

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

Júlia Schneider Krimberg

**EFEITOS DO ISOLAMENTO SOCIAL NO SISTEMA OCITOCINÉRGICO E NA
PREFERÊNCIA POR METILFENIDATO OU SOCIALIZAÇÃO NA ADOLESCÊNCIA
DE RATOS WISTAR**

Porto Alegre

2022

Júlia Schneider Krimberg

**EFEITOS DO ISOLAMENTO SOCIAL NO SISTEMA OCITOCINÉRGICO E NA
PREFERÊNCIA POR METILFENIDATO OU SOCIALIZAÇÃO NA ADOLESCÊNCIA
DE RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de mestre em Neurociências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosa Maria M. de Almeida

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Wendt Viola

Porto Alegre

2022

Schneider Krimberg, Júlia
Efeitos do isolamento social no sistema
ocitocinérgico e na preferência por metilfenidato ou
socialização na adolescência de ratos Wistar / Júlia
Schneider Krimberg. -- 2022.

71 f.

Orientadora: Rosa Maria Martins de Almeida.

Coorientador: Thiago Wendt Viola.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Neurociências,
Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Estresse. 2. Socialização. 3. Ocitocina. 4.
Droga de abuso. 5. Isolamento Social. I. de Almeida,
Rosa Maria Martins, orient. II. Viola, Thiago Wendt,
coorient. III. Título.

Júlia Schneider Krimberg

**EFEITOS DO ISOLAMENTO SOCIAL NO SISTEMA OCITOCINÉRGICO E NA
PREFERÊNCIA POR METILFENIDATO OU SOCIALIZAÇÃO NA ADOLESCÊNCIA
DE RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Neurociências

Aprovado em: ____ de _____ de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luís Eduardo Wearick-Silva - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Jesus Landeira-Fernandez – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Prof^a. Dr^a. Rosane Gomez – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientadora
Prof^a. Dr^a. Rosa Maria M. de Almeida – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço às orientadoras que tive ao longo da minha trajetória acadêmica, Prof. Dr. Marlene Strey, Prof. Dr. Lilian Stein e, em especial, à minha atual orientadora, Prof. Dr. Rosa Maria Martins de Almeida, que me abriu as portas, inicialmente como assistente de pesquisa e depois como estagiária e então mestranda. Ao longo dos últimos anos, a Prof. Rosa me deu constante apoio e orientação em todos os sentidos, além de alguns “empurrõezinhos” quando necessário. Agradeço também ao meu coorientador Prof. Dr. Thiago Wendt Viola e ao Rodrigo Orso, que colaboraram de todas as formas possíveis para o sucesso deste projeto.

Agradeço aos professores e funcionários do programa de Pós-Graduação em Neurociências da UFRGS, em especial à minha relatora, Prof. Dr. Rosane Gomez, e à secretária Andréa, que me auxiliou sempre que necessário.

Agradeço também aos meus amigos e companheiros de laboratório Francisco, Érika e Lorrane, que, faça chuva, sol, frio ou calor, estiveram comigo nas longas e cansativas jornadas de laboratório.

À minha namorada, Bruna, que não só me traz parceria na vida pessoal, mas também me confortou e incentivou nos momentos de incertezas ou frustrações naturais da trajetória acadêmica. Além de todo o suporte e conforto emocional, a hoje sanitarista Bruna esteve ao meu lado no laboratório sempre que necessário, voltando às suas origens acadêmicas (diz ela que até deu saudade de trabalhar com ratos...).

Agradeço também aos meus amigos, Nayron, Gabi e Ana, que me orientaram no estágio acadêmico e se tornaram alguns dos meus amigos mais próximos. Quero agradecer especialmente ao Nayron, que sempre me faz acreditar que tudo vai dar certo.

Agradeço à minha família, à minha mãe, meu irmão, meu pai, meu tio, Gi, minhas avós e avôs, pela ocitocina que me deram durante o desenvolvimento e pela educação questionadora que fizeram com que eu quisesse ser uma pesquisadora, ou seja, uma questionadora profissional.

Dedico esta dissertação a esses e muitos outros que elevam meu nível de ocitocina diariamente, em especial às minhas avós Gladis e Terezinha.

RESUMO

A adolescência é marcada por mudanças neuronais e cognitivas que possibilitam o desenvolvimento saudável dos indivíduos. A falta de socialização pode ter resultados negativos duradouros, incluindo maior vulnerabilidade à ansiedade e ao uso de drogas. Sabendo que roedores têm na interação social um reforçador natural, e aliada à ideia de que a ocitocina possui ação moduladora do comportamento social, a presente dissertação buscou investigar o comportamento social de animais estressados por isolamento social e sua relação com o sistema ocitocinérgico, destacando a escolha dos animais entre dois reforçadores, interação social e substância de abuso (metilfenidato). Para isso foram realizados dois estudos. O primeiro foi uma meta-análise com o objetivo de elucidar o efeito do isolamento social no sistema ocitocinérgico e no comportamento de ratos e camundongos. Após, foi realizado um estudo experimental para avaliar os efeitos da privação social na escolha entre interação social e metilfenidato. Para isso, 78 ratos Wistar adolescentes (PND21-57) foram distribuídos igualmente em 3 grupos pareados por sexo: Agrupado (GH: *group-housed*), Isolado (ISO) e Estímulo (ST: *Stimulus*). Apenas o grupo ISO foi submetido ao isolamento social, pela duração total do experimento, enquanto os animais GH e ST foram mantidos em gaiolas com 3 a 4 animais. Entre os dias 35 e 47 de vida dos animais foi realizada sensibilização ao metilfenidato (2.5 mg/kg), e entre os dias 51 e 56 foram realizados procedimentos de condicionamento ao local, condicionando a droga (metilfenidato) à uma câmara e interação social à outra câmara. No dia 57 de vida os animais foram submetidos ao teste de preferência por local, de modo a expressar comportamento de escolha entre a câmara condicionada à droga ou à interação social. Os parâmetros atividade locomotora dos animais, comportamento tipo-ansioso e memória de curto prazo também foram avaliados.

