



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

O ambiente enriquecido influencia as propriedades reforçadoras do etanol em ratos

Cristiane Ribeiro de Carvalho

Florianópolis – SC
2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**O ambiente enriquecido influencia as propriedades reforçadoras
do etanol em ratos**

Cristiane Ribeiro de Carvalho

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção de título de mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi

Florianópolis – SC
2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

C331e Carvalho, Cristiane Ribeiro de

O enriquecimento ambiental influencia as propriedades
reforçadoras do etanol em ratos [dissertação] / Cristiane
Ribeiro de Carvalho; orientador, Reinaldo Naoto Takahashi.
- Florianópolis, SC, 2010.
76: il., grafs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Álcool. 3. Auto-administração oral.
3. Enriquecimento ambiental. 4. Preferência condicionada de
lugar. 5. Transtorno de déficit de atenção e
hiperatividade. I. Takahashi, Reinaldo Naoto. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Maria das Dores e José Erácleo (in memoriam)
E ao Eduardo, com todo meu amor!*

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Dr. Reinaldo Naoto Takahashi, pela confiança, incentivo e orientação durante estes anos.
- Aos meus colaboradores, Fabrício Pamplona e Pablo Pandolfo pelo envolvimento, pela contribuição intelectual e pelo apoio imprescindíveis na realização deste trabalho. E também, ao Eduardo e Rafael, pelo importante auxílio em alguns momentos deste trabalho.
- Aos Professores Dr. André de Ávila Ramos, Dr. Antônio de Pádua Carobrez, e Dr. Roberto Andreatini, por aceitarem o convite de participar da avaliação deste trabalho.
- Aos meus colegas de laboratório: Carina, Fabrício Assini, Fabrício Pamplona, Pablo, Rafael, Sanmara e Thiago, não só pela ajuda nas tarefas do cotidiano, mas também pelas conversas enriquecedoras e pelo convívio agradável.
- Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, pelos ensinamentos que contribuíram para minha formação científica e pessoal.
- Aos funcionários do Departamento de Farmacologia pela prestatividade.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.
- Aos amigos e colegas que conheci no Departamento: Aderbal, Cristina, Daniel, Grazielle, Elizabete, Mariana, Meigy, Thaize e Vanessa, pelo convívio agradável e pelos momentos de descontração.
- Aos demais colegas do Departamento, pela companhia e pelas conversas agradáveis que tivemos nos corredores do prédio e nos congressos.

- A toda a minha família, meus irmãos Ana Paula e Marcelo, meus cunhados Sandro e Laisa, e meus sobrinhos Laurinha, Pedro e Antônio por serem meu porto seguro. E principalmente, ao meu pai, José Erácleo, por ter me ensinado valores que eu carrego sempre comigo, e à minha mãe Maria das Dores, pelo amor, carinho e apoio incondicional.
- Ao meu amado companheiro Eduardo, pelo amor, carinho e dedicação diários, e também, pela compreensão e incentivo, especialmente nos momentos difíceis.
- As minhas grandes amigas, Betina e Nicolle, minhas irmãzinhas do coração desde o primeiro dia de aula, sei que sempre posso contar com vocês, apesar da falta de convívio. Sou muito grata a vocês pela amizade e por trazerem mais brilho e alegrias para minha vidinha.
- As minhas amigas da amoreira, Ângela, Aline, Betina, Carol, Franciane, Francine, Laisa, Márcia, Nicolle, Patrícia e Vanessa, por acreditarem e torcerem por mim.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Uso abusivo e dependência ao etanol.....	1
1.2 Sistema de recompensa	3
1.3 Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade.....	4
1.4 Ratos espontaneamente hipertensos como modelo do TDAH	6
1.5 Enriquecimento ambiental	8
2 OBJETIVOS	10
2.1 Objetivos gerais	10
2.2 Objetivos específicos	10
3 MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 Animais	11
3.2 Ambientes de criação	11
3.3 Drogas e reagentes	12
3.4 Testes comportamentais	13
3.4.1 <i>Campo aberto</i>	13

3.4.2 Caixa de movimentação espontânea	14
3.4.3 Labirinto em cruz elevado	14
3.3.4 Auto-administração oral	16
3.4.5 Preferência condicionada de lugar	16
3.4.6 Plano inclinado	17
3.5 Dosagem de etanol	18
3.6 Delineamento experimental	19
3.6.1 Consumo de substâncias reforçadoras em ratos SHR machos e fêmeas criados em AP e AE	19
3.6.2 Influência do enriquecimento ambiental sobre o desempenho comportamental das ratas SHR avaliadas no CA e na CME	21
3.6.3 Influência do enriquecimento ambiental sobre os comportamentos relacionados à ansiedade em ratas SHR avaliadas no LCE	21
3.6.4 Influência do enriquecimento ambiental sobre a atividade locomotora e ansiedade induzidas pela administração aguda de etanol ou salina, em ratas SHR avaliadas no CA	21
3.6.5 Influência do enriquecimento ambiental sobre as propriedades reforçadoras do etanol, avaliadas no teste da PCL em ratas SHR	21
3.6.6 Influência do enriquecimento ambiental sobre a tolerância aguda ao etanol avaliada no teste do plano inclinado, em ratas SHR	22
3.7 Análise estatística	23
4 RESULTADOS	24
4.1 Consumo de substâncias reforçadoras em ratos SHR machos e fêmeas criados em AP e AE	24
4.2 Influência do enriquecimento ambiental sobre o desempenho comportamental das ratas SHR avaliadas no CA e na CME	30
4.3 Influência do enriquecimento ambiental sobre os comportamentos relacionados à ansiedade em ratas SHR avaliadas no LCE	32
4.4 Influência do enriquecimento ambiental sobre a atividade locomotora e ansiedade induzidas pela administração aguda de etanol ou salina, em ratas SHR avaliadas no CA	32
4.5 Influência do enriquecimento ambiental sobre as propriedades reforçadoras do etanol, avaliadas no teste da PCL em ratas SHR	35
4.6 Influência do enriquecimento ambiental sobre a tolerância aguda ao etanol avaliada no teste do plano inclinado, em ratas SHR	37

5 DISCUSSÃO	39
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
7 ANEXO	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
AE	Ambiente enriquecido
AP	Ambiente padrão
ATV	Área tegmental ventral
CA	Campo aberto
CPF	Córtex pré-frontal
CME	Caixa de movimentação espontânea
i.p.	Intraperitoneal
LCE	Labirinto em cruz elevado
NAc	Núcleo <i>accumbens</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato
PCL	Preferência condicionada de lugar
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
TDAH	Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotografia do labirinto em cruz elevado.....	12
Figura 2 - Fotografia do campo aberto.....	13
Figura 3 - Fotografia da caixa de locomoção espontânea.....	14
Figura 4 - Fotografia do labirinto em cruz elevado.....	15
Figura 5 - Fotografia da caixa de preferência condicionada de lugar.....	17
Figura 6 - Fotografia do plano inclinado.....	18
Figura 7 - Consumo de sacarina dos ratos SHR machos e fêmeas criados em AP e AE.....	25
Figura 8 - Consumo forçado de etanol dos ratos SHR machos e fêmeas criados em AP e AE.....	26
Figura 9 - Consumo voluntário de etanol e preferência ao etanol dos ratos SHR machos e fêmeas criados em AP e AE.....	28
Figura 10 - Consumo de ração durante o protocolo de auto-administração oral dos ratos SHR criados em AP e AE.....	29
Figura 11 - Efeitos do enriquecimento ambiental sobre o comportamento das ratas SHR avaliadas no CA e na CME.....	31
Figura 12 - Efeitos do enriquecimento ambiental sobre os comportamentos relacionados à ansiedade das ratas SHR avaliadas no LCE.....	32
Figura 13 - Efeito da administração aguda de etanol sobre o comportamento das ratas SHR criadas em AP ou AE avaliadas no CA.....	34
Figura 14 - Efeito do enriquecimento ambiental sobre as propriedades reforçadoras do etanol avaliadas na PCL, em ratas SHR.....	36
Figura 15 - Efeito do enriquecimento ambiental sobre a tolerância aguda ao etanol em ratas SHR.....	37

RESUMO

O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) ocorre frequentemente em comorbidade com outros transtornos psiquiátricos como a ansiedade e a dependência às drogas. Os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) apresentam características neuroquímicas e comportamentais que o tornam um modelo adequado para o estudo do TDAH. Esta linhagem de ratos também apresenta um elevado comportamento de busca por novidade e alta sensibilidade para distintas classes de abuso de drogas, o que faz dela um interessante modelo para o estudo da associação entre o TDAH e o uso abusivo de drogas. O propósito deste estudo é investigar a influência do ambiente de criação durante os estágios iniciais da vida sobre as propriedades motivacionais do etanol e sobre o comportamento relacionado à ansiedade dos ratos SHR. Os animais criados em ambiente padrão (AP) ou enriquecido (AE), desde o desmame até a idade adulta, foram submetidas a testes que avaliam a locomoção induzida por novidade, o consumo oral de substâncias reforçadoras (sacarina e etanol), a sensibilidade aos efeitos do etanol no campo aberto, na preferência condicionada do lugar (PCL) induzida por etanol e na tolerância aguda ao etanol no plano inclinado. SHR criados em um AE mostraram uma redução da locomoção induzida por novidade, beberam menos sacarina e etanol e não preferiram o etanol à água, em comparação aos ratos do AP. Além disso, os animais criados em AE não desenvolveram PCL, enquanto os animais do AP desenvolveram preferência ao lugar associado ao etanol (dose de 1,2 g/kg). Os dois grupos mostraram diferentes sensibilidades aos efeitos ansiolítico/estimulante do etanol, porém os ratos mantidos tanto em AP quanto AE desenvolveram tolerância aguda ao etanol. Estes resultados mostram que a exposição a estímulos que mimetizam experiências positivas (enriquecimento ambiental) induzem alterações persistentes no sistema de recompensa/motivacional dos ratos SHR, sugerindo um importante papel do ambiente de criação durante os primeiros estágios do neurodesenvolvimento, sobre a comorbidade entre o TDAH e abuso de drogas.

ABSTRACT

Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) often occurs in comorbidity with other psychiatric disorders, such as anxiety and drug addiction. The spontaneously hypertensive rats (SHR) show neurochemical and behavioral characteristics which make their suitable model of ADHD. This rat strain displays increased novelty seeking behavior and high sensitivity to distinct classes of abused drugs, which makes it an interesting model for the study of the association between ADHD and drug abuse. The purpose of this study is to investigate the influence of rearing environment during early stages of life on motivational properties of ethanol, novelty-induced locomotion and anxiety-like behavior of SHR rats. The animals reared from weaning to adulthood in standard (SE) or enriched (EE) environment were evaluated on novelty-induced locomotion, oral consumption of rewarding substances (saccharin and ethanol), sensitivity to the effects of ethanol in open field (OF), ethanol-induced conditioned place preference (CPP) and acute tolerance to ethanol on the tilting plane. SHR reared in an EE showed reduced novelty-induced locomotion, drank less saccharin and ethanol and showed less ethanol preference compared to SE rats. Moreover, EE rats did not develop CPP, whereas SE rats developed preference for ethanol-associated compartment (1.2 g/kg). They also showed different sensitivity to the anxiolytic/stimulant effects of ethanol and both groups developed acute tolerance to ethanol. These results show that exposure to stimuli mimicking positive life experiences (EE) induces persistent changes in the reward/motivational system of SHR rats, suggesting an important role of the familiar environment during early stages of the neurodevelopment on the comorbidity of ADHD and drug abuse.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Uso abusivo e dependência ao etanol

O álcool (etanol) é uma das drogas psicoativas mais antigas utilizada pela humanidade. Atualmente, o consumo de bebidas alcoólicas está inserido em diversas culturas. Seu uso é associado com celebrações, cerimônias religiosas e eventos culturais, sociais e de negócio. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 2 bilhões de pessoas consomem bebidas alcoólicas em todo o mundo. O uso abusivo do álcool e a sua dependência representam um dos maiores problemas de saúde pública, sendo que os transtornos relacionados ao uso do álcool acometem em torno de 76 milhões de pessoas em todo o mundo. Os problemas decorrentes direta e indiretamente do consumo de álcool como acidentes, violência e perda de produtividade geram grandes prejuízos econômicos e sociais (WHO, 2002). Os problemas de saúde causados pelo uso de álcool e de outras drogas psicoativas incluem o uso abusivo e a dependência. O uso abusivo é caracterizado por um padrão de consumo de álcool considerado prejudicial do ponto de vista físico, psicológico ou social, mas não preenche os critérios de dependência (American Psychiatric Association, 2000). A dependência é caracterizada pelo consumo repetido de bebidas alcoólicas, resultando em tolerância, síndrome de abstinência e comportamento compulsivo de procura pela droga (“fissura”). O uso compulsivo de substâncias é uma característica da dependência e um dos critérios diagnósticos centrais apresentados pelo DSM IV (American Psychiatric Association, 2000).

No Brasil, de acordo com o I levantamento domiciliar sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira, realizado pelo CEBRID (Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas) em 2007, mostrou que cerca de 12% da população adulta (18 anos ou mais) relatou algum problema relacionado ao abuso ou a dependência de álcool. Tanto o uso abusivo quanto a dependência predominam entre os homens, sendo em média quatro vezes mais comum em homens do que em mulheres. Sendo que, ainda não se notou na população brasileira um fenômeno que já ocorre nos países desenvolvidos, onde se observa uma maior aproximação entre os gêneros em relação ao perfil de consumo abusivo de bebidas alcoólicas.

O etanol possui uma estrutura molecular simples de lipossolubilidade elevada, capaz de interagir com vários alvos

moleculares no sistema nervoso central. Os principais alvos farmacológicos do etanol no cérebro são os receptores. Os efeitos depressores do etanol são devidos principalmente a ações nos dois maiores receptores ionotrópicos presentes no cérebro o GABA_A e os receptores NMDA (Lovinger *et al.*, 1989; Roberto *et al.*, 2003; Ron, 2004). Além disso, o etanol interage direta ou indiretamente com outros sistemas de neurotransmissão (dopaminérgico, serotoninérgico, colinérgico e glicinérgico) e de neuromodulação (adenosinérgico, opioidérgico e endocanabinóide) (Nevo e Hamon, 1995; Lovinger, 2008).

O ácido gama-aminobutírico (GABA) medeia a maioria das sinapses inibitórias rápidas através da ativação dos receptores GABA_A. O etanol aumenta a condutância dos canais GABA_A ao íon cloreto promovendo um aumento de correntes inibitórias e potencializando a neurotransmissão gabaérgica (Weiner e Valenzuela, 2006). A potencialização da transmissão gabaérgica parece contribuir para vários dos aspectos da intoxicação aguda por etanol, incluindo incoordenação motora, efeitos ansiolíticos e sedação. O glutamato medeia a maioria das sinapses excitatórias rápidas do sistema nervoso central. Os receptores glutamatérgicos principalmente do subtipo NMDA são inibidos pelo álcool, o que leva a uma diminuição do influxo de cátions por esse receptor promovendo a redução da excitabilidade neuronal. Além disso, canais de cálcio ativados por voltagem também são bloqueados pela administração aguda de etanol contribuindo ainda mais para diminuição da excitabilidade neuronal, uma vez que esses canais estão envolvidos na fusão e liberação de vesículas de neurotransmissores (Wang *et al.*, 1994; Widmer *et al.*, 1998). O uso crônico do etanol pode promover diversas neuroadaptações, principalmente nos sistemas gabaérgico e glutamatérgico. Com a interrupção do uso, essas neuroadaptações são desbalanceadas e pode ser estabelecido um quadro clínico conhecido como síndrome de abstinência, caracterizado por um estado de hiperexcitabilidade neuronal devido principalmente à potenciação da neurotransmissão glutamatérgica (Hoffman e Tabakoff, 1994). Além disso, a inibição promovida pelo etanol leva a uma desinibição os neurônios dopaminérgicos do sistema mesolímbico de recompensa, que está intimamente ligado aos efeitos reforçadores do etanol, assim como ocorre com outras drogas de abuso (Nevo e Hamon, 1995; Lima, 2003). A tolerância que é caracterizada pela redução dos efeitos após administração repetida, onde se requer um aumento da dose para promover os mesmos efeitos iniciais, é outro processo adaptativo bastante observado no desenvolvimento da dependência ao etanol, assim como de outras drogas de abuso (Radlow, 1994). No contexto das drogas

de abuso, os efeitos reforçadores das drogas de abuso juntamente com a tolerância contribuem para seu uso compulsivo durante o curso da dependência (Koob e Le Moal, 2001).

1.2 Sistema de recompensa

O sistema dopaminérgico além de estar envolvido nos sintomas motores e cognitivos do TDAH, também desempenha um papel fundamental em processos de motivação e recompensa (Tomkins e Sellers, 2001). Embora os substratos neuronais que delineiam processo de dependência às drogas sejam bastante complexos, não existem dúvidas de que o sistema dopaminérgico mesolímbico, assim como estruturas associadas ao sistema límbico, exerce um papel crucial nas alterações na plasticidade sináptica de diferentes regiões do cérebro que contribuem para o desenvolvimento da dependência (Nestler, 2005; Hyman *et al.*, 2006). O Sistema de recompensa é constituído por neurônios dopaminérgicos que se projetam da área tegmentar ventral (ATV) para o núcleo *accumbens* (NAc), estriado dorsal, córtex pré-frontal (CPF) e outras estruturas límbicas (Masterman e Cummings, 1997; Hyman *et al.*, 2006). Várias evidências indicam que estas regiões cerebrais medeiam os principais aspectos da dependência, como os efeitos reforçadores positivos (sensação de prazer e euforia), o desejo compulsivo pela droga (“fissura”) e os efeitos reforçadores negativos relacionados com a retirada da droga (disforia e irritabilidade) (Hyman *et al.*, 2006; Kauer e Malenka, 2007).

A liberação de dopamina no NAc e na ATV é influenciada por impulsos excitatórios, que incluem as projeções glutamatérgicas originadas no córtex cerebral, amígdala e hipocampo, e por impulsos inibitórios que incluem projeções de inter-neurônios gabaérgicos (Johnson, 2004). Ao contrário dos psicoestimulantes que estimulam diretamente a liberação da dopamina, o etanol promove a liberação de dopamina no sistema de recompensa de maneira indireta. Isso ocorre, principalmente porque a administração aguda de etanol causa uma inibição dos neurônios gabaérgicos localizados na ATV e NAc, desinibindo os neurônios dopaminérgicos nesses locais, o que aumenta a liberação de dopamina (Weiss *et al.*, 1993), bem como a taxa de disparos das células dopaminérgicas nas regiões cerebrais envolvidas nas propriedades reforçadoras do etanol (Li *et al.*, 2001). O uso crônico do etanol leva a uma sensibilização do sistema de recompensa, ocasionando uma deficiência nos níveis dopamina no cérebro (Koob e Le Moal, 2001). Neste contexto, existe uma hipótese postulando que os indivíduos que

possuem uma hipofunção dopaminérgico central são mais susceptíveis ao desenvolvimento do alcoolismo (Volkow *et al.*, 2002), sendo esta característica observada também em indivíduos com TDAH.

