Mariana Beu Rae

Estudo do enriquecimento ambiental na recompensa e na modulação do sistema de oxitocina

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

Mariana Beu Rae

Estudo do enriquecimento ambiental na recompensa e na modulação do sistema da oxitocina

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

Área de concentração: Farmacologia

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

Versão Original

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)

Beu Rae, Mariana

Estudo do enriquecimento ambiental na recompensa e na modulação do sistema de oxitocina / Mariana Beu Rae; orientadora Rosana Camarini. -- São Paulo, 2019.

88 p.

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

1. Enriquecimento Ambiental. 2. Oxitocina. 3. Etanol. 4. Interação Social. 5. Dependência. I. Camarini, Rosana, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Mariana Beu	Rae
Titulo da Dissertação/Tese modulação do sistema de o	: Estudo do enriquecimento ambiental na recompensa e na kitocina
Orientador: Prof ^a Dr ^a Rosan	a Camarini
A Comissão Julgadora dos, consider	trabalhos de Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a ou o(a) candidato(a):
() Aprov	ado(a) () Reprovado(a)
Examinador(a):	Assinatura:
Examinador(a):	Assinatura:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Presidente:	Assinatura:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Cidade Universitària "Armando de Salles Cliverra", Butantili, São Paulo SP - Av Professor Lineu Prestes, 2415 - ICS III - 05508 000 Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail cap@icb usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a solicitação de licença de uso de animais intitulada "O efeito do enriquecimento ambiental e a relação entre sistemas oxitocinérgico e dopaminérgico sobre comportamentos relacionados ao etanol", registrada sob nº 047, nas fls. 32, do livro 03, foi analisada e aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-ICB/USP) em 23 de abril de 2015.

Por esta licença, estão autorizados a manipular animais dentro dos limites do projeto proposto e no âmbito da Lei Federal nº 11.794, o Dr. (Dra.) Rosana Camarini (Investigador Principal) e os membros da equipe Mariana Beu Rae, Gabriel de Araújo Costa. Esta licença de uso de animais expira em 23 / 04 / 2019.

Havendo interesse na renovação da proposta, a solicitação deverá ser protocolada pela secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após essa data, uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that permission for the use of animals was granted to the research proposal *Environmental enrichment and oxytocinergic and dopaminergic systems in ethanol-related behaviors*, registered as Number 047, in pages 32 of book 03, by the local ETHICS COMMITTEE ON THE USE OF ANIMALS (CEUA-ICB/USP) in 04 / 23 / 2015.

Under this license, Rosana Camarini (Principal Investigator) and team members Mariana Beu Rae, Gabriel de Araújo Costa are authorized to make use of animals within the limits of the research proposal presented to this committee and of the Brazilian Federal Law nº 11.794.

This license expires in 04 / 23 / 2019. In case the investigators wish to renew this license, this must be presented to CEUA-ICB/USP before the last day of validity of the present license. After such date, a new research proposal must be presented.

São Paulo, 23 de abril de 2015.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima Coordenador-CEUA- ICB/USP Profa. Dra. Ana Paula Lepique Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico este trabalho à minha mãe, Rosa, meu irmão, Jeffrey, ao Rodrigo e à minha família por todo amor, apoio e dedicação.

AGRADECIMENTOS

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

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

Agradeço a professora Lakshmi Devi que aceitou me receber em seu laboratório no Hospital Mount Sinai, nos EUA e que demonstrou plena confiança em mim. Agradeço as palavras, as conversas, conselhos, ensinamentos e a oportunidade.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório dos Estados Unidos, Mariana, Lindsay, Amanda, Nikita, Achla, Ivone, Seshat, Chenge, Andrei, Jeshua e Ali a quem eu também já posso chamar de amigos. Tê-los lá tornou tudo muito mais fácil e divertido. Além disso, a ajuda deles foi fundamental para a realização do meu projeto. Agradeço muito a generosidade e a paciência.

Agradeço aos professores que colaboraram com o meu trabalho durante o meu exame de qualificação: Prof. Carolina Munhoz, Prof. Jorge Florio e Prof. Pedro Augusto Fernandes.

Agradeço os animais utilizados na realização desse projeto. Espero que esses resultados mostrem que a vida deles não foi em vão.

Agradeço a CAPES e o CNPq pelo apoio financeiro, sem o qual não teria sido possível realizar o projeto.

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

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

Agradeço ao meu pai, John, que em vida sempre me deu todo o apoio que um pai poderia dar, seja no âmbito pessoal como no profissional. Sem você eu não seria a pessoa que eu sou. Agradeço agora, de onde você estiver, por me iluminar, me abençoar e me proteger e continuar me dando a força necessária para trilhar meu caminho. Nunca vou conseguir expressar a minha gratidão por você. Obrigada por em vida ter pensado no futuro dos seus filhos, permitindo que eu realizasse os meus sonhos, mesmo sem você por perto. Te amo muito e o amor transcende o plano físico!

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

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

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

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

"Para adquirir conhecimento, deve-se estudar; mas para adquirir sabedoria, deve-se observar"

Marilyn vos Savant

RESUMO

Rae MB. Estudo do enriquecimento ambiental na recompensa e na modulação do sistema da oxitocina. [tese (Doutorado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2019.

A dependência tem como um dos fatores chaves a questão social. O enriquecimento ambiental (EA) promove aumento da interação social e apresenta efeitos positivos sobre a dependência. A OT (oxitocina) é responsável pela modulação da sociabilidade e está associada a manutenção do equilíbrio entre o valor recompensador do estímulo social e das drogas, corrompido durante a dependência. Camundongos Swiss machos adultos foram separados em dois grupos: controle (CT) e EA por 21 dias antes da realização dos testes. A interação e comportamento social avaliados pelos testes de Crawley e do tubo de dominância encontram-se aumentados no grupo EA, comparado com CT. A preferência condicionada a lugar foi adaptada e realizada com etanol vs estímulo social e revelou maior preferência pelo etanol no grupo EA e no grupo tratado com o análogo de OT, carbetocina. A motivação foi avaliada usando o teste de Food Enticing e revelou menor interação com alimento palatável nos animais enriquecidos. Por fim, a análise da expressão gênica através de qPCR mostrou que o EA promove aumento da expressão de OT e VP no hipotálamo e no estriado, respectivamente, além de diminuir a ativação de OTR no estriado, utilizando o ensaio de dosagem de PLC. Devido a semelhança estrutural entre os sistemas de OT e VP, foi realizado o teste de dosagem de Ca²⁺ para estudar a interação cruzada entre esses sistemas. A OT foi capaz de ativar receptores V1a com maior eficácia do que a VP ativando OTR. Finalmente, podemos concluir que o ambiente enriquecido é capaz de modular a interação social e a motivação dos animais e de aumentar a preferência pelo etanol frente a um estímulo social, além de modular a expressão gênica de oxitocina e vasopressina, que podem estar envolvidos com diferenças comportamentais observadas.

Palavras-chaves: Enriquecimento ambiental. Oxitocina. Etanol. Interação social. Dependência.

ABSTRACT

Rae MB. Study of environmental enrichment on reward and modulation of the oxytocinergic system. [Doctoral thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2019.

Drug addiction presents sociability as a key point. Environmental enrichment (EE) promotes social interaction and shows protective effects upon drug abuse. Oxytocin (OT) is responsible for the modulation of sociability and is linked to the maintenance of the balance between the reward value of social and drug stimuli, which is corrupted during addiction. Male adults' Swiss mice were separated in 2 groups: control (CT) and EE during 21 days before the following tests were performed. Here, social interaction and behavior, evaluated using Crawley test and social dominance tube test, were higher in enriched animals, compared to controls. Conditioned place preference test was modified and performed using alcohol vs social stimulus and showed higher preference for alcohol in EE animals and animals treated with an OT analogue, carbetocin. Motivation was explored through Food Enticing test, and reveled lower interaction with palatable food in enriched animals. Finally, gene expression analysis using qPCR revealed that EE promotes increase in expression of OT and VP in the hypothalamus and striatum, respectively, as well as decrease activation of OTR in the striatum, evaluated by using a PLC assay. Due to the similarities between OT and VP systems, Ca²⁺ release assay was used to study the cross-talk between both systems. OT was able to activate V1a with higher efficacy then VP activating OTR. Lastly, we were able to conclude that an enriched environment is capable of modulating social interaction, and motivation in animals and increase alcohol place preference over social preference, alongside modualting the increase of OT and VP, which could be involved with the behavioral changes observed.

Keywords: Environmental enrichment. Oxytocin. Ethanol. Social interaction. Drug addiction.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - graus celsius

aa - Aminoácido

AC- Adenilato ciclase

ACTH- hormônio adrenocorticotrófico

AMPc- Monofosfato de adenosina cíclico

ANOVA- Análise de Variância

Ans - aspargina

Ant - antagonista

Arg – Arginina

AVE- acidente vascular encefálico

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

BNST - Bed nucleus of the stria termianlis

Ca2+ - íon de cálcio

CamKII- cálcio-calmodulina quinase II

CBT - Carbetocina

CEBRID- Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas

CEUA- Comitê de Ética no Uso de Animais

CHO – chinease hamster ovary (ovário de hamster chinês)

cm - Centímetro

CPF- cortex pré-frontal

CPP- Preferência condicionada a lugar (conditioned place preference)

CRF- fator liberador de corticotrofina

CT- Controle

Cys – cisteína

D- dia de tratamento

DA - Dopamina

DAG – diacilglicerol

∆- delta

DNA - ácido desoxirribonucleico

DS – Estriado dorsal

EA- Enriquecimento ambiental

EC₅₀ – Concentração efetiva

ELISA- Enzyme-linked Immunosorbent Assay

E_{max} – Efeito máximo

g - Gravidade

GABA- Ácido γ-aminobutírico

Gi – Proteína G inibitória

Gln – glutamina

Gly – glicina

GLzM – Modelo linear generalizado

GPCR - Receptor acoplado à proteína G

G_q – Proteína G quinase

Gs - Proteína G estimulatória

h - Horas

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

HPA – eixo Hipotálamo Pituitária Adrenal

HPA- hipotálamo-pituitária-adrenal

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

lle - isoleucina

IP3 - inositol trifosfato

IS - Fosfato de Inositol

Kd – Constante de dissociação

Ki – Constante de inibição

Leu - leucina

LS – Septo lateral

M - Molar

MgCI- cloreto de magnésio

mL- mililitro

mM - milimolar

mRNA – RNA mensageiro

n- número de animais por grupo

NAc- Núcleo Accumbens

nM - nanometro

NMDA- N-metil D-aspartato

OMS- Organização Mundial da Saúde

OT- Oxitocina

OTR- Receptor de oxitocina

p- nível de significância estatístico

PCR – polimerase chain reaction (reação de polimerase em cadeia)

pH – potencial hidrogeniônico

Phe-fenilalanina

PKA - Fosfoquinase A

PKC – Fosfoquinase C

PLC - Fosfolipase C

Pro – prolina

PVN- Núcleo para-ventricular

RD- Razão de discriminação

RNA – ácido ribonucleico

SON- Núcleo supra-óptico

CS+hab - Tempo gasto no compartimento pareado no dia da habituação da CPP

CS+teste- Tempo gasto no compartimento pareado no dia do teste da CPP

Tyr - tirosina

UK – United Kingdom (Reino Unido)

μL – microlitro

µM – micromolar

USA – United States of America (Estados Unidos da América)

V1a - Receptor de Vasopressina do subtipo 1a

V1b - Receptor de Vasopressina do subtipo 1b

V2 - Receptor de Vasopressina do subtipo 2

VP - Vasopressina

VPR - Receptor de Vasopressina

VS - Estriado ventral

VTA- área ventral do tegmento mesencefálico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇAO	18
1.1 Dependência e etanol	18
1.2 Enriquecimento Ambiental e dependência	19
1.3 Oxitocina e os mecanismos neuronais envolvidos na proteção frente uso de drogas de abuso	
1.3.1 Sistema oxitocinérgico e vasopressinérgico	21
1.3.1.1 Síntese e liberação dos peptídeos	23
1.3.1.2 Receptores e mecanismos de sinalização	24
1.3.1.3 Afinidade de ligantes pelos receptores	27
1.3.1.4 Localização dos receptores	27
1.3.1.5 OT, VP e comportamento	28
2 OBJETIVOS	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Animais	30
3.2 Condições de alojamento	31
3.3 Droga, agonistas e antagonistas	31
3.4. Preferência condicionada ao lugar (conditioned place preference, em inglês (CPP))	
3.5. Teste de Três Câmaras de Interação Social (Teste de Crawley)	35
3.6. Teste do Tubo de Dominância Social	36
3.7. Teste da Tábua de Buracos	37
3.8. Food Enticing	37
3.9. Ensaio para determinação de Fosfolipase C (PLC)	38
3.9.1 Preparo das membranas	38
3.9.2 Ensaio de PLC	38
3.10. Análise da expressão gênica	39
3.10.1 Preparo das amostras	39
3.10.2 Transcricão Reversa	39

3.10.3 Análise dos dados de expressão gênica40	
3.11. Ensaio para determinação de liberação de Ca2+ intracelular (FLIPR®)41	
3.11.1. Preparo das células41	
3.11.2 Ensaio de Ca ²⁺ intracelular41	
3.12 Análise dos Resultados42	
4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	
4.1. Experimento 1 – Efeitos do EA sobre os efeitos recompensadores de estímulo social e ao etanol	
4.2. Experimento 2 – Efeitos da CBT sobre os efeitos recompensadores do estímulo social vs etanol	
4.3. Experimento 3 – Efeitos do EA sobre o teste de interação social44	
4.4. Experimento 4 – Efeitos do EA sobre comportamentos relacionados à motivação de busca por alimentos comuns e palatáveis44	
4.5. Experimento 5 – Efeitos do EA sobre comportamentos relacionados à atividade exploratória, locomoção e ansiedade e dominância social45	
4.6. Experimento 6 – Efeitos do EA sobre atividade de PLC na presença de OT no estriado e expressão gênica de V1a, V1b, VP, OTR e OT no hipotálamo e estriado	
4.7. Experimento 7 – Análise da resposta cruzada entre OT e VP e seus receptores V1a e OTR, respectivamente, na liberação de Ca2+47	
5 RESULTADOS47	
5 RESULTADOS	
5.1. Resultados das análises comportamentais	
5.1. Resultados das análises comportamentais	

5.1.7 Efeitos do EA sobre comportamentos relacionados à exploração, lo ansiedade	•
5.2 Resultados das análises bioquímicas	56
5.2.1 Efeitos do EA sobre ativação de PLC mediada por OTR	56
5.2.2 Efeitos do EA sobre a expressão gênica de vasopressina (VP) e rece	ptores V1a,
V1b, oxitocina (OT) e OTR no hipotálamo e estriado	57
5.2.3 Análise da resposta cruzada entre OT e VP e seus receptores \	/1a e OTR,
respectivamente, na liberação de Ca2+	59
6 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS	77

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dependência e etanol

O abuso de etanol é tido como um dos principais problemas de Saúde Pública do mundo, com consequências socioeconômicas e de saúde. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o consumo de etanol está relacionado a mais de 200 doenças e lesões, entre elas câncer de esôfago e fígado, cirrose hepática, epilepsia e acidentes, além de causar 3 milhões de mortes (5,3% do total) mundialmente (*Global Status Report on Alcohol and Health*, 2018).

A dependência é uma doença complexa, influenciada por fatores genéticos, ambientais e sociais (Kendler, 2001) e é caracterizada pelo uso compulsivo de droga e perda de controle sobre sua administração (Koob, 2008; Milton et. al, 2012). De acordo com a teoria de George Koob e colaboradores (2009), a dependência consiste em três estágios: intoxicação, abstinência e antecipação. A impulsividade predomina nos primeiros estágios e está associada com mecanismos de reforço positivo. A procura compulsiva pela droga se deve principalmente ao seu reforço negativo, definido como um aumento na probabilidade de consumir a droga para aliviar um estado emocional negativo (Koob e Volkow, 2010).

O efeito recompensador do etanol pode ser explicado pelas suas propriedades como regulador alostérico positivo do receptor ionotrópico do aminoácido GABA (ácido γ-aminobutírico) (receptor GABAA) (Harris et al., 2008). Além do seu efeito no receptor GABAA, o etanol também atua como um regulador alostérico negativo do receptor de glutamato NMDA (Fadda e Rossetti, 1998) e também é capaz de ativar o sistema dopaminérgico mesolímbico de recompensa. Esse sistema consiste de neurônios dopaminérgicos da área ventral do tegmento mesencefálico (VTA) que se projetam para regiões como núcleo accumbens (NAc), córtex pré-frontal (CPF), amígdala e hipocampo (Ron e Jurd, 2005).

As drogas de abuso utilizam de circuitos neuronais geralmente envolvidos em motivação, prazer e aprendizado (Robinson e Berridge, 2003). Em relação ao último, Milton et al. (2012) mostraram que a dependência pode ser vista como um distúrbio de aprendizagem aberrante na formação de memórias instrumentais que ligam ações

de procura e consumo da droga expressas como hábitos persistentes em resposta a um estímulo. Dessa forma, estímulos ambientais neutros são associados com estados de euforia (ou de sintomas de abstinência) por condicionamento pavloviano. A formação desse tipo de memória seria responsável pela propensão a recaídas mesmo após um longo período sem o indivíduo fazer uso da droga. Uma vez re-expostos às pistas ambientais associadas a drogas de abuso, o comportamento de busca pela droga pode ser reiniciado mesmo depois de anos de abstinência (Zhao et al., 2013).

Diversos fatores já foram propostos como contribuintes no início e manutenção do consumo da droga, entre eles condições psiquiátricas, ansiedade, estresse (Sinha, 2008). Nessa mesma linha, já foi mostrado que alterações sociais como personalidade antissocial, exclusão social, isolamento e transtorno de conduta são fatores de risco proeminente para desenvolvimento da dependência (Trezza et al., 2014).

Por outro lado, é crescente o número de estudos na literatura que apontam para os efeitos protetor e terapêutico decorrentes de exposição a ambientes e estímulos positivos, tanto em animais quanto em humanos (Hops et al., 1999; Stairs e Bardo, 2009; Trezza et al., 2014). Um exemplo bem estabelecido de como o estímulo positivo contribui para o tratamento da dependência de drogas são os encontros e reuniões promovidos por grupos de igreja, comunidade e de narcóticos/alcoólicos anônimos ou pela integração destes. Um dos efeitos exercidos pelos encontros é o aumento da interação social, que permite que os membros aprendam, aos poucos, como se conectar uns aos outros, sem a intervenção da droga como desinibidor social (Koerner, 2010).

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

1.2. Enriquecimento ambiental e dependência

Animais mantidos em um ambiente enriquecido são expostos a uma maior complexidade de estímulos físicos e sociais do que aqueles mantidos em caixas padrão, ou seja, o EA propicia estimulação sensorial, motora e cognitiva (Nithianantharajah e Hannan, 2006). Os animais ficam acondicionados em caixas maiores que as caixas padrões com objetos para exploração (cubos, brinquedos,

túneis, casas) e atividade física voluntária, como rodas e escadas. Diversos estudos mostram que os animais expostos ao enriquecimento apresentam maior neuroplasticidade, o que inclui aumento do tamanho celular, maior neurogênese, ramificação dendrítica, gliogênese e aumento da formação de sinapses em diversas estruturas cerebrais, como córtex pré-frontal e hipocampo (Simpson et al., 2011; Van Praag et al., 2000). Além disso, o EA aumenta os níveis de fatores neurotróficos, especialmente do fator neutrófico derivado do encéfalo (BDNF), altamente ligado a aprendizado e memória no hipocampo (Simpson et al., 2011). Outros trabalhos mostram a importância do EA para o estudo e desenvolvimento de tratamento de diversas patologias, como doença de Huntington (Van Dellen et al., 2000), doença de Alzheimer (Arendash et al., 2004), acidente vascular encefálico (AVE) (Risedal et al., 2002), e câncer (Cao et al., 2010).

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

Mais especificamente em relação ao etanol, estudo no nosso laboratório demonstrou que o EA foi capaz de prevenir o desenvolvimento da sensibilização comportamental induzida pela droga assim como reverter a sensibilização já estabelecida previamente (Rueda et al., 2012). Além disso, mostramos também que o EA é capaz de diminuir o consumo de etanol em animais C57BL/6 após exposição a estresse (Marianno et al., 2017).

Os mecanismos pelos quais o EA atua na dependência não estão totalmente esclarecidos. Resultados obtidos em nosso laboratório mostraram que camundongos expostos ao EA por 21 dias sofreram modulação do sistema oxitocinérgico, apresentando diminuição da ligação de receptores de OT em regiões olfatórias e corticais, no teste da autorradiografia. Além disso, também foi mostrado um aumento de OT no hipotálamo inferindo que houve uma resposta fisiológica ao aumento da concentração de OT nessas regiões, levando, portanto, à diminuição da quantidade de receptores (Rae et al., 2018). É possível que essas alterações contribuam para a

ação do EA sobre a dependência, uma vez que é crescente o número de trabalhos mostrando efeito da oxitocina sobre abuso de drogas (McGregor e Bowen, 2012, Sarnyai, 2011).