Como resultado, no primeiro estudo verificamos que o isolamento social reduziu o número de receptores ocitocinérgicos em diversas áreas encefálicas e aumentou comportamentos agressivos e tipo-ansiosos nos animais pesquisados. No segundo estudo, encontramos que o isolamento social causou preferência à interação social apenas em ratos machos, enquanto não foi evidenciada preferência por metilfenidato em nenhum grupo. Em relação às demais variáveis comportamentais, verificamos que houve uma redução do comportamento tipo-ansioso de fêmeas isoladas apenas. Desta forma, entendemos que o contato social pode ser compreendido como um reforçador potente, superando (machos ISO) ou se igualando (machos GH e fêmeas GH e ISO) à droga. Ademais, a influência dos receptores de ocitocina neste processo é desconhecida, visto que a hipótese inicial era de que redução no número destes receptores em animais isolados, evidenciado no primeiro estudo, levaria a uma redução na busca por interação social. Sugere-se uma investigação detalhada desses processos especialmente em fêmeas, já que foi encontrada diferença entre sexos no estudo experimental, mas uma análise separada por sexos não foi possível na meta-análise pelo uso não frequente de fêmeas em estudos experimentais.

Palavras-chave: Isolamento Social; Adolescência; Ocitocina; Metilfenidato; Ratos Wistar

ABSTRACT

Adolescence is marked by neuronal and cognitive changes that enable the healthy development of individuals. Lack of socialization can have long-lasting negative outcomes, including increased vulnerability to anxiety and drug use. Knowing that rodents have social interaction as a natural reinforcer, and allied to the idea that oxytocin has a modulating impact on social behavior, the present dissertation sought to investigate the social behavior of animals stressed by social isolation and its relationship with the oxytocinergic system, highlighting the choice of animals between two reinforcers, social interaction and substance of abuse (methylphenidate). In this sense, two studies were carried out. The first was a meta-analysis aiming to elucidate the effect of social isolation on the oxytocinergic system and on the behavior of rats and mice. Afterwards, an experimental study was carried out to evaluate the effects of social isolation on the choice between social interaction and methylphenidate. For this, 78 adolescent Wistar rats (PND21-57) were equally distributed in 3 sex-paired groups: Group-housed (GH), Isolated (ISO), and Stimulus (ST). Only the ISO group was subjected to social isolation, which lasted for the entire duration of the experiment, while the GH and ST animals were kept in cages with 3 to 4 animals. Sensitization to methylphenidate (2.5 mg / kg) was performed between days 35 and 47; and place preference conditioning was performed between days 51 and 56, conditioning the drug (methylphenidate) to a chamber and social interaction to the other chamber. On day 57, the animals were submitted to a conditioned place preference test, in order to express preference behavior towards the drug-conditioned or social interaction-conditioned chambers. The animals' locomotor activity, anxious-like behavior and short-term memory were also evaluated. As a result, in the first study we found that social isolation reduced the number of oxytocinergic receptors in several brain regions and increased aggressive and anxious-like behaviors in the animals studied. In the

second study, we found that social isolation caused a preference for social interaction only in male rats, while no preference for methylphenidate was evidenced in any group. Regarding the other behavioral variables, we found that there was a reduction in the anxious-like behavior of ISO females only. In this way, we understand that social interaction can be understood as a potent reinforcer, overcoming (ISO males) or equaling (GH males and GH and ISO females) to the reinforcing power of the drug. Furthermore, the influence of oxytocin receptors in this process is unknown, since it was hypothesized that the reduction in the number of these receptors in isolated animals, evidenced in the first study, would lead to a reduction in the search for social interaction. A detailed investigation of these processes is suggested, especially in females, since a difference between sexes was found in the experimental study, but a separate analysis by sex was not possible in the meta-analysis due to the tttttttt use of females in experimental studies.

Keywords: Social Isolation; Adolescence; Oxytocin; Methylphenidate; Wistar Rats

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figure 1 Desenho esquemático do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), adaptado de Cacioppo, Cacioppo, Capitanio, & Cole (2015).	19
Figure 2 Projeções ocitocinérgicas no encéfalo de rato, de Jurek & Neumann (2018).	23
Figure 3 Timeline for Group-Housed and Isolated groups.	40
Figure 5 Locomotor activity in three sessions of the Open Field Test.	48
Figure 6 Measures obtained from the Elevated Plus-Maze test.	49

LISTA DE TABELAS

Table 1. Synthesis of results of the tests performed by sex and group.....	46
Table 2 Effect of social isolation on different dependent variables.....	47

ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACTH - Hormônio Adrenocorticotrófico
- AON - Núcleo Olfatório Anterior
- BLA - Amígdala Basolateral
- BNST - *Bed Nucleus of The Stria Terminalis*
- CC - Córtex Cingulado
- CeA - Amígdala Central
- CPP - Preferência Condicionada ao Local
- CPu - Putamen Caudado
- CRH - Hormônio Liberador de Corticotrofina
- DA - Dopamina
- DAT - Transportador de Dopamina
- DRN - Núcleos Da Rafe, Porção Dorsal
- EPM - Labirinto em Cruz-Elevado
- GH - Animais agrupados
- HDB - Núcleo Da Banda Horizontal Do Ramo Diagonal Da Banda De Broca
- HPA - Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
- HPC - Hipocampo
- ISO - Isolamento Social
- LC - Cerúleo Ou Locus Coeruleus
- LS - Septo Lateral
- MeA - Amígdala Medial
- MPD - Metilfenidato
- mPFC - Córtex Pré-Frontal Medial
- MPOA - Área Pré-Óptica Medial
- mRNA - Ácido Ribonucleico Mensageiro
- NAc - *Nucleus Accumbens*
- NOR - Reconhecimento de Objeto Novo
- OB - Bulbo olfatório

OFC - Córtex Orbitofrontal
OFT - Tarefa em Campo Aberto
OT - Tubérculo Olfatório
OVLT - Órgão Vascular Da Placa Terminal
OXT - Ocitocina
OXTR - Receptor de Ocitocina
PBN - Núcleo Parabraquial
PAG - Núcleo Periaquedutal
PFC - Cortex Pré-Frontal
PND - Dia após nascimento
PP - Pituitária Posterior
PV - Núcleo Paraventricular Do Tálamo
SC - Sensitization Challenge
SI - Isolamento Social
SN - *Substantia Nigra*
SON - Núcleo Supraóptico
ST - Estímulo Social
PVN - Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
TDAH - Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade
VTA - Área Tegmental Ventral

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	16
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL	18
1.1 Isolamento social na adolescência	20
1.2 Papel da ocitocina na recompensa social	21
1.3 Adolescência e predisposição ao consumo de drogas de abuso.....	23
CAPÍTULO 2: ARTIGO DE REVISÃO SISTEMÁTICA E META-ANÁLISE	26
CAPÍTULO 3: ESTUDO EXPERIMENTAL	37
CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO GERAL	59
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXO I: CARTA DE APROVAÇÃO DO CEUA	71

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação apresenta como tema principal o impacto do estresse na adolescência na escolha entre dois reforçadores: interação social ou droga de abuso. Considerando a associação do sistema ocitocinérgico com o comportamento de socialização (Insel, 2000), e evidências de que animais estressados possuem limitações em relação à socialização (Hodges et al., 2017) e alterações no sistema de recompensas (Fosnocht, Lucerne, Ellis, Olimpo, & Briand, 2019), hipotetizamos que animais estressados apresentariam alterações no sistema ocitocinérgico, levando a uma diminuição da busca por comportamento social. Para isso, comparamos a busca de animais por socialização à busca por uma droga de abuso (metilfenidato, ou Ritalina®) por meio do teste de preferência por local com estímulos condicionados concomitantes.

A presente dissertação foi estruturada e redigida obedecendo o modelo de organização por artigos. Desta forma, é apresentada uma introdução geral aos temas trabalhados na dissertação no Capítulo 1. Em seguida, são apresentados os artigos científicos originados de dados obtidos com o presente estudo (Capítulos 2 e 3). O Capítulo 2 consiste em uma revisão sistemática e meta-análise sobre o impacto do estresse por isolamento social no sistema ocitocinérgico de ratos e camundongos, intitulado “Impact of social isolation on the oxytocinergic system: A systematic review and meta-analysis of rodent data”, publicado em fevereiro de 2022 na revista científica “Neuroscience & Biobehavioral Reviews”. O Capítulo 3 se refere ao estudo principal da presente dissertação, onde é relatado o estudo experimental que buscou comparar a valência dos reforçadores socialização e uso de droga, e está em fase de

submissão. O Capítulo 4 apresenta a discussão geral, onde é feita uma síntese comentada dos estudos, conclusão e perspectivas sobre o tema.

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL

Tanto humanos quanto roedores são seres sociais, sendo a socialização um comportamento reforçador natural essencial para estes (Douglas, Varlinskaya, & Spear, 2004). Evolutivamente, a socialização foi ímpar para a sobrevivência de diversas espécies, servindo como forma de proteção por meio da cooperação, comunicação e reprodução (Araya-Ajoy, Westneat, & Wright, 2020; Insel, 2000). Assim como muitos outros animais, humanos e roedores dependem da interação social para atingir o neurodesenvolvimento e maturação cerebral esperados (Lockhart, Sawa, & Niwa, 2018; Robinson et al., 2019; Trezza, Baarendse, & Vanderschuren, 2014). Tanto na vida pré-natal quanto pós-natal, infância e adolescência, um ambiente de desenvolvimento seguro, sem a presença de estressores crônicos e/ou grandes estressores agudos, constitui-se como fator protetor contra psicopatologias (Lupien, McEwen, Gunnar, & Heim, 2009; Masten, Lucke, Nelson, & Stallworthy, 2021; Perry, Dollar, Calkins, Keane, & Shanahan, 2020; Silvers, 2022).