1.3 Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade

O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) é um transtorno psiquiátrico bastante comum e persistente na infância, caracterizado pela presença de três sintomas primários: desatenção, hiperatividade e impulsividade (Taylor, 1998; Himelstein *et al.*, 2000). A prevalência estimada do TDAH é de 2–12 % em crianças em idade escolar em diferentes culturas, incluindo o Brasil (Rohde *et al.*, 1999). Das crianças diagnosticadas, 20-30% continuam manifestando sintomas do TDAH durante a adolescência e idade adulta (Muglia *et al.*, 2000), sendo que 4% da população adulta total apresentam os sintomas completos da síndrome (Mannuzza *et al.*, 1998; Faraone e Biederman, 2005; Kessler *et al.*, 2006). Na infância, esse transtorno psiquiátrico é mais comum em meninos do que em meninas, no entanto, quando analisado o gênero dos pacientes que continuam apresentando os sintomas durante a adolescência e idade adulta, observa-se que o número de mulheres afetadas é relativamente maior do que o de homens (Biederman *et al.*, 1994; Muglia *et al.*, 2000).

Existe uma preocupação com relação à co-ocorrência de outros transtornos psiquiátricos em indivíduos com TDAH, como depressão, ansiedade, transtornos de personalidade (por exemplo, comportamento desafiante e distúrbio de conduta), e particularmente, o uso abusivo de drogas e vulnerabilidade ao desenvolvimento da dependência (Biederman *et al.*, 1994; Biederman, 2005; Wilens *et al.*, 2005; Kessler *et al.*, 2006). Evidências mostram que indivíduos com TDAH experimentam substâncias psicoativas mais precocemente e há uma elevada prevalência do uso abusivo de álcool e outras drogas nesses indivíduos (Carroll e Rounsaville, 1993; Schubiner *et al.*, 2000). Alterações na via dopaminérgica de recompensa parecem estar envolvidas na associação entre TDAH e o abuso de drogas. Por consequência, indivíduos com TDAH tendem a ser mais propensos a recompensas imediatas e a ter menor capacidade de planejar e antecipar situações, características fortemente associadas ao abuso de drogas.

O TDAH é um transtorno psiquiátrico heterogêneo decorrente de uma complexa interação entre fatores genéticos e ambientais. Em relação à neurobiologia do TDAH, tem sido sugerido que alterações nos sistemas de neurotransmissão monoaminérgica, particularmente no

sistema dopaminérgico, possam estar envolvidas. Evidências clínicas, por exemplo, demonstram que inibidores da recaptação de catecolaminas, como os inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina, e os inibidores da recaptação de dopamina - como a d-anfetamina ou metilfenidato (Ritalina®) - promovem uma melhora substancial na qualidade de vida dos portadores de TDAH (Biederman e Spencer, 1999; Seeman e Madras, 1998). Por outro lado, o tratamento com inibidores seletivos da recaptação de serotonina promove apenas benefícios limitados nos pacientes com TDAH (Barrickman *et al.*, 1991).

A alta taxa de prevalência e hereditariedade deste transtorno psiquiátrico na população (Smalley, 1997; Faraone, 2004), indica que pode existir uma associação entre o TDAH e os polimorfismos encontrados em vários genes ligados aos neurotransmissores monoaminérgicos, incluindo os genes dos receptores de dopamina (D1, D4 e D5), do receptor α_2 -adrenérgico e dos transportadores de dopamina, noradrenalina e serotonina (Bobb *et al.*, 2005a; 2005b; Faraone *et al.*, 2001; La Hoste *et al.*, 1996; Maher *et al.*, 2002; Manor *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2005). Isso reflete uma etiologia poligênica e de múltiplos determinantes ao TDAH, que resulta de uma combinação entre várias combinações de genes, capaz de produzir alterações pós-sinápticas de uma magnitude que exceda a capacidade de mecanismos neuronais ou comportamentais compensatórios, e que confere ao indivíduo um conjunto de sintomas peculiar. Neste contexto, fatores ambientais também poderiam atuar no sentido de normalizar a função sináptica a despeito de uma constituição genética desfavorável (Sagvolden *et al.*, 2005a), o que poderia explicar a existência dos três subtipos deste transtorno psiquiátrico: (1) TDAH predominante hiperativo, (2) TDAH predominante hiperativo e impulsivo e (3) TDAH combinado, segundo a classificação da 4ª edição do Manual de Diagnóstico Estatístico de Transtornos Mentais da Associação Americana de Psiquiatria (DSM IV, *sigla em inglês*) (American Psychiatric Association, 2000).

Notadamente uma grande vertente de estudos considera que a hipofunção do sistema dopaminérgico, está intimamente relacionada com as características comportamentais presentes nos indivíduos com TDAH (Sagvolden e Sergeant, 1998; Sagvolden *et al.*, 2005a). Estes estudos sugerem que a hipofunção das vias mesocorticais, mesolímbica e nigroestriatal sejam responsáveis pelas alterações nos processos de reforçamento e extinção de um comportamento previamente reforçado. Tais alterações implicam em uma deficiência de inibir respostas aliada a um prejuízo nas funções executivas, que no âmbito comportamental são refletidos nos sintomas cognitivos e motores observados nestes

pacientes (Sagvolden *et al.*, 2005b). Em decorrência disso, pacientes com TDAH apresentam um aumento da atividade da enzima monoamino oxidase (MAO), responsável pela metabolização da dopamina (Stoff *et al.*, 1989), bem como, uma aumentada expressão de receptores dopaminérgicos D₂ no cérebro em relação aos indivíduos sadios de mesma faixa etária, quando observados por estudos de imagem (Jucaite *et al.*, 2005).

1.4 Ratos espontaneamente hipertensos como modelo animal do TDAH

De uma maneira geral, os modelos animais propostos para o estudo do TDAH consistem em roedores desenvolvidos a partir da exposição a toxinas ambientais (Silbergeld e Goldberg, 1974; Holene *et al.*, 1998), ratos Wistar-Kyoto hiperativos, selecionados a partir de uma população heterogênea (Puumala *et al.*, 1996), animais submetidos à anoxia neonatal (Dell'Anna *et al.*, 1993) ou lesões neurológicas induzidas por toxinas dopaminérgicas (Shaywitz *et al.*, 1976), bem como, modelos obtidos a partir de manipulação genética, a exemplo dos ratos Naple com alta/baixa excitabilidade (Sadile *et al.*, 1996), camundongos deletados geneticamente para o transportador de dopamina (Giros *et al.*, 1996) e os ratos espontaneamente hipertensos (SHR-spontaneously hypertensive rat, *sigla em inglês*) (Sagvolden, 2000). De certa forma, cada um desses modelos animais reserva em si uma ou outra característica que mimetiza o TDAH, no entanto, a maioria não contempla todos os critérios necessários para um modelo animal desse transtorno psiquiátrico. Contudo, os ratos da linhagem SHR, apresentam características comportamentais e neuroquímicas, que fazem deles um modelo animal amplamente utilizado no estudo do TDAH (Davids *et al.*, 2003).

A linhagem de ratos SHR foi desenvolvida a partir da seleção genética de ratos Wistar-Kyoto com fenótipo de hipertensão, onde foi observado que estes ratos também apresentavam uma atividade locomotora aumentada (Moser *et al.*, 1988). Partindo de cruzamentos consangüíneos, foi criada a linhagem isogênica SHR (Okamoto e Aoki, 1963), que além da atividade locomotora aumentada, apresentava as principais características fenotípicas relacionadas ao TDAH. Quando comparado com ratos Wistar-Kyoto ou com outras linhagens, os ratos SHR apresentam déficits cognitivos em diferentes paradigmas de aprendizagem e memória (Nakamura-Palacios *et al.*, 1996; Prediger *et al.*, 2005a; Prediger *et al.*, 2005b Pires *et al.*, 2009); hiperatividade, em algumas

situações, impulsividade motora e avidéz por novidade (Sagvolden e Sergeant, 1998; Sagvolden, 2000; Russell, 2002, Sagvolden e Xu, 2008). No entanto, é importante salientar que, em um estudo envolvendo seis diferentes linhagens isogênicas, os ratos SHR mostraram-se hiperativos somente quando comparados aos ratos Wistar-Kyoto, o que demonstra a importância do uso de uma linhagem controle adequada em estudos envolvendo modelos genéticos (Ramos *et al.*, 1997). Muitas das características comportamentais anteriormente mencionadas, já estão nos animais jovens, antes do estabelecimento da hipertensão arterial, sugerindo que a hipertensão e as características comportamentais desses animais são, ao menos parcialmente, fenótipos independentes conforme foi demonstrado por Ramos e colaboradores (1998a). Os ratos SHR apresentam também características neurobiológicas consistentes com a hipótese da hipofunção dopaminérgica do TDAH, como baixa liberação de dopamina (Russel *et al.*, 1995) aliada a uma atividade aumentada da MAO e alterações no gene do transportador de dopamina (DAT1), que poderiam afetar a recaptção e o metabolismo da dopamina o que diminuiria a disponibilidade deste neurotransmissor no cérebro (Boix *et al.*, 1998). Outro aspecto importante é que esses animais apresentam uma relativa diminuição na atividade locomotora e uma melhora nos prejuízos cognitivos, quando submetidos ao tratamento com metilfenidato, conferindo validade farmacológica este modelo animal (Adriani *et al.*, 2004).

Além das características comportamentais e neuroquímicas que o validam como modelo animal do TDAH, os ratos SHR apresentam um elevado comportamento de busca por novidade e são mais sensíveis aos efeitos de diferentes classes de drogas de abuso, como: etanol (Khanna *et al.*, 1990; Da Silva *et al.*, 2005), psicoestimulantes (Amini *et al.*, 2004; Pamplona *et al.*, 2007; Vendruscolo *et al.*, 2009a), canabinóides (Pandolfo *et al.*, 2007; 2009) e opióides (ver revisão, Vendruscolo *et al.*, 2009b). Em relação ao consumo de etanol, a linhagem de ratos SHR, particularmente as fêmeas, consomem maiores quantidades de etanol e sacarina do que outras linhagens de ratos (Da Silva *et al.*, 2004; 2005; Vendruscolo *et al.*, 2005). Neste sentido, tem sido proposto que a linhagem de ratos SHR constitui um modelo promissor para o estudo da relação entre o TDAH e o uso abusivo de drogas.

1.5 Enriquecimento ambiental

O enriquecimento ambiental consiste em um modelo experimental no qual os animais são expostos a um ambiente que fornece uma variedade de estímulos cognitivos, sensoriais e motores (Renner e Rosenzweig, 1987; van Praag *et al.*, 2000). O paradigma do enriquecimento ambiental foi primeiramente descrito em um contexto neurocientífico, no final da década de 40 por Donald Olding Hebb (Hebb, 1947), quando o neurocientista relatou uma melhoria no comportamento dos ratos que eram criados livremente em sua casa, quando comparados com aqueles que eram mantidos em gaiolas no laboratório.

Desde então, muitos trabalhos foram publicados mostrando os benefícios desse paradigma no comportamento dos animais. Embora a natureza do protocolo utilizado varie bastante entre os trabalhos, o ambiente enriquecido é normalmente constituído de gaiolas grandes, contendo uma variedade de objetos: escadas, túneis, esconderijos, brinquedos e uma roda de correr. Esses objetos fornecem uma gama de oportunidades de estímulos visuais, somatossensoriais, olfativas e motoras, com maiores possibilidades de interação, manipulação, exploração do ambiente, além dos benefícios da atividade física voluntária. Há também protocolos experimentais, onde é inserido um número maior de animais, potencializando as interações sociais. Além disso, a localização dos objetos e da ração é freqüentemente trocada de lugar dentro da gaiola, o que favorece a aprendizagem espacial através da criação de novos mapas espaciais (van Praag *et al.*, 2000). Atualmente alguns autores têm sugerido que o ambiente enriquecido representa um ambiente de criação mais natural e saudável para os animais (Würbel, 2001).

Muitos estudos têm mostrado que a exposição ao AE promove benefícios fisiológicos, morfológicos, bem como alterações na plasticidade neuronal incluindo: aumento da arborização dendrítica, gliogênese, neurogênese, e modificações na expressão de genes ligados à plasticidade neuronal. Em decorrência disso, a exposição ao ambiente enriquecido melhora o aprendizado e a memória (van Praag *et al.*, 2000); diminui o estresse (Larsson *et al.*, 2002; Moncek *et al.*, 2004; Fox *et al.*, 2006), a ansiedade (Fernández Teruel *et al.*, 2002; Benaroya-Milshtein *et al.*, 2004) e a depressão (Brenes e Fonarguera, 2008); atenua danos ao cérebro (Will *et al.*, 2004) e diminui a insurgência de doenças neurodegenerativas (Nithianantharajah e Hannan, 2006). Além disso, muitos estudos pré-clínicos têm mostrado que o enriquecimento ambiental diminui os

efeitos reforçadores de drogas como anfetamina, nicotina e cocaína (Bowling *et al.*, 1993; Bardo *et al.*, 2001; Green *et al.*, 2002, 2003; Solinas *et al.*, 2008a). Estes resultados indicam que estímulos ambientais positivos, como enriquecimento ambiental, promovam certa proteção contra os efeitos das drogas, reduzindo a vulnerabilidade ao abuso de drogas (ver artigo de revisão Stairs e Bardo, 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Considerando as informações relatadas na introdução, e tendo em vista a escassez de trabalhos na literatura abordando este assunto, o objetivo do presente estudo foi investigar as conseqüências da exposição a estímulos positivos (enriquecimento ambiental) durante o período crucial do neurodesenvolvimento - do início da vida até a idade adulta – sobre a sensibilidade a reforços externos e às propriedades reforçadoras do etanol em um modelo animal do TDAH.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar efeito do enriquecimento ambiental sobre o consumo de substâncias reforçadoras (sacarina e etanol) em ratos SHR machos e fêmeas.

- Avaliar a influência do enriquecimento ambiental sobre o impacto à novidade e sobre características comportamentais relacionadas à ansiedade em ratas SHR.

- Avaliar efeitos do enriquecimento ambiental sobre a sensibilidade aos efeitos ansiolítico / estimulante induzidos pela administração aguda de etanol, em ratas SHR, avaliadas no teste do campo aberto.

- Avaliar os efeitos do enriquecimento ambiental sobre as propriedades reforçadores do etanol em ratas SHR, avaliadas no teste da preferência condicionada de lugar.

- Avaliar a influência do enriquecimento ambiental sobre o desenvolvimento da tolerância aguda ao prejuízo motor induzido pelo etanol em ratas SHR.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR) machos e fêmeas criados e mantidos em nosso laboratório. A colônia de ratos SHR utilizada neste estudo foi originada de uma matriz proveniente do Laboratório de Genética do Comportamento da UFSC (Florianópolis, SC, Brasil), gentilmente cedida ao biotério setorial do Laboratório de Psicofarmacologia em 2001, pelo Professor Dr. André Ramos. Deste então, os animais têm sido mantidos sob um sistema de acasalamento irmão/irmã conforme recomendado para todas as linhagens isogênicas. Vinte e um dias após o nascimento, os animais foram desmamados, separados por sexo e mantidos em gaiolas de moradia distintas (padrão ou enriquecida), até a idade adulta (aproximadamente 3 meses de idade). As gaiolas de moradia foram mantidas em uma sala com temperatura controlada (23 ± 2 °C) sob 12-h de ciclo claro/escuro (fase clara 07:00-19:00). Os animais tinham livre acesso a água e ração. Todos os experimentos foram realizados entre 09:00 e 18:00 horas para minimizar as variações comportamentais circadianas dos animais. O manuseio dos animais ocorreu de acordo com as normas de conduta com animais experimentais do Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA-UFSC). O peso corporal médio dos ratos SHR ao atingirem a idade adulta e antes de iniciarem os testes, era de: 153 ± 8 g e 192 ± 4 g para as fêmeas criadas em ambientes padrão e enriquecido, respectivamente; 199 ± 3 g e 215 ± 10 g para os machos criados em ambientes padrão e enriquecido, respectivamente.

3.2 Ambientes de Criação

Após o desmame, os animais foram aleatoriamente separados em dois ambientes de criação distintos: ambiente padrão (AP) ou ambiente enriquecido (AE). O AP consistia em gaiolas comuns de polietileno (42 x 34 x 17 cm). O AE consistia de duas gaiolas de polietileno idênticas (43 x 33 x 23 cm) interconectadas por um tubo de PVC, contendo uma variedade de estímulos sensoriais, por exemplo: uma roda de correr, um túnel contorcido, escadas, chocalhos e brinquedos como bolas de diversas cores e texturas, conforme previamente estabelecido em nosso laboratório (Pamplona *et al.*, 2009). Estes objetos eram lavados e

alternados entre os ambientes e as suas posições eram trocadas de lugar mudando a configuração espacial do AE e a composição dos objetos duas vezes por semana. Os animais foram mantidos em grupos de 5-6 animais nos dois tipos de ambientes de criação (AP e AE) 24 horas por dia até o início dos experimentos, exceto para os animais submetidos ao teste da preferência condicionada de lugar, os quais retornavam aos seus respectivos ambientes de criação depois de cada procedimento experimental.



Figura 1. Gaiola de ambiente enriquecido.

3.3 Drogas e reagentes

A solução de sacarina 0,75 mM (Vetec, Brasil) e a solução de etanol 10%(v/v), utilizadas nos procedimentos de auto-administração oral foram preparadas pela diluição de sacarina 99,9 % (Vetec Química Fina Ltda, Brasil) e etanol 99,5% (Merck, Alemanha) em água potável. As soluções de etanol administradas pela via intraperitoneal (0,5-2,0 g/kg) foram diluídas em solução de cloreto de sódio 0,9%, a concentração máxima de etanol 15% nas soluções injetáveis era de 15% (v/v). O volume injetado (ml) foi calculado pela seguinte fórmula: peso corporal (Kg) multiplicado pela dose de etanol (g/kg) dividido pela concentração de etanol da solução. Na dosagem de etanol no sangue dos animais foram utilizados os seguintes reagentes: TRIS (hidroximetil) amino metano (Vetec Química Fina Ltda, Brasil), ADH (Alcohol

Dehydrogenase, 15000UI) e β -NAD (β -nicotinamide adenine dinucleotide) obtidos da indústria Sigma Chemical Co. (EUA).

