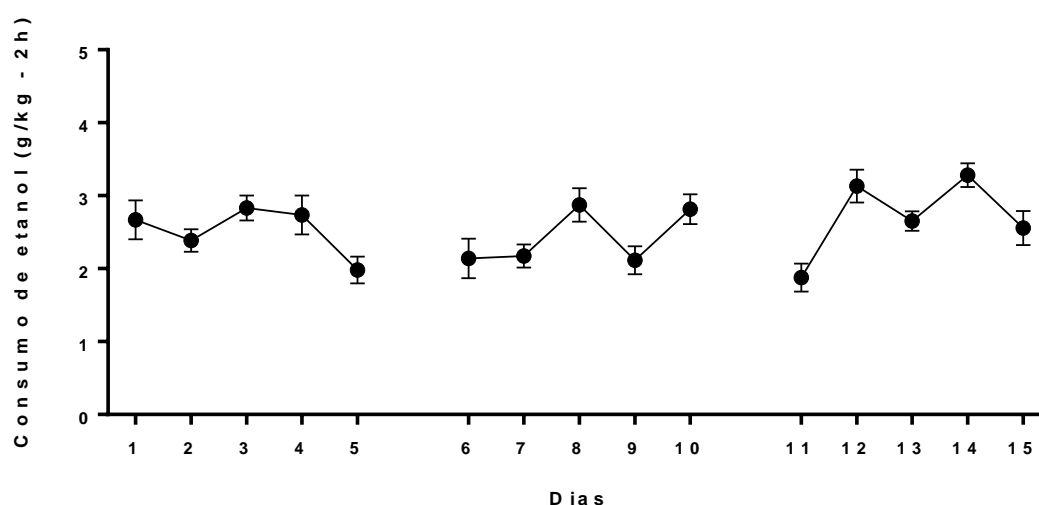
14.4.1 Consumo de Etanol

14.4.1.1 Aquisição

O período de aquisição (15 dias) é feito no início do delineamento de consumo intermitente de etanol com o intuito de estabilizar o consumo dos animais no período de 2h, de forma que os animais tenham um padrão já estabelecido de consumo, antes de outras intervenções relacionadas ao delineamento.

Como pode ser visto na figura abaixo existe uma pequena variação no consumo ao longo dos dias, contudo, de acordo com o teste ANOVA de uma via para medidas repetidas [$F_{(1,16)} = 0,38$; $p > 0,05$] não há diferença significativa no consumo ao longo dos dias. Vale ressaltar que nesta etapa do delineamento os animais ainda não foram separados em grupos (enriquecido e não enriquecido), sendo assim, nesta fase de aquisição é mostrada a média geral de consumo de todos os animais.

Figura 21: Consumo de etanol na fase de aquisição – experimento 3B.



Dados em média \pm EPM de consumo, por dia, de todos os animais (n=18). Teste ANOVA uma via.

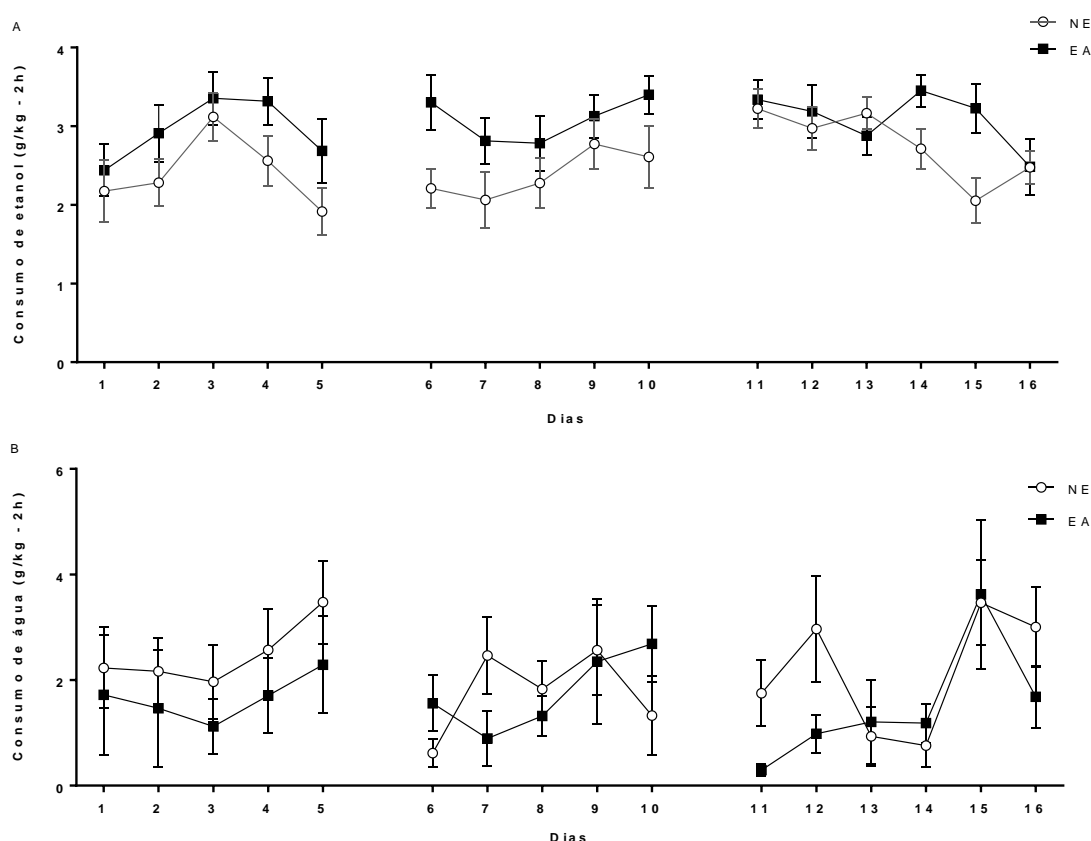
14.4.1.2 Consumo prolongado intermitente

O consumo crônico de etanol e água se iniciou logo após o período de aquisição e perdurou até antes do início do estresse crônico imprevisível.

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas (ambiente X dia) não mostrou diferença significativa para o fator ambiente [$F_{(1,16)} = 2,64$; $p > 0,05$]. Houve diferença no fator dia [$F_{(15,240)} = 4,11$; $p < 0,001$] porém não houve interação entre os fatores [$F_{(15,240)} = 1,56$; $p > 0,05$].

Para o consumo de água a ANOVA de duas vias para medidas repetidas (ambiente X dia) não mostrou diferença significativa para o fator ambiente [$F_{(1,16)} = 1,96$; $p > 0,05$] e para o fator dia [$F_{(15,240)} = 1,29$; $p > 0,05$]. Não houve interação entre os fatores [$F_{(15,240)} = 0,83$; $p > 0,05$].

Figura 22: Consumo de etanol e água – experimento 3B.



A: Consumo de etanol, NE: grupo não enriquecido (n=10), EA: Grupo enriquecimento ambiental (n=8), Dados em média \pm EPM de consumo, por dia. Teste ANOVA duas vias. **B:** Consumo de água, NE: grupo não enriquecido (n=10), EA: Grupo enriquecimento ambiental (n=8), Dados em média \pm EPM de consumo, por dia. Teste ANOVA duas vias.

14.4.1.3 Reexposições

A primeira reexposição foi feita logo após o término do período de exposição ao estresse por 11 dias, sendo este o tempo de privação ao etanol; as demais reexposições foram feitas após períodos de 6 dias de privação. Em todas as reexposições duas garrafas (água e etanol 20%) foram oferecidas por 24 horas e o consumo avaliado após 2 e 24 horas.

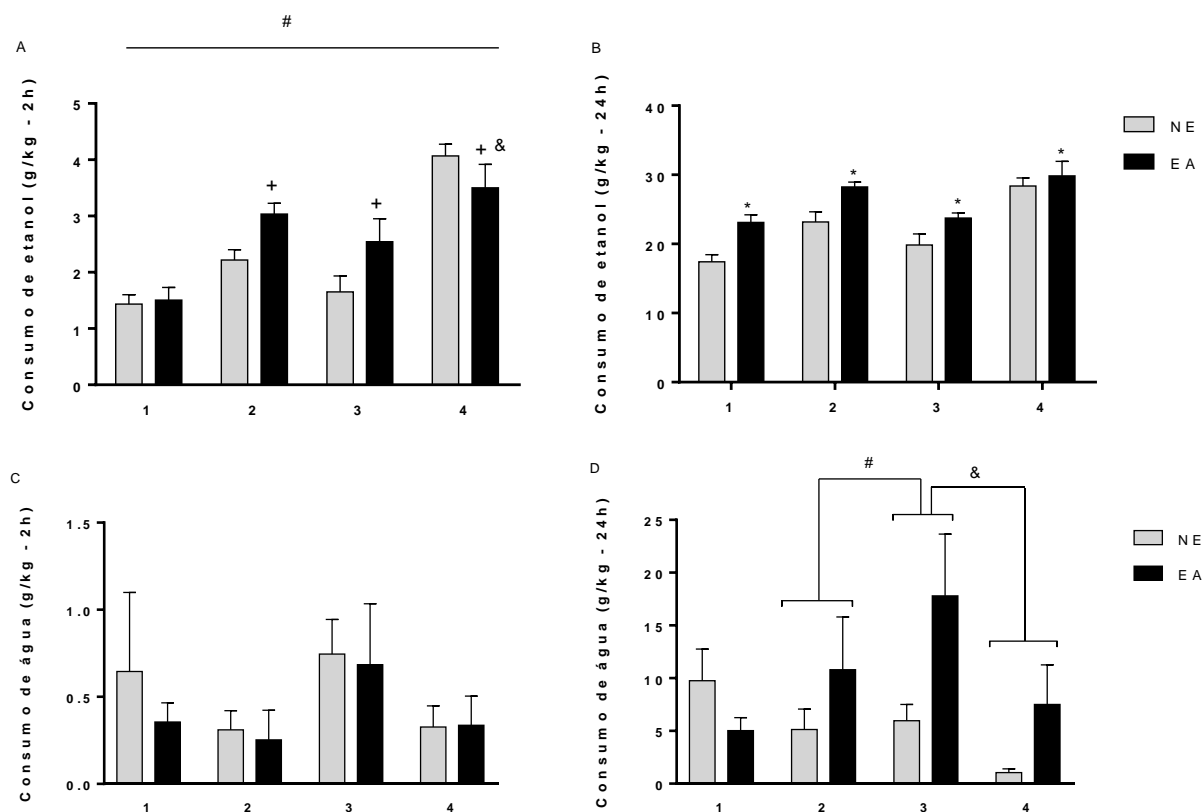
A ANOVA de duas vias para medidas repetidas (ambiente X reexposição) do consumo de etanol de 2 horas não revelou diferença para o fator ambiente [$F_{(1,16)}= 1,40$; $p>0,05$]. Houve, contudo, diferença para o fator dia [$F_{(3,48)}= 37,50$; $p<0,001$] e interação entre os fatores ambiente x dia [$F_{(3,48)}= 4,61$; $p<0,01$]. O post-hoc de Newman-Keuls para o fator dia mostrou diferença no consumo entre todas as reexposições. Já o post-hoc de Newman-Keuls ambiente X dia mostrou maior consumo do grupo EA nas reexposições 2, 3 e 4 em comparação com ele mesmo na reexposição 1; maior consumo do grupo EA na reexposição 4 em comparação com a 3.