Situações ansiogênicas resultantes de experiências sociais inefetivas, especialmente em períodos de extrema importância para o neurodesenvolvimento, como a infância e adolescência, podem ter efeitos duradouros na cognição devido a alterações neuronais causadas por estressores crônicos ou agudos (Burke, McCormick, Pellis, & Lukkes, 2017; Love, 2014; Potřebić, Pavković, Puškaš, & Pešić, 2022). O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) é responsável pela produção do glicocorticoide cortisol em humanos (e corticosterona em roedores) a partir da identificação de estímulos estressores externos e consequente alterações fisiológicas causadas pelo estresse (Fig.1) (Gunnar & Quevedo, 2007). Receptores de glicocorticoides presentes no hipocampo inibem o eixo HPA e diminuem a produção de glicocorticoides, trazendo o sistema para a homeostase. A presença de estressores

crônicos ao longo do desenvolvimento aumenta a metilação dos genes de receptores de glicocorticoides no hipocampo, reduzindo a presença destes e reduzindo também o feedback negativo em resposta ao estresse (Gunnar & Quevedo, 2007), levando a ativação aumentada do eixo frente a estressores.

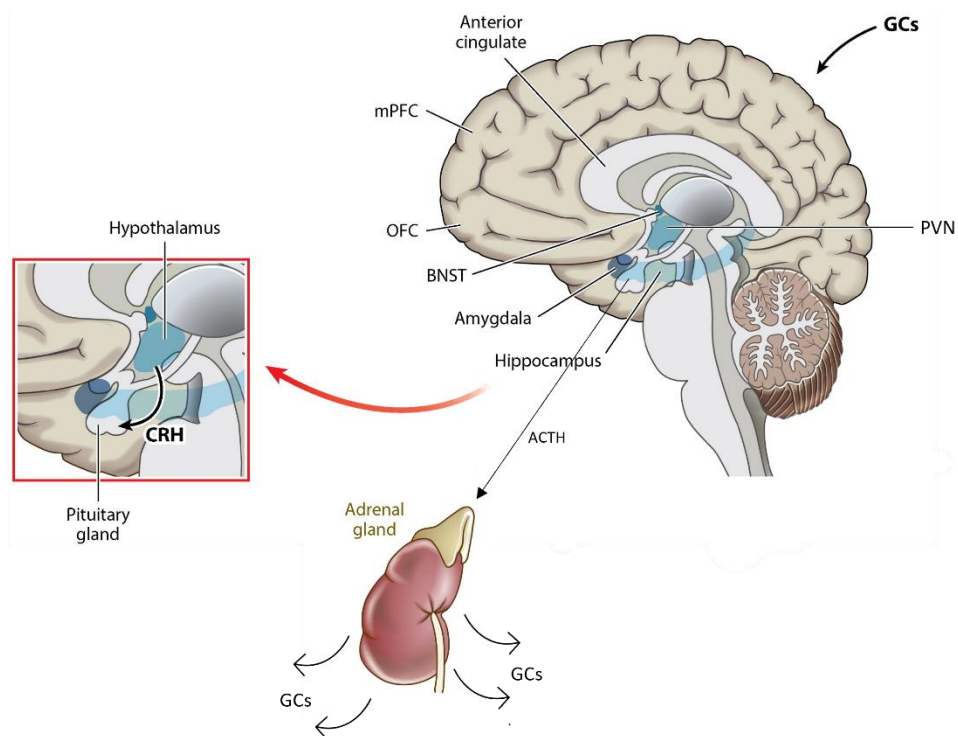


Figura 1 Desenho esquemático do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), adaptado de Cacioppo, Cacioppo, Capitanio, & Cole (2015). Demonstra a cascata resultante da ativação do eixo HPA, que tem início com a ativação do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN) em resposta a estímulos advindos de regiões pré-frontais (mPFC: Cortex Medial Pré-Frontal, e OFC: Córtex Orbitofrontal) e límbicas (Amígdala e BNST: núcleo leito da estria terminal ou bed nucleus of the stria terminalis). A ativação do PVN resulta na liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) na pituitária e estimulando a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Esse viajará pela corrente sanguínea até o córtex adrenal, de onde são secretados os glicocorticoides. *Autorização de uso requisitada.*

Em humanos, algumas das repercussões das experiências sociais negativas na adolescência são: predisposição aumentada a transtornos de ansiedade, depressão, compulsões, entre outros (Burke et al., 2017; Burke & Miczek, 2014; Dafny & Yang, 2006; Walker, Cunningham, Gregory, & Nestler, 2019). Dentre as compulsões, destaca-se a predisposição ao abuso de drogas. Em estudo com mais de seis mil adolescentes do Estado de São Paulo, De Micheli e Formigoni (2004) identificaram associações entre relação familiar prejudicada (e.g., brigas frequentes e

sensação de não haver cuidado) com maiores chances de uso de drogas na adolescência, quando comparado a jovens que relatavam boa relação familiar.