1.3. Oxitocina e os mecanismos neuronais envolvidos na proteção frente ao uso de drogas de abuso

É crescente o número de estudos que destacam a importância da oxitocina (OT) sobre o processo de dependência, ainda que os mecanismos de sua atuação ainda não estejam bem estabelecidos.

Já é bem estabelecido o papel da OT na amamentação, parto, gravidez, instinto maternal e formação de pares sexuais, além de emoção, humor, comportamento sexual e social, bem como memória e aprendizado (Gimpl e Fahrenholz, 2001). Em particular, a OT promove contato e memória social e exerce efeito anti-agressividade e antidepressivo em roedores (Zanos et al., 2013). Este aspecto parece relevante no processo de dependência, uma vez que os usuários de drogas frequentemente se excluem do convívio social. Por outro lado, relacionamentos e interações sociais saudáveis, as quais estão relacionadas a um maior nível de OT, poderiam ter um efeito protetor no processo de uso de drogas (McGregor e Bowen, 2012), como ocorre em grupos de apoio.

Para que ocorra a interação social e formação de laços, é preciso que haja diminuição da ansiedade e agressividade causada pelo encontro inicial com outro animal. Em seguida, é preciso formar memória de reconhecimento desse animal, para que ele deixe de ser visto como um animal "desconhecido" e evitar a reação de ansiedade e agressividade. Ambos comportamentos são mediados pela ação da OT na amígdala e no bulbo olfatório, respectivamente (Johnson e Young, 2015). Como os roedores são animais sociais, a interação social é interpretada como algo recompensador e ativa a liberação de DA no NAc e estriado (Keverne e Curley, 2004; Oettl et al., 2016; Johnson e Young, 2015). Dessa forma, fica clara a coparticipação da OT e DA na modulação de um mesmo comportamento. Além disso, já foram descritas vias oxitocinérgicas que se conectam com o NAc (Xiao et al., 2017), em que neurônios oxitocinérgicos se projetam do PVN para o NAc (Dölen et al. 2013), ou se projetam para a VTA, resultando no aumento da liberação de DA também no accumbens (Melis et al., 2007). Em relação às drogas de abuso, diversos trabalhos já

apontaram para o papel protetor da OT sobre a dependência. Peters e colaboradores (2016) demonstraram que a OT pode atuar diretamente diminuindo a liberação de DA no NAc frente ao estímulo recompensador, como o etanol, por exemplo. Portanto, o papel da OT como protetor do desenvolvimento da dependência parece estar ligado com seu papel como modulador da DA. Assim, ambos esses sistemas interagem para afetar o valor recompensador do estímulo social (Shahrokh et al., 2010; Young e Wang, 2004) e de recompensa de drogas (Young et al., 2011). Essa interação pode ser responsável pelo equilíbrio entre recompensa social e de drogas de abuso (Buisman-Pijlman et al., 2014), ou seja, reforçar os laços afetivo-sociais pode levar a um *shift* entre o comportamento de busca por recompensa oriunda do uso da droga pela recompensa resultante da formação de vínculos sociais (McGregor e Bowen, 2012).

Portanto, para compreender a participação da oxitocina em efeitos recompensadores, faz-se necessário avaliar como se comporta esse sistema em regiões encefálicas relacionadas à motivação e recompensa, como o NAc e estriado.

Em decorrência da alta semelhança estrutural e funcional da oxitocina com a vasopressina (VP), torna-se relevante a maior compreensão de como esses dois sistemas podem ser afetados de forma cruzada, conforme discutido a seguir.

1.3.1 Sistema oxitocinérgico e vasopressinérgico

A OT tem uma proximidade estrutural e funcional com a VP, um outro neuropeptídio modulador do sistema nervoso central. Oxitocina e vasopressina então entre os primeiros peptídeos a serem isolados e descritos. Em 1895, Oliver e Schafer descreveram uma substância pituitária que aumentava a pressão arterial, que mais tarde seria chamada de vasopressina. Sir Henry Dale, em 1906, isolou um peptídeo responsável pela contração uterina, que posteriormente foi denominado de oxitocina (do grego "parto rápido"). Somente em 1953 du Vigneaud e colaboradores identificaram a estrutura e sequencia de nove aminoácidos de ambos peptídeos. No ano seguinte, du Vigneaud descreveu suas sínteses (Jurek e Neumann, 2018). Ambos peptídeos foram descritos como tendo estruturas e sequencia de aminoácidos muito semelhantes, tornando possível uma interação entre os sistemas. Os dois possuem 9 aminoácidos, e a mesma sequência de aminoácidos, com exceção dos aminoácidos (aa) da posição 3 e 8. A OT possui os aa isoleucina e leucina, enquanto a VP possui

fenilalanina e arginina, respectivamente. Em ambos, cisteínas na posição 1 e 6 são ligadas por pontes dissulfeto, formando um anel (Song e Albers, 2018). Além disso, porcos e algumas espécies de roedores possuem uma lisina na posição 8 da VP, por esse motivo a VP humana é também conhecida por Arginina-VP e a outra como Lisina-VP (Stoop, 2012). Neste trabalho, VP será usada para se referir a Arg-VP. A semelhança também é encontrada nos receptores desses peptídeos, que apresentam um nível de 40-85% de similaridade entre eles (Chini e Manning, 2007). Portanto, trabalhos que focam em determinar a afinidade e a possível ativação cruzada entre OT, VP e seus receptores são extremamente válidos e necessários.

Além das funções previamente descritas, novos estudos sobre as funções centrais da OT e VP revelaram que ambos aparentam estar envolvidos na modulação de comportamentos similares, tanto potencializando como atuando de forma antagônica um ao outro.

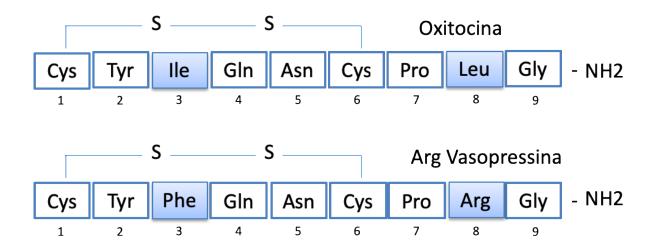


Figura 1. Esquema da sequência de aminoácidos das moléculas de oxitocina e vasopressina. Os aminoácidos destacados representam as diferenças entre as moléculas.

1.3.1.1 Síntese e liberação dos peptídeos

OT e VP são sintetizados primariamente em neurônios magnocelulares e parvocelulares localizados nos núcleos supraótico (SON) e paraventriclar (PVN) e acessórios do hipotálamo, que possuem projeções para a neurohipófise (Lee et al., 2009). De lá, são secretados na corrente sanguínea e atuam no sistema periférico,

regulando parto, lactação e função renal, respectivamente (Kimura et al., 1992; Koshimizu et al., 2012). Essas regiões hipotalâmicas também possuem projeções para diversas regiões encefálicas, como córtex, amígdala, *bed nucleus of the stria terminalis* (BNST), VTA, NAc e bulbo olfatório (Veenema and Neumann, 2008). Apesar de estímulos externos, como estresse, estimularem a liberação de OT e VP tanto central como periférica, existe uma dinâmica temporal diferente no padrão de liberação desses peptídeos. Além disso, também já foi descrita a síntese de VP na amígdala e na BNST (Veenema and Neumann, 2008).

A grande maioria dos neurônios magnocelulares expressam mRNA para ambos OT e VP, sugerindo uma co-expressão de ambos os peptídeos. Entretanto, sob circunstâncias externas, pode haver variação na expressão de mRNA de um peptídeo e não do outro, o que indica que a síntese é independente (Scott e Brown, 2011). Ainda, o padrão de liberação de VP e OT parece ser diferente. A estimulação elétrica de neurônios oxitocinérgicos aumenta a liberação de OT proporcionalmente à intensidade do estímulo. Já a VP tem um pico de liberação com baixo estímulo seguido de um platô (Bicknell, 1988). Levando isso em consideração, é possível hipotetizar que a liberação de ambos acontece de forma independente.

Os genes de OT e VP são expressos no mesmo cromossomo, mas em ordem inversa (Donaldson and Young, 2008). A ativação do gene de OT se traduz em pró-oxitocina, que contém um peptídeo de sinalização, a OT propriamente dita e a neurofisina I. Por sua vez, a VP é traduzida em pró-vasopressina, que contém um peptídeo de sinalização, a vasopressina, neurofisina II e uma cadeia de glicoproteína. Ambos são clivados dentro da vesícula secretora em OT e VP, respectivamente. As neurofisinas auxiliam no tráfego desses peptídeos para as vesículas secretoras, mas uma vez que a clivagem acontece, parece não terem função biológica por si só (Stoop, 2012). A liberação desses peptídeos ocorre por um processo dependente de Ca²+ (Koshimizu et al., 2012).

1.3.1.2 Receptores e mecanismos de sinalização

Receptores de OT e VP são receptores acoplados a proteína G (GPCR). A ativação desse tipo de receptor inicia uma sinalização *downstream*, via ativação enzimática (Rosenbaum et al., 2009).

Somente um tipo de receptor de OT (OTR) foi caracterizado. No encéfalo, o OTR é acoplado à proteína G_{q/11}, aumentando os níveis de PLC e ativando inositol-3-fosfato (IP3), 1,2 diacyl-glycerol, o que promove liberação de Ca²⁺ de vesículas intracelulares e ativação de PKC, respectivamente (Gimpl e Fahrenholz, 2001). Além disso, OTR também podem se acoplar à proteína G_i, diminuindo as concentrações intracelulares de AMPc e PKA, e, portanto, a excitabilidade neuronal (Busnelli et al., 2012).

A ativação das diferentes proteínas G parece ser dose-dependente. Busnelli e colaboradores (2012) mostraram que concentrações baixas de OT facilitam ativação de OTR Gq, enquanto doses maiores são necessárias para a ativação de Gi ou Go. Essa informação é relevante, pois pode ajudar a explicar os diferentes efeitos da ativação do sistema oxitocinérgico, dependendo do contexto em que a OT é liberada.

Em relação à VP, três tipos de receptores foram clonados: V1a, V1b e V2. O receptor V2 se encontra no sistema periférico, portanto não será discutido aqui (Koshimizu et al., 2012). Ambos V1a e V1b também são acoplados à proteína Gq/11 e causam as mesmas alterações intracelulares citadas acima (Zingg e Laporte, 2003). Entretanto, no caso do receptor V1b, já foi descrito que sua densidade pode afetar o tipo de proteína G que ele se acopla. Por exemplo, uma baixa densidade de V1b facilita o acoplamento com proteína Gq, enquanto alta densidade facilitaria o acoplamento com proteína Gs, que também induz ativação celular, mas via aumento de AMPc e PKA (Thibonnier et al., 1998). Como e se ativação dos receptores via acoplamento a diferentes proteínas G afeta comportamento e respostas fisiológicas ainda precisa ser elucidado.

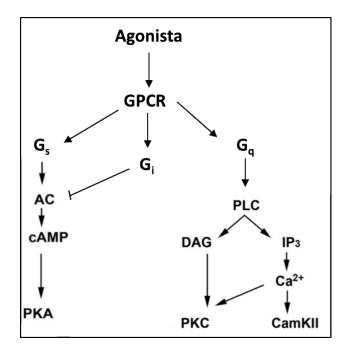


Figura 2. Esquema da resposta celular *downstream* após ligação do agonista com receptor acoplado à proteína G_s, G_i e G_q.

Depois de serem ativados, GPCRs são dessensibilizados via um mecanismo de fosforilação. Isso é importante para encerrar a resposta e prevenir que a célula responda por mais tempo que o necessário. Frente à ativação contínua, OTRs e VPRs são internalizados via mecanismo dependente de clatrina, que tem início com o recrutamento de β-arrestina (Busnelli et al., 2013). Depois de internalizados, a maioria dos OTRs não são reciclados, e a síntese de novos receptores é necessária. Por outro lado, β-arrestina se dissocia rapidamente de receptores V1a, permitindo que este volte à membrana celular (Birnbaumer, 2000; Stoop, 2012). Em relação ao receptor V1b, utilizando ensaio em células CHO, foi demonstrado que após o tratamento com o agonista (VP) cerca de 80% de receptores V1b foram internalizados, enquanto apenas cerca de 30% de V1a não estavam na superfície celular (Kashiwazaki et al., 2015). Essas diferenças no processo de internalização e reciclagem podem ser responsáveis pelas diferenças em expressão e ativação dos receptores e consequentemente do comportamento modulado por eles.

1.3.1.3 Afinidade de ligantes pelos receptors

Uma das formas de se analisar a afinidade de uma substância a um dado receptor é através da constante de inibição (Ki). Nesse caso, quanto menor o valor do Ki, maior a afinidade e menor concentração da droga é necessária para produzir um efeito. Seu valor é dependente do EC₅₀ (concentração efetiva) e Kd (constante de dissociação).

Diversos estudos utilizando ensaios de fosfato de inositol (IS) e adenilato ciclase forneceram informações sobre a especificidade de OT e VP para receptores OT, V1a e V1b em ratos, camundongos e humanos (Chini et al., 1995; Derick et al., 2002; Manning et al., 2012). De forma mais detalhada, a OT parece ter maior afinidade pelo OTR, mas baixa afinidade pelos três tipos de VPRs. Por outro lado, OTR aparenta ser menos seletivo, uma vez que VP possui afinidade por esse receptor (ainda que menor que a OT em si). De fato, foi apontada uma diferença de aproximadamente 10 vezes entre os valores de Ki da ligação entre VP e receptor V1a e OTR. Por outro lado, os valores de Ki para a ligação de OT em receptores de oxitocina é de 10-100 vezes menores do que os valores da ligação entre OT e V1a (Kashiwazaki et al., 2015) o que pode implicar em uma atividade oxitocinérgica mediada por VP. Também foi demonstrado que OT é capaz de ativar V1b no eixo HPA, mas que VP não possui efeito em OTRs nessa região (Koshimizu et al., 2012). Portanto, é possível que a afinidade dos peptídeos pelos receptores seja região-dependente.

1.3.1.4 Localização dos receptors

OTR é expresso de forma ampla no encéfalo incluindo, mas não de forma exclusiva, amígdala central e basolateral, bulbo olfatório, NAc, VTA, hipotálamo, hipocampo, BNST, córtex frontal, córtex piriforme, septo lateral e estriado em roedores. Essas regiões estão envolvidas em comportamentos como ansiedade, sociabilidade, memória, recompensa, motivação e estresse, que podem ser modulados pela OT (Gimpl et al., 2012; Viero et al., 2010).

Em relação aos VPRs, apesar dos três subtipos (V1a, V1b e V2) terem sido caracterizados, no sistema nervoso central, a maior parcela da modulação causada por VP se dá por meio da ativação do receptor V1a (Johnson e Young, 2017). Assim como OTRs, V1a também é altamente expresso no cérebro em regiões como: bulbo

olfatório, hipocampo, septo lateral (LS), núcleo supraquiasmático, habenula lateral, VTA, núcleo da rafe, *locus coeruleus* e substância negra (Caldwell et al., 2008). A colocalização de OTRs e VPRs pode ser responsável pelos efeitos de VP e OT em comportamentos comuns, além de permitir que haja ativação cruzada entre os peptídeos e seus receptores (Song e Albers, 2018).

O receptor V1b é especialmente importante na regulação do eixo-HPA, ativando e estimulando a liberação de CRF e ACTH (Surget e Belzung, 2008). Entretanto, sua presença também foi descrita no bulbo olfatório, córtex piriforme, septo, hipocampo e cerebelo (Caldwell et al., 2008).

Cabe ressaltar que devido à semelhança estrutural tanto dos peptídeos como dos seus receptores, não se tem ainda anticorpos de alta especificidade que permita estudar a localização dos receptores de forma mais eficiente. Por isso, estudos ainda divergem sobre a distribuição encefálica desses receptores (Manning et al., 2012). Com o passar do tempo, síntese laboratorial de peptídeos com maior especificidade tem contribuído para avançar os estudos nessa área.

1.3.1.5 OT, VP e comportamento

Devido à semelhança estrutural e co-localização dos receptores em regiões encefálicas, é esperado que ambos os peptídeos atuem sobre modulação de comportamentos em comum. De fato, trabalhos realizados sobre ansiedade, comportamento social, aprendizado e memória, além de dependência a diversas drogas de abuso mostram que OT e VP podem atuar de forma sinérgica ou antagônica, dependendo do comportamento e situação estudados.

De forma resumida, estudos sugerem que tanto VP quanto OT são responsáveis pela memória social e comportamento materno (OT está envolvida na formação de laços entre mãe e filhotes, enquanto a VP age aumentando a agressividade necessária para a mãe proteger seus filhotes) (Bosch e Neumann, 2012). Em relação à formação de pares, a distribuição de receptores de OT no encéfalo difere entre espécies monogâmicas e poligâmicas (Insel e Shapiro, 1992). Por sua vez, a maioria dos estudos sobre comportamento social em machos foca no papel da vasopressina como mediador, incluindo comportamento agressivo e "flank marking" (fenômeno que envolve liberação de feromônios através de glândulas, geralmente com a finalidade de marcar território) (Albers e Bamshad, 1998).

Um exemplo clássico de efeito antagônico desses peptídeos é seus efeitos sobre estresse e ansiedade. Enquanto OT é liberada durante estímulo estressor, ela se liga em receptores da amígdala diminuindo sua ativação. Por outro lado, a VP é liberada durante o estresse, aumentando a resposta do eixo HPA, ampliando o efeito do CRF e promovendo maior liberação de ACTH (Makino et al., 1995). Como já foi citado anteriormente, o receptor V1b está altamente envolvido nesse efeito (Serradeil-Le Gal et al., 2002). Ainda, cabe citar que estudos realizados em animais KO para V1a mostraram que eles têm uma diminuição no comportamento tipo ansioso no teste de labirinto em cruz elevado e *marble burying* (enterrar bolinhas) (Bielsky et al., 2004; Egashira et al., 2007). Portanto, o tipo de receptor ativado e sua localização aparentam estar relacionados com o comportamento exibido.

Já em relação aos efeitos sobre transtornos por uso de substâncias (*substance use disorders*), os resultados são controversos, possivelmente pelas diferenças em protocolo, testes realizados, linhagem animal e droga estudados. Por exemplo, OT foi capaz de reduzir o consumo de etanol no modelo de auto-administração (King et al., 2017), mas aumentou a preferência pela mesma droga no teste de CPP (Rae et al., 2018). Já com cocaína, a VP diminuiu a sensibilização comportamental de maneira dose dependente, enquanto a OT aumentou o efeito de sensibilização da droga (Sarnyai et al., 1992). Portanto, estudos adicionais se mostram necessários para elucidar os efeitos desses peptídeos sobre comportamentos relacionados à dependência.

Diante do exposto acima, esse estudo se propôs a avaliar a influência do EA nos efeitos recompensadores induzidos pelo etanol, frente a um outro estímulo recompensador, que é a interação social. Como a sociabilidade também é recompensadora, foi levantada a hipótese de que a recompensa social pudesse ser um fator protetor e induzisse um desvio de interesse do animal de uma recompensa pela droga para uma recompensa social. Considerando que a oxitocina a) apresenta um efeito pró-social (Rae et al, 2018); b) é responsável pelo aumento dos efeitos recompensadores ao etanol induzido pelo EA (Rae et al, 2018), avaliamos a modulação do EA sobre o sistema oxitocinérgico no hipotálamo e estriado, regiões que participam da síntese da oxitocina e do sistema da recompensa, respectivamente. A fim de avaliar se o EA aumenta o valor hedônico de recompensas de forma generalizada, testamos sua influência na busca por recompensas naturais com diferentes valores hedônicos. Finalmente, em decorrência do balanço da participação

da oxitocina e vasopressina como mediadores de comportamentos sociais, foram avaliadas as interações cruzadas entre esses peptídeos num modelo *in vitro*.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo estudar a influência do EA sobre comportamentos envolvidos com recompensa e sua modulação no sistema da oxitocina.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- estudar a influência do EA sobre os efeitos recompensadores induzidos pelo etanol, estímulos sociais e estímulos hedônicos.
- estudar os efeitos do EA sobre a expressão gênica de receptores de oxitocina e vasopressina no hipotálamo e estriado
- avaliar os efeitos do EA sobre a atividade da atividade da PLC mediada pela ativação de receptores de oxitocina no estriado
- 3) avaliar a interação cruzada entre oxitocina e vasopressina em células através do teste de liberação de Ca²⁺.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram usados camundongos *Swiss* machos, com 70 dias de idade, fornecidos pelo Biotério de Camundongos do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo. Os animais foram alojados em grupos de 5 em caixas que variam em tamanho e material de acordo com cada grupo experimental. Foram mantidos no biotério sob temperatura constante (22 ± 1°C), sob um ciclo claro/escuro de 12 horas (luz ascendia às 7:00h e apagava às 19:00), recebendo ração e água *ad libitum*. Esse protocolo foi autorizado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) e encontra-se registrado sobre número de processo 047, folha 32, livro 03.

