MARINA GOMES DE ALMEIDA

Efeitos do enriquecimento ambiental e da oxitocina sobre o consumo de etanol em camundongos C57BL/6 submetidos ao estresse agudo

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

São Paulo

2018

MARINA GOMES DE ALMEIDA

Efeitos do enriquecimento ambiental e da oxitocina sobre o consumo de etanol em camundongos C57BL/6 submetidos ao estresse agudo

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof.ª Dr.ª Rosana Camarini

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Gomes de Almeida, Marina
Efeitos do enriquecimento ambiental e da oxitocina sobre o consumo de etanol em camundongos C57BL/6 submetidos ao estresse agudo / Marina Gomes de Almeida; orientadora Rosana Camarini. -- São Paulo, 2018.
113 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Etanol. 2. Enriquecimento Ambiental. 3. Oxitocina. 4. Estresse. 5. TEPT. I. Camarini, Rosana, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marina Gomes de Almeida

Título da Dissertação/Tese: Efeitos do enriquecimento ambiental e da oxitocina sobre o consumo de etanol em camundongos C57BL/6 submetidos ao estresse agudo

Orientador: Profª Drª Rosana Camarini

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

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

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

ICBUSP

COMISSAO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMEDICAS
UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

CEUA-ICB/USP - Telefone

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "***Efeitos da oxitocina sobre o consumo de etanol em camundongos C57BL/6 enriquecidos e submetidos ao estresse agudo***", registrado sob o protocolo nº ***25/2016***, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Cientifica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em ***26/07/2016*** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.)** ***Rosana Camarini***
- Departamento: *Farmacologia*
- Membros da Equipe: *Marina Gomes de Almeida (Pós-graduando), Mariana Beu Rae (Pós-graduando), Gabriel de Araújo Costa (Pós-graduando), Sonia Maria Rodrigues Leite (Técnico de Laboratório)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico *www.icb.usp.br/ceua*. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

.CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "***Effects of oxytocin on alcohol consumption in enriched C57BL/6 mice submitted to acute stress***", protocol nº ***25/2016***, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on ***7/26/2016*** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.)** ***Rosana Camarini***
- Team members: *Marina Gomes de Almeida (Graduate Student), Mariana Beu Rae (Graduate Student), Gabriel de Araújo Costa (Graduate Student), Sonia Maria Rodrigues Leite (Laboratory Technician).*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	*C57bl/6*	*Macho/Male*	*70 dias/days*	*150*
Rattus norvegicus	*Long evans*	*Macho/Male*	*30 g*	*5*

São Paulo, 02 de agosto de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

Dedico este trabalho à minha família,
pelo apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer a minha orientadora, Prof.ª Dr.ª Rosana Camarini, que me recebeu em seu laboratório de braços abertos. Obrigada pela confiança, pelos ensinamentos, pela compreensão, pela motivação e pelas risadas.

A todos os meus colegas e amigos de laboratório que sempre contribuíram para uma convivência leve e prazerosa em nosso ambiente de trabalho. Obrigada Sônia pela ajuda nos experimentos, pela organização, pelas conversas e pelo carinho. Obrigada André, Mari, Lucas, Pri, Olívia, Bruno e Marcos por toda a ajuda e risadas. Em especial, obrigada Nívea e Gabriel que se tornaram amigos muito especiais, por me ouvirem, pelo apoio em meus momentos difíceis, por compartilharem dias bons e dias ruins, pela doação e carinho, pelos pães de alho, pelos vinhos, pelos bolos e por toda a alegria envolvida. Obrigada Veridiana, minha “aluninha”, que me deu uma ajuda gigantesca em todas as etapas deste trabalho. Agradeço as conversas, o carinho e a confiança. E muito obrigada pelos chocolates.

Aos meus colegas de departamento, especialmente aos alunos da Profª Carol que se dispuseram a me ensinar protocolos que eu não conhecia e por me fornecerem dicas importantes. Agradeço também à professora pelos equipamentos e materiais fornecidos para realizar alguns experimentos.

Às secretárias da pós-graduação, Mônica e Camila, por sempre estarem com um sorriso no rosto quando precisamos enfrentar as burocracias.

À minha família, meu pai Francisco, minha mãe Irene e meu irmão Raphael, pelo apoio incondicional. Pela confiança depositada em mim. Por investirem em meus sonhos. Por acreditarem no meu sucesso. Pela ajuda material e emocional desde o início da minha vida. Pela presença em todos os meus momentos importantes. Serei eternamente grata. Amo muito vocês.

Aos meus tios e tias, primos e primas e especialmente às minhas avós que me apoiam e entendem minhas faltas nas festas de família quando fico presa nos estudos.

Às minhas amigas queridas de infância, Fernanda e Thais, que conhecem meus medos mas sempre dão um jeitinho de me sentir bem comigo mesma. Por ouvirem meus

desabafos, por me darem alegrias, que me dão forças pra seguir em frente em busca dos meus sonhos.

Às agências de fomento, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Processo: 133613/2016-0) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processo: 15/02397-0) pelo financiamento da pesquisa e por possibilitar a realização desse projeto. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao ICB e à USP por me acolherem ao longo da última década e contribuírem para a construção do meu conhecimento.

“Ninguém liberta ninguém, ninguém se liberta sozinho:
os homens se libertam em comunhão”

Paulo Freire

ALMEIDA M. G. **Efeitos do enriquecimento ambiental e da oxitocina sobre o consumo de etanol em camundongos C57BL/6 submetidos ao estresse agudo**. 2018. 113 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2018.

O etanol é a droga de abuso mais consumida em todo o mundo. Frequentemente, há comorbidade entre o alcoolismo e transtornos relacionados ao estresse. O enriquecimento ambiental (EA) reduz o comportamento ansioso em resposta ao estresse e consequentemente minimiza os efeitos reforçadores de drogas de abuso. Como o enriquecimento induz interações sociais, deve promover a liberação de oxitocina (OT), um neuropeptídeo liberado em resposta a experiências sociais. A OT tem propriedades ansiolíticas que devem conferir proteção aos efeitos deletérios do estresse. Neste trabalho, verificamos se o EA ou a OT protegem contra o consumo de etanol em camundongos machos C57BL/6, mesmo após a exposição ao estresse de exposição ao predador, um modelo de transtorno de estresse pós traumático (TEPT). Para avaliar os efeitos do EA, os animais foram divididos entre caixas padrão (NE) e caixas enriquecidas (EA) após a fase de aquisição, onde permaneceram por 21 dias. Em seguida foram subdivididos em grupos não estressados (NENS e EANS) e estressados (NEST e EAST) e reexpostos novamente ao etanol por 24h após o estresse; após 7 dias, com avaliação do comportamento do tipo ansioso por Labirinto em Cruz Elevado; e após 14 dias do estresse, quando passaram pela Caixa Claro-Escuro. Dentre os animais estressados, EAST reduziu o consumo e exibiu menos comportamento de medo e ansiedade. Em outro experimento, verificamos os efeitos de diferentes doses de carbetocina (CBT), um análogo da OT, sobre a ingestão de álcool. Então, foi realizado o tratamento crônico com CBT em camundongos, sendo que um grupo recebeu salina (CTL), outro recebeu CBT 1h antes das reexposições (CBT1h) e o último recebeu CBT 16h antes das reexposições ao etanol (CBT16h). Os animais passaram pelo mesmo delineamento do experimento anterior. A CBT1h teve efeito protetor sobre o consumo de álcool após estresse, enquanto a CBT16h não

Palavras-chave: Etanol. Enriquecimento Ambiental. Oxitocina. Estresse. TEPT.

ALMEIDA, M. G. **Effects of environmental enrichment and oxytocin on ethanol intake in C57BL/6 mice after an acute stress**. 2018. 113 f. Masters thesis (Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.2018.

Ethanol is the most commonly abused drug. Comorbidity between alcoholism and stress related disorders is highly frequent. Environmental enrichment (EE) reduces anxiety-like behaviour and consequently minimizes reinforcing effects of abused drugs. As EE favours social interactions, it might promote oxytocin (OT) release. OT is a neuropeptide secreted after social experiences. It is also related that OT has anxiolytic properties, which confers protection against stress maladaptive effects. The purpose of this work was to check if EE or OT protect against ethanol intake in male C57BL/6 abstinent mice even after stress exposure. To evaluate EE effects, animal were divided between standard housing (NE) and enriched housing (EA) after acquisition for 21 days. Then, both groups were subdivided into non-stressed (NENS, EANS) and stressed (NEST, EAST) and were submitted to predator exposure stress, a model of post traumatic stress disorder (PTSD). Right after stress, animals were reexposed to ethanol for 24h; after 7 days, when anxiety-like behaviour was evaluated by Elevated Plus Maze; and after 14 days of stress, when their behaviour was assessed by Light Dark Box. Among stressed animals, EAST reduced ethanol intake and exhibited decreased anxiety-like behaviour and fear. We determined the effects of different doses of carbetocin (CBT) on alcohol intake. In another experiment, mice were chronically treated CBT, an OT analogue. Control mice received saline (CTL), CBT1h were treated 1 hour before ethanol reexposure and CBT16h were treated 16 hours before reexposures. The protocol was the same of the first experiment. CBT1h protected against ethanol intake after stress, while CBT16h did not. These results show that EE buffers ethanol. CBT reduced ethanol consumption when it was administered immediately before stress.

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Modelo de autoadministração por livre escolha (*Two-bottle choice*). 37
Figura 2. Comparação entre a caixa-padrão e a caixa enriquecida. 39
Figura 3. Aparato utilizado no teste de exposição ao predador.....41
Figura 4. Aparato utilizado para o teste de Labirinto em Cruz Elevado.....42
Figura 5. Aparato utilizado para o teste da Caixa Claro-Escuro.....43
Figura 6. Delineamento do experimento 1 45
Figura 7. Delineamento do experimento 2. 46
Figura 8. Delineamento do experimento 3. 48
Figura 9. Consumo de etanol (A) e preferência (B) durante a fase de aquisição do experimento 1.....50
Figura 10. Consumo de etanol (A) e preferência (B) nas reexposições de 2h do experimento 1.....52
Figura 11. Consumo de etanol (A) e preferência (B) nas reexposições de 24h do experimento 1.....54
Figura 12. Parâmetros espaciais e temporais avaliados no teste de exposição ao rato. 56
Figura 13. Parâmetros comportamentais avaliados no teste de exposição ao rato. A. ..57
Figura 14. Parâmetros avaliados no teste de Labirinto em Cruz Elevado. 59
Figura 15. Parâmetros avaliados no teste da Caixa Claro Escuro. 60
Figura 16. Consumo de etanol (A) e preferência (B) durante a fase de aquisição dos animais do experimento 2. 62
Figura 17. Consumo de etanol por 2 horas imediatamente após o tratamento (A), após 7 dias (C) e após 14 dias (E) nos animais tratados com diferentes doses de CBT. Preferência ao etanol imediatamente após o tratamento com CBT (B), após 7 dias (D) e após 14 dias do tratamento (F). 64
Figura 18. Consumo de etanol por 2 horas imediatamente após o tratamento (A), após 7 dias (C) e após 14 dias (E) nos animais tratados com diferentes doses de CBT. Preferência ao etanol imediatamente após o tratamento com CBT (B), após 7 dias (D) e após 14 dias do tratamento (F). 66

Figura 19. Consumo de etanol (A) e preferência (B) durante a aquisição do experimento 3 68
Figura 20. Consumo de etanol (A) e preferência (B) nas reexposições de 2h do experimento 3.....70
Figura 21. Consumo de etanol (A) e preferência (B) nas reexposições de 24h do experimento 3.....72
Figura 22. Parâmetros espaciais e temporais avaliados no teste de exposição ao rato no experimento 3.....73
Figura 23. Parâmetros comportamentais avaliados no teste de exposição ao rato no experimento 3.....74
Figura 24. Parâmetros avaliados no teste de Labirinto em Cruz Elevado no experimento 3. 76
Figura 25. Parâmetros avaliados no teste da Caixa Claro-Escuro no experimento 3. ...77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABL – Amígdala Basolateral

ACe – Amígdala Central

ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico

ATV – Área Tegmental Ventral

AVP – Arginina-Vasopressina

CBT – Carbetocina

CCE – Caixa Claro-Escuro

CPF – Córtex Pré-Frontal

CPP – Preferência Condicionada por Lugar

CRF – Fator Liberador de Corticotrofinas

CRF1 – Receptor para CRF do tipo 1

CTL – Grupo Controle

DA – Dopamina

DID – Modelo *Drinking in the Dark*

EA – Enriquecimento Ambiental

EANS – Animais Enriquecidos e Não Estressados

EAST – Animais Enriquecidos e Estressados

EPA – Efeito de Privação do Álcool

GC – Glicocorticoide

GPCR – Receptor Acoplado a Proteína G

GR – Receptores para Glicocorticóides

HPA – Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

HD – *Head Dip*

LCE – Labirinto em Cruz Elevado

LENAD – Levantamento Nacional de Álcool e Drogas

NAc – Núcleo Accumbens

NE – Animais Não Enriquecidos

NENS – Animais Não Enriquecidos e Não Estressados

NEST – Animais Não Enriquecidos e Estressados

OMS – Organização Mundial da Saúde

OT – Oxitocina

OTR – Receptores para oxitocina

PVN – Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

SAP – *Stretched Attend Posture*

SNC – Sistema Nervoso Central

SON – Núcleo Supraóptico do Hipotálamo

TEPT – Transtorno do Estresse Pós-Traumático

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
1.1 Dependência de Substâncias *19*
1. 1. 1 Aspectos Históricos e Epidemiológicos 19
1. 1. 2 Neurofisiologia da Adicção 21
1. 2 Estresse *25*
1. 2. 1 Eixo Hipotálamo - Pituitária - Adrenal (HPA) e sistemas extra-hipotalâmicos 25
1. 2. 2 Transtorno do Estresse Pós-Traumático 27
1. 3 Enriquecimento Ambiental *29*
1. 4 Sociabilidade e Oxitocina *31*
1. 5 Hipóteses *33*
2 OBJETIVOS 35
2. 1 Objetivos Gerais *35*
2. 2 Objetivos específicos *35*
3 MATERIAIS E MÉTODO 36
3. 1 Animais *36*
3. 2 Consumo oral de etanol por livre escolha entre duas garrafas (“Two-bottle choice”) *36*
3. 3 Enriquecimento Ambiental *38*
3. 4 Tratamento com carbetocina *39*
3. 5 Teste de exposição ao predador *40*
3. 6 Teste de labirinto em cruz elevado *41*
3. 7 Teste de caixa claro-escuro *43*
3. 8 Delineamento experimental *44*
3. 8. 1 Experimento 1: Enriquecimento ambiental 44
3. 8. 2 Experimento 2: Tratamento agudo com carbetocina 45
3. 8. 3 Experimento 2: Tratamento crônico com carbetocina 46
3. 9 Análise estatística *48*
4 RESULTADOS ..... **Erro! Indicador não definido.**
4. 1 Experimento 1: Enriquecimento Ambiental *49*
4. 1. 1 Aquisição 49
4. 1. 2 Ingestão de etanol nas reexposições de 2 horas 51
4. 1. 3 Ingestão de etanol nas reexposições de 24 horas 53
4. 1. 4 Teste de exposição ao predador 55

4. 1. 5 Labirinto em Cruz Elevado 58
4. 1. 6 Caixa Claro-Escuro 60
4. 2. Experimento 2: Tratamento agudo com CBT 61
4. 2. 1 Aquisição 61
4. 2. 2 Consumo de etanol em 2h após tratamento agudo com CBT 63
4. 2. 2 Consumo de etanol em 24h após tratamento agudo com CBT 65
4. 3. Experimento 3: Tratamento crônico com CBT 67
4. 3. 1. Aquisição 67
4. 3. 2. Ingestão de etanol nas reexposições de 2 horas 69
4. 3. 3 Ingestão de etanol nas reexposições de 24 horas 71
4. 3. 4 Teste de exposição ao predador 73
4. 3. 5 Labirinto em Cruz Elevado 75
4. 3. 6 Caixa Claro-Escuro 77
5 DISCUSSÃO 78
5. 1 Enriquecimento Ambiental, Estresse e Consumo de Etanol 78
5. 2 Oxitocina, Estresse e Consumo de Etanol 82
6 CONCLUSÃO 88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 90

1 INTRODUÇÃO

O consumo de etanol é bastante comum em nossa sociedade e muitas são as razões pelas quais a população engaja neste comportamento. Muitas pessoas relatam sensações de prazer com o álcool e bebem por divertimento; outros são influenciados pelos amigos e consomem para se sentirem incluídos em grupos sociais. Ainda existem aqueles que bebem para se sentirem menos tensos em situações de estresse, já que os efeitos iniciais do consumo incluem desinibição (KOOB; VOLKOW, 2010). Por este motivo, muitos indivíduos com transtornos de humor e ansiedade são bastante propensos ao consumo elevado de etanol com o intuito de aliviar os sintomas psiquiátricos (BECKER; LOPEZ; DOREMUS-FITZWATER, 2011).

Os transtornos de humor e ansiedade vêm recebendo bastante atenção nos últimos anos, visto que cada vez mais pessoas manifestam essas doenças graças ao estresse da vida moderna e a outros traumas. Muitos pacientes não os compreendem como doenças, de forma que poucos procuram tratamento especializado e acabam consumindo drogas de abuso como forma de automedicação (BACK; BRADY, 2008). De fato, dados de diversos estudos mostram que existe uma correlação entre o abuso e dependência de álcool e outras drogas com transtornos psiquiátricos. O II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (II LENAD) mostra que 40,9% da população com problema de álcool apresentam indicadores de depressão (LARANJEIRAS et al., 2012). Além disso, estudos de meta-análise de pesquisas epidemiológicas afirmam que aproximadamente 35% dos indivíduos com transtorno de uso de álcool portavam algum transtorno de humor e, entre estes, mais de 50% apresentavam algum tipo de transtorno de ansiedade, dentre os quais se destacam o transtorno de estresse pós-traumático, o transtorno de pânico, a fobia social e o transtorno de ansiedade generalizada (LAI et al., 2015; GIMENO et al., 2017). A automedicação alivia os sintomas de estresse e ansiedade presentes nessas síndromes, entretanto, o consumo crônico de etanol e o desenvolvimento de dependência estão associados ao aumento nos níveis de estresse e, dessa forma, pode agravar os sintomas desses transtornos psiquiátricos.

Estudos recentes indicam a importância do ambiente para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, incluindo o transtorno de uso de substâncias (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; SOLINAS et al., 2010). O enriquecimento ambiental (EA) expõe os animais de laboratório à maior estimulação física, devido às rodas de exercícios; sensorial, pelo contato com objetos diferentes aos do alojamento padrão; e também o aumento de interações sociais com outros animais (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006). Pouco se sabe como o EA produz efeito protetor contra a adicção, porém acredita-se que um dos mecanismos seja pela regulação dos sistemas de estresse (SOLINAS et al., 2010).

A oxitocina (OT), por sua vez, é um hormônio liberado em resposta a interações sociais e fortemente associado às emoções positivas (NEUMANN, 2008). Defende-se que a OT atue sobre os sistemas encefálicos que regulam a resposta de estresse, reduzindo os sintomas emocionais negativos (NEUMANN; SLATTERY, 2016). O sistema de estresse possui atividade aumentada em vários transtornos psicossociais, incluindo os transtornos de ansiedade e o alcoolismo (KOOB, 2008). Dessa forma, espera-se que a OT possa ser utilizada como tratamento para essas doenças ou pelo menos para o alívio dos sintomas. Além disso, acredita-se que a OT seja capaz de modificar a sinalização do centro dopaminérgico mesolímbico de recompensa, conferindo resiliência ao estresse e assim, efeito protetor contra a adicção (KOVÁCS; SARNYAI; SZABÓ, 1998).

Como o EA aumenta as interações sociais e altera o *binding* a receptores de OT (OTR) (RAE et al., 2018), nosso laboratório investiga o papel deste hormônio no EA como agente endógeno no tratamento da dependência de álcool. Dessa forma, espera-se que o trabalho colabore com os conhecimentos atuais sobre a importância do ambiente e de uma boa qualidade de vida para a redução do consumo de etanol. Assim, além de fornecer benefícios individuais, como a recuperação da saúde do indivíduo, o menor consumo de álcool pode proporcionar melhorias à sociedade, diminuindo os acidentes de trânsito, os níveis de desemprego, além de todos os custos envolvidos no sistema criminal, em hospitais e outras instituições responsáveis pelo tratamento desses indivíduos.

1.1 Dependência de Substâncias

1. 1. 1 Aspectos Históricos e Epidemiológicos

Desde a pré-história, há relatos que indicam o consumo de substâncias psicoativas para diversos fins e em diferentes circunstâncias. Existem registros datados do Período Neolítico, há cerca de 8000 a.C., que humanos já conheciam ervas que influenciavam o humor e o pensamento (VENTULANI, 2001). Dados arqueológicos de aproximadamente 2500 anos relatam o uso de preparações de ópio, derivado da seiva da papoula *Papaver somniferum*, em cultos religiosos; além de materiais de outras regiões indicarem o uso medicinal ou recreativo dessa substância (MERLIN, 2003; VENTULANI, 2001). Ainda mais, na Ásia Central, há registros de 5000 anos que descrevem o preparo de haxixe a partir da planta *Cannabis sativa,* em cerimônias e rituais (MERLIN, 2003). O uso de álcool também já era bastante difundido na Antiguidade, devido à facilidade de seu preparo: fermentação de materiais por levedura, sendo amplamente utilizado não só em festas, mas também em rituais religiosos, incluindo da Igreja Católica (VENTULANI, 2001). Com as Grandes Navegações, os europeus descobriram o tabaco e as folhas de coca na América, os quais foram utilizados para fins medicinais e recreativos (VENTULANI, 2001). Nos séculos XIX e XX, houve o aperfeiçoamento da síntese de compostos químicos, que levaram ao desenvolvimento de drogas sintéticas como, por exemplo, os barbituratos, os benzodiazepínicos e as anfetaminas, utilizadas, inicialmente, como terapia médica, mas que se tornaram drogas de abuso com o passar do tempo (VENTULANI, 2001).

No passado, o consumo dessas substâncias era aceito socialmente. Como o uso ocorria apenas em determinadas situações, eram raros os efeitos nocivos ou o desenvolvimento de transtorno de uso de substâncias. Porém, há relatos conhecidos de problemas com o uso crônico, como a “epidemia de gin” na Inglaterra, por volta do século XVII e a “epidemia do ópio” na Ásia, na mesma época (WESTERMEYER, 2016). Ainda mais, como as substâncias eram utilizadas diretamente da planta em sua forma fresca

ou seca, sem que houvesse purificação ou seleção dos compostos ativos, o efeito psicoativo era moderado (VENTULANI, 2001).

Ao longo do tempo, a facilitação do transporte das substâncias entre os países aumentou o estoque e a disponibilidade das mesmas. A elas, foram atribuídos valores de mercado e passaram a ser produzidas em larga escala para comercialização, resultando na perda das características culturais de consumo em favor do uso hedônico (VENTULANI, 2001; WESTERMEYER, 2016). Adicionalmente, com o desenvolvimento de técnicas de purificação, houve a geração de drogas mais potentes como o MDMA e estimulantes similares à anfetamina, e de novas formas de administração como o “crack”, que, por possuírem diferentes propriedades farmacocinéticas, geram maior potencial aditivo. Em decorrência disto, o número de indivíduos dependentes cresceu. Como resposta, o consumo dessas substâncias foi proibido em diversos países, com exceção do etanol e da nicotina (VARGAS, 2008; WESTERMEYER, 2016) nos países ocidentais. A Organização Mundial da Saúde, OMS, relatou o aumento do consumo de drogas ilícitas a partir dos anos 1980 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000).

Pelo breve histórico apresentado, sabe-se que as drogas tem forte impacto sobre a sociedade moderna, sejam elas lícitas ou ilícitas. Geralmente, o consumo inicial da droga ocorre pela busca das propriedades hedônicas, para redução de sintomas de afeto negativo ou por pressão dos pares (KOOB; VOLKOW, 2010). No entanto, nem todos que utilizam drogas se tornam adictos. A susceptibilidade está relacionada a fatores ambientais e sociais, como eventos traumatizantes ao longo da história do indivíduo, às características genéticas e também aos estágios de desenvolvimento do indivíduo, sendo que adolescentes são mais vulneráveis ao transtorno (VOLKOW; KOOB; MCLELLAN, 2016).

Estes fatores induzem diferentes padrões de consumo, como o consumo em *binge*, que podem evoluir para o Transtorno de Uso de Substâncias. De acordo com o DSM-5, o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, o Transtorno de Uso Substâncias é definido como a utilização recorrente de álcool e outras drogas, provocando prejuízos não apenas à própria saúde, mas também problemas de convívio em sociedade, que vão desde dificuldades em casa até negligência no trabalho e/ou estudos (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). A dependência de

substâncias é descrita como a busca compulsiva pela droga e pelo seu consumo crônico e excessivo apesar das consequências fisiológicas e psicológicas negativas (KOOB; VOLKOW, 2010; ROBISON; NESTLER, 2011).

Estima-se que, em 2015, 250 milhões de pessoas consumiram drogas ilícitas pelo menos uma vez na vida (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Cerca de 29,5 milhões de pessoas apresentaram transtorno de uso de substâncias. Ainda assim, apenas um indivíduo a cada seis tiveram acesso ao tratamento do transtorno (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Já no Brasil, cerca de 22,8% da população já consumiu drogas ilícitas em algum momento da vida. Considerando apenas o consumo de álcool, a porcentagem sobe para 74,6% da população e, no caso do tabaco, para 44% (CEBRID, 2006). Em 2005, 12,3% da população brasileira que consumiu álcool estava incluída nos critérios para dependência de álcool e 10,1% para dependência de tabaco (CEBRID, 2006).

No planeta, quase 6% das mortes (3,3 milhões) e cerca de 5% dos casos de incapacitação são atribuídos ao consumo de etanol (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). As consequências para a sociedade incluem acidentes de trânsito, comportamento agressivo do usuário, desemprego, além de todos os custos envolvidos em campanhas para a redução do consumo, sistema criminal e em hospitais e outras instituições responsáveis pelo tratamento desses indivíduos (LARANJEIRAS, 2012; WHO, 2014).

Para um entendimento completo dos prejuízos individuais e sociais do Transtorno de Uso de Substâncias, é necessário não apenas conhecer os fenômenos sociais, padrões de consumo e fatores de risco que levam ao consumo, mas também compreender os mecanismos de ação fisiológica das substâncias sobre os organismos vivos. Dessa forma, é possível implementar programas de prevenção ao consumo e planejar políticas públicas voltadas para o tratamento do transtorno e de métodos de reabilitação.

1. 1. 2 Neurofisiologia da Adicção

São conhecidas diversas drogas de abuso que causam dependência com alvos farmacológicos distintos. No entanto, todas essas drogas ativam a via dopaminérgica mesolímbica, apesar das ações serem diferentes em um primeiro momento (KALIVAS; VOLKOW, 2005; WISE; ROMPRE, 1989). Como induzem o disparo de neurônios da Área Tegmental Ventral (ATV) ao Núcleo Accumbens (NAc), o consumo da droga de abuso ativa os sistemas de motivação que direcionam o indivíduo a buscá-la como recompensa (HYMAN; MALENKA; NESTLER, 2006). O consumo excessivo e crônico aumenta os níveis de dopamina (DA) mesolímbica, induzindo alterações neuroplásticas relacionadas a mecanismos de tolerância e dependência farmacológicas. Como consequência, áreas talâmicas e corticais que fazem conexões com o circuito sofrem neuroadaptações que resultam na motivação aumentada para o consumo da droga, porém reduzida para as recompensas naturais (KOOB; VOLKOW, 2010). Assim, o indivíduo torna-se incapaz de controlar o próprio consumo.

A hipótese mais aceita atualmente sugere que a adicção é o resultado de alterações dos circuitos neuronais envolvidos na recompensa e motivação, provocando um *loop* de *feedback* positivo que leva ao consumo excessivo e descontrolado. Ou seja, o consumo inicial da droga aumenta a ativação de circuitos de memória e motivação, contribuindo para a perpetuação do uso (VOLKOW; MORALES, 2015). Para fins didáticos, a adicção é dividida em três etapas: *Binge*/Intoxicação, Abstinência/Afeto negativo e Preocupação/Antecipação (KOOB; LE MOAL, 1997).