Em modelos animais, estresse e comportamento do tipo-ansioso podem ser gerados por meio de diferentes protocolos (Campos, Fogaca, Aguiar, & Guimaraes, 2013). Uma forma de estresse social, podendo desencadear níveis de estresse comparáveis aos experienciados por humanos em contextos aversivos, é a privação de interação social (Noschang, Lampert, Krolow, & de Almeida, 2021). O isolamento social causa alterações em diversos sistemas de neurotransmissores, como serotoninérgico, dopaminérgico, GABAérgico e ocitocinérgico (Krimberg, Lumertz, Orso, Viola, & de Almeida, 2022; Mumtaz, Khan, Zubair, & Dehpour, 2018), podendo gerar diversos comportamentos tipo-ansioso (Han et al., 2018; Huang et al., 2021), agressivo (Heck et al., 2020; Oliveira, Neumann, & de Jong, 2019; Popova & Petkov, 1990; Tan et al., 2019) e tipo-depressivo (Brenes, Fornaguera, & Sequeira-Cordero, 2020; Ieraci, Mallei, & Popoli, 2016), principalmente quando ocorre em períodos críticos do desenvolvimento (pré-natal, pós-natal, infância e adolescência).

1.1 Isolamento social na adolescência

A adolescência, tanto em humanos quanto em roedores e outros animais, é um período de reorganização hormonal e social, e de conclusão da maturação cerebral que ocorre desde o início da vida (Gunnar & Quevedo, 2007). Nesta fase, a prole busca independência de seus cuidadores por meio, principalmente, da socialização com outros indivíduos, motivada pelo aumento da disponibilidade de dopamina (Larsen & Luna, 2018; Trezza et al., 2014; Walker et al., 2019). Em roedores, a adolescência é entendida como o período entre os dias 21 (desmame) e 59 pós-natal (PND: *Post-Natal Day*), que corresponde à faixa etária de 10 a 21 anos em humanos (Burke et al., 2017), e é a fase do desenvolvimento em que os animais se envolvem

em mais comportamentos sociais, como brincadeiras de luta e investigação social (Douglas et al., 2004).

Estresse por isolamento social durante a adolescência pode ser causador de alterações duradoras, aumentando a predisposição a comportamentos relacionados a reatividade a recompensas (e.g. uso abusivo de substâncias e comportamento impulsivo), comportamentos tipo-depressivo e tipo-ansioso (Burke et al., 2017; J. Y. Goh et al., 2020; Gunnar & Quevedo, 2007; King, Gano, & Becker, 2020; Tanaka et al., 2019; Trezza et al., 2014; Watt, Weber, Davies, & Forster, 2017). Ao mesmo tempo, animais expostos ao isolamento social apresentam exploração e locomoção reduzidos em novos ambientes, diminuição na busca por interação social, comportamento de congelamento frente a outros animais, dificuldades de aprendizado e de memória (Burke et al., 2017; Lampert et al., 2017; Noschang et al., 2021; Tanaka et al., 2019). Em humanos e roedores saudáveis, o sistema ocitocinérgico é ativado durante momentos de socialização, aumentando a motivação para esse tipo de comportamento, enquanto em animais isolados esta ativação parece ser prejudicada pelo estresse (Tanaka et al., 2019).

1.2 Papel da ocitocina na recompensa social

A ocitocina (OXT) é um hormônio neuromodulador do sistema nervoso central (SNC), e suas funções básicas conhecidas são reprodução (e.g. indutora de contrações uterinas importantes para o parto e aleitamento) (Jurek & Neumann, 2018), comportamento de cuidado, tolerância à dor, diminuição de medo e estresse, e comportamentos pró-sociais (Cilz, Cymerblit-Sabba, & Young, 2018; Jurek & Neumann, 2018; Shamay-Tsoory & Abu-Akel, 2016; Warfvinge, Krause, & Edvinsson,

2020). Embora se conheçam muitos efeitos da OXT no SNC e periférico, seu mecanismo de ação ainda não é tão claro (Han et al., 2018). Embora exista a expectativa de comportamentos pró-sociais em resposta à liberação natural ou à administração de OXT (Anagnostou et al., 2014; K. K. Goh, Chen, & Lane, 2021; Rubin et al., 2010; Welch & Ruggiero, 2005), isto nem sempre acontece. Estudos têm demonstrado que certos contextos são desfavoráveis para os efeitos pró-sociais da OXT, uma vez que, ao aumentar os comportamentos de cuidado, a reatividade a possíveis ameaças à prole ou similares pode ser exacerbada, aumentando o comportamento agressivo (e.g. agressividade aumentada de mães em resposta a ameaças aos filhotes) (Bosch, Meddle, Beiderbeck, Douglas, & Neumann, 2005; Cilz et al., 2018; de Jong & Neumann, 2017; Love, 2014; Marlin & Froemke, 2017; Pedersen, Ascher, Monroe, & Prange, 1982; Shamay-Tsoory & Abu-Akel, 2016; Warfvinge et al., 2020; Williams et al., 2020).

A síntese da OXT é realizada pelos núcleos supraóptico (SON: *Supraoptic Nucleus*) e paraventricular do hipotálamo (PVN: *Paraventricular Nucleus*) de mamíferos, sendo liberada em sua maioria na corrente sanguínea através da porção posterior da hipófise (Jirikowski, 2019). A passagem de moléculas de OXT pela barreira hematoencefálica é escassa, e o hormônio se distribui pelo encéfalo por meio de suas diversas projeções (Fig.2) (Jirikowski, 2019; Jurek & Neumann, 2018). Tais projeções têm sido alvo de diversos estudos nas últimas décadas, visto o desconhecimento das funções do peptídeo em diversas áreas que suas projeções alcançam (Jurek & Neumann, 2018; Marlin & Froemke, 2017; Warfvinge & Edvinsson, 2019). Uma das teorias, denominada Teoria da Saliência Social (*Social Salience Theory*) (Love, 2014; Shamay-Tsoory & Abu-Akel, 2016), sugere que o peptídeo, em interação com o sistema dopaminérgico mesolímbico, pode ter ação na regulação da

seletividade e direcionamento atencional. Como resultado, a OXT teria papel modulador na percepção de estímulos sociais e na motivação para comportamentos sociais e de cuidado em humanos e roedores (De Dreu & Kret, 2016; Lara, 2017; Love, 2014; Venta et al., 2019).