3.2. Condições de alojamento

Os animais dos grupos não-enriquecidos foram mantidos em caixas de polipropileno, medindo 27,5 x 16,5 x 13 cm, cobertas com maravalha.

Já os animais do grupo enriquecimento ambiental foram alojados em caixas de policarbonato medindo 42 cm x 28 cm x 21,5 cm. Nestas foram colocados estímulos como brinquedos, rodas de exercício, tubos, escadas, casas, entre outros objetos. Os objetos foram trocados de lugar em dias alternados e duas vezes por semana os objetos foram limpos e trocados por novos, promovendo assim o estímulo à novidade. Os animais foram mantidos nessas condições durante a realização de todos os testes.



Figura 3. Caixa de Enriquecimento Ambiental (EA) com casa, tubos, escada, pote para ração e rodinha de exercício. Os objetos foram rearranjados/trocados 3 vezes por semana.

3.3. Droga, agonistas e antagonistas

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

A Carbetocina (CBT) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), um análogo da OT, foi administrada intraperitonealmente por 21 dias e durante o protocolo da CPP, na dose de 5mg/Kg. A CBT foi escolhida, pois apresenta tempo de meia vida (85-100 min) superior a OT (3-5 min) e por ser mais estável que a OT, facilitando seu manuseio por um período longo (Passoni et al., 2016). Oxitocina, Vasopressina, L-368,899

(antagonista de OTR), (d(CH2)51,Tyr(Me)2,Arg8)-Vasopressina (antagonista V1a) e TASP 0390325 (antagonista V1b) foram diluídos conforme instrução do fabricante (Tocris Bioscience, Bristol, UK) e utilizados nos ensaios de PLC e liberação de Ca²⁺.

3.4. Preferência condicionada ao lugar (conditioned place preference, em inglês (CPP))

A CPP é uma forma de condicionamento pavloviano usada para medir os efeitos recompensadores de uma droga ou experiência com estímulos variados (Cunningham et al., 2006). Neste estudo, usamos o etanol ou um estímulo social. A CPP foi conduzida depois de 21 dias de exposição ao EA, uma vez que esse período se mostrou suficiente para reverter a sensibilização comportamental induzida pelo etanol (Rueda et al., 2012) e induzir alterações na ligação de OT ao seu receptor em regiões encefálicas específicas (Rae et al, 2018). Durante a CPP, os animais do grupo EA permaneceram nas caixas enriquecidas.

Foram delineados quatro desenhos experimentais diferentes para a realização da CPP, conforme Tabela 1. As fases de habituação e teste são iguais para todos os protocolos.

Tabela 1. Tabela dos grupos, condição de moradia e tratamentos realizados antes do início do condicionamento ao etanol ou ao estímulo social (CPP).

Grupo	Moradia	Tratamento	CPP	
СТ	caixa padrão	-	SOCIAL	
EA	caixa enriquecida	-	SOCIAL	
СТ	caixa padrão	-	ETANOL	
EA	caixa enriquecida	-	ETANOL	
CT	caixa padrão	-	SOCIAL vs ETANOL	
EA	caixa enriquecida	-	(animal desconhecido)	
CT	caixa padrão	-	SOCIAL vs ETANOL	
EA	caixa enriquecida	-	(animal familiar)	
SAL	caixa padrão	salina	SOCIAL vs ETANOL	
CBT	caixa padrão	carbetocina	SOCIAL VS LIANOL	
Dias	D1 - D21	D23-D30	D22 - D31	

Os efeitos recompensadores do etanol e do estímulo social foram testados separadamente, conforme descrito abaixo no procedimento da CPP. Feito isso, o protocolo da CPP social vs etanol foi realizado mediante alternância do condicionamento ao etanol e a um animal social desconhecido ou conhecido em dias separados. Esse protocolo permite comparar o valor da recompensa da droga *versus* da interação social entre os grupos experimentais (Thiel et al., 2008). Os efeitos recompensadores da CBT foram testados após os animais serem tratados com CBT por 21 dias consecutivos, além dos 10 dias do protocolo de condicionamento da CPP. As injeções foram administradas no período da tarde para evitar o efeito agudo da CBT sobre a aquisição da preferência. Esse protocolo permite avaliar se a OT de fato, participa da resposta à recompensa observada na CPP etanol vs social (animal desconhecido).

Aparato: Foi utilizada uma caixa retangular de 4,6 x 40,0 x 18,0 cm, com 3 compartimentos separados entre si por guilhotinas: um compartimento com paredes pretas com listras verticais brancas e piso em barras; um compartimento central com paredes cinzas e piso liso e outro compartimento com paredes brancas e listras horizontais pretas e piso em grade. Nos protocolos da CPP social e CPP social vs etanol, foi inserida uma tela de arame nos compartimentos maiores, dividindo-os em duas áreas, uma com 14 cm e a área da extremidade com 3,5 com. Neste último, um animal (conhecido ou desconhecido*) foi colocado, permitindo interação social, mas evitando contato direto.

* foram realizados experimentos distintos, considerando-se a familiaridade ou não com o animal social.



Figura 4. Aparato de preferência condicionada por lugar (*CPP*) vista de cima (foto superior) e vista lateral (foto inferior) do aparato.

O teste da CPP foi realizado no período da manhã (08:00 e 11:00h), com duração de 10 dias e dividido em 3 fases:

- Habituação (D1): Os animais receberam injeção de salina e foram colocados, um por vez, no compartimento central (neutro) da caixa, com livre acesso aos outros dois compartimentos. Após 15 minutos os animais foram retirados e devolvidos a sua gaiola de origem.
- Condicionamento (D2-D9): Nesta fase, o pareamento variou de acordo com o tipo de CPP realizada. Para a CPP etanol, os animais receberam injeção de etanol em um dos compartimentos, randomicamente escolhido, e receberam uma injeção de salina no compartimento oposto, em dias alternados. Para a CPP social, os animais receberam uma injeção de salina foram pareados com animal social desconhecido em um dos compartimentos e receberam somente injeção de salina no outro compartimento. Já com a CPP etanol vs social (animal desconhecido), os animais receberam injeção de salina e foram pareados em um compartimento com um animal social desconhecido e receberam uma injeção de etanol no compartimento oposto. O mesmo foi feito no protocolo de CPP etanol vs social (animal familiar), entretanto o animal social desconhecido foi substituído por um animal social familiar. No caso do

teste com o grupo tratado com CBT, foi realizado o mesmo protocolo descrito acima para CPP etanol vs social (animal desconhecido). Para evitar resultado enviesado, os compartimentos e os pareamentos foram escolhidos de forma randômica. Os animais permaneceram por 15 minutos nos compartimentos e depois foram devolvidos às suas gaiolas.

- Teste (D10): Os animais foram colocados no compartimento central (neutro) da caixa, com livre acesso aos outros dois compartimentos, como na fase de habituação. Permaneceram por 15 minutos e depois foram devolvidos às suas gaiolas.

Todas as fases do teste foram filmadas para posterior análise. A análise da CPP foi feita de acordo com a seguinte fórmula: delta = **CS**⁺ teste - **CS**⁺ hab, onde CS⁺ teste = tempo passado no lado pareado durante teste; CS⁺ hab = tempo passado no lado pareado durante habituação.

3.5 Teste de Três Câmaras de Interação Social (Teste de *Crawley*)

Esse teste é usado para avaliar abordagem social (afiliativa) baseado em comportamentos que excluem aspectos de agressividade e aproximação sexual (Brodkin et al., 2004), observando se a preferência do animal teste pelo animal desconhecido em relação à gaiola vazia. O aparato usado consistiu de uma caixa retangular, dividida em três câmaras (42,5cm largura; 22.2cm altura; 17,8cm de comprimento compartimento do meio; 19,1cm comprimento compartimentos laterais). As paredes divisoras têm uma porta que permite que o animal transite entre as câmaras (Moy et al., 2008).

O teste durou 1 dia e foi realizado no período da tarde (12:00 às 16:00hs), sendo dividido em 2 fases:

Fase de habituação: o animal foi colocado na câmara central e pôde explorar todo o aparato por 10 minutos.

Teste de sociabilidade: Passados os 10 minutos, o animal foi confinado no compartimento central e uma gaiola redonda pequena, com grades que permitem interação social com um animal desconhecido dentro, foi colocada em um dos lados do aparato, de forma randômica. Do outro lado, foi colocada uma gaiola idêntica vazia. O tempo de exploração na câmara foi de 10 minutos.

Ao fim de cada sessão, o aparato foi limpo com álcool 70% a fim de eliminar qualquer pista olfatória, antes de introduzir um outro animal na câmara.

Foi avaliado o tempo que o animal passa interagindo com o animal novo e com a gaiola vazia e a distância percorrida. A razão da interação social também foi calculada baseada na divisão entre o tempo que o animal passou explorando a gaiola com o animal novo e o tempo gasto explorando a gaiola vazia.

3.6 Teste do Tubo de Dominância Social

O teste do tubo foi desenvolvido para avaliar a tendência de dominância em camundongos (Lindzey et al., 1961) e já foi utilizado para comparar comportamento de diferentes linhagens e de diferentes genótipos. Esse teste é útil para avaliar interação social e efeitos de tratamentos farmacológicos em cognição e comportamento social. A tendência é de que o animal dominante force o outro para fora do tubo (subordinado).

Este teste foi realizado em tubo transparente longo de acrílico transparente, medindo 30 cm de comprimento, 3,2 cm de diâmetro e elevado a 2,0 cm de altura da superfície.

Cada animal do grupo CT foi testado com 5 animais do grupo EA, ou seja, cada animal foi testado 5 vezes. Um animal do grupo CT e um do grupo EA foram colocados nas extremidades opostas do tubo transparente com a cabeça voltada para o interior do tubo e foi medido o número de vezes que cada animal saiu primeiro do tubo. A sessão foi considerada como encerrada quando um dos dois animais colocou as quatro patas para fora do tubo. O animal é considerado "perdedor" quando ele sai do tubo e o animal "vencedor" é aquele que forçou a saída do primeiro.

Ao término de 2 minutos, se nenhum animal saiu do tubo, a sessão foi encerrada, sendo desconsiderada a classificação deles como dominante ou subordinado. A avaliação foi feita sobre forma de percentagem de vitórias e derrotas dentro do número total de sessões.

Ao final de cada sessão o tubo foi lavado com álcool 5% para eliminar pistas olfatórias.

3.7 Teste da Tábua de Buracos

Como o EA pode alterar diversos comportamentos relacionados com dependência, foi escolhido teste da tábua de buracos para avaliar possíveis alterações na atividade geral, exploração direcionada, ansiedade e nível de estimulação (*arousal*, em inglês), como um *screening* geral (Binder et al., 2011, Ohl et al., 2003).

Os animais foram colocados, um por vez, no canto inferior esquerdo da caixa e ficaram livres para explorar o aparato por 10 minutos. Foi contabilizada a distância percorrida, o número de buracos visitados (consiste no animal inserir o focinho no buraco), tempo de latência para visitar o primeiro buraco, o tempo de permanência no centro do aparato e tempo de latência para primeiro *grooming*.

Depois de cada teste o aparato foi limpo com álcool 70% para eliminar pistas olfatórias.

3.8 Food Enticing

Esse teste foi adaptado de Valdés e colaboradores (2010) e é usado para medir motivação e comportamento direcionado para um objetivo (Torrealba et al., 2012).

Os animais foram privados de comida por um período de 24hs antes da realização do teste. Após isso, foram colocados individualmente em gaiolas onde tiveram acesso a uma pequena caixa de arame quadriculado de 5 cm de largura por 5 cm de altura, com *pellets* de comida dentro. Essa caixa permite que os animais cheirem, toquem e vejam os *pellets*, mas não permite que eles comam ou roam os *pellets*. O teste foi realizado uma única vez e teve duração de 40 minutos e foi gravado para posterior análise do tempo que o animal passou interagindo com a caixa de *pellets*. Foi considerado interação o tempo que os animais se aproximaram da caixa a uma distância de pelo menos 2 cm. Não foi considerado interação se eles subiam na caixa ou se encostaram outra parte do corpo que não o focinho.

Esse mesmo teste também foi realizado com o cereal *Froot Loops*® no lugar dos *pellets* de comida. Nesse caso, os animais não foram privados de se alimentar e os *Froot Loops*® foram adicionados às suas gaiolas 3 dias antes do teste. No dia do teste, as caixas de arame forma preenchidas com as pelotas de *Froot Loops*®, conforme descrito acima. O teste também durou 40 minutos e foi filmado para posterior análise do tempo de interação dos animais com as caixas de *Froot Loops*®.

Cada caixa de arame foi limpa e a comida trocada entre as sessões.

3.9 Ensaio para determinação de Fosfolipase C (PLC)

O ensaio da PLC foi usado para medir a atividade da proteína G_{q/11}, a qual está acoplada ao receptor de OT. Portanto, este ensaio foi usado para determinar a amplitude da sinalização de OTR em animais do grupo CT e EA.

3.9.1 Preparo das membranas

As membranas foram preparadas de acordo com Gomes e colaboradores (2013). Foram utilizados estriados de camundongos dos grupos CT e EA. O tecido foi homogeinizado em 25 volumes (1 g peso/25 mL) de tampão 20 mM tris-CI contendo 250 mM de sacarose, 2 mM EGTA e 1 mM MgCI (pH 7.4) à 4 °C. Feito isso, o homogenato foi centrifugado a 27.000 g por 15 minutos, à 4 °C. O pellet foi ressuspendido em 25 mL do mesmo tampão e a etapa da centrifugação foi repetida. O pellet resultante foi ressuspendido em 40 volumes (do peso original da amostra) de tampão 2 mM tris-CI contendo 2 mM EGTA e 10% de glicerol (pH 7.4). A quantidade de proteína das amostras foi determinada utilizando o NanoVue plus (GE). As amostras foram armazenadas à -80 °C até a realização dos testes.

3.9.2 Ensaio de PLC

O ensaio utilizado para medir os níveis de PLC em resposta à ativação de OTR foi feito utilizando o EnzChek® Direct Phospholipase C Assay Kit (Invitrogen, Arlsbad, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante. De maneira resumida, em placas escuras de 96 poços foram acrescentados 40 μL de solução tampão Tris-HCl (250 mM Tris-HCl, 0.7 M NaCl, 10 mM CaCl2; pH 7.4), o agonista OT (concentração final de 0, 100 nM, 1 μM e 10 μM), substrato de PLC (diluído em DMSO e lecitina) e as membranas de estriado (1 mg) preparadas previamente, conforme descrito acima. Para medir a atividade basal das células, foram utilizados poços sem a adição da oxitocina. Além disso, como controle positivo, poços sem droga e com adição de fosfolipase C obtida a partir de *Bacillus cereus*, também foram analisados. Depois de completa, a placa foi encubada a 37 °C por 30 minutos. As medidas foram obtidas através do leitor de placa SpectraMax plus (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)

no comprimento de onda 560 nm. As leituras foram feitas nos tempos de 30, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos. Portanto, além do efeito de concentração do agonista, também foi medido o decurso temporal da atividade de PLC.

3.10 Análise da expressão gênica

A expressão gênica de V1a, V1b, VP, OTR e OT foi determinada por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (qPCR).

3.10.1 Preparo das amostras

Todas as amostras foram preparadas em ambiente RNA *free*. Hipotálamo e estriado de encéfalos de animais CT e EA foram homogeinizados em 500 μL de Trizol com o auxílio de uma pipeta. Em seguida, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 5 minutos e depois foram adicionados 100 μL de clorofórmio em cada tubo e eles foram agitados vigorosamente por 15 segundos. Depois, os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por mais 3 minutos e logo foram centrifugados a 12.000 g por 15 minutos à 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para tubos contendo 300 μL de etanol 70%. Em seguida, o processo de extração foi feito utilizando o kit RNeasy Mini Kit (Quiagen) seguindo as instruções do fabricante. Após a elução, a quantificação de RNA foi mensurada usando o NanoVue Plus (GE) e as amostras foram armazenadas à -80 °C.

3.10.2 Transcrição Reversa

Os oligonucleotídeos foram obtidos da Integrated DNA Technologies (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA, USA). Foram utilizados oligonucleotídeos *forward* e *reverse* para os seguintes peptídeos: V1a (F: CCA ATT TCG TTT GGA CCG ATT C; R: CAA TCT TGT AGG AGA TGA CCA CTA A), VP (F: CTA CTT CCA GAA CTG CCC AAG; R: CCG AAG CAG CGT CCT TT), OTR (F: TTC TTC GTG CAG ATG TGG AG; R: CAA GAG CAT GGC AAT GAT GAA G), OT (F: GGA TAT GCG CAA GTG TCT C; R: GTA GTT CTC CTC CTG GCA), GAPDH (F: TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT; R: CAT GTG GGC CAT GAG GTC CACCAC e β-actina (F: TGA GAG GGA AAT CGT GCG TG; R: TGC TTG CTG ATC

CAC ATC TGC). As sequências foram obtidas através de acesso a banco de dados públicos do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi obtida a partir de 2,5 μg de RNA total. Foi adicionado VILO reaction mix e superscript enzyme mix (ambos da Invitrogen) e água RNAse free, para completar o volume de 20 μL. A amplificação foi feita utilizando a máquina da BioRad C1000 touchTM, em 3 ciclos. No primeiro ciclo, as amostras foram incubadas à 25 °C por 10 minutos. No segundo, a temperatura foi de 42 °C por 60 minutos. Por fim, no terceiro ciclo, as amostras permaneceram incubadas à 85 °C por 5 minutos. Após a finalização de todos os ciclos, as amostras foram armazenadas à -20 °C.

As reações foram realizadas em placas de 364 poços, cada um contendo: 4 μ L de cDNA, 0,5 μ L de oligonucleotídeo senso e antisenso cada, 5 μ L de SYBR Green. A solução foi mantida protegida da luz para preservar a atividade do SYBR Green. Além disso, foram acrescentadas análises sem o cDNA, para controle negativo.

3.10.3 Análise dos dados de expressão gênica

A análise dos resultados foi feita pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, segundo Livak e Schmittgen (2001). Primeiro, uma linha de controle foi colocada na região "linear" da curva, em que a amplificação é ótima. O número de ciclos correspondente a esse valor foi considerado como Ct da amostra. Posteriormente, o valor de ΔCt foi calculado, utilizando o valor do Ct da amostra e o valor de Ct do controle endógeno, seguindo a fórmula:

 Δ Ct = [Ctamostra – Ctcontrole endógeno].

A partir desses valores, ΔΔCt foi calculado, seguindo a fórmula:

 $\Delta\Delta$ Ct = [Δ Ct grupo experimental – Δ Ct média do grupo controle].

Por fim, o valor relativo de expressão gênica foi obtido utilizando a fórmula:

Como o $\Delta\Delta$ Ct do grupo controle deve ser próximo de zero, 2^0 é igual a 1. Dessa forma, os valores obtidos para o grupo enriquecido determinam se a expressão gênica foi maior ou menor que o grupo controle.

3.11 Ensaio para determinação de liberação de Ca2+ intracelular (FLIPR®)

3.11.1Preparo das células

Células de ovário de *hamster* chinês (CHO, do inglês *chinease hamster ovary*) foram transfectadas com plasmídeo contendo sequência de DNA para receptores de OT e V1a de camundongos, marcados com DYKDDDDK no terminal N do receptor, individualmente, utilizando Turbofect®, conforme instruções do fabricante. Após transfecção, as células foram cultivadas em placas de 10 cm³ contendo 10 mL de meio de cultura F-12 (catálogo #11765-054, Gibco Life Sciences), 10% soro fetal bovino (FBS) e 1X penicilina-estreptomicina, a 37 °C com 10% de CO₂/O₂. Depois de atingirem 80% de confluência, as células foram ressuspensas utilizando solução de tripsina a 0,25% e colocadas em novas placas contendo o mesmo meio de cultura acima. Na terceira passagem, as células foram ressuspendidas em placas de 364 pocos para realização de atividade de cálcio.

3.11.2 Ensaio de Ca²⁺ intracelular

O Ca²+ intracelular foi medido através do kit FLIPR, seguindo as instruções do fabricante. Duas placas de 364 poços foram preparadas para esse experimento: a primeira contendo os agonistas e a segunda contendo as células mais os corantes. Na primeira placa, foi adicionado 20 μL de VP e OT em concentrações de 0-10 μΜ. Em seguida, a placa foi agitada a 300 g por 3 minutos, para garantir que toda a droga caísse para o fundo da placa. Na segunda placa, células CHO transfectadas com receptores V1a, V1b e OT (individualmente) foram cultivadas por dois dias, até atingirem o nível de confluência ideal. Depois disso, foram acrescentados 20 μL do corante diluído em solução tampão HBSS-HEPES. Essa etapa foi realizada dentro da capela e na ausência de luz, para assegurar a eficácia do corante. Essa placa também foi agitada a 300 g por 3 minutos. Depois disso, foi encubada por 2 horas. Depois

disso, 20 μL de antagonista (100 μM) de OT e VP foram acrescentados à placa contendo células e foram encubadas por mais 30 minutos. Finalmente, a placa foi lida usando o equipamento FLIPR Tetra® High Throughput Cellular Screening System que permite a leitura em tempo real do efeito dos agonistas sobre a liberação de Ca²⁺ intracelular.