3.4 Testes Comportamentais

3.4.1 Campo aberto

O teste do campo aberto (CA) foi originalmente desenvolvido como um teste de para avaliação da emocionalidade (Hall, 1934) e desde então este teste tem sido amplamente utilizado para avaliar o efeito de drogas e de manipulações genéticas e ambientais sobre a emocionalidade dos animais (Archer, 1973; Ramos e Mormède, 1998). Além disso, tem sido sugerido que a atividade locomotora e exploratória em uma ambiente novo e inescapável pode refletir um componente reforçador da novidade (Bardo *et al.*, 1996) em roedores. O CA consiste em uma arena contendo uma área central aversiva que gera medo e conflito nos animais. O aparato é feito de madeira coberto com fórmica branca e impermeável (100 x 100 cm), com assoalho dividido por linhas pretas formando 25 quadrados (20 x 20 cm) e cercada por paredes brancas de madeira (40 cm de altura) (Figura 2). A intensidade de luz no centro do CA mudou de acordo com o protocolo experimental utilizado. No momento do teste, cada animal foi gentilmente colocado no centro do CA, e o seu comportamento foi registrado por uma câmera de vídeo, acoplado a um aparelho de DVD instalado em uma sala adjacente à sala de experimentos. As seguintes medidas foram registradas durante 5 minutos: número de cruzamentos periféricos e centrais, número de levantamentos e tempo gasto no centro da arena. Após o final de sessão experimental o CA foi limpo com álcool papel toalha embebido com solução de etanol a 10 %.



Figura 2. Campo aberto

3.4.2 Caixa de movimentação espontânea

A caixa de movimentação espontânea (CME) consiste em uma caixa retangular (40 x 12 x 20 cm) com assoalho de grades metálicas, teto de acrílico transparente e paredes de madeira equipadas com três pares de sensores de luz infravermelha equidistantes entre si e posicionadas 2 cm acima do assoalho da caixa (Figura 3). Três pares de sensores fotoelétricos registram o número de interrupções do feixe luminoso, quando o animal se movimenta no interior da caixa, fornecendo o parâmetro ambulação. Os sensores fotoelétricos eram conectados a um contador automático que registrava a locomoção dos animais. Cada interrupção do feixe de luz correspondia a uma unidade de locomoção. O teste foi conduzido em uma sala com baixa iluminação (aproximadamente 10 lux). Os parâmetros analisados neste teste foram: a locomoção, durante os primeiros 20 minutos, que representa a reatividade do animal em um ambiente novo, e a locomoção total (somatório dos 60 min), que melhor representa uma medida da locomoção geral (Vendruscolo *et al.*, 2005).



Figura 3. Caixa de movimentação espontânea

3.4.3 Labirinto em cruz elevado

O teste do labirinto em cruz elevado (LCE), que é baseado no conflito de roedores entre a movimentação para explorar um ambiente novo e o medo de áreas elevadas abertas, foi utilizado para mensurar comportamentos relacionados à ansiedade em ratos (Montgomery, 1955; Pellow *et al.*, 1985) O aparato do LCE é feito de madeira revestido com fórmica preta e impermeável, possui quatro braços elevados (52 cm de altura) com 50 cm de comprimento e 10 cm de largura. Os braços estão

dispostos perpendicularmente, formando uma cruz, com dois braços opostos fechados por paredes de 40 cm de altura e dois braços abertos com uma borda de 1 cm de altura em cada braço. A intersecção dos quatro braços forma uma plataforma central (10 x 10 cm) que dá acesso a qualquer um dos braços (Figura 4). Os testes foram conduzidos sob iluminação moderada (50 lux na plataforma central), sendo o comportamento registrado por uma por uma câmera de vídeo, acoplada a um aparelho de DVD instalado na sala adjacente à sala de experimentos. Cada animal foi colocado nessa plataforma, com a face voltada para um dos braços abertos, enquanto os seguintes comportamentos eram observados durante 5 min: Número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados e tempo de permanência nos braços abertos e nos braços fechados (foi registrada a entrada em cada braço toda vez que o animal colocava as quatro patas dentro do braço). Estes dados foram utilizados para calcular o percentual de entradas nos braços abertos [% de entradas nos braços abertos = $\frac{\text{entradas nos braços abertos}}{\text{braços abertos} + \text{braços fechados}} \times 100$] e o percentual de tempo gasto nos braços abertos [% de tempo gasto nos braços abertos = $\frac{\text{tempo nos braços abertos}}{\text{tempo nos braços abertos} + \text{tempo nos braços fechados}} \times 100$], ambos utilizados como índices de ansiedade. O número de entradas nos braços fechados foi utilizado como medida da atividade locomotora (Rodgers e Dalvi, 1997).



Figura 4. Labirinto em cruz elevado.

3.4.4 Procedimento de auto-administração oral

O procedimento de auto-administração oral foi realizado em gaiolas individuais de polietileno, cobertas por uma grade de arame contendo o comedouro de ração e suporte para duas garrafas. Durante o procedimento de consumo de substâncias reforçadoras as garrafas eram preenchidas com líquidos (água e solução de sacarina e etanol). Sendo pesadas diariamente e completadas com água e/ou soluções testes frescas a cada dois dias. Além disso, a posição das garrafas era trocada diariamente para evitar preferência de lugar. As gaiolas ficavam dispostas em uma estante no biotério setorial, seguindo o mesmo esquema de iluminação. A pesagem dos animais foi realizada no início dos testes e ao final de cada etapa do protocolo (fase de adaptação, consumo voluntário de sacarina e consumo de etanol em regime forçado e voluntário).

3.4.5 Preferência Condicionada de Lugar

A preferência condicionada de lugar (PCL) é um modelo animal amplamente utilizado para avaliar os efeitos reforçadores de drogas com potencial de abuso em humanos (Bardo e Bevins, 2000; Cunningham *et al.*, 2000; Tzschentke, 2007). Este teste avalia a capacidade do animal em associar o efeito reforçador da droga com dicas do ambiente. Os experimentos da PCL foram realizados em uma caixa retangular de madeira coberta com fórmica (Figura 5). A caixa de PCL era formada por três diferentes compartimentos separados por portas de guilhotina. O compartimento central “neutro” (15 x 25 x 40 cm) era de madeira cinza e tinha aberturas (10 x 10 cm) que davam acesso aos outros dois outros compartimentos. Os dois compartimentos de condicionamento (30 x 25 x 40 cm) tinham diferentes pistas visuais e táteis: um compartimento era preto com piso de madeira lisa e o outro era branco com listras verticais pretas e piso de alumínio. Os experimentos de PCL foram conduzidos em uma sala de baixa iluminação (10 lux) e o comportamento de cada animal era registrado através de uma câmera de vídeo posicionada acima da caixa e monitorada em uma sala adjacente por um circuito fechado de TV por um experimentador que não tinha conhecimento do tratamento do dos grupos experimentais durante a avaliação comportamental. Ao final de cada sessão, os animais retornavam para seus respectivos ambientes e os aparatos eram limpos com papel toalha embebidos com solução de etanol a 10%.



Figura 5. Caixa de preferência condicionada de lugar.

3.4.6 Plano inclinado

O prejuízo motor induzido pelo etanol foi avaliado através do teste do plano inclinado, utilizando um protocolo modificado de acordo com Quintanilla e Tampier (2000). O aparato consiste em uma plataforma retangular móvel recoberta por uma grade metálica que é inclinada manualmente de 0 a 90° num intervalo aproximado de 5 segundos. No momento do teste, o animal era colocado sobre a grade tendo o focinho voltado para a parte de cima. Uma parede de acrílico transparente evita a saída do animal da plataforma, permitindo ao observador verificar o ângulo de queda do animal (Figura 6). Em seguida, o ângulo era transformado em um percentual de prejuízo motor de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Prejuízo motor (\%)} = \frac{(\text{Basal} - a) \times 100}{(\text{Basal} - \alpha)}$$

Onde:

a = ângulo de queda do animal no momento do teste.

α = ângulo de queda de um animal anestesiado (aproximadamente 40°).

Basal = ângulo de queda antes de qualquer tratamento (normalmente 90°).

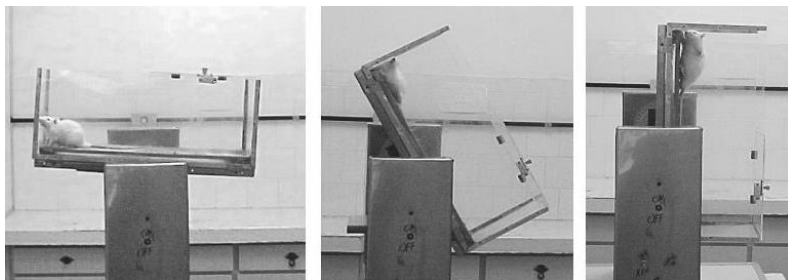


Figura 6. Teste do plano inclinado. O aparato consiste em uma grade metálica inclinada manualmente de 0 a 90° em relação ao plano horizontal em aproximadamente 5 s. Esta figura mostra o desempenho de um animal antes de qualquer tratamento, onde ele permanece agarrado ao assoalho do aparelho grade metálica mesmo na inclinação máxima de 90° correspondente a uma ausência de prejuízo motor (prejuízo motor (%) = 0).

3.5 Dosagem de álcool

O método utilizado na dosagem consiste na conversão de álcool a acetaldeído pela enzima álcool desidrogenase, na presença da forma oxidada do cofator que é reduzida na reação enzimática. Concentrações crescentes de etanol estão diretamente relacionadas com densidades ópticas maiores devido ao aumento da forma reduzida do cofator. A metodologia utilizada para dosagem de etanol foi modificada e adaptada de outros estudos (Kristoffersen *et al.*, 2005; Kristoffersen e Smith-Kielland, 2005). Imediatamente após a coleta, amostras de 50 µl de sangue foram colocadas em tubos plásticos contendo 1 ml de uma solução de ácido perclórico a 3% para precipitação de proteínas. Em seguida, os tubos foram vedados com parafilme e guardados no refrigerador (temperatura de 4° C) até o momento da dosagem. No dia da dosagem alcoólica, as amostras foram centrifugadas a 5000 RPM durante 5 minutos em uma centrífuga com rotor de “*ependorf*”. Após a centrifugação das amostras, uma alíquota do sobrenadante foi diluída em uma solução contendo 1 mg de enzima álcool desidrogenase (15000 UI, Sigma, EUA) e 100 mg de β-nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado (β-NAD⁺, Sigma, EUA) preparada em 100 ml de tampão TRIS 0,5 M pH= 8,8. Para estimativa das concentrações de etanol presentes nas amostras, foi realizada uma curva padrão com 8 concentrações da “solução-padrão” contendo concentrações conhecidas de etanol (39,5 - 553 mg/dl) diluídas em água destilada. Após o preparo das “soluções-padrão”, um

volume de 50 µl (similar ao das mostras) de água destilada (branco) ou de cada solução padrão foi colocado em tubos plásticos com ácido perclórico. Para a dosagem, 40 µl de cada solução (branco, soluções padrões, ou sobrenadante de cada amostra centrifugada) foram colocados em tubos contendo 1 ml da solução que continha enzima (ADH) e cofator (β -NAD⁺) e agitados em seguida. Depois de 15 minutos, foi realizada a leitura no espectrofotômetro no comprimento de 340 nm (UV) começando pelos brancos em duplicata onde foi “zerada” a leitura para descartar absorbâncias inespecíficas. Em seguida, foi medida a densidade óptica de cada solução, começando pelos padrões (em duplicata) seguidos das amostras a serem dosadas. O espectrofotômetro era acoplado a um computador que inicialmente convertia os valores das densidades ópticas as amostras-padrão, em uma “curva-padrão” obtida cujos dados apresentavam uma inclinação de 45° típica de uma regressão linear, sendo que curvas com valores de $r^2 < 0,98$ eram desconsideradas. Os valores das densidades ópticas das amostras a serem testadas eram comparados pelo software com os valores obtidos na “curva-padrão, fornecendo o valor da concentração de álcool em mg/dl presente na amostra analisada.

3.6 Delineamento experimental

3.6.1. Consumo de substâncias reforçadoras em ratos SHR machos e fêmeas criados em AP e AE.

Neste experimento foram utilizados ratos SHR machos e fêmeas, mantidos em AP ou AE, desde o desmame até a idade adulta, quando iniciaram os experimentos, onde cada grupo era formado por 10 animais. Após atingirem a idade adulta, os animais foram colocados em gaiolas individuais e submetidos a um procedimento experimental de auto-administração oral de substâncias reforçadoras adaptado do estudo realizado por Da Silva e colaboradores (2005). O protocolo de auto-administração oral consistia em um período de adaptação às gaiolas plásticas, onde os animais tinham livre acesso a duas garrafas idênticas contendo somente água (5 dias), seguido de 2 dias de livre escolha entre sacarina (0,75 mM) e água. Após um intervalo de 2 dias, os animais eram submetidos ao consumo forçado de etanol 10% v/v (2 dias). Em seguida, eles eram submetidos ao consumo voluntário de etanol, durante 14 dias. O consumo de líquidos ingeridos, era medido diariamente das 12:00 às 14:00 horas, durante os 25 dias de protocolo.

Livre escolha entre sacarina e água

Após o período de adaptação, os animais foram submetidos durante dois dias ao paradigma da livre escolha entre duas garrafas, utilizando água e solução de sacarina (0,75 mM). Os dados foram expressos como quantidade de líquidos (solução de sacarina ou água) em mililitros, ingerida diariamente por quilograma de peso corporal (ml/kg/dia) e a preferência à sacarina foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: consumo de sacarina/(consumo total de fluidos) x 100.

Consumo forçado de etanol

Antes de iniciar o consumo forçado de etanol, os animais tiveram acesso somente à água durante dois dias. Durante o consumo forçado, os ratos tinham livre acesso a duas garrafas, ambas contendo solução de etanol 10% (v/v). Os dados foram expressos como quantidade de etanol consumida (média dos 2 dias consecutivos), expressa em gramas de etanol por quilograma de peso corporal consumidas por dia (g/kg/dia).

Consumo voluntário de etanol

Após o consumo forçado de etanol, os animais tiveram acesso à livre escolha entre água e etanol 10% (v/v) durante 14 dias. Os dados do consumo voluntário de etanol foram expressos em gramas de etanol por quilograma de peso corporal consumidas por dia (g/kg/dia). A preferência ao etanol foi calculada pela seguinte fórmula: quantidade de etanol consumida / (consumo de etanol + água) x 100.

Ao longo do procedimento de auto-administração oral, também foram avaliadas a ingestão de ração comercial dos animais criados em AP e AE. O objetivo deste experimento era verificar possíveis diferenças no consumo de ração, que poderiam estar implicadas com as diferenças encontradas em relação ao perfil de consumo de sacarina e etanol. Durante este protocolo todos os animais tiveram livre acesso a ração comercial, e seu consumo era medido a cada dois dias, os dados foram expressos como quantidade de ração ingerida diariamente por 100 gramas de peso corporal.

3.6.2 Influência do enriquecimento ambiental sobre o desempenho comportamental das ratas SHR avaliadas no CA e na CME.

No presente experimento foram utilizados os testes do CA e da CME, para avaliar os efeitos do enriquecimento ambiental sobre a emocionalidade / ansiedade e sobre a atividade locomotora e exploratória induzida por um ambiente novo, em ratas SHR. Os testes foram conduzidos utilizando grupos independentes de animais, sob baixas condições de iluminação (10 lux).

3.6.3 Influência do enriquecimento ambiental sobre os comportamentos relacionados à ansiedade em ratas SHR avaliadas no LCE.

Neste experimento foram avaliados os comportamentos relacionados com a ansiedade, das ratas SHR criadas em AP e AE, através do teste do LCE. Foram utilizados 10 animais de cada grupo.

3.6.4 Influência do enriquecimento ambiental sobre a atividade locomotora e ansiedade induzidas pela administração aguda de etanol ou salina, em ratas SHR avaliadas no CA

Neste experimento foram avaliados os efeitos do enriquecimento ambiental sobre os comportamentos locomotor e relacionados à ansiedade induzidos pela administração aguda de etanol no CA. Inicialmente os animais criados em AP e AE foram separados em quatro grupos experimentais os quais receberam uma injeção intraperitoneal de salina ou etanol nas doses de 0,5 g/kg, 1,2g/kg ou 2,0 g/kg. Cinco minutos após a administração os animais foram gentilmente colocados no centro do CA e tiveram seus comportamentos registrados por 5 minutos. Este teste foi realizado em um local sob luminosidade intensa (cerca de 250 lux).

3.6.5 Influência do enriquecimento ambiental sobre as propriedades reforçadoras do etanol, avaliadas no teste da PCL em ratas SHR.

O paradigma da PCL foi realizado para avaliar os efeitos do enriquecimento ambiental sobre as propriedades reforçadoras do etanol, usando um protocolo não-enviesado previamente estabelecido em nosso laboratório (Pandolfo *et al.*, 2009). O procedimento experimental de PCL consistiu em um esquema de 11 dias divididos em três diferentes fases:

pré-condicionamento (2 dias), condicionamento (8 dias) e pós-condicionamento (1 dia). Na fase de pré-condicionamento (primeiros dois dias), cada animal foi colocado no compartimento central e foi permitido que ele explorasse livremente os três compartimentos durante 15 minutos em cada dia. Sendo o tempo gasto pelo animal (com as quatro patas) em cada um dos dois compartimentos foi registrado no segundo dia. Animais que apresentassem uma marcante aversão (menos de 15% do tempo gasto na sessão) ou preferência (mais de 85%) incondicionada por qualquer um dos compartimentos eram excluídos do restante dos experimentos. O condicionamento consistiu em 8 sessões diárias, cada uma com 25 minutos de duração. Nas sessões de condicionamento, imediatamente após a administração via i.p. de etanol (0,5 ou 1,2 g/kg) cada rato era confinado em um dos compartimentos, e no dia seguinte, recebia uma injeção i.p. de veículo (salina) e era confinado no compartimento oposto. Os grupos controle recebiam somente injeções de veículo nas 8 sessões de condicionamento, independente do compartimento onde eram confinados. A sessão de pós-condicionamento foi realizada no décimo primeiro dia, de maneira semelhante á sessão de pré-condicionamento. O tempo gasto em cada um dos compartimentos foi registrado e comparado com o tempo gasto nos mesmos compartimentos durante a sessão de pré-condicionamento. O índice de preferência que fornece uma medida dos efeitos reforçadores do etanol, foi calculado pela subtração do tempo (em segundos) gasto nas sessões de pós e pré-condicionamento nos compartimentos pareados com etanol. Nos grupos controle, os compartimentos foram escolhidos de maneira arbitrária para o cálculo do índice de preferência, visto que os animais não apresentaram preferência natural por nenhum dos compartimentos.

3.6.6. Influência do enriquecimento ambiental sobre a tolerância aguda ao etanol avaliada no teste do plano inclinado, em ratas SHR.