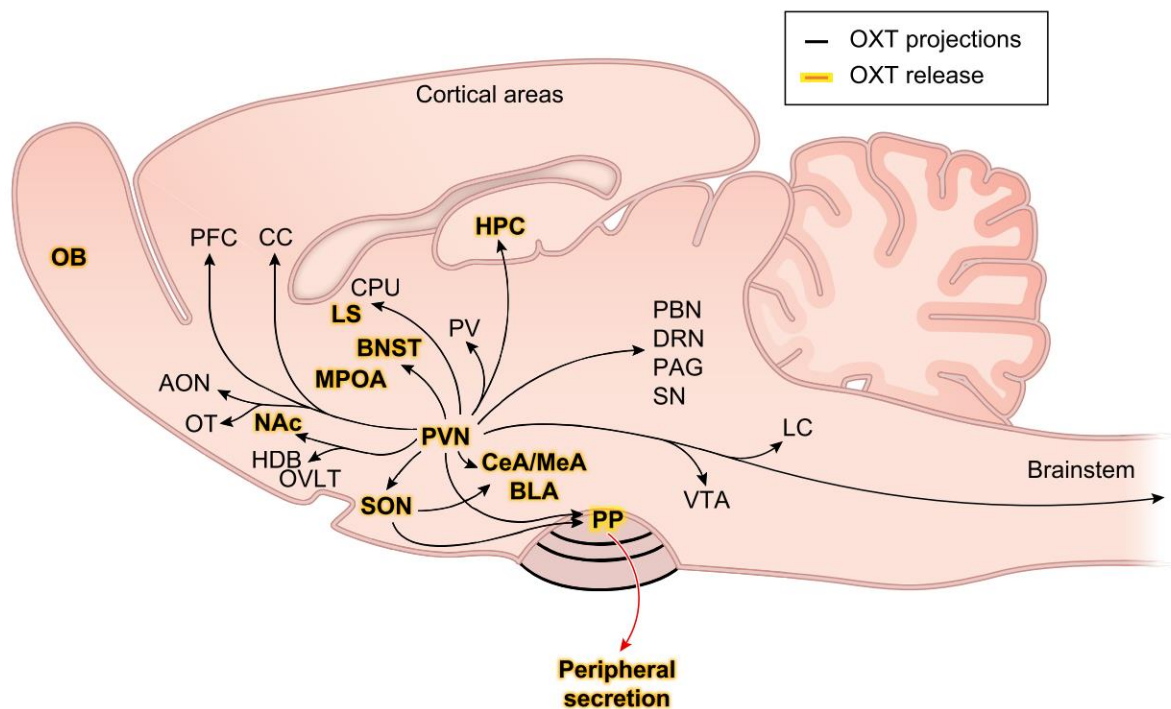


Figure 2 Projeções ocitocinérgicas no encéfalo de rato, de Jurek & Neumann (2018). Esquema representativo de zonas de projeção de neurônios ocitocinérgicos no encéfalo de rato (linhas pretas com setas), áreas com liberação de ocitocina mapeadas por meio da identificação de receptores deste hormônio (nome da região escrito na cor preta), e áreas com liberação de ocitocina em que existe demonstração direta da liberação de ocitocina, identificada por técnica de microdialise (nome da região escrito na cor preta com destaque amarelo). AON, núcleo olfatório anterior; OB, bulbo olfatório; OT, tubérculo olfatório; Nac, nucleus accumbens; OVLT, órgão vascular da placa terminal; SON, núcleo supraóptico; PVN, núcleo paraventricular do hipotálamo; PP, pituitária posterior; PFC, córtex pré-frontal; CC, córtex cingulado; MPOA, área pré-óptica medial; BNST, núcleo leito da estria terminal ou bed nucleus of the stria terminalis; LS, septo lateral; CPU, putamen caudado; PV, núcleo paraventricular do tálamo; CeA, amígdala central; MeA, amígdala medial; BLA, amígdala basolateral; VTA, área tegmental ventral; LC, cerúleo ou locus coeruleus; PBN, núcleo parabraquial; DRN, núcleos da rafe, porção dorsal; PAG, núcleo periaquedutal; SN, substância nigra; HPC, hipocampo; HDB, núcleo da banda horizontal do ramo diagonal da banda de broca. *Autorização de uso requisitada.*

1.3 Adolescência e predisposição ao consumo de drogas de abuso

A adolescência, especialmente seus períodos finais, e o início da vida adulta são momentos em que indivíduos têm a maior taxa de iniciação de uso de drogas de abuso, principalmente álcool, tabaco e maconha em humanos (De Micheli & Formigoni, 2004; Trezza et al., 2014). Alguns dos motivos para isso são o aumento da motivação para busca por recompensas e a impulsividade, motivados pelo aumento

na disponibilidade de dopamina neste período crítico para a maturação cognitiva (Doremus-Fitzwater, Varlinskaya, & Spear, 2010; Larsen & Luna, 2018). Em sujeitos com histórico de estresse crônico ou agudo grave, comportamentos aditivos mostraram-se agravados (Noschang et al., 2021; Watt et al., 2017) devido a alterações no sistema dopaminérgico que se projetam da Área Tegmental Ventral (VTA: *Ventral Tegmental Area*) para o *Nucleus Accumbens* (NAc) e Córtex Pré-Frontal (PFC: *Pre-Frontal Cortex*), áreas que constituem o sistema límbico, caracterizado por seu papel na motivação e ação visando recompensas (Burke & Miczek, 2014).