3.12 Análise dos Resultados

Para análise estatística da CPP social *vs* etanol foi utilizado modelo linear generalizado (GLzM). Para a avaliação do tempo de interação social foi utilizada ANOVA, com teste post hoc Tuckey. O teste de tubo de dominância social foi avaliado utilizando o teste de Qui-Quadrado. Para os demais experimentos foi utilizado o *Student's t- test*. Em todas as comparações realizadas, a probabilidade de p<0,05 foi considerada para determinar diferenças significantes.

4. DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1. Experimento 1 – Efeitos do EA sobre os efeitos recompensadores de estímulo social e ao etanol

No primeiro dia de experimento (D1; PND = 70), 80 animais foram colocados na caixa enriquecida (n=10), enquanto o grupo controle foi mantido na caixa padrão (n=10) durante todo o experimento. De D22 até D31 os animais foram divididos em 4 subgrupos para a realização dos respectivos condicionamentos: condicionamento à interação social, ao etanol ou ao etanol vs interação social (animal familiar ou desconhecido).

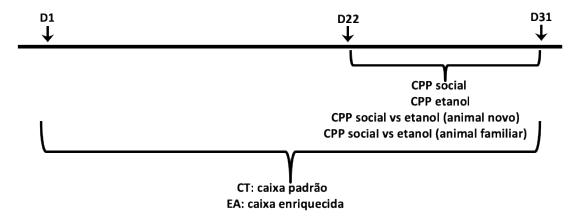
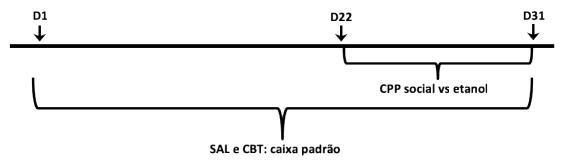


Figura 5. Representação do delineamento experimental para realização dos testes de condicionamento à interação social, condicionamento ao etanol e condicionamento à interação social vs etanol. CPP, preferência condicionada à lugar (do inglês, *conditioned place preference*); CT, grupo controle; D1, dia 1; D22, dia 22; D31, dia 31; EA, grupo enriquecimento ambiental.

4.2. Experimento 2 – Efeitos da CBT sobre os efeitos recompensadores do estímulo social vs etanol

Os animais foram mantidos na caixa padrão (n=10/grupo) durante todo o experimento. Entre D1 e D31 os animais do grupo CBT receberam injeções diárias de carbetocina (dose 5g/Kg) e os animais do grupo SAL receberam a mesma dose de salina. De D22 a D31 foi realizado o protocolo da CPP ao etanol *v*s interação social.



SAL: injeção salina 1x dia CBT: injeção carbertocina 1x dia

Figura 6. Representação do delineamento experimental para realização dos testes de condicionamento à interação social vs etanol. *CBT*, grupo carbetocina; *CPP*, preferência condicionada à lugar (do inglês, *conditioned place preference*); *D1*, dia 1; *D22*, dia 22; *D31*, dia 31; *SAL*, grupo salina.

4.3. Experimento 3 – Efeitos do EA sobre o teste de interação social

No primeiro dia de experimento (D1; PND = 70), os animais foram colocados na caixa enriquecida (n=10), enquanto o grupo controle foi mantido na caixa padrão (n=10) durante todo o experimento. Em D22 foi realizado o teste de três câmeras de interação social.

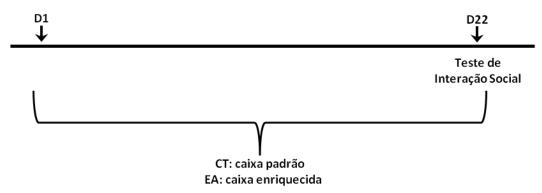


Figura 7. Representação do delineamento experimental para realização do teste de interação social. *CT*, grupo controle; *D1*, dia 1; *D22*, dia 22; *EA*, grupo enriquecimento ambiental.

4.4. Experimento 4 – Efeitos do EA sobre comportamentos relacionados à motivação de busca por alimentos comuns e palatáveis

No primeiro dia de experimento (D1; PND = 70), os animais foram colocados na caixa enriquecida (n=10), enquanto o grupo controle foi mantido na caixa padrão (n=10) durante todo o experimento. Em D22, os animais foram privados de comida por 24 horas e em D23 foi feito o teste de motivação de busca por alimento (*Food Enticing*) com *pellets* de ração. Outro lote de animais foi testado para avaliar a motivação pela busca de alimentos palatáveis. Foi mantida ração ad libitum e em D23 foi realizado o protocolo de *Food Enticing* com cereais *Froot Loops*®.

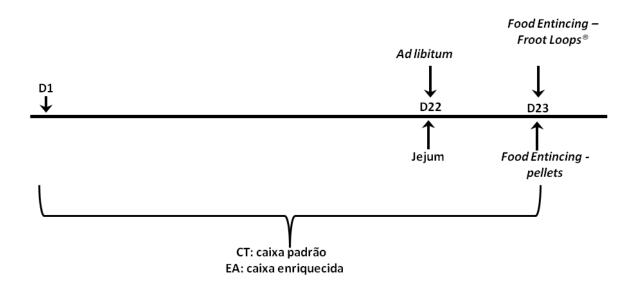


Figura 8. Representação do delineamento experimental para realização do teste de *Food enticing* com *pellets* de ração ou *Froot Loops®. CT*, grupo controle; *D1*, dia 1; *D22*, dia 22; *D23*, dia 23; *EA*, grupo enriquecimento ambiental.

4.5 Experimento 5 – Efeitos do EA sobre comportamentos relacionados à atividade exploratória, locomoção e ansiedade e dominância social

No primeiro dia de experimento (D1; PND = 70), os animais foram colocados na caixa enriquecida (n=10), enquanto o grupo controle foi mantido na caixa padrão (n=10) durante todo o experimento. Em D22, foi realizado o teste da tábua de buracos e em D24 o teste do tubo de dominância social.

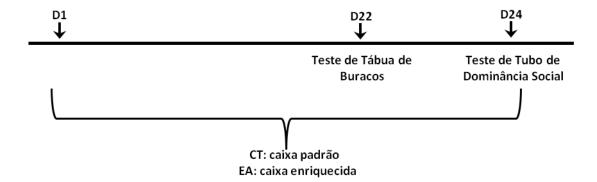


Figura 9. Representação do delineamento experimental para realização do teste da tábua de buracos e do tubo de dominância social. *CT*, grupo controle; *D1*, dia 1; *D22*, dia 22; *D24*, dia 24; *EA*, grupo enriquecimento ambiental.

4.6 Experimento 6 – Efeitos do EA sobre atividade de PLC na presença de OT no estriado e expressão gênica de V1a, V1b, VP, OTR e OT no hipotálamo e estriado

No primeiro dia de experimento (D1; PND = 70), os animais foram colocados na caixa enriquecida (n=10), enquanto o grupo controle foi mantido na caixa padrão (n=10) durante todo o experimento. Em D21, os animais foram eutanasiados e os encéfalos foram removidos e armazenados à -80 °C. Posteriormente, o hipotálamo e o estriado foram retirados, de forma que o número amostral total de cada grupo, para cada experimento fosse de 5. Feito isso, foram realizados o teste de atividade de PLC na presença de OT no estriado e qPCR para análise de mRNA de V1a, V1b, VP, OTR e OT no hipotálamo e no estriado.

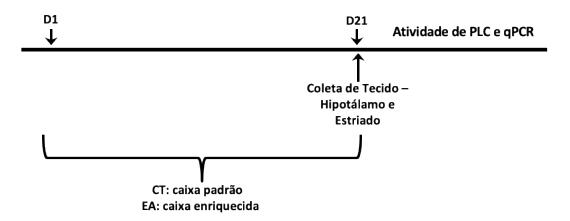


Figura 10. Representação do delineamento experimental para realização dos testes de atividade de PLC de OTR no estriado e qPCR para a análise de expressão gênica de V1a, V1b, VP, OTR e OT no hipotálamo e estriado dos animais. *CT*, grupo controle; *D1*, dia 1; *D21*, dia 21; *EA*, grupo enriquecimento ambiental.

4.7 Experimento 7 – Análise da resposta cruzada entre OT e VP e seus receptores V1a e OTR, respectivamente, na liberação de Ca²⁺

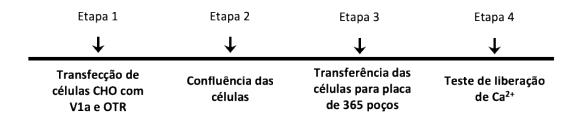


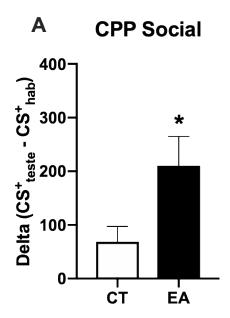
Figura 11. Representação do delineamento experimental para realização do teste de liberação de Ca²⁺ em células CHO transfectadas com V1a e OTR. CHO, *chinease hamster ovary* (ovário de hamster chinês); *OTR*, receptor de oxitocina; *V1a*, receptor de vasopressina do subtipo 1a.

5. RESULTADOS

5.1. Resultados das análises comportamentais

5.1.1 Efeitos do EA sobre os efeitos recompensadores do estímulo social e do etanol

A fim de avaliar os efeitos do ambiente enriquecido sobre a recompensa social e ao etanol, foram realizadas duas CPPs distintas, conforme mostrado no gráfico abaixo. O modelo de *Student's t- test* foi utilizado para analisar as diferenças estatísticas. Referente a CPP social, o teste estatístico apontou que o grupo EA apresentou maior preferência social, comparado com CT [t= 2,34; p<0,05]. Já em relação a CPP etanol, não houveram diferenças significantes [t= 0,90; p=0,379], sugerindo que ambos os grupos apresentaram preferência similar pelo lado pareado com etanol.



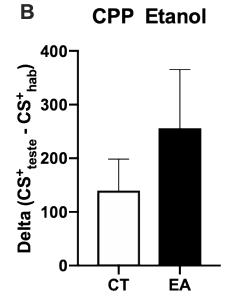


Figura 12. Efeitos do EA sobre preferência pela interação social e pelo etanol. A) Delta (diferença entre o tempo gasto no compartimento pareado no dia do teste e no dia da habituação) (n=15/grupo). B) Delta (diferença entre o tempo gasto no compartimento pareado no dia do teste e no dia da habituação (n=10/grupo). Duração do teste: 15 minutos. Dados apresentados como média ± EPM. Análise estatística por *Student's t-test.* *p<0,05. Abreviações: *CPP*, preferência condicionada à lugar (do inglês, *conditioned place preference*); *CS*+, compartimento pareado com estímulo condicionado (do inglês *conditioned stimulus*); *CT*, controle; *EA*, enriquecimento ambiental; *hab*, habituação.

5.1.2 Efeitos do EA sobre os efeitos recompensadores do estímulo social (animal novo) vs etanol

O protocolo da CPP foi realizado com pareamento do estímulo social de um lado e do etanol do outro, para comparar o efeito recompensador de cada estímulo. O modelo de GLzM foi utilizado para analisar as diferenças estatísticas. Para execução do teste, foram adotadas a variável "delta" como variável dependente e as variáveis "grupo" (CT e EA) e "pareamento" (Social ou Etanol) como variáveis independentes e o modelo de distribuição como linear. O teste de efeito revelou significância de 0,037 para a variável "pareamento" e significância de p<0,001 para a interação "grupo" vs "pareamento". A comparação de pares mostrou que o tempo gasto no compartimento pareado com etanol foi maior do que o tempo no lado pareado com o animal social. Na análise da interação, a comparação de pares foi estatisticamente significante para o pareamento "social" vs "etanol" do grupo EA (p<0,001) e para o pareamento "etanol" entre os grupos CT e EA (p<0,05), revelando que os animais enriquecidos passaram mais tempo do lado pareado com etanol do que do lado pareado com a interação

social. Além disso, comparado ao grupo controle, os animais EA exibiram maior preferência pelo etanol.

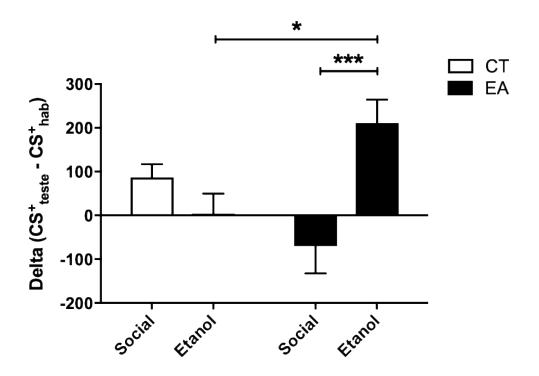


Figura 13. Efeitos do EA sobre preferência pela interação social (animal novo) vs etanol. Delta (diferença entre o tempo gasto no compartimento pareado no dia do teste e no dia da habituação) da interação social e do etanol (2.0g/Kg). Duração do teste: 15 minutos. (n=10/grupo). Dados apresentados como média ± EPM. Análise de GLzM de distribuição linear, com efeito de modelo significante para variável "pareamento" e interação "grupo" vs "pareamento" *p<0,05; ***p<0,001. Abreviações: CS+ hab compartimento pareado com estímulo condicionado (do inglês conditioned stimulus) do dia da habituação, CS+ teste, compartimento pareado com estímulo condicionado (do inglês conditioned stimulus) do dia do teste; CT, controle; EA, enriquecimento ambiental.

5.1.3 Efeitos do EA sobre os efeitos recompensadores do estímulo social (animal familiar) vs etanol

O protocolo da CPP foi realizado com pareamento do estímulo social familiar de um lado e do etanol do outro, para estudar o efeito de familiaridade do estímulo social sobre a preferência. O modelo de GLzM foi utilizado para analisar as diferenças estatísticas. Para execução do teste, foram adotadas a variável "delta" como variável dependente e as variáveis "grupo" (CT e EA) e "pareamento" (Social ou Etanol) como variáveis independentes e o modelo de distribuição como linear. O teste de efeito revelou significância de 0,003 para a variável "pareamento" e significância de p<0,01 para a interação "grupo" vs "pareamento". A comparação de pares mostrou que o tempo gasto no compartimento pareado com etanol foi maior

do que o tempo no lado pareado com o animal social. Na análise da interação, a comparação de pares foi estatisticamente significante para o pareamento "social" vs "etanol" do grupo EA (p<0,001) e para o pareamento "etanol" entre os grupos CT e EA (p<0,01), revelando que os animais enriquecidos passaram mais tempo do lado pareado com etanol do que do lado pareado com a interação social. Além disso, comparado ao grupo controle, os animais EA exibiram maior preferência pelo etanol.

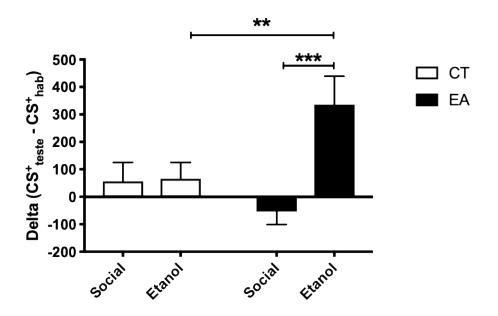


Figura 14. Efeitos do EA sobre preferência pela interação social (animal familiar) vs etanol. Delta (diferença entre o tempo gasto no compartimento pareado no dia do teste e no dia da habituação) da interação social familiar e do etanol (2.0g/Kg). Duração do teste: 15 minutos. (n=10/grupo). Dados apresentados como média ± EPM. Análise de GLzM de distribuição linear, com efeito de modelo significante para variável "pareamento" e interação "grupo" vs "pareamento". **p<0,01; ***p<0,001. Abreviações: CS+ hab compartimento pareado com estímulo condicionado (do inglês conditioned stimulus) do dia da habituação, CS+ teste, compartimento pareado com estímulo condicionado (do inglês conditioned stimulus) do dia do teste; CT, controle;

5.1.4 Efeito da CBT sobre os efeitos recompensadores de estímulo social vs etanol

O protocolo da CPP social vs etanol foi também empregado em animais tratados com CBT por 31 dias no total (21 dias anterior à CPP + 10 dias durante a CPP), a fim de estudar se a modulação oxitocinérgica influencia a preferência dos efeitos recompensadores induzidos pelo estímulo social e/ou etanol. O modelo de GLzM foi utilizado para analisar as diferenças estatísticas. Para execução do teste,

foram adotadas a variável "delta" como variável dependente e as variáveis "grupo" e "pareamento" como variáveis independentes e o modelo de distribuição como linear. O teste de efeito do modelo revelou tendência estatística de 0,06 para a interação "grupo" vs "pareamento". A comparação de pares foi apenas estatisticamente significante para o pareamento "social" vs "etanol" do grupo CBT (p=0,034), revelando que os animais desse grupo passaram mais tempo do lado pareado com etanol do que no lado pareado com a interação social.

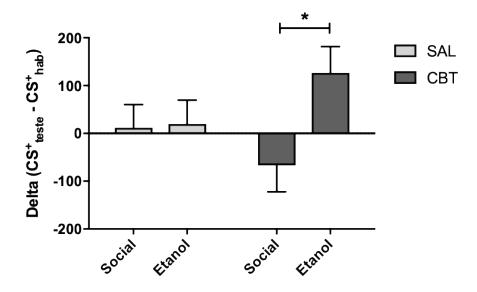


Figura 15. Efeitos da CBT sobre preferência pela interação social vs etanol. Delta (diferença entre o tempo gasto no compartimento pareado no dia do teste e no dia da habituação) da interação social e do etanol (2.0g/Kg), para animais tratados com salina ou carbetocina (análogo de OT) Duração do teste: 15 minutos. (n=10/grupo). Dados apresentados como média ± EPM. Análise de GLzM de distribuição linear, com efeito de modelo com tendência significante para interação "grupo" vs "pareamento". *p<0,05. Abreviações: CS+ hab compartimento pareado com estímulo condicionado (do inglês conditioned stimulus) do dia da habituação, CS+ teste, compartimento pareado com estímulo condicionado (do inglês conditioned stimulus) do dia do teste; CT, controle; EA, enriquecimento ambiental.

5.1.5 Efeitos do EA sobre comportamentos sociais

5.1.5.1 Efeitos do EA sobre o teste de interação social

O teste de interação social foi realizado para estudar os efeitos do ambiente enriquecido sobre a sociabilidade dos animais. A ANOVA de uma via mostrou diferenças para o fator "lado" (gaiola com animal X gaiola vazia) $[F_{(1,30)}=11,57; p<0,01]$ e para a interação dos fatores "grupo" (CT e EA) e "lado" $[F_{(1,30)}=6,68; p<0,05]$, mas não revelou diferenças significantes para o fator "grupo" $[F_{(1,30)}=0,72; p=0,40]$. O teste

post-hoc, apontou que o grupo EA passou mais tempo interagindo com a gaiola que continha o animal social dentro, em relação à gaiola vazia. O grupo CT não apresentou diferenças de exploração entre os lados. O *Student's t- test* apontou que o grupo EA apresentou maior razão de interação social, comparado com CT [t= 3,49; p<0,01]. Já para a medida de atividade locomotora, o *Student's t- test* mostrou menor distância percorrida dos animais enriquecidos, comparados com os controles [t= -2,49; p<0,05].

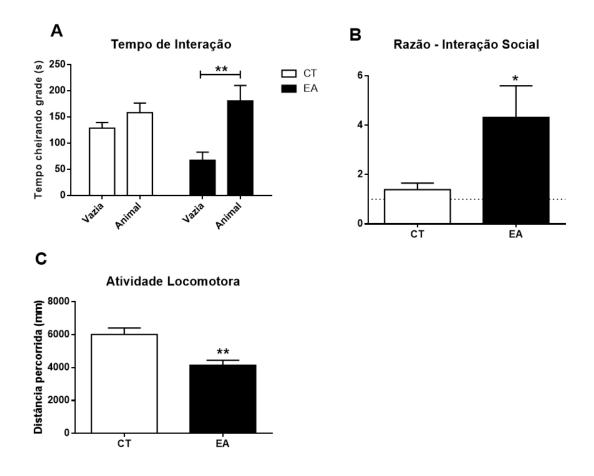


Figura 16. Efeitos do EA sobre teste de interação social. A) Tempo gasto interagindo com a gaiola vazia e com o animal novo. Análise de ANOVA de uma via seguido de *post hoc Tuckey.* **B)** Razão da interação social (tempo gasto interagindo com gaiola com animal novo/tempo gasto interagindo com gaiola vazia). **C)** Atividade locomotora na fase de habituação. Duração do teste: 10 minutos. (n=10/grupo). Dados apresentados como média ± EPM. Análise estatística por *Student's t-test**p<0,05; **p<0,01. Abreviações: *CT*, controle; *EA*, enriquecimento ambiental.