O presente experimento teve como objetivo investigar os efeitos do enriquecimento ambiental sobre a tolerância aguda ao efeito de incoordenação motora promovida pelo etanol em ratas SHR. Inicialmente foi realizado um experimento piloto a fim de selecionar a dose de etanol capaz de causar um prejuízo motor nas ratas SHR, visto que não existem dados na literatura com emprego deste teste na linhagem de ratos SHR. O estudo piloto foi realizado com as doses de 2,0; 2,5 e 2,7 g/kg de etanol, sendo a dose de 2,7 g/kg escolhida como a mais adequada para avaliar o fenômeno da tolerância no modelo do

plano inclinado (dados não mostrados). O protocolo do plano inclinado modificado de um estudo de Wazlawik e Morato (2003) e consiste em dois dias de teste. No primeiro dia, os animais foram submetidos à habituação ao aparelho. No dia seguinte, os animais criados em AP e AE, foram divididos em dois grupos, os quais receberam uma injeção via i.p. de salina ou 2,7 g/kg de etanol, e o desempenho motor dos animais foi medido antes e após (15, 30, 45 e 60 min) o tratamento. Paralelo a isso, foram coletadas amostras de sangue coletadas (15, 30 e 60 minutos) a partir da cauda dos animais com o auxílio de uma lâmina de bisturi e tubos capilares heparinizados de 50 µl. Os valores obtidos no plano inclinado foram convertidos para prejuízo motor percentual (item 3.4.6) e as amostras de sangue foram armazenadas para posterior dosagem de álcool segundo método descrito no item 3.5.

3.7. Análise estatística

Todos os resultados obtidos nos procedimentos experimentais foram analisados utilizando o programa Statistica® (versão 7.0). Conforme o tipo de experimento e grupos experimentais foi utilizado o teste t de Student para grupos independentes (AP vs AE), ANOVA de duas vias (ambiente e dose de etanol) e ANOVA de três vias (ambiente, dose de etanol e dia/sessão), com dia/sessão como medida repetida. A comparação múltipla *post hoc* foi realizada através do teste de Newman-Keuls, quando apropriado. Todos os dados estão apresentados como média ± E.P.M. O nível de significância aceito para os testes foi de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1. *Consumo de substâncias reforçadoras em ratos SHR machos e fêmeas criados em AP e AE.*

A figura 7 mostra os dados obtidos na comparação do consumo médio de sacarina (ml/kg/dia) entre ratos SHR machos e fêmeas, criados em dois ambientes distintos, durante os dois dias de livre-escolha entre solução de sacarina (0,75 mM) e água. A ANOVA de duas vias (gênero, ambiente), para o consumo médio de líquidos apontou um efeito significativo do gênero [$F(1,36)=15,72$; $p<0,0001$] e do ambiente [$F(1,36)=10,40$; $p<0,003$] em relação ao consumo de sacarina. Não foi observada interação significativa entre os fatores ambiente e gênero. Bem como, não foi observada diferença significativa entre os animais dos quatro grupos experimentais, quanto ao consumo de água, antes do início do teste (período basal), nem durante o período de dois dias consecutivos de livre-escolha entre sacarina e água. Comparações através do teste de Newman-Keuls mostraram que as ratas SHR criadas em AP, bebem mais solução de sacarina do que as fêmeas criadas em AE ($p<0,001$) e também bebem mais do que os machos criados em AP e AE ($p<0,001$ e $p<0,0002$, respectivamente). Para a preferência à sacarina, ANOVA de duas vias (gênero, ambiente), não revelou efeito significativo em nenhum dos fatores. A média \pm E.P.M. para o percentual de preferência à sacarina foi $92,29 \pm 3,53$ e $91,44 \pm 4,27$ % para os machos criados em AP e AE, respectivamente; $93,63 \pm 2,99$ e $91,77 \pm 4,65$ % para as fêmeas criadas em AP e AE, respectivamente.

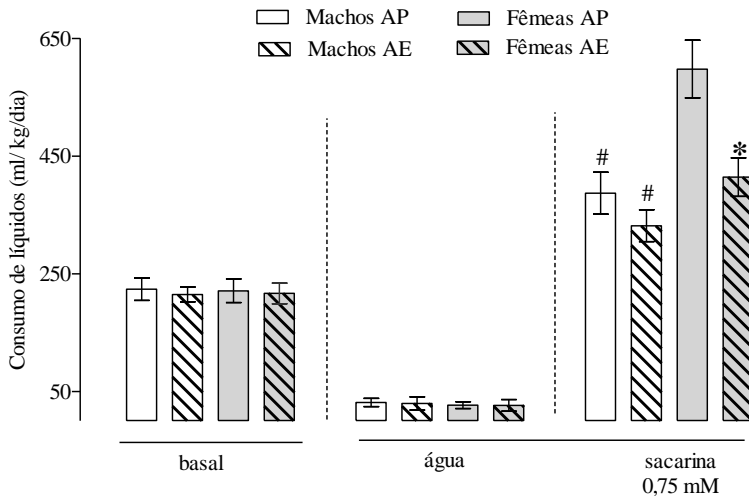


Figura 7. Consumo de líquidos antes e durante a livre-escolha entre sacarina (0,75 mM) e água, em ratos SHR machos e fêmeas criados em AP e AE. Os dados são expressos em quantidade média de líquidos em mililitros, por quilograma de peso corporal, ingeridas diariamente. As barras e linhas verticais representam a média \pm E.P.M. dos animais agrupados de acordo com o gênero e o ambiente ($n=10/\text{grupo}$). # Indica diferença significativa entre os ratos SHR machos e as fêmeas criadas em AP e * indica diferença significativa das ratas SHR criadas em AE em relação àquelas criadas e AP ($p<0,05$; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Newman–Keuls).

A figura 8 ilustra os resultados da comparação do consumo médio de etanol entre ratos SHR machos e fêmeas, criados em dois ambientes distintos durante os dois dias de consumo forçado de etanol. A ANOVA de duas vias (ambiente e gênero), para esta medida detectou diferença significativa gênero [$F(1,36)=38,44$; $p<0,0001$] e ambiente [$F(1,36) = 62,68$; $p<0,0001$]. No entanto, não foi detectada interação destes fatores. A análise *post hoc*, indicou um efeito significativo do ambiente, do qual, podemos inferir que o enriquecimento ambiental reduziu o consumo forçado de etanol nos ratos SHR machos ($p<0,0002$) e fêmeas ($p<0,0001$), quando comparados com o seu respectivo controle no teste Newman-Keuls. A análise também mostrou que as ratas SHR fêmeas criadas em AP, bebem mais etanol em regime forçado do que as fêmeas criadas em AE ($p<0,0001$) e dos machos criados tanto em AP ($p<0,0001$) quanto em AE ($p<0,0001$).

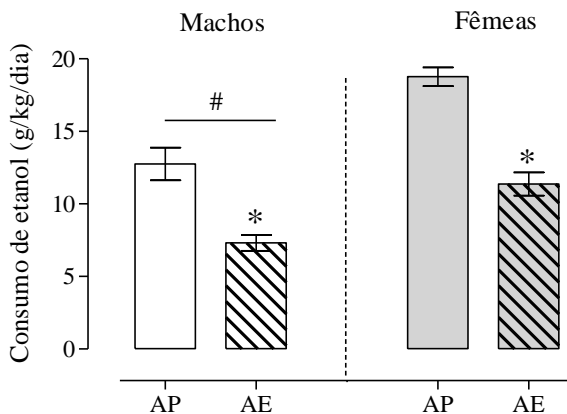


Figura 8. Consumo médio de etanol durante os dois dias consecutivos de consumo em regime forçado, dos ratos SHR machos e fêmeas criados em AP e AE. Os dados são expressos em quantidade de etanol em gramas, consumidas diariamente por quilograma de peso corporal. As barras e linhas verticais representam a média \pm E.P.M. dos animais agrupados de acordo com o gênero e o ambiente ($n=10$ /grupo). # indica diferença significativa entre os ratos SHR machos e fêmeas criadas em AP e * indica diferença significativa entre AP e AE nos animais do mesmo gênero ($p<0,05$; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls).

A figura 9 mostra a comparação do consumo e da preferência ao etanol, entre ratos da linhagem SHR machos e fêmeas, criados em AP ou AE, durante os 14 dias de livre-escolha entre etanol 10% (v/v) e água. Para o consumo de etanol, (Fig. 9 A) a ANOVA de três vias (ambiente, gênero, dias), revelou diferenças significantes entre estes fatores, ambiente [$F(1,36) = 299,17$; $p<0,00001$], gênero [$F(1,36) = 287,91$; $p<0,00001$] e dia [$F(13,468) = 4,34$; $p<0,00001$]. Além disso, foi observada uma interação significativa entre ambiente e gênero [$F(1,36) = 189,44$; $p<0,0001$] e gênero e dias [$F(13,468) = 5,15$; $p<0,00001$], sugerindo que as fêmeas bebem substancialmente mais etanol do que os machos. Neste caso, foi aplicada ANOVA de duas vias com (ambiente e dias) seguida do teste de Newman-Keuls, separadamente para cada sexo. De uma maneira geral, a análise *post hoc* mostrou que a exposição ao ambiente enriquecido, diminuiu o consumo de etanol tanto nos machos quanto nas fêmeas. De maneira

interessante, foi observado que somente as ratas SHR criadas em AP, apresentaram um aumento pronunciado no consumo de etanol a partir do 9º dia ($p < 0,003$) em relação os primeiros dias de experimento. Diferentemente dos outros três grupos, onde, tanto as ratas fêmeas criadas em AE quanto os machos (dos dois ambientes) mostram um consumo relativamente estável ao longo do experimento. A figura 9 B, mostra a comparação entre machos e fêmeas dos dois ambientes em relação à preferência ao etanol. Na ANOVA de três vias (ambiente, gênero, dias) para esta medida, também foram observadas diferenças significantes entre ambiente [$F(1,36)=284,41$; $p < 0,00001$], gênero [$F(1,36)=295,70$; $p < 0,00001$] e uma interação entre estes fatores [$F(1,36)=105,32$; $p < 0,0001$], com as ratas SHR fêmeas apresentando um percentual de preferência ao etanol maior do que os machos, e com o enriquecimento ambiental diminuindo a preferência em ambos os sexos. A subsequente análise aplicada individualmente para os sexos (ANOVA de duas vias seguida do teste de Newman-Keuls) mostrou em relação aos machos, diferenças significantes do ambiente [$F(1,18)=22,01$; $p < 0,0002$], e dias [$F(13,234)=2,51$; $p < 0,03$]. Todavia não foi encontrado efeito significativo para a interação entre estes fatores. Estes resultados indicam que os ratos SHR machos criados em AE exibem menor percentual de preferência ao etanol, do que àqueles criados em AP, principalmente após o 11º dia ($p < 0,05$).

Para as ratas SHR fêmeas, a ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do ambiente [$F(1,18)=415,2$; $p < 0,00001$] e do dia [$F(13,234)=8,80$; $p < 0,0001$]. Além disso, foi detectada uma interação entre os fatores ambiente e dias [$F(13,234)=9,10$; $p < 0,0001$], sugerindo que as ratas SHR fêmeas criadas em AP mostram um aumento gradativo do percentual de preferência ao etanol ao longo dos dias (particularmente após o 5º dia), e somente as ratas SHR fêmeas criadas em AP exibiram um perfil de preferência ao etanol (preferência maior que 50% em relação à água). E de maneira surpreendente, as ratas criadas em AE mostraram um percentual de preferência inferior ao das ratas criadas em AP, o qual se manteve relativamente estável ao longo de todo o experimento.

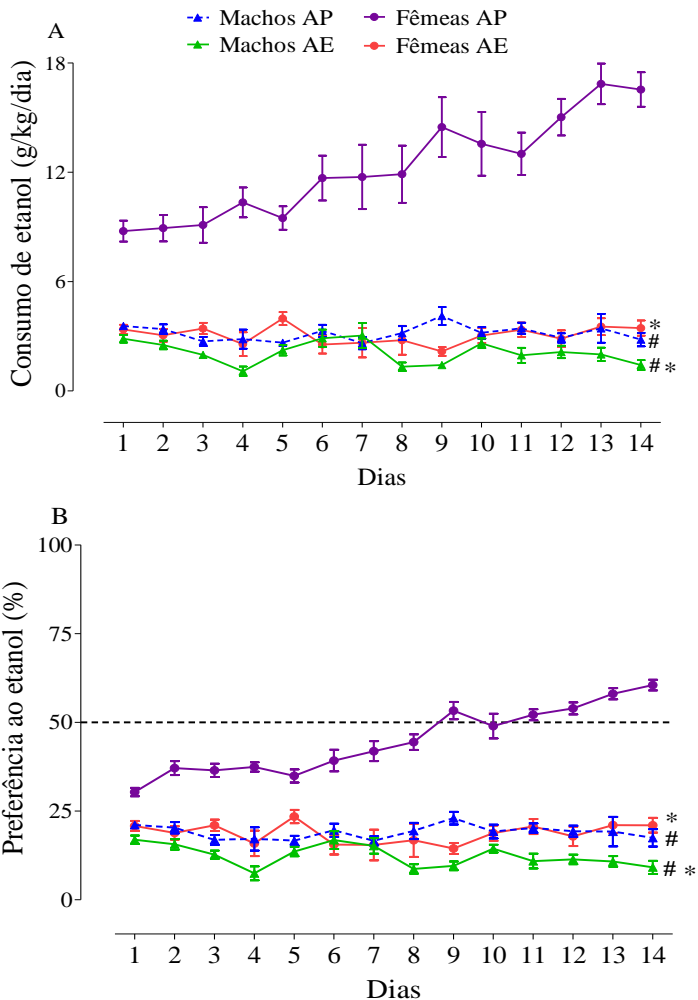


Figura 9. Comparação entre o consumo (A) e a preferência (B) ao etanol entre ratos SHR, machos e fêmeas criados em AP e AE, durante os 14 dias de livre-escolha etanol 10%(v/v) vs água. As curvas e linhas verticais representam a média \pm E.P.M. dos animais agrupados de acordo com gênero, ambiente e dia (n=10/grupo). # Indica diferença significativa dos ratos SHR machos em relação às fêmeas e * indica diferença significativa entre AP ou AE nos animais do mesmo gênero (p<0,05; ANOVA de três vias, seguida do teste de Newman-Keuls).

A figura 10 sumariza o consumo médio de ração, expresso em gramas de ração ingerida diariamente por 100 kg de peso corporal, das ratas SHR criadas em AP e AE durante os 25 dias de procedimento de consumo de substâncias reforçadoras. A ANOVA de três vias (gênero, ambiente, dias), para o consumo médio de ração dos ratos SHR, revelou uma diferença significativa do ambiente [F(1, 36)=21,79; p<0,00001] e dos dias F(11,396)=10,85 p<0,00001], e uma interação entre estes fatores [F(11,396)=8,49; p<0,0001]. Não foi observado efeito significativo para o fator gênero e nem uma interação significativa entre os fatores ambiente e gênero. De maneira geral, a análise *post hoc* indicou uma diferença na ingestão de ração entre os animais criados AP e AE (machos e fêmeas) somente nos cinco primeiros dias do protocolo de consumo de substâncias reforçadoras, ou seja, somente no período de adaptação às duas garrafas (p<0,05).

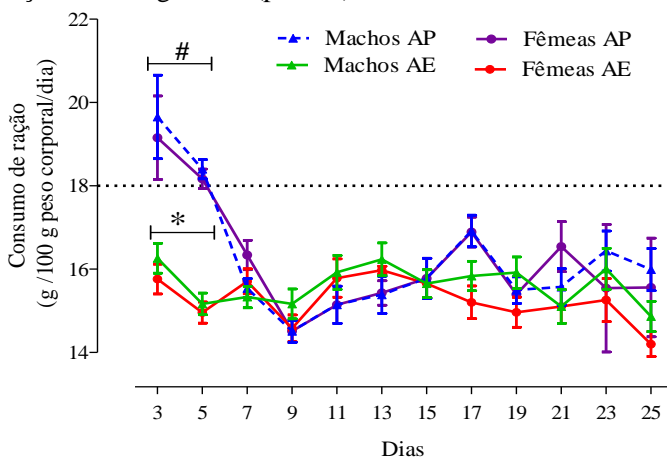


Figura 10. Consumo médio de ração dos ratos SHR machos e fêmeas criados em AP e AE, durante procedimento de auto-administração oral. Os dados são apresentados como quantidade de ração ingerida em gramas por 100 g de peso corporal por dia, medidas a cada dois dias ao longo dos 25 dias do protocolo de consumo de substâncias reforçadoras. As curvas e linhas verticais representam a média \pm E.P.M. dos animais agrupados de acordo com o ambiente e os dias (n=10/grupo). # Indica diferença significativa dos primeiros dias de adaptação em comparação aos dias subsequentes (p<0,05; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls). * Diferença significativa entre os grupos AP e AE, e no teste de Newman-Keuls (p<0,05).

4.2. Influência do enriquecimento ambiental sobre as respostas comportamentais das ratas SHR avaliadas no CA e na CME

A figura 11 mostra o desempenho comportamental das ratas SHR criadas em AP e AE, avaliadas no CA e na CME. Em relação às medidas avaliadas no teste do CA, a análise estatística através do teste t de Student revelou uma diferença significativa entre os dois ambientes de criação em relação ao tempo gasto na área central [$t=2,91$; $p<0,001$] (Fig. 11A) e ao percentual de cruzamentos centrais em relação aos cruzamentos periféricos [$t=3,82$; $p<0,002$] (Fig. 11 B), indicando que os animais criados em AE permanecem mais tempo e exploram mais a área central e aversiva do CA, do que os animais criados em AP. No que diz respeito à atividade locomotora e exploratória no CA, a análise dos resultados através do teste t de Student também revelou uma diferença significativa entre os dois grupos (AP x AE) em relação ao número de cruzamentos totais [$t=5,39$; $p<0,0001$] (Fig. 11 C) e número de levantamentos [$t=4,69$; $p<0,001$] (Fig. 11 D) no CA. Estes resultados indicam que os animais mantidos em AE são menos ativos e exploram menos o ambiente novo.

Com relação à atividade locomotora das ratas SHR criadas em AP e AE avaliadas na CME, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas para a atividade locomotora medida a cada 10 minutos (por 60 min) (Fig. 11 E), indicou um significativo efeito do ambiente [$F(1,18)=21,31$; $p<0,001$], do tempo (fator de repetição) [$F(5,90)=71,49$; $p<0,0001$] e uma interação entre os fatores ambiente e tempo [$F(5,90)=4,70$; $p<0,001$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls indicou que as ratas criadas em AE são menos ativas em relação às ratas criadas em AP quando colocados em um ambiente novo, somente nos primeiros 20 minutos. A partir dos 30 minutos até o final da sessão, esta diferença é suprimida provavelmente devido à habituação. Em relação à atividade locomotora total na CME, representada pelo somatório da ambulação durante os 60 min (Fig. 11 F), a análise através do teste t de Student revelou uma diferença significativa entre os dois ambientes de criação [$t=4,62$; $p<0,001$], com os animais criados no AE apresentando uma menor locomoção geral do que os animais criados em AP.