O estágio de *binge*/intoxicação é caracterizado pelo alto consumo da droga em um período curto do tempo, no qual há predomínio do comportamento impulsivo, definido como o uso da droga para promover um estado prazeroso. Nessa fase, há ativação predominante da via mesolímbica de dopamina (KOOB; VOLKOW, 2010). Todas as drogas de abuso promovem a liberação fásica de dopamina da ATV para o NAc, seja de forma direta como os psicoestimulantes, ou indireta, como os opioides e o etanol (DI CHIARA; IMPERATO, 1988, KALIVAS; VOLKOW, 2005; KOOB; VOLKOW, 2010). Particularmente, o consumo agudo de álcool é capaz de ativar a via mesolímbica de forma direta ou indireta, por alterar o balanço entre os neurotransmissores GABA e glutamato que agem como moduladores da liberação de DA (ENOCH, 2008; PIERCE; KUMARESAN, 2006). Inicialmente, o etanol inibe interneurônios GABAérgicos,

desinibindo a atividade dos neurônios dopaminérgicos da ATV, o que eleva a liberação de dopamina no NAc (ENOCH, 2008).

O rápido aumento de DA no estriado ventral facilita a aquisição de condicionamento, associando pistas ambientais a estímulos reforçadores. Elevações rápidas e transientes de DA no estriado estão associadas a sensações hedônicas, porém o aumento lento e prolongado do tônus basal de dopamina no NAc não induz respostas subjetivas em humanos (GRACE, 2000; VOLKOW; FOWLER; WANG, 2004).

No estágio de Abstinência/Afeto Negativo, a busca pela droga torna-se predominantemente compulsiva, ou seja, a droga passa a ser utilizada para aliviar sintomas negativos prévios ao consumo (KOOB; VOLKOW, 2010). O uso repetido da droga promove adaptações como a hipofunção da atividade dopaminérgica com redução de receptores D2 no estriado ventral e no córtex pré-frontal (CPF) (KOOB; VOLKOW, 2010; VOLKOW; FOWLER; WANG, 2004; VOLKOW, MORALES, 2015); bem como aumento na síntese de dinorfina no NAc e na amígdala (FRANKEL et al., 2008; HURD; HERKENHAM, 1993; KOOB, 2008). A dinorfina é um opioide endógeno que age sobre receptores *kappa* opioides na pré-sinapse dos neurônios dopaminérgicos com a finalidade de reduzir a liberação de DA (HYMAN; MALENKA; NESTLER, 2006; KOOB; VOLKOW, 2010). Em adição, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), principal sistema de controle da resposta ao estresse, é ativado com o consumo da droga, que provoca o aumento do Fator de Liberação de Corticotrofinas (CRF) (KOOB, 2008). O CRF age sobre a amígdala e contribui para o surgimento dos comportamentos ansioso e depressivo (MERLO-PICH et al., 1995; KOOB; VOLKOW, 2010). De fato, já foi observado que drogas como o etanol causam a hiperexcitabilidade da amígdala durante a abstinência (FADDA; ROSSETTI, 1998; GILPIN; KOOB, 2008).

O último estágio, Preocupação/Antecipação, é caracterizado pelo "*craving*" ou "fissura": o desejo intenso pela droga. Atualmente, muitos estudos são direcionados para entender melhor essa etapa, já que a recaída pode ser induzida por neuroadaptações que se desenvolveram durante essa fase (KOOB, VOLKOW, 2010). A ATV envia projeções dopaminérgicas para o CPF, cuja ativação determina valores e seleciona ações para atingir um objetivo (HYMAN; MALENKA; NESTLER, 2006). O disparo fásico de DA no CPF informa que novos objetivos salientes são codificados. Porém, o excesso

de DA mediado pela droga de abuso sinaliza a hipervalorização da pista (HYMAN; MALENKA; NESTLER, 2006). Indivíduos adictos tem atividade reduzida do CPF em situação de tomada de decisões (KALIVAS; VOLKOW, 2005; KAUFMAN et al., 2003; VOLKOW; MORALES, 2015) e apresentam uma resposta reduzida frente a reforços naturais (GARAVAN et al., 2000; KALIVAS; VOLKOW, 2005), que pode significar menor direcionamento a esses objetivos.

Substratos neurais de memória e aprendizado condicionado também sofrem neuroadaptações com o uso crônico da droga. Memórias relacionadas ao consumo da droga e aos estímulos ambientais associados a ele provocam a ativação do estriado ventral, promovendo a busca pela substância. (KOOB; VOLKOW, 2010; VOLKOW; KOOB; MCLELLAN, 2016). Nas pesquisas utilizando modelos animais de recaída induzida pela presença da droga ou pelo estresse, ocorre liberação de DA no CPF que estimula a busca da droga (KALIVAS; VOLKOW, 2005) com ativação da amígdala estendida e consequente surgimento do estado emocional negativo que favorece a recaída (KALIVAS, VOLKOW, 2005; KOOB, VOLKOW, 2010).

O conhecimento dos circuitos encefálicos envolvidos na patogênese da adicção possibilita estudos futuros para entendermos os motivos da vulnerabilidade de certos indivíduos para o transtorno e desenvolver tratamentos para compensar as alterações neuroplásticas ocorridas por causa da exposição crônica à droga. Um dos principais modelos para o estudo da adicção é o de autoadministração não operante, o qual é válido para avaliar as propriedades motivacionais das drogas de abuso, em especial do etanol (SANCHIS-SEGURA; SPANAGEL, 2006). A autoadministração é baseada no consumo voluntário que se assemelha ao comportamento apresentado por humanos (SANCHIS-SEGURA; SPANAGEL, 2006). Nela, os animais passam inicialmente pela aquisição, na qual lhes são disponibilizadas duas garrafas, uma contendo água e a outra etanol. Então, eles aprendem a responder pelo reforço ao álcool até que ocorra a estabilização do consumo (BECKER; LOPEZ; DOREMUS-FITZWATER, 2011; PIERCE; KUMARESAN, 2006). Diversos fatores influenciam a ingestão da droga, como a sua concentração, disponibilidade de outros reforçadores e, em especial, o tempo de exposição (SANCHIS-SEGURA; SPANAGEL, 2006).

Quando animais têm acesso voluntário ao etanol por um tempo prolongado e são privados por alguns dias, ocorre aumento temporário no consumo após reapresentação da droga, denominado efeito de privação do álcool (EPA) (SINCLAIR; SENTER, 1967; VENGELIENE; BIMBAO; SPANAGEL, 2014). Já foi demonstrado que o acesso intermitente ao etanol induz aumento escalonado do consumo em camundongos C57BL/6J (HWA et al., 2011), mesmo quando o período de privação é curto (MELENDEZ; MIDDAUGH; KALIVAS, 2006). Finalmente, foi determinado que camundongos expostos a 2 h diárias de etanol durante a fase escura do ciclo circadiano escalonam o consumo, atingindo concentrações plasmáticas de etanol farmacologicamente relevantes e válidas para o estudo do alcoolismo (RHODES et al, 2005).

1. *2 Estresse*

1. 2. 1 Eixo Hipotálamo - Pituitária - Adrenal (HPA) e sistemas extra-hipotalâmicos

No final da década de 1930, Hans Selye introduziu o conceito de estresse: uma resposta comum e inespecífica a diversos agentes nocivos e que chamou de Síndrome de Adaptação Geral (GOLDSTEIN; KOPIN, 2007; SELYE, 1936). Estímulos nocivos que perturbam a homeostase iniciam uma resposta cujo objetivo é retomar as variáveis biológicas aos seus níveis basais por meio de alterações dinâmicas internas (GUNNAR; VAZQUEZ, 2015). Essa regulação dinâmica, chamada de alostase, demonstra a habilidade do organismo em manter a estabilidade por meio de alterações do ponto de ajuste de uma variável biológica dentro de intervalos aceitáveis em determinadas situações (GOLDSTEIN, KOPIN, 2007). Por exemplo, quando um indivíduo está em repouso, os níveis de glicose sanguínea são mantidos dentro de limites aceitáveis, porém, no contexto da atividade física, os níveis de glicose sanguínea tendem a aumentar e, durante o exercício intenso, atingem valores associados à hiperglicemia (GOLDSTEIN; KOPIN, 2007). Os efeitos alostáticos são custosos ao organismo, o que se denomina carga alostática. Quando o indivíduo permanece com esse sistema ativado de forma

prolongada, podem surgir doenças e transtornos psiquiátricos (GOLDSTEIN; KOPIN, 2007; GUNNAR; VAZQUEZ, 2015).

A resposta ao estresse é mediada principalmente pelo hipotálamo, em especial por neurônios da região parvocelular do Núcleo Paraventricular (PVN) (SMITH; VALE, 2006). Quando ativados, secretam CRF, que age tanto na periferia, por meio do eixo HPA, quanto no sistema nervoso central em sistemas extra-hipotalâmicos (GUNNAR, VAZQUEZ, 2015; SMITH; VALE, 2006).

No eixo HPA, o CRF secretado pelo PVN é liberado nos vasos portais hipofisários, estimulando a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) para o sangue pela hipófise anterior. O ACTH, por sua vez, age sobre as glândulas adrenais, induzindo a liberação de glicocorticoides (GCs) pela zona fasciculada (SMITH; VALE 2006). Estes GCs agem negativamente sobre a liberação dos hormônios hipotalâmicos, formando uma alça de *feedback* negativo (NEUMANN et al., 2000a). Os GCs, cortisol em humanos e corticosterona em roedores, são hormônios esteroidais que se ligam a receptores nucleares GR, modulando processos metabólicos, imunes e comportamentais (GUNNAR, VAZQUEZ, 2015; SMITH; VALE, 2006).

Há expressão de receptores para CRF do tipo CRF1 no encéfalo em regiões extra-hipotalâmicas (SMITH; VALE, 2006). No SNC, o CRF ativa respostas comportamentais como aumento da vigilância e ativação simpática por meio de projeções aos neurônios catecolaminérgicos do *locus coeruleus* (VALENTINO et al., 1997; VALENTINO; FOOTE; ASTON-JONES, 1983); facilitação de aprendizado dependente de contexto via projeções ao hipocampo e amígdala (LIANG; LEE, 1988; RADULOVIC et al., 1999) e modulação de respostas motoras dependentes de contexto como luta ou fuga (GUNNAR; VAZQUEZ, 2015).

A região da amígdala apresenta neurônios que expressam CRF, os quais são críticos para a resposta a situações de ameaça (GAFFORD; RESSLER, 2015). A atividade dos núcleos amigdalares medeia comportamentos de medo e de outros estados aversivos como a ansiedade (JANAK; TYE, 2015). Há relatos que mostram que a ativação de receptores GR aumenta a síntese de CRF na amígdala estendida, que contribui para os comportamentos do tipo ansioso e depressivo (BINDER; NEMEROFF, 2010). Em situações não patológicas, a liberação de CRF mantém respostas para

manutenção da homeostase frente a estímulos ameaçadores, no entanto, quando o estresse é crônico ou bastante intenso, ocorre hiperativação da via do CRF, favorecendo a manifestação de transtornos como o transtorno de estresse pós-traumático e outras doenças (HAUGER et al., 2006).

Na adicção, a hiperatividade do sistema HPA e a alta concentração de GCs circulantes sensibiliza os receptores para CRF na Amígdala Central (ACe) e os sistemas noradrenérgicos na Amígdala Basolateral (ABL), o que deve contribuir para o estágio de afeto negativo (KOOB, 2008). De fato, sabe-se que há aumento dos níveis de CRF na ACe e no Núcleo Leito da Estria Terminal, regiões da amígdala estendida, durante a abstinência ao etanol (KOOB, 2008; MERLO-PICH et al., 1995) e que ele está relacionado ao aumento da autoadministração de etanol em ratos dependentes e privados de etanol (FUNK et al, 2006) bem como na indução de comportamento do tipo ansioso em ratos durante a abstinência após administração crônica de etanol (OVERSTREET; KNAPP; BREESE, 2004).

De fato, várias evidências mostram que situações de estresse aumentam o comportamento de busca e de recaída em modelos de autoadministração de várias drogas (GOEDERS, 2003). Em especial, roedores que são expostos ao estresse de derrota social apresentaram um período de baixo consumo de etanol durante ou imediatamente após o mesmo, que se elevou após a descontinuação das agressões (VAN ERP; MICZEK, 2001; VAN ERP; TACHI; MICZEK, 2001). Os autores postularam que a redução do consumo está associada a redução dos comportamentos consumatórios induzida pelo estresse (VAN ERP; MICZEK, 2001), mas o aumento tardio do consumo deve ter sido uma resposta rebote aos efeitos ansiogênicos do estresse (MICZEK; YAP; COVINGTON, 2008).

1. 2. 2 Transtorno do Estresse Pós-Traumático

O transtorno do estresse pós-traumático (TEPT) é caracterizado pela exposição a um estresse intenso, causando uma série de sintomas de ordem psicossomática. Esses sintomas incluem memórias intrusivas, como flashbacks e pesadelos, exagero nas

reações, sobressalto, alterações no humor e comportamento de aversão às pessoas ou situações que lembrem o paciente do trauma sofrido (LIBERZON; SRIPADA, 2008; WHITAKER; GILPIN; EDWARDS, 2014).

O TEPT envolve interações complexas entre o tálamo, o hipocampo, a amígdala e o CPF (NEMEROFF et al., 2006), refletindo mecanismos mal adaptativos do processamento de condicionamento ao medo e sensibilização a respostas de estresse. Estudos utilizando ressonância magnética mostram que veteranos do Vietnã com TEPT têm menor volume hipocampal que indivíduos controle, o qual está associado a déficits de memória (BREMNER et al., 1995). Ainda mais, mulheres diagnosticadas com TEPT têm fluxo sanguíneo aumentado em regiões do córtex pré-frontal anterior, cingulado posterior e córtex motor, bem como redução do fluxo sanguíneo no hipocampo e no córtex pré-frontal medial quando expostas a pistas ambientais associadas ao evento traumático em estudos de imageamento PET (BREMNER et al., 1999; LIBERZON; SRIPADA, 2008; NEMEROFF et al., 2006). Observa-se, ainda, reatividade exagerada a estímulos relacionados à ameaça em indivíduos diagnosticados com TEPT devido a neuroadaptações da própria amígdala e também ao controle inibitório reduzido da amígdala pelas regiões corticais. Isso deve contribuir para as emoções negativas relacionadas ao transtorno e aos sintomas de hipervigilância e sobressalto (LIBERZON; SRIPADA, 2008).

O CPF medial projeta-se para a ACe, regulando os sistemas de estresse amigdalares (KOOB, 2008; WHITAKER; GILPIN, EDWARDS, 2014) e a ativação do eixo HPA (KOOB, 2008). A exposição repetida ao estresse e também às drogas de abuso fazem com que os glicocorticoides circulantes sensibilizem a ACe (WHITAKER; GILPIN; EDWARDS, 2014). A sobreposição de mecanismos e circuitos neuronais entre o TEPT e o Transtorno de Uso de Substâncias deve ser um dos motivos da alta comorbidade entre ambas as doenças (BECKER; LOPEZ; DOREMUS-FITZWATER, 2011; EDWARDS et al., 2013). Cerca de 20-40% dos indivíduos com TEPT enquadram-se nos critérios utilizados para caracterizar o transtorno de uso de álcool (WHITAKER; GILPIN; EDWARDS, 2014). Portanto, entender as interações entre os circuitos de ambos os transtornos é essencial para que os tratamentos disponíveis sejam melhorados e adaptados às características individuais de cada paciente.

O modelo de exposição de roedores ao seu predador ou ao odor do predador é bastante utilizado para estudar o TEPT, já que, similarmente aos humanos, provoca hiperativação do eixo HPA e da liberação simpática, comportamento do tipo ansioso aumentado, reatividade exagerada e aumento do comportamento de medo (BELZUNG et al., 2001; BLANCHARD et al., 1990; WHITAKER; GILPIN; EDWARDS, 2014; ZANGROSSI; FILE, 1992). Ratos expostos a gatos por uma única vez exibiram comportamento do tipo ansioso elevado, como avaliado por meio dos testes Labirinto em Cruz Elevado, Caixa-Claro Escuro e Sobressalto Acústico, e que durou pelo menos 21 dias após a exposição ao predador (ADAMEC; SHALLOW, 1992).

Ainda mais, a exposição ao gato aumenta a expressão de pCREB, um marcador de atividade neuronal, na amígdala, especialmente na ABL. Os autores consideraram que essa ativação da ABL medeia os efeitos ansiogênicos duradouros após o estresse (ADAMEC; BLUNDELL; BURTON, 2005a), porém a exposição apenas ao odor do predador não gera essa ativação (ADAMEC; BLUNDELL; BURTON, 2005a; DIELENBERG et al., 2001). Por fim, estudos utilizando esse modelo mostram que ratos expostos ao odor do predador apresentam comportamento evasivo e consumo de etanol elevado em comparação aos animais controle em conjunto com alterações na função da amígdala (EDWARDS et al, 2013).

1. 3 Enriquecimento Ambiental

O ambiente em que um indivíduo se desenvolve e permanece durante a sua vida é fundamental para a expressão de um comportamento, já que os estímulos que recebe durante esse tempo são essenciais para refinar detalhes da estrutura cerebral (FOX; MERALI; HARRISON, 2006). No final da década de 1940, Hebb levou ratos para sua casa para cuidar como animais de estimação. Ele então percebeu que esses roedores aprendiam mais rapidamente que animais que permaneciam no laboratório (HEBB, 1947). Surgiram então vários experimentos que introduziram o modelo de enriquecimento ambiental (EA). O EA consiste em uma série de alterações nas caixas de alojamento dos animais de laboratório, que são geralmente maiores e contém uma variedade de objetos

como rodas de exercícios, túneis, rampas, brinquedos e alimentos, os quais são mudados de lugar com frequência (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000). Essas alterações ambientais têm efeitos benéficos, conferindo proteção a situações de estresse e eliciam respostas no encéfalo adulto que variam de alterações nos níveis de neurotransmissores e na distribuição de seus receptores a mudanças estruturais como aumento da arborização dendrítica, gliogênese e neurogênese (HENDRIKSEN et al., 2010; KOE; ASHOKAN; MITRA, 2016; VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000). Dessa forma, o ambiente mais complexo fornece um conjunto de estímulos sensoriais, cognitivos e motores que são capazes de induzir alterações morfológicas, neuroquímicas, fisiológicas e comportamentais (FOX; MERALI; HARRISON, 2006; NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; OKUDA et al., 2009).

Há evidências de que o EA atue sobre a proliferação celular na amígdala em roedores adolescentes e adultos (OKUDA et al., 2009; URAKAWA et al., 2013). Além disso, o EA reduz o número de ramificações e espinhas dendríticas que se projetam da ABL para outros centros encefálicos (ASHOKAN; HEGDE; MITRA, 2016). Ainda mais, o EA reduz os níveis de mRNA do receptor CRF1 em camundongos C57BL/6 (SZTAINBERG et al., 2010). Todos esses fatores sugerem redução da atividade da ABL. A excitação das projeções da ABL para o núcleo do leito da estria terminal e para o CPF está associada ao comportamento do tipo ansioso (CALHOON; TYE, 2015; JANAK; TYE, 2015). A atividade diminuída da ABL, portanto, reduziria esse comportamento.

Adicionalmente, o EA pode atuar reduzindo os efeitos reforçadores das drogas de abuso (BARDO et al., 2001; SOLINAS et al., 2008; STAIRS; BARDO, 2009). Defende-se que o EA seja capaz tanto de prevenir o início do consumo de drogas quanto ser um adjuvante no tratamento de indivíduos já dependentes, diminuindo a chance de recaída (SOLINAS et al., 2010).

Por um lado, os efeitos preventivos do EA contra a dependência de drogas já foram bastante descritos na literatura. Roedores expostos ao EA antes de qualquer contato com drogas tem vulnerabilidade à adicção reduzida (BARDO et al., 2001; SOLINAS et al., 2010), especialmente quando essa exposição se dá em períodos críticos de desenvolvimento encefálico, como na adolescência. Camundongos que foram colocados

em gaiolas enriquecidas durante a adolescência, apresentaram sensibilização comportamental reduzida à cocaína em comparação aos animais em gaiolas padrão (SOLINAS et al, 2009)

Por outro lado, os efeitos terapêuticos do EA ainda são bastante discutidos (MA et al., 2016; SOLINAS et al., 2010), apesar de diversos estudos mostrarem que alojar animais em ambiente enriquecido após histórico de uso de drogas diminua a probabilidade de busca e recaída. Camundongos expostos ao EA durante a abstinência à cocaína apresentam comportamentos de busca e de recaída à droga reduzidos utilizando o protocolo de Preferência Condicionada por Lugar (CPP), utilizado para avaliar os efeitos recompensadores da droga (SOLINAS et al., 2008). Adicionalmente, o EA reduz a autoadministração de cocaína induzida por pistas ou por estresse em camundongos abstinentes com histórico de consumo de 6 horas diárias (CHAUVET et al., 2009). Além disso, verificou-se que ratos que respondiam de forma operante a doses orais de etanol consumiam menos quando estavam em ambiente enriquecido do que quando alojados nas caixas-padrão (DEEHAN; CAIN; KIEFER, 2007).

Em nosso laboratório, demonstramos que o EA preveniu a sensibilização locomotora (RUEDA et al. 2012) induzida pelo etanol em camundongo. Adicionalmente, a ingestão de etanol foi atenuada em camundongos enriquecidos submetidos ao estresse de contenção (MARIANNO; ABRAHAO; CAMARINI, 2017). Visto que o EA previne o surgimento de comportamento do tipo ansioso após estresse de contenção (NOVAES et al., 2017), acredita-se que o EA possa reduzir o consumo de etanol por meio da atenuação dos estados emocionais negativos que induzem o consumo exagerado.

1. 4 Sociabilidade e Oxitocina

Ao longo da evolução dos vertebrados, as relações sociais se desenvolveram de forma cada vez mais complexa e intensa, contribuindo para a expansão do volume encefálico, desenvolvimento de habilidades cognitivas, emocionalidade e linguagem (DONALDSON; YOUNG, 2008; NEUMANN, 2009). A presença, qualidade e natureza das experiências sociais ao longo da vida são fatores que contribuem para o bem-estar físico

e emocional dos indivíduos. Experiências sociais negativas aumentam a susceptibilidade ao estresse psicossocial. Como consequência, a probabilidade de desenvolver doenças tais como os transtornos de ansiedade, transtornos depressivos e a dependência de drogas aumenta (TOPS et al., 2014; YOUNG et al., 2011). Então, há necessidade de se entender detalhadamente como as interações sociais são reguladas em nível fisiológico, a fim de promover melhora na qualidade de vida da população em geral (NEUMANN, 2009).

Os mecanismos fisiológicos e neuroquímicos que explicam o comportamento e a cognição social ainda não estão bem elucidados. Porém, sabe-se que envolve um conjunto específico de circuitos neurais mediados por diferentes neurotransmissores. Entre eles, neuropeptídeos como a oxitocina (OT) e a arginina-vasopressina (AVP) tem papel importante sobre esses comportamentos. Eles agem como neurotransmissores quando liberados em sinapses ou como neuro-hormônios quando atuam em locais distantes de onde foram liberados inicialmente (DONALDSON; YOUNG, 2008).

A OT foi inicialmente descoberta como um hormônio que medeia as contrações uterinas durante o parto e também a ejeção de leite. Seu nome vem do grego e significa “nascimento rápido” (GIMPL; FAHRENHOLZ; GENE, 2001). Após a descoberta de altos níveis de OT em núcleos hipotalâmicos e também de receptores de oxitocina em várias regiões encefálicas, a OT passou a ser considerada um fator de modulação neural (BUIJS et al., 1978; BUIJS; SWAAB, 1979; NEUMANN, 2008; VIERO et al., 2010). A OT é produzida nos neurônios magnocelulares do PVN e dos núcleos supraópticos (SON) do hipotálamo, os quais se interconectam dentro do próprio PVN e também se projetam para outras regiões encefálicas, como o sistema límbico e o tronco encefálico (CARTER, 2014; VIERO et al., 2010). Os OTRs são receptores acoplados a proteína G (GPCRs), ligados a uma proteína do subtipo Gq. Quando ativados induzem o aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular, de forma que a ativação de OTRs age sobre a excitabilidade celular, modulação dos padrões de disparo neuronal e sobre vias de transcrição (GIMPL; FAHRENHOLZ; GENE, 2001).

A OT atua no sistema nervoso central sobre os comportamentos sociais, como interação social entre pessoas, comportamento sexual e comportamento parental (BASKERVILLE; DOUGLAS, 2010; CARTER, 2014; TOPS et al., 2014). Ainda mais, a

OT também é capaz de modular a reação ao estresse, ao comportamento ansioso e à agressividade (BASKERVILLE; DOUGLAS, 2010; NEUMANN; SLATTERY, 2016). De fato, vários trabalhos mostram a atividade da OT sobre a redução e o tamponamento de comportamentos de medo e de ansiedade e sobre o aumento da confiança entre os indivíduos (BOWEN et al., 2011; DODHIA et al., 2014; EBNER et al., 2005; HEINRICHS et al., 2003; MEYER-LINDENBERG et al., 2011; WINDLE et al., 1997).

A OT é co-liberada com o CRF e age no próprio PVN, inibindo a liberação do CRF e reduzindo os níveis de corticosteroides plasmáticos. Assim, reduz a resposta do eixo HPA ao estresse (BASKERVILLE; DOUGLAS, 2010; LABUSCHAGNE et al., 2010; NEUMANN et al., 2000b; SARNYAI; KOVÁCS, 2014; VIERO et al., 2010; WINDLE et al., 2004). A ativação de OTRs presentes nos interneurônios GABAérgicos tanto da amígdala central quanto da amígdala basolateral exerce inibição tônica de neurônios glutamatérgicos, portanto gera um efeito de redução de comportamentos de medo e de ansiedade (EHRLICH et al., 2009; HUBER; VEINANTE; STOOP, 2005; JANAK; TYE, 2015; KNOBLOCH et al., 2012).

A OT *per se* tem efeito recompensador e, conjuntamente à liberação de dopamina, parece aumentar as propriedades motivacionais a estímulos sociais (MCGREGOR; BOWEN, 2012; MCGREGOR; CALLAGHAN; HUNT, 2008). A OT pode reduzir o consumo de drogas por modular projeções dopaminérgicas da ATV ao NAc e também os circuitos amigdalares envolvidos na fisiopatologia da dependência (KOVÁCS; SARNYAI; SZABÓ, 1998). Dessa forma, a OT pode regular a atribuição de saliência a diferentes tipos de estímulos (BASSAREO; LUCA; CHIARA, 2002; SALAMONE et al., 2015). Ainda mais, acredita-se que a OT aja sobre a hiperativação dos núcleos da amígdala mediada por estímulos aversivos, reduzindo o comportamento ansioso e de medo (HUBER; VEINANTE; STOOP, 2005; KNOBLOCH et al., 2012).

1. 5 Hipóteses

De acordo com as informações acima, tanto o enriquecimento quanto a sinalização oxitocinérgica têm propriedades ansiolíticas. Visto que o estado emocional negativo é um

fator importante para a manutenção da dependência e indução de recaída em indivíduos com histórico de consumo de drogas de abuso, é possível que estas abordagens tenham efeito protetor sobre a adicção, podendo futuramente serem utilizadas de forma terapêutica.

Um dos principais componentes do EA é a estimulação das interações sociais entre os indivíduos que convivem em um mesmo alojamento. Dado que a oxitocina é um dos principais moduladores do comportamento social, pode ser que os efeitos ansiolíticos do EA sejam decorrentes de alterações na atividade oxitocinérgica.

Dessa forma, postulamos que camundongos mantidos em ambiente enriquecido ou tratados de forma crônica com Carbetocina (CBT), agonista seletivo de OTR, pelo mesmo período de tempo apresentem redução no consumo de etanol. Adicionalmente, a recaída induzida pelo estresse deve estar diminuída em animais submetidos a estes protocolos.

Para avaliar os efeitos crônicos da administração da CBT bem como as influências do ciclo circadiano sobre o tratamento, decidimos testar dois horários diferentes para administração da CBT: no início da fase escura, após 2h das luzes se apagarem e ao término da fase escura, 2h antes das luzes se acenderem.

2 OBJETIVOS

2. 1 Objetivos Gerais

Avaliar o papel do ambiente por meio do enriquecimento ambiental e das relações sociais por modulação oxitocinérgica sobre o consumo de etanol antes e depois de um estresse agudo de exposição ao predador.