5.1.5.2 Efeitos do EA sobre comportamento de dominância social

O teste de qui-quadrado foi realizado para as variáveis dependentes "grupo" (CT e EA) e "dominância" (vitória e derrota). O teste revelou o tamanho de efeito ϕ = 0,391 e p<0,001 entre o número de vitórias e derrotas dos grupos EA e CT. O grupo enriquecido venceu aproximadamente 80% dos confrontos com os animais do grupo CT.

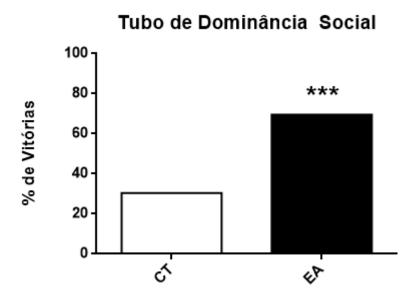


Figura 17. Efeitos do EA sobre teste do tubo de dominância social. Número de vitórias expresso em percentagem. (n=10/grupo). Dados apresentados como percentagem em relação ao número de confrontos (46 confrontos). Análise de Qui-Quadrado com ϕ = 0,391. ***p<0,001. Abreviações: *CT*, controle; *EA*, enriquecimento ambiental.

5.1.6 Efeitos do EA sobre comportamentos relacionados à motivação.

Para avaliar os efeitos do EA sobre comportamentos associados à motivação, foi usado o teste de *Food Enticing* com algumas modificações. O teste foi realizado com pellets de ração e com cereais *Froot Loops*® (alimento altamente palatável), separadamente. O *Student's t- test* realizado para o teste com os pellets de ração não mostrou diferenças significantes entre os grupos no tempo de exploração da caixa contendo os pellets [t= 0,50; p=0,62]. Já o *Student's t- test* realizado para o protocolo do *Froot Loops*® apontou que os

animais do grupo EA passaram menos tempo explorando a caixa com o cereal em comparação com o grupo CT [t= 4,25; p<0,001].

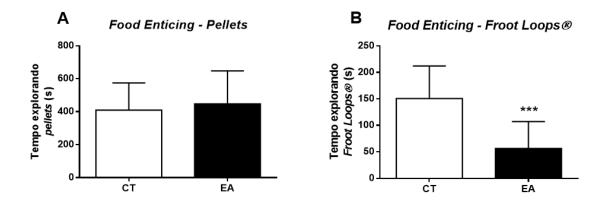


Figura 18. **Efeitos do EA sobre comportamento de motivação por alimento comum e palatável. A)** Tempo gasto explorando gaiola com *pellets* de ração, após 24hs de jejum. **B)** Tempo gasto explorando gaiola com *Froot Loops*®, sem período de privação alimentar. Duração do teste: 40 minutos. (n=10/grupo). Dados apresentados como média ± EPM. Análise estatística por *Student's t-test* ***p<0,001. Abreviações: *CT*, controle; *EA*, enriquecimento ambiental.

5.1.7 Efeitos do EA sobre comportamentos relacionados à exploração, locomoção e ansiedade.

O teste da tábua de buracos foi usado para avaliar atividade exploratória, locomotora e comportamentos relacionados com ansiedade. O *Student's t- test* foi realizado para cada um dos seguintes parâmetros: a) número de buracos visitados [t= -0,98; p= 0,34]; b) distância percorrida [t= 1,11; p= 0,28]; c) tempo gasto no compartimento central [t= -0,29; p= 0,98]; d) tempo gasto no compartimento periférico [t= -0,59; p= 0,56]; e) latência para entrar no compartimento central [t= 2,31; p<0,05]; f) frequência de entradas no compartimento central [t= -0,13; p= 0,90]; g) latência para o primeiro *grooming* [t= 2,72; p<0,05]. O teste estatístico mostrou que o grupo EA apresentou menor latência para entrar no compartimento central e para o primeiro *grooming*, comparado com o grupo CT, sem alterações nos demais parâmetros.

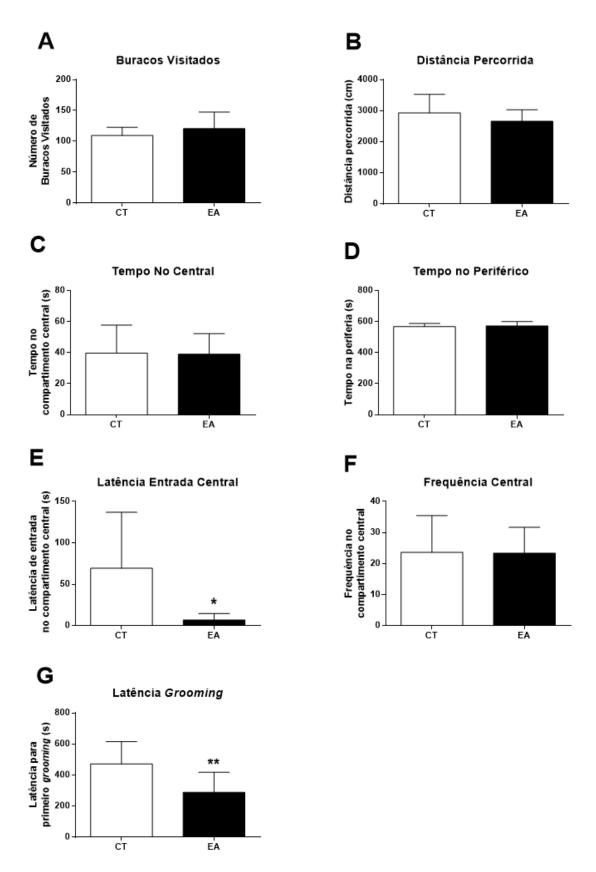


Figura 19. Efeitos do EA sobre atividade exploratória, locomoção e comportamento tipo-ansioso no teste da tábua de buracos. A) Número de buracos visitados. B) Distância percorrida na caixa. C) Tempo gasto no compartimento central. D) Tempo gasto no compartimento periférico. E) Latência para a entrada no compartimento central. F) Frequência de entrada no compartimento central. G) Latência para o primeiro *grooming*. Duração do

teste: 10 minutos. (n=10/grupo). Dados apresentados como média ± EPM. Análise estatística por *Student's t-test* *p<0,05; **p<0,01. Abreviações: *CT*, controle; *EA*, enriquecimento ambiental.

5.2 Resultados das análises bioquímicas

5.2.1 Efeitos do EA sobre ativação de PLC mediada por OTR no estriado

O teste de PLC foi realizado para medir a atividade celular mediada pela ativação de OTR acoplado à proteína G_q . O teste foi realizado utilizando 3 doses do agonista OT (100 nM, 1 μ M e 10 μ M) de forma temporal. Foi realizada ANOVA de duas vias com os fatores "grupo" (CT x EA) e "Tempo" (minutos em que a leitura foi realizada). Para a dose de 100 nM, a ANOVA de duas vias mostrou diferenças para o fator "grupo" [$F_{(1,56)} = 4,82$; p<0,06] e fator "tempo" [$F_{(6,56)} = 22,76$; p<0,001], mas não apontou diferenças significantes para a interação dos fatores "grupo" e "tempo" [$F_{(6,56)} = 0,61$; p=0,71], sugerindo que o EA possui menor ativação de PLC, comparado com o CT, na dose de 100 nM de OT. Já para as doses de 1 μ M e 10 μ M, a ANOVA de duas vias revelou diferenças para o fator "tempo" [$F_{(6,60)} = 15,60$; p<0,001], [$F_{(6,60)} = 13,54$; p<0,001], mas não para o fator "grupo" [$F_{(1,60)} = 2,98$; p=0,08], [$F_{(1,60)} = 2,42$; p=0,12] nem para a interação entre os dois fatores [$F_{(6,60)} = 0,38$; p=0,89], [$F_{(6,60)} = 0,19$; p=0,97], respectivamente.

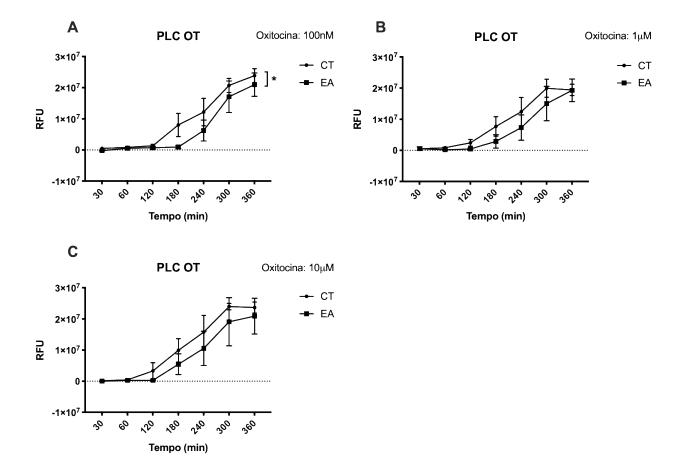


Figura 20. Efeitos do EA sobre ativação de PLC mediada por OTR no estriado. A) Dosagem temporal de PLC após tratamento com 100 nM de OT no estriado. B) Dosagem temporal de PLC após tratamento com 1 μ M de OT no estriado. C) Dosagem temporal de PLC após tratamento com 1 μ M de OT no estriado. (n=6/grupo). Dados apresentados como média \pm EPM. Análise estatística por ANOVA de duas vias. *p<0,05. Abreviações: *CT*, controle; *EA*, enriquecimento ambiental; *OT*, oxitocina; *PLC*, fosfolipase C; *RFU*, unidade de fluorescência relativa.

5.2.2 Efeitos do EA sobre a expressão gênica de vasopressina (VP) e receptores V1a, V1b, oxitocina (OT) e OTR no hipotálamo e estriado

Para estudar os efeitos do ambiente enriquecido sobre a expressão de mRNA dos sistemas vasopressinérgico e oxitocinérgico no hipotálamo e estriado, foi realizado o protocolo de PCR em tempo real. O *Student's t- test* mostrou aumento da expressão de mRNA de OT no hipotálamo e de mRNA de VP no estriado dos animais do grupo EA, comparado com CT [t=2,530; p=0,052] e [t=4,349, p<0,05], respectivamente. Já a análise estatística para o restante dos receptores não apontou diferenças significantes.

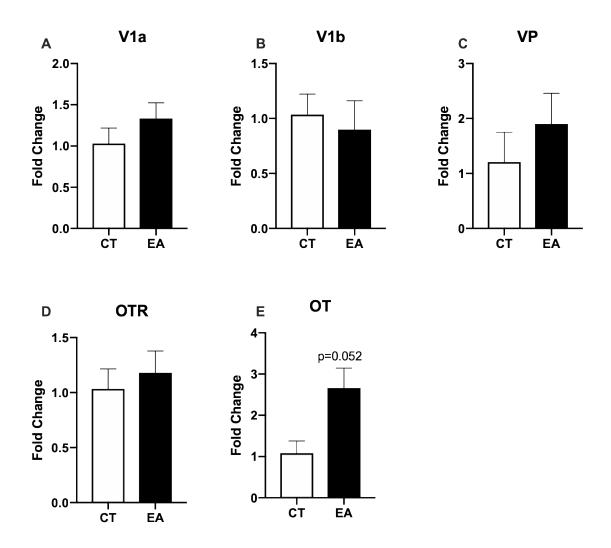


Figura 21. Efeitos do EA sobre a expressão gênica de vasopressina (VP) e receptores V1a, V1b, oxitocina (OT) e OTR no hipotálamo A) Quantificação de receptor V1a de animais controle e EA. B) Quantificação de receptor V1b de animais controle e EA. C) Quantificação de vasopressina de animais controle e EA. D) Quantificação de receptor de oxitocina de animais controle e EA. E) Quantificação de oxitocina de animais controle e EA. C) Quantificação de oxitocina de animais controle e EA. Os animais foram sacrificados depois de 21 no ambiente enriquecido. (n=4/grupo). Dados apresentados como média ± EPM. Análise estatística por *Student's t-test* *p<0,05. Abreviações: *CT*, controle; *EA*, enriquecimento ambiental; *OT*, oxitocina; *OTR*, receptor de oxitocina; *VP*, vasopressina; *V1a*, receptor de vasopressina do subtipo 1a; *V1b*, receptor de vasopressina do subtipo 1b.

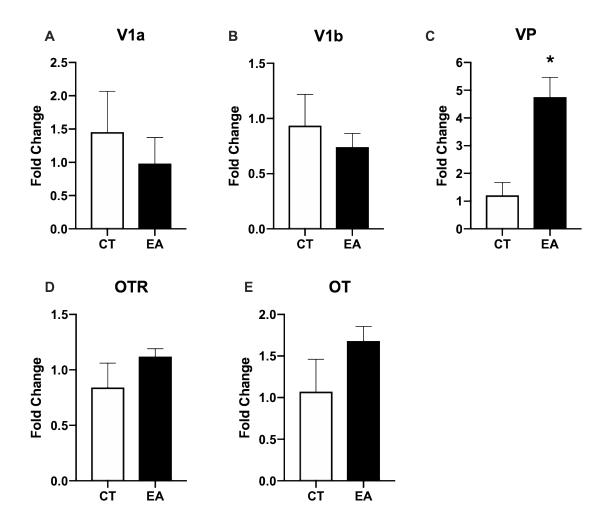


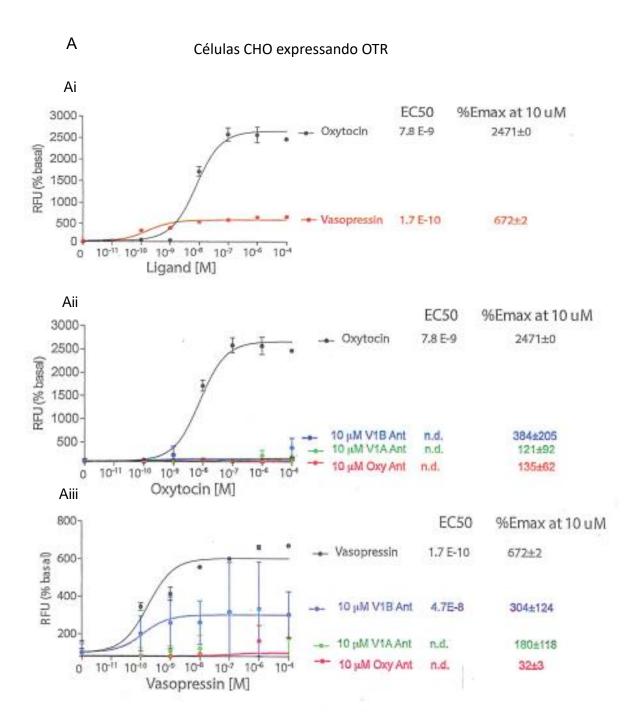
Figura 22. Efeitos do EA sobre a expressão gênica de vasopressina (VP) e receptores V1a, V1b, oxitocina (OT) e OTR no estriado A) Quantificação de receptor V1a de animais controle e EA. B) Quantificação de receptor V1b de animais controle e EA. C) Quantificação de vasopressina de animais controle e EA. D) Quantificação de receptor de oxitocina de animais controle e EA. E) Quantificação de oxitocina de animais controle e EA. Os animais foram sacrificados depois de 21 no ambiente enriquecido. (n=4/grupo). Dados apresentados como média ± EPM. Análise estatística por Student's t-test *p<0,05. Abreviações: CT, controle; EA, enriquecimento ambiental; OT, oxitocina; OTR, receptor de oxitocina; VP, vasopressina; V1a, receptor de vasopressina do subtipo 1a; V1b, receptor de vasopressina do subtipo 1b.

5.2.3 Análise da resposta cruzada entre OT e VP e seus receptores V1a e OTR, respectivamente, na liberação de Ca²⁺

O teste de liberação de Ca²⁺ foi utilizado para medir eficácia e potência da ligação dos agonistas OT e VP em receptores de OT e V1a, na presença e ausência dos respectivos antagonistas. Para isso, foram utilizadas células CHO transfectadas com OTR e V1a, de maneira isolada. Para células tranfectadas com OTR tratadas com OT, o EC₅₀ foi de 7,8x10-9 e a porcentagem de E_{max} foi

2.471. Quando os antagonistas OTR, V1a e V1b foram adicionados, houve bloqueio da resposta, apresentando valores de E_{max} de 135 ± 62 , 121 ± 92 e 384 ± 205 , respectivamente. Quando as células contendo OTR foram tratadas com VP, o valor de EC_{50} apresentado foi de 1,7x10-10 e o E_{max} 672. Após tratamento com os antagonistas, houve bloqueio da resposta apenas na presença de antagonista de OTR e V1a ($E_{max} = 32\pm3$ e 108 ± 18 , respectivamente). Já com antagonista V1b, houve apenas um bloqueio parcial, aprsentando EC_{50} de 4,7x10-10 e E_{max} de 304 ± 205 .

Para as células transfectadas com receptores V1a tratadas com VP, o EC₅₀ foi de 4,2x10-11 e E_{max} de 1145±9. Entretanto, quando os antagonistas de OTR, V1a e V1b foram adicionados, apenas o antagonista de V1a foi capaz de bloquear a ativação de receptor (EC₅₀= 4,2x10⁻¹¹ e E_{max}= 698±46). Enquanto o antagonista de V1b provocou um bloqueio parcial (EC₅₀= 4,7x10⁻⁸ e E_{max}=993±99), o antagonista de OTR não teve efeito em reduzir a liberação de Ca²⁺ (EC₅₀= 8,8x10⁻⁹ e E_{max}=1176±80). Por outro lado, nessas células, o tratamento com OT produziu um EC₅₀ de 1,2x10-9 e E_{max} de 1001±84. De forma similar aos resultados anteriores, apenas o tratamento com antagonista de V1a foi capaz de gerar um bloqueio na resposta celular (EC₅₀= 5,8x10⁻⁸ e E_{max}=142±26). Por outro lado, os antagonistas V1b e OTR não foram capazes de impeder a resposta de liberação de Ca2+ (EC₅₀= 4,7x10⁻⁸ e E_{max}= 993±99; EC₅₀= 6.0x10⁻⁸ e E_{max}= 826±172; respectivamente).



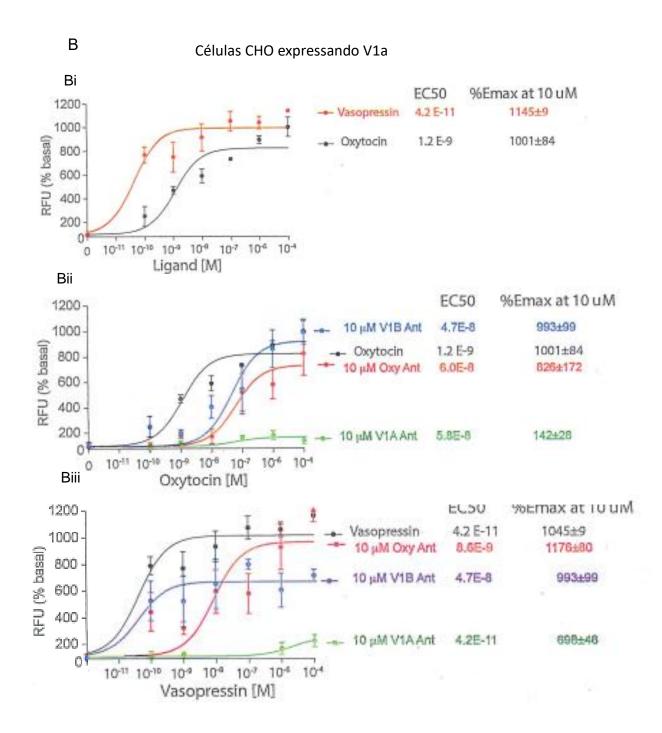


Figura 23. Análise da resposta cruzada entre OT e VP na liberação de Ca²+. **A)** Células CHO tranfectadas com OTR **Ai)** Tratamento com agonista OT e VP; **Aii)** Tratamento com OT na presença de antagonista OTR, V1a e V1b; **Aiii)** Tratamento com VP na presença de antagonista OTR, V1a e V1b. **B)** Células CHO tranfectadas com V1a. **Bi)** Tratamento com agonista OT e VP; **Bii)** Tratamento com OT na presença de antagonista OTR, V1a e V1b; **Biii)** Tratamento com VP na presença de antagonista OTR, V1a e V1b. Dados apresentados como média ± EPM.