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas (ambiente X reexposição) do consumo de etanol de 24 h mostrou diferença para o fator ambiente [$F_{(1,16)}= 9,14$; $p<0,01$] e para o fator dia [$F_{(3,48)}= 26,87$; $p<0,001$] mas não houve interação entre os fatores [$F_{(3,48)}= 1,48$; $p>0,05$]. A análise a posteriori pelo post-hoc de Newman-Keuls revelou que o grupo EA consumiu mais etanol com relação ao controle em todas as reexposições de 24 horas.

Para o consumo de água de 2 horas a ANOVA de duas vias para medidas repetidas (ambiente X reexposição) mostrou diferença para o fator ambiente [$F_{(1,16)}= 9,48$; $p<0,01$] mas não houve diferença para o fator dia [$F_{(3,48)}= 0,84$; $p>0,05$] nem interação entre os fatores [$F_{(3,48)}= 0,26$; $p>0,05$].

Para o consumo de água de 24 horas a ANOVA de duas vias para medidas repetidas (ambiente X reexposição) não mostrou diferença para o fator ambiente [$F_{(1,16)}= 1,79$; $p>0,05$] mas houve diferença para o fator dia [$F_{(3,48)}= 3,35$; $p<0,05$]. Não houve interação entre os fatores [$F_{(3,48)}= 2,44$; $p>0,05$]. A análise a posteriori pelo post-hoc de Newman-Keuls revelou que a reexposição 3 teve diferença no consumo com relação à 2 e a reexposição 4 foi diferente com relação à 3.

Figura 23: Reexposições após períodos de privação – experimento 3B.

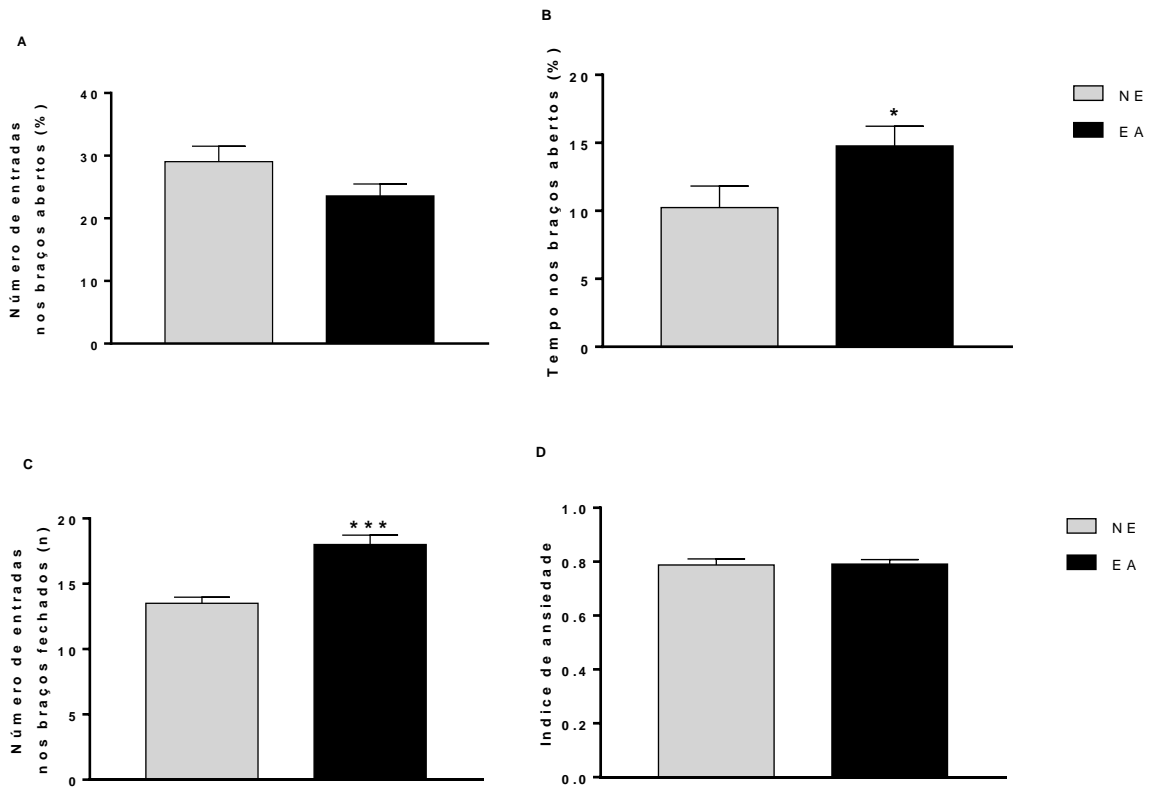


A: Consumo de etanol, NE: grupo não enriquecido (n=10), EA: Grupo enriquecimento ambiental (n=8), dados em média \pm EPM de consumo por 2h, ANOVA de duas vias. # diferença no consumo entre as reexposições, + aumento no consumo EA-4 x EA-1, EA-2 x EA-1 e EA-3 x EA-1, & aumento no consumo EA-4 x EA-3. **B:** Consumo de etanol, NE: grupo não enriquecido (n=10), EA: Grupo enriquecimento ambiental (n=8), dados em média \pm EPM de consumo por 24h, ANOVA de duas vias. *maior consumo de etanol no grupo EA em todas as reexposições, EA x NE. **C:** Consumo de água, NE: grupo não enriquecido (n=10), EA: Grupo enriquecimento ambiental (n=8), dados em média \pm EPM de consumo por 2h, ANOVA de duas vias. **D:** Consumo de água, NE: grupo não enriquecido (n=10), EA: Grupo enriquecimento ambiental (n=8), dados em média \pm EPM de consumo por 24h, ANOVA de duas vias. # reexposição 3 x reexposição 2, & reexposição 4 x reexposição 3.

14.4.2 Teste de Labirinto em Cruz Elevado

A análise dos parâmetros comportamentais pelo teste t-Student revelou diferenças significantes para a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos e número de entradas nos braços fechados, ambos maiores no grupo EA.

Figura 24: Parâmetros para o comportamento do tipo ansioso analisados no Labirinto em Cruz Elevado em animais expostos ao enriquecimento, estresse e etanol.