2. 2 Objetivos específicos

- Avaliar por meio do modelo de livre escolha entre duas garrafas (*Two-bottle choice*) se o tratamento agudo com CBT pode reduzir a ingestão de etanol em camundongos C57BL/6, construindo uma curva dose-resposta.
- Investigar por meio do modelo de livre escolha entre duas garrafas (*Two-bottle choice*) se o EA ou o tratamento crônico com CBT são capazes de modular a ingestão de etanol em camundongos C57BL/6 após períodos de abstinência, mesmo após esses animais serem submetidos a um modelo de estresse por exposição ao predador e após períodos de abstinência.
- Avaliar o comportamento de avaliação de risco e de medo dos camundongos C57BL/6 submetidos ao EA e dos camundongos tratados cronicamente com CBT por meio do teste de exposição ao predador
- Analisar parâmetros associados à ansiedade de camundongos C57BL/6 submetidos ao EA e de camundongos tratados cronicamente com CBT no teste de labirinto em cruz elevado e no teste da caixa claro-escuro após uma semana do estresse por exposição ao predador.

3 MATERIAIS E MÉTODO

3. 1 Animais

Foram utilizados 95 camundongos machos C57BL/6 adultos com idades entre 65 e 75 dias provenientes do Biotério de Camundongos do Departamento de Farmacologia do ICB-USP. Os animais foram alojados em grupos de 5 animais em gaiolas de policarbonato (27,5 cm de comprimento x 16,5 cm de largura x 13 cm de altura), com alimento e água *ad libitum* em condições controladas de temperatura (21 ± 2 °C) e luminosidade em ciclo invertido (ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo as luzes apagadas às 9 h). Antes de iniciar o experimento, os camundongos permaneceram no biotério por 15 dias para habituação. Luzes vermelhas foram utilizadas para manipular os animais durante a fase escura. Os animais foram pesados duas vezes por semana para determinação da quantidade de etanol ingerido em g/kg. Todos os procedimentos de manipulação e experimentação foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo (Protocolo Nº: 25/2016).

3. 2 Consumo oral de etanol por livre escolha entre duas garrafas ("Two-bottle choice")

O protocolo de consumo voluntário de etanol deste experimento já está estabelecido em nosso laboratório (MARIANNO; ABRAHAO; CAMARINI, 2017). Ele é baseado no paradigma "*Drinking in the Dark*" (DID), em que a exposição dos animais ao etanol se dá durante a fase ativa dos camundongos, ou seja, na fase escura do ciclo circadiano (CRABBE; PHILLIPS; BELKNAP, 2010).

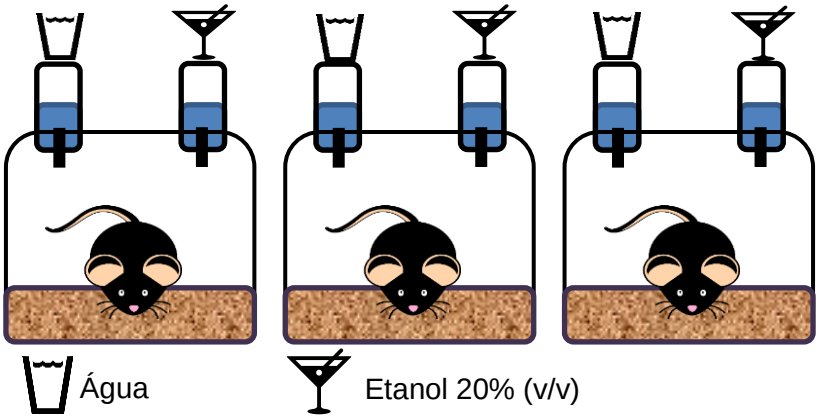
Durante o período de consumo, os animais foram isolados e expostos a duas garrafas de 30 ml, uma contendo etanol a 20% (v/v) [água de torneira, a partir de etanol 95% (Labsynth®, Diadema, SP, Brasil)] e a outra água da torneira, 3 horas após as luzes se apagarem (Figura 1). As soluções foram trocadas diariamente para evitar possíveis

contaminações, bem como as garrafas foram alternadas a cada dia para evitar viés de localização. Após 2 horas de consumo, os animais foram alojados novamente em grupo, apenas com garrafas de água. Tanto as garrafas de água quanto as garrafas de etanol foram pesadas antes e depois da sessão para determinação do consumo de etanol em g/kg de animal.

A cada sessão de consumo, havia uma gaiola com duas garrafas controle, uma com água e outra com a solução de etanol para estimar a evaporação de líquido. Ainda mais, os bicos das garrafas dispunham de um mecanismo com duas esferas para evitar vazamentos.

A linhagem de camundongos C57BL/6 geralmente é a de escolha para avaliar a autoadministração não operante de etanol, visto que são predispostos a consumir maiores volumes (RHODES et al., 2005; CRABBE; PHILLIPS; BELKNAP, 2010). Neste modelo, a disponibilidade de uma garrafa com água e outra com álcool possibilita o aumento do consumo voluntário, de forma a atingir níveis elevados de etanol no plasma, sem que a privação de água seja a motivação para a ingestão de álcool (KHISTI et al., 2006). Em nosso laboratório, demonstramos que a alteração no volume das garrafas correlaciona-se com os níveis plasmáticos de etanol (MARIANNO; ABRAHAO; CAMARINI, 2017).

Figura 1. Modelo de autoadministração por livre escolha (*Two-bottle choice*).



Fonte: Modificado de www.clker.com (2018)

O consumo de etanol em gramas por quilograma de peso corporal do animal foi calculado utilizando a fórmula abaixo. O coeficiente 0,16 é baseado na densidade e na concentração da solução de etanol.

$$C_{EtOH} = (V_{EtOH} \times 0{,}16) / p \times 1000 \qquad (1)$$

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

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

p = peso do animal (g)

3. 3 Enriquecimento Ambiental

Os grupos “controle” ou não enriquecidos (NE) foram alojados em gaiolas de policarbonato (27,5 cm de comprimento x 16,5 cm de largura x 13 cm de altura) forradas com maravalha, com comida e água *ad libitum*. Os animais enriquecidos foram alojados em gaiolas de policarbonato transparente maiores que as caixas padrão (42 cm comprimento x 28 cm de largura x 21,5 cm de altura) também forradas com maravalha e livre acesso à água e comida. Tanto no alojamento padrão quanto nas gaiolas enriquecidas foram colocados 5 animais por caixa.

A caixa enriquecida possui objetos adicionais que não estão presentes nas gaiolas não enriquecidas. São tubos de plástico, rampas, casas e rodas de exercício para exercício voluntário, os quais são substituídos três vezes por semana para manter a estimulação contínua de novidades no ambiente (Figura 2).

Figura 2. Comparação entre a caixa-padrão e a caixa enriquecida.

Fonte: Autora

3. 4 Tratamento com carbetocina

A carbetocina é um análogo da oxitocina e atua sobre OTRs no SNC por atravessar a barreira hematoencefálica. Foi realizada uma curva dose-resposta com as doses 1 mg/kg; 3 mg/kg; 6,4 mg/kg e 12 mg/kg i.p. para verificar se a dose aguda é capaz de reduzir o consumo de etanol. A CBT foi administrada 1h antes da exposição dos animais ao etanol.

De acordo com nosso experimento dose-resposta e com a literatura vigente, utilizamos a dose 6,4 mg/kg i.p. no experimento com tratamento crônico de CBT (CHAVIARAS et al., 2010; GEORGIOU et al., 2015; ZANOS et al., 2014). Nele, os animais foram separados em grupos que receberam o tratamento em horários distintos. O grupo CBT1h recebia a CBT diariamente às 11h, que, nos dias de reexposição, ocorria 1h antes da sessão de consumo. O grupo CBT16h recebia a CBT diariamente às 20h, com 16h de antecedência aos episódios de reexposição ao álcool.

3. 5 Teste de exposição ao predador

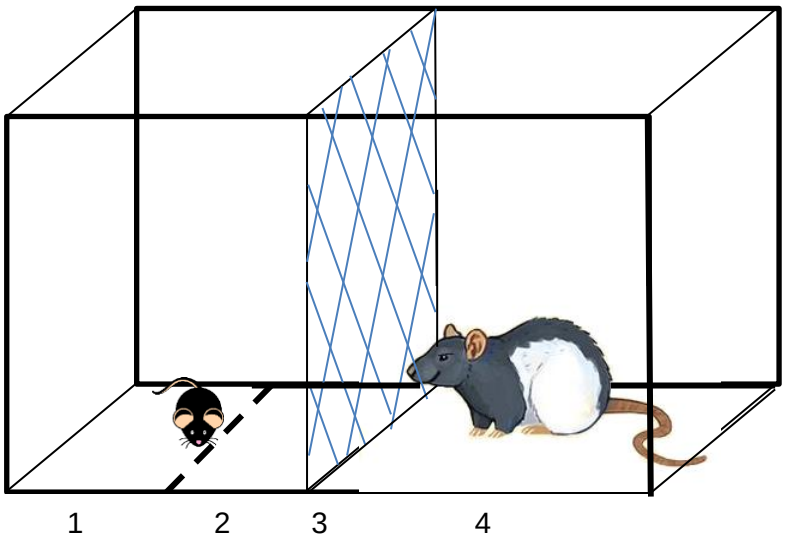
O estresse por exposição ao predador foi baseado em protocolos existentes na literatura (MARTINEZ et al., 2008). O aparato consiste em uma câmara subdividida em dois compartimentos por uma rede, a qual possibilita a passagem do camundongo para o outro lado, mas não a passagem do rato (Figura 3). Os animais foram habituados ao aparato durante três minutos nos três dias que antecederam o teste. Apesar do teste ser realizado na fase escura do ciclo circadiano dos camundongos, o teste foi realizado no claro, com as luzes acesas.

No dia do teste, cada camundongo foi colocado no aparato e, após um minuto, um rato da linhagem *Long Evans* foi colocado no segundo compartimento por dez minutos. O teste foi gravado para avaliação de parâmetros espaço-temporais, como a proximidade ao predador e parâmetros comportamentais como avaliação de risco, incluindo *stretch*, *freezing*, *grooming*, número de defecações e número de saltos. Após o estresse, o camundongo permaneceu na presença do odor do rato por mais cinco minutos.

No experimento com os animais EA, o estresse foi realizado 3h antes da reexposição ao etanol. Ressalta-se ainda que os camundongos controle, que não passaram pelo estresse, também foram colocados no aparato seguindo o mesmo protocolo, porém utilizando um rato de brinquedo no lugar do rato verdadeiro.

Nos experimentos com administração crônica de CBT, a injeção ocorreu após 90 minutos do início da fase escura do ciclo. Após 40 minutos, os animais foram expostos ao predador e em seguida foram submetidos ao protocolo de consumo de etanol por livre escolha. Este procedimento foi adotado com o grupo CBT1h. Já o grupo CBT16h foi tratado na noite anterior à exposição ao rato, ou seja, 15 horas antes do teste.

Figura 3. Aparato utilizado no teste de exposição ao predador.



1. Área mais distante do rato; 2. Área mais próxima ao rato; 3. Rede entre compartimentos; 4. Compartimento do rato.
Fonte: Modificado de www.clker.com (2018) e www.marmotdoodles.tumblr.com (2018)

3. 6 Teste de labirinto em cruz elevado

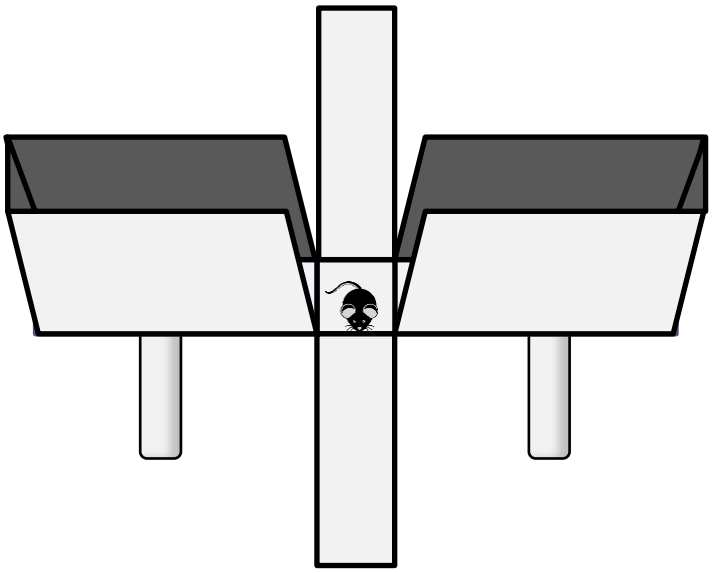
O labirinto em cruz elevado (LCE) consiste em um aparato contendo quatro braços, dois abertos (33,5 cm de comprimento x 7 cm de largura), margeados por um anteparo de 0,5 cm de altura para evitar a queda dos animais, e dois fechados (33,5 cm de comprimento x 7 cm de largura, com paredes de 20 cm de altura). A plataforma central mede 13,5 cm x 10 cm, onde os braços estão dispostos em forma de cruz. Os braços abertos ficam dispostos em lados opostos, assim como os braços fechados. Essa estrutura está elevada do solo em 50 cm (Figura 4).

O teste é utilizado para a avaliação do comportamento ansioso em roedores e se baseia no comportamento de roedores em permanecer em ambientes fechados e escuros quando tratados com agentes ansiogênicos (LISTER, 1987; PELLOW et al., 1985).

O teste aconteceu em uma sala com iluminação adequada e é gravado para registro do comportamento. O animal é colocado no centro, voltado anteriormente para o braço fechado. O teste dura 5 minutos e o aparato foi higienizado com álcool 5% após cada animal.

A avaliação do teste incluiu parâmetros espaciais e temporais como o tempo em que o animal permaneceu nos braços abertos e nos braços fechados em relação ao tempo total de teste, a frequência de entrada nos braços abertos e fechados e parâmetros comportamentais como a frequência dos comportamentos de "*stretched attend posture* (SAP)" e de "*head-dip* (HD)", os quais testam o comportamento de avaliação de risco dos animais. Considerou-se que os animais entraram em um braço quando as quatro patas estavam dentro dessa área. O SAP é avaliado como o comportamento de se esticar da plataforma central em direção ao braço aberto, mas sem retirar as patas traseiras do lugar e depois retornar à posição de início e o HD é o comportamento de se esticar em direção ao chão quando nas bordas dos braços abertos.

Figura 4. Aparato utilizado para o teste de Labirinto em Cruz Elevado.



Fonte: Modificado de www.clker.com (2018)

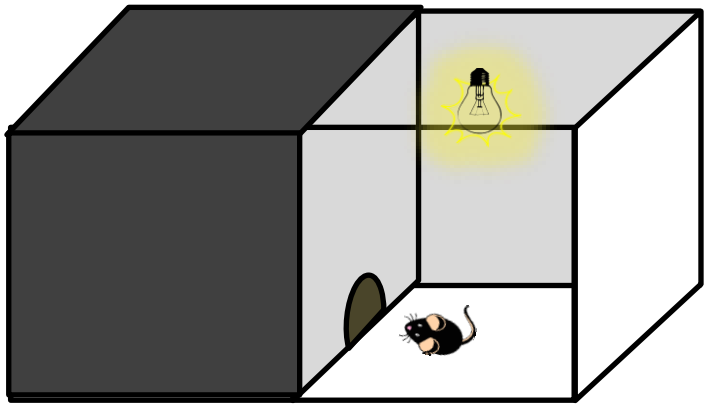
3. 7 Teste de caixa claro-escuro

O aparato consiste em uma caixa de acrílico dividida em dois compartimentos. Um dos compartimentos, o qual tem 35 cm x 21 cm, é revestido por acrílico preto e permanece no escuro. O outro compartimento tem 45 cm x 21 cm e é revestido de chapas de acrílico branco. Ele permanece iluminado com intensidade de luz a 400 lux. Na parede entre os dois compartimentos, há uma abertura de 3 cm x 3 cm que permite a passagem do animal (Figura 5).

O teste é utilizado para avaliação do comportamento do tipo ansioso em roedores e se baseia no conflito que esses animais têm entre explorar ambientes desconhecidos e na aversão natural a áreas iluminadas. Animais considerados ansiosos evitam permanecer na área iluminada. Fármacos ansiolíticos aumentam a exploração de ambos os compartimentos e a permanência desses animais no compartimento claro (BOURIN; HASCOE, 2003).

O teste teve a duração de 10 minutos e foi gravado para registro do comportamento do animal. O camundongo foi colocado no compartimento claro voltado anteriormente para a abertura para o lado escuro. Foram avaliados o tempo de permanência em cada um dos lados e o número de transições entre os dois compartimentos.

Figura 5. Aparato utilizado para o teste da Caixa Claro-Escuro



Fonte: Modificado de www.clker.com (2018)

3. 8 Delineamento experimental

3. 8. 1 Experimento 1: Enriquecimento ambiental

Para verificar os efeitos do enriquecimento ambiental sobre o consumo de etanol antes e depois de uma situação de estresse agudo, foi proposto o delineamento experimental que está resumido na figura 6.

Antes de iniciar qualquer manipulação animal, 32 camundongos C57BL/6 foram aclimatados por 15 dias em biotério com ciclo invertido 12:12 com as luzes apagando às 9h da manhã. Em seguida, antes de serem separados em grupos, os animais passaram pela fase de aquisição, na qual foram submetidos ao procedimento de consumo voluntário por livre escolha entre duas garrafas "*Drinking in the Dark*" por 5 dias consecutivos intercalados por 2 dias de abstinência. Esse ciclo se repetiu por três vezes, totalizando 3 semanas de aquisição.

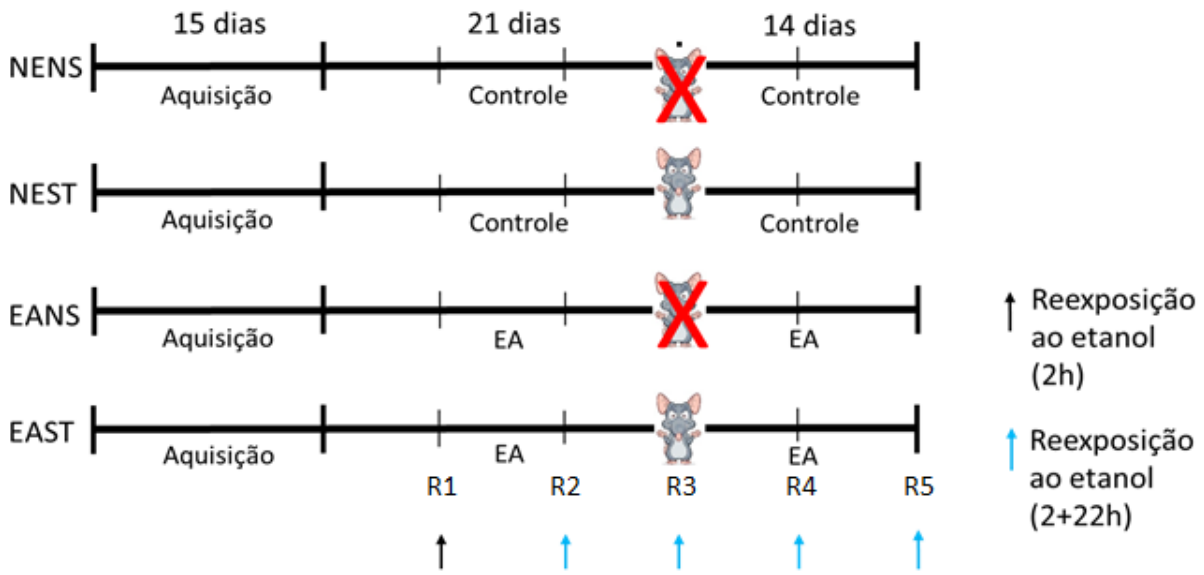
Os animais foram então privados de etanol e divididos em caixas-padrão (NE, n=16) e caixas enriquecidas (EA, n=16). Os animais permaneceram nessas condições de alojamento até o término do experimento. A cada sete dias, os camundongos foram reexpostos ao etanol em sessões de 2h na primeira semana e sessões de 2 e 24h nas semanas seguintes. Após 21 dias de EA, os animais foram submetidos ao teste de exposição ao predador, resultando nos seguintes grupos:

1. NENS (n = 8). Animais em caixas padrão que não passaram pelo teste de exposição ao predador.
2. NEST (n = 8). Animais alojados em caixas padrão que passaram pelo teste de exposição ao predador.
3. EANS (n = 8). Animais em caixas enriquecidas que não passaram pelo teste de exposição ao predador
4. EAST (n = 8). Animais em caixas enriquecidas quee passaram pelo teste de exposição ao predador.

Imediatamente após ao estresse, os animais foram reexpostos novamente ao etanol em sessões de 2 e 24 horas.

Os animais permaneceram privados de etanol por mais sete dias. Em seguida os animais foram submetidos à avaliação no labirinto em cruz elevado e novamente reexpostos ao etanol em novas sessões de 2 e 24 horas. Os animais retornaram então às suas caixas, privados de etanol, e, após sete dias, foram avaliados no teste da caixa claro-escuro. Em seguida foram reexpostos ao etanol para as últimas sessões de 2 e 24 horas e eutanasiados em seguida.

Figura 6. Delineamento do experimento 1



Fonte: Modificado de www.shutterstok.com (2018)

3. 8. 2 Experimento 2: Tratamento agudo com carbetocina

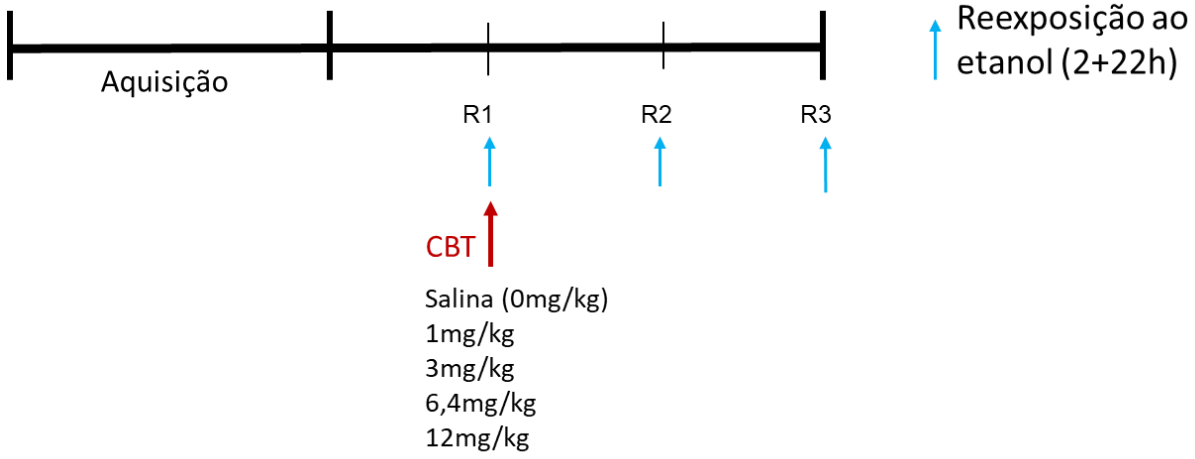
Para avaliar os efeitos agudos da carbetocina sobre o consumo de etanol em camundongos, foi desenvolvido o delineamento da Figura 7.

Antes de iniciar os experimentos, 35 camundongos C57BL/6 foram aclimatados por 15 dias em biotério com ciclo invertido. Em seguida, os animais passaram pela fase de aquisição pelo procedimento DID. Após a aquisição, os animais foram privados de

etanol por seis dias. No sétimo dia, os animais foram tratados com salina (0) ou CBT (1 mg/kg; 3 mg/kg; 6,4 mg/kg; 12 mg/kg; n=7). Imediatamente após o teste, os animais foram reexpostos ao etanol em sessões de 2 e 24 horas.

Em seguida, os animais foram privados de etanol por 14 dias, sendo reexpostos ao etanol a cada 7 dias, totalizando 3 reexposições totais. Ao término da última reexposição, os animais foram eutanasiados.

Figura 7. Delineamento do experimento 2.



Fonte: Autora.

3. 8. 3 Experimento 2: Tratamento crônico com carbetocina

O delineamento a seguir (Figura 8) foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os efeitos crônicos da carbetocina sobre o consumo de etanol em animais com histórico de exposição ao álcool (fase de aquisição) e seus possíveis efeitos protetores em uma situação de estresse agudo.

Da mesma forma que no experimento anterior, 30 camundongos C57BL/6 foram aclimatados por 15 dias em biotério com ciclo invertido antes de realizar qualquer manipulação. Em seguida, todos os animais passaram pela fase de aquisição pelo procedimento DID, como no experimento com o EA.

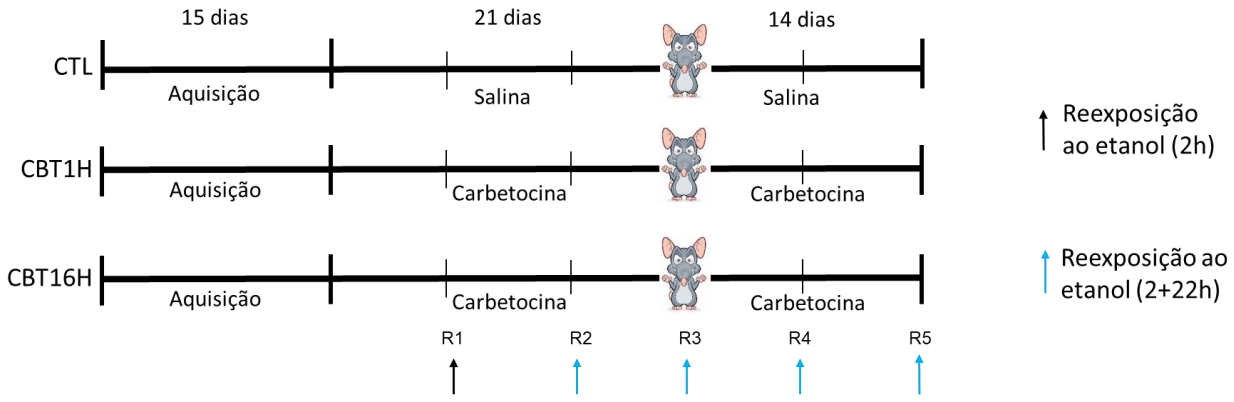
Após a aquisição, os animais foram privados de etanol e divididos nos seguintes grupos: 1) CTL (n = 10), em que os animais receberam salina por via i.p.; 2) CBT1h (n = 10), em que os animais receberam CBT (6,4 mg/kg) i. p. todos os dias, sendo que o tratamento ocorreu 1 hora antes das reexposições semanais ao etanol e 3) CBT16h, que os animais receberam CBT (6,4 mg/kg) i. p. todos os dias, sendo que o tratamento ocorreu 16 horas antes das reexposições semanais ao etanol. Os animais foram tratados até o término do experimento.

A cada sete dias, os animais eram reexpostos às garrafas de etanol em sessões com 2 horas de duração na primeira semana e sessões de 2 e 24 horas nas reexposições seguintes, totalizando 5 reexposições totais.

Após 21 dias de tratamento, os animais foram submetidos ao teste de exposição ao rato e imediatamente após o estresse, foram reexpostos ao etanol. Neste dia, o grupo CBT1h recebeu o tratamento 40 minutos antes do estresse para que, no momento da reexposição ao álcool, eles já tivessem recebido a droga com 1 h de antecedência.

Os animais permaneceram privados de álcool por mais 7 dias e passaram pelo teste de LCE, sendo reexpostos ao consumo de etanol em seguida em sessões de 2 e 24 horas. Novamente os animais passaram por 7 dias abstinentes e em seguida foram avaliados no teste de CCE, e reexpostos ao álcool logo após. Ao término destas últimas sessões de consumo de 2 e 24 horas, os animais foram eutanasiados.

Figura 8. Delineamento do experimento 3.



Fonte: Modificado de www.shutterstock.com (2018)

3. 9 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o software IBM SPSS Statistics 21.0. Inicialmente, foram realizados testes de aderência, o qual informa o melhor tipo de distribuição dos dados. Para os testes de medidas não repetidas, incluindo os de exposição ao predador, o LCE e a CCE, foi utilizada a ANOVA de uma via. Nos testes com medidas repetidas, como a avaliação de ingestão de etanol ao longo do experimento, foi aplicada a ANOVA de três vias no experimento 1, com diferenças de alojamento e estresse e ANOVA de duas vias no experimento 3 para analisar diferenças entre tratamento e tempo. A ANOVA de medidas repetidas também foi utilizada para o experimento 2. Em todos os casos foram aplicados *post hoc* de Bonferroni. No experimento 1, foi realizado teste T para verificar se há diferença entre os grupos NE e EA na primeira reexposição de 24 horas antes do estresse.

Para todos os testes, assume-se diferença estatística quando a significância for menor que 0,05 ($p<0,05$).