6 DISCUSSÃO

Os efeitos recompensadores do estímulo social não foram capazes de reverter o aumento da preferência pelo etanol nos animais enriquecidos, apesar do aumento da interação social promovida por esse ambiente. Esse efeito potencializador do EA sobre a recompensa ao etanol aparenta ser um efeito etanol-direcionado, uma vez que, frente a recompensas naturais de alto valor hedônico (*Froot Loops®*), o EA atenuou o comportamento de busca. De forma muito interessante, o tratamento com a carbetocina exibiu um padrão de resposta semelhante ao EA em relação à preferência pelo etanol vs social. De fato, como já demonstrado anteriormente, a oxitocina tem um papel relevante na recompensa ao etanol (Rae et al., 2018).

A diminuição da atividade locomotora em um ambiente novo (na fase de habituação do teste de Crawley) e menor interação dos animais EA com os *Froot Loops®*, comparado com os CTs, sugerem menor motivação e resposta à novidade e a estímulos hedônicos, que são aspectos críticos do processo de dependência (Arenas et al., 2014; Sjoerd et al., 2014). A importância desse teste reside no fato de ser um teste motivacional que impede o animal de consumir o alimento adocicado, reforçando o comportamento motivacional para obter o alimento. Talvez por esse motivo, estudos que avaliaram a motivação de animais enriquecidos para consumir alimentos adocicados encontraram nenhuma diferença (Konkle et al., 2010) ou menor preferência após EA em ratos (Fernández-Teruel et al., 2002). É interessante apontar que animais cronicamente estressados mostram aumento de ingestão de alimentos doces (Ely et al., 1997). Em virtude do potencial ansiolítico do EA (Novaes et al, 2017), é plausível supor que a menor motivação possa estar relacionada a esse efeito.

No teste de *food enticing* foram utilizados dois métodos: no primeiro o animal passou por 24 horas de privação alimentar e o teste foi realizado com os *pellets*. Neste caso, os *pellets* representam uma recompensa primária com alto valor reforçador, já que o animal estava privado de alimento. No segundo método, os animais não passaram pelo jejum e foram testados com *Froot Loops®*, um cereal com alta quantidade de açúcar (12g de açúcares por porção de 30g de cereal), considerado um alimento palatável. Conforme demonstrado previamente, o açúcar tem alto valor hedônico para os animais e é capaz de gerar CPP e consumo maior no teste de preferência por sacarose (Papp et al., 1991; Pothion et al., 2004), por exemplo. Neste caso, como os animais não estavam em jejum, o cereal pode ser considerado uma

recompensa com baixo valor reforçador, mas com alto valor hedônico. A palatabilidade aumenta a ingestão do alimento por mecanismos hedônicos que prevalecem sobre necessidades calóricas (Guegan et al., 2013). Enquanto que no primeiro teste os grupos não apresentaram diferenças na exploração da caixa de arame contendo os pelletes, no segundo teste o grupo EA passou menos tempo explorando a caixa de arame com Froot Loops® comparado com os CT. Isso sugere uma menor motivação dos animais enriquecidos para obter a recompensa com maior característica palatável e alto valor hedônico, quando não está associada à "fome", por exemplo. A DA é um dos responsáveis por mediar esse comportamento, uma vez que em animais com restrição alimentar a DA aumenta o comportamento de busca pelo alimento associado à pista, e diminui esse comportamento em ratos alimentados ad libitum (Du Hoffmann e Nicola, 2016). Estudos sugerem que o EA reduz a função de receptores dopaminérgicos D1 no córtex pré-frontal (Del Arco et al., 2007), reduz a liberação de dopamina no córtex pré-frontal induzida por estresse (Segovia et al., 2008), aumenta a internalização de transportadores de DA no estriado (Kim et al., 2016 e aumenta a liberação de dopamina induzida por anfetamina no NAc (Bowling et al., 1993). Esses estudos sugerem uma modulação dopaminérgica induzida pelo ambiente enriquecido. Seguindo essa linha, o aumento do consumo de comidas palatáveis está associado com comportamentos de impulsividade, compulsão e perda de controle, como observado em obesos (Guegan et al., 2013). Essas características também são observadas no processo de dependência, sugerindo que a menor resposta apresentada pelo grupo EA é potencialmente protetora frente ao uso de drogas de abuso.

Em relação à atividade locomotora, foi mostrado que animais enriquecidos exploram menos ambientes novos, como no caso do campo aberto. Por exemplo, Rueda (2017) mostrou que animais que passaram pelo enriquecimento de 1 semana tiveram menor atividade locomotora no campo aberto. Entretanto, o padrão de exploração foi diferente dos controles, em que os EA no começo do teste exploravam mais e com o passar do tempo tinham a exploração decaída. Isso sugere um processamento da novidade diferente, ou seja, existe a motivação para a exploração do ambiente novo, mas a passagem de novidade para familiarização ocorre mais rapidamente (de Carvalho et al., 2010; Hughes e Collins, 2010; Kobilo et al., 2013).

Em contrapartida, não foram encontradas diferenças entre os grupos no número de buracos visitados nem na locomoção, que também podem ser

interpretados como atividade exploratória (Lister, 1990). É possível que os buracos ofereçam estímulos novos aos animais enriquecidos, favorecendo a exploração desse novo ambiente. Por outro lado, muitos autores atribuem os eventos observados na caixa de buracos a comportamentos relacionados à ansiedade Casarubea et al., 2009; Lister, 1990; Ohl et al., 2001). Neste caso, apesar do número de buracos visitados e atividade exploratória não apresentarem diferença, o padrão em que esses eventos aconteceram foi diferente. Os animais EA tiveram menor latência para entrar na região central e também para iniciar o primeiro grooming. Estes dois eventos estão relacionados com menor comportamento tipo-ansioso. Casarrubea et al. (2010) discutem que o grooming acontece quando o animal está com menor nível de ansiedade e está envolvido no processo de familiarização dele com o ambiente novo. Dessa forma, a menor latência para *grooming* sugere que o animal enriquecido se familiarizou com o ambiente novo de maneira mais rápida, levando a um menor estado ansioso. Esses dados estão em acordo com outros trabalhos que mostraram que o enriquecimento promove efeitos ansiolíticos, quando usado o teste de labirinto em cruz elevado (Rae et al., 2018; Sampedro-Piquero et al., 2013).

O teste de interação social apresentou resultados consistentes com a modulação oxitocinérgica promovida pelo EA (Rae et al., 2018). Enquanto os animais CT não exibiram diferença entre exploração do animal e da gaiola vazia, os animais enriquecidos exploraram mais o lado com o animal novo do que o lado vazio. Esse aumento de sociabilidade apresentado pelo grupo EA está de acordo com outros trabalhos que mostram que o ambiente enriquecido é capaz de aumentar o comportamento social (Neal et al., 2018). A importância do papel da OT nesse processo (Onaka et al., 2012) corrobora a hipótese de que o EA aumenta a interação social por promover aumento de OT em regiões importantes para reconhecimento social, como regiões olfatórias e corticais. Inclusive, nossos dados mostraram um aumento de OT no hipotálamo (Rae et al., 2018).

Além de o EA aumentar a interação social, os animais enriquecidos mostraram maior comportamento de dominância, representado pelo maior número de vitórias sobre animais CT, no tubo de dominância social. Esse teste, relacionado com comportamento social, reflete principalmente graus de agressividade e dominância, parâmetros que também são mediados pela OT (Timmer et al., 2011). Como a OT é responsável por modular o comportamento social, é possível especular que a formação de alianças sociais esteja positivamente correlacionada com o status social

e vice-versa (Wang, 2014). Estudos prévios mostraram que animais dominantes bebem menos que animais subordinados (Anacker et al., 2014), sugerindo que a dominância pode ter um efeito protetor em relação ao consumo de etanol, possivelmente devido ao maior efeito ansiogênico causado pela submissão.

A OT regula o comportamento social diminuindo a ansiedade (e.g., neofobia) e inibindo a agressividade causada pelo encontro com um indivíduo desconhecido, permitindo que haja aumento do contato social e formação de laços (Keverne e Curley, 2004). Uma vez que o contato é estabelecido, ocorre o aumento da liberação de OT em regiões relacionadas com reconhecimento do outro, como córtex visual e auditivo em humanos e regiões olfatórias (bulbo olfatório, córtex piriforme) em roedores (Oettl et al., 2016). Como o contato social é recompensador, existe liberação de DA no NAc e no estriado, reforçando a interação social (Johnson e Young, 2015). Por exemplo, já foi demonstrado que durante a formação de casais em roedores, a DA interage com receptores do tipo D2, e uma vez que o par foi formado, os receptores do tipo D1 são mais ativados, mantendo a formação do casal e mediando comportamento agressivo em relação a estranhos do sexo oposto (Resendez e Aragona, 2013), que será discutido em mais detalhes adiante. Esse turnover na ativação de receptores D2 e D1 também já foi descrita para psicoestimulantes, como a cocaína (Burkett e Young, 2012), ou seja, parece haver uma sobreposição dos efeitos da interação social com os das drogas de abuso no sistema de recompensa.

Uma literatura crescente tem mostrado os potenciais efeitos protetores da OT sobre a dependência (para revisão ver McGregor e Bowen, 2012). De um lado, diversos autores apontam que a modulação da via oxitocinérgica promove aumento da recompensa social e fortalece as relações sociais. De fato, a ausência de e/ou interação social inadequada, são fatores de risco para o desenvolvimento da dependência (Volkow et al., 2011). Além disso, devido à sobreposição das vias oxitocinérgicas e da recompensa, o fortalecimento da recompensa social poderia levar à diminuição da recompensa pela droga (Buisman-Pijlman et al., 2014). Do outro lado, a OT pode ter efeitos diretos sobre aspectos da dependência relacionados ao etanol. Já foi demonstrado que a OT é capaz de modular a resposta reforçadora ao etanol, no modelo de consumo, mais especificamente diminuindo a liberação de DA no NAc promovida pela droga (Peters et al., 2017). Já um experimento utilizando o modelo de CPP, mostrou que injeções do análogo de OT antes do condicionamento ao etanol foram capazes de diminuir a aquisição e reinstalação e acelerar o processo de

extinção, todos os eventos envolvendo superexpressão de OTR no NAc (Bahi, 2015). Bowen e colaboradores (2015) sugeriram que a OT é capaz de fisicamente bloquear a ligação da molécula de etanol com os receptores GABAérgicos, principal sítio de ação da droga diminuindo seus efeitos depressores.

Apesar da literatura citada acima, mostrando os efeitos protetores do sistema oxitocinérgico sobre fatores de risco para a dependência (e.g. ansiedade, isolamento social), e dos testes sociais no presente trabalho indicarem um aumento de sociabilidade e dominância social nos animais EA (potencialmente mediado por OT), os resultados encontrados no teste de preferência condicionada à lugar (CPP) não indicaram esse caminho. Neste estudo, foram demonstradas as propriedades recompensadoras tanto do etanol quanto da interação social, separadamente. Para comparar o poder recompensador de ambos, confrontamos o poder recompensador do etanol e social seguindo um procedimento de condicionamento concorrente, onde o etanol foi pareado a um lado e a interação social pareada ao lado oposto. Apesar dessa concorrência, o grupo EA continuou demonstrando maior preferência pelo etanol do que pelo lado social. Em contrapartida, os animais do grupo CT não apresentaram diferenças significantes na preferência por nenhum dos estímulos.

O teste da CPP avalia efeitos de recompensa da droga, utilizando doses baixas e poucas administrações (i.e 2,0g/Kg; 4 injeções em dias alternados). Koob (2009) descreve esse teste como sendo correlacionado com o primeiro estágio da dependência, também chamado por ele de antecipação. Portanto, é possível dizer que a CPP mede a recompensa dada pelo contato inicial com a droga. Sabe-se que nos primeiros contatos, o etanol é capaz de ativar o eixo HPA, levando a um estágio inicial aversivo (Chester et al., 2014; Stewart e Grupp, 1989). Além disso, sabe-se que fazer uso da bebida no contexto social (em inglês, social drinking) está associado ao escalonamento do seu uso (Cruz et al., 2012; Osgood et al., 2013). Pelo fato de o contexto social ser um diferencial no aumento do uso inicial do etanol, é possível que a OT esteja exercendo um papel na modulação desse efeito, apesar dos mecanismos ainda não estarem esclarecidos. De fato, um estudo recente mostra que a OT não só aumenta o consumo inicial da nicotina, como alivia os efeitos aversivos e do tipo ansioso provocados por ela, em camundongos (Lee et al., 2016). A análise dos resultados dos testes sociais e da CPP no presente estudo, sugere que o efeito prósocial causado pelo EA pode estar relacionado com a maior preferência pelo etanol do que pela novidade social, possivelmente mediado pela OT.

O grupo CT não apresentou diferenças em relação à preferência condicionada tanto ao etanol quanto ao estímulo social. Esse resultado reforça a hipótese de que a recompensa social pode competir com a recompensa causada pela droga, diminuindo o valor da última (Sarnyai e Kovács, 2014), e ressalta a importância da intervenção social como tratamento e prevenção da dependência química, conforme observado em grupos de apoio de Narcóticos Anônimos (McGregor e Bowen, 2012), por exemplo.

A fim de investigar se a OT de fato participa do efeito observado na CPP social vs etanol do grupo EA, foi realizado o mesmo protocolo da CPP, em animais que receberam carbetocina (CBT), um análogo da OT, por 21 dias. Os resultados foram semelhantes aos dos animais EA, sugerindo a participação desse neuropeptídeo na resposta recompensadora ao etanol e à novidade social. De fato, o mesmo resultado já havia sido encontrado em nosso laboratório, usando o modelo convencional de CPP ao etanol, mostrando que a OT aumenta os efeitos recompensadores ao etanol (Rae et al., 2018). Conforme demonstrado neste mesmo trabalho, injeções repetidas de CBT levam a diminuição de OTRs nas mesmas regiões que o EA por 21 dias. Portanto, é possível discutir que a *downregulation* desses receptores nas regiões olfatórias e corticais está envolvida com o aumento da preferência pelo etanol, confrontada ou não com o estímulo social.

No presente estudo, a observação de um maior comportamento social e de dominância concomitante com a maior preferência pelo etanol do que pelo estímulo social, pode parecer contraditório. Entretanto, existem modulações oxitocinérgicas e dopaminérgicas que podem explicar o motivo pelo qual o etanol é mais recompensador do que a novidade social neste contexto.

Duas vias oxitocinérgicas que se projetam para a via mesolímbica já foram descritas. A primeira foi descrita por Dölen e colaboradores (2013) que demonstraram que neurônios oxitocinérgicos enviam projeções axonais do PVN para o NAc e que os OTRs são pré-sinapticos em sua maioria. Os autores não descartam uma atividade parácrina da OT nessa região, apesar da existência das projeções axonais. Já Melis e colaboradores (2007) descreveram uma segunda via que consiste em projeções axônicas do PVN para a área caudal da VTA. Neste caso, também existem neurônios e receptores dopaminérgicos no PVN, que regulam a liberação de OT, fortalecendo a ativação mesolímbica. Conforme já foi discutido acima, os sistemas dopaminérgico e oxitocinérgico interagem aumentando a recompensa a estímulos sociais e já foi

mostrado que a OT interage com o sistema dopaminérgico regulando a motivação social (Johnson e Young, 2015). Estudos apontam que receptores D2 no estriado ventral estão envolvidos com recompensa à novidade social e, conforme a familiarização ocorre, receptores D1 sofrem *up-regulation* no estriado dorsal e começam a sinalizar a interação social com conspecíficos desconhecidos como aversiva (Tops et al., 2014). Portanto, existe uma transição de efeito de novidade para familiarização que é mediada pela interação de OT com DA no estriado dorsal.

A transição da recompensa à novidade para recompensa à familiarização mediada por esses sistemas pode ser considerada protetora. Nesse sentido, a OT via interação com o sistema dopaminérgico poderia facilitar a interação social (familiar) e proteger contra o desenvolvimento da dependência ao etanol (novidade). A fim de testar essa hipótese, foi realizada a CPP pareada com etanol de um lado e um animal familiar do outro. O resultado foi o mesmo encontrado com a CPP feita com o animal novo, sugerindo que mesmo que essas alterações moleculares ocorram, elas não são suficientes para se contraporem ao efeito recompensador do etanol. Além disso, como os animais enriquecidos já possuem um aumento de estímulo social em seu ambiente, o fator de novidade promovido pelos efeitos do etanol também pode contribuir para sua preferência. Por outro lado, o fato de os animais controles não demostrarem preferência por nenhum compartimento também pode estar relacionado com o fato de que tanto o estímulo social quanto o etanol se equiparam em termos de novidade e competem pela preferência do animal de forma semelhante.

Uma teoria para o aumento da preferência pelo etanol em animais enriquecidos é de que o ambiente mais estimulador pode sensibilizar vias dopaminérgicas mesolímbicas. De fato, já foi previamente mostrado que animais que passaram pelo EA apresentaram maior liberação de DA (Segovia et al., 2010) e menor atividade da DAT no NAc (Zhu et al., 2005). O aumento de DA no NAc está intrinsecamente relacionada com recompensa às drogas de abuso (Volkow e Baler, 2014) e o próprio etanol é capaz de aumentar as concentrações de DA no NAc (Di Chiara e Imperato, 1985; Yoshimoto et al., 1992; Clarke et al., 2014). É plausível supor uma exacerbação de atividade dopaminérgica mesolímbica induzida pelo EA e pelo etanol, aumentando a recompensa pelo etanol.

A maioria das pessoas que experimentam drogas de abuso não se torna dependente, por isso cabe discutir o que representa a CPP dentro do contexto do ciclo da dependência. Os resultados encontrados na literatura referentes ao papel do EA e

da OT em outros testes comportamentais relacionados à dependência tem apontado um efeito protetor de ambos. No caso do EA, já foi demonstrado que este é capaz de impedir e reverter a sensibilização comportamental (Rueda et al., 2012) e o consumo de etanol (Marianno et al., 2017). Em relação à OT, King e colaboradores (2017) mostraram que o tratamento com OT diminuiu a auto-administração de etanol e reduziu a reinstalação de consumo de etanol induzida por pistas ambientais em ratos dependentes (Hansson et al., 2018). Finalmente, um estudo clínico piloto usando imagens de ressonância magnética funcional em homens com um padrão de consumo pesado de álcool mostrou que a ocitocina intranasal diminuiu a reatividade neural nas redes cerebrais semelhantes àquelas detectadas em ratos dependentes e em humanos com aumento de expressão do receptor de ocitocina (Hansson et al., 2018). Resultados preliminares em nosso laboratório mostraram que esse peptídeo é capaz de reverter a sensibilização comportamental ao etanol. O modelo de sensibilização comportamental é usado para estudar mecanismos de neuroplasticidade envolvidos no desenvolvimento da dependência (Berridge e Robinson, 2016). Já o modelo de consumo também é utilizado para estudar efeito reforçador de drogas de abuso e é o que mais se aproxima do comportamento humano, uma vez que o animal possui livre acesso à droga (Bardo e Bevins, 2000). Cabe ressaltar que em protocolos de sensibilização ao etanol e de consumo voluntário ou de auto-administração operante, o número de exposições à droga é substancialmente maior que no protocolo de condicionamento. Além disso, a relação direta entre aumento de preferência pela droga no protocolo de CPP e maior consumo e/ou sensibilização se mostra controversa (Green e Grahame, 2008). Por exemplo, animais expostos ao protocolo de CPP ao etanol ou cocaína não apresentaram diferenças no nível de sensibilização comportamental ao etanol (Pildervasser et al., 2014) ou a cocaína (Deroche et al., 1999), respectivamente. Seguindo essa linha, um estudo comparando os efeitos de pré-exposição ao etanol sobre CPP, CPA e sensibilização mostrou que há dissociação entre sensibilização e valor recompensador da droga. Neste estudo, o tratamento prévio com o etanol não aumentou a preferência pela droga, mas foi capaz de atenuar seu efeito aversivo (medido pela CPA), além de aumentar a sensibilização pelo etanol. Portanto, o estudo sugere que o aumento do consumo de etanol estaria mais relacionado com o aumento à tolerância dos efeitos aversivos do etanol do que com diferenças no valor recompensador dessa droga (Cunningham et al., 2002).

Modelos animais se tornaram ferramentas úteis no avanço de nossa compreensão dos processos neurobiológicos subjacentes à iniciação, manutenção, uso compulsivo e recaída ao uso de drogas na dependência em humanos. É importante distinguir os modelos animais que são usados para estudar a dependência. Os modelos podem avaliar aspectos transitórios que medeiam a expressão de comportamentos relacionados com dependência ou mudanças constitutivas de longa duração produzidas pela droga determinantes na dependência.