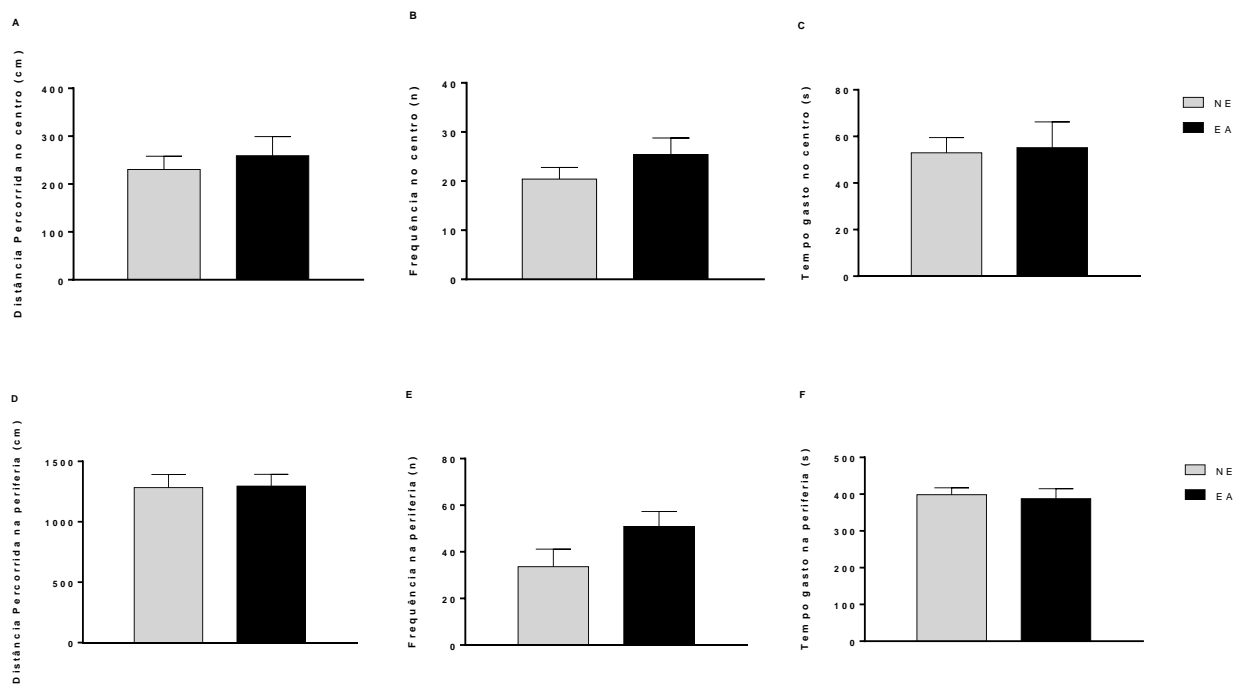
A: NE: grupo não enriquecido (n=10), EA: Grupo enriquecimento ambiental (n= 10), dados em porcentagem. **B:** NE: grupo não enriquecido (n=10), EA: Grupo enriquecimento ambiental (n= 10), dados em porcentagem. **C:** NE: grupo não enriquecido (n=10), EA: Grupo enriquecimento ambiental (n= 10), dados em número absoluto. **D:** NE: grupo não enriquecido (n=10), EA: Grupo enriquecimento ambiental (n= 10), dados expressos pelo índice de ansiedade = $[1 - (\text{frequência de entradas nos braços abertos} + \text{tempo de permanência nos braços abertos}) / 2]$. **A – D:** Teste t-Student não pareado. *p<0,05 ***p<0,0001.

Este resultado indica que neste experimento o enriquecimento não está relacionado com o desenvolvimento de um comportamento do tipo ansioso. De maneira semelhante, no experimento 3A o ambiente enriquecido não elicitou um comportamento do tipo ansioso.

14.4.3 Teste de Campo Aberto

A análise da atividade locomotora no campo aberto pelo teste t-Student não mostrou diferença significativa entre os grupos para nenhum dos parâmetros.

Figura 25: Influência do enriquecimento ambiental sobre a atividade locomotora em campo aberto.

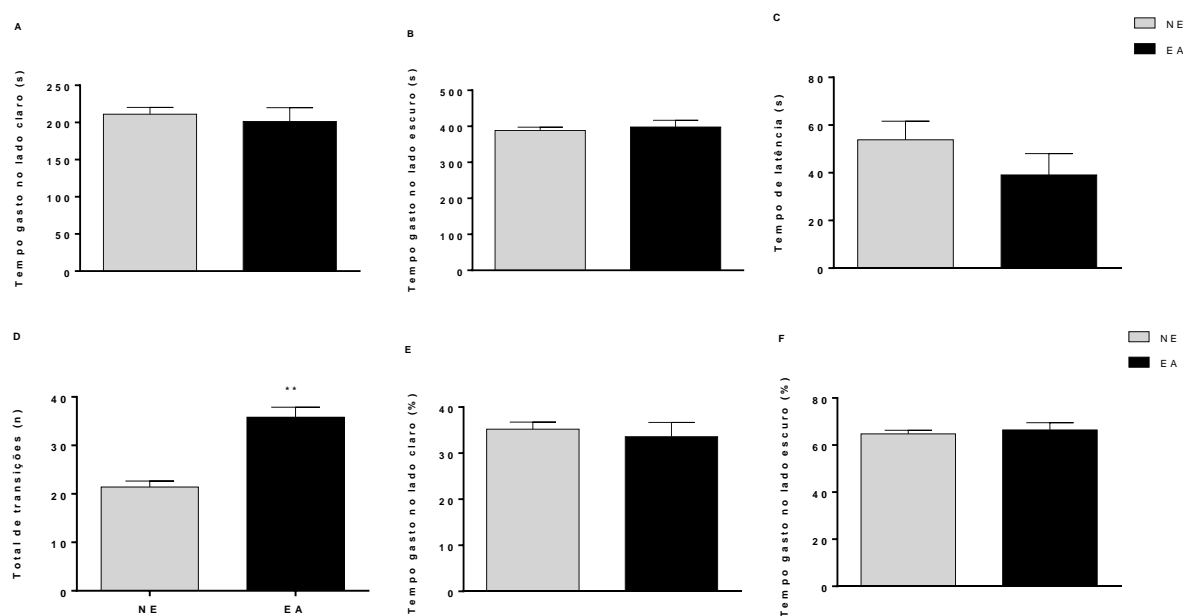


NE: grupo não enriquecido (n=10), EA: Grupo enriquecimento ambiental (n=10), Dados em média \pm EPM. Teste t-Student.

14.4.4 Teste de Caixa Claro Escuro

A análise do comportamento do tipo ansioso pelo teste t-Student mostrou diferença significativa apenas para o total de transições, que foi maior para o grupo EA.

Figura 26: Influência do enriquecimento ambiental sobre o comportamento do tipo ansioso em caixa claro escuro.



NE: grupo não enriquecido (n=10), EA: Grupo enriquecimento ambiental (n=10), Dados em média \pm EPM. Teste t-Student.

15 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que enriquecimento ambiental (EA) *per se* (experimento 1), por um período prolongado, foi capaz de alterar a expressão gênica de diferentes éxons relacionados com a transcrição do *Bdnf*, mas não alterou a expressão proteica de BDNF, fator que pode estar relacionado a uma questão temporal entre transcrição e expressão proteica ou ao baixo número amostral nos ensaios de western blot. A expressão de receptores de glicocorticóides (GR) na amígdala também não foi alterada. A resposta bioquímica da exposição ao ambiente enriquecido bem como o comportamento dos animais só mostrou alteração quando os animais enriquecidos foram testados frente a um protocolo de estresse crônico imprevisível (EI) (experimento 2). Nesta condição (EI) observou-se um comportamento do tipo ansioso nos animais do ambiente enriquecido e um aumento nas concentrações de corticosterona, relacionado ao estresse. Quando a estratégia ambiental foi testada frente ao EI e à exposição ao etanol (experimentos 3 A), os

animais enriquecidos não tiveram alteração nas concentrações de corticosterona e nem no comportamento do tipo ansioso mas mostraram um aumento no consumo de etanol durante e após o estresse. Diante de períodos de privação, os animais enriquecidos consumiram mais etanol quando reexpostos à droga. No experimento 3B o perfil de consumo foi semelhante, com maior consumo de etanol nas reexposições para o grupo EA. Esses animais apresentaram maior entrada nos braços abertos e fechados, um indicativo de maior sensibilidade aos efeitos de privação ao etanol. Inclusive, o consumo de etanol foi maior nesse grupo logo após a primeira reexposição.

A avaliação do comportamento do tipo ansioso medido no labirinto em cruz elevado em animais expostos somente ao EA (experimento 1) não mostrou alterações. Neste sentido a literatura apresenta diferentes resultados, com alguns trabalhos sugerindo efeito ansiolítico (Soares et al., 2015; Rae et al., 2018). Tratando-se da corticosterona, este mesmo estudo encontrou resultado semelhante, no qual o EA não alterou os níveis de corticosterona em roedores (Lopes et al., 2018). Uma resposta semelhante também foi descrita em McQuaid et al., (2012) no qual as concentrações basais de corticosterona também não mostraram alteração em animais mantidos em ambiente enriquecido.

A análise da expressão gênica mostrou um aumento significativo na expressão dos éxons 4, em duas regiões do éxon 9, no éxon 2 e no éxon 6 para os animais enriquecidos. Com exceção dos éxons 4 e 9, que já foram previamente relatados na literatura, embora amplificados com primers de diferentes sequências (Roth et al.2009; Roth et al., 2011; Karpova et al., 2014) os resultados para os éxons 2 e 6 podem fornecer um indicativo de que estas regiões também são importantes no controle epigenético da expressão do gene em questão, o *Bdnf*.

O aumento da expressão gênica do éxon 4 do *Bdnf* nos levou a especular o perfil de metilação neste éxon, através da análise nas regiões CpG. Foram avaliadas diversas regiões CpG ao longo do éxon, mostrando uma diminuição significativa na metilação para os animais EA em 2 posições CpG (ilhas CpG 5 e 10). Já foi previamente descrito na literatura que a expressão do éxon 4 pode ser alterada por mecanismos epigenéticos (Roth et al.2009; Moonat et al. 2013; Pandey et al. 2015; Sakharkar et al. 2016; Kyzar et al., 2017). Nossa hipótese foi de que os animais EA apresentariam menor metilação do DNA comparados aos controles.

Diante de nossos achados, a maior expressão gênica nos EA em relação aos NE vai ao encontro da diminuição na metilação, mesmo que discreta.

Num estudo recente, no qual camundongos adultos foram estudados frente à exposição a um estresse social, o nível de metilação do DNA no córtex pré-frontal também foi relativamente baixo, de forma que não houve diferença significativa entre os animais estressados e os controles (Xu et al., 2018). Neste mesmo estudo, foram descritas alterações nos níveis de RNAm do *Bdnf* no córtex pré-frontal (a mesma região analisada neste trabalho) dos animais expostos ao estresse. Mais detalhadamente, houve diminuição nos níveis de RNAm para o *Bdnf* total e para a região 4. Não houve alteração para as regiões 1 e 6. Em concordância, foram encontradas alterações epigenéticas no éxon 4 do *Bdnf* no córtex pré-frontal (Xu et al., 2018). Além do córtex pré-frontal o BDNF também possui papel de destaque na adaptação ao estresse em outras regiões como no hipocampo (Tsankova et al., 2006).