4 RESULTADOS

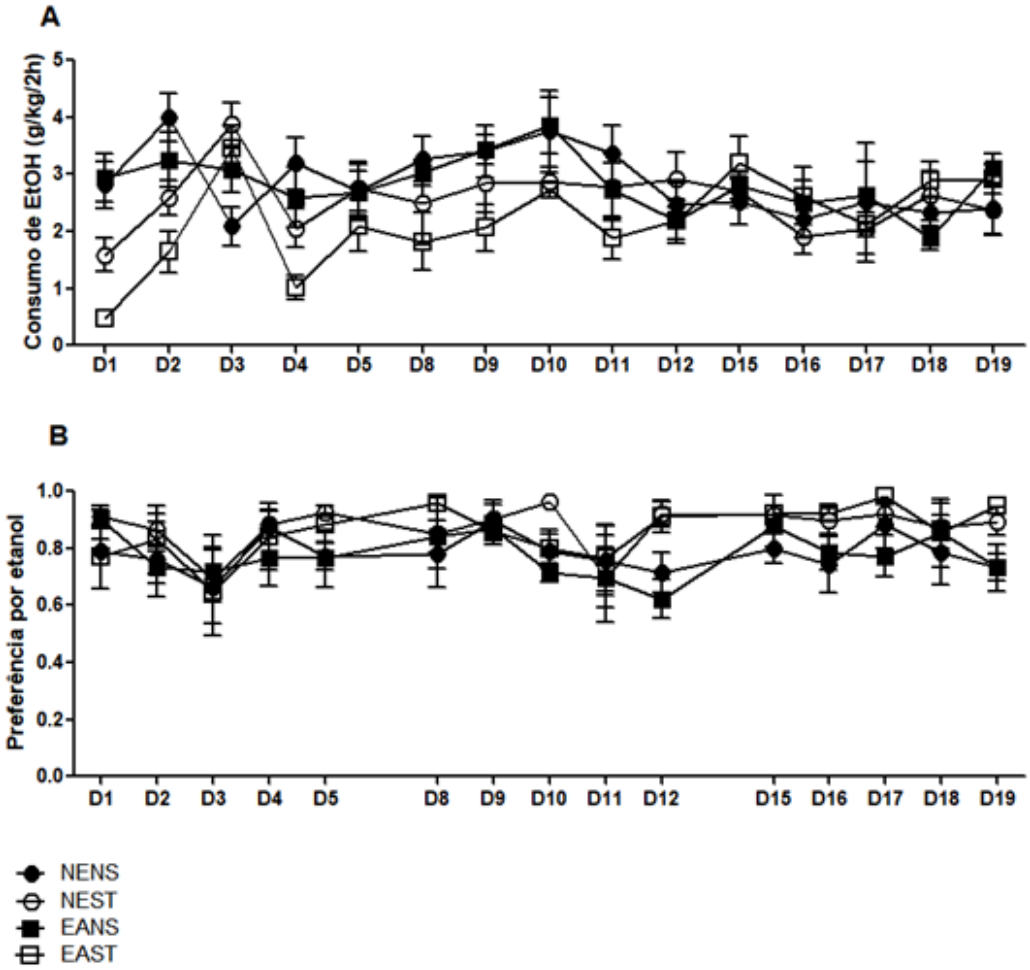
4. 1 Experimento 1: Enriquecimento Ambiental

4. 1. 1 Aquisição

A aquisição é necessária para estabilizar o consumo entre todos os animais e garantir que não há diferenças significativas entre eles para iniciar o experimento. Quando foi calculada ANOVA de medidas repetidas considerando o tempo total da aquisição, observou-se diferenças de tempo [$F_{(14,294)} = 3,61$; $p < 0,001$], indicando que os animais variaram o volume de etanol ingerido ao longo do tempo (Figura 9A). Entretanto, não houve diferença entre os animais que foram posteriormente separados entre os grupos do delineamento [$F_{(3,21)} = 1,697$; $p = 0,2$]. Considerando apenas os últimos 5 dias de aquisição, não houve diferença de consumo entre os grupos nesses dias [$F_{(4,96)} = 0,459$; $p = 0,766$] (Figura 9A), concluindo que a ingestão de etanol estava estabilizada entre todos os grupos de animais.

Ainda durante a aquisição, observou-se que a preferência dos indivíduos ao etanol foi a mesma por todo o período [$F_{(14, 378)} = 1,659$; $p = 0,06$], sem diferença significativa entre os grupos [$F_{(3, 20)} = 1,970$; $p = 0,15$]; indicando que o consumo de água também permaneceu semelhante ao longo de toda a aquisição (Figura 9B).

Figura 9. Consumo de etanol (A) e preferência (B) durante a fase de aquisição do experimento 1.



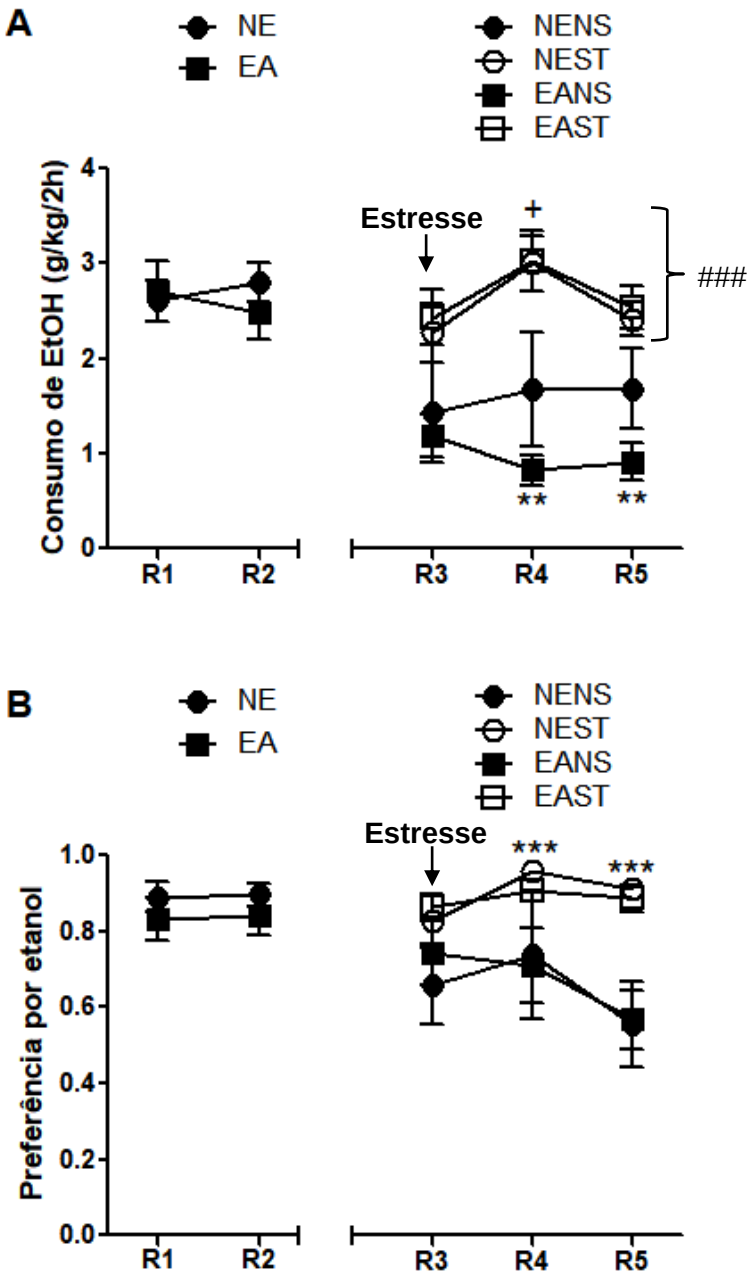
Fonte: Autora

4. 1. 2 Ingestão de etanol nas reexposições de 2 horas

Durante as reexposições, foi avaliada a ingestão de etanol durante as 2h iniciais. Não houve diferença significativa entre os grupos não enriquecidos e enriquecidos nas primeiras reexposições R1 e R2 que ocorreram antes dos animais serem expostos ao estresse [$F_{(1,30)} = 0,687$; $p = 0,41$]. Considerando as reexposições após o estresse, a ANOVA de três vias mostrou que os animais estressados e não estressados são diferentes ao longo do tempo, independentemente do tipo de alojamento [$F_{(1,22)} = 33,528$; $p < 0,001$]. Dentre os animais não estressados, não foram encontradas diferenças de ingestão de etanol ao longo do tempo [$F_{(2,9)} = 0,616$; $p = 0,56$] pela ANOVA de duas vias; no entanto, observou-se que os animais enriquecidos bebem menos que os animais alojados em caixas-padrão [$F_{(1,10)} = 11,05$; $p < 0,01$]. Entre os animais estressados, o consumo de etanol foi maior na semana seguinte à exposição ao predador [$F_{(2,10)} = 4,04$; $p < 0,05$] do que no dia do estresse, mas sem diferenças significativas entre os tipos de alojamento [$F_{(1,11)} = 0,002$; $p = 0,96$] (Figura 10A).

Em relação às preferências durante as 2h iniciais da sessão de consumo, a ANOVA de duas vias mostrou que não houve diferença entre os animais não enriquecidos e enriquecidos nas reexposições anteriores ao estresse [$F_{(1,28)} = 0,02$; $p = 0,88$]. Assim como observado em relação ao consumo de etanol, foi observado que animais estressados apresentam maior preferência ao álcool que animais não estressados na R4 [$F_{(1,25)} = 13,407$; $p < 0,001$] e R5 [$F_{(1,25)} = 31,787$; $p < 0,001$] pelo teste ANOVA de três vias. O grupo NENS não difere do grupo EANS em relação à preferência nas últimas três reexposições [$F_{(1,12)} = 0,39$; $p = 0,54$]. Da mesma forma, dentre os animais estressados, não houve diferenças significativas quanto ao tipo de alojamento [$F_{(1,13)} = 0,12$; $p = 0,73$) nem quanto ao tempo [$F_{(2,12)} = 3,50$; $p = 0,06$] (Figura 10B).

Figura 10. Consumo de etanol (A) e preferência (B) nas reexposições de 2h do experimento 1.



[### p<0,001 em relação a NE; ** p<0,01 em relação a NENS; *** p<0,001 em relação a NENS; + p<0,05 em relação a R3].

Fonte: Autora

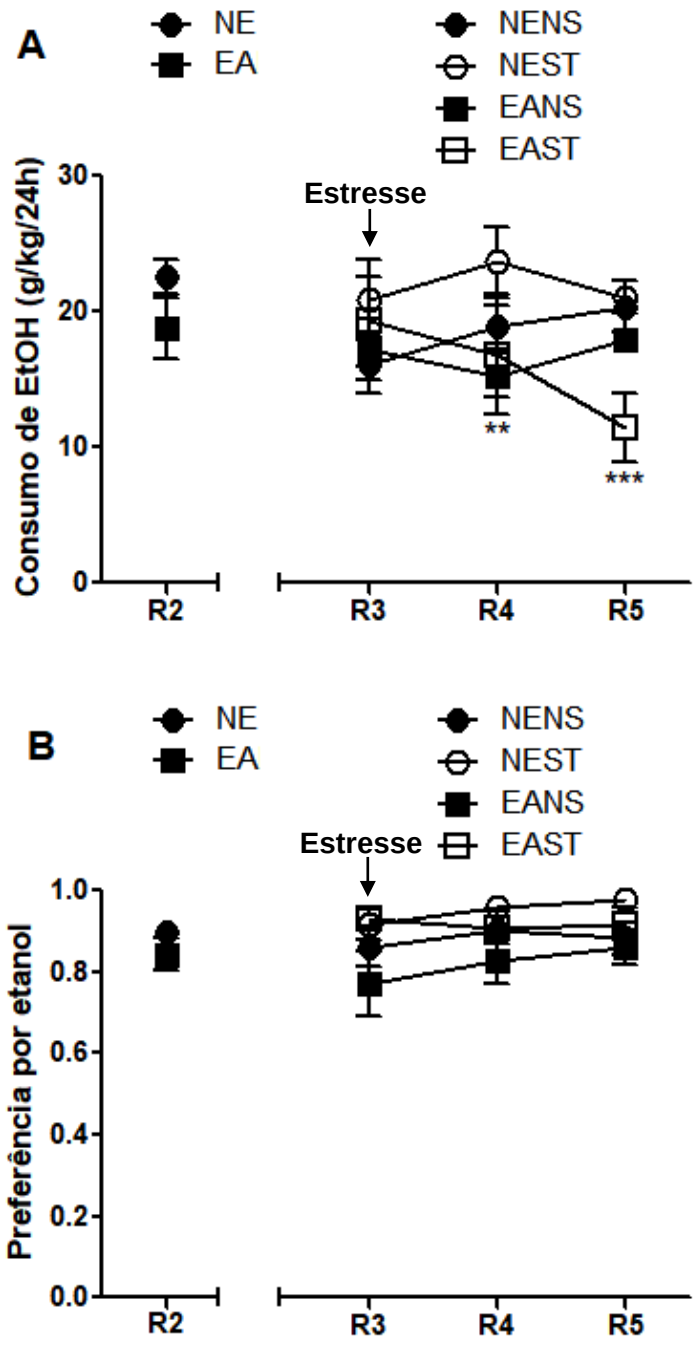
4. 1. 3 Ingestão de etanol nas reexposições de 24 horas

Houve quatro reexposições semanais ao álcool com duração total de 24h, as quais se iniciaram na semana anterior ao estresse. Na primeira sessão R2, não foi observada diferença significativa entre os animais NE e EA [$t = 1,469$; $p = 0,15$]. (Figura 11A)

Os animais alojados em gaiolas enriquecidas consumiram menos álcool, independentemente do estresse [$F_{(1,24)} = 5,98$; $p < 0,01$] e essa diferença se torna mais evidente com o tempo, sendo que em R5, os animais EA ingeriram menos etanol que NE [$F_{(1,24)} = 12,115$; $p < 0,01$]. O grupo EAST ingeriu menor volume de etanol que NEST após a exposição ao predador [$F_{(1,24)} = 7,921$; $p < 0,01$]. (Figura 11A)

Não há diferença significante entre as preferências dos animais NE e EA na semana anterior ao estresse. [$t = 1,60$; $p = 0,11$]. Ainda, de acordo com a ANOVA de três vias, não houve alterações entre as preferências em nenhuma das variáveis estudadas após a exposição ao predador. (Figura 11B)

Figura 11. Consumo de etanol (A) e preferência (B) nas reexposições de 24h do experimento 1.



[** p<0,01 em relação a NENS; *** p<0,001 em relação a NENS).

Fonte: Autora

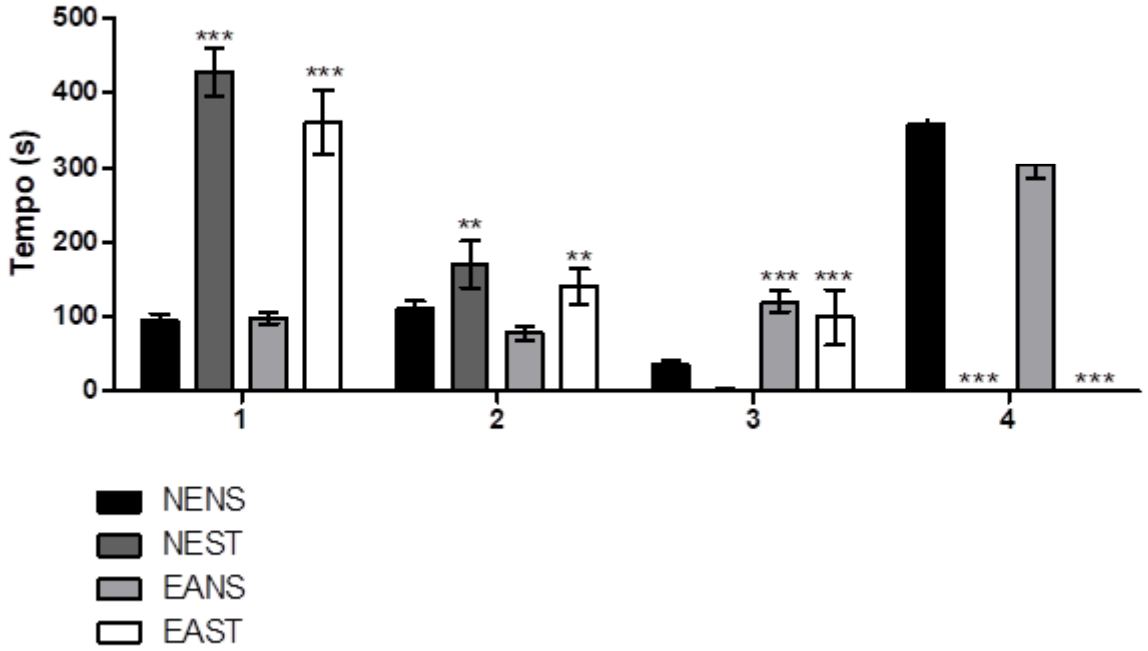
4. 1. 4 Teste de exposição ao predador

O teste de estresse por exposição ao predador foi eficaz para provocar comportamento do tipo medo nos camundongos, como observado pela análise dos parâmetros espaciais, temporais e comportamentais. Por um lado, os grupos estressados permaneceram por mais tempo no compartimento que o rato não tem acesso, tanto na área considerada mais distante [$F_{(3,26)} = 45,615$; $p < 0,001$], quanto na área mais próxima ao predador [$F_{(3,26)} = 4,091$; $p < 0,01$] (Figura 12). Por outro lado, os grupos não estressados cruzaram a rede que atua como barreira no aparato, permanecendo por mais tempo no compartimento dedicado ao rato [$F_{(3,26)} = 167,759$; $p < 0,001$] (Figura 12). Ressalta-se que os animais não estressados foram submetidos ao teste no aparato, porém utilizando um rato de brinquedo em vez do animal real.

É interessante observar que os grupos enriquecidos, sejam estressados ou não, gastaram mais tempo escalando a rede de separação que os animais mantidos nas caixas padrão [$F_{(3,26)} = 8,192$; $p < 0,001$] (Figura 12), o que sugere que o enriquecimento tem efeito sobre o comportamento exploratório desses animais.

Em relação aos parâmetros comportamentais, os animais estressados realizaram *stretching* mais frequentemente que os camundongos não estressados [$F_{(3,26)} = 25,004$; $p < 0,001$] (Figura 13A). Dentre os animais estressados, o grupo EAST exerce mais *stretching* que NEST ($p < 0,05$) (Figura 13A), indicando que o enriquecimento aumentou o comportamento de avaliação de risco. De forma similar, o estresse fez com que os animais NEST e EAST realizassem mais *freezing* que os grupos NENS e EANS [$F_{(3,26)} = 89,7$; $p < 0,001$] (Figura 13B), porém os animais enriquecidos fizeram menos *freezing* que os animais não enriquecidos ($p < 0,05$) (Figura 13B), indicando que o EA reduziu o comportamento de medo. Os animais NEST realizaram mais *grooming* que o grupo controle [($F_{(3,26)} = 6,487$; $p < 0,01$] (Figura 13C). Os animais EAST defecaram mais que os NENS [$F_{(3,26)} = 5,686$, $p < 0,01$] (Figura 13D). Não houve diferença significativa em relação ao número de saltos [$F_{(3,26)} = 2,839$; $p = 0,06$] (Figura 13E).

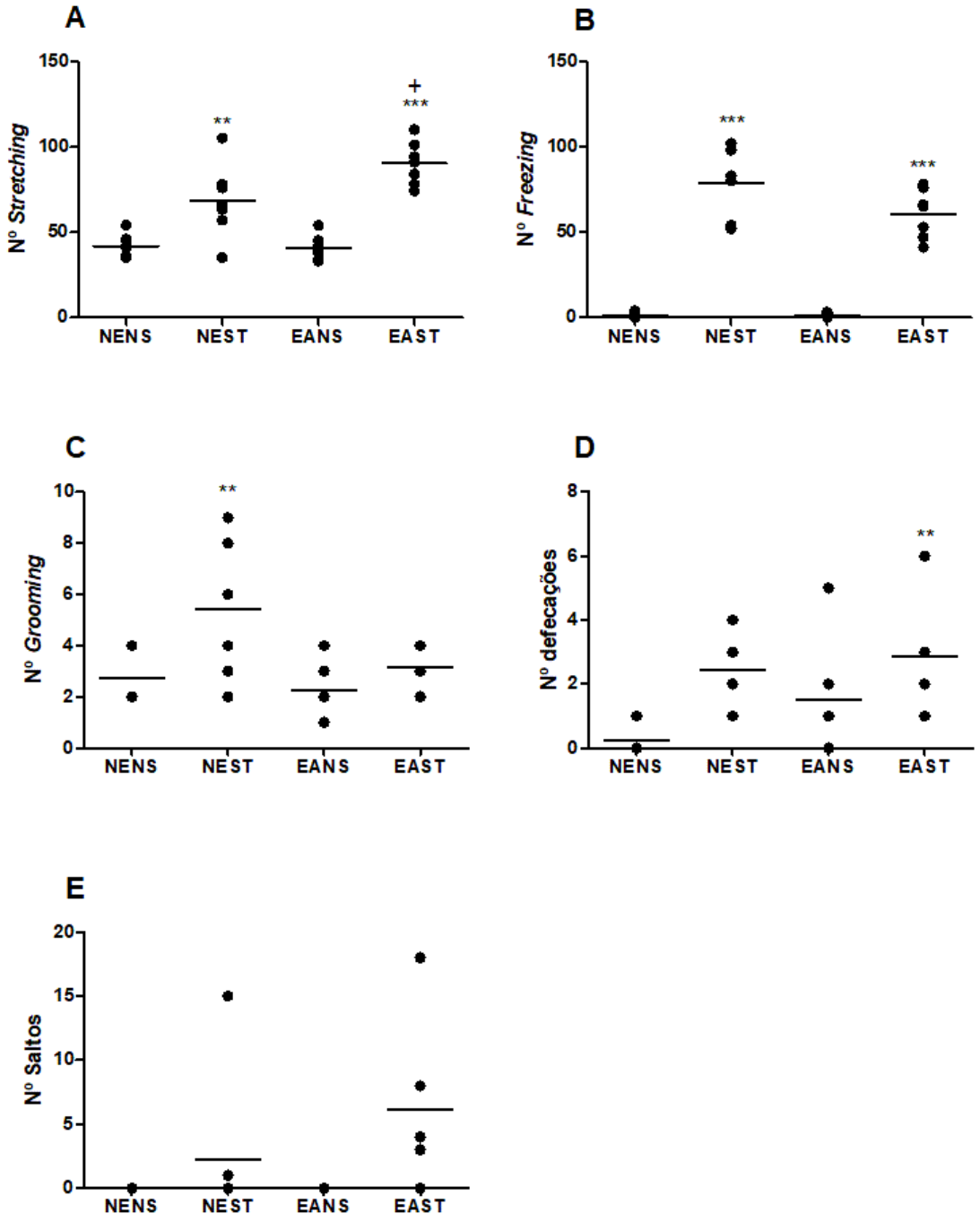
Figura 12. Parâmetros espaciais e temporais avaliados no teste de exposição ao rato.



1. Área mais distante do rato; 2. Área mais próxima ao rato; 3. Rede entre compartimentos; 4. Compartimento do rato.
[** p<0,01 em relação a NENS; *** p<0,001 em relação a NENS].

Fonte: Autora

Figura 13. Parâmetros comportamentais avaliados no teste de exposição ao rato. A.



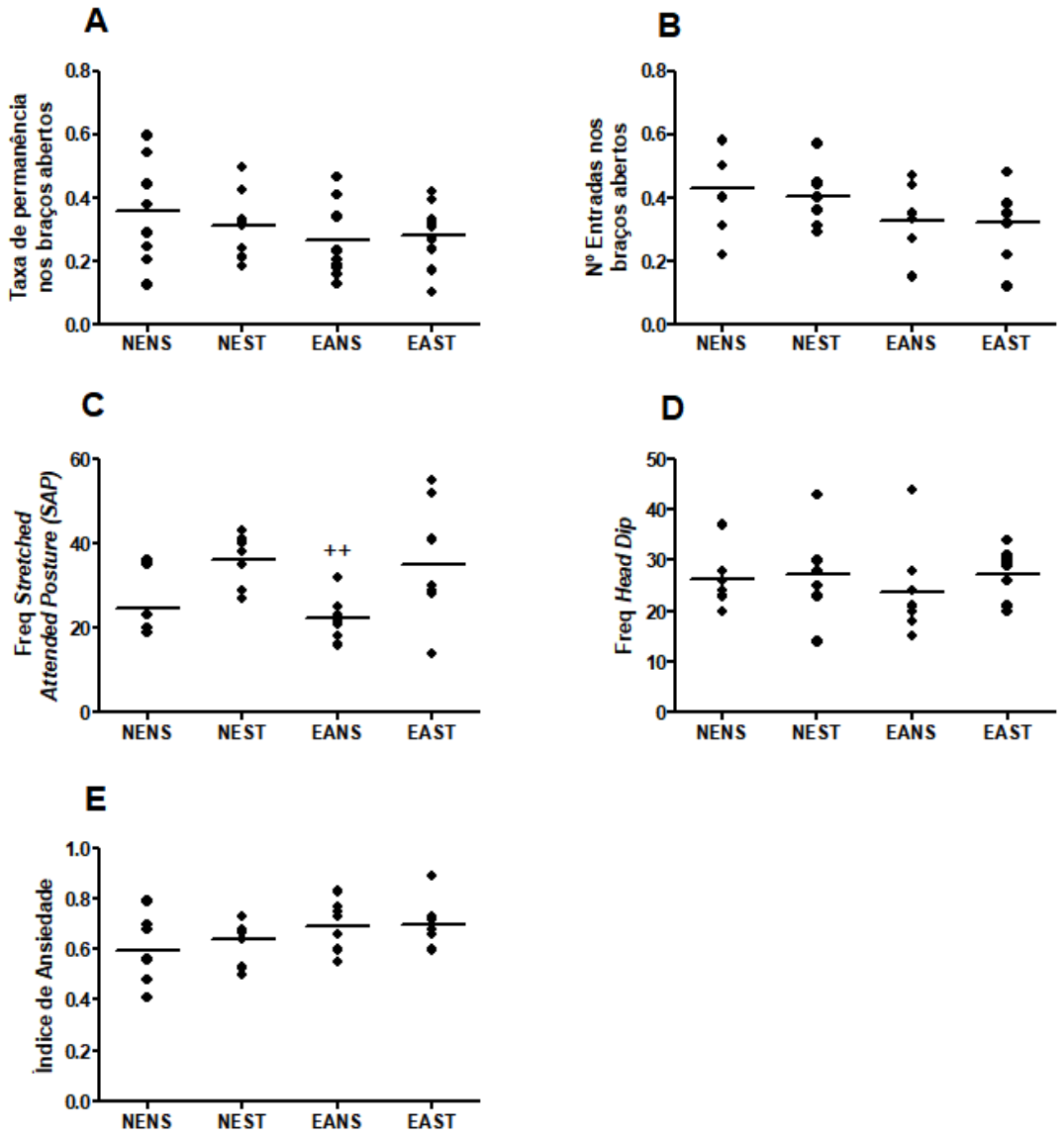
[** p<0,01 em relação a NENS; *** p<0,001 em relação a NENS; + p<0,05 em relação a NEST].

Fonte: Autora

4. 1. 5 Labirinto em Cruz Elevado

Após sete dias do teste de exposição ao predador, os animais passaram pelo teste do Labirinto em Cruz Elevado para avaliar o comportamento do tipo-ansioso. Não foram observadas diferenças significativas quanto aos parâmetros taxa de permanência nos braços abertos [$F_{(3,26)} = 1,032$; $p = 0,39$], número de entradas nos braços abertos [$F_{(3,26)} = 1,933$; $p = 0,14$], índice de ansiedade [$F_{(3,26)} = 1,628$; $p = 0,20$] e *head-dip* [$F_{(3,26)} = 0,37$; $p = 0,77$]. Os animais EANS realizaram menos *SAP* que os animais NEST ($F_{(3,26)} = 4,7557$; $p < 0,01$] (Figura 14).

Figura 14. Parâmetros avaliados no teste de Labirinto em Cruz Elevado.