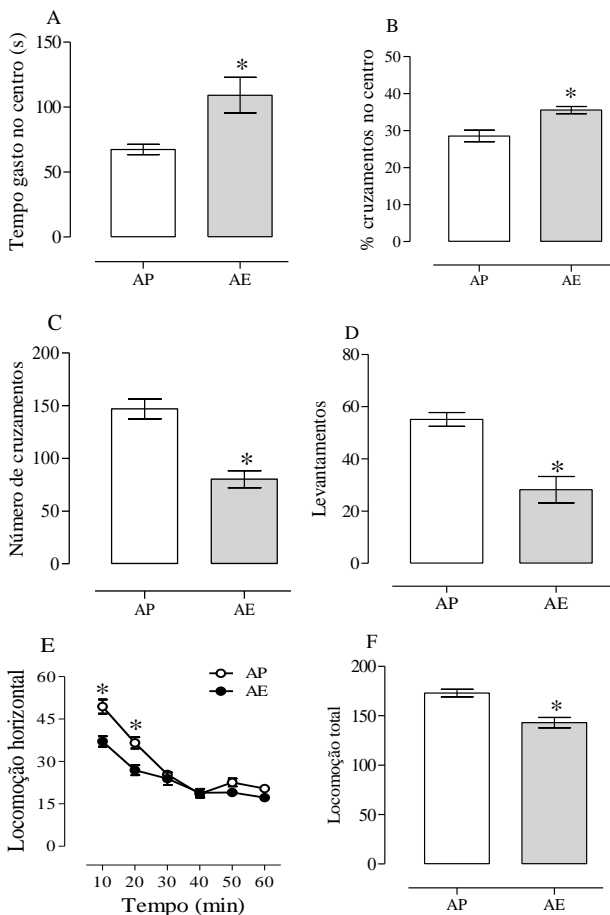


Figura 11. Desempenho comportamental das ratas SHR criadas em AP e AE avaliadas no CA (5 min) e na CME (60 min), medidos através de grupos experimentais independentes. Durante o teste do CA foram avaliados o tempo gasto na área central (A), o percentual de cruzamentos centrais (B), o número total de cruzamentos (C) e o número de levantamentos (D), na CME foi medida atividade locomotora a cada 10 min (E) e atividade locomotora total (somatório dos 60 min) (F). As curvas, barras e linhas verticais representam a média \pm E.P.M. dos animais agrupados de acordo com o ambiente ($n=10$ /grupo). * Indica diferença significativa entre os ambientes AP e AE ($p < 0,05$ no teste t de Student ou ANOVA de duas vias seguida do teste de Newman-Keuls).

4.3. Influência do enriquecimento ambiental sobre comportamentos relacionados à ansiedade, das ratas SHR avaliadas no LCE.

Os parâmetros relacionados com a ansiedade das ratas SHR criadas em AP e AE, medidos no LCE, estão ilustrados na figura 12. O teste t de Student revelou uma diferença significativa entre os dois ambientes de criação nos três parâmetros avaliados: número de entradas nos braços fechados [$t= -4,92$; $p<0,0001$] (Fig. 12 A), utilizado como medida de locomoção; percentual de entradas nos braços abertos em relação ao total de entradas [$t= -5,02$; $p<0,0001$] (Fig. 12 B) e percentual de tempo gasto nos braços abertos [$t= -5,67$; $p<0,0001$] (Fig. 12 C), ambos utilizados como medidas de ansiedade. Estes resultados nos permitem inferir que o enriquecimento ambiental reduziu os comportamentos relacionados à ansiedade das ratas SHR neste modelo.

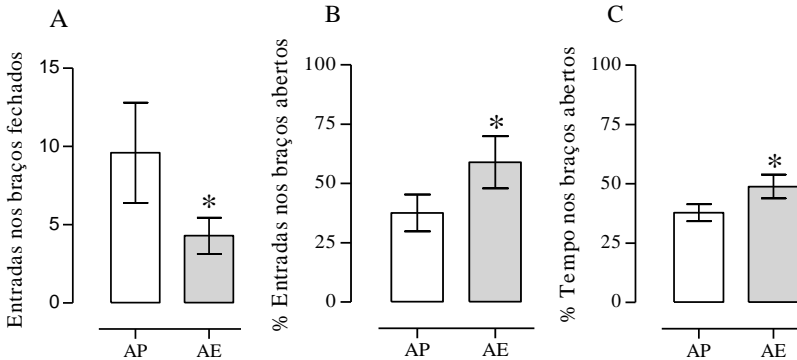


Figura 12. Representa o número de entradas nos braços fechados (A) e percentual de entradas nos braços abertos (B) e percentual de tempo gasto (C) nos braços abertos do LCE durante 5 min, das ratas SHR criadas em AP e AE. As barras e linhas verticais representam a média \pm E.P.M. dos animais agrupados de acordo com o ambiente ($n=10$ /grupo). * Indica diferença significativa entre os animais criados em ambientes AP e AE ($p<0,05$ no teste t de Student).

4.4. Influência do enriquecimento ambiental sobre a atividade locomotora e ansiedade induzidas pela administração aguda de etanol, em ratas SHR avaliadas no CA.

O efeito da administração aguda do etanol nas ratas SHR criadas em diferentes ambientes e avaliadas no teste do CA está ilustrado na figura 13. ANOVA de duas vias para o tempo gasto na área central (Fig.

13 A), revelou efeito significativo para os fatores, ambiente [F(1,72)=145,42; $p<0,00001$] e dose de etanol [F(3,72)=106,09; $p<0,00001$] e uma interação entre ambiente e dose de etanol [F(3,72)=10,53; $p<0,00001$]. Em relação à sensibilidade ao efeito do etanol, é notável que os animais criados em AE permaneçam mais tempo no centro do CA em relação aos criados em AP. Comparações com o teste de Newman-Keuls, demonstraram que a administração de etanol causou aumento significativo o tempo gasto na área central nas doses intermediária e mais alta de etanol nos animais do AE ($p<0,0001$ em ambas as doses 1,2 e 2,0 g/kg) e um aumento dose dependente nos animais do AP ($p<0,002$ na dose de 0,5 g/kg e $p<0,0001$ nas doses 1,2 e 2,0 g/kg) em relação aos seus respectivos controles. Para porcentagem de locomoção na área central em relação à periferia do CA (Fig. 13 B), foi observado efeito significativo do ambiente [F(1,72)=52,21; $p<0,0001$] e da dose de etanol [F(3,72)=27,12; $p<0,0001$], mas não houve interação significativa entre estes dois fatores. De maneira semelhante neste parâmetro, o etanol promoveu um aumento significativo na porcentagem de locomoção central nos dois ambientes de criação. Análise *post hoc* mostrou um efeito significativo nas doses de 1,2 g/kg ($p<0,001$) e 2,0 g/kg ($p<0,0001$) de etanol nos animais criados em AP, enquanto para os animais criados em AE houve um aumento significativo em todas as doses de etanol ($p<0,04$, $p<0,001$ e $p<0,0001$, para as doses de 0,5, 1,2 e 2,0 g/kg respectivamente). Para o número total de cruzamentos no CA (Fig. 13 C), a ANOVA detectou efeito significativo para os fatores, ambiente [F(1,72)=898,39; $p<0,00001$], dose de etanol [F(3,72)=25,04; $p<0,0001$] e uma interação entre os dois fatores [F(3,72)=11,70; $p<0,0001$]. A análise *post hoc* demonstrou que os animais criados em AP um aumento significativo no número de cruzamentos em relação ao controle nas doses de 0,5 g/kg ($p<0,01$), 1,2 g/kg ($p<0,0001$) e 2,0 ($p<0,0002$) g/kg de etanol. É importante salientar, que as comparações através do teste de Newman-Keuls, indicaram diferenças marcantes entre os animais dos grupos controles do AP e AE, nos três parâmetros analisados tempo no centro ($p<0,0001$), % de cruzamentos no centro ($p<0,0001$) e número de cruzamentos totais ($p<0,001$). Estes resultados indicam que os animais criados em AE, apesar de serem menos ativos (conforme visto no item 4.2) eles permanecem mais tempo e exploram mais a área central e aversiva do CA, do que os animais criados em AP.

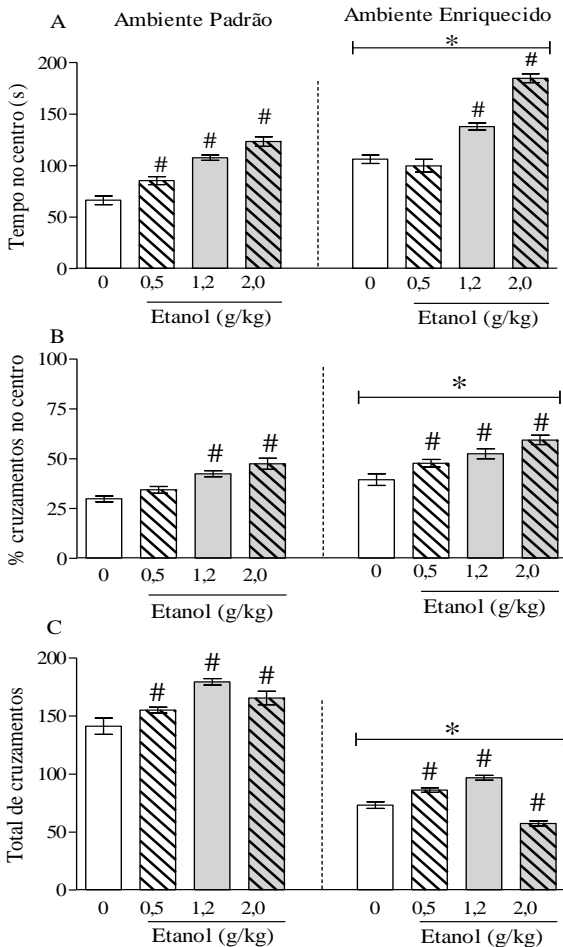


Figura 13. Efeitos da administração aguda de etanol (0,5; 1,2 ou 2,0 g/kg) ou veículo nas ratas SHR criadas em AP e AE, sobre o tempo gasto no centro (A), o percentual de cruzamentos centrais (B) e sobre o número total de cruzamentos (C) no CA durante 5 min. As barras e linhas verticais representam a média \pm E.P.M. dos animais agrupados por ambiente e dose de etanol ($n=10$ /grupo). * Indica diferença significativa entre os grupos AP e AE e # indica diferença significativa dos grupos que receberam etanol em comparação ao respectivo controle ($p<0,05$; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls).

4.5 Influência do enriquecimento ambiental sobre as propriedades reforçadoras do etanol, avaliadas no teste da PCL em ratas SHR.

Os efeitos do etanol sobre a PCL destes animais estão ilustrados na figura 14. ANOVA de três vias (ambiente, dose de etanol, sessões de pré-/pós-condicionamento) para o tempo de permanência dos animais no compartimento pareado com etanol, antes (pré-condicionamento) e depois (pós-condicionamento) das sessões de condicionamento (Fig. 14A), revelou um efeito significativo do ambiente e das sessões de pré-/pós-condicionamento [$F(1,58)=4,97$; $p<0,05$ e $F(1,58)=9,91$; $p<0,01$, respectivamente], mas não foi observado um efeito significativo da dose de etanol. Além disso, foram observadas interações significantes entre os fatores: ambiente e dose de etanol [$F(2,58)=3,68$; $p<0,05$], ambiente e sessões de pré-/pós-condicionamento [$F(1,58)=13,16$; $p<0,001$] e entre os três fatores [$F(2,58)=5,47$; $p<0,01$]. Estes resultados mostram que as ratas criadas em AP desenvolveram uma significativa preferência pelo compartimento condicionado com etanol na dose de 1,2 g/kg, enquanto que a dose de 0,5 g/kg não foi capaz de induzir uma preferência, mas indicou uma tendência ao desenvolvimento da PCL ($p=0.067$, no teste de Newman-Keuls). Por outro lado, as ratas criadas em AE não desenvolveram preferência condicionada de lugar por nenhuma dose de etanol. Para o índice de preferência (Fig. 14B) a ANOVA de duas vias (ambiente, dose de etanol) revelou um efeito significativo do ambiente [$F(1,58)=13,16$; $p<0,001$], porém não houve efeito significativo da dose de etanol. Comparações subseqüentes (teste de Newman-Keuls) para o índice de preferência mostraram que os animais do AP pareados com a dose mais alta de etanol desenvolveram PCL quando comparados com seu respectivo controle ($p<0,05$). E também, indicou uma diferença entre os grupos AP e AE para a maior dose etanol, sugerindo novamente que os animais do AE não desenvolveram PCL.

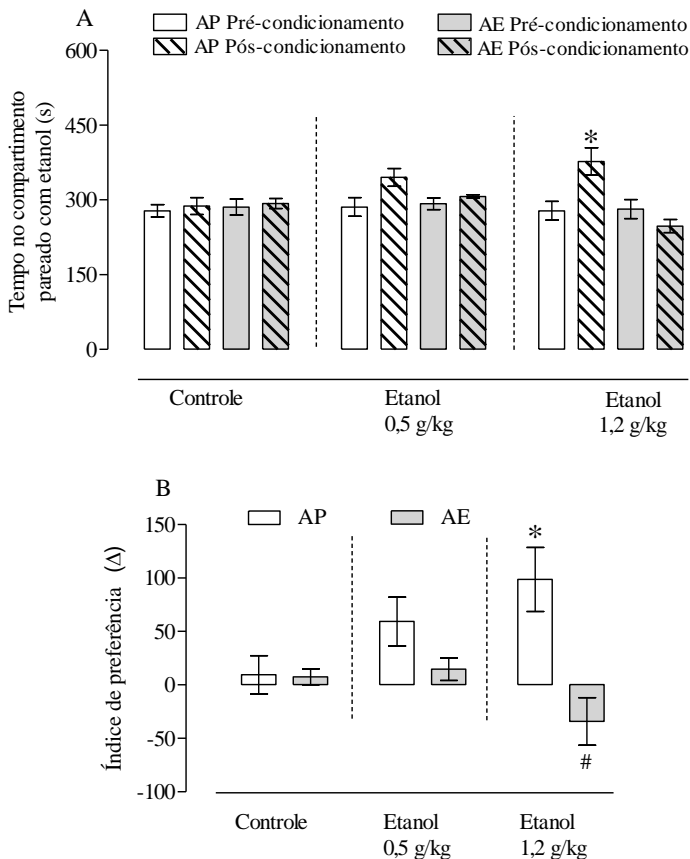


Figura 14. Efeitos do enriquecimento ambiental sobre o desenvolvimento da PCL induzida pelo etanol em ratos SHR. A figura mostra o tempo gasto no compartimento pareado com etanol (0,5 ou 1,2 g/kg) ou salina antes (pré-condicionamento) e depois (pós-condicionamento) do condicionamento (A) e o índice de preferência ao etanol (B), calculado pela subtração dos tempos de gastos nas sessões de pré- e pós-condicionamento. As barras e linhas verticais representam a média \pm E.P.M. dos animais agrupados por ambiente (AP ou AE) e dose de etanol ($n=10-11$ /grupo). * Indica diferença significativa em comparação ao seu respectivo grupo controle ($p<0,05$; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls). #Indica diferença significativa entre os grupos AP e AE ($p<0,05$; no teste de Newman-Keuls).

4.6. *Influência do enriquecimento ambiental sobre a tolerância aguda ao etanol avaliada no teste do plano inclinado, em ratas SHR.*

A figura 15 ilustra os efeitos da administração aguda de etanol sobre o prejuízo motor no plano inclinado e sobre a concentração plasmática de etanol em ratas SHR criadas em AP e AE. Conforme mostrado na figura 15 A, apenas os animais tratados com etanol (de ambos os grupos AP e AE) apresentaram prejuízo motor, ocorrendo uma diminuição significativa deste prejuízo ao longo do tempo nas exposições seguintes ao aparato. A ANOVA de três vias (ambiente, tratamento e tempo) para o prejuízo motor induzido pela administração aguda de etanol, revelou efeito significativo para os fatores, ambiente [F(1,13)=13,37; p<0,001], tratamento F(1,26)=113,56; p<0,00001] e tempo [F(3,78)=121,54; p<0,00001] e uma interação entre os fatores ambiente e tempo [F(3,39)=5,43; p<0,003]. Do mesmo modo foram observadas interações significantes entre os fatores: ambiente e tratamento [F(1,26)=13,37; p<0,001], ambiente e tempo [F(3,78)=5,43; p<0,002], tempo e tratamento [F(3,78)=121,54; p<0,00001] e entre os fatores ambiente, tratamento e tempo [F(3,78)=5,47; p<0,002], sugerindo que os ambos os grupos (AP e AE) desenvolveram tolerância aguda ao etanol, quando comparados com seu respectivo controle (p<0,05). A subsequente análise através do teste de Newman-Keuls, indicou diferença significativa entre as ratas criadas em AP e AE, em relação ao prejuízo motor somente na primeira exposição (p<0,007) ao plano inclinado (15min após injeção de etanol), sugerindo que o prejuízo motor induzido pelo etanol é relativamente menor nas ratas criadas em AE, do que nas ratas do AP. Aliado a isso, a ANOVA de duas vias (ambiente, tempo) para a concentração plasmática de etanol, revelou uma diferença significativa no fator ambiente [F(1,26)=13,37; p<0,001], mas não foi observada diferença significativa em relação ao tempo e também não houve interação entre os fatores ambiente e tempo, indicando que concentrações de etanol permaneceram constantes ao longo dos 45 minutos de experimentos, nos animais dos dois ambientes de criação (Fig. 15 B), embora os animais criados em AE apresentaram concentrações plasmáticas de etanol menores, especialmente 15 e 30 minutos (p<0,001 e p<0,05; respectivamente) após a administração do etanol. De maneira inesperada, estes resultados mostram que após a administração sistêmica de etanol as ratas mantidas em AE, apresentam os níveis menores de etanol no sangue (nos primeiros 30 min),

acompanhados por menor prejuízo motor no plano inclinado, quando comparadas com as ratas mantidas em AP.

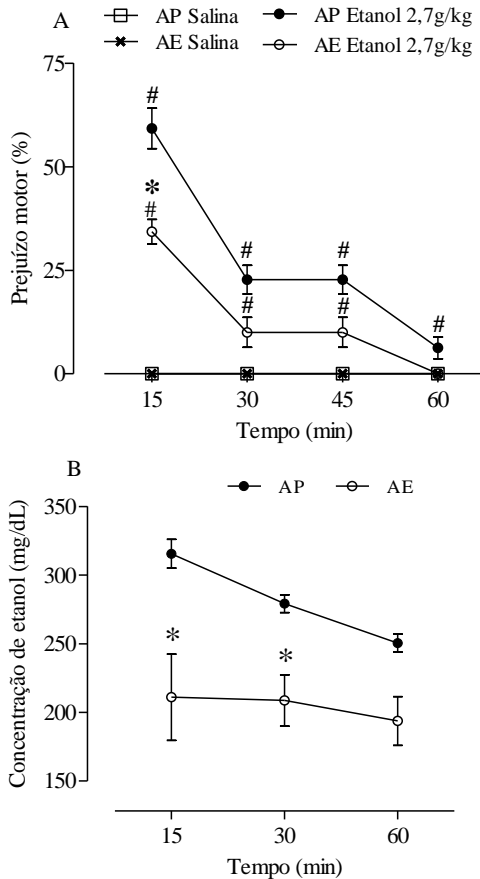


Figura 15. Efeitos do enriquecimento ambiental sobre a tolerância aguda ao prejuízo motor promovido pelo etanol em ratas SHR. A figura mostra o prejuízo motor induzido (A) pelo etanol (2,7 g/kg) em relação ao grupo que recebeu salina e as concentrações plasmáticas de etanol (B) ao longo do tempo. As curvas e linhas verticais representam a média \pm E.P.M. dos animais agrupados de acordo com o ambiente e o tratamento. # Indica diferença significativa em comparação ao respectivo grupo controle e * indica diferença significativa entre os grupos AP e AE ($p < 0,05$; ANOVA de três vias seguida pelo teste de Newman-Keuls).