No experimento 2, diante da exposição a um protocolo de EI, a avaliação do comportamento no LCE após exposição ao estresse mostrou um comportamento do tipo ansioso para o grupo EA, evidenciando um efeito da habitação em todos os parâmetros analisados. Um estudo semelhante, com ratos, mostrou que o EA, ao contrário, protege contra a ansiedade induzida por estresse agudo (Novaes et al., 2017). Da mesma forma, existem dados opostos e que corroboram com o nosso resultado, sugerindo maior ansiedade em animais enriquecidos comparados aos seus controles (McQuaid et al., 2013). É importante destacar que nos estudos citados, as espécies usadas foram diferentes (ratos em Novaes et al., 2017 e camundongos em McQuaid et al., 2013).

Um trabalho anterior do nosso laboratório também mostrou que animais enriquecidos apresentaram uma diminuição no comportamento do tipo ansioso, por meio da diminuição na latência para acessar os braços abertos no LCE (Rae et al., 2018).

Nosso resultado, que vai na contramão da hipótese de que o enriquecimento gera um comportamento menos ansioso em animais estressados, possivelmente se deve a fatores relacionados ao tipo de estresse aplicado, que por ser crônico, não oferece um resultado consistente frente aos parâmetros de análise do teste de labirinto. Tem-se observado que os animais enriquecidos tendem a explorar mais o ambiente

nos primeiros minutos (Rueda, 2017; Rae et al., 2018), com gradativa diminuição com o decorrer do tempo. Com base no comportamento observado no presente experimento, o aumento no total de transições na caixa claro-escuro pode ter ocorrido pelo fato de o animal enriquecido apresentar maior exploração do aparato do que os controles. Esse efeito é conhecido como processamento de novidade. Os dados deste estudo no LCE são consistentes com esse efeito. Observou-se maior frequência no centro por parte deste grupo (dados não mostrados), ao contrário de Novaes et al., 2017 no qual o enriquecimento *per se* não alterou o comportamento exploratório dos animais no LCE.

Uma vez que o enriquecimento também pode ser visto como um tipo de estresse leve e repetido (Larsson et al., 2002), ou eustresse, é possível inferir que este estresse pode ter se somado aos efeitos do próprio EI na manifestação de um fenótipo do tipo ansioso. Sabe-se que os efeitos aversivos do estresse social são capazes de ativar os sistemas dopaminérgicos mesocorticolímbicos; ainda, os efeitos neuroplásticos provenientes deste tipo de estresse parecem estar relacionados com um comportamento do tipo ansioso (Newman et al., 2018). Vale citar que a constante interação social presente no modelo de enriquecimento, juntamente com a rotatividade de novos estímulos, pode ser vista como um fator estressor (Crofton et al., 2015).

Já foi sugerido pela literatura que condições enriquecidas podem não ser um ambiente positivo com relação a convivência em grupo, devido a competição pelo acesso a determinados recursos ser maior do que a capacidade de interação social (Howerton et al., 2008; McQuaid et al., 2012).

As concentrações de corticosterona nos animais EA expostos ao estresse foram maiores em comparação com o grupo não enriquecido (NE) mostrando um efeito do ambiente neste parâmetro. Também foi mostrada interação com o estresse, ou seja, as concentrações de corticosterona foram maiores após a exposição ao estresse em ambos os grupos (EA e NE), contudo, o grupo EA exibiu valores maiores que o NE, resultado semelhante ao encontrado por McQuaid et al., (2013).

Em concordância com os nossos resultados, Macedo et al., (2018) encontraram um aumento nas concentrações de corticosterona após o estresse repetido *per se*, associado à imprevisibilidade. Ainda corroborando com os

resultados aqui encontrados, no trabalho de Norman et al., (2015) animais que foram expostos a modelos de estresse crônico moderados e leves também exibiram elevadas concentrações de corticosterona, quando mensurada ao final do período de estresse.

O papel do ambiente sobre o estresse e no consumo de etanol tem sido bem relatado na literatura. Já foi observado que o enriquecimento ambiental pode atenuar os efeitos reforçadores de drogas (Brenes et al., 2008), assim como pode ajudar o animal a lidar melhor com possíveis eventos estressores severos (Lehmann, Herkenham, 2011; Schloesser et al., 2010). Considerando este raciocínio, seria esperado que os animais enriquecidos apresentassem um consumo de etanol menor, em comparação com o grupo não enriquecido. De fato, resultado semelhante foi encontrado num estudo prévio em nosso laboratório, no qual a exposição ao EA durante os períodos de privação causou diminuição no consumo voluntário de etanol após um estresse agudo de contenção (Marianno et al, 2017). Outro trabalho recente também mostra este resultado, como o estudo de Bahi, (2017) no qual animais enriquecidos tiveram redução no consumo voluntário de etanol. Entretanto, Berardo et al., (2016) mostraram aumento no consumo de etanol após estresse de privação materna.

Estudos mostram que o ambiente enriquecido simula um estresse leve e repetido (Larsson et al., 2002), e pode elicitar uma resposta neuroquímica de aumento da atividade de norepinefrina no encéfalo (Diaz et al., 1978). Neste contexto, estudos com ratos mostraram que um aumento na atividade de catecolaminas no encéfalo de animais enriquecidos pode levar a um aumento no consumo de etanol (Amit et al., 1970; Amit et al., 1971). Há outros estudos com resultados semelhantes, nos quais o consumo voluntário de etanol foi maior em ratos enriquecidos (Rockman et al., 1989). Outro trabalho do mesmo grupo também mostrou que animais enriquecidos expostos ao estresse de contenção exibiram maior consumo e maior preferência por etanol comparados aos não enriquecidos (Rockman et al., 1986). Adicionalmente, trabalhos mais recentes como o de Berardo et al., (2016) reforçam estes resultados mostrando que ratos machos enriquecidos consumiram mais etanol do que os alojados em ambiente padrão no modelo de autoadministração voluntária, com prévia exposição ao estresse.

Em concordância com estes dados, no presente trabalho (experimento 3A), após um período de privação, na reexposição de 2h o consumo voluntário de etanol foi maior em ambos os grupos na segunda reexposição em relação à primeira, já que episódios repetidos de privação parecem estar relacionados à manutenção do consumo (Ripley, Stephens, 2011). Já na reexposição de 24h o consumo foi maior em animais criados no EA tanto na primeira quanto na segunda reexposição.

Estes achados levaram à hipótese de que poderia haver mecanismos subjacentes que possam ter contribuído para os efeitos observados. Na intenção de elucidar os possíveis mecanismos moleculares relacionados aos comportamentos observados, analisamos a expressão de receptores de glicocorticóides (GR) na amígdala. A diminuição da relação entre as formas fosforilada e não fosforilada (pGR/GR) que foi encontrada no grupo EA denota que houve uma menor ativação dos receptores de GR nestes animais, uma vez que esta relação sugere a translocação do receptor para o núcleo. Uma diminuição nesta relação pode indicar uma supra-regulação desses receptores na região estudada. Com efeito, no estudo de Vendruscolo et al (2012) foi visto que há variações na expressão dos receptores GR de acordo com períodos de privação (aguda ou prolongada), no qual pode ocorrer supra-regulação em áreas cerebrais relacionadas ao estresse e recompensa quando há privação de etanol prolongada, em regiões encefálicas específicas. De fato, o RNAm dos receptores de glicocorticóide se mostrou diminuído no núcleo leitoso da *stria terminalis*, córtex pré-frontal e *nucleus accumbens* (NAc) após episódios de retirada agudo. Este efeito de supra-regulação também foi mostrado em outros estudos com exposição ao estresse crônico (de Kloet et al., 2005; Noguchi et al., 2010).

Quando se estuda enriquecimento, deve-se considerar que a maneira como ocorre a exposição ao ambiente enriquecido pode desencadear ou não os efeitos protetores sobre o consumo de drogas, uma vez que os protocolos variam muito entre os pesquisadores. As diferenças vão desde aspectos menores como os tipos e quantidade de objetos utilizados, até aspectos principais como idade dos animais e tempo de exposição, tipos de controles (individuais ou em grupos) e linhagens diferentes (Simpson, Kelly, 2011). Além disso, outros fatores também podem contribuir, uma vez que nos protocolos que estudam a interação entre o estresse e o aumento no consumo de etanol, a duração do estresse e o momento no qual ele

é aplicado são fundamentais (Croft et al., 2005; Newman et al., 2018). De fato, trabalhos que variaram no tipo e intensidade dos protocolos de estresse mostraram resultados contraditórios, nos quais o estresse aumentou, diminuiu, ou não alterou a ingestão de etanol (Becker et al., 2011).

Tendo como exemplo o estudo de Marianno et al., (2017), o consumo de etanol não foi diário após a aquisição, sendo que os animais foram reexpostos ao etanol uma vez por semana e o estresse foi agudo. Isto diz muito sobre o resultado, principalmente o fato de o estresse ser agudo. Os animais parecem apresentar maior resiliência frente a um único estresse, como foi observado em Novaes et al., (2017), em que o enriquecimento foi capaz de proteger o aumento da ansiedade induzido por um estresse agudo de contenção. Já no presente protocolo, a cronicidade na exposição ao etanol aliada a um estresse crônico de alta intensidade pode ter conferido um maior efeito reforçador ao etanol que acabou se sobrepondo à capacidade protetora sobre o consumo teoricamente amparada pela condição enriquecida. Tal ideia é amparada pela literatura, que mostra que intervenções ambientais que expõem os animais a situações de estresse parecem aumentar os efeitos de reforço das drogas e desempenhar um papel importante na vulnerabilidade para a dependência e o consumo (Goeders, 2002).