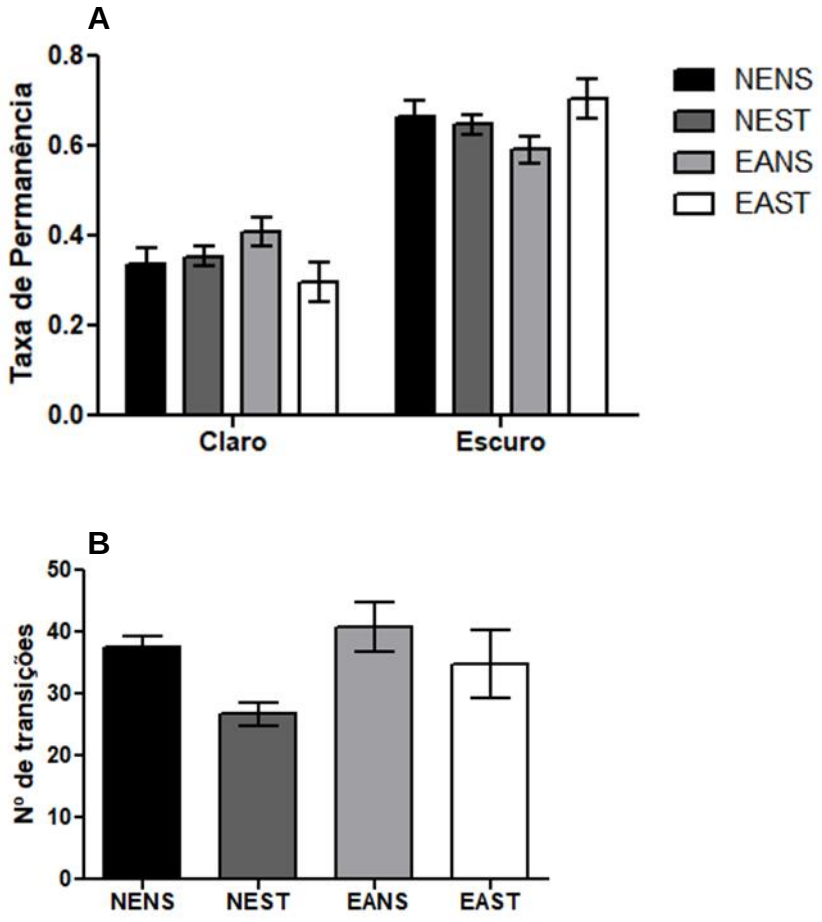
A. Taxa de Permanência nos Braços Abertos; B. Nº de entradas nos braços abertos; C. Frequência de *Stretched Attended Posture (SAP)*; D. Frequência de *Head- Dip*; E. Índice de Ansiedade.
[++ p<0,01 em relação a NEST]

Fonte: Autora

4. 1. 6 Caixa Claro-Escuro

Após 14 dias do teste de exposição ao rato, o comportamento ansioso dos camundongos foi novamente avaliado por meio do teste da Caixa Claro-Escuro. Novamente, não foram observadas diferenças significativas em relação à taxa de permanência no claro [$F_{(3,24)} = 1,930$; $p = 0,15$] e o número de transições entre ambos os compartimentos [$F_{(3,24)} = 2,652$; $p = 0,08$] (Figura 15).

Figura 15. Parâmetros avaliados no teste da Caixa Claro Escuro.



Fonte: Autora

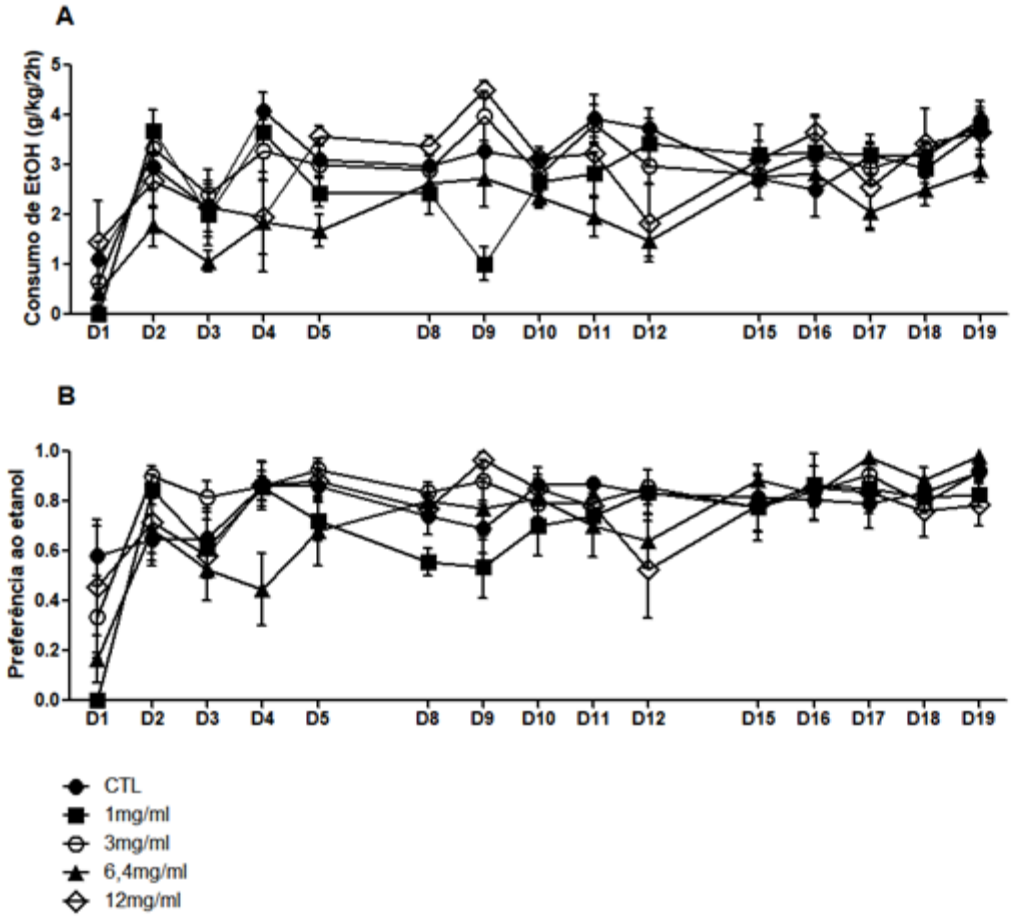
4. 2. Experimento 2: Tratamento agudo com CBT

4. 2. 1 Aquisição

Para analisar o papel da CBT como agente modulador do consumo de etanol, avaliamos o efeito das doses 1 mg/kg; 3 mg/kg; 6,4 mg/kg e 12 mg/kg. Houve diferença de consumo ao longo da aquisição [$F_{(14, 378)} = 19,264$; $p < 0,001$] que se estabilizou nos últimos cinco dias de consumo [$F_{(4, 108)} = 1,711$; $p = 0,17$] (Figura 16A). Além disso, não foram observadas diferenças entre os animais que foram posteriormente tratados com doses diferentes [$F_{(4, 27)} = 1,296$; $p = 0,29$].

Da mesma forma, houve variação nas preferências ao longo dos 15 dias de aquisição [$F_{(14, 378)} = 13,649$; $p < 0,001$], mas sem diferenças entre os grupos [$F_{(4, 27)} = 0,399$; $p = 0,80$]. Nos últimos cinco dias, não há variação entre as preferências [$F_{(4, 108)} = 0,863$; $p = 0,61$] (Figura 16B).

Figura 16. Consumo de etanol (A) e preferência (B) durante a fase de aquisição dos animais do experimento 2.



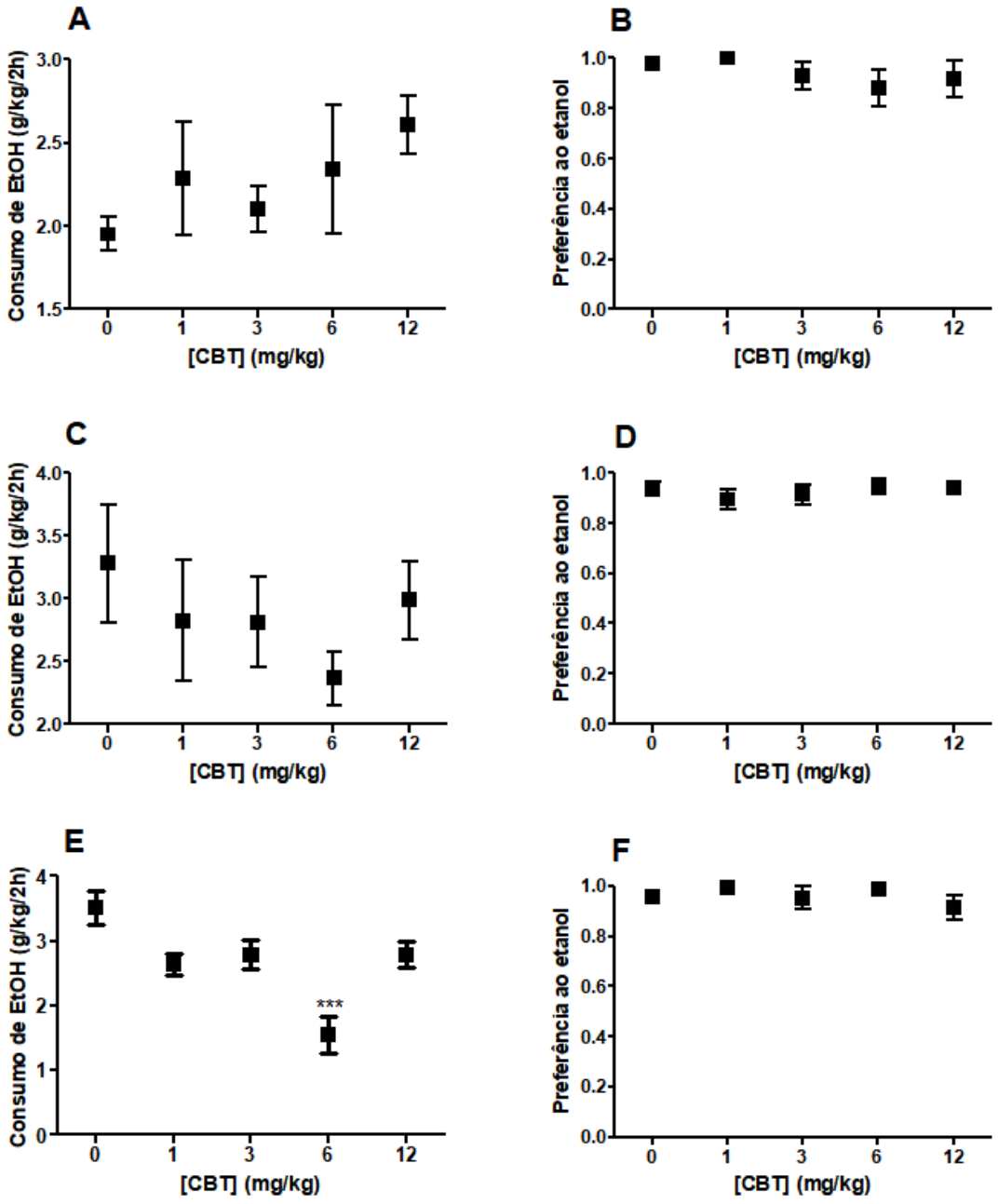
Fonte: Autora

4. 2. 2 Consumo de etanol em 2h após tratamento agudo com CBT

Para analisar as possíveis diferenças entre as doses, a teste ANOVA foi calculado em todas as reexposições. Com relação às duas horas iniciais de consumo, não observamos diferenças entre as diferentes doses no dia do tratamento com CBT [$F_{(4,30)} = 1,245$; $p = 0,31$] (Figura 17A) nem na semana seguinte [$F_{(4, 31)} = 0,755$; $p = 0,56$] (Figura 17C). No entanto, após catorze dias do tratamento, os animais que receberam a dose 6,4 mg/kg consumiram menos etanol que os que receberam as outras doses [$F_{(4,30)} = 9,084$; $p < 0,001$] (Figura 17E).

Quanto às preferências, a ANOVA não mostrou diferenças significativas entre as doses na reexposição ao etanol imediatamente após o tratamento [$F_{(4, 31)} = 1,122$; $p = 0,36$] (Figura 17B), na semana seguinte [$F_{(4, 31)} = 0,405$; $p = 0,80$] (Figura 17D) e após catorze dias da carbetocina [$F_{(4, 31)} = 0,971$; $p = 0,44$] (Figura 17F).

Figura 17. Consumo de etanol por 2 horas imediatamente após o tratamento (A), após 7 dias (C) e após 14 dias (E) nos animais tratados com diferentes doses de CBT. Preferência ao etanol imediatamente após o tratamento com CBT (B), após 7 dias (D) e após 14 dias do tratamento (F).



[*** p < 0,001 em relação a 0 – salina]

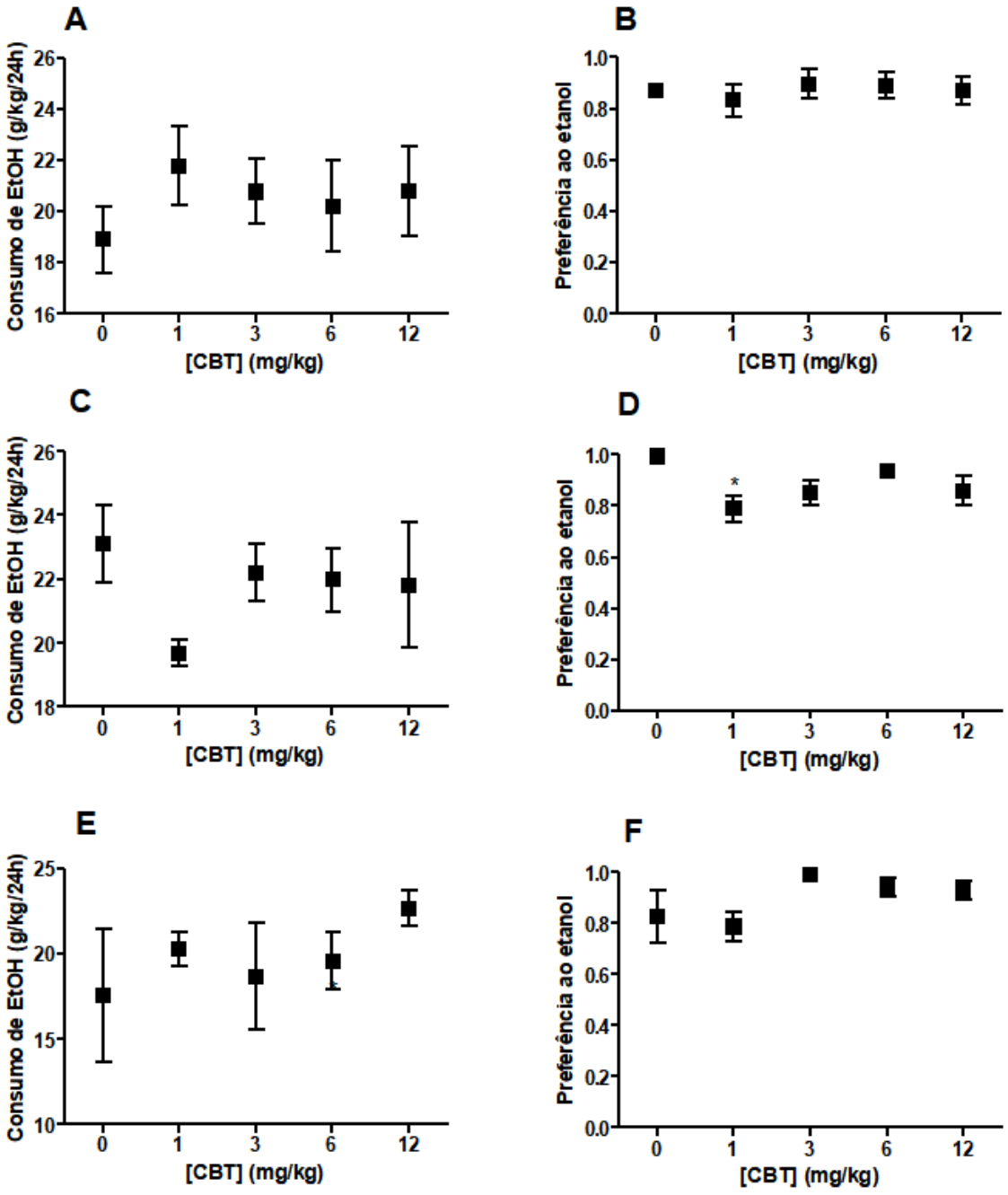
Fonte: Autora

4. 2. 2 Consumo de etanol em 24h após tratamento agudo com CBT

O teste ANOVA não mostrou diferença significativa entre as diferentes doses na reexposição imediatamente após o tratamento [$F_{(4, 31)} = 0,467$; $p = 0,76$] (Figura 18A). Da mesma forma, o tratamento agudo não resultou em alteração na ingestão de etanol em função das doses na segunda reexposição [$F_{(4, 31)} = 0,955$; $p = 0,44$] (Figura 18C) e na terceira reexposição [$F_{(4, 31)} = 0,713$; $p = 0,59$] (Figura 18E).

Ainda, as diferentes doses não alteraram a preferência dos animais em R1, após o tratamento [$F_{(4,31)} = 0,224$; $p = 0,92$] (Figura 18B) e em R3, após 14 dias [$F_{(4, 31)} = 2,463$; $p = 0,07$] (Figura 18F). No entanto, em R2, após 7 dias do tratamento, os animais tratados com 1 mg/kg de CBT apresentaram menor preferência ao etanol que o grupo controle [$F_{(4, 31)} = 3,577$; $p < 0,05$] (Figura 18D).

Figura 18. Consumo de etanol por 2 horas imediatamente após o tratamento (A), após 7 dias (C) e após 14 dias (E) nos animais tratados com diferentes doses de CBT. Preferência ao etanol imediatamente após o tratamento com CBT (B), após 7 dias (D) e após 14 dias do tratamento (F).



[*** p < 0,001 em relação a 0 – salina]

Fonte: Autora

4. 3. Experimento 3: Tratamento crônico com CBT

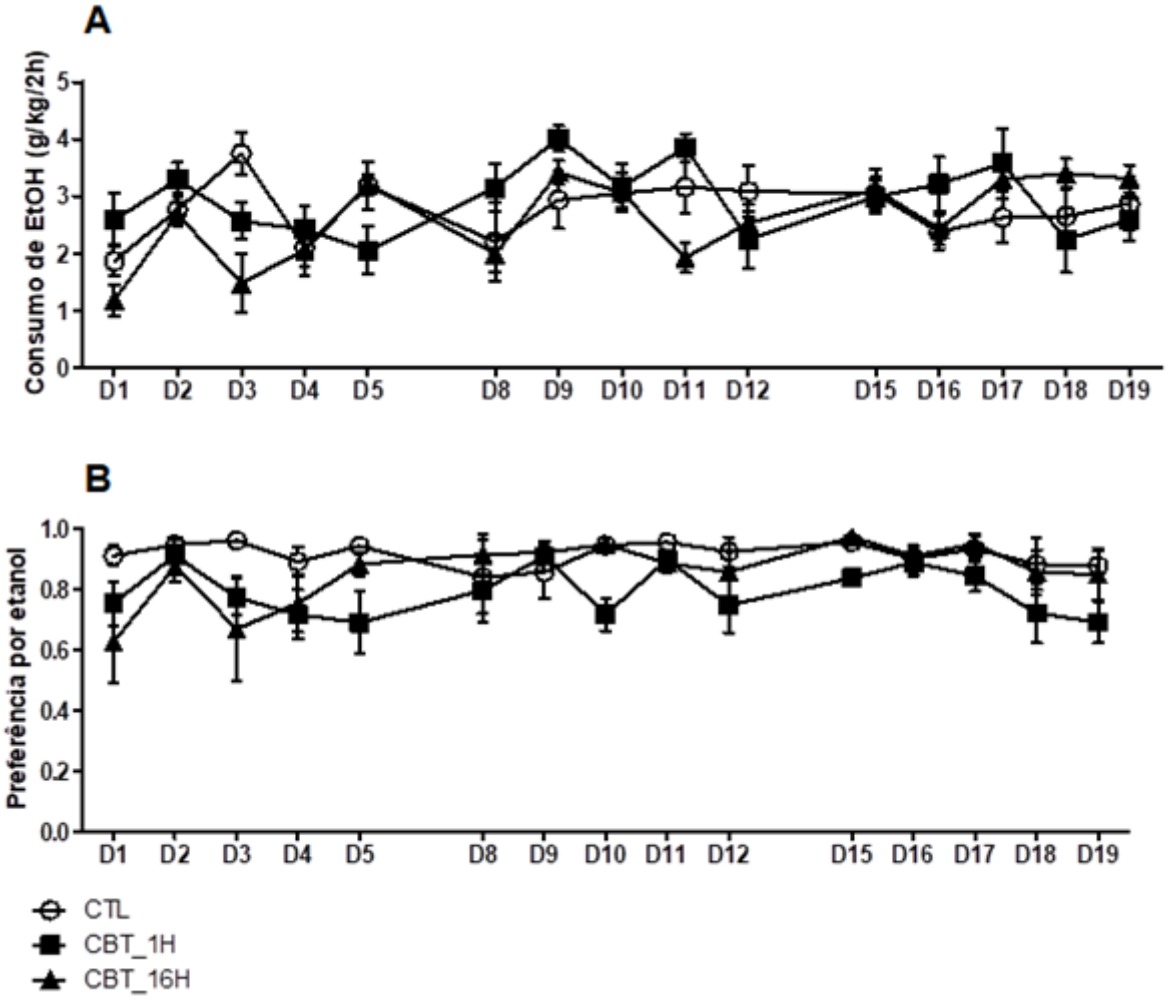
4. 3. 1. Aquisição

Durante a aquisição, observou-se diferença entre os tempos do início da aquisição até o seu término com a duração total de 15 dias [$F_{(14,322)} = 4,984$; $p < 0,001$], mas não houve diferença entre os grupos [$F_{(2,23)} = 0,016$; $p = 0,98$], pelo teste de ANOVA de medidas repetidas (Figura 19A).

Como a aquisição é necessária para estabilizar o consumo de todos os animais no início do experimento, foi realizado um novo teste utilizando apenas os cinco dias finais da aquisição. Neste teste, não houve diferença significativa ao longo do tempo [$F_{(4,96)} = 0,872$; $p = 0,484$], o que indica que o consumo estava estabilizado.

Com relação à preferência, não foi encontrada diferença entre os grupos ao longo dos quinze dias da aquisição [$F_{(2,23)} = 2,13$; $p = 0,14$] (Figura 19B).

Figura 19. Consumo de etanol (A) e preferência (B) durante a aquisição do experimento 3



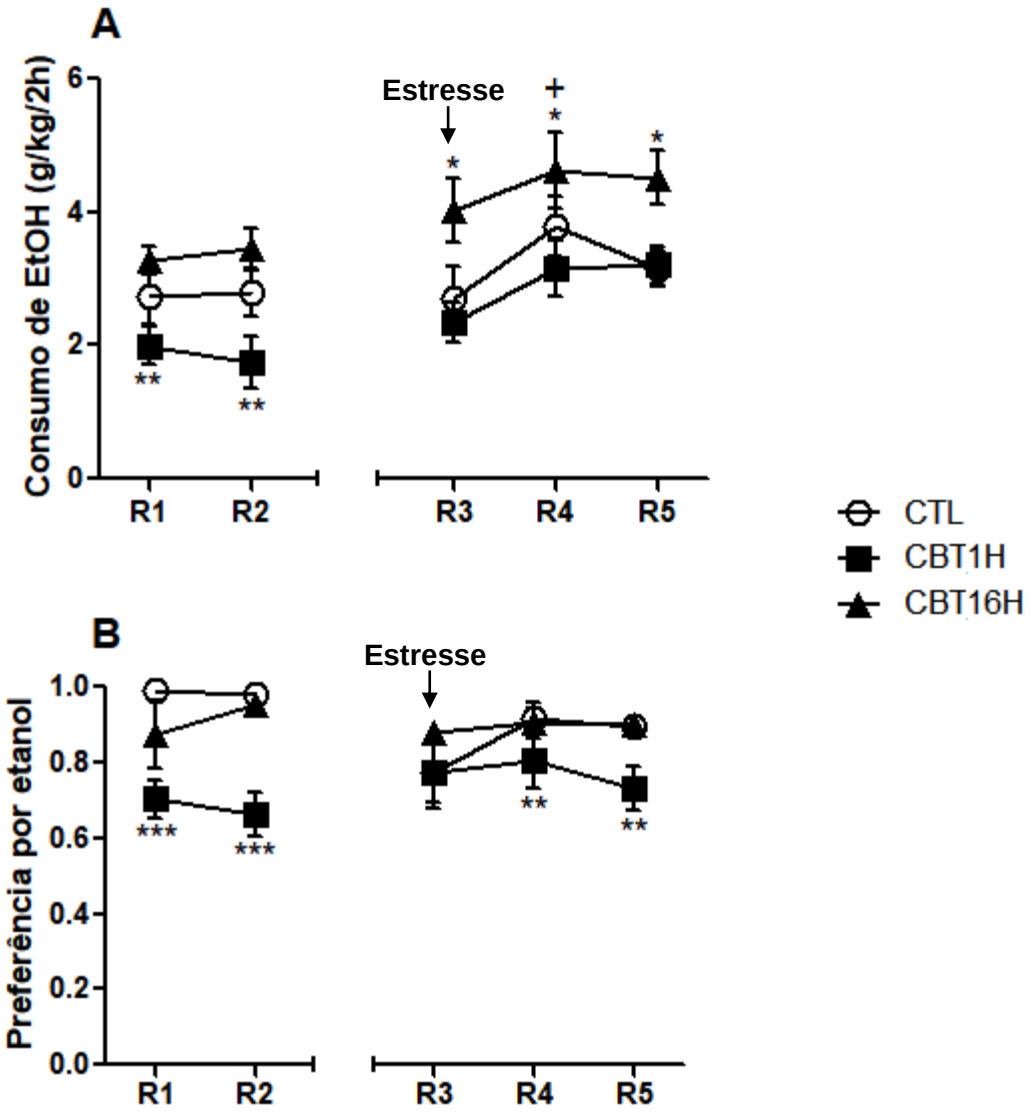
Fonte: Autora

4. 3. 2. Ingestão de etanol nas reexposições de 2 horas

Após a separação dos grupos e início do tratamento crônico com a CBT, os animais foram reexpostos semanalmente ao etanol por 2h durante 5 semanas. Para avaliar o efeito do estresse, foi realizada uma ANOVA de medidas repetidas que mostrou que todos os animais consumiram mais etanol na semana seguinte à exposição ao estresse em comparação à semana anterior [$F(4,84) = 7,356$; $p<0,001$] (Figura 20A), de forma similar ao que ocorreu com o experimento anterior, em que tanto os animais controle quanto os enriquecido aumentaram a ingestão de álcool após sete dias do estresse. Antes do estresse, a ANOVA de medidas repetidas não mostrou variação no consumo ao longo do tempo [$F_{(1,24)} = 0,537$; $p = 0,47$]. Porém, os animais CBT1H beberam menos do que o controle [$F_{(2,24)} = 14,777$; $p < 0,01$] [(Figura 20A), indicando que o momento que o animal recebeu o tratamento afetou o volume de etanol ingerido. Analisando apenas os efeitos do tratamento após o estresse, verificou-se que o grupo CBT16H ingeriu mais etanol que o controle [$F (2,21) = 7,453$; $p<0,05$] (Figura 20A).

Não foram observados efeitos do tratamento sobre o consumo de etanol ao longo do tempo. Os animais do grupo CBT1H apresentaram menor preferência ao etanol antes do estresse [$F_{(2,24)} = 18,69$; $p<0,001$] (Figura 20B), indicando que apenas o tratamento crônico foi capaz de reduzir a preferência ao álcool nesses animais. Finalmente, após o estresse, o grupo CBT1H teve menor preferência ao etanol que o controle ($F_{(2,22)} = 6,256$; $p < 0,01$] (Figura 20B).

Figura 20. Consumo de etanol (A) e preferência (B) nas reexposições de 2h do experimento 3.



[* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 em relação a CTL; + p<0,05 em relação a R2].