O presente estudo demonstra que o ambiente de criação exerce um significativo impacto sobre as propriedades motivacionais do etanol em ratas SHR, sugerindo que a exposição a estímulos positivos durante o período crítico do desenvolvimento cerebral diminui as respostas às novidades não-reforçadoras (ambientes novos) e reforçadoras (sacarina e etanol), podendo conferir uma proteção aos efeitos reforçadores das drogas de abuso.

Aparentemente, as ratas SHR fêmeas criadas em AE, beberam menos solução de sacarina em livre-escolha com a água, sugerindo que o enriquecimento ambiental tenha reduzido a sensibilidade ao efeito prazeroso da sacarina. Estudos anteriores do nosso laboratório mostraram que as fêmeas da linhagem de ratos SHR apresentam um aumento geral no consumo de novas soluções (com sabor apazível ou não) acompanhado por um aumento no consumo de etanol, quando comparados com machos e fêmeas de outras linhagens de ratos (Da Silva *et al.*, 2004; 2005; Vendruscolo *et al.*, 2005; 2008). Em geral, estudos em animais de experimentação têm mostrado que existe uma forte relação entre consumo exagerado de substâncias palatáveis e o uso abusivo de drogas (Overstreet *et al.*, 1993). Esse fenômeno comportamental pode indicar uma “perda de controle” sobre o uso da substância, e representa uma característica bastante relevante na dependência às drogas e nos distúrbios alimentares, pois reflete uma maior vulnerabilidade ao comportamento de recaída (Koob e Le Moal, 1997).

Foi verificada uma redução da sensibilidade ao efeito da sacarina na ratas SHR criadas em AE, a qual poderia ser especulada como uma perda do prazer ou interesse frente a um estímulo recompensador (anedonia), considerado um indício de um comportamento do tipo depressivo. Contudo, um estudo no qual foram avaliados o consumo de sacarose, a imobilidade no teste do nado forçado e os níveis de dopamina no estriado, em ratos Sprague-Dawley criados em isolamento, AP e AE, mostrou que somente os ratos criados em isolamento apresentaram uma correlação positiva entre estes três parâmetros. E ainda, uma correlação negativa entre o consumo de sacarina e o tempo de imobilidade no nado forçado nos animais criados em AE, enquanto os animais do AP apresentaram uma correlação oposta. Além disso, não houve diferença quanto ao nível de dopamina no estriado dos ratos criados em AP e AE (Brenes e Fonarguera, 2008). Apesar de não terem sido realizados experimentos mostrando claramente que o

enriquecimento ambiental não exerce efeito do tipo-depressivo nas ratas SHR, é importante enfatizar, que no presente estudo não foram encontradas diferenças no consumo de ração entre os animais criados em AE e AP, durante o consumo de sacarina e etanol, sugerindo que o enriquecimento ambiental não modificou a motivação dos animais por reforços naturais, como o alimento. Além disso, também não foi demonstrada uma diferença significativa entre os animais criados em AP ou AE, em relação à preferência por sacarina, sendo que ambos os grupos preferiram beber solução de sacarina à água.

De uma maneira geral os experimentos de auto-administração mostraram que os animais da linhagem SHR criados em AE consumiram nitidamente menos etanol do que os animais criados em AP, tanto no esquema consumo forçado quanto em livre escolha com a água. Adicionalmente, foi observado que os animais criados em AE tanto machos quanto as fêmeas não preferem beber solução de etanol à água, sendo observado um comportamento oposto nas ratas SHR criadas em AP. Outro aspecto relevante destes resultados, é que das ratas SHR criadas em AP, aparentemente apresentaram um aumento gradual do consumo de etanol, diferentemente das ratas SHR fêmeas criadas em AE, bem como dos machos (de ambos os grupos AE e AP) que tiveram um perfil de consumo relativamente estável ao longo do teste.

Os resultados deste estudo mostraram que os ratos SHR fêmeas (criadas em AP) bebem mais solução de sacarina e etanol do que os machos, o que corrobora com estudos anteriores (Vendruscolo *et al.*, 2005; 2008). A diferença do comportamento de beber das ratas SHR fêmeas, também tem sido observada trabalhos, tanto em outras linhagens de ratos isogênicas (Cailhol e Mormède, 2001), quanto em linhagens de ratos heterogênicas, selecionadas com base na preferência ao álcool (Li *et al.*, 1993). Neste sentido, têm sido propostos vários fatores como responsáveis pela diferença gênero-específico do consumo de etanol, destacando-se o metabolismo diferenciado do etanol e a influência dos hormônios gonadais. Foi demonstrado que as ratas Sprague-Dawley apresentam atividade da enzima aldeído desidrogenase aumentada em relação aos machos, o que auxiliaria o metabolismo do etanol, resultando em uma menor concentração de etanol no sangue, que poderia levar a um aumento do consumo, como ocorre em humanos, nesse caso com homens (Mezey *et al.*, 1992). No que diz respeito aos hormônios gonadais, não existem dados consistentes sobre a sua influência no consumo de etanol em roedores. Um estudo realizado por Roberts e colaboradores (1998), mostrou que não houve alteração na auto-administração de etanol em função da fase do ciclo estral das ratas.

No presente estudo, as fases do ciclo estral não foram sistematicamente verificadas, de maneira que as considerações em relação às flutuações hormonais e suas implicações não foram acessadas. Certamente, são necessários estudos adicionais para elucidar o motivo pelo qual as ratas SHR fêmeas bebem mais etanol do que os machos.

O enriquecimento ambiental também promoveu alterações na sensibilidade à novidade, aqui representadas pela redução da atividade exploratória frente a um ambiente novo e pelo consumo atenuado de uma solução adocicada inédita aos animais. De modo que, as ratas SHR expostas ao AE apresentaram uma redução na atividade locomotora e exploratória em um ambiente novo e inescapável, em relação às ratas criadas em AP (tanto no CA quanto na CME). Com relação aos resultados observados na, os animais expostos ao AE exibiram também uma atividade locomotora reduzida durante os primeiros 20 min, que remete a uma redução do comportamento locomotor reduzido a uma situação nova, e uma diminuição da locomoção total. É provável que esta diferença observada entre os animais do AP e AE na locomoção total, tenha sido causada mais pela diferença a locomoção induzida pela novidade do que pela ambulação geral propriamente dita. Estes resultados têm bastante relevância no contexto da dependência às drogas, isso porque existe uma vasta literatura relatando uma correlação positiva entre o comportamento de busca por novidade, que pode ser representado pela elevada exploração de um ambiente novo e a auto-administração de drogas (Piazza *et al.*, 2000; Marinelli e White, 2000; Klebaur *et al.*, 2001; Nadal *et al.*, 2002; Pelloux *et al.*, 2004). Isto ocorre porque a exposição a um novo estímulo bem como às drogas de abuso ativam, em parte, o sistema dopaminérgico de recompensa de maneira comum causando a liberação de dopamina nesta via (Feenstra e Botterblom, 1996; Beaufour *et al.*, 2001). Os resultados deste trabalho corroboram com outros trabalhos da literatura, que mostram uma redução do impacto á novidade nos animais criados em AE. O que sugere uma redução do valor relativo, ao incentivo à novidade nos animais expostos ao ambiente enriquecido (Bowling e Bardo, 1994; Bezar *et al.*, 2003; Green *et al.*, 2003) que ocorre, possivelmente, por conta da exposição a diferentes estímulos ao qual os animais são confrontados durante o período crítico da adolescência. Isso porque a adolescência é considerada um período crucial para o desenvolvimento cerebral, principalmente porque é nesta fase que ocorre a maturação de estruturas cerebrais envolvidas em processos de motivação, tomada de decisão e na dependência às drogas (Chambers *et al.*, 2003).

Além disso, com base nos resultados obtidos nos testes do CA e LCE, podemos inferir que a exposição ao AE promoveu mudanças drásticas na emocionalidade das ratas SHR, sugerindo que o enriquecimento ambiental tenha reduzido o comportamento do tipo-ansiedade das ratas SHR, estando de acordo com outros trabalhos da literatura (Fernandez-Teruel *et al.*, 2002; Benaroya-Milshtein *et al.*, 2004). No teste do LCE, os animais criados em AE exibiram uma maior atividade nos braços abertos quando comparados aos animais criados em AP. Eles apresentaram um maior percentual de entradas nos braços abertos, e um maior percentual de tempo de permanência nos braços abertos, indicando um efeito do tipo ansiolítico da exposição ao AE. Isto porque o aumento da exploração das áreas abertas do LCE é considerado uma resposta do tipo-ansiolítica, visto que drogas ansiolíticas clássicas aumentam a permanência nos braços abertos (Pellow *et al.*, 1985; Carobrez e Bertoglio, 2005). Além disso, os animais criados em AE realizaram menos entradas nos braços fechados quando comparados àqueles criados em AP, indicando uma menor atividade locomotora. Isso porque, o número de entradas nos braços fechado é considerado como medida da atividade locomotora neste teste (Rodgers e Dalvi, 1997), quando comparados àqueles criados em AP.

Em relação ao teste do CA, as ratas SHR criadas em AE apresentaram uma atividade locomotora menor em relação às ratas criadas em AP, o que inicialmente poderia ser considerado um aumento da emocionalidade baseados em alguns trabalhos clássicos da literatura (Hall, 1934; Archer, 1973), onde a locomoção e a defecação são originalmente propostas medidas de emocionalidade/ansiedade. De acordo com estes estudos, os animais que apresentam níveis elevados de emocionalidade defecam bastante e se locomovem pouco na arena do CA. Contudo, atualmente outros parâmetros como o tempo de permanência e a locomoção na região central e aversiva do CA, também são considerados como medidas de emocionalidade (Ramos e Moermède, 1998). Isso porque, drogas ansiolíticas tendem a aumentar o tempo de permanência e a locomoção na região central e aversiva do CA, enquanto drogas ansiogênicas induzem a um efeito contrário (Gentsch *et al.*, 1987). Neste sentido, podemos inferir que o enriquecimento ambiental reduziu o comportamento do tipo-ansiedade das ratas SHR. De maneira que, as ratas criadas em AE permaneceram mais tempo e fizeram mais cruzamentos na área central do CA quando comparadas às ratas criadas em AP, tanto no procedimento experimental onde foi avaliada a atividade locomotora induzida por um ambiente novo (Figura 11), bem como se observarmos os grupos controle (tratados com salina)

do experimento onde foi avaliado o efeito da administração aguda de etanol sobre o comportamento locomotor e de ansiedade no CA (Figura 13). É importante mencionar que embora estes testes sejam ferramentas experimentais bastante úteis na avaliação da emocionalidade em roedores, parece não haver uma correlação direta entre as medidas de ansiedade do CA e do LCE, indicando que possivelmente estes testes avaliem diferentes traços ou tipos de ansiedade (Ramos e Mormède, 1998).

A relação entre o comportamento de ansiedade e o consumo de etanol em modelos animais é bastante controversa. Alguns estudos mostram uma correlação positiva entre a ansiedade e o consumo elevado de etanol. Por exemplo, estudos utilizando duas linhagens de ratos selecionadas para beber muito e beber pouco etanol, constataram que a linhagem que mais bebia etanol também apresentava um nível maior de ansiedade (Stewart *et al.*, 1993). Outro estudo utilizando uma população heterogênea de ratos Wistar, os quais foram classificados como “muito ansiosos” e “pouco ansiosos”, também demonstrou que os animais mais ansiosos também bebiam mais etanol (Spanagel *et al.*, 1995). Por outro lado, em um estudo realizado por Overstreet e colaboradores (1997), utilizando várias linhagens de ratos que preferem e que não-preferem etanol, nenhuma relação entre a ansiedade e o consumo de etanol foi encontrada. Mesmo em estudos que comparam o consumo de etanol utilizando duas linhagens isogênicas com características emocionais contrastantes, os resultados são controversos. Em dois trabalhos de Da Silva e colaboradores (2004 e 2005) a linhagem de ratos SHR considerada “pouco ansiosa” consumiu menos etanol do que a linhagem de ratos Lewis considerada “mais ansiosa”. Enquanto que em um estudo recente de utilizando as linhagens de ratos Lewis/SHR, mostrou que os ratos Lewis beberam mais etanol do que os ratos SHR (Chiavegatto *et al.*, 2008).

De uma maneira geral, o experimento no qual se avaliou os efeitos da administração aguda do etanol no teste do CA em ratas SHR criadas em AP e AE, mostrou que a dose de 0,5 g/kg de etanol aumentou o tempo de gasto no centro, nos animais criados no AP, e a locomoção na área central, nos animais criados no AE, ao passo que a dose de 1,2 g/kg CA aumentou as duas medidas de relacionadas à ansiedade nos animais de ambos os grupos. Isso poderia ser aludido como uma redução da ansiedade. Todavia, estas mesmas doses (0,5 e 1,2 g/kg) também promoveram um aumento geral da locomoção, tanto na periferia quando no centro do CA. Devido a esse aumento geral da ambulação, o qual denota um possível efeito estimulante do etanol, estes achados não nos permitem afirmar que o etanol (nestas doses) tenha

causado um efeito puramente ansiolítico nos animais. Já em relação à dose mais elevada de etanol, foi nitidamente observado um efeito ansiolítico/sedativo, com um maior tempo de gasto no centro e um maior número de cruzamentos no centro, apesar de uma considerável redução da locomoção total nos ratos SHR criados no AE. Enquanto que, nos animais criados em AP, a dose de 2,0 g/kg de etanol, promoveu um efeito semelhante ao das outras doses, ou seja, aumento da locomoção total, e um aumento do percentual de cruzamentos centrais e do tempo gasto no centro CA. Tomados juntos, estes achados sugerem que o AE diminuiu a sensibilidade ao efeito estimulante do etanol nos ratos SHR. Este resultado tem uma considerável relevância no contexto das drogas de abuso, pois muitos estudos com roedores têm demonstrado uma forte relação entre o efeito estimulante, refletido pelo aumento da atividade locomotora, e o potencial de abuso de algumas drogas, incluindo o etanol (Wise e Bozard, 1987; Colombo *et al.*, 1998).

Outro importante achado do presente estudo é que os animais criados em AE não desenvolveram preferência aos compartimentos onde foram condicionados com etanol, enquanto os animais criados em AP desenvolveram uma preferência dose-dependente pelos compartimentos previamente pareados com etanol, exibindo claramente um comportamento de busca pela droga. Evidências apontam para o envolvimento de processos de aprendizagem e a formação de memórias associativas no desenvolvimento da dependência às drogas (Everitt e Robbins, 2005; Hyman, 2005). Neste sentido, poderia ser levantada a questão de que a capacidade do AE em inibir o desenvolvimento da PCL induzida pelo etanol poderia ter ocorrido devido a uma inibição da formação de memórias associativas entre os compartimentos de condicionamento (pistas ambientais) e os efeitos subjetivos da droga condicionada (etanol), ao invés de uma redução das propriedades motivacionais desta droga. Recentemente, um trabalho do grupo utilizando o mesmo protocolo de enriquecimento ambiental, mostrou uma melhora da função cognitiva dos ratos SHR (Pamplona *et al.*, 2009), em relação aos animais criados em AP. Em resumo, o trabalho mostrou, que os ratos SHR criados em AE exibiram melhoras cognitivas em paradigmas de aprendizagem e memória de curto e longo prazo, nos testes do labirinto aquático de Morris, do reconhecimento social e do reconhecimento do objeto, sem afetar outras características não-cognitivas como (nocicepção e pressão arterial). Isso reforça a hipótese de redução da sensibilidade aos efeitos reforçadores do etanol em detrimento de um “prejuízo” no processo de formação de memórias associativas. Deste modo que, estes resultados juntamente com os

resultados anteriores mostram que o enriquecimento ambiental promoveu uma redução no comportamento de consumo de etanol e da sensibilidade ao efeito estimulante do etanol, associados com uma redução da PCL, indicando que estes comportamentos refletem uma redução à sensibilidade as propriedades reforçadoras do etanol, e possivelmente compartilham os mesmos substratos neuronais (Green e Grahame, 2008).

Com respeito aos resultados obtidos na tolerância observou-se que tanto os ratos SHR criados em AP quanto AE exibiram uma melhora do prejuízo motor induzido pelo etanol ao longo do experimento, enquanto a concentração de etanol no sangue permaneceu estável, caracterizando o fenômeno da tolerância aguda (Radlow, 1994; Khanna *et al.*, 2002). Esse fenômeno é um processo neuroadaptativo, que também pode ser causado por alterações que facilitam a metabolização e eliminação da droga. Diversos estudos têm sugerido que a tolerância aguda envolve processos inatos de adaptação aos efeitos do etanol, particularmente dos efeitos depressores, podendo contribuir para o desenvolvimento de dependência ao etanol (Khanna *et al.*, 1990; Tampier *et al.*, 2000; Tampier e Quintanilla, 2002). O desenvolvimento de tolerância aos efeitos depressores do etanol pode estar relacionado com alterações moleculares particularmente nos receptores NMDA ou GABA_A. Por exemplo, modificações rápidas como fosforilações que podem ocorrer mesmo após uma única exposição à droga, levando a diminuição dos efeitos inibitórios do etanol sobre os receptores NMDA, ou ainda aumentando a sensibilidade dos receptores GABA_A ao etanol (Krystal *et al.*, 2003; Ron, 2004). Todavia, o presente estudo não avaliou estas interações.