Tanto os efeitos aversivos de um estresse de caráter imprevisível como o efeito recompensador das drogas de abuso, como o etanol, são capazes de ativar os sistemas dopaminérgicos mesocorticolímbicos. Neuroadaptações nestas regiões podem ser as responsáveis pela relação entre as respostas elicitadas pelo estresse e o padrão do uso de substâncias, mostrando uma interação entre estes fatores. As neuroadaptações no sistema de modulação de monoaminas por CRF na VTA são apontados como mecanismos subjacentes importantes no aumento do consumo de drogas em situações de estresse (Newman et al., 2018). De maneira complementar tem-se que o neuropeptídeo CRF exerce um papel de suma importância nas redes neurais que integram o estresse social e o início, adaptação e recaída do uso abusivo de substâncias (Sarnyai et al., 2001). Apesar de a maioria dos efeitos de estresse social serem caracterizados pelo CRF hipotalâmico ativando o eixo HPA, há evidências do CRF extra-hipotalâmico agindo como um modulador de liberação de monoaminas, apontando assim, a sinalização extra-hipotalâmica de CRF como

um fator base na modulação da motivação pela busca e uso de substâncias (Wise, 2004; Koob, Volkow, 2010; Hooly, Miczek, 2016).

De posse destes dados, pode-se sugerir que os receptores GR desempenham um papel de destaque nos mecanismos de desenvolvimento e manutenção da dependência ao etanol, uma vez que pode ocorrer uma regulação alostática de GR nos sistemas de estresse extrahipotalâmicos trazendo a hipótese de que uma ativação inicial de receptores GR em excesso esteja envolvida no mecanismo de dependência ao etanol (Vendruscolo et al., 2012).

Ainda no experimento 3A, o LCE não mostrou diferenças significantes no comportamento do tipo ansioso dos animais. Os resultados não conclusivos neste teste podem ter relação com o fato de o teste ter sido realizado ao final de um período longo de estresse (11 dias) que sofreu interferência também do consumo crônico de etanol, o qual sabidamente pode exercer um efeito complexo sobre o estresse, de maneira geral, numa relação de causa-efeito (Sillaber et al., 2002).

O fato de não haver diferenças significantes entre os grupos pode ter relação com uma possível adaptação do eixo HPA. Embora o estresse crônico imprevisível a princípio não cause uma adaptação do eixo (Franco et al., 2016), o fato de ter sido combinado com a exposição ao etanol pode ter influenciado neste parâmetro, perturbando a regulação da resposta de corticosterona, ao contrário do que seria esperado a princípio.

É sabido que o consumo crônico de etanol, assim como o estresse crônico imprevisível é capaz de ativar o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) de maneira prolongada, com resultantes aumentos nos níveis de corticosterona. Tal mecanismo pode interferir no estabelecimento das neuroadaptações relacionadas com o consumo crônico de etanol, uma vez que esta hiperatividade do eixo pode culminar com alterações em nível molecular como uma desregulação na expressão do gene do *crf* (fator liberador de corticotrofina) (Heilig, Koob, 2007). Alterações no eixo HPA podem alterar comportamentos de busca e consumo de drogas (Deroche-Gamonet et al., 2003; Pastor et al., 2008; Wang et al., 2008); neste sentido, há evidências de que a atividade do eixo HPA encontra-se desregulada durante períodos de abstinência ou privação em modelos de autoadministração de etanol (Pang et al., 2013). De maneira mais detalhada, pode ocorrer uma super-regulação dos receptores de glicocorticóides no encéfalo (receptores GR) (Vendruscolo et al.,

2012). O aumento na expressão destes receptores, por sua vez, pode gerar elevados níveis cerebrais de corticosterona resultando numa supressão da atividade do eixo HPA durante períodos de privação seguidos de consumo crônico de etanol. (Little et al., 2008; Pang et al., 2013).

Tal como discutido anteriormente (nos resultados do experimento 3A) o fato de os animais enriquecidos apresentarem maior consumo de etanol em comparação com os não enriquecidos após abstinência pode guardar relação com o fato de que o estresse aplicado aos animais pode ter atuado como um reforçador para o consumo de etanol. É válido, neste contexto, considerar que o próprio enriquecimento ambiental também pode ser considerado como um estresse, elicitando respostas neuroquímicas que podem levar a um aumento no consumo de etanol (Amit et al., 1970; Amit et al., 1971). Pode-se ainda sugerir que o enriquecimento atua produzindo uma resposta adaptativa diante de exposições ao estresse crônico, levando a um aumento nos níveis de GR no hipocampo (Zanca et al., 2015).

Desta maneira, neste delineamento, é possível que tenha ocorrido uma complexa interação entre o estresse advindo dos protocolos do estresse crônico imprevisível e do enriquecimento ambiental, bem como da regulação dos mecanismos de estresse devido aos períodos de privação aplicados. Esta interação culminou com um aumento no consumo de etanol nos animais enriquecidos após períodos de privação, concordando com a literatura prévia na ideia de que o estresse, de maneira geral, pode induzir ao consumo de etanol e a episódios de recaída, e que esta relação pode integrar fatores ambientais e moleculares (Sandi, Haller, 2015).

Adicionalmente, surgiu a necessidade de investigar de maneira mais direta a influência dos períodos de privação sobre a motivação e o aumento do consumo de etanol, por isso foi realizado o experimento 3B, que diferente do 3A, privou os animais de etanol durante os 11 dias de EI, adicionando um novo período de privação, dessa vez mais prolongado. Esta hipótese veio do fato de que a manifestação do efeito de retirada do etanol é um fator essencial que contribui para o risco genético da dependência (Kendler et al., 2012) e a intensidade desse efeito pode aumentar diante de sucessivos episódios de retirada, tanto em humanos como em animais (Duka et al., 2004). Episódios de privação seguidos de períodos de

exposição ao etanol parecem diminuir a quantidade de alopregnona no hipocampo, que por sua vez pode se mostrar associado a aumentos no comportamento do tipo ansioso e no consumo de etanol (Cagetti et al., 2004). A importância desta relação vem do fato de que neuroesteróides endógenos como a alopregnona e a pregnolona são capazes de modular alostericamente receptores GABA_A. Efeitos comuns destes esteroides sobre a atividade de receptores GABA_A, como o aumento da sua inibição, reforçam a idéia de que são importantes na modulação dos efeitos crônicos e agudos do etanol no sistema nervoso central (Jensen et al., 2017; Finn, Jimenez, 2018). Trabalhos prévios com estresse crônico e consumo de etanol mostraram um efeito tardio do estresse sobre o comportamento de busca pela droga (Norman et al., 2015; Sillaber et al., 2012).

Estudos com estresse de derrota social, que assim como o estresse crônico imprevisível mantém o eixo HPA num estado contínuo de ativação, mostrou que camundongos machos expostos ao estresse exibiram comportamento do tipo ansioso e maior vulnerabilidade aos efeitos reforçadores do etanol (Hwa et al., 2016, Macedo et al., 2018).

Quando animais são expostos a derrota social e ao etanol simultaneamente ou mesmo quando o etanol é oferecido logo em seguida a um episódio de derrota social, camundongos (Norman et al., 2015) e ratos (Van Erp et al., 2001a) geralmente consomem menos etanol que os animais controle. O aumento no consumo de etanol ocorre de maneira tardia, dias ou semanas após o cessar do estresse, sugerindo que as neuroadaptações consequentes a estresses crônicos são duradouras. Sugere-se que a ativação simpática durante o estresse pode inicialmente suprimir o uso de substâncias, fazendo com que o consumo de etanol se torne aparente ou aumentado somente após a recuperação de uma atividade autonômica intensa (Van Erp et al., 2001b). Inclusive, no estudo de Marianno et al., 2017, no qual foi oferecido etanol no paradigma de livre escolha entre duas garrafas (etanol 20% e água), o consumo de etanol também diminuiu nas 2 primeiras horas após a exposição a um estresse agudo.

Neuroadaptações induzidas pelo estresse podem alterar os efeitos recompensadores do etanol e aumentar o consumo, em indivíduos socialmente derrotados. Alguns peptídeos, incluindo glicocorticoides e CRF, podem modular a liberação dopaminérgica no sistema mesocorticolímbico causando modificações

duradouras ou permanentes que podem levar a um consumo escalonado de etanol na presença de estresse. (Koob 2010); (Ostroumov et al., 2016).

Em resumo, o enriquecimento ambiental prolongado foi capaz de alterar a expressão gênica de alguns exons da região promotora do gene do *Bdnf* e diminuir a metilação em regiões CpG do exon 4 do *Bdnf*. Entretanto, esse aumento não se refletiu em proteção ao consumo voluntário de etanol, uma vez que não encontramos diferenças entre os grupos EA e controle no consumo. Ainda mais, após exposição ao EI, houve aumento de consumo de EA. Estudos em roedores mostram que a diminuição da expressão de BDNF no estriado dorsal, por meio de intervenção com vetores virais, aumenta o consumo de etanol (Jeanblanc et al., 2009), enquanto o aumento da expressão nesta mesma região encefálica, reduz o consumo (Jeanblanc et al, 2006). Mais recentemente, repetidos ciclos de exposição crônica intermitente ao etanol induziu um escalonamento no consumo de etanol acompanhado por diminuição de BDNF no córtex pré-frontal. Por outro lado, a infusão de BDNF nesta região reduziu o consumo, o que evidencia que adaptações na atividade do BDNF no córtex pré-frontal pode media o consumo excessivo de etanol (HAUN et al., 2018). No presente trabalho, o aumento da expressão dos diferentes exons nesta região não foi capaz de proteger os animais de um aumento no consumo induzido pelo EI associado a privações de etanol. Entretanto, vale ressaltar que EI associado a privações pode induzir alterações neuroquímicas não previstas no estudo de HAUN et al. (2018).