Na CPP o animal experimenta o efeito de uma recompensa na presença de um conjunto de pistas. A CPP envolve a associação do tratamento de uma droga com um compartimento particular de uma arena. Considera-se que um efeito de "recompensa / reforço" se manifesta por um aumento relativo do tempo gasto no compartimento na área que foi pareada com o tratamento. Dessa forma, a CPP reflete um comportamento impulsionado pela busca de um lugar relacionado a um reforçador e depende de múltiplos processos de aprendizagem (Huston et al, 2013). O paradigma da CPP é uma ferramenta popular de triagem de drogas em modelos animais porque é um procedimento barato e eficiente e é útil para avaliar o desenvolvimento de adaptações comportamentais e neurológicas induzidas por drogas. A CPP difere de estudos com consumo ou auto-administração por se tratar de um modelo que avalia um comportamento aprendido demonstrado por um condicionamento a um estímulo que pode ser recompensador (CPP) ou aversivo (CPA). Outras abordagens para estudar o condicionamento instrumental na dependência incluem respostas operantes (por exemplo, uma pressão de alavanca) que conduzem à administração de uma droga. Este procedimento de reforço positivo é denominado auto-administração. A autoadministração é frequentemente usada para modelar dependência, pois se assemelha mais à condição humana em comparação com uma droga que é fornecida pelo experimentador. Portanto, vale ressaltar que os modelos de CPP e autoadministração avaliam diferentes aspectos da recompensa (abordagem condicionada versus resposta operante) (Scofield et al., 2016).

Baseado nisso, não é possível afirmar que a preferência aumentada ao etanol tanto causada pelo EA quanto pelo tratamento com CBT indiquem necessariamente um risco aumentado de desenvolvimento de dependência. Levando em consideração o papel social de ambos os tratamentos, utilizar droga dentro de um contexto social pode ser um fator protetor por si só. Considerando que a maioria da população vai fazer uso de algum tipo de droga, especialmente do etanol, fazê-lo dentro de um grupo

familiar pode limitar seu uso a esse contexto, prevenindo assim o abuso dessa droga, que tende a acontecer quando o indivíduo se isola. Entretanto, vale a pena refletir esse aspecto do aumento do efeito reforçador pelo EA e pela CBT. De fato, quando ratos são expostos repetidamente a um estímulo neutro que está pareado a uma droga (condicionado), o próprio estímulo pode provocar aumentos de DA e restabelecer a autoadministração de drogas, em modelos de auto-administração de cocaína, por exemplo (Phillips et al., 2003). A reinstalação de respostas induzidas por drogas, estresse ou pistas associadas a drogas é um modelo valioso para avaliar o desejo induzido por esses elementos em seres humanos em abstinência, os quais podem apresentar recaídas ao consumo da droga. Nesse sentido, a exposição a um ambiente previamente associado à droga pode representar uma pista para recaída, devido ao surgimento da memória dos efeitos reforçadores da droga. Portanto, assim como o ambiente social e a CBT podem representar fatores positivos no tratamento e na proteção à dependência, como discutido anteriormente, vale o alerta de que associações prolongadas e repetidas da droga com esses elementos podem também representar fatores de risco.

Um conjunto de dados obtidos na literatura sugere que talvez o tratamento com OT seja particularmente eficaz revertendo o reforço negativo causado pelo uso crônico de drogas, incluindo diminuição da resposta a ansiedade (Morales-Rivera et al., 2014) e aos efeitos emocionais negativos causados pela abstinência, abrangendo também o aspecto social (Zanos et al., 2014). Koob e Mason (2016) discutem que o fármaco ótimo seria aquele que conseguisse impedir/reverter os efeitos dos sintomas que levam ao reforço negativo, experimentados quando o indivíduo se encontra na ausência da droga. No fundo, segundo a teoria da dependência do Koob, o que mantem os indivíduos presos no ciclo da dependência é o uso da droga para aliviar sintomas negativos. Essa hipótese converge com o estudo do Cunningham e colaboradores (2002), mostrando que o aumento do consumo de etanol se dá pela diminuição da aversão e aumento dos efeitos de tolerância à droga.

Ainda analisando os efeitos da oxitocina sobre comportamentos sociais e relacionados ao uso de drogas de abuso, apesar de ambos serem modulados por esse sistema, o papel desse peptídeo parece ser antagônico para cada caso. Por exemplo, enquanto a formação de laços sociais depende da liberação de dopamina causada pela OT, a OT impede essa liberação frente à administração de etanol (Pedersen, 2017). Em relação aos efeitos pró-sociais, a OT aumenta a liberação de

dopamina no NAc, favorecendo a formação de laços sociais (Lieberwirth e Wang, 2016). De fato, Peters e colaboradores (2016) mostraram que administração de etanol (i.p.) aumenta a liberação de dopamina no NAc e que tratamento agudo com OT é capaz de prevenir esse aumento. Ainda, é possível especular que na presença da droga as concentrações de oxitocina possam ser diferentes das concentrações alcançadas com a interação social, o que poderia levar à ativação de diferentes classes de receptores de OT e resultar nesse efeito antagônico referente à liberação de dopamina. Portanto, parece haver um ajuste fino entre os efeitos da OT sobre a DA, no que tange seus efeitos protetores.

No presente estudo, verificamos que o efeito do EA sobre o sistema oxitocinérgico pode prejudicar o papel desse peptídeo frente ao valor recompensador do etanol. O aumento e estímulo crônico desse sistema aparentemente não representou maior atividade intracelular induzida pela ativação de OTRs. Em animais enriquecidos, a ativação de PLC no estriado foi menor do que nos animais controles, sugerindo menor ativação intracelular desencadeada pela estimulação de receptores acoplados à proteína G_q. Estudos apontam que a ativação desses receptores se dá em concentrações muito inferiores de OT quando comparado a OTRs acoplados à proteína G_i (Grinevich et al., 2016). Considerando que os animais do grupo EA possuem concentrações maiores de OT no hipotálamo (Rae et al, 2018), é possível especular que em concentrações acima do fisiológico haja uma transferência de afinidade de G_q para G_i, favorecendo a ativação de receptores acoplados à proteína G_i a exemplo do que acontece com os receptores D1 e D2 (Dreyer et al., 2010).

Os resultados de expressão gênica apontaram que não há diferenças entre as concentrações de mRNA de receptores de OT e VP entre animais controles e enriquecidos. Receptores são estruturas altamente complexas e com mecanismos de regulação mais refinados comparados à liberação de neuropeptídios. A ativação de receptor pode induzir internalização, degradação ou reciclagem. Isso impede que haja super ativação do receptor e descompensação da resposta celular. Além disso, o sistema de reciclagem de receptores permite que a célula gaste menos energia, pois impede a ativação do receptor e consegue devolver o mesmo receptor para a superfície, não sendo necessária a síntese de um novo receptor. Ainda, o tempo necessário para diferentes tipos de receptores serem ativados e/ou reciclados, permite que a modulação dos diferentes sistemas varie. Isso pode ser útil no caso de sistemas muito parecidos, como o da OT e VP.

Já em relação às concentrações de mRNA dos peptídeos, os animais do grupo EA apresentaram maior concentração de OT no hipotálamo, corroborando com os resultados anteriores (Rae et al., 2018). Isso sugere que o aumento desse peptídeo se dá por aumento na sua síntese e não por diminuição na sua degradação, por exemplo.

No caso da VP, foi observado aumento de mRNA no estriado. Infelizmente, o número de trabalhos que estudam esse peptídeo nessa região é escasso. A maioria dos trabalhos apontam para a importância da VP em regiões ligadas ao estresse, como amígdala, hipotálamo e BNST (Harper et al., 2018). Entretanto, Rodriguez-Borrero e colaboradores (2010) mostraram que o bloqueio de receptores V1a no NAc inibia a preferência por cocaína enquanto que a ativação desse mesmo receptor aumentava a preferência pela droga. Resultados semelhantes também foram demonstrados para metanfetamina (Everett et al., 2018). Ainda, foi mostrado que o tratamento com morfina aumenta a concentração de VP no estriado e que a inibição de receptor V1b no estriado bloqueia o desenvolvimento da CPP (Bates et al., 2018). Portanto, esses estudos sugerem um papel relevante da VP na preferência condicionada a drogas de abuso.

Já foi bem estudada a relação cruzada entre OT e VP e seus respectivos receptores. A maioria dos estudos realizou ensaios que medem fosfato de inositol e adenilato ciclase como meio de medir atividade celular mediada pela ativação dos receptores acoplados às proteínas Gq e Gi, respectivamente, por ambos os peptídeos. O resultado mais recorrente é o de que a VP é capaz de ativar OTRs de forma mais eficaz que a OT ativando receptores V1a (Chini et al., 1995; Derick et al., 2002; Manning et al., 2012). A fim avaliar a possível inter-relação entre esses sistemas sobre a ativação de OTR e V1a acoplados à proteína Gq foi realizado o teste de liberação de Ca²⁺ intracelular na presença e ausência dos antagonistas. Os resultados desse teste revelaram que a OT é capaz de ativar os receptores V1a com eficácia semelhante à própria VP, uma vez que os valores de E_{max} são muito próximos. No caso da VP, o Emax da VP em relação ao receptor de OT corresponde a 1/5 do Emax da OT em relação ao seu receptor, indicando uma eficácia bem menor da VP sobre o OTR. Isso sugere uma ligação cruzada entre OT e VP. Inclusive, foram relatadas respostas comportamentais da OT sobre receptores de VP, como no caso da liberação de feromônios em hamsters (flank marking) (Albers e Bamshad, 1998) e na melhora de sintomas associados ao autismo em animais *knockout* para o gene de OTR (Sala et al., 2011).

Avaliando os efeitos dos antagonistas, todos eles foram capazes de inibir a ativação do OTR na presença de OT. O mesmo não aconteceu com os receptores V1a na presença de VP. Isso sugere que apesar de semelhanças entre os receptores, existem diferenças de afinidade e ligação tanto de agonistas como de antagonistas. Além disso, os resultados permitem observar a não especificidade dos antagonistas, o que dificulta estudos sobre esses sistemas. O desenvolvimento de antagonistas específicos se faz necessário para que possamos elucidar o papel e efeitos da OT e VP de maneira mais eficaz e isolada.

Esses resultados evidenciam a complexidade da ativação desses sistemas, o que pode explicar os diferentes efeitos comportamentais resultantes da ativação oxitocinérgica e vasopressinérgica, além de sugerir que não é possível excluir totalmente a possibilidade de que a conversa cruzada entre esses peptídeos ocorra.

Entretanto, é válido ressaltar que o modelo celular, apesar de muito útil para estudar a farmacodinâmica de receptores, não consegue mimetizar a complexidade de um sistema *in vivo*. Diversos fatores contribuem para a ativação dos receptores de OT e VP, incluindo o número de receptores disponíveis, localização de receptores e a concentração liberada do agonista. De acordo com Busnelli e Chini (2018) e Grinevich e colaboradores (2016), em estado basal, ou seja, na ausência de estímulos que possam alterar as concentrações fisiológicas de OT e VT, dificilmente esses peptídeos atingiriam concentrações necessárias para que haja ativação cruzada. Ou seja, para que isso ocorra, geralmente o sistema precisaria ser manipulado, seja por via farmacológica ou modulações ambientais intensas. Outro dado que converge com essa informação é a de que a OT só é capaz de ativar receptores V1a em animais *knockout* para OTR, ou seja, em uma situação não fisiológica (Sala et al., 2011).

De maneira geral, é necessário ter cautela ao analisar os dados obtidos até o momento em relação à interação entre esses dois sistemas. Claramente, a alta complexidade com a qual eles se complementam ainda precisa ser objeto de estudo para que conclusões mais precisas possam ser obtidas e aplicadas à farmacologia.

7 CONCLUSÕES

Os dados obtidos através desse trabalham permitem que se conclua que o EA promove um aumento da preferência condicionada ao etanol, mesmo frente a recompensa social. O EA também promove aumento de comportamentos sociais (interação e dominância) e diminui a motivação pela busca de alimentos palatáveis. Além disso, o EA provoca modificações bioquímicas, como aumento da expressão gênica de VP no estriado e de OT no hipotálamo e diminuição da resposta de OTRs no estriado.

Por fim, também foi mostrada a interação cruzada entre os sistemas de OT e VP, in vitro, através do teste de liberação de Ca²⁺.

REFERÊNCIAS*

Albers HE, Bamshad M. Role of vasopressin and oxytocin in the control of social behavior in Syrian hamsters (Mesocricetus auratus). Prog Brain Res. 1998;119:395-408.

Anacker AM, Smith ML, Ryabinin AE. Establishment of stable dominance interactions in prairie volepeers: relationships with alcohol drinking and activation of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. Soc Neurosci. 2014;9(5):484-94.

Arenas MC, Daza-Losada M, Vidal-Infer A, Aguilar MA, Miñarro J, Rodríguez-Arias M. Capacity of novelty-induced locomotor activity and the hole-board test to predict sensitivity to the conditioned rewarding effects of cocaine. Physiol Behav. 2014;133:152-60.

Bahi A.The oxytocin receptor impairs ethanol reward in mice. Physiol Behav. 2015; 139: 321-327.

Bardo MT, Bevins RA. Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? Psychopharmacology (Berl). 2000 Dec;153(1):31-43.

Bardo MT, Klebaur JE, Valone JM, Deaton C. Environmental enrichment decreases intravenous self-administration of amphetamine in female and male rats. Psychopharmacology. 2001; 155(3):278-84.

Bates MLS, Hofford RS, Emery MA, Wellman PJ, Eitan S. The role of the vasopressin system and dopamine D1 receptors in the effects of social housing condition on morphine reward. Drug Alcohol Depend. 2018;188:113-118. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2018.03.021.

Berridge KC, Robinson TE. Liking, wanting, and the incentive-sensitization theory of addiction. Am Psychol. 2016 Nov;71(8):670-679.

Bicknell RJ. Optimizing release from peptide hormone secretory nerve terminals. J Exp Biol. 1988;139:51-65.

Bielsky IF, Hu SB, Szegda KL, Westphal H, Young LJ. Profound impairment in social recognition and reduction in anxiety-like behavior in vasopressin V1a receptor knockout mice. Neuropsychopharmacology. 2004;29(3):483-93.

Binder E, Malki K, Paya-Cano JL, Fernandes C, Aitchison KJ, Mathé AA, Sluyter F, Schalkwyk LC. Antidepressants and the resilience to early-life stress in inbred mouse strains. Pharmacogenet Genomics. 2011; 21(12): 779-89.

Birnbaumer M. Vasopressin receptors. Trends Endocrinol Metab. 2000;11(10):406-10.

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

Bosch OJ, Neumann ID. Both oxytocin and vasopressin are mediators of maternal care and aggression in rodents: from central release to sites of action. Horm Behav. 2012;61(3):293-303. doi: 10.1016/j.yhbeh.2011.11.002.

Bowen MT, Peters ST, Absalom N, Chebib M, Neumann ID, McGregor IS. Oxytocin prevents ethanol actions at δ subunit-containing GABAA receptors and attenuates ethanol-induced motor impairment in rats. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(10):3104-9.

Bowling SL, Rowlett JK, Bardo MT. The effect of environmental enrichment on amphetamine-stimulated locomotor activity, dopamine synthesis and dopamine release. Neuropharmacology. 1993;32(9):885-93.

Brodkin ES, Hagemann A, Nemetski SM, Silver LM. Social approach-avoidance behavior of inbred mouse strains towards DBA/2 mice. Brain Res. 2004;1002(1-2):151-7.

Buisman-Pijlman FT, Sumracki NM, Gordon JJ, Hull PR, Carter CS, Tops M. Individual differences underlying susceptibility to addiction: Role for the endogenous oxytocin system. Pharmacol Biochem Behav. 2014; 119: 22-38.

Burkett JP, Young LJ. The behavioral, anatomical and pharmacological parallels between social attachment, love and addiction. Psychopharmacology (Berl). 2012;224(1):1-26

Busnelli M, Bulgheroni E, Manning M, Kleinau G, Chini B. Selective and potent agonists and antagonists for investigating the role of mouse oxytocin receptors. J Pharmacol Exp Ther. 2013;346(2):318-27. doi: 10.1124/jpet.113.202994.

Busnelli M, Chini. Molecular Basis of Oxytocin Receptor Signalling in the Brain: What We Know and What We Need to Know. Curr Top Behav Neurosci. 2018;35:3-29. doi: 10.1007/7854_2017_6.

Busnelli M, Saulière A, Manning M, Bouvier M, Galés C, Chini B. Functional selective oxytocin-derived agonists discriminate between individual G protein family subtypes. J Biol Chem. 2012;287(6):3617-29. doi: 10.1074/jbc.M111.277178.

Caldwell HK, Lee HJ, Macbeth AH, Young WS 3rd. Vasopressin: behavioral roles of an "original" neuropeptide. Prog Neurobiol. 2008;84(1):1-24.

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

Casarrubea M, Sorbera F, Magnusson M, Crescimanno G. Temporal patterns analysis of rat behavior in hole-board. Behav Brain Res. 2010;208(1):124-31

Chester JA, Kirchhoff AM, Barrenha GD. Relation between corticosterone and fearrelated behavior in mice selectively bred for high or low alcohol preference. Addict Biol. 2014l;19(4):663-75. doi: 10.1111/adb.12034.

Chini B, Manning M. Agonist selectivity in the oxytocin/vasopressin receptor family: new insights and challenges. Biochem Soc Trans. 2007 Aug;35(Pt 4):737-41.

Chini B, Mouillac B, Ala Y, Balestre MN, Trumpp-Kallmeyer S, Hoflack J, Elands J, Hibert M, Manning M, Jard S, et al. Tyr115 is the key residue for determining agonist selectivity in the V1a vasopressin receptor. EMBO J. 1995;14(10):2176-82.

Clarke RB, Adermark L, Chau P, Söderpalm B, Ericson M. Increase in nucleus accumbens dopamine levels following local ethanol administration is not mediated by acetaldehyde. Alcohol Alcohol. 2014;49(5):498-504. doi: 10.1093/alcalc/agu047.

Cruz JE, Emery RE, Turkheimer E. Peer network drinking predicts increased alcohol use from adolescence to early adulthood after controlling for genetic and shared environmental selection. Dev Psychol. 2012; 48(5): 1390-1402.

Cunningham CL, Gremel CM, Groblewski PA. Drug-induced conditioned place preference and aversion in mice. Nature Protocols. 2006; 1: 1662-1670.

Cunningham CL, Tull LE, Rindal KE, Meyer PJ. Distal and proximal pre-exposure to ethanol in the place conditioning task: tolerance to aversive effect, sensitization to activating effect, but no change in rewarding effect. Psychopharmacology (Berl). 2002;160(4):414-24.

De Carvalho CR, Pandolfo P, Pamplona FA, Takahashi RN. Environmental enrichment reduces the impact of novelty and motivational properties of ethanol in spontaneously hypertensive rats. Behav Brais Res. 2010; 208: 231-6.

Del Arco A, Segovia G, Canales JJ, Garrido P, de Blas M, García-Verdugo JM, Mora F. Environmental enrichment reduces the function of D1 receptors in the prefrontal cortex of the rat. J Neural Transm. 2007; 114: 43-8.

Derick S, Cheng LL, Voirol MJ, Stoev S, Giacomini M, Wo NC, Szeto HH, Ben Mimoun M, Andres M, Gaillard RC, Guillon G, Manning M. [1-deamino-4-cyclohexylalanine] arginine vasopressin: a potent and specific agonist for vasopressin V1b receptors. Endocrinology. 2002;143(12):4655-64.

Deroche V, Le Moal M, Piazza PV. Cocaine self-administration increases the incentive motivational properties of the drug in rats. Eur J Neurosci. 1999;11(8):2731-6.

Di Chiara G, Imperato A. Ethanol preferentially stimulates dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats. Eur J Pharmacol. 1985;115(1):131-2.

Dölen G, Darvishzadeh A, Huang KW, Malenka RC. Social reward requires coordinated activity of nucleus accumbens oxytocinand serotonin. Nature. 2013; 501(7466):179-84.

Donaldson ZR, Young LJ. Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. Science. 2008;322(5903):900-4. doi: 10.1126/science.1158668.

Dreyer JK, Herrik KF, Berg RW, Hounsgaard JD. Influence of phasic and tonic dopamine release on receptor activation. J Neurosci. 2010;30(42):14273-83. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1894-10.2010.

du Hoffmann J, Nicola SM. Activation of Dopamine Receptors in the Nucleus Accumbens Promotes Sucrose-Reinforced Cued Approach Behavior. Front BehavNeurosci. 2016;10:144.

Egashira N, Tanoue A, Matsuda T, Koushi E, Harada S, Takano Y, Tsujimoto G, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M. Impaired social interaction and reduced anxiety-related behavior in vasopressin V1a receptor knockout mice. Behav Brain Res. 2007;178(1):123-7.

Ely DR, Dapper V, Marasca J, Corrêa JB, Gamaro GD, Xavier MH, Michalowski MB, Catelli D, Rosat R, Ferreira MB, Dalmaz C. Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. Physiol Behav. 1997;61(3):395-8.

Everett NA, McGregor IS, Baracz SJ, Cornish JL. The role of the vasopressin V1A receptor in oxytocin modulation of methamphetamine primed reinstatement. Neuropharmacology. 2018;133:1-11. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.12.036.

Fadda F, Rossetti ZL. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. Prog Neurobiol. 1998; 56: 385-431.