Curiosamente, os animais criados em AE apresentaram menores de álcool no sangue, especialmente nos primeiros 30 minutos, quando comparados com os animais mantidos em AP. O que justifica, ao menos em parte, o prejuízo motor relativamente menor que foi observado nas ratas SHR criadas em AE, excepcionalmente, na primeira exposição ao plano inclinado, em relação àquelas criadas em AP. Diversos trabalhos têm mostrado que a sensibilidade aos efeitos depressores do etanol está inversamente relacionada ao seu consumo (Olive *et al.*, 2000; Bowers e Wehner, 2001), mostrando que linhagens menos sensíveis aos efeitos depressores do etanol tendem a consumir mais etanol (Kurtz *et al.*, 1996; Tampier *et al.*, 2000). Contudo, esta hipótese vai de encontro com os demais resultados os quais mostram de maneira bastante contundente em os efeitos protetores do AE no que diz respeito à redução das propriedades reforçadoras do etanol e também da sacarina. Com base

nisto, poderia ser especulada a hipótese de que o AE estaria promovendo mudanças na absorção e distribuição do etanol, o que levaria a uma redução dos níveis séricos de etanol. Além, disso, aspectos cardiovasculares e outros aspectos metabólicos podem estar contribuindo para essa diferença em relação à alcoolemia dos animais. Por exemplo, alterações cardiovasculares podem levar a um aumento da oxigenação hepática e respiração mitocondrial por aumentar as concentrações da forma oxidada da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺), cofator importante e limitante da degradação enzimática do álcool pela álcool-desidrogenase (ADH) (Thurman e Scholz, 1977). Embora sejam apenas especulações, é possível que a exposição ao ambiente enriquecido tenha promovido estas alterações, principalmente por conta dos efeitos benéficos da atividade física voluntária, proporcionada pela roda de correr, visto que outros trabalhos mostraram que o AE pode promover alterações farmacológicas e fisiológicas marcantes (van de Weerd *et al.*, 1997; Editorial, 2002). Sem dúvidas, uma das limitações deste estudo foi não ter avaliado com mais afinco esta questão.

Evidências têm mostrado que dentre as pessoas que experimentam os efeitos de substâncias psicoativas apenas uma pequena percentagem desenvolve o uso compulsivo típico da dependência. Características genéticas e traços de personalidade estão bastante relacionados ao desenvolvimento da dependência de drogas. Além disso, acredita-se que fatores ambientais desempenhem um papel crucial na determinação da sensibilidade aos efeitos reforçadores das drogas e a vulnerabilidade ao desenvolvimento da dependência (Sinha, 2001; Marinelli e Piazza, 2002; Kreek *et al.*, 2005). Neste sentido, existe uma série de evidências mostrando que fatores negativos, como o estresse, aumentam a predisposição ao abuso da drogas. De uma maneira geral estes trabalhos mostram que ambientes estressores tendem a exacerbar os efeitos reforçadores de drogas de abuso como anfetamina, cocaína e heroína em animais de experimentação (Sinha, 2001; Marinelli e Piazza, 2002; Kreek *et al.*, 2005). Por outro lado, experiências positivas, onde os indivíduos recebem uma variedade de estímulos sensoriais, cognitivos e motores, durante o desenvolvimento, podem ativar de maneira contínua o sistema de recompensa e promover neuroadaptações capazes de reduzir as respostas a reforços externos, conferindo uma proteção aos efeitos reforçadores das drogas de abuso, diminuindo o risco de desenvolvimento da dependência (Bardo *et al.*, 2001; Green *et al.*, 2002;2003; Deehan *et al.*, 2007; Stairs e Bardo, 2009). Estes trabalhos em geral relatam uma redução dos efeitos reforçadores de diferentes classes

de drogas, como anfetaminas (Bardo *et al.*, 2001; Green *et al.*, 2002), nicotina (Green *et al.*, 2003) e etanol (Deehan *et al.*, 2007) nos animais criados em AE, em relação aos animais criados em isolamento, e também reduzem os efeitos reforçadores da cocaína (Solinas *et al.*, 2008a, 2008b) quando comparados com animais criados em AP. Além disso, estas alterações podem estar refletindo as mudanças neuroquímicas e moleculares em estruturas da via mesocorticolímbica (Bardo, 1998; Solinas *et al.*, 2008a; 2008b). Estudos têm mostrado um aumento da arborização dendrítica em neurônios do NAc (Kolb *et al.*, 2003), uma redução da expressão do transportador de dopamina no CPF (Bezard *et al.*, 2003), o qual tem sido implicado na redução da impulsividade de animais criados AE comparados aos animais criados em isolamento (Zhu *et al.*, 2005). Além disso, existem trabalhos mostrando que os animais expostos ao AE e submetidos à administração repetida de cocaína, apresentam uma menor ativação do estriado, refletida por uma redução na expressão do gene Zif-268, (Solinas *et al.*, 2008a) e uma menor ativação do Nac, ATV e amígdala basolateral, representada por uma diminuição da expressão do fator de transcrição c-FOS (Solinas *et al.*, 2008b). Estes trabalhos sugerem que estas estruturas estejam envolvidas com os efeitos protetores do AE, visto que a ativação destas regiões parece ser imprescindível para promover o comportamento de busca pela droga (McFarland e Kalivas, 2001; Kalivas e McFarland, 2003; Anderson *et al.*, 2003; Bossert *et al.*, 2005). Além disso, muitos trabalhos têm mostrado que o enriquecimento ambiental atenua as respostas comportamentais e endócrinas mediadas pelo eixo hipófise-pituitária-adrenal (Fernández-Teruel *et al.*, 2002; Fox *et al.*, 2006), bem como, diminui a liberação de noradrenalina e dopamina no CPF, em função do estresse, de maneira que essa baixa reatividade ao estresse tem sido sugerida como um indício de uma melhor capacidade de adaptação a agentes estressores e pode estar associada aos efeitos benéficos do ambiente enriquecido (Larsson *et al.*, 2002; Moncek *et al.*, 2004; Segovia *et al.*, 2009), e também deve ser levada em consideração no contexto das drogas de abuso.

Evidências apontam para o envolvimento do sistema de recompensa dopaminérgico tanto nos efeitos reforçadores da drogas de abuso quanto nas alterações comportamentais observadas em ratos SHR, considerados um modelo animal do TDAH, entretanto, estudos adicionais são necessários para verificar a participação do sistema dopaminérgico, bem como de outros sistemas de neurotransmissão (gabaérgico e glutamatérgico, por exemplo) nas alterações observadas nas ratas SHR expostas ao AE.

Em conclusão, este trabalho mostrou pela primeira vez que a exposição a estímulos que mimetizem experiências positivas de vida induzem mudanças persistentes no sistema motivacional das ratas SHR, como demonstrado pela redução da sensibilidade à novidade e das propriedades reforçadoras da sacarina e do etanol e também diminui as respostas do tipo-ansiedade. Embora, precauções devam se tomadas antes de extrapolar os resultados do presente estudo para a condição humana, este trabalho sugere um importante papel do ambiente de criação durante período crítico da adolescência no desenvolvimento da comorbidade entre o TDAH e o abuso de drogas.

6 REFERÊNCIAS

Adriani W, Laviola G. Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. *Behav Pharmacol*, 2004; 15:341-352.

American Psychiatric Association: Diagnostic and statistical manual of mental disorders: *DSM-IV-TR*. Washington DC: Author 2000.

Amini B, Yang PB, Swann AC, Dafny N. Differential locomotor responses in male rats from three strains to acute methylphenidate. *Int J Neurosci*, 2004; 114: 1063–1084.

Anderson SM, Bari AA, Pierce RC. Administration of the D1-like dopamine receptor antagonist SCH-23390 into the medial nucleus accumbens shell attenuates cocaine priming-induced reinstatement of drug-seeking behavior in rats. *Psychopharmacol (Berl)*, 2003; 168:132–138.

Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav*, 1973; 21:205–235.

Bardo MT. Neuropharmacological mechanisms of drug reward: beyond dopamine in the nucleus accumbens. *Crit Rev Neurobiol*, 1998; 12(1–2):37–67.

Bardo MT, Bevins RA. Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacol*, 2000; 153:31–43.

Bardo MT, Klebaur JE, Valone JM, Deaton C. Environmental enrichment decreases intravenous self-administration of amphetamine in female and male rats. *Psychopharmacol (Berl)*, 2001; 155: 278–284.

Barrickman L, Noyes R, Kuperman S, Schumacher E, Verda M. Treatment of ADHD with fluoxetine: a preliminary trial. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 1991; 30:762-767.

Beaufour CC, Le Bihan C, Hamon M, Thiebot M. Extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex during reward - punishment - and

novelty-associated behaviour. Effects of diazepam. *Pharmacol Biochem Behav*, 2001; 69: 133-142.

Benaroya-Milshtein N, Hollander N, Apter A, Kukulansky T, Raz N, Wilf A, Yaniv I, Pick CG. Environmental enrichment in mice decreases anxiety attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur J Neurosci*, 2004; 20: 1341-1347.

Bezard E, Dovero S, Belin D, Duconger S, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Piazza PV, Gross CE, Jaber M. Enriched environment confers resistance to 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine and cocaine: involvement of dopamine transporter and trophic factors. *J Neurosci*, 2003; 23: 10999-11007.

Biederman J, Faraone SV, Spencer T, Wilens T, Mick E, Lapey KA. Gender differences in a sample of adults with attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatry Res*, 1994; 53:13–29.

Biederman J, Spencer T. Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) as a noradrenergic disorder. *Biol Psychiatry*, 1999; 46:1234-1242.

Biederman J. Attention-deficit/hyperactivity disorder: a selective overview. *Biol Psychiatry*, 2005; 57:1215–1220.

Bobb AJ, Castellanos FX, Addington AM, Rapoport JL. Molecular genetic studies of ADHD: 1991 to 2004. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2005(a), 132:109-125.

Bobb AJ, Addington AM, Sidransky E, Gornick MC, Lerch JP, Greenstein DK, Clasen LS, Sharp WS, Inoff-Germain G, Wavrant-De VF, Arcos-Burgos M, Straub RE, Hardy JA, Castellanos FX, Rapoport JL. Support for association between ADHD and two candidate genes: NET1 and DRD1. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2005(b), 134:67-72.

Boix F, Qiao S, Kolpus T, Sagvolden T. Chronic-deprenyl treatment alters brain monoamine levels and reduces impulsiveness in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Behav Brain Res*, 1998; 94:153-162.

Bossert JM, Ghitza UE, Lu L, Epstein DH, Shaham Y. Neurobiology of relapse to heroin and cocaine seeking: An update and clinical implications. *Eur J Pharmacol*, 2005; 526:36–50.

Bowers BJ, Wehner JM. Ethanol consumption and behavioral impulsivity are increased in protein kinase C gamma null mutant mice. *J Neurosci*, 2001, 21(21):180.

Bowling SL, Bardo MT. Locomotor and rewarding effects of amphetamine in enriched, social, and isolate reared rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 1994; 48(2):459–64.

Bowling, SL, Rowlett, JK, Bardo, MT. The effect of environmental enrichment on amphetamine-stimulated locomotor activity, dopamine synthesis and dopamine release. *Neuropharmacol*, 1993; 32: 885-893.

Brenes JC, Fornaguera J. Effects of environmental enrichment and social isolation on sucrose consumption and preference: Associations with depressive-like behavior and ventral striatum dopamine. *Neuroscience Let*, 2008; 436: 278–282.

Cailhol S, Mormède P. Sex and strain differences in ethanol drinking: effects of gonadectomy. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001; 25(4):594-599.

Carroll KM, Rounsaville BJ. History and significance of childhood attention deficit disorder in treatment-seeking cocaine abusers. *Compr Psychiatry*, 1993; 34(2): 75-82.

CEBRID - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas. I Levantamento Nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira. *Secretaria Nacional Antidrogas*; Brasília-DF, 2007.

Chambers RA, Taylor JR, Potenza MN. Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability. *Am J Psychiatry*, 2003; 160:1041–1052.

Chiavegatto S, Izidio GS, Mendes-Lana A, Aneas I, Freitas TA, Torrão AS, Conceição IM, Britto LRG, Ramos A. Expression of a-synuclein is

increased in the hippocampus of rats with high levels of innate anxiety. *Mol Psych*, 2008; 0:1–13.

Colombo G, Agabio R, Diaz G, Fà M, Lobina C, Reali R, Gessa GL. Sardinian alcohol-preferring prefer chocolate and sucrose over ethanol. *Alcohol*, 1997; 14:611-615.

Cunnigham CL, Fidler TL, Hill KG. Animal models of alcohol's motivational effects. *Alcohol Res Health*, 2000; 24:85-92.

Da Silva GE, Vendruscolo LF, Takahashi RN. Effects of ethanol on locomotor and anxiety-like behaviors and the acquisition of ethanol intake in Lewis and spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*, 2005; 77: 693-706.

Da Silva GE, Ramos A, Takahashi RN. Acquisition of ethanol self-administration in two rat lines used as genetic models of anxiety. *Braz J Med Biol Res*, 2004; 37:1511–151.

Davids E, Zhang K, Tarazi FI, Baldessarini RJ. Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. *Brain Res Rev*, 2003; 42:1–21.

Deehan Jr GA, Cain ME, Kiefer SW. Differential rearing conditions alter operant responding for ethanol in outbred rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 2007; 31(10): 1692–1698.

Dell'Anna ME, Luthman J, Lindqvist E, Olson L. Development of monoamine systems after neonatal anoxia in rats. *Brain Res Bull*, 1993; 32:159-170.

Editorial / Pharmacology, Biochemistry and Behavior. Environmental manipulations in rodents and primates: Insights into pharmacology, biochemistry and behavior. *Pharmacol Biochem Behav*, 2002; 73: 1-5.

Everitt BJ, Robbins TW. Neural systems of reinforcement for drug addiction: From actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci*, 2005; 8:1481–1489.

Faraone SV, Doyle AE, Mick E, Biederman J. Meta-analysis of the association between the 7-repeat allele of the dopamine D(4) receptor

gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry*, 2001; 158:1052-1057.

Faraone SV. Genetics of adult attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychiatr Clin North Am*, 2004; 27:303-321.

Faraone SV, Biederman J. What is the prevalence of adult ADHD? Results of a population screen of 966 adults. *J Atten Disord*, 2005; 9:384-391

Feenstra MG, Botterblom MH. Rapid sampling of extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex during food consumption, handling and exposure to novelty. *Brain Res*, 1996; 742: 17-24.

Fernández-Teruel A, Giménez-Llort L, Escorihuela RM, Gil L, Aguilar R, Steimer T, Tobenã A. Early-life handling stimulation and environmental enrichment: are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacol Biochem Behav*, 2002; 73: 233-245.

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

Gentsch C, Linchtsteiner M, Feer H. Open field and elevated plus-maze, a behavioral comparison between spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar-Kyoto (WKY) rats and the effects of chlordiazepoxide. *Behav Brain Res*, 1987; 25:101-107.

Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nat*, 1996; 379: 606-612.

Green AS, Grahame NJ. Ethanol drinking in rodents: is free choice drinking related to the reinforcing effects of ethanol? *Alcohol*, 2008; 42: 1-11.

Green TA, Gehrke BJ, Bardo MT. Environmental enrichment decreases intravenous amphetamine self-administration in rats: dose-response functions for fixed- and progressive-ratio schedules. *Psychopharmacol (Berl)*, 2002; 162: 373-378.

Green TA, Cain ME, Thompson M, Bardo MT. Environmental enrichment decreases nicotine-induced hyperactivity in rats. *Psychopharmacol (Berl)*, 2003; 170: 235-241.

Hall CS. Emotional behavior in the rat: Defecation and urination as measures of individual differences in the emotionality. *J Comp Psychol*, 1934; 18:385-403.

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

Himelstein J, Newcorn JH, Halperin JM. The neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder. *Front Biosci*, 2000; 5: 461-478.

Hoffman PL, Tabakoff B. The role of the NMDA receptor in ethanol withdrawal. *EXS*, 1994; 71:61-70.

Holene E, Nafstad I, Skaare JU, Sagvolden T. Behavioural hyperactivity in rats following postnatal exposure to sub-toxic doses of polychlorinated biphenyl congeners 153 and 126. *Behav Brain Res*, 1998; 94: 213-224.

Hyman SE. Addiction: A disease of learning and memory. *Am J Psychiatry*, 2005; 162:1414–1422.

Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ. Neural mechanisms of addiction: The role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci*, 2006; 29:565–598.

Johnson BA. Progress in the development of topiramate for treating alcohol dependence: from a hypothesis to a proof-of-concept study. *Alcohol Clin Exp Res*, 2004; 28: 1137-1144.

Jucaite A, Fernell E, Halldin C, Forssberg H, Farde L. Reduced midbrain dopamine transporter binding in male adolescents with attention deficit/ hyperactivity disorder: association between striatal dopamine markers and motor hyperactivity. *Biol Psychiatry*, 2005; 57: 229-238.

Kalivas PW, McFarland K. Brain circuitry and the reinstatement of cocaine seeking behavior. *Psychopharmacol (Berl)*, 2003; 168:44–56.

Kauer JA, Malenka RC. Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci*, 2007; 8(11):844-858.

Klebaur JE, Bevins RA, Segar TM, Bardo MT. Individual differences in behavioral responses to novelty and amphetamine self-administration in male and female rats. *Behav Pharmacol*, 2001; 12: 267–275.

Kessler RC, Adler L, Barkley R, Biederman J, Conners CK, Demler O, et al. The prevalence and correlates of adult ADHD in the United States: results from the National Comorbidity Survey Replication. *Am J Psychiatry*, 2006; 163:716–723.

Khanna JM, Kalant H, Chau AK, Sharma H. Initial sensitivity, acute tolerance and alcohol consumption in four inbred strains of rats. *Psychopharmacol (Berl)*, 1990; 101(3):390-395.

Khanna JM, Morato GS, Kalant H. Effect of NMDA antagonists, an NMDA agonist, and serotonin depletion on acute tolerance to ethanol. *Pharmacol Biochem Behav*, 2002; 72(1-2):291-298.

Kreek MJ, Nielsen DA, Butelman ER, LaForge KS. Genetic influences on impulsivity, risk taking, stress responsivity and vulnerability to drug abuse and addiction. *Nat Neurosci*, 2005; 8: 1450–1457.

Kristoffersen L, Smith-Kielland A. An automated alcohol dehydrogenase method for ethanol quantification in urine and whole blood. *J Anal Toxicol*, 2005; 29(5):387-389.

Kristoffersen L, Skuterud B, Larssen BR, Skurtveit S, Smith-Kielland A. Fast quantification of ethanol in whole blood specimens by the enzymatic alcohol dehydrogenase method. Optimization by experimental design. *J Anal Toxicol*, 2005; 29(1):66-70.

Krystal JH, Petrakis IL, Mason G, Trevisan L, D'souza DC. N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and alcoholism: reward, dependence, treatment, and vulnerability. *Pharmacol Ther*, 2003; 99 (1): 79-94.

Kolb B, Gorny G, Soderpalm AH, Robinson TE. Environmental complexity has different effects on the structure of neurons in the

prefrontal cortex versus the parietal cortex or nucleus accumbens. *Synapse*, 2003; 48(3):149–153.

Koob GF, Le Moal M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Sci*, 1997; 278: 52-58.

Koob GF, Le Moal M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacol*, 2001; 24: 97–129.

Kurtz DL, Stewart RB, Zweifel M, Li TK, Froehlich JC. Genetic differences in tolerance and sensitization to the sedative/hypnotic effects of alcohol. *Pharmacol Biochem Behav*, 1996; 53(3):585-591.