Fonte: Autora

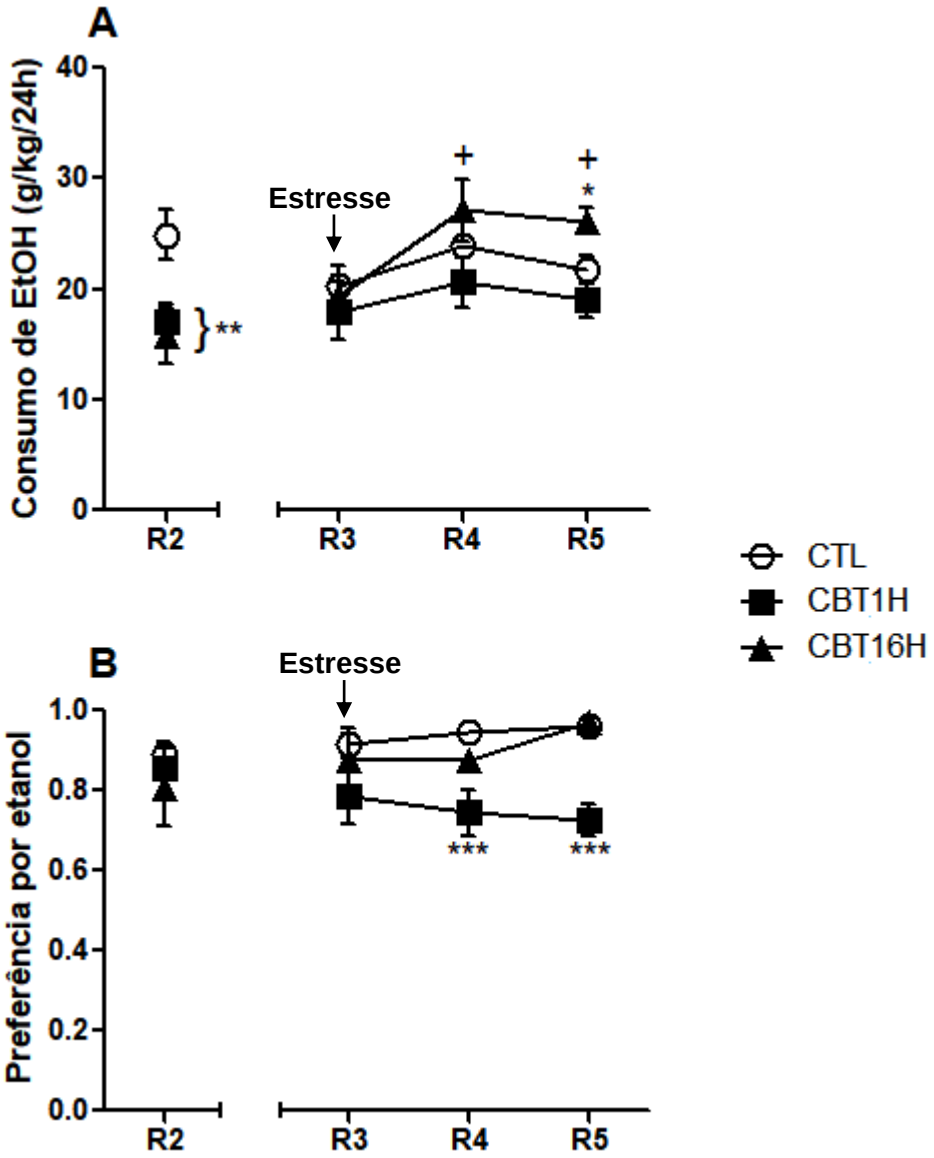
4. 3. 3 Ingestão de etanol nas reexposições de 24 horas

Considerando também as 24h totais de consumo nas últimas quatro reexposições, verificou-se que o consumo na semana seguinte ao estresse foi maior que na semana anterior ao mesmo [$F(3,69) = 3,128$; $p=0,03$] (Figura 21A), o que acompanhou o observado nas 2h iniciais de consumo.

Na primeira reexposição, antes do estresse, a ANOVA mostra que os animais tratados com CBT1H e CBT16H beberam menos que o grupo controle, independente da hora da administração da droga, sugerindo efeito protetor da CBT sobre o consumo [$F_{(2,24)} = 5,443$; $p < 0,01$]. No entanto, na última reexposição, os animais CBT16h consumiram mais que os animais CTL [$F_{(6,69)} = 2,177$; $p < 0,05$] (Figura 21A).

Em relação à preferência, não houve diferenças significativas antes do estresse, porém os animais CBT1h passaram a preferir menos o etanol que os outros grupos depois do estresse [$F_{(2,23)} = 10,180$; $p < 0,001$] (Figura 21B).

Figura 21. Consumo de etanol (A) e preferência (B) nas reexposições de 24h do experimento 3.



[* p < 0,05 em relação a CTL; ** p < 0,01 em relação a CTL; *** p < 0,001 em relação a CTL; + p < 0,05 em relação a R2].

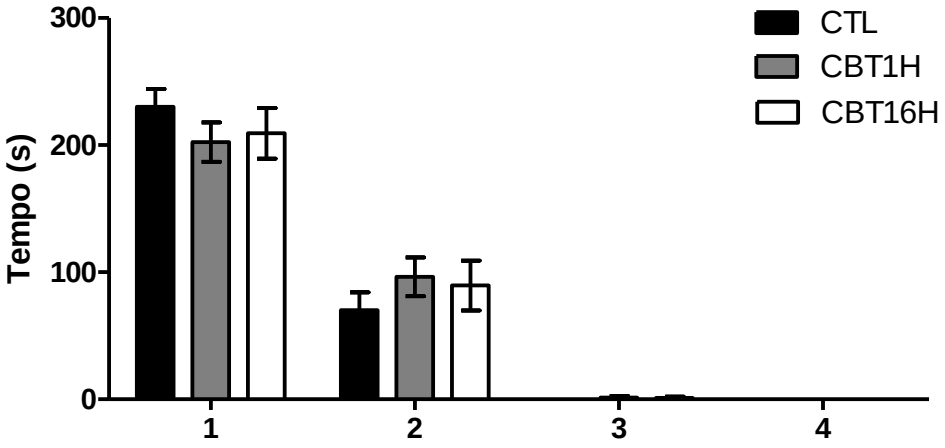
Fonte: Autora

4. 3. 4 Teste de exposição ao predador

A avaliação dos parâmetros espaciais e temporais no teste de exposição ao rato não mostrou diferença entre os grupos CTL; CBT1h e CBT16h em relação ao tempo gasto em cada um dos compartimentos do aparato (Figura 22). Portanto, a CBT não alterou a aproximação dos camundongos ao predador.

Quanto aos parâmetros comportamentais, a ANOVA mostrou que os animais CTL realizaram mais *freezing* que o grupos CBT1h ($p < 0,01$), mas não diferiram do grupo CBT16h ($p = 0,07$) [$F_{(2,24)} = 7,757$] (Figura 23B). Adicionalmente, os animais CBT1h mostraram tendência de menor engajamento nos comportamentos de avaliação de risco que os outros grupos [$F_{(2,24)} = 3,156$; $p = 0,06$] (Figura 23A).

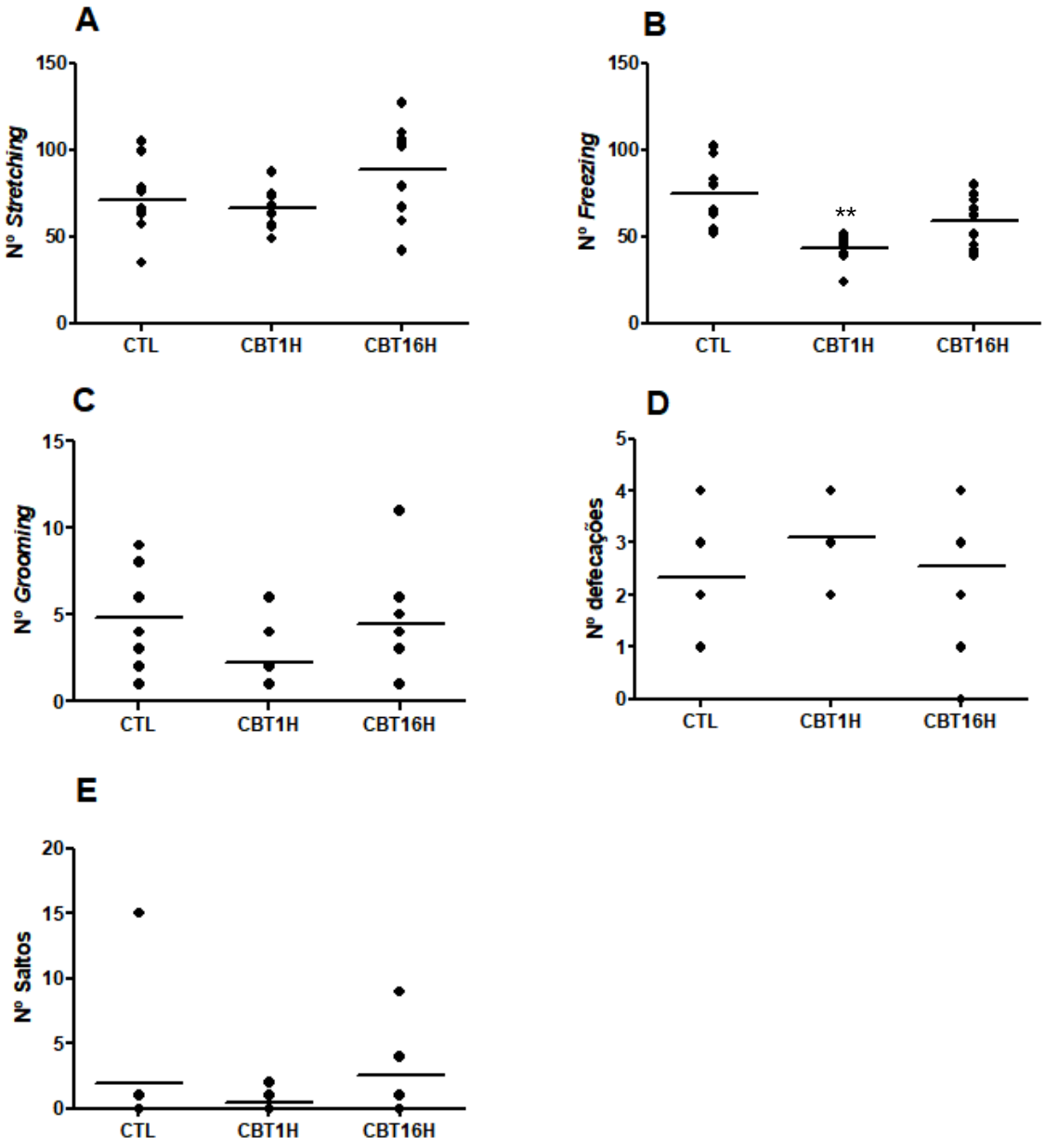
Figura 22. Parâmetros espaciais e temporais avaliados no teste de exposição ao rato no experimento 3.



1. Área mais distante do rato; 2. Área mais próxima ao rato; 3. Rede entre compartimentos; 4. Compartimento do rato. Não há diferenças entre os grupos.

Fonte: Autora

Figura 23. Parâmetros comportamentais avaliados no teste de exposição ao rato no experimento 3.



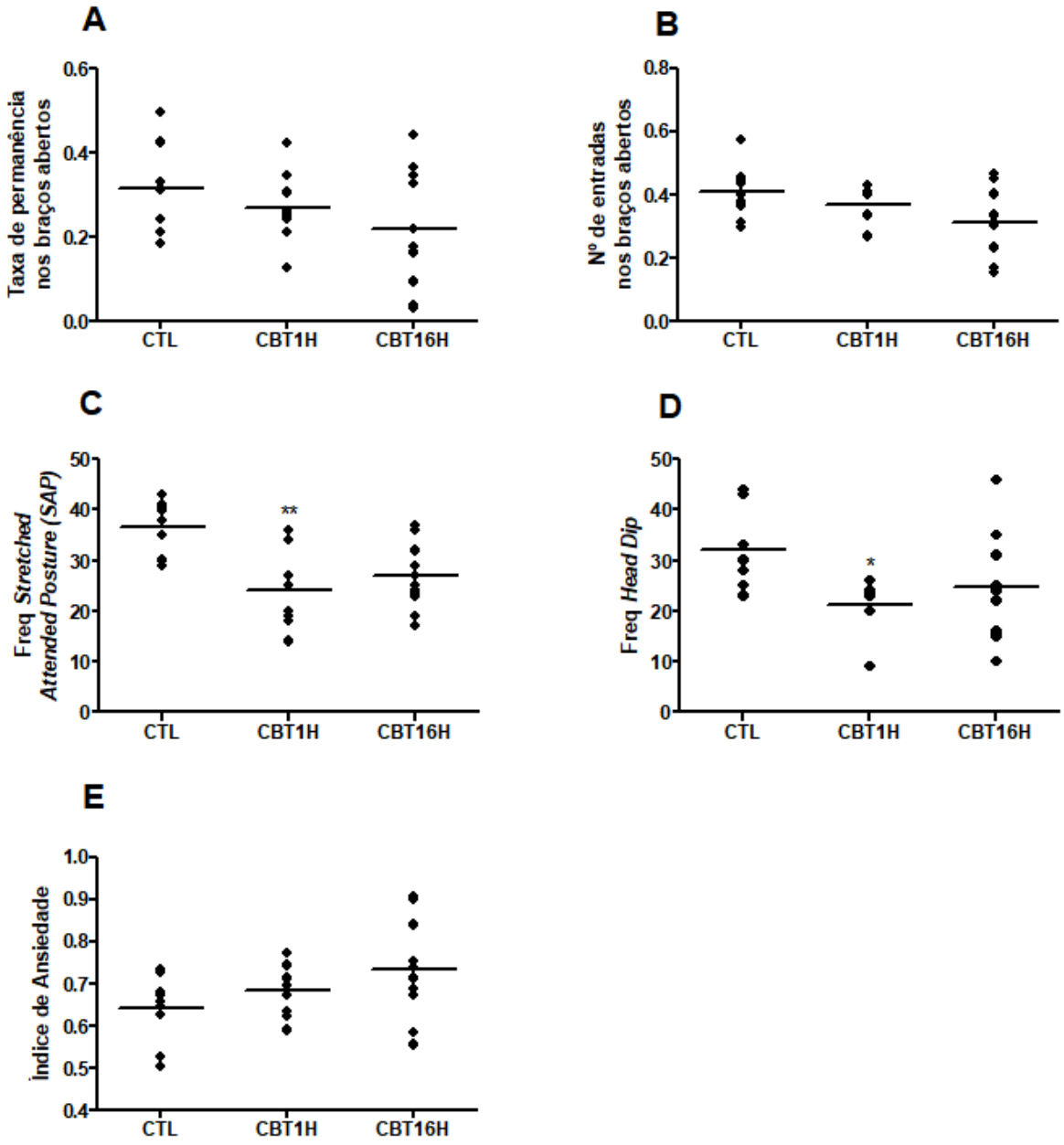
[** p<0,01 em relação a CTL].

Fonte: Autora

4. 3. 5 Labirinto em Cruz Elevado

Não foram observadas diferenças estatísticas nos parâmetros de nº de entradas [$F_{(2,23)} = 2,143$; $p = 0,14$] e taxa de permanência nos braços abertos [$F_{(2,23)} = 0,856$; $p = 0,44$] do teste de Labirinto em Cruz Elevado realizado após uma semana do estresse (Figura 24). Ainda mais, não houve diferenças no índice de ansiedade [$F_{(2,23)} = 1,598$; $p = 0,224$]. Animais CBT1H ($p < 0,01$) e CBT16h ($p < 0,05$) realizaram menos comportamento do tipo SAP [$F_{(2,23)} = 7,342$] (Figura 24C). Da mesma forma, animais CBT1H realizaram menos *head dip* que os animais controle [$F_{(2,23)} = 3,494$; $p = 0,047$] (Figura 24D).

Figura 24. Parâmetros avaliados no teste de Labirinto em Cruz Elevado no experimento 3.



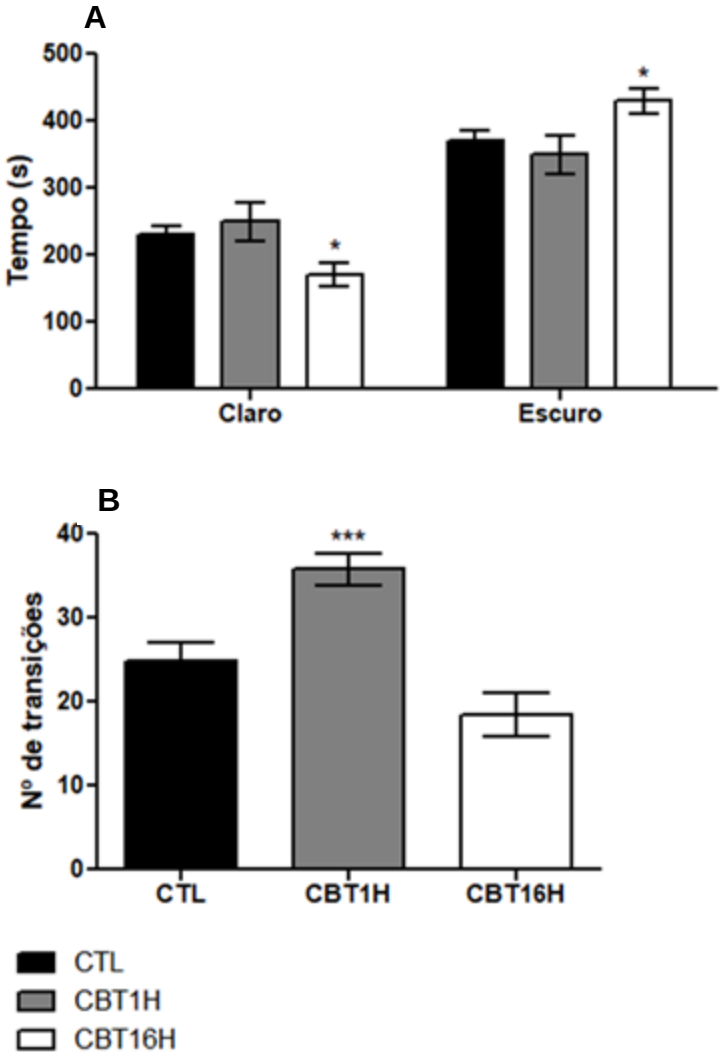
[* p< 0,05 em relação ao CTL; ** p<0,01 em relação ao CTL].

Fonte: Autora

4. 3. 6 Caixa Claro-Escuro

Os animais CBT16H permaneceram por mais tempo no compartimento escuro da Caixa Claro Escuro, teste realizado após 14 dias do estresse [$F_{(2,22)} = 3,899$; $p=0,036$] (Figura 25A). Ainda nesse teste, os animais CBT1h fizeram mais transições entre os compartimentos claro e escuro [$F_{(2,22)} = 12,691$; $p<0,001$] (Figura 25B).

Figura 25. Parâmetros avaliados no teste da Caixa Claro-Escuro no experimento 3.



[* p<0,05 em relação a CTL; *** p<0,001 em relação a CTL].

Fonte: Autora

5 DISCUSSÃO

5. 1 Enriquecimento Ambiental, Estresse e Consumo de Etanol

Neste trabalho, foi demonstrado que o EA tem efeito protetor sobre o consumo de etanol em camundongos C57BL/6 com histórico prévio de autoadministração da droga. Adicionalmente, verificou-se que animais enriquecidos submetidos ao estresse tem consumo de etanol reduzido em comparação ao controle, sugerindo que o EA tem papel sobre a diminuição do comportamento de recaída ao álcool.

As experiências de vida positivas podem ser mimetizadas em laboratório com a metodologia do EA (SOLINAS et al., 2010). Enquanto diversos estudos mostram que as experiências negativas induzem a ativação do eixo HPA (MCEWEN, 2007; SOLINAS et al, 2010), com consequente aumento na vulnerabilidade ao transtorno de uso de substâncias (KOOB, 2008), evidências sugerem que o EA tem efeito protetor sobre os comportamentos de busca e de consumo de drogas de abuso (SOLINAS et al., 2010). A respeito do etanol, foi observado que ratos de uma linhagem com preferência a álcool autoadministram menos álcool quando mantidos em ambiente enriquecido em comparação a animais em condição “empobrecida”, assim como possuem preferência e motivação ao etanol reduzidas (DEEHAN et al., 2011).

O EA reduz os Transportadores de Dopamina na fenda sináptica dos neurônios estriatais (FAHERTY et al., 2005; YUAN et al., 2009), o que deve resultar em níveis maiores de dopamina no NAc com a administração aguda da droga. De fato, acredita-se que o EA tenha efeito estimulatório sobre os comportamentos iniciais relacionados à administração imediata da droga, como se observa com o aumento da atividade locomotora e da indução de CPP à anfetamina (BOWLING et al., 1993; BOWLING; BARDO, 1994). No entanto, com a administração crônica da droga, ocorre atenuação dos comportamentos relacionados à adicção (BARDO, 2001; STAIRS; BARDO, 2009), como a busca pela droga e seu consumo. Em alguns estudos utilizando o modelo de sensibilização comportamental à cocaína (SOLINAS et al., 2008) ou etanol (RUEDA et al., 2012), foi observado que o EA previne o aumento da locomoção induzido pela droga ou reverte o comportamento já estabelecido quando introduzido durante um período de abstinência forçada.

Ainda, hipotetiza-se que um dos papéis do enriquecimento sobre a recaída seja pela inibição da atividade dos circuitos envolvidos neste comportamento, que incluem áreas corticais, estriatais e límbicas (CHAUVET et al., 2011; THIEL et al., 2010). De fato, estudos mostram que a expressão de *cFos* no NAc, ATV, ABL e CPF está diminuída em animais mantidos em gaiolas enriquecidas durante a abstinência à cocaína em comparação a animais mantidos em ambiente padrão (CHAUVET et al., 2011; SOLINAS et al., 2008; THIEL et al., 2010). Essa reatividade reduzida resultante do EA em várias regiões encefálicas deve conferir resiliência à recaída induzida pela presença da droga ou de pistas a ela associadas e também à recaída por estresse, já que essas regiões estão desreguladas em indivíduos dependentes (CHAUVET et al., 2009; KOOB; VOLKOW, 2010).

Após uma semana da primeira reexposição do protocolo, os camundongos passaram pelo estresse agudo de exposição ao rato e, em seguida, foram reexpostos ao etanol, de forma que todos os grupos estressados consumiram a mesma quantidade de álcool nas 24h de reexposição. Estudos indicam que ratos Long-Evans com histórico de autoadministração de álcool reduzem o consumo quando são imediatamente reexpostos ao etanol após estresse psicossocial (VAN ERP; MICZEK, 2001a; VAN ERP; TACHI; MICZEK, 2001b) ou estresse físico como choque elétrico ou contenção (NG CHEONG TON et al., 1983). Os autores associaram esses efeitos à inibição geral provocada pelo estresse sobre o comportamento consumatório dos animais, afetando todas as funções fisiológicas e comportamentais (VAN ERP; MICZEK, 2001). Resultado similar também foi observado em nosso laboratório, em que camundongos C57BL/6 autoadministraram menos etanol durante 2h após passarem por estresse de contenção (MARIANNO; ABRAHAO; CAMARINI, 2017). Entretanto, após uma semana da exposição ao rato, o consumo de etanol aumenta nos grupos que foram estressados nas 2h iniciais de consumo. De acordo com a literatura, os estresses de derrota social e nado forçado produzem um efeito atrasado sobre o consumo de etanol, elevando-o após alguns dias da exposição (LOPEZ; ANDERSON; BECKER, 2016; SILLABER et al., 2002). O aumento do consumo voluntário de etanol em camundongos CFW que sofreram derrota social crônica ocorre exatamente após uma semana do término do estresse (NORMAN et al., 2015). Por fim, animais da linhagem C57BL/6N não apresentam aumento permanente do

consumo de etanol, como é observado em camundongos da linhagem BALB/cJ, indicando que há diferenças entre linhagens. Foi demonstrado que as linhagens com alta preferência ao etanol não têm efeito atrasado de consumo muito intenso (LOWERY et al., 2008). O aumento do consumo pode ser decorrente do estado emocional negativo provocado pela estimulação da amígdala devido ao conjunto abstinência (BECKER, 2017) e estresse (KOOB; VOLKOW, 2010), já que ambos estimulam tanto o eixo HPA e o sistema CRFérgico extra-hipotalâmico.

Foi visto também que os animais enriquecidos retornaram aos mesmos níveis de consumo observados na semana anterior a exposição ao estresse ao longo das duas semanas após o estresse. Esses resultados indicam que o EA foi capaz de reduzir o comportamento de busca e de consumo a droga em comparação aos animais estressados que permaneceram nas condições padrão. Utilizando o mesmo modelo, animais que permaneceram em condições enriquecidas beberam menos do que o controle após estresse de contenção (MARIANNO; ABRAHAO; CAMARINI, 2017). O estresse é um gatilho importante que induz a recaída em indivíduos dependentes e os impede de continuar abstinentes, podendo, até mesmo, provocar o aumento do consumo. Sabe-se que as regiões responsivas ao estresse também participam da recaída ao etanol, englobando o NAc, o hipotálamo e a amígdala (PANG; HANNAN; LAWRENCE, 2018).

Por mediar os comportamentos de medo e ansiedade (ERLICH et al., 2009; JANAK; TYE, 2015) e também ter papel importante sobre o comportamento de recaída de busca e consumo de drogas de abuso (KOOB, 2008), entende-se que o EA pode ter efeito ansiolítico sobre situações estressoras. Alguns estudos mostram que o EA reduz o comportamento do tipo-ansioso em camundongos avaliados pelo modelo de Labirinto em Cruz (BENAROYA-MILSHTEIN et al., 2004; CHAPILLON et al., 1999; NOVAES et al., 2017; ROY, et al., 2001), bem como redução nos parâmetros que definem ansiedade no teste de campo aberto (LARSSON; WINBLAD; MOHAMMED, 2002; ROY et al., 2001), apesar de existirem relatos que mostram que o EA não altera o comportamento ansioso em camundongos da linhagem C57BL/6 (CHAPILLON et al, 1999). O efeito ansiolítico do EA parece ser mais evidente quando o animal é exposto a uma situação bastante desafiadora e por isso seria mais interessante utilizá-lo como terapia quando os níveis de

estresse são elevados o suficiente para causar ansiedade (FOX; MERALI; HARRISON, 2006). Muitos autores defendem que o enriquecimento ambiental representa um mecanismo de inoculação de estresse (CROFTON; ZHANG; GREEN, 2015), ou seja, a apresentação contínua de novos estímulos seria comparável a estresses leves, que tornam os animais mais estáveis emocionalmente e por isso, mais preparados quando expostos a uma situação de estresse mais intenso (FOX; MERALI; HARRISON, 2006).

Diversos autores já mostraram que a amígdala é a principal região encefálica envolvida em comportamentos de medo e ansiedade (JANAK; TYE, 2015). Em relação ao estresse por exposição ao predador, foi observado que a excitabilidade da ACe e da ABL aumenta de forma duradoura em ratos expostos a um gato (ADAMEC; BLUNDELL; BURTON, 2005b). Adicionalmente, ocorre hipertrofia dendrítica dos neurônios da ABL após tratamento agudo com corticosterona que se correlaciona ao aumento do comportamento ansioso gerado pelo estresse (MITRA; SAPOLSKY, 2008). O EA, por sua vez, reverte a hipertrofia induzida pela ativação do eixo HPA nos neurônios da ABL, protegendo o animal dos efeitos ansiogênicos duradouros causados pelo estresse (KOE; ASHOKAN; MITRA, 2016). De fato, muitos estudos mostram que animais enriquecidos tem expressão de receptores do tipo CRF1 reduzida na ABL (SZTAINBERG et al., 2010) e que o EA é capaz de limitar a translocação nuclear de GR na ABL após estresse agudo (NOVAES et al., 2017). Tais estudos sugerem que este núcleo tem atividade neuronal reduzida em animais enriquecidos, o que deve estar associado a níveis reduzidos de ansiedade. Por isso, animais EA devem ser capazes de manter baixos níveis de consumo de etanol, mesmo quando passam por estresse.

No modelo de exposição ao predador deste trabalho, os animais enriquecidos escalaram a rede que os separava do predador, mantendo assim, maior proximidade com ele. Essa maior aproximação parece ser devido à redução do comportamento de medo observada nestes animais. Relata-se que ratos Wistar com 21 meses de idade e mantidos em ambiente enriquecido apresentam menos comportamento de *freezing* quando expostos ao odor de urina de gato, além de se aproximarem do estímulo com mais frequência que os animais controle (SANPEDRO-PIQUERO et al., 2016). Sugere-se que os animais enriquecidos devem apresentar comportamento de medo reduzido frente ao estímulo por estarem acostumados a ambientes em constante mudança, de forma que a

resposta inicial ao medo é reduzida (SANPEDRO-PIQUERO et al., 2016). Finalmente, Klein et al. mostraram que ratos enriquecidos apresentam comportamento defensivo reduzido quando expostos a gatos (KLEIN et al.; 1994)

5. 2 Oxitocina, Estresse e Consumo de Etanol

No experimento com administração aguda de carbetocina, foi observado que ela foi incapaz de reduzir o consumo de etanol quando a reexposição ocorria logo após a administração da droga, independentemente da dose administrada. Porém, verificamos que há efeitos tardios, já que os camundongos tratados com a dose 6,4 mg/kg ingerem menos álcool após catorze dias do tratamento. Chaviaras e colaboradores descobriram que essa dose de CBT reduz comportamentos do tipo-depressivo em ratos Sprague-Dawley (CHAVIARAS et al., 2010). Adicionalmente, já foi descrito que a dose 6,4 mg/kg reduz o comportamento de busca por morfina (GEORGIOU et al., 2015) e impede a recaída induzida por estresse (ZANOS et al., 2014).