Diferentes grupos de drogas (opioides, canabinóides, etanol, nicotina e psicoestimulantes) têm mecanismos de ação distintos no sistema nervoso central. O metilfenidato (MPD) é uma droga de abuso psicoestimulante usada amplamente como medicamento para Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) e outros transtornos (Dafny & Yang, 2006; Freese et al., 2012; Shellenberg, Stoops, Lile, & Rush, 2020; Zimmer, 2017). Com estrutura neurofarmacológica similar à da cocaína e anfetaminas, o MPD age inibindo os recaptadores de dopamina (DAT) e noradrenalina, garantindo maior disponibilidade destes neurotransmissores na fenda sináptica, aumentando, assim, a estimulação do neurônio pós-sináptico e, conseqüentemente, do sistema dopaminérgico mesolímbico (Dafny & Yang, 2006; Zimmer, 2017). Acredita-se que o aumento da dopamina com o uso crônico de psicoestimulantes seja o motivador de processos como a sensibilização (*sensitization*), caracterizado pelo aumento da sensibilidade à droga após interrupção do uso (Dafny & Yang, 2006; Freese et al., 2012).

Muitas vezes, animais machos e fêmeas respondem de forma diferente ao estresse. Alguns dos comportamentos que são afetados de maneira sexo-específicas são comportamento do tipo-ansioso ou do tipo-depressivo, atividade locomotora,

busca por socialização, e resposta a drogas. Machos parecem ser mais sensíveis a alterações estruturais e comportamentais resultantes de estresse por isolamento social, principalmente quando ocorre na adolescência (Walker et al., 2019). Estes animais apresentam susceptibilidade aumentada ao uso e abuso de drogas, aumento de comportamentos tipo-ansiosos, hiperatividade locomotora e maior busca por comportamentos sociais (Douglas et al., 2004; Oliveira et al., 2019; Walker et al., 2019).

Tendo em vista o exposto, nos estudos realizados como parte dessa dissertação buscamos investigar o efeito do estresse por isolamento social na adolescência na motivação a dois recompensadores, uso de droga e interação social. Além disso, hipotetizou-se a respeito do papel do sistema ocitocinérgico na modulação do comportamento de escolha, possivelmente, diminuindo a busca por socialização. Para tanto foram realizados dois estudos, uma revisão sistemática e meta-análise sobre os efeitos do isolamento social no sistema ocitocinérgico, e um estudo experimental com ratos Wistar machos e fêmeas.

CAPÍTULO 2: ARTIGO DE REVISÃO SISTEMÁTICA E META-ANÁLISE

Artigo completo e publicado na revista científica *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, conforme referência abaixo:

Krimberg, J. S., Lumertz, F. S., Orso, R., Viola, T. W., & de Almeida, R. M. M. (2022). Impact of social isolation on the oxytocinergic system: A systematic review and meta-analysis of rodent data. In *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* (Vol. 134, p. 104549). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104549>

CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar a preferência em relação a dois reforçadores (socialização e metilfenidato como droga de abuso) em animais submetidos a estresse por isolamento social. Além disso, buscamos traçar um paralelo entre os comportamentos sociais e o hormônio neuromodulador ocitocina, hipotetizando que animais isolados apresentariam reduzida expressão de mRNA para OXTR, e que isso levaria a diminuída busca por interação social. Para tanto, foram realizados dois estudos, o primeiro uma meta-análise, visando compilar e analisar dados a respeito do efeito do isolamento social no sistema ocitocinérgico de ratos e camundongos na literatura. E, em seguida, um estudo experimental, aplicando um paradigma de isolamento social na adolescência em ratos Wistar de ambos os sexos, com o objetivo de entender o efeito deste tipo de estresse na escolha entre socialização ou uso de metilfenidato.

Para a meta-análise foi realizada busca de estudos em cinco bases de dados, resultando em 133 estudos após a remoção de duplicadas. Destes, 12 foram incluídos para análise em nosso estudo. De acordo com resultados da meta-análise, identificamos que o estresse por isolamento social diminuiu o número de receptores de ocitocina (OXTR) em diversas áreas encefálicas, sem interferência na concentração de ocitocina periférica, além de aumentar comportamentos tipo-ansioso e agressivo, sem afetar comportamentos sociais e atividade locomotora.