Fernández-Teruel A, Driscoll P, Gil L, Aguilar R, Tobeña A, Escorihuela RM. Enduring effects of environmental enrichment on novelty seeking, saccharin and ethanol intake in two rat lines (RHA/Verh and RLA/Verh) differing in incentive-seeking behavior. Pharmacol Biochem Behav. 2002;73(1):225-31.

Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, andregulation. Physiol Rev. 2001; 81(2): 629-683.

Global status report on alcohol and health. Switzerland: WHO 2018.

Gomes I, Aryal DK, Wardman JH, Gupta A, Gagnidze K, Rodriguiz RM, Kumar S, Wetsel WC, Pintar JE, Fricker LD, Devi LA. GPR171 is a hypothalamic G protein-coupled receptor for BigLEN, a neuropeptide involved in feeding. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Oct 1;110(40):16211-6. doi: 10.1073/pnas.1312938110.

Green AS, Grahame NJ. Ethanol drinking in rodents: is free-choice drinking related to the reinforcing effects of ethanol? Alcohol. 2008;42(1):1-11. doi: 10.1016/j.alcohol.2007.10.005.

Grinevich V, Knobloch-Bollmann HS, Eliava M, Busnelli M, Chini B. Assembling the Puzzle: Pathways of Oxytocin Signaling in the Brain. Biol Psychiatry. 2016;79(3):155-64. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.04.013.

Guegan T, Cutando L, Ayuso E, Santini E, Fisone G, Bosch F, Martinez A, Valjent E, Maldonado R, Martin M. Operant behavior to obtain palatable food modifies neuronal plasticity in the brain reward circuit. Eur Neuropsychopharmacol. 2013; 23(2):146-59.

Hansson AC, Koopmann A, Uhrig S, Bühler S, Domi E, Kiessling E, Ciccocioppo R, Froemke RC, Grinevich V, Kiefer F, Sommer WH, Vollstädt-Klein S, Spanagel R. Oxytocin Reduces Alcohol Cue-Reactivity in Alcohol-Dependent Rats and Humans. Neuropsychopharmacology. 2018;43(6):1235-1246. doi: 10.1038/npp.2017.257.

Harper KM, Knapp DJ, Criswell HE, Breese GR. Vasopressin and alcohol: a multifaceted relationship. Psychopharmacology (Berl). 2018;235(12):3363-3379. doi: 10.1007/s00213-018-5099-x.

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

Hops H, Davis B, Lewin LM. The development of alcohol and other substance use: a gender study of family and peer context. J Stud Alcohol Suppl. 1999; 13:22-31.

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

Huston JP, Silva MA, Topic B, Müller CP. What's conditioned in conditioned place preference? Trends Pharmacol Sci. 2013;34(3):162-6. doi: 10.1016/j.tips.2013.01.004.

Insel TR, Shapiro LE. Oxytocin receptor distribution reflects social organization in monogamous and polygamous voles. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(13):5981-5.

Johnson ZV, Young LJ. Neurobiological mechanisms of social attachment and pair bonding. Curr Opin Behav Sci. 2015; 3:38-44.

Johnson ZV, Young LJ. Oxytocin and vasopressin neural networks: Implications for social behavioral diversity and translational neuroscience. Neurosci Biobehav Rev. 2017;76(Pt A):87-98. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.01.034.

Jurek B, Neumann ID. The Oxytocin Receptor: From Intracellular Signaling to Behavior. Physiol Rev. 2018;98(3):1805-1908. doi: 10.1152/physrev.00031.2017.

Kashiwazaki A, Fujiwara Y, Tsuchiya H, Sakai N, Shibata K, Koshimizu TA. Subcellular localization and internalization of the vasopressin V1B receptor. Eur J Pharmacol. 2015;765:291-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.08.043.

Kendler KS. Twin studies of psychiatric illness: an update. Arch Gen Psychiatry. 2001; 58: 1005-1014.

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

Kim MS, Yu JH, Kim CH, Choi JY, Seo JH, Lee MY, Yi C, Choi TH, Ryu YH, Lee JE, Lee BH, Kim H, Cho SR. Environmental enrichment enhances synaptic plasticity by internalization of striatal dopamine transporters. J Cereb Blood Flow Metab. 2016;36(12):2122-2133.

Kimura T, Tanizawa O, Mori K, Brownstein MJ, Okayama H. Structure and expression of a human oxytocin receptor. Nature. 1992;356(6369):526-9.

King CE, Griffin WC, Luderman LN, Kates MM, McGinty JF, Becker HC. Oxytocin Reduces Ethanol Self-Administration in Mice. Alcohol Clin Exp Res. 2017;41(5):955-964. doi: 10.1111/acer.13359.

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

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

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

Koob GF, Mason BJ. Existing and Future Drugs for the Treatment of the Dark Side of Addiction. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2016;56:299-322. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010715-103143.

Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addcition. Neuropsychopharmacology. 2010; 35:217-238.

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

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

Koshimizu TA, Nakamura K, Egashira N, Hiroyama M, Nonoguchi H, Tanoue A. Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. Physiol Rev. 2012;92(4):1813-64. doi: 10.1152/physrev.00035.2011.

Lee H, Jang M, Noh J. Oxytocin attenuates aversive response to nicotine and anxiety-like behavior in adolescent rats. Neurosci Res. 2017;115:29-36. doi: 10.1016/j.neures.2016.11.007

Lee HJ, Macabeth AH, Pagani JH, Young WS 3rd. Oxytocin: the freat facilitator of life. Prog Neurobiol. 2009; 88(2): 127-51.

Lieberwirth C, Wang Z. The neurobiology of pair bond formation, bond disruption, and social buffering. Curr Opin Neurobiol. 2016;40:8-13. doi: 10.1016/j.conb.2016.05.006.

Lindzey G, Winston H, Manosevitz M. Social dominance in inbred mouse strain. Nature. 1961; 191: 474-6.

Lister RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. Pharmacol Ther. 1990;46(3):321-40.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001;25(4):402-8.

Makino S, Smith MA, Gold PW. Increased expression of corticotropin-releasing hormone and vasopressin messenger ribonucleic acid (mRNA) in the hypothalamic paraventricular nucleus during repeated stress: association with reduction in glucocorticoid receptor mRNA levels. Endocrinology. 1995;136(8):3299-309.

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. J Neuroendocrinol. 2012;24(4):609-28. doi: 10.1111/j.1365-2826.2012.02303.x.

Marianno P, Abrahao KP, Camarini R. Environmental Enrichment Blunts Ethanol Consumption after Restraint Stress in C57BL/6 Mice. PLoS One. 2017; 20;12(1):e0170317

McGregor IS, Bowen MT. Breaking the loop: oxytocin as a potential treatment for drug addcition. Horm Behav. 2012;61(3):331-9. doi: 10.1016/j.yhbeh.2011.12.001.

Melis MR, Melis T, Cocco C, Succu S, Sanna F, Pillolla G, Boi A, Ferri GL, Argiolas A. Oxytocin injected into the ventral tegmental area induces penile erection and increases extracellular dopamine in the nucleus accumbens and paraventricular nucleus of the hypothalamus of male rats. Eur J Neurosci. 2007;26(4):1026-35.

Milton AL, Everitt BJ. The persistence of maladaptive memory: addiction, drug memories and anti-relapse treatments. Neuroscience and Biobehavioral Rev. 2012; 36: 1119-39.

Morales-Rivera A, Hernández-Burgos MM, Martínez-Rivera A, Pérez-Colón J, Rivera R, Montalvo J, Rodríguez-Borrero E, Maldonado-Vlaar CS. Anxiolytic effects of oxytocin in cue-induced cocaine seeking behavior in rats. Psychopharmacology (Berl). 2014;231(21):4145-55. doi: 10.1007/s00213-014-3553-y.

Moy SS, Nadler JJ, Young NB, Nonneman RJ, Segall SK, Andrade GM, Crawley JN, Magnuson TR. Social approach and repetitive behavior in eleven inbred mice strains. Behav Brain Res. 2008; 191(1): 118-29.

Neal S, Kent M, Bardi M, Lambert KG. Enriched Environment Exposure Enhances Social Interactions and Oxytocin Responsiveness in Male Long-Evans Rats. Front Behav Neurosci. 2018;12:198. doi: 10.3389/fnbeh.2018.00198.

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

Novaes LS, Dos Santos NB, Batalhote RFP, Malta MB, Camarini R, Scavone C, Munhoz CD. Environmental enrichment protects against stress-induced anxiety: Role of glucocorticoid receptor, ERK, and CREB signaling in the basolateral amygdala. Neuropharmacology.2017;113(PtA):457-466.doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.10.026.

Oettl LL, Ravi N, Schneider M, Scheller MF, Schneider P, Mitre M, da Silva Gouveia M, Froemke RC, Chao MV, Young WS, Meyer-Lindenberg A, Grinevich V, Shusterman R, Kelsch W. Oxytocin Enhances Social Recognition by Modulating Cortical Control of Early Olfactory Processing. Neuron. 2016;90(3):609-21.

Ohl F, Roedel A, Holsboer F. Impact of high and low anxiety on cognitive performance in a modified hole board test in C57BL/6 and DBA/2 mice. Eur J Neurosci. 2003; 17(1): 128-36.

Ohl F, Sillaber I, Binder E, Keck ME, Holsboer F. Differential analysis of behavior and diazepam-induced alterations in C57BL/6N and BALB/c mice using the modified hole board test. J Psychiatr Res. 2001; 35(3):147-54.

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

Osgood DW, Ragan DT, Wallace L, Gest SD, Feinberg ME, Moody J. Peers and the Emergence of Alcohol Use: Influence and Selection Processes in Adolescent Friendship Networks. J Res Adolesc. 2013; 23(3).

Papp M, Willner P, Muscat R. An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. Psychopharmacology (Berl). 1991;104(2):255-9.

Passoni I, Leonzino M, Gigliucci V, Chini B, Busnelli M. Carbetocin is a Functional Selective Gq Agonist That Does Not Promote Oxytocin Receptor Recycling After Inducing beta-Arrestin-Independent Internalisation. J Neuroendocrinol. 2016; 28(4).

Pedersen CA. Oxytocin, Tolerance, and the Dark Side of Addiction. Int Rev Neurobiol. 2017;136:239-274. doi: 10.1016/bs.irn.2017.08.003.

Peters ST, Bowen MT, Bohrer K, McGregor IS, Neumann ID. Oxytocin inhibits ethanol consumption and ethanol-induced dopamine release in the nucleus accumbens. Addict Biol. 2017;22(3):702-711. doi: 10.1111/adb.12362.

Phillips PE, Stuber GD, Heien ML, Wightman RM, Carelli RM. Subsecond dopamine release promotes cocaine seeking. Nature. 2003;422(6932):614-8.

Pildervasser JV, Abrahao KP, Souza-Formigoni ML. Distinct behavioral phenotypes in ethanol-induced place preference are associated with different extinction and reinstatement but not behavioral sensitization responses. Front Behav Neurosci. 2014;8:267. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00267.

Pothion S, Bizot JC, Trovero F, Belzung C. Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. Behav Brain Res. 2004; 155(1):135-46.

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. 2018;138:267-274. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.06.013.

Resendez SL, Aragona BJ. Aversive motivation and the maintenance of monogamous pair bonding. Rev Neurosci. 2013;24(1):51-60.

Risedal A, Mattsson B, Dahlqvist P, Nordborg C, Olsson T, Johansson BB. Environmental influences on functional outcome after a cortical infarct in the rat. Brain Res. Bull. 2002; 58:315-321.

Robinson TE, Berridge KC. Addiction. Annu Rev Psychol. 2003; 54:25-53.

Rodríguez-Borrero E, Rivera-Escalera F, Candelas F, Montalvo J, Muñoz-Miranda WJ, Walker JR, Maldonado-Vlaar CS. Arginine vasopressin gene expression changes within the nucleus accumbens during environment elicited cocaine-conditioned response in rats.Neuropharmacology.2010;58(1):88-101.doi: 10.1016/j.neuropharm.2009.06.040.

Ron D, Jurd R. The "ups and downs" of signaling cascades in addiction. Science. 2005

Rosenbaum DM, Rasmussen SG, Kobilka BK. The structure and function of G-protein-coupled receptors. Nature. 2009 May 21;459(7245):356-63. doi: 10.1038/nature08144.

Rosenzweig MR, Bennett EL, Hebert M, Morimoto H. Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. Brain Res. 1978; 153:563-76.

Rueda AVL, Teixeira AMA, Yonamine M, Camarini R. Environmental enrichment blocks ethanol-induced locomotor sensitization and decreases BDNF levels in the prefrontal cortex in mice. Addict Biol. 2012; 17(4):736-45. doi: 10.1111/j.1369-1600.2011.00408.x.

Sala M, Braida D, Lentini D, Busnelli M, Bulgheroni E, Capurro V, Finardi A, Donzelli A, Pattini L, Rubino T, Parolaro D, Nishimori K, Parenti M, Chini B. Pharmacologic rescue of impaired cognitive flexibility, social deficits, increased aggression, and seizure susceptibility in oxytocin receptor null mice: a neurobehavioral model of autism. Biol Psychiatry. 2011;69(9):875-82. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.12.022.

Sampedro-Piquero P, Zancada-Menendez C, Begega A, Rubio S, Arias JL. Effects of environmental enrichment on anxiety responses, spatial memory and cytochrome c oxidase activity in adult rats. Brain Res Bull. 2013; 98: 1-9.

Sarnyai Z, Kovács GL. Oxytocin in learning and addiction: From early discoveries to present. Pharmacol Biochem Behav. 2014; 119: 3-9.

Sarnyai Z, Szabó G, Kovács GL, Telegdy G. Opposite actions of oxytocin and vasopressin in the development of cocaine-induced behavioral sensitization in mice. Pharmacol Biochem Behav. 1992;43(2):491-4.

Sarnyai Z. Oxytocin as a potencial mediator and modulator of drug addiction. Addiction Biology. 2011;16: 199-201.

Scofield MD, Heinsbroek JA, Gipson CD, Kupchik YM, Spencer S, Smith AC, Roberts-Wolfe D, Kalivas PW. The Nucleus Accumbens: Mechanisms of Addiction across Drug Classes Reflect the Importance of Glutamate Homeostasis. Pharmacol Rev. 2016;68(3):816-71. doi: 10.1124/pr.116.012484.

Scott V, Brown CH. Kisspeptin activation of supraoptic nucleus neurons in vivo. Endocrinology. 2011;152(10):3862-70. doi: 10.1210/en.2011-1181.

Segovia G, Del Arco A, de Blas M, Garrido P, Mora F. Effects of an enriched environment on the release of dopamine in the prefrontal cortex produced by stress and on working memory during aging in the awake rat. Behav Brain Res. 2008 Mar 5;187(2):304-11.

Segovia G, Del Arco A, De Blas M, Garrido P, Mora F. Environmental enrichment increases the in vivo extracellular concentration of dopamine in the nucleus accumbens: a microdialysis study. J Neural Transm. 2010;117(10):1123-30.

Serradeil-Le Gal C, Wagnon J, Valette G, Garcia G, Pascal M, Maffrand JP, Le Fur G. Nonpeptide vasopressin receptor antagonists: development of selective and orally active V1a, V2 and V1b receptor ligands. Prog Brain Res. 2002;139:197-210.

Shahrokh DK, Zhang TY, Diorio J, Gratton A, Meaney MJ. Oxytocin-dopamine interactions mediate variations in maternal behavior in the rat. Endocrinology. 2010; 151(5): 2276-86.

Simpson J, Kelly JP. The impact of environmental enrichment in laboratory rats-Behavioural and neurochemical aspects. Behavioural Brain Res. 2011; 222:246-264.

Sinha R. Chronic Stress, Drug Use, and Vulnerability to Addiction. Annals of the New York Academy of Sciences. 2008; 1141: 105-130.

Sjoerds Z, Luigjes J, van den Brink W, Denys D, Yucel M The role of habits and motivation in human drug addiction: a reflection. Front Psychiatry; 20145: 8

Solinas M, Chauvet C, Thiriet N, El Rawas R, Jaber M. Reversal of cocaine addiction by environmental enrichment. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2008; 105:17145-17150.

Song Z, Albers HE. Cross-talk among oxytocin and arginine-vasopressin receptors: Relevance for basic and clinical studies of the brain and periphery. Front Neuroendocrinol. 2018;51:14-24. doi: 10.1016/j.yfrne.2017.10.004.

Stairs DJ, Bardo MT. Neurobehavioral effects of environmental enrichment and drug abuse vulnerability. Pharmacol Biochem Behav. 2009; 92(3):377-382.

Stewart RB, Grupp LA. Conditioned place aversion mediated by self-administered ethanol in the rat: a consideration of blood ethanol levels. Pharmacol Biochem Behav. 1989; 32(2): 431-437.

Stoop R. Neuromodulation by oxytocin and vasopressin. Neuron. 2012 Oct 4;76(1):142-59. doi: 10.1016/j.neuron.2012.09.025.

Surget A, Belzung C. Involvement of vasopressin in affective disorders. Eur J Pharmacol. 2008;583(2-3):340-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.11.065.

Thibonnier M, Berti-Mattera LN, Dulin N, Conarty DM, Mattera R. Signal transduction pathways of the human V1-vascular, V2-renal, V3-pituitary vasopressin and oxytocin receptors. Prog Brain Res. 1998;119:147-61.

Thibonnier M, Coles P, Thibonnier A, Shoham M. The basic and clinical pharmacology of nonpeptide vasopressin receptor antagonists. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2001;41:175-202.

Thiel KJ, Okun AC, Neisewander JL. Social reward-conditioned place preference: a model revealing an interaction between cocaine and social context rewards in rats. Drug Alcohol Depend. 2008; 96(3): 202-12.

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

Timmer M, Cordero MI, Sevelinges Y, Sandi C. Evidence for a role of oxytocin receptors in the long-term establishment of dominance hierarchies. Neuropsychopharmacology. 2011; 36(11): 2349-56.

Tops M, Koole SL, IJzerman H, Buisman-Pijlman FT. Why social attachment and oxytocin protect against addiction and stress: Insights from the dynamics between ventral and dorsal corticostriatal systems. Pharmacol Biochem Behav. 2014;119:39-48.

Torrealba F, Riveros ME, Contreras M, Valdes JL. Histamine and motivation. Front Syst Neurosci. 2012; 6:51.

Trezza V, Baarendse PJ, Vanderschuren LJ. On the interaction between drugs of abuse and adolescent social behavior. Psychopharmacology (Berl.). 2014; 231(8): 1715-29.

Valdés JL, Sánchez C, Riveros ME, Blandina P, Conteras M, Farías P, Torrealba F. The histaminergic tuberomammilary nucleus is critical for motivated arousal. Eur J Neurosci. 2010; 31(11): 2073-85.

Van Dellen A, Blakemore C, Deacon R, York D, Hannan AJ. Delaying onset of Huntington's in mice. Nature. 2000; 404:721-722.

Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. Nat. Rev. Neurosci. 2000; 1:191-198.

Veenema AH, Neumann ID. Central vasopressin and oxytocin release: regulation of complex social behaviours. Prog Brain Res. 2008;170:261-76. doi: 10.1016/S0079-6123(08)00422-6.

Viero C, Shibuya I, Kitamura N, Verkhratsky A, Fujihara H, Katoh A, Ueta Y, Zingg HH, Chvatal A, Sykova E, Dayanithi G. Oxytocin: crossing the bridge between basic science and pharmacotherapy. CNS Neurosci Ther. 2010; 16(5): e138-e156.

Volkow ND, Baler RD, Goldstein RZ. Addiction: Pulling at the neural threads of social behaviors. Neuron. 2011; 69(4): 599-602.

Volkow ND, Baler RD. Addiction science: uncovering neurobiological complexity. Neuropharmacology. 2014; 76: 235-49.

Wang F, Kessels HW, Hu H. The mouse that roared: neural mechanisms of social hierarchy Trends. Neurosci. 2014;37(11):674-82.

Xiao L, Priest MF, Nasenbeny J, Lu T, Kozorovitskiy Y. Biased Oxytocinergic Modulation of Midbrain Dopamine Systems. Neuron. 2017;95(2):368-384.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2017.06.003.

Xu Z, Hou B, Gao Y, He F, Zhang C. Effects of enriched environment on morphine-induced reward in mice. Exp Neurol. 2007; 204:714-719.

Yoshimoto K, McBride WJ, Lumeng L, Li TK. Alcohol stimulates the release of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens. Alcohol. 1992;9(1):17-22.

Young KA, Gobrogge KL, Liu K, Wang Z. The neurobiology of pair bonding: insights from a socially monogamous rodent. Front Neuroendocrinol. 2011; 32(1): 53-69.

Young LJ, Wang Z. The neurobiology of pair bonding. Nat Neurosci. 2004; 7(10): 1048-54.

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

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

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

Zingg HH, Laporte SA. The oxytocin receptor. Trends Endocrinol Metab. 2003;14(5):222-7.