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.

17 REFERÊNCIAS¹

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

Allgaier, C. (2002). "Ethanol sensitivity of NMDA receptors." **Neurochem Int** 41(6): 377-382.

Amit Z, et al., (1970). "Alcohol preferences in the laboratory rat induced by hypothalamic stimulation." **Psychopharmacologia** 17: 367-377.

Amit Z, Stern MH. (1971). "A further investigation of alcohol preference in the laboratory rat induced by hypothalamic stimulation." **Psychopharmacologia** 1971.

Bahi, A. (2017). "Environmental enrichment reduces chronic psychosocial stress-induced anxiety and ethanol-related behaviors in mice." **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry** 77: 65–74.

Bardo, M. T., et al. (2001). "Environmental enrichment decreases intravenous self-administration of amphetamine in female and male rats." **Psychopharmacology (Berl)** 155(3): 278-284.

Becker, H. C., et al. (2011). "Effects of stress on alcohol drinking: a review of animal studies." **Psychopharmacology (Berl)** 218(1): 131-156.

Berardo, L.R. et al. (2016). "Post-weaning Environmental Enrichment, But Not Chronic Maternal Isolation, Enhanced Ethanol Intake during Periadolescence and Early Adulthood." **Frontiers in Behavioral Neuroscience** 10: 195.

Bird, A. (2002). "DNA methylation patterns and epigenetic memory." **Genes Dev** 16(1): 6-21.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." **Anal Biochem** 72: 248-254.

Brenes Saenz, J. C., et al. (2006). "Factor analysis of Forced Swimming test, Sucrose Preference test and Open Field test on enriched, social and isolated reared rats." **Behav Brain Res** 169(1): 57-65.

Brenes, J. C., et al. (2008). "Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum." **Pharmacol Biochem Behav** 89(1): 85-93.

Cagetti, E., et al. (2004). "Chronic intermittent ethanol (CIE) administration in rats decreases levels of neurosteroids in hippocampus, accompanied by altered behavioral responses to neurosteroids and memory function". **Neuropharmacology** 46: 570–579.

Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas and Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas (2010). **VI Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio das Redes Pública e Privada de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras**. São Paulo: CEBRID - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas; UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo, Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas (SENAD).

Charney, D. S. (2004). "Psychobiological mechanisms of resilience and vulnerability: implications for successful adaptation to extreme stress." **Am J Psychiatry** 161(2): 195-216.

Charney, D. S. and H. K. Manji (2004). "Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention." **Sci STKE** 2004(225): re5.

Chauvet, C., et al. (2009). "Environmental enrichment reduces cocaine seeking and reinstatement induced by cues and stress but not by cocaine." **Neuropsychopharmacology** 34(13): 2767-2778.

Choleris, E., et al. (2001). "A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field." **Neurosci Biobehav Rev** 25(3): 235-260.

Christmas, A. J. and D. R. Maxwell (1970). "A comparison of the effects of some benzodiazepines and other drugs on aggressive and exploratory behaviour in mice and rats." **Neuropharmacology** 9(1): 17-29.

Cohen, H., et al. (2008). "Early post-stressor intervention with high-dose corticosterone attenuates posttraumatic stress response in an animal model of posttraumatic stress disorder." **Biol Psychiatry** 64(8): 708-717.

Connor, J. R., et al. (1982). "Increased length of terminal dendritic segments in old adult rats' somatosensory cortex: an environmentally induced response." **Exp Neurol** 78(2): 466-470.

Covington, H. E., 3rd and K. A. Miczek (2005). "Intense cocaine self-administration after episodic social defeat stress, but not after aggressive behavior: dissociation from corticosterone activation." **Psychopharmacology (Berl)** 183(3): 331-340.

Crabbe, J. C. and T. J. Phillips (2004). "Pharmacogenetic studies of alcohol self-administration and withdrawal." **Psychopharmacology (Berl)** 174(4): 539-560.

Crawley, J. and F. K. Goodwin (1980). "Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines." **Pharmacol Biochem Behav** 13(2): 167-170.

Crofton, E. J., et al. (2015). "Inoculation stress hypothesis of environmental enrichment." **Neurosci Biobehav Rev** 49: 19-31.

Deehan, G. A., Jr., et al. (2011). "Differential rearing conditions and alcohol-preferring rats: consumption of and operant responding for ethanol." **Behav Neurosci** 125(2): 184-193.

Deroche-Gamonet V, et al. (2003). "The glucocorticoid receptor as a potential target to reduce cocaine abuse." **J. Neurosci** 23: 4785-4790.

de Kloet, E. R. (2005). "Stress and the brain: from adaptation to disease." **Nat Rev Neurosci**. 6:463–475.

Diaz, J, et al. (1978). "Stages of recovery from central norepinephrine lesions in enriched and impoverished environments: A behavioral and biochemical study. " **Exp Brain Res**. 31: 117-1

Dos Santos, N., et al. (2019). "High dose of dexamethasone protects against EAE-induced motor deficits but impairs learning/memory in C57BL/6 mice." **Sci Rep** 9(1): 6673.

During, M. J. and L. Cao (2006). "VEGF, a mediator of the effect of experience on hippocampal neurogenesis." **Curr Alzheimer Res** 3(1): 29-33.

Duka, T., et al. (2004). "Consequences of Multiple Withdrawals From Alcohol." **Alcohol Clin Exp Res** 28(2): 233–246.

Feder, A., et al. (2009). "Psychobiology and molecular genetics of resilience." **Nat Rev Neurosci** 10(6): 446-457.

Fernandez-Teruel, A., et al. (2002). "Enduring effects of environmental enrichment on novelty seeking, saccharin and ethanol intake in two rat lines (RHA/Verh and RLA/Verh) differing in incentive-seeking behavior." **Pharmacol Biochem Behav** 73(1): 225-231.

Finn, D. A., et al. (2005). "A procedure to produce high alcohol intake in mice." **Psychopharmacology (Berl)** 178(4): 471-480.

Finn, D. A., Jimenez, V. A. (2018). "Chapter X. Dynamic Adaptation in Neurosteroid Networks in Response to Alcohol." **Handb Exp Pharmacol** 248: 55–78.

Fox, C., et al. (2006). "Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress." **Behav Brain Res** 175(1): 1-8.

Francis, D. D., et al. (2002). "Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity." **J Neurosci** 22(18): 7840-7843.

Franco, A. J., et al. (2016). "Sensitization of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in a Male Rat Chronic Stress Model." **Endocrinology** 157(6): 2346-2355.

Fuchikami, M., et al. (2011). "DNA Methylation Profiles of the Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Gene as a Potent Diagnostic Biomarker in Major Depression". **Plos One** 6(8): 1-7.

Gill, K., et al. (1986). "Voluntary ethanol consumption in rats: an examination of blood/brain ethanol levels and behavior." **Alcohol Clin Exp Res** 10(4): 457-462.

Gilpin, N. W. and G. F. Koob (2008). "Neurobiology of alcohol dependence: focus on motivational mechanisms." **Alcohol Res Health** 31(3): 185-195.

Goeders, N. E. (2002). "Stress and cocaine addiction." **J Pharmacol Exp Ther** 301(3): 785-789.

Goldstein, D. B. and R. Kakihana (1977). "Circadian rhythms of ethanol consumption by mice: a simple computer analysis for chronopharmacology." **Psychopharmacology (Berl)** 52(1): 41-45.

Green, T. A., et al. (2003). "Environmental enrichment decreases nicotine-induced hyperactivity in rats." **Psychopharmacology (Berl)** 170(3): 235-241.

Greenough, W. T. and F. R. Volkmar (1973). "Pattern of dendritic branching in occipital cortex of rats reared in complex environments." **Exp Neurol** 40(2): 491-504.

Greenough, W. T., et al. (1973). "Effects of rearing complexity on dendritic branching in frontolateral and temporal cortex of the rat." **Exp Neurol** 41(2): 371-378.

Hall, C. S. (1934). "Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality." **Journal of Comparative Psychology** 18(3): 385-403.

Haun H.L. et al. (2018). "Increasing Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in Medial Prefrontal Cortex Selectively Reduces Excessive Drinking in Ethanol Dependent Mice." **Neuropharmacology** 15(140): 35-42.

Hebb, D. O. (1947). "The effects of early experience on problem-solving at maturity." **Am Psychol** 2: 306-307.

Heilig, M., Koob, G. F. (2007). "A key role for corticotropin-releasing factor in alcohol dependence." **Trends Neurosci** 30:399–406.

Heyser, C. J., et al. (1997). "Increased ethanol self-administration after a period of imposed ethanol deprivation in rats trained in a limited access paradigm." **Alcohol Clin Exp Res** 21(5): 784-791.

Holly, E. N. and K. A. Miczek (2016). "Ventral tegmental area dopamine revisited: effects of acute and repeated stress." **Psychopharmacology (Berl)** 233(2): 163-186.

Howerton, C. L., et al. (2008). "Effects of a running wheel-igloo enrichment on aggression, hierarchy linearity, and stereotypy in group-housed male CD-1 (ICR) mice." **Applied Animal Behaviour Science** 115(1):90–103.

