

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.

São Paulo
2019

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 à 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 à semelhança estrutural entre os sistemas de OT e VP, foi realizado o teste de dosagem de Ca^{2+} 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 revealed 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, Ca^{2+} release assay was used to study the cross-talk between both systems. OT was able to activate V1a with higher efficacy than 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 modulating the increase of OT and VP, which could be involved with the behavioral changes observed.

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

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 GABA_A) (Harris et al., 2008). Além do seu efeito no receptor GABA_A, 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 neurotrófico 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 neuropeptídeo modulador do sistema nervoso central. Oxitocina e vasopressina estão 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 seqüência 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.

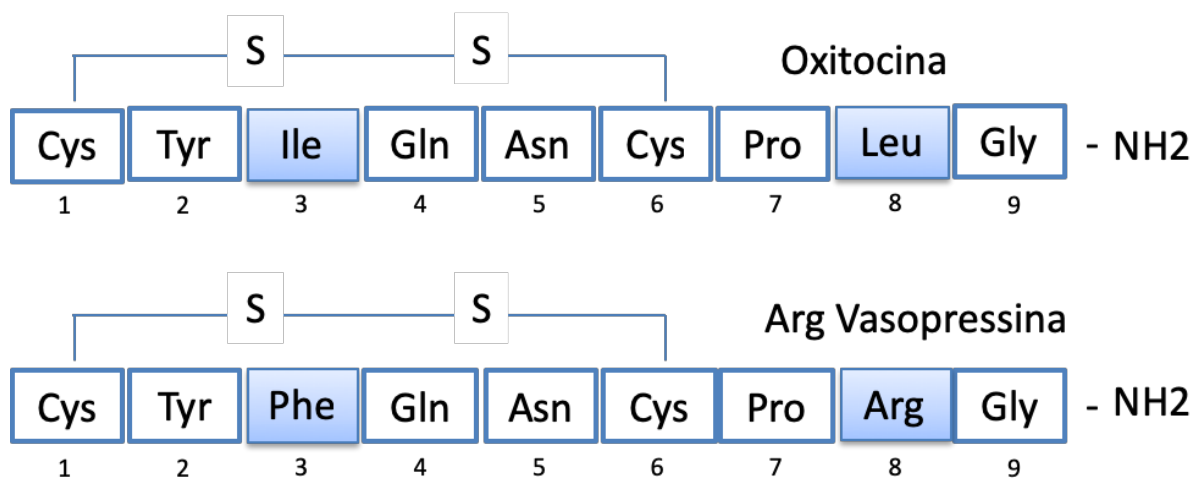


Figura 1. Esquema da sequência de aminoácidos das moléculas de oxitocina e vasopressina. Os aminoácidos destacados representam as diferenças entre as moléculas.

1.3.1.1 Síntese e liberação dos peptídeos

OT e VP são sintetizados primariamente em neurônios magnocelulares e parvocelulares localizados nos núcleos supraóptico (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 Ca^{2+} (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 Ca^{2+} 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 G_q , enquanto doses maiores são necessárias para a ativação de G_i ou G_o . 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 $G_{q/11}$ 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 G_q , enquanto alta densidade facilitaria o acoplamento com proteína G_s , 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.

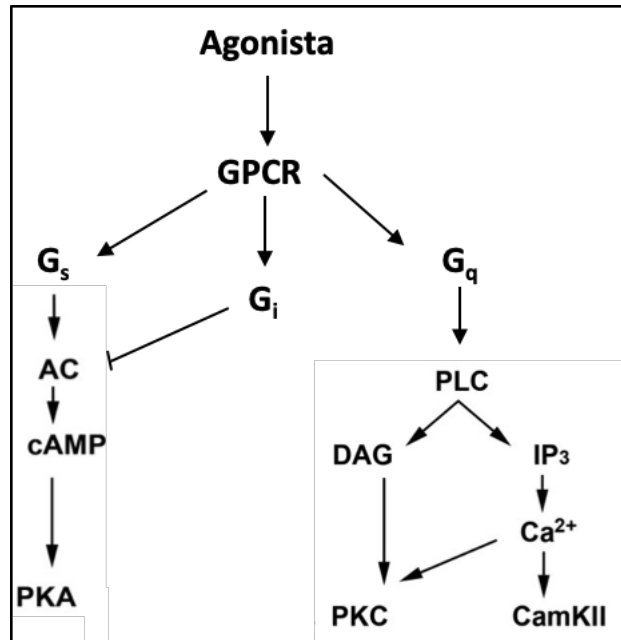


Figura 2. Esquema da resposta celular *downstream* após ligação do agonista com receptor acoplado à proteína G_s, G_i e G_q.

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 (Birnbauer, 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 conseqüentemente do comportamento modulado por eles.

1.3.1.3 Afinidade de ligantes pelos receptores

Uma das formas de se analisar a afinidade de uma substância a um dado receptor é através da constante de inibição (K_i). Nesse caso, quanto menor o valor do K_i , maior a afinidade e menor concentração da droga é necessária para produzir um efeito. Seu valor é dependente do EC_{50} (concentração efetiva) e K_d (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 K_i da ligação entre VP e receptor V1a e OTR. Por outro lado, os valores de K_i 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 receptores

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 cérebro 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*.

CONCLUSÕES

Os dados obtidos através desse trabalho 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 Ca^{2+} .

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.

*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>

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

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 fear-related behavior in mice selectively bred for high or low alcohol preference. *Addict Biol.* 2014;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 Brain 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 oxytocin and 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 Behav Neurosci.* 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, and regulation. *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 neurotrophic 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 addiction. *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, Hiroshima 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 great 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 addiction. *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 control 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 potential mediator and modulator of drug addiction. *Addiction Biology*. 2011;16: 199-201.

Scotfield 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;* 2014; 5: 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 tuberomammillary 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, Verkhatsky 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. Galnol 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.