Para avaliar o efeito do isolamento na escolha social, foram utilizados 78 ratos Wistar machos e fêmeas, divididos em 3 grupos pareados por sexo (GH: agrupados/sociais; ISO: isolamento social; e ST: estímulo social). Destes, foi realizada sensibilização ao metilfenidato como droga de abuso, realizados testes comportamentais

(Labirinto em cruz-elevado e Reconhecimento de Objeto Novo) e aplicado o paradigma do condicionamento ao local, usando dois estímulos concomitantes (metilfenidato e socialização). Como resultado, encontramos que machos isolados apresentam maior busca por socialização comparados a machos agrupados, o que não foi evidenciado em fêmeas, e que isso não parece ter associação com variações em outras funções, como atividade locomotora e comportamentos-tipo ansiosos.

Resultados indicando aumento na motivação para a socialização em animais machos submetidos a estresse por isolamento social já foram previamente relatados (Douglas et al., 2004; Potřebić et al., 2022). Embora não se tenha uma hipótese clara a respeito dessas diferenças entre sexos, uma possível explicação para tais resultados pode ser baseada no efeito da interação com similares na redução de comportamentos tipo-ansioso e agressivo (Kikusui, Winslow, & Mori, 2006). Assim, a interação social é mais recompensadora para machos isolados, que apresentaram níveis normais de comportamento tipo-ansioso, quando comparados às fêmeas isoladas, que apresentaram um índice reduzido de comportamento tipo-ansioso.

Em vista da observação acerca da diminuição de OXTR em animais isolados e do papel modulador da OXT em relação à socialização (Carter, Grippo, Pournajafi-Nazarloo, Ruscio, & Porges, 2008; Jurek & Neumann, 2018; Krimberg et al., 2022), hipotetizava-se que estariam também reduzidos os comportamentos pró-sociais nestes animais. Tal ideia não se confirmou após a análise de 17 resultados retirados de seis estudos incluídos em nossa meta-análise, que não encontrou diferenças na busca por interação social entre animais agrupados e socializados; e, no estudo experimental, verificamos o contrário: aumento no comportamento social em machos isolados, enquanto fêmeas mantiveram o

mesmo índice. Tanaka et al., (2019) mostraram que ambos os sexos, mas, principalmente, as fêmeas isoladas apresentam redução na preferência social, ao mesmo tempo que elas apresentam reduzida ativação de neurônios ocitocinérgicos no PVN e SON. Oliveira et al. (2019) pesquisaram as mesmas áreas e encontraram aumento de expressão de mRNA para o receptor de ocitocina no PVN, principalmente de fêmeas, enquanto não foi vista alteração no mRNA de OXT no SON. Os autores encontraram, porém, uma redução na conectividade dos receptores de OXT no NAc, principalmente em fêmeas, concomitante à uma redução na memória social (discriminação social) e preferência social inalterada em animais isolados (Oliveira et al., 2019). É importante ressaltar que a diversidade de testes e medidas sociais utilizadas por tais estudos pode ter sido um viés na análise, visto que existem numerosos tipos de comportamentos do tipo social e estes não necessariamente variam de forma semelhante.

O isolamento social também aumentou o comportamento agressivo ($p < 0.001$), no entanto, a agressividade pôde ser revertida com a administração de ocitocina periférica ou central. O comportamento do tipo-ansioso também se mostrou mais evidenciado em animais isolados ($p = 0.045$) na meta-análise. Este resultado não foi encontrado em nosso estudo experimental, que indicou um aumento da % do tempo passado por fêmeas isoladas nos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado (EPM: *elevated plus-maze*) em comparação com fêmeas agrupadas. O uso de uma única forma de avaliação do comportamento tipo-ansioso, porém, é uma limitação do estudo.

Conclusão e perspectivas

Cada vez mais se busca compreender possíveis moduladores do comportamento social e resiliência com o objetivo de prevenir e tratar condições associadas à socialização. Neste trabalho, buscamos compreender o potencial recompensador de dois reforçadores, droga de abuso e interação social, em animais com histórico de estresse crônico por isolamento social na adolescência, período importante de maturação neuronal relativo à socialização. Além disso foi feita associação com o peptídeo hipotalâmico ocitocina, um modulador do comportamento social importante para processos básicos desde o início da vida, i.e. papel na contração uterina durante o parto, amamentação, cuidado maternos, entre outros.

Na revisão sistemática e meta-análise foram encontradas alterações em níveis de OXT ou OXTR, principalmente, em fêmeas, enquanto em nosso estudo experimental fêmeas pareceram mais resilientes ao isolamento social. Entendendo que existe um aparente conflito entre os resultados dos estudos apresentados (Estudo 1: isolamento social associado ao reduzido número dos receptores de ocitocina; e Estudo 2: machos isolados socialmente apresentam preferência aumentada à interação social), e a literatura, que indica associação entre ocitocina e comportamento social (Decety, Bartal, Uzefovsky, & Knafo-Noam, 2016; Jurek & Neumann, 2018), sugerimos que mais pesquisas sejam desenvolvidas para elucidar a interação entre os elementos estresse, ocitocina e interação social.

Dessa forma, ao longo dos próximos meses serão feitas análises usando a técnica de RT-PCR visando quantificar OXTR mRNA nos tecidos coletados (mPFC, NAcc, Hipocampo, BNST e Amígdala). Medidas de níveis periféricos de OXT e corticosterona

também são possíveis já que amostras sanguíneas (sangue de tronco) dos animais foram coletadas.

REFERÊNCIAS

- Anagnostou, E., Soorya, L., Brian, J., Dupuis, A., Mankad, D., Smile, S., & Jacob, S. (2014). Intranasal oxytocin in the