Hwa, L. S., et al. (2016). "Social stress-escalated intermittent alcohol drinking: modulation by CRF-R1 in the ventral tegmental area and accumbal dopamine in mice." **Psychopharmacology**.

Ickes, B. R., et al. (2000). "Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain." **Exp Neurol** 164(1): 45-52.

Jeanblanc, J., et al. (2006). "The dopamine D3 receptor is part of a homeostatic pathway regulating ethanol consumption." **J Neurosci** 26:1457–1464.

Jeanblanc, J., et al. (2009). "Endogenous BDNF in the dorsolateral striatum gates alcohol drinking." **J Neurosci** 29:13494–13502.

Jensen, J. P., et al. (2017). "Ethanol withdrawal-induced dysregulation of neurosteroid levels in plasma, cortex, and hippocampus in genetic animal models of high and low withdrawal." **Psychopharmacology** 234:2793–2811.

Jiang, Y., et al. (2008). "Epigenetics in the nervous system." **J Neurosci** 28(46): 11753-11759.

Karpova, N. (2014). " Role of BDNF epigenetics in activity-dependent neuronal plasticity." **Neuropharmacology** 76:709-718.

Kempermann, G., et al. (1997). "More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment." **Nature** 386(6624): 493-495.

Kendler, K. S., et al. (2012). "Evidence for multiple genetic factors underlying the DSM-IV criteria for alcohol dependence." **Molecular Psychiatry** 17:1306–1315.

Keyes, K. M., et al. (2012). "Stress and alcohol: epidemiologic evidence." **Alcohol Res** 34(4): 391-400.

Khisti, R. T., et al. (2006). "Characterization of the ethanol-deprivation effect in substrains of C57BL/6 mice." **Alcohol** 40(2): 119-126.

Komada, M., et al. (2008). "Elevated plus maze for mice." **J Vis Exp**(22).

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

Koob, G. F. (2003). "Alcoholism: allostasis and beyond." **Alcohol Clin Exp Res** 27(2): 232-243.

Koob, G. F. (2010). " The role of CRF and CRF-related peptides in the dark side of addiction." **Brain Research** 131 4:3 – 14.

Koob, G. F. and N. D. Volkow (2010). "Neurocircuitry of addiction." **Neuropsychopharmacology** 35(1): 217-238.

Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." **Cell** 128(4): 693-705.

Krishnan, V., et al. (2007). "Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions." **Cell** 131(2): 391-404.

Kuleshkaya, N. and V. Voikar (2014). "Assessment of mouse anxiety-like behavior in the light-dark box and open-field arena: role of equipment and procedure." **Physiol Behav** 133: 30-38.

Kumar, A., et al. (2005). "Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum." **Neuron** 48(2): 303-314.

Kyzar, E. J., Pandey, S. C. (2015). " Molecular mechanisms of synaptic remodeling in alcoholism." **Neuroscience Letters**.

Kyzar, E. J., et al. (2017). "Adolescent alcohol exposure alters lysine demethylase 1 (LSD1) expression and histone methylation in the amygdala during adulthood." **Addict Biol** 22(5): 1191-1204.

Larsson, F., et al. (2002). "Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats." **Pharmacol Biochem Behav** 73(1): 193-207.

Le, A. D., et al. (1998). "Reinstatement of alcohol-seeking by priming injections of alcohol and exposure to stress in rats." **Psychopharmacology (Berl)** 135(2): 169-174.

Leggio, M. G., et al. (2005). "Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat." **Behav Brain Res** 163(1): 78-90.

Lehmann, M. L. and M. Herkenham (2011). "Environmental enrichment confers stress resiliency to social defeat through an infralimbic cortex-dependent neuroanatomical pathway." **J Neurosci** 31(16): 6159-6173.

Lister, R. G. (1987). "The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse." **Psychopharmacology (Berl)** 92(2): 180-185.

Little, H. J. et al. (2008). "Selective increases in regional brain glucocorticoid: a novel effect of chronic alcohol." **Neuroscience** 156: 1017-1027.

Liu, Z. P., et al. (2014). "Chronic stress impairs GABAergic control of amygdala through suppressing the tonic GABAA receptor currents." **Mol Brain** 7: 32.

Lopes, D. A., et al. (2018). "Environmental enrichment decreases avoidance responses in the elevated T-maze and delta FosB immunoreactivity in anxiety-related brain regions." **Behavioural Brain Research** 344:65-72.

Lopez, M. F., et al. (2011). "Chronic social isolation and chronic variable stress during early development induce later elevated ethanol intake in adult C57BL/6J mice." **Alcohol** 45(4): 355-364.

Louilot, A., et al. (1986). "Differential reactivity of dopaminergic neurons in the nucleus accumbens in response to different behavioral situations. An in vivo voltammetric study in free moving rats." **Brain Res** 397(2): 395-400.

Lowery-Gionta; Kash, T. L. (2014). "The Bed Nucleus of the Stria Terminalis: A Critical Site of Ethanol-Induced Alterations in Neurotransmission." In: **Neurobiology of Alcohol Dependence** 83–96.

Macedo, G. C., et al. (2018). "Consequences of continuous social defeat stress on anxiety- and depressive-like behaviors and ethanol reward in mice." **Horm Behav** 97: 154-161.

McQuaid, R. J. et al. (2012). "Environmental enrichment in male CD-1 mice promotes aggressive behaviors and elevated corticosterone and brain norepinephrine activity in response to a mild stressor." **Stress** 15(3):354–360.

McQuaid, R. J., et al. (2013). "The differential impact of social defeat on mice living in isolation or groups in an enriched environment: plasma corticosterone and monoamine variations." **Int J Neuropsychopharmacol** 16(2): 351-363.

Marianno, P. (2015). Camundongos C57BL/6 alojados em ambiente enriquecido apresentam menor consumo de etanol após estresse Dissertação. Universidade de São Paulo.

Marianno, P., et al. (2017). "Environmental Enrichment Blunts Ethanol Consumption after Restraint Stress in C57BL/6 Mice." **PLoS One** 12(1): e0170317.

Marmigere, F., et al. (2003). "Rapid induction of BDNF expression in the hippocampus during immobilization stress challenge in adult rats." **Hippocampus** 13(5): 646-655.

Martinowich, K., et al. (2003). "DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation." **Science** 302(5646): 890-893.

Medini, D., et al. (2008). "Microbiology in the post-genomic era." **Nat Rev Microbiol** 6(6): 419-430.

Mihic, S. J. and R. A. Harris (1997). "GABA and the GABAA receptor." **Alcohol Health Res World** 21(2): 127-131.

Moonat, S., et al. (2013). "Aberrant histone deacetylase2-mediated histone modifications and synaptic plasticity in the amygdala predisposes to anxiety and alcoholism." **Biol Psychiatry** 73(8): 763-773.

Muscat, R. and P. Willner (1992). "Suppression of sucrose drinking by chronic mild unpredictable stress: a methodological analysis." **Neurosci Biobehav Rev** 16(4): 507-517.

Naka, F., et al. (2005). "Modification of AMPA receptor properties following environmental enrichment." **Brain Dev** 27(4): 275-278.

Nestler, E. J. (2005). "Is there a common molecular pathway for addiction?" **Nat Neurosci** 8(11): 1445-1449.

Newman, E. L., et al. (2018). "Social defeat stress and escalation of cocaine and alcohol consumption: Focus on CRF." **Neurobiol Stress** 9: 151-165.

Nibuya, M., et al. (1995). "Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments." **J. Neurosci** 15: 7539-7547.

Nithianantharajah, J. and A. J. Hannan (2006). "Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system." **Nat Rev Neurosci** 7(9): 697-709.

Noguchi, T. et al. (2010). "Regulation of glucocorticoid receptor transcription and nuclear translocation during single and repeated immobilization stress." **Endocrinology** 151:4344–4355.

Norman, K. J., et al. (2015). "Social stress and escalated drug self-administration in mice I. Alcohol and corticosterone." **Psychopharmacology (Berl)** 232(6): 991-1001.

Novaes, L. S., et al. (2017). "Environmental enrichment protects against stress-induced anxiety: Role of glucocorticoid receptor, ERK, and CREB signaling in the basolateral amygdala." **Neuropharmacology** 113: 457–466.

Ortiz, J., et al. (1996). "Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to repeated stress." **Neuropsychopharmacology** 14(6): 443-452.

Ostroumov, A., et al. (2016). "Stress Increases Ethanol Self-Administration via a Shift toward Excitatory GABA Signaling in the Ventral Tegmental Area." **Neuron** 92: 493–504.

Pandey, S. C., et al. (2015). "Potential role of adolescent alcohol exposure-induced amygdaloid histone modifications in anxiety and alcohol intake during adulthood." **Neurobiol Dis** 82: 607-619.

Pandey, S. C., et al. (2016). "A Critical Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Alcohol Consumption." **Biological Psychiatry** 79:427–429.

Pang, T. Y., et al. (2013). "Positive environmental modification of depressive phenotype and abnormal hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in female C57BL/6J mice during abstinence from chronic ethanol consumption." **Frontiers in Pharmacology** 4: 93.

Pastor, R., et al. (2008). "Corticotropin-releasing factor -1 receptor involvement in behavioral neuroadaptation to ethanol: a urocortin1-independent mechanism." **Proc. Natl. Acad. Sci** 105: 9070-9075.

Patterson, K., et al. (2011). "DNA methylation: bisulphite modification and analysis." **J Vis Exp**(56).