Alguns autores já descreveram que a administração aguda de oxitocina diminui o consumo de etanol em um modelo de consumo em *binge* de forma dose-dependente e que essa redução é bloqueada com a administração de um antagonista dos receptores de oxitocina (KING et al. 2017). Neste mesmo trabalho, os autores viram que a administração de oxitocina antes da exposição às garrafas de água e álcool em um modelo *two-bottle choice* similar ao nosso reduziu a ingestão de etanol (KING et al, 2017). Em nosso estudo, o tratamento agudo com CBT não foi capaz de reduzir o consumo de etanol imediatamente após a sua administração, porém nós observamos alguns efeitos tardios. Estas diferenças podem estar relacionadas às propriedades farmacocinéticas da OT e CBT. Por exemplo, sabe-se que a CBT apresenta meia vida de 2h, enquanto a OT tem meia vida de 5 min. Além disso, a metabolização de ambas as substâncias gera compostos distintos (ENGSTROM et al., 1998). No entanto, mais experimentos são necessários para comprovar esta hipótese.

O tratamento crônico com carbetocina teve efeito protetor sobre o consumo de etanol em camundongos abstinentes. Após enfrentarem uma situação de estresse, o consumo de álcool aumenta nos animais tratados com carbetocina com 16h de

antecedência, o que não é observado nos animais que receberam o tratamento antes do estresse. Portanto, a ativação de receptores de oxitocina tem efeitos protetores sobre o aumento da ingestão de etanol induzido pelo estresse quando a administração do agonista ocorre com maior proximidade ao estresse como no caso do grupo CBT1H. Entretanto, é possível que as neuroadaptações induzidas pelo tratamento crônico possam elevar o consumo quando não há administração exógena imediata do agonista, como se observou no caso do grupo CBT16H, que elevou a ingestão de etanol após a exposição ao estresse.

A oxitocina, o “neuropeptídeo social”, age sobre o sistema nervoso central mediando o comportamento social (GIMPL; FAHRENHOLZ, 2001). O sistema oxitocinérgico modula a atividade mesolímbica dopaminérgica, direcionando o indivíduo às recompensas sociais (BASKERVILLE; DOUGLAS, 2010; MCGREGOR; BOWEN, 2012). Sabe-se que a infusão crônica de OT no encéfalo de ratos aumenta o número de interações sociais, o que indica que o hormônio tem papel pró-social (WITT; WINSLOW; INSEL, 1992). As interações sociais, por sua vez, contribuem para a manutenção de estados emocionais positivos, incluindo a responsividade reduzida ao estresse (HEINRICHS et al, 2003). Visto que a atividade dopaminérgica, os estados emocionais negativos e o estresse são componentes importantes para a manifestação da adicção, a OT tem sido estudada como possível farmacoterapia para transtornos desse tipo (MCGREGOR; BOWEN, 2012; MCGREGOR; CALLAGHAN; HUNT, 2008).

O presente trabalho mostrou que a administração repetida de CBT, agonista da OT, preveniu o consumo de etanol em camundongos abstinentes. Sabe-se que o tratamento agudo com OT reduz de forma dose dependente a autoadministração de etanol em ratos (MACFADYEN et al., 2016) e camundongos (KING et al., 2017). De fato, o tratamento com oxitocina reduziu a autoadministração de metanfetamina em ratos Sprague-Dawley e a hiperatividade induzida pela droga (CARSON et al., 2010), assim como a CBT foi capaz de reduzir os efeitos emocionais negativos causados pela abstinência de opióides, diminuindo a chance de recaída (ZANOS et al., 2014).

É interessante observar a alteração do padrão de consumo nas duas horas iniciais da sessão de consumo, em que os animais tratados 16 horas antes da exposição bebem mais que os animais tratados 1 hora antes, apesar de terem recebido a mesma dose. A

oxitocina é capaz de produzir condicionamento preferencial por lugar ao etanol, um paradigma que indica que o fármaco pode aumentar as propriedades reforçadoras do etanol (RAE et al., 2018). Dessa forma, hipotetizamos que os animais tratados com maior intervalo de tempo já metabolizaram toda a carbetocina administrada, visto que a CBT tem meia-vida de 85-100 minutos (PASSONI et al., 2016); e, portanto, consumiram o etanol em grande quantidade para compensar uma possível redução na atividade dopaminérgica mesolímbica ou em decorrência de um estado ansioso pelo estado de "abstinência" da oxitocina. Por sua vez, os animais tratados com 1 hora de antecedência não exibiram este aumento de consumo pela presença do efeito agudo da droga.

De forma similar ao observado para os animais enriquecidos, a exposição ao rato não elevou o consumo de etanol imediatamente após o estresse, mas o aumento tornou-se evidente após uma semana. Houve uma tendência de aumento do consumo de etanol após o estresse nos animais que eram tratados no dia anterior a sessão de consumo. Já foi visto na literatura que animais que receberam OT cronicamente apresentaram *downregulation* no *binding* de OTR em diversas regiões do encéfalo, incluindo os núcleos olfatórios e CPF, podendo desencadear mecanismos de neuroplasticidade em resposta à ativação repetida do receptor pelo agonista (RAE et al., 2018). Além disto, tem-se que a sinalização oxitocinérgica é capaz de reduzir a reatividade dos circuitos encefálicos relacionados à ativação do eixo HPA em resposta ao estresse (NEUMANN et al., 2000a; WINDLE et al., 2004), apesar dos estresses psicológicos produzirem efeitos mais evidentes que os estresses físicos (NEUMANN et al., 2000a). Ainda, o *binding* a OT em áreas ricas em receptores glicocorticoides, incluindo amígdala e hipocampo, aumenta em resposta ao estresse e aos níveis plasmáticos de corticosteroides (LIBERZON; YPUNG, 1997), sugerindo que a OT é um fator importante para o controle do *feedback* negativo do eixo HPA.

Os animais que receberam CBT imediatamente antes da exposição ao rato (CBT 1h) não mostraram escalonamento do consumo de etanol induzido pelo estresse, como aqueles que receberam a CBT 16h. O grupo CBT16h já havia metabolizado a CBT que havia recebido no dia anterior, de modo que a oxitocina endógena foi incapaz de modular a atividade do eixo HPA sozinha. Dessa forma, é possível supor que a CBT inibiu os efeitos do escalonamento do etanol induzido por estresse por inibição do eixo HPA.

Relatos mostram que a OT é capaz de reduzir o comportamento do tipo ansioso quando administrada imediatamente antes da situação de ameaça, mas sem afetar a aquisição da memória de medo em modelos animais de TEPT (MISSIG et al., 2010). De fato, pré-tratamento com OT em ratos reduz a expressão de medo e facilita a sua extinção (TOTH; NEUMANN; SLATTERY, 2012), o que deve contribuir para a manutenção do consumo basal de etanol ao longo do tempo. Ainda, a administração de OT entre as fases de condicionamento e extinção ao medo prejudica a extinção em ratos e camundongos (TOTH; NEUMAN; SLATTERY, 2012).

Mesmo recebendo CBT 16 h após exposição ao estresse, a administração de CBT crônica não foi capaz de reduzir o consumo de etanol. Ou seja, ainda que os animais estivessem sendo tratados com CBT após o estresse, essa não foi capaz de inibir o escalonamento do consumo de etanol induzido pelo estresse. Ressalta-se, então, a importância do momento da administração de oxitocina ou de seus análogos para o tratamento de TEPT, já que a OT só seria capaz de inibir o escalonamento do consumo de etanol induzido pelo estresse, quando utilizada antes da exposição ao estímulo estressor.

O efeito ansiolítico da CBT administrada imediatamente antes do teste foi observado durante o teste de exposição ao predador, visto que esses animais realizaram menos comportamento de *freezing* que o controle. O comportamento de medo está associado à ativação da amígdala, visto que lesões amigdalares estão relacionadas à redução de *freezing* em ratos expostos a um gato sedado (BLANCHARD; BLANCHARD, 1972); e coelhos que tiveram a ACe lesionada exibem respostas cardiovasculares induzidas pelo estresse menos intensas (KAPP et al., 1979). A OT central inibe a amígdala central em resposta a estímulos estressores por meio da restrição da liberação de neurotransmissores excitatórios (EBNER et al., 2005), o que contribui para a o comportamento de medo atenuado.

Apesar de muito ser discutido sobre seus efeitos ansiolíticos, a administração exógena de OT pode ter consequências negativas (CARTER, 2014). A área septal, rica em OTRs e importante para a modulação dos comportamentos de estresse e de medo, tem ativação aumentada após o condicionamento do medo por derrota social em camundongos C57BL/6, provocando efeito ansiogênico (GUZMÁN et al., 2013). Em outro

estudo, a administração crônica de OT intracerebroventricular (i.c.v.) em camundongos submetidos a estresse psicossocial crônico induziu fenótipo ansiogênico com redução de OTRs no septo, ABL e ACe, porém esses efeitos não foram observados quando a dose era considerada baixa (PETERS et al., 2014). Em outro modelo, o tratamento crônico de OT intranasal em camundongos C57BL/6 saudáveis causou redução dos comportamentos sociais bem como dos OTRs encefálicos (HUANG et al., 2014). Com base nessas informações, é possível postular que a oxitocina não é majoritariamente ansiolítica, mas pode assumir funcionalidade bilateral, em que seus efeitos sobre o comportamento de ansiedade e de medo podem ser positivos ou negativos, dependendo não só das características neuroquímicas e estruturais das regiões encefálicas, mas também do contexto ambiental em que o indivíduo está submetido (BARTZ et al., 2011; GUZMÁN et al., 2013).

Outra hipótese plausível para explicar o aumento do consumo de etanol induzido por CBT após o estresse é que ele possa ser decorrente de alterações no balanço entre a oxitocina e a vasopressina encefálicas. A OT e a AVP surgiram de uma duplicação gênica no início da evolução animal, de forma que ambos os peptídeos têm estrutura similar, com nove resíduos de aminoácidos que se diferem nas posições 3 e 8 (STOOP; HEGOBURU; VAN DER BURG, 2015). A AVP também é produzida no PVN, porém nos neurônios parvocelulares, e age sobre receptores do tipo GPCR V_{1a}, V_{1b} e V_2 localizados na periferia e no SNC (MANNING et al. 2012). Sua atuação sobre o balanço hidroeletrolítico já é bastante conhecida, porém, sabe-se que a AVP age no encéfalo modulando comportamentos relacionados ao medo e ansiedade em roedores e humanos (FRANK; LANDGRAF, 2008; MEYER-LINDENBERG et al., 2011). Ao contrário dos efeitos da OT, com propriedades ansiolíticas, a AVP exerce ação oposta favorecendo fenótipos ansioso e depressivo quando age sobre o sistema límbicos. Dessa forma, o balanço entre ambos os peptídeos determina a resposta comportamental do indivíduo (NEUMANN; LANDGRAF, 2012). Com um estímulo estressor, os neurônios do PVN co-secretam AVP e CRF no sistema portal para estimular o eixo HPA e iniciar a resposta ao estresse (WHITNALL, 1993). Ainda mais, evidências mostram que a AVP estimula neurônios da amígdala central medial (CeM), relacionados à indução da resposta ao medo, enquanto a OT age sobre receptores em células GABAérgicas da amígdala central

lateral (CeL) que se projetam à CeM, inibindo sua resposta (HUBER; VEINANTE; STOOP, 2005). Com base nesses conhecimentos, postulamos que a *downregulation* dos OTRs devido ao tratamento crônico possa ter alterado o balanço entre os neuropeptídeos OT e AVP, favorecendo o fenótipo ansioso. Finalmente, devido à similaridade entre as moléculas, pode ser que a CBT tenha ativado os receptores de AVP, mesmo que a literatura indique seletividade em sua ação (PASSONI et al, 2016).

Diante dos resultados aqui observados, o tratamento crônico com CBT impediu o escalonamento do consumo de etanol independentemente do horário de sua administração. Após o estresse, houve redução do consumo apenas nos animais tratados imediatamente antes da exposição ao predador, mas os animais que receberam o tratamento apenas no dia anterior aumentaram o seu consumo após o estresse. Outros estudos mostram que a OT ou seus análogos administrados cronicamente (GUZMÁN et al., 2013; HUANG et al., 2014; PETERS et al., 2014) tem efeitos ansiogênicos, ao contrário do que se esperava. Portanto, a OT ainda deve ser bastante estudada antes de ser utilizada como agente ansiolítico de uso crônico para prevenção ou tratamento de doenças relacionadas ao estresse, já que pode induzir a uma piora dos sintomas e, no caso de indivíduos alcoolistas em abstinência, pode até mesmo provocar o retorno do uso do etanol.

6 CONCLUSÃO

O transtorno de uso de substâncias ainda é bastante estigmatizado pela população. Contudo, é necessário compreender que a dependência é uma doença que ocorre após uma série de alterações no sistema nervoso central que impede que o indivíduo consiga controlar o próprio consumo. As modificações são tão intensas que, mesmo que o dependente esteja em abstinência por um longo período de tempo, uma situação de estresse pode induzi-lo à recaída. Poucos são os fármacos disponíveis para o tratamento, uma vez que o transtorno tenha se instalado. Dessa forma, a pesquisa em dependência de drogas tenta entender os fatores fisiológicos subjacentes para desenvolver tratamentos cada vez mais eficazes.

O ambiente influencia fortemente o fenótipo de dependência. Indivíduos que vivem em condições inóspitas são mais vulneráveis aos efeitos das drogas de abuso, por isso apresentam maior probabilidade de adquirir o transtorno. Por outro lado, condições ambientais positivas oferecem proteção ao desenvolvimento da dependência. Neste trabalho, foi demonstrado que o enriquecimento ambiental é capaz de reverter o aumento do consumo de etanol em camundongos com histórico de dependência, após serem expostos a um estresse por exposição ao rato, que é utilizado como modelo de TEPT.

Devido ao fato do EA induzir estímulos sociais, entende-se que o sistema oxitocinérgico deve atuar como um dos componentes endógenos de sua ação. De fato, nosso laboratório mostrou que o perfil de distribuição dos receptores de OT se altera com o EA (RAE et al., 2018). Por isso, postulamos uma hipótese de que o consumo de etanol diminuiria com a ativação repetida dos receptores de oxitocina, caso ela ocorresse durante o mesmo período de tempo que o EA passa a ter os seus efeitos protetores. Contudo, descobrimos que a estimulação oxitocinérgica por meio de agonistas exógenos pode bloquear o escalonamento de etanol induzido pelo estresse, mas também é bastante dependente do horário do tratamento.

A maioria dos estudos mostrando os efeitos ansiolíticos e protetores da oxitocina contra o consumo de drogas foi realizado utilizando doses agudas, enquanto os poucos que fizeram um tratamento crônico mostram resultados pouco promissores para iniciar o uso da OT como medicamento ansiolítico. Apesar de muitos destes trabalhos mostrarem

resultados divergentes, ora com efeitos ansiolíticos, ora com efeitos ansiogênicos, todos eles afirmam a importância do contexto para a resposta obtida. Neste trabalho, mostramos que a CBT tem efeitos positivos sobre o consumo de etanol em animais abstinentes, porém seus efeitos após estresse dependem do momento que o fármaco é administrado. Dessa forma, ainda são necessários mais estudos para avaliar a possibilidade de utilizar a OT como tratamento para o consumo abusivo de álcool, já que, dependendo do contexto, ela pode inclusive gerar efeitos deletérios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMEC, R. E.; SHALLOW, T. Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. **Physiol. Behav.** v. 54, p. 101-109, 1992.

ADAMEC, R. E.; BLUNDELL, J.; BURTON, P. Neural circuit changes mediating lasting brain and behavioral response to predator stress. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v. 29, p. 1225-1241, 2005a.

ADAMEC, R.; BLUNDELL, J.; BURTON, P. Role of NMDA receptors in the lateralized potentiation of amygdala afferent neural transmission produced by predator stress. **Physiology&Behavior**, v. 86, p. 75-91, 2005b.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. DSM-5. Tradução de Maria Inês Corrêa Nascimento et al. 5ª ed. Porto Alegre, Artmed. 2014.

ASHOKAN, A.; HEGDE, A.; MITRA, R. Short-term environmental enrichment is sufficient to counter stress-induced anxiety and associated structural and molecular plasticity in basolateral amygdala. **Psychoneuroendocrinology**, v. 69, p. 189–196, 2016.

BACK, S. E.; BRADY, K. T. Anxiety disorders with comorbid substance use disorders: diagnostic and treatment considerations. **Psychiatr Ann.**, v. 38, n. 11, p. 724-729, 2008.

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

BARTZ, J.A.; ZAKI, J.; BOLGER, N.; OCHSNER, K.N. Social effects of oxytocin in humans: context and person matter. **Trends Cogn. Sci.** 15(7): p. 301-9, 2011.

BASKERVILLE, T. A.; DOUGLAS, A. J. Dopamine and Oxytocin Interactions Underlying Behaviors : Potential Contributions to Behavioral Disorders. **CNS NeuroscienceandTherapeutics**, v. 16, p. 92–123, 2010.

BASSAREO, V.; LUCA, M. A. DE; CHIARA, G. DI. Differential Expression of Motivational Stimulus Properties by Dopamine in Nucleus Accumbens Shell versus Core and Prefrontal Cortex. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 11, p. 4709–4719, 2002.

BECKER, H. C.; LOPEZ, M. F.; DOREMUS-FITZWATER, T. L. Effects of stress on alcohol drinking: A review of animal studies. **Psychopharmacology**, v. 218, n. 1, p. 131–156, 2011.

BECKER, H. C. Influence of stress associated with chronic alcohol exposure on drinking. **Neuropharmacology**, v. 122: p. 115-126, 2017.

BELZUNG, C. EL HAGE, W.; MOINDROT, N.; GRIEBEL, G. Behavioral and neurochemical changes following predatory stress in mice. **Neuropharmacology**, v. 41, n. 3, p. 400–408, 2001.

BENAROYA-MILSHNTEIN, N.; HOLLANDER, N.; APTER, A.; KUKULANSKY, T.; RAZ, N.; WILF, A.; YANIV, I.; PICK, C. G. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, p. 1341-1347, 2004.

BINDER, E. B.; NEMEROFF, C. B. The CRF system, stress, depression and anxiety - insights from human genetic studies. **Molecular Psychiatry**, v. 15, p. 574-588, 2010.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Innate and conditioned reaction to threat in rats with amygdaloid lesions. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 81, n. 2, p. 281-290, 1972.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C.; WEISS, S. M.; MEYER, S. The effects of ethanol and diazepam on reactions to predatory odors. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 35, p. 775-780. 1990.

BOURIN, M. HASCÖET, M. The mouse light/dark box test. **Eur. J. Pharmacol.**, 463(1): 55-65, 2003.

BOWEN, M. T.; CARSON, D. S.; SPIRO, A.; ARNOLD, J. C.; MCGREGOR, I. S. Adolescent Oxytocin Exposure Causes Persistent Reductions in Anxiety and Alcohol Consumption and Enhances Sociability in Rats. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, 2011.

BOWLING, S.L.; BARDO, M.T. Locomotor and rewarding effects of amphetamine in enriched, social, and isolate reared rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 48(2): p. 459–464, 1994.

BOWLING, S.L.; ROWLETT, J.K.; BARDO, M.T. The effect of environmental enrichment on amphetamine-stimulated locomotor activity, dopamine synthesis and dopamine release. **Neuropharmacology**, 32 (9): p. 885-93, 1993.

BREMNER, J. D.; RANDALL, P.; SCOTT, R. A.; BRONEN, R. A.; SEIBYL, J. P.; SOUTHWICK, S. M.; DELANEY, R. C.; MCCARTHY, G.; CHARNEY, D. S.; INNIS, R. B. MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. **Am J Psychiatry**. v. 152, n. 7, p. 973-981. 1995.

BREMNER, J. D.; NARAYAN, M.; STAIB, L. H.; SOUTHWICK, S. M.; MCGLASHAN, T.; CHARNEY, D.S. Neural correlates of memories of childhood sexual abuse in women with and without posttraumatic stress disorder. **Am J Psychiatry**. v. 156, n. 11, p. 1787-1795. 1999

BUIJS, R. M.; SWAAB, D. F.; DOGTEROM, J.; VAN LEEUWEN, F. W. Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. **Cell Tiss. Res.**, v. 186, p. 423-433, 1978.

BUIJS, R.; SWAAB, D. F. Immuno-electron microscopical demonstration of vasopressin and oxytocin synapses in the limbic system of the rat. **Cell. Tiss. Res.**, v. 204, p. 355-365, 1979.

CALHOON, G. G.; TYE, K. M. Resolving the neural circuits of anxiety. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 1394–1404, 2015.

CARSON, D. S.; CORNISH, J. L.; GUASTELLA, A. J.; HUNT, G. E.; MCGREGOR, I. S. Oxytocin decreases methamphetamine self-administration, methamphetamine hyperactivity, and relapse to methamphetamine-seeking behaviour in rats. **Neuropharmacology**, v. 58, p. 38-43, 2010.

CARTER, C. S. Oxytocin Pathways and the Evolution of Human Behavior. **Annu. Rev. Psychol**, v. 65, p. 17–39, 2014.

CEBRID. II Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Droga Psicotrópicas no Brasil: Estudo Envolvendo as 108 maiores cidades do país. UNIFESP, São Paulo, BR. 2006.

CHAPILLON, P.; MANNECHÉ, C.; BELZUNG, C.; CASTON, J. Rearing environmental enrichment in two inbred strains of mice: 1. Effects on emotional reactivity. **Behavior Genetics**, v. 29, n. 1, p. 41-46, 1999.

CHAUVET, C.; LAERDEUX, V.; GOLDERG, S. R.; JABER, M.; SOLINAS, M. Environmental Enrichment reduces cocaine seeking and reinstatement induce by cues and stress but not by cocaine. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, p. 2767-2778. 2009.

CHAUVET, C.; LARDEUX, V.; JABER, M.; SOLINAS, M. Brain regions associated with the reversal of cocaine conditioned place preference by environmental enrichment. **Neuroscience**. v. 184, p. 88-96, 2011.

CHAVIARAS, S.; MAK, P.; RALPH, D.; KRISHNAN, L.; BROADBEAR, J.H. Assessing the antidepressant-like effects of carbetocin, an oxytocin agonist, using a modification of the forced swimming test. **Psychopharmacology (Berl),** 210(1): 35-43, 2010.

CLKER. C57 black mouse pink ears clip art. Disponível em: http://www.clker.com/clipart-c57-black-mouse-pink-ears.html. Acesso em 09 de outubro de 2018.

CRABBE, J. C.; PHILLIPS, T. J.; BELKNAP, J. K. The Complexity of Alcohol Drinking : Studies in Rodent Genetic Models. p. 737–750, 2010.

CROFTON, E. J.; ZHANG, Y.; GREEN, T. A. Inoculation stress hypothesis of environmental enrichment. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 49, p. 19–31, 2015.

DEEHAN, G. A.; CAIN, M. E.; KIEFER, S. W. Differential Rearing Conditions Alter Operant Responding for Ethanol in Outbred Rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 31, n. 10, p. 1692–1698, 2007.

DEEHAN, G. A.; PALMATIER, M. I.; CAIN, M. E.; KIEFER, S. W. Differential Rearing Conditions and Alcohol-Preferring Rats: Consumption of and Operant Responding for Ethanol. **Behavioral Neuroscience**, v. 125, n. 2, p. 184-193, 2011.

DI CHIARA, G.; IMPERATO, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. July, p. 5274–5278, 1988.

DI CHIARA, G. Nucleus Accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. **Behavioural Brain Research**, v. 137, p. 75-114. 2002.

DIELENBERG, R. A.; HUNT, G. E.; MCGREGOR, I. S. 'When a rat smells a cat': the distribution of FOS immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. **Neuroscience**. v. 104, n. 4, p. 1085-1097, 2001.

DODHIA, S.; HOSANAGAR, A.; FITZGERALD, D. A.; LABUSCHAGNE, I.; WOOD, G. A.; NATHAN, P. J.; PHAN, K. L. Modulation of Resting-State Amygdala-Frontal Functional Connectivity by Oxytocin in Generalized Social Anxiety Disorder. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 9, p. 2061–2069, 2014.

DONALDSON, Z. R.; YOUNG, L. J. Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. **Science (New York, N.Y.)**, v. 322, n. 5903, p. 900–904, 2008.

EBNER, K.; BOSCH, O. J.; KRÖMER, S. A.; SINGEWALD, N.; NEUMANN, I. D. Release of oxytocin in the rat central amygdala modulates stress-coping behavior and the release of excitatory amino acids. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, p. 223–230, 2005.

EDWARDS, S.; BAYNES, B. B.; CARMICHAEL, C. Y.; ZAMORA-MARTINEZ, E. R.; BARRUS, M.; KOOB, G. F.; GILPIN, N. W.. Traumatic stress reactivity promotes excessive alcohol drinking and alters the balance of prefrontal cortex-amygdala activity. **Translational Psychiatry**, v. 3, n. 8, p. e296, 2013.

EHRLICH, I.; HUMEAU, Y.; GRENLER, F.; CIOCCHI, S.; HERRY, C.; LÜTHI, A. Amygdala Inhibitory Circuits and the Control of Fear Memory. **Neuron**, v. 62, p. 757–771, 2009.

ENGSTROM, T.; BARTH, T.; MELIN, P.; VILHARDT, H. Oxytocin receptor binding and uterotonic activity of carbetocin and its metabolites following enzymatic degradation. **European Journal of Pharmacology**, v. 355, p. 203-210, 1998.

ENOCH, M. A. The role of GABAA receptors in the development of alcoholism. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 90, n. 1, p. 95–104, 2008.

FADDA, F.; ROSSETTI, Z. L. Chronic ethanol consumption:fromneuroadaptation to neurodegeneration. **Progress in Neurobiology**, v. 56, n. 4, p. 385–431, 1998.

FAHERTY, C.J.; SHEPHERD, K.R.; HERASIMTSCHUK, A.; SMEYNE, R.J. Environmental enrichment in adulthood eliminates neuronaldeath in experimental Parkinsonism. **Brain Res. Mol. Brain. Res.** v. 134, p. 170–179, 2005.

FOX, C.; MERALI, Z.; HARRISON, C. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. **Behavioural Brain Research**, v. 175, n. 1, p. 1–8, 2006.

FRANK, E.; LANDGRAF, R. The vasopressin system – from antidiuresis to psychopathology. **European Journal of Pharmacology**, v. 583, p. 226-242, 2008.

FRANKEL, P. S.; ALBURGES, M. E.; BUSH, L.; HANSOR, G. R.; KISH, S. J. Striatal and Ventral PallidumDynorphin Concentrations are markedly increased in human chronic cocaine users. **Neuropharmacology**. v. 55, n. 1, p. 41-46. 2008.

FUNK, C. K.; O'DELL, L. E.; CRAWFORD, E. F.; KOOB, G. F. Corticotropin-Releasing Factor within the Central Nucleus of the Amygdala mediate enhanced ethanol self-administration in withdrawn, ethanol-dependent rats. **Journal of Neuroscience**. v. 26, n. 44, p. 11324-11332, 2006.

GAFFORD, G. M.; RESSLER, K. J. GABA and NMDA receptors in CRF neurons have opposing effects in fear acquisition and anxiety in central amygdala vs . bed nucleus of the striaterminalis. **Hormones and Behavior**, v. 76, p. 136–142, 2015.

GARAVAN, H.; PANKIEWICZ, J.; BLOOM, A.; CHO, J. K.; SPERRY, L.; ROSS, T. J.; SALMERON, B. J.; RISINGER, R.; KELLEY, D.; STEIN, E. A. Cue-Induced Cocaine Craving: Neuroanatomical specificity for drug users and drug stimuli. **Am J Psychiatry**, v. 157, n. 11, p. 1789-1798. 2000.

GEORGIOU, P.; ZANOS, P.; GARCIA-CARMONA, J.A.; HOURANI, S.; KITCHEN, I.; KIEFFER, B.L.; LAORDEN, M.L.; BAILEY, A. The oxytocin analogue carbetocin prevents priming-induced reinstatement of morphine-seeking: Involvement of dopaminergic, noradrenergic and MOPr systems. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, 25(12): 2459-64, 2015.

GILPIN, N. W.; KOOB, G. F. Neurobiology of Alcohol Dependence: Focus on Motivational Mechanisms. **Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism**, v. 31, n. 3, p. 185–195, 2008.