LaHoste GJ, Swanson JM, Wigal SB, Glabe C, Wigal T, King N, Kennedy JL. Dopamine D4 receptor gene polymorphism is associated with attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*, 1996; 1:121-124.

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

Li TK, Lumeng L, Doolittle DP. Selective breeding for alcohol preference and associated responses. *Behav Genetic*, 1993; 23:163-170.

Li, TK, Spanagel R, Colombo G, McBride WJ, Porrino LJ, Suzuki T, Rodd-Henricks ZA. Alcohol reinforcement and voluntary ethanol consumption. *Alcohol Clin Exp Res*, 2001; 25: 117-126.

Lima, DR. Manual de Farmacologia Clínica, Terapêutica e Toxicologia. Rio de Janeiro; *Editora Médica e Científica Ltda*, 2003; 1: 892.

Lovinger DM, White G, Weigh FF. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Sci*, 1989; 243: 1721-1724.

Lovinger DM. Communication networks in the brain. *Alcohol Res Health*, 2008; 31(3):196-214.

Maher BS, Marazita ML, Ferrell RE, Vanyukov MM. Dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis. *Psychiatr Genet*, 2002; 12:207-215.

Manor I, Corbex M, Eisenberg J, Gritsenko I, Bachner-Melman R, Tyano S, Ebstein RP. Association of the dopamine D5 receptor with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and scores on a continuous performance test (TOVA). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2004; 127:73-77.

Mannuzza S, Klein RG, Bessler A, Malloy P, La Padula M. Adult psychiatric status of hyperactive boys grown up. *Am J Psychiatry*, 1998;155(4):493-498.

Marinelli M, Piazza PV. Interaction between glucocorticoid hormones, stress and psychostimulant drugs. *Eur J Neurosci*, 2002; 16: 387-394.

Marinelli M, White FJ. Enhanced vulnerability to cocaine self-administration is associated with elevated impulse activity of midbrain dopamine neurons. *J Neurosci*, 2000; 20:8876-85.

Masterman DL, Cummings JL. Frontal-subcortical circuits: the anatomical basis of executive, social and motivational behaviors. *J Psychopharmacol*, 1997; 11:107-114.

McFarland K, Kalivas PW. The circuitry mediating cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *J Neurosci*, 2001; 21:8655-8663.

Mezey E, Sharma S, Rennie L, Potter JJ. Sex differences in gastric alcohol dehydrogenase activity in Sprague-Dawley rats. *Gastroenterol*, 1992; 103:149-156.

Moncek F, Duncko R, Johansson BB, Jezova D. Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. *J Neuroendocrinol*, 2004; 16:423-431.

Moser MB, Moser EI, Wulz B, Sagvolden T. Component analysis differentiate between exploratory behaviour of spontaneously hypertensive rats and Wistar Kyoto rats in a two-compartment free-exploration open field. *Scand J Psychol*, 1988; 29: 200-206.

Montgomery KC. The relation between fear induced by novel stimulation and expository behavior. *J Comp Physiol Psychol*, 1955; 48:254-260.

Muglia P, Jain U, Macciardi F, Kennedy JL. Adult attention hyperactivity disorder and the dopamine D4 receptor gene. *Am J Med Genet*, 2000; 96: 273-277.

Nadal R, Armario A, Janak PH. Positive relationship between activity in a novel environment and operant ethanol self-administration in rats. *Psychopharmacol*, 2002; 62: 333–338.

Nakamura-Palacios EM, Caldas CK, Fiorini A, Chagas KD, Chagas KN, Vasquez EC. Deficits of spatial learning and working memory in spontaneously hypertensive rats. *Behav Brain Res*, 1996; 74:217-227.

Nestler EJ. Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci*, 2005; 8 (11): 1445 – 1449.

Nevo I, Hamon M. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism (Review). *Neurochem Int*, 1995; 26 (4): 305-336.

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

Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*, 1963; 27, 282-293.

Olive MF, Mehmert KK, Messing RO, Hodge CW. Reduced operant ethanol self-administration and in vivo mesolimbic dopamine responses to ethanol in PKC epsilon-deficient mice. *Eur J Neurosci*, 2000; 12(11): 4131-4140.

Overstreet DH, Kampov-Polevoy AB, Rezvani AH, Murelli L, Halikas JA, Janowsky DS. Saccharin intake predicts intake in genetically heterogeneous rats as well as different rat strains. *Alcohol Clin Exp Res*, 1993; 17: 366–369.

Overstreet DH, Halikas JA, Seredenin SB, Kampov-Polevoy AB, Vingliskaya IV, Kashevskaya O, Batishtov BA, Knapp DJ, Mormède P, Kiianmaa K, Li TK, Rezvani AH. Behavioral similarities and differences among alcohol-preferring and –nonpreferring rats: confirmation by factor analysis and extension to additional groups. *Alcoholism Clin Exp Res*, 1997; 21: 840–848.

Pamplona FA, Vendruscolo LF, Takahashi RN. Increased sensitivity to cocaine-induced analgesia in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR). *Behav Brain Funct*, 2007; 3:9.

Pamplona FA, Pandolfo P, Savoldi R, Prediger RD, Takahashi RN. Environmental enrichment improves cognitive deficits in spontaneously hypertensive rats (SHR): relevance for attention deficit / hyperactivity disorder (ADHD). *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2009, 33: 1153-1160.

Pandolfo P, Vendruscolo LF, Sordi R, Takahashi RN. Cannabinoid-induced conditioned place preference in the spontaneously hypertensive rat—an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. *Psychopharmacol (Berl)*, 2009; 205:319–326.

Pandolfo P, Pamplona FA, Prediger RD, Takahashi RN. Increased sensitivity of adolescent spontaneously hypertensive rats, an animal model of attention deficit hyperactivity disorder, to the locomotor stimulation induced by the cannabinoid receptor agonist WIN 55,2122. *Eur J Pharmacol*, 2007; 563:141-148.

Park L, Nigg JT, Waldman ID, Nummy KA, Huang-Pollock C, Rappley M, Friderici KH. Association and linkage of alpha-2A adrenergic receptor gene polymorphisms with childhood ADHD. *Mol Psychiatry*, 2005; 10:572-580.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Meth*, 1985; 14: 149-167.

Pelloux Y, Costentin J, Duterte-Boucher D. Differential effects of novelty exposure on place preference conditioning to amphetamine and its oral consumption. *Psychopharmacol (Berl)*, 2004; 171: 277-285.

Piazza PV, Deroche-Gamonet V, Rouge-Pont F, Le Moal M. Vertical shifts in self-administration dose–response functions predict a drug-vulnerable phenotype predisposed to addiction. *J Neurosci*, 2000; 20: 4226-4232.

Pires VA, Pamplona FA, Pandolfo P, Fernandes D, Prediger RD and Takahashi RN. Adenosine receptor antagonists improve short-term object-recognition ability of spontaneously hypertensive rats: a rodent model of attention-deficit hyperactivity disorder. *Behav Pharmacol*, 2009; 20:134-145.

Prediger RD, Pamplona FA, Fernandes D, Takahashi RN. Caffeine improves spatial learning deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) - the spontaneously hypertensive rat (SHR). *Int J Neuropsychopharmacol*, 2005 (b); 8:583-594.

Puumala T, Routsalainen S, Jakala P, Koivisto E, Riekkinen P, Sirviö J. Behavioral and pharmacological studies on the validation of a new animal model of attention deficit hyperactivity disorder. *Neurobiol. Learn. Mem*, 1996; 66: 198-211.

Radlow R. A quantitative theory of acute tolerance to alcohol. *Psychopharmacol (Berl)*, 1994; 114(1):1-8.

Ramos, A, Berton O, Mormède P, Chaouloff F. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behav Brain Res*, 1997; 85: 57–69.

Ramos A, Mormède P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci Biobehav Rev*, 1998; 22: 33–57.

Ramos A, Mellerin Y, Mormède P, Chaouloff F. A genetic and multifactorial analysis of anxiety related behaviours in Lewis and SHR intercrosses. *Behav Brain Res*, 1998; 96: 195–205.

Roberto M, Madamba SG, Moore SD, Tallent MK, Siggins GR. Ethanol increases GABAergic transmission at both pre- and postsynaptic sites in rat central amygdala neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; 100(4):2053-2058.

Roberts AJ, Smith AD, Weiss F, Rivier C, Koob GF. Estrous cycle effects on operant responding for ethanol in female rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 1998; 22: 1564-1569.

Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus- maze. *Neurosci Biobehav Rev*, 1997; 21: 801–810.

Rohde LA, Biederman J, Busnello EA, Zimmermann H, Schmitz M, Martins S, Tramontina S. ADHD in a school sample of brazilian adolescents: a study of prevalence, comorbid conditions and impairments. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 1999; 38:716-722.

Ron D. Signaling cascades regulating NMDA receptor sensitivity to ethanol. *Neuroscientist*, 2004; 10 (4): 325-336.

Russell V, de Villiers A, Sagvolden T, Lamm M, Taljaard J. Altered dopaminergic function in the prefrontal cortex, nucleus accumbens and caudate-putamen of an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder: the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res*, 1995; 676: 343–351.

Russell VA. Hypodopaminergic and hypernoradrenergic activity in prefrontal cortex slices of an animal model for attention-deficit hyperactivity disorder—the spontaneously hypertensive rat. *Behav Brain Res*, 2002; 130:191–196.

Sadile AG, Pelicano MP, Sagvolden T, Sergeant JA. NMDA and non-NMDA sensitive [L-3H] glutamate receptor binding in the brain of the Naples high- and low-excitability rats: an autoradiographic study. *Behav Brain Res*, 1996; 78: 163-174.

Sagvolden T Sergeant JA. Attention deficit/hyperactivity disorder – from brain dysfunction to behaviour. *Behav Brain Res*, 1998; 94: 1–10.

Sagvolden T. Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD). *Neurosci Biobehav Rev*, 2000; 24: 31-39.

Sagvolden T, Aase H, Johansen EB, Russell VA. A dynamic developmental theory of attention-deficit/hyperactivity disorder

(ADHD) predominantly hyperactive/impulsive and combined subtypes. *Behav Brain Sciences*, 2005 (a); 28: 397–468.

Sagvolden T, Russell VA, Aase H, Johansen EB, Farshbaf M. Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*, 2005(b); 57: 1239-1247.

Sagvolden T, Xu T. l-Amphetamine improves poor sustained attention while d-amphetamine reduces overactivity and impulsiveness as well as improves sustained attention in an animal model of attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Behav Brain Funct*, 2008; 4: 3.

Schubiner H, Tzelepis A, Milberger S, Lockhart N, Kruger M, Kelley BJ, Schoener EP. Prevalence of attention-deficit/hyperactivity disorder and conduct disorder among substance abusers. *J Clin Psychiatry*, 2000; 61: 244-251.

Seeman P, Madras BK. Anti-hyperactivity medication: methylphenidate and amphetamine. *Mol Psychiatry*, 1998; 3: 386-396.

Segovia G, Arco AD, Mora F. Environmental enrichment, prefrontal cortex, stress, and aging of the brain. *J Neural Transm*, 2009; 116:1007–1016.

Shaywitz BA, Klopper JH, Yager RD, Gordon, J.W. Paradoxical response to amphetamine in developing rats treated with 6-hydroxydopamine. *Nat*, 1976; 261: 153-155.

Silbergeld EK, Goldberg AM. Lead-induced behavioral dysfunction: an animal model of hyperactivity. *Exp Neurol*, 1974; 42: 146-157.

Sinha R. How does stress increase risk of drug abuse and relapse? *Psychopharmacol (Berl)*, 2001; 158: 343–359.

Smalley SL. Genetic influences in childhood-onset psychiatric disorders: autism and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Hum Genet*, 1997, 60:1276-1282.

Soeters HS, Howells FM, Russell VA. Methylphenidate does not increase ethanol consumption in a rat model for attention-deficit

hyperactivity disorder-the spontaneously hypertensive rat. *Metab Brain Dis*, 2008; 23(3): 303-314.

Solinas M, Thiriet N, Rawas RE, Lardeux V, Jaber M. Environmental enrichment during early stages of life reduces the behavioral, neurochemical, and molecular effects of cocaine. *Neuropsychopharmacol*, 2008(a); 51: 1–10.

Solinas M, Chauvet C, Thiriet N, Rawas RE, Jaber M. Reversal of cocaine addiction by environmental enrichment. *PNAS*, 2008(b); 105(44): 17145-17150.

Spanagel R, Montkowski A, Allingham K, Stöhr T, Shoaib M, Holsboer F, Landgraf R. Anxiety: a potential predictor of vulnerability to the initiation of ethanol self-administration in rats. *Psychopharmacol*, 1995; 122: 369–373.

Stairs DJ, Bardo MT. Neurobehavioral effects of environmental enrichment and drug abuse vulnerability. *Pharmacol Biochem Behav*, 2009; 92: 377-382.

Stewart RB, Gatto GJ, Lumeng L, Li TK, Murphy JM. Comparison of alcohol-preferring (P) and nonpreferring (NP) rats on tests of anxiety and for the anxiolytic effects of ethanol. *Alcohol*, 1993; 10: 1–10.

Stoff DM, Friedman E, Pollock L, Vitiello B, Kendall PC, Bridger WH. Elevated platelet MAO is related to impulsivity in disruptive behavior disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 1989; 28:754-760.

Tampier L, Quintanilla ME, Mardones J. Acute tolerance, alcohol sensitivity and drinking pattern in the F2 generation of UChA and UChB rats. *J Stud Alcohol*. 2000, 61(5): 647-651.

Taylor E. Clinical foundations of hyperactivity research. *Behav Brain Res*, 1998; 94: 11–24.

Terenina-Rigaldie E, Jones BC, Mormède P. The High-alcohol Preferring rat as a model to study the shift between alcohol abuse and dependence. *Eur J Pharmacol*, 2004; 504: 199-206.

Thurman RG, Scholz R. Interaction of glycolysis and respiration in perfused rat liver. Changes in oxygen uptake following the addition of ethanol. *Eur J Biochem*, 1977; 75(1): 13-21.

Tomkins DM, Sellers EM. Addiction and brain: the role of neurotransmitters in the cause and treatment of drug dependence. *CMAJ*, 2001; 164 (6): 817821.

Tzschentke TM. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol*, 2007; 12:227–462.

van de Weerd HA, van Loo PLP, Van Zutphen LFM, Koolhaas JM, Baumans V. Nesting material as environmental enrichment has no adverse effects on behavior and physiology of laboratory mice. *Physiol Behav*, 1997; 62: 1019–1028.

van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences sequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci*, 2000; 1(3): 191–198.

Vendruscolo LF, Terenina-Rigaldie E, Raba F, Ramos A, Takahashi RN, Mormède P. Evidence for a female-specific effect of a chromosome 4 locus on anxiety-related behaviors and ethanol drinking in rats. *Gen Brain Behav*, 2005; 5: 441-450.

Vendruscolo LF, Izídio GS, Takahashi RN, Ramos A. Chronic methylphenidate treatment during adolescence increases anxiety-related behaviors and ethanol drinking in adult spontaneously hypertensive rats. *Behav Pharmacol*, 2008; 19: 21–27.

Vendruscolo LF, Vendruscolo JMC, Terenina E, Ramos A, Takahashi RN, Mormède P. Marker-assisted dissection of genetic influences on motor and neuroendocrine sensitization to cocaine in rats. *Gen Brain Behav*, 2009 a; 8: 267–274.

Vendruscolo LF, Izídio GS, Takahashi RN. Drug reinforcement in a rat model of attention deficit/hyperactivity disorder – the spontaneously hypertensive rat (SHR). *Curr Drug Abuse Rev*, 2009b; 2:177–183.

Volkow ND, Fowler JS, Wang G, Goldstein RZ. Role of dopamine, the frontal cortex and memory circuits in drug addiction: insight from imaging studies. *Neurobiol Learn Mem*, 2002; 78: 610-624.

Wang X, Wang G, Lemos JR, Treisman SN. Ethanol directly modulates gating of a dihydropyridinesensitive Ca²⁺ channel in neurohypophysial terminals. *J Neurosci*, 1994; 14(9):5453-5460.

Wazlawik E, Morato GS. Influence of drugs acting on nitric oxide-dependent pathways on ethanol tolerance in rats. *Psychopharmacol*, 2003; 170:343-350.

Weiner JL, Valenzuela CF. Ethanol modulation of GABAergic transmission: The view from the slice. *Pharmacol Ther*, 2006; 111(3):533-54.

Weiss F, Lorang MT, Bloom FE. Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus accumbens: genetic and motivational determinants. *J Pharmacol Ther*, 1993; 267: 250-258.

Widmer H, Lemos JR, Treisman SN. Ethanol reduces the duration of single evoked spikes by a selective inhibition of voltage-gated calcium currents in acutely dissociated supraoptic neurons of the rat. *J Neuroendocrinol*, 1998; 10 (6):399-406.

Wilens TE, Kwon A, Tanguay S, Chase R, Moore H, Faraone SV, et al. Characteristics of adults with attention deficit hyperactivity disorder plus substance use disorder: the role of psychiatric comorbidity. *Am J Addict*, 2005; 14:319-327.

Will B, Galani R, Kelche C, Rosenzweig MR. Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002). *Prog Neurobiol*, 2004; 72:167-182.

Wise RA, Bozarth MA. A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev*, 1987; 94:469-492.

WHO - World Health Organization. The World Health Report 2002. Reducing risks, promoting healthy life. Geneva, 2002.

Würbel H. Ideal homes? Housing effects on rodent brain and behaviour. *Trends Neurosci*, 2001; 24: 207–211.

Zhu J, Apparsundaram S, Bardo MT, Dwoskin LP. Environmental enrichment decreases cell surface expression of the dopamine transporter in rat medial prefrontal cortex. *J Neurochem*, 2005; 93(6):1434–1443.

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

7 ANEXO

Artigo publicado em periódico científico indexado

De Carvalho CR, Pandolfo P, Pamplona FA, Takahashi RN. Environmental enrichment reduces the impact of novelty and motivational properties of ethanol in spontaneously hypertensive rats *Behavioural Brain Research*, 2010; 17: 208(1):231-236.

Resumos apresentados em congressos com resultados relacionados à dissertação:

Carvalho CR, Pandolfo P, Takahashi RN. O enriquecimento ambiental na adolescência diminui respostas emocionais e o consumo de etanol em ratas espontaneamente hipertensas adultas. I Congresso IBRO/LARC de Neurociências da América Latina, Caribe e Península Ibérica – Neurolatam. Búzios-RJ, Brasil, 2008.

Carvalho CR, Pandolfo P, Pamplona FA, Takahashi RN. Environmental enrichment during early stages of life reduces motivational proprieties of ethanol and emotional responses in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. XXIV Reunião Anual Federação de Sociedades de Biologia Experimental – SBFTE. Águas de Lindóia-SP, Brasil, 2009.