Paxinos, G. and K. B. J. Franklin (2012). **Paxinos and Franklin's The mouse brain in stereotaxic coordinates**. New York, NY, Academic Press.

Peters, S., et al. (2014). "Dose-dependent effects of chronic central infusion of oxytocin on anxiety, oxytocin receptor binding and stress-related parameters in mice." **Psychoneuroendocrinology** 42: 225-236.

Pham, T. M., et al. (1999). "Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year." **Neuroscience** 94(1): 279-286.

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

Pizarro, J.M., et al. (2004). "Acute social defeat reduces neurotrophin expression in brain cortical and subcortical areas in mice." **Brain Research** 1025:10-20

Rae, M. B. (2014). Efeitos do enriquecimento ambiental sobre comportamentos induzidos pelo etanol em camundongos Swiss: envolvimento da circuitaria do estresse Dissertação. Universidade de São Paulo.

Rae, M. B. (2018). "Environmental enrichment enhances conditioned place preference to ethanol via an oxytocinergic-dependent mechanism in male mice." *Neuropharmacology* 138:267-274.

Rhodes, J. S., et al. (2005). "Evaluation of a simple model of ethanol drinking to intoxication in C57BL/6J mice." **Physiol Behav** 84(1): 53-63.

Ripley, T. L., Stephens, D. N. (2011). "Critical thoughts on current rodent models for evaluating potential treatments of alcohol addiction and withdrawal." **British Journal of Pharmacology** 164:1335–1356.

Rockman, G. E., et al. (1986). "The effects of environmental enrichment on voluntary ethanol consumption and stress ulcer formation in rats." **Alcohol** 3:299-302.

Rockman, G. E., et al. (1989). "Effects of environmental enrichment on voluntary ethanol intake in rats." **Pharmacol Biochem Behav** 34(3): 487-490.

Roth, T. L., et al. (2009). "Lasting epigenetic influence of early-life adversity on the BDNF gene." **Biol Psychiatry** 65(9): 760-769.

Roth, T. L., et al. (2011). "Epigenetic modification of hippocampal Bdnf DNA in adult rats in an animal model of post-traumatic stress disorder." **J Psychiatr Res** 45(7): 919-926.

Rueda, A. V., et al. (2012). "Environmental enrichment blocks ethanol-induced locomotor sensitization and decreases BDNF levels in the prefrontal cortex in mice." **Addict Biol** 17(4): 736-745.

Rueda, A. V. L. (2017). Efeitos comportamentais do enriquecimento ambiental de curta duração em camundongos: expressão de microRNAs e participação da via de sinalização BDNF – TrkB na sensibilização comportamental ao etanol. Tese. Universidade de São Paulo.

Sakata, K., et al. (2009). "Critical role of promoter IV-driven BDNF transcription in GABAergic transmission and synaptic plasticity in the prefrontal cortex." **Proc Natl Acad Sci U S A** 106(14): 5942-5947.

Sakharkar, A. J., et al. (2016). "A role for histone acetylation mechanisms in adolescent alcohol exposure-induced deficits in hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis markers in adulthood." **Brain Struct Funct** 221(9): 4691-4703.

Sale, A., et al. (2009). "Enrich the environment to empower the brain." **Trends Neurosci** 32(4): 233-239.

Sale, A., et al. (2014). "Environment and brain plasticity: towards an endogenous pharmacotherapy." **Physiol Rev** 94(1): 189-234.

Salinovich, O. and R. C. Montelaro (1986). "Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." **Anal Biochem** 156(2): 341-347.

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

Santos-Rocha, J. B., et al. (2018). "Involvement of neuronal nitric oxide synthase in cross-sensitization between chronic unpredictable stress and ethanol in adolescent and adult mice." **Alcohol** 68: 71-79.

Sarnyai, Z., et al. (2001). "The role of corticotropin-releasing factor in drug addiction." **Pharmacol Rev** 53(2): 209-243.

Schaaf, M. J. et al. (1998). "Down-regulation of BDNF mRNA and protein in the rat hippocampus by corticosterone." **Brain Res** 813:112-120.

Schuckit, M. A. (1998). "Biological, psychological and environmental predictors of the alcoholism risk: a longitudinal study." **J Stud Alcohol** 59(5): 485-494.

Sillaber, I., et al. (2002). "Enhanced and delayed stress-induced alcohol drinking in mice lacking functional CRH1 receptors." **Science** 296(5569): 931-933.

Simpson, J. and J. P. Kelly (2011). "The impact of environmental enrichment in laboratory rats--behavioural and neurochemical aspects." **Behav Brain Res** 222(1): 246-264.

Singhal, G., et al. (2014). "Cellular and molecular mechanisms of immunomodulation in the brain through environmental enrichment." **Front Cell Neurosci** 8: 97.

Smith, M. A. et al. (1995). "Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus." **J. Neurosci** 15:1768-1777.

Soares, R. O., et al. (2015). "Environmental enrichment reverses reduction in glucocorticoid receptor expression in the hippocampus of and improves behavioral responses of anxiety in early malnourished rats." **Brain Research** 1600:32-41.

Solinas, M., et al. (2008). "Reversal of cocaine addiction by environmental enrichment." **Proc Natl Acad Sci U S A** 105(44): 17145-17150.

Solinas, M., et al. (2010). "Prevention and treatment of drug addiction by environmental enrichment." **Prog Neurobiol** 92(4): 572-592.

Spanagel, R. (2000). "Recent animal models of alcoholism." **Alcohol Res Health** 24(2): 124-131.

Spanagel, R. (2009). "Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior." **Physiol Rev** 89(2): 649-705.

Stairs, D. J. and M. T. Bardo (2009). "Neurobehavioral effects of environmental enrichment and drug abuse vulnerability." **Pharmacol Biochem Behav** 92(3): 377-382.

Steketee, J. D. and P. W. Kalivas (2011). "Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior." **Pharmacol Rev** 63(2): 348-365.

Stern, Y. (2002). "What is cognitive reserve? Theory and research application of the reserve concept." **J Int Neuropsychol Soc** 8(3): 448-460.

Takao, K. and T. Miyakawa (2006). "Light/dark transition test for mice." **J Vis Exp**(1): 104.

Tang, Y. P., et al. (2001). "Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice." **Neuropharmacology** 41(6): 779-790.

Timmusk, T. et al. (1993). "Multiple promoters direct tissue- specific expression of the rat BDNF gene." **Neuron** 10:475-489.

Tsankova, N. M. et al., (2006). "Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action." **Nature Neuroscience** 9(4):519-525.

Tsankova, N. M. et al., (2007). "Epigenetic regulation in psychiatric disorders". **Nature Reviews: Neuroscience** 8:355-367.

van Erp, A. M. M., Miczek, K. A. (2001) a. "Short or continuous social stress: suppression of continuously available ethanol intake in subordinate rats;" **Behavioural Pharmacology** 12:335-342.

van Erp, A. M. M., Miczek, K. A. (2001) b. "Persistent suppression of ethanol self-administration by brief social stress in rats and increased startle response as index of withdrawal." **Physiol Behav** 73:301-311.

van Praag, H., et al. (2000). "Neural consequences of environmental enrichment." **Nat Rev Neurosci** 1(3): 191-198.

Vendruscolo, L. F. et al. (2012). "Corticosteroid-Dependent Plasticity Mediates Compulsive Alcohol Drinking in Rats." **J. Neurosc** 32: 7563-7571.

Vengeliene, V., et al. (2014). "The alcohol deprivation effect model for studying relapse behavior: a comparison between rats and mice." **Alcohol** 48(3): 313-320.

Xu, H., et al. (2018). " Effects of adolescent social stress and antidepressant treatment on cognitive inflexibility and Bdnf epigenetic modifications in the mPFC of adult mice." **Psychoneuroendocrinology** 88:92-101.

Wang, X. Y., et al. (2008). "Stress impairs reconsolidation of drug memory via glucocorticoid receptors in the basolateral amygdala." **J. Neurosci** 28: 5602-5610.

Wise, R. A. (2004). "Dopamine, learning and motivation." **Nat Rev Neurosci** 5(6): 483-494.

World Health Organization (2014). **Global status report on alcohol and health**. Geneva, WHO Press.

World Health Organization (2018). **Global status report on alcohol and health**. Geneva: World Health Organization.

Zanca, R. M., et al. (2015). "Environmental Enrichment Increases Glucocorticoid Receptors and Decreases GluA2 and Protein Kinase M Zeta (PKMz) Trafficking During Chronic Stress: A Protective Mechanism?." **Frontiers in Behavioral Neuroscience** 9: 303.

Ziv, Y., et al. (2006). "Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood." **Nat Neurosci** 9(2): 268-275.

ANEXOS

ANEXO A – Certificado da comissão de ética no uso de animais



Universidade de São Paulo
**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo epigenético do efeito do enriquecimento ambiental no consumo voluntário de etanol associado ao estresse crônico imprevisível", protocolada sob o CEUA nº 5664120118, sob a responsabilidade de **Rosana Camarini e equipe; Gabriel de Araujo Costa** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 22/02/2018.

We certify that the proposal "Epigenetic study of environmental enrichment effect in the voluntary ethanol consumption associated with chronic unpredictable stress", utilizing 120 Isogenics mice (120 males), protocol number CEUA 5664120118, under the responsibility of **Rosana Camarini and team; Gabriel de Araujo Costa** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 02/22/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **30 meses**

Depto/Setor: **Farmacologia**

Origem: **Biotério Central FMUSP**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

Idade ou peso: **65 a 75 dias**

Linhagem: **C57BL/6**

N amostral: 120

São Paulo, 23 de fevereiro de 2018

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Dr. Alexandre Ceroni
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)