GIMENO, C.; DORADO, M. L.; RONCERO, C.; SZERMAN, N.; VEJA, P.; BALANZÁ-MARTINEZ, V.; ALVAREZ, F. J.; Treatment of comorbid alcohol dependence and anxiety disorder: review of the scientific evidence and recommendations for treatment. **Front Psychiatry**, v. 8, p. 1-14, 2017.

GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F.; GENE, C. The Oxytocin Receptor System : Structure , Function , and Regulation. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 2, p. 629–683, 2001.

GOEDERS, N. E. The impact of stress on addiction. **European Neuropsychopharmacology**, v. 13, n. 6, p. 435–441, 2003.

GOLDSTEIN, D.S.; KOPIN, I.J. Evolution of concepts of stress. **Stress**, 10(2): 109-20. 2007.

GRACE, A. A. The tonic/phasic model of dopamine system regulation and its implication for understanding alcohol and psychostimulant craving. **Addiction,** v. 95 (Supplement 2), p. S119-S128, 2000.

GUNNAR, M. R.; VAZQUEZ, D. Stress Neurobiology and Developmental Psychopathology. In: Developmental Neuroscience. John Wiley and Sons Ltd. vol. 2. 2015. Capitulo de livro

GUZMÁN, Y.F.; TRONSON, N.C.; JOVASEVIC, V.; SATO, K.; GUEDEA, A.L.; MIZUKAMI, H.; NISHIMORI, K.; RADULOVIC, J. Fear-enhancing effects of septal oxytocin receptors. **Nat. Neurosci.**, v. 16(9): p. 1185-7, 2013.

HAUGER, R. L.; RISBROUGH, V.; BRAUNS, O.; DAUTZENBERG, F. M. Corticotropin Releasing Factor (CRF) Receptor signalling in the central nervous system: new molecular targets. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**. v. 5, p. 453-479, 2006.

HEBB, D. O.; The effects of early experience on problem-solving at maturity. **Am. Psychol.**, v. 2, p. 306-307, 1947.

HEINRICHS, M.; BAUMGARTNER, T.; KIRSCHBAUM, C.; EHLERT, U. Social support and oxytocin interact to suppress cortisol and subjective responses to psychosocial stress. **Biological Psychiatry**, v. 54, n. 12, p. 1389–1398, 2003.

HENDRIKSEN, H.; PRINS, J.; OLIVIER, B.; OOSTING, R. S. Environmental enrichment induces behavioral recovery and enhanced hippocampal cell proliferation in an antidepressant-resistant animal model for PTSD. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, 2010.

HUANG, H.; MICHETTI, C.; BUSNELLI, M.; MANAGÒ, F.; SANNINO, S.; SCHEGGIA, D.; GIANCARDO, L.; SONA, D.; MURINO, V.; CHINI, B.; SCATTONI, M.L.; PAPALEO, F. Chronic and acute intranasal oxytocin produce divergent social effects in mice. **Neuropsychopharmacology**, 39(5): p. 1102-14.

HUBER, D.; VEINANTE, P.; STOOP, R. Vasopressin and Oxytocin Excite Distinct Neuronal Populations in the Central Amygdala. **Science**, v. 308, n. 5719, p. 245–248, 2005.

HURD, Y. L.; HERKENHAM, M. Molecular Alterations in the Neostriatum of Human Cocaine Addicts. **Synapse**. v. 13, n. 4, p. 357-369. 1993.

HWA, L.S.; CHU, A.; LEVINSON, S.A.; KAYYALI, T.M.; DeBOLD, J.F. MICZEK, K.A. Persistent escalation of alcohol drinking in C57BL/6J mice with intermittent access to 20% ethanol. **Alcohol Clin Exp Res**. 35(11):1938-47. 2011.

HYMAN, S.E.; MAKENKA, R.C.; NESTLER, E.J. Neural Mechanisms of Addiction: The Role of Reward-Related Learning and Memory. **Annu. Rev. Neurosci.** v. 29, p. 565-598. 2006.

JANAK, P. H.; TYE, K. M. From circuits to behaviour in the amygdala. **Nature**, v. 517, p. 284–292, 2015.

KALIVAS, P.W.; VOLKOW, N.D. The Neural Basis of Addiction: A Pathology of Motivation and Choice. **Am J Psychiatry**. v. 162, p. 1403-1413. 2005.

KAPP, B. C.; FRYSINGER, R. C.; GALLAGHER, M.; HASELTON, J. R. Amygdala central nucleus lesions: effect on heart rate conditioning in the rabbit. **Physiology & Behavior**, v. 23, p. 1109-1117, 1979.

KAUFMAN, J. N.; ROSS, T. J.; STEIN, E. A.; GARAVAN, H. Cingulate Hypoactivity in Cocaine users during GO-NOGO task as revealed by event-related functional magnetic resonance imaging. **J Neurosci**. v. 23, n. 21, p. 7839-7843. 2003.

KHISTI, R.T.; WOLSTENHOLME, J.; SHELTON, K.L.; MILES, M.F. Characterization of the ethanol-deprivation effect in substrains of C57BL/6 mice. **Alcohol**, 40(2):119-26, 2006.

KING, C. E.; GRIFFIN, W. C.; LUDERMAN, L. N.; KATES, M. M.; MCGINTY, J. F.; BECKER, H. C. Oxytocin reduces ethanol self-administration in mice. **Alcoholism: Clinical & Experimental Research**. v. 41, n. 5, p. 955-964, 2017.

KLEIN, S. L.; LAMBERT, K. G.; DURR, D.; SCHAEFER, T.; WARING, R. E. Influence of environmental enrichment and sex on predator stress response in rats. **Physiology & Behavior**, v. 56, n. 2, p. 291-297, 1994.

KNOBLOCH, H. S.; CHARLET, A.; HOFFMAN, L. C.; ELIAVA, M.; KHRULEV, S.; CETIN, A. H.; OSTEN, P.; SCHWARZ, M. K.; SEEBURG, P. H.; STOOP, R.; GRINEVICH, V. Evoked axonal oxytocin release in the central amygdala attenuates fear response. **Neuron**, v. 73, n. 3, p. 553–566, 2012.

KOE, A. S.; ASHOKAN, A.; MITRA, R. Short environmental enrichment in adulthood reverses anxiety and basolateral amygdala hypertrophy induced by maternal separation. v. 6, n. 2, p. e729–7, 2016.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Drug Abuse: Hedonic Homeostatic Dysregulation. **Science**, v. 278, n. 5335, p. 52–58, 1997.

KOOB, G. F. A Role for Brain Stress Systems in Addiction. **Neuron**. v. 59, n. 1, p. 11-34. 2008.

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurocircuitry of addiction. **Neuropsychopharmacology** . v. 35, n. 1, p. 217–238, 2010.

KOVÁCS, G. L.; SARNYAI, Z.; SZABÓ, G. Oxytocin and addiction: A review. **Psychoneuroendocrinology**, v. 23, n. 8, p. 945–962, 1998.

LABUSCHAGNE, I.; PHAN, K. L.; WOOD, A.; ANGSTADT, M.; CHUA, P.; HEINRICHS, M; STOUT, J. C.; NATHAN, P. J. Oxytocin attenuates amygdala reactivity to fear in generalized social anxiety disorder. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 12, p. 2403–2413, 2010.

LAI, H. M. X.; CLEARY, M.; SITHARTHAN, T.; HUNT, G. E. Prevalence of comorbid substance use, anxiety and mood disorders in epidemiological surveys, 1990-2014: A systematic review and meta-analysis. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 154, p. 1-13, 2015.

LARANJEIRAS, R.; MADRUGA, C. S.; PINSKY, I.; CAETANO, R.; MITSUHIRO, S. S. II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD). São Paulo: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD), UNIFESP, Relatório. 2012.

LARSSON, F.; WINBLAD, B.; MOHAMMED, A. H. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 73, p. 193-207, 2002.

LIANG, K. C.; LEE, E. H. Y. Intra-amygdala injections of corticotropin releasing factor facilitate inhibitory avoidance learning and reduce exploratory behavior in rats. **Psychopharmacology**, v. 96, p. 232-236, 1988.

LIBERZON, I.; YOUNG, E.A. Effects of stress and glucocorticoids on CNS oxytocin receptor binding. **Psychoneuroendocrinology**, 22 (6): p. 411-22, 1997.

LIBERZON, I.; SRIPADA, C. S. The functional neuroanatomy of PTSD : a critical review. **Progress in Brain Research**, v. 167, n. 7, p. 151–169, 2008.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, 92(2): 180-5,1987.

LOPEZ, M. F.; ANDERSON, R. I.; BECKER, H. C. Effect of different stressors on voluntary ethanol intake in ethanol-dependent and nondependent C57BL/6J mice. **Alcohol**, v. 51, p. 17-23, 2016.

LOWERY, E. G.; SPARROW, A. M.; BREESE, G. R.; KNAPP, D. J.; THIELE, T. E. The CRF-1 receptor antagonist, CP-154,526, attenuates stress-induced increases in ethanol consumption by BALB/cJ mice. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 32, n. 2, p. 240-248, 2008.

MA, Y-Y.; WANG, X.; HUANG, Y.; MARIE, H.; NESTLER, E. J.; SCHLÜTER, O. M.; DONG, Y. Re-silencing of silent synapses unmasks anti-relapse effects of environmental enrichment. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, n. 18, p. 5089 - 5094, 2016.

MACFADYEN, K.; LOVELESS, R.; DELUCCA, B.; WARDLEY, K.; DEOGAN, S.; THOMAS, C.; PERIS, J. Peripheral oxytocin administration reduces ethanol consumption in ratos, **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. V. 140, p. 27-32, 2016.

MANNING, M.; MISICKA, A.; OLMA, A.; BANKOWSKI, K.; STOEV, S.; CHINI, B.; DURROUX, T.; MOUILLAC, B.; CORBANI, M.; GUILLON, G. Oxytocin and vasopressin agonists and antagonists as research tools and potential therapeutics. **Journal of Endocrinology**, v. 24, p. 609-628, 2012.

MARIANNO, P.; ABRAHAO, K. P.; CAMARINI, R. Environmental Enrichment Blunts Ethanol Consumption after Restraint Stress in C57BL/6 Mice. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2017.

MARMOTDOODLES. Some rat colors and markings. Disponível em: http://marmotdoodles.tumblr.com/post/139743043576/some-rat-colors-and-markings-prints-available. Acesso em 09 de outubro de 2018.

MARTINEZ, R. C. R.; CARVALHO-NETTO, E. F.; AMARAL, V. C. S.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTERAS, N. Investigation of the hypothalamic defensive system in the mouse. **Behavioural Brain Research**. v. 192, p. 185-190, 2008.

MCGREGOR, I. S.; CALLAGHAN, P. D.; HUNT, G. E. From ultrasocial to antisocial: a role for oxytocin in the acute reinforcing effects and long-term adverse consequences of drug use? **British journal of pharmacology**, v. 154, n. 2, p. 358–368, 2008.

MCGREGOR, I. S.; BOWEN, M. T. Breaking the loop: Oxytocin as a potential treatment for drug addiction. **Hormones and Behavior**, v. 61, n. 3, p. 331–339, 2012.

MCEWEN, B.S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. **Physiol. Rev.**, v: 87, p. 873-904, 2007.

MELENDEZ, R. I.; MIDDAUGH, L. D.; KALIVAS, P. W. Development of an alcohol deprivation effect and escalation effect in C57BL/6J mice. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 30, n. 12, p. 2017-2025, 2006.

MERLIN, M. D. Archaeological Evidence For The Tradition of Psychoative Plant Use in the old world. **Economic Botany**, v. 57, n. 3, p. 295–323, 2003.

MERLO-PICH, E.; LORANG, M.; YEGANEH, M.; RODRIGUEZ DE FONSECA, F.; RABER, J.; KOOB, G. F.; WEISS, F. Increase Of Extracellular Corticotropin-Releasing Factor-Like Immunoreactivity Levels In The Amygdala Of Awake Rats During Restrain Stress And Ethanol Withdrawal As Measured By Microdyalisis. **The Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 8, p. 5439-5447. 1995.

MEYER-LINDENBERG, A.; DOMES, G.; KIRSCH, P.; HEINRICHS, M. Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, n. 9, p. 524–538, 2011.

MICZEK, K.A.; YAP, J.J.; COVINGTON, H.E. 3rd. Social stress, therapeutics and drug abuse: preclinical models of escalated and depressed intake. **Pharmacology & Therapeutics,** 120(2):102-28, 2008**.**

MISSIG, G.; AYERS, L. W.; SCHULKIN, J.; ROSEN. Oxytocin reduces background anxiety in a fear-potentiated startle paradigm. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, p. 2607-2616, 2010.

MITRA, R.; SAPOLSKY, R. M. Acute corticosterone treatment is sufficient to induce anxiety and amygdaloid dendritic hypertophy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 14, p. 5573-5578, 2008.

NEMEROFF, C. B.; BREMNER, J. D.; FOA, E. B.; MAYBERG, H. S.; NORTH, C. S.; STEIN, M. B. Posttraumatic stress disorder: a state-of-the-science review. **Journal of Psychiatric Research**. v. 40, n. 1, p. 1-21, 2006.

NEUMANN, I. D.; KRÖMER, S. A.; TOSCHI, N.; EBNER, K. Brain oxytocin inhibits the (re)activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in male rats: Involvement of hypothalamic and limbic brain regions. **Regulatory Peptides**, v. 96, n. 1-2, p. 31–38, 2000a.

NEUMANN, I. D.; WIGGER, A.; TORNER, L.; HOLSBOER, F.; LANDGRAF, R. Brain Oxytocin Inhibits Basal and Stress-Induced Activity of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis in Male and Female Rats : Partial Action Within the Paraventricular Nucleus. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 12, n. 27, p. 235–243, 2000b.

NEUMANN, I. D. Brain oxytocin: A key regulator of emotional and social behaviours in both females and males. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, n. 6, p. 858–865, 2008.

NEUMANN, I. D. The advantage of social living: Brain neuropeptides mediate the beneficial consequences of sex and motherhood. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 30, n. 4, p. 483–496, 2009.

NEUMANN, I.D.; LANDGRAF, R. Balance of brain oxytocin and vasopressin: implications for anxiety, depression, and social behaviors. **Trends Neurosci.**, v. 35(11): p. 649-59, 2012.

NEUMANN, I. D.; SLATTERY, D. A. Oxytocin in General Anxiety and Social Fear : A Translational Approach. **Biological Psychiatry**, v. 79, n. 3, p. 213–221, 2016.

NG CHEONG TON M. J.; BROWN, Z.; MICHALAEKAS, A.; AMIT, Z. Stress induces suppression of maintenance but not acquisition of ethanol consumption in rats. **Pharmacol, BiochemBehav**, v. 18, p. 141-144, 1983.

NITHIANANTHARAJAH, J.; HANNAN, A. J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. September, p. 697–709, 2006.

NORMAN, K. J.; SEIDEN, J. A.; KLICKSTEIN, J. A.; HAN, X.; HWA, L. S.; DEBOLD, J. F.; MICZEK, K. A. Social stress and escalated drug self-administration in mice I. Alcohol and corticosterone. **Psychopharmacology**, v. 232, p. 991-1001, 2015.

NOVAES, L. S.; DOS SANTOS, N. B.; BATALHOTE, R. F. P.; MALTA, M. B.; CAMARINI, R.; SCAVONE, C.; MUNHOZ, C. D. Environmental enrichment protects against stress-induced anxiety: Role of glucocorticoid receptor, ERK, and CREB signaling in the basolateral amygdala. **Neuropharmacology**, v. 113, p. 457-466, 2017.

OKUDA, H.; TATSUMI, K.; MAKINODAN, M.; YAMAUHI, T.; KISHIMOTO, T.; WANAKA, A. Environmental Enrichment Stimulates Progenitor Cell Proliferation in the Amygdala. v. 3553, p. 3546–3553, 2009.

OVERSTREET, D. H.; KNAPP, D. J.; BREESE, G. R. Modulation of multiple ethanol withdrawal-induced anxiety-like behavior by CRF and CRF1 receptors. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 77, n. 2, p. 405-413. 2004.

PANG; T. Y.; HANNAN, A. J.; LAWRENCE, A. J. Novel approaches to alcohol rehabilitation: Modification of stress-responsive brain regions through environmental enrichment. **Neuropharmacology** - *In press*

PASSONI, I.; LEONZINO, M.; GIGLIUCCI, V.; CHINI, B.; BUSNELLI, M. Carbetocin is a functional selective Gq agonist that does not promote oxytocin receptor recycing after inducin β-arrestin-independent internalisation. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 28, p. 1-10, 2016.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods**, 14:149–167, 1985.

PETERS, S.; SLATTERY, D.A.; USCHOLD-SCHMIDT, N.; REBER, S.O.; NEUMANN, I.D. Dose-dependent effects of chronic central infusion of oxytocin on anxiety, oxytocin receptor binding and stress-related parameters in mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 42, p. 225-36, 2014.

PIERCE, R. C.; KUMARESAN, V. The mesolimbic dopamine system: The final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 30, n. 2, p. 215–238, 2006.

RADULOVIC, J.; RÜHMANN, A.; LIEPOLD, T.; SPIESS, J. Modulation of Learning and Anxiety by Corticotropin-releasing factor (CRF) and stress: Differential roles of CRF receptors 1 and 2. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 12, p. 5016-5025, 1999.

RAE, M.; ZANOS, P.; GEORGIOU, P.; CHIVERS, P.; BAILEY, A.; CAMARINI, R. Environmental enrichment enhances conditioned place preference to ethanol via an oxytocinergic-dependent mechanism in male mice. **Neuropharmacology**, v. 138, p. 267-274, 2018.

RHODES, J. S.; BEST, K.; BELKNAP, J. K.; FINN, D. A.; CRABBE, J. C. Evaluation of a simple model of ethanol drinking to intoxication in C57BL/6J mice. **Physiology & Behavior**, v. 84, n. 1, p. 53-63, 2005.

ROBISON, A. J.; NESTLER, E. J. Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, n. 11, p. 623–637, 2011.

ROY, V.; BELZUNG, C.; DELARUE, C.; CHAPILLON, P. Environmental enrichment in BALB/c mice. Effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. **Physiology & Behavior**, v. 74, p. 313-320, 2001.

RUEDA, A. V. L.; TEIXEIRA, A. M. A.; YONAMINE, M.; CAMARINI, R. Environmental enrichment blocks ethanol-induced locomotor sensitization and decreases BDNF levels in the prefrontal cortex in mice. **Addiction Biology**, v. 17, p. 746-745, 2012.

SALAMONE, J. D.; PARDO, M.; YOHN, S. E.; LÓPEZ-CRUZ, L.; SANMIGUEL, N.; CORREA, M. Mesolimbic Dopamine and the Regulation of Motivated Behavior. In: Simpson, E.; Balsam, P. (eds) Behavioral Neuroscience of Motivation. Current Topics in Behavioral Neurosciences. Springer, Cham. vol 27. 2015.

SANCHIS-SEGURA, C.; SPANAGEL, R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: An overview. **Addiction Biology**, v. 11, n. 1, p. 2–38, 2006.

SANPEDRO-PIQUERO, P.; CASTILLA-ORTEGA, E.; ZANCADA-MENENDEZ, C.; SANTIN, L. J.; BEGEGA, A. Environmental enrichment as a therapeutic avenue for anxiety in aged wistar rats: effect on cat odor exposition and GABAergic interneurons. **Neuroscience**, v. 330, p. 17-25, 2016.

SARNYAI, Z.; KOVÁCS, G. L. Oxytocin in learning and addiction: From early discoveries to the present. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 119, p. 3–9, 2014.

SELYE, H. The syndrome produced by diverse noxious agents. **Nature**, V. 138, p. 32-34, 1936.

SHUTTERSTOCK. Evil rat – Vector. Disponível em: https://www.shutterstock.com/image-vector/evil-rat-219727843. Acesso em 09 de outubro de 2018.

SILLABER, I.; RAMMES, G.; ZIMMERMANN, S.; MAHAL, B.; ZIEGLGÄNSBERGER, W.; WURST, W.; HOLSBOER, F; SPANAGEL, R. Enhanced and delayed stress-induced alcohol drinking in mice lacking functional CRH1 receptors. **Science**. v. 296: p. 931–933, 2002.

SINCLAIR, J. D.; SENTER, R. J. Increased preference for ethanol in rats following alcohol deprivation. **Psychon. Sci.**, v. 8, n. 1, p. 11-12, 1967.

SOLINAS, M.; CHAUVET, C.; THIRIET, N.; EL RAWAS, R.; JABER, M. Reversal of cocaine addiction by environmental enrichment. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 105, n. 44, p. 17145–17150, 2008.

SOLINAS, M; THIRIET, N; EL RAWAS, R; LARDEUX, V; JABER, M. Environmental Enrichment During Early Stages of life reduces the behavioral, neurochemical, and molecular effects of cocaine. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, p. 1102 - 1111, 2009.

SOLINAS, M.; THIRIET, N.; CHAUVET, C.; JABER, M. Prevention and treatment of drug addiction by environmental enrichment. **Progress in Neurobiology**, v. 92, n. 4, p. 572–592, 2010.

SMITH, S. M.; VALE, W. W. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. **Dialogues ClinNeurosci**. v. 8, n. 4, p. 383-395, 2006.

STAIRS, D. J.; BARDO, M. T. Neurobehavioral effects of environmental enrichment and drug abuse vulnerability. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 92, n. 3, p. 377–382, 2009.

STOOP, R.; HEGOBURU, C.; VAN DER BURG, E. New opportunities in vasopressin and oxytocin research: a perspective from the amygdala. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 38, p. 369-388, 2015.

SZTAINBERG, Y.; KUPERMAN, Y.; LEBOW, M.; CHEN, A. The anxiolytic effect of environmental enrichment is mediated via amygdalar CRF receptor type 1. **Molecular psychiatry**, v. 15, n. 9, p. 905–17, 2010.

THIEL, K.J.; PENTKOWSKI, N.S.; PEARTREE, N.A.; PAINTER, M.R.; NEISEWANDER, J.L. Environmental living conditions introduced during forced abstinence alter cocaine-seeking behavior and Fos protein expression. **Neuroscience**, v. 171: p. 1187–1196, 2010.

TOPS, M.; KOOLE, S. L.; IJZERMAN, H.; BUISMAN-PIJLMAN, F. T. A. Why social attachment and oxytocin protect against addiction and stress: Insights from the dynamics

between ventral and dorsal corticostriatal systems. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 119, p. 39–48, 2014.

TOTH, I.; NEUMANN, I. D.; SLATTERY, D. A. Central administration of oxytocin receptor ligands affects cued fear extinction in rats and mice in a timepoint-dependent manner. **Psychopharmacology**, v. 223, n. 2, p. 149–158, 2012.

URAKAWA, S.; TAKAMOTO, K.; HORI, E.; SAKAI, N.; ONO, T.; NISHIJO, H. Rearing in enriched environment increases parvalbumin-positive small neurons in the amygdala and decreases anxiety-like behavior of male rats. **BMC Neuroscience**, v. 14, n. 13, p. 1–11, 2013.

VALENTINO, R. J.; FOOTE, S. L.; ASTON-JONES, G. Corticotropin-releasing factor activates noradrenergic neurons of the locus coeruleus. **Brain Research**, v. 270, p. 363-367, 1983.

VALENTINO, R. J.; CURTIS, A. L.; PAGE, M. E.; FLORIN-LECHNER, S. M. Activation of the locus coeruleus brain noradrenergic system during stress: circuitry, consequences and regulation. **Advances in Pharmacology**, v. 42, p. 781-784. 1997.

VAN ERP, A. M. M.; MICZEK, K. A. Persistent suppression of ethanol self-administration by brief social stress in rats and increased startle response as index of withdrawal. **Physiology & Behavior**, v. 73, p. 301-311, 2001a.

VAN ERP, A. M. M.; TACHI, N.; MICZEK, K. A. Short or continuous social stress: suppression of continuously available ethanol intake in subordinate rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 12, p. 335-342, 2001b.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 1, n. December, p. 191–198, 2000.

VARGAS, E. V. Fármacos e outros objetos sócio-técnicos: notas para uma genealogia das drogas. In: Labate, B. C.; Goulart, S. L.; Fiore, M.; MacRae, E.; Carneiro, H. (orgs.) Drogas e cultura: novas perspectivas. Parte I, p. 41-64. EDUFBA, Salvador, BR. 2008.

VENGELIENE, V.; BILBAO, A.; SPANAGEL, R. The alcohol deprivation effect model for studying relapse behavior: a comparison between rats and mice. **Alcohol**, v. 48, p. 313-320, 2014.

VENTULANI, J. DrugAddiction. Part I. Psychoactive Substances in the Past and Presence. **Pol J Pharmacol**, v. 53, n. 3, p.201-214. 2001.

VIERO, C.; SHIBUYA, I.; KITAMURA, N.; VERKHRATSKY, A.; FUJIHARA, H.; KATOH, A.; UETA, Y.; ZINGG, H. H.; CHVATAL, A.; SYKOVA, E.; DAYANITHI, G. Oxytocin: Crossing the bridge between basic science and pharmacotherapy. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 16, n. 5, p. 138–156, 2010.

VOLKOW, N. D.; FOWLER, J. S.; WANG, G. The Addicted Human Brain Viewed in the Light of Imaging Studies: Brain Circuits and Treatment Strategies. **Neuropharmacology**, v. 47, p. 3-13, 2004.

VOLKOW, N. D.; MORALES, M. The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. **Cell.** v. 162, n. 13, p. 712-725. 2015.

VOLKOW, N. D.; KOOB, G. F.; MCLELLAN, A. T. Neurobiologic Advances from the Brain Disease Model of Addiction. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 4, p. 363–371, 2016.

WESTERMEYER, J. Historical and Social Context of Psychoactive Substance Use Disorders. In: Mack, A. H.; Brady, K. T.; Miller, . I.; Frances, R. J. (eds) Textbook of

Addictive Disorders. 4ª ed. Cap. 2. The Guildord Press, NY. 2016. - citação de capítulo de livro, ver abnt

WHITAKER, A. M.; GILPIN, N. W.; EDWARDS, S. Animal Models of Post-Traumatic Stress Disorder and Recent Neurobiological Insights. **BehavPharmacol**, v. 25, n. 11, p. 398–409, 2014.

WHITNALL, M. H. Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. **Progress in Neurobiology**, v. 40, p. 573-629, 1993.

WINDLE, R. J.; SHANKS, N.; LIGHTMAN, S. L.; INGRAM, C. D. Central Oxytocin Administration Reduces Stress- Induced Corticosterone Release and Anxiety Behavior in Rats. **Endo**, v. 138, n. 7, p. 2829–2834, 1997.

WINDLE, R. J.; KERSHAW, Y. M.; SHANKS, N.; WOOD, S. A.; LIGHTMAN, S. L.; INGRAM, C. D. Oxytocin Attenuates Stress-Induced c- fos mRNA Expression in Specific Forebrain Regions Associated with Modulation of Hypothalamo – Pituitary – Adrenal Activity. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 12, p. 2974–2982, 2004.

WISE, R.A; ROMPRE, P.P. Brain Dopamine and Reward. **Annu. Rev. Psychol.** v. 40, p. 191-225. 1989.

WITT, D. M.; WINSLOW, J. T.; INSEL, T. R. Enhanced social interactions in rats following chronic, centrally infused oxytocin. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 43, p. 855-861, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guide to Drug Abuse Epidemiology. 2000

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global status report on alcohol and health 2014. **Global status report on alcohol**, p. 1–392, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Drug Report. Executive Summary: Conclusions and Policy Implications. p. 1-35. 2017

YOUNG, K. A.; GOBROGGE, K. L.; WANG, Z. The role of mesocorticolimbic dopamine in regulating interactions between drugs of abuse and social behaviour. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews.** v. 35, p. 498-515, 2011.

YUAN, Z.Y.; GU, P.; LIU, L.; WANG, Y.Y.; LIU, J.; CUI, D.S.; GENG, Y.; ZHANG, Z.X.; ZHU, A.P.; MA, L.; WANG, M.W. Neuroprotective effects of enriched environment in MPTP-treated SAMP8 mice. **Neurosci. Lett.,** 454(1): p. 6-10. 2009.

ZANGROSSI, H. J. R.; FILE, S. E.; Behavioral consequences in animal tests of anxiety and exploration of exposure to cat odor. **Brain Research Bulletin**. v. 29, p. 381-388, 1992.

ZANOS, P.; GEORGIOU, P.; WRIGHT, S. R.; HOURANI, S. M.; KITCHEN, I.; WINSKY-SOMMERER, R.; BAILEY, A. The oxytocin analogue carbetocin prevents emotional impairment and stress-induced reinstatement of opioid-seeking in morphine-abstinent mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, p. 855-865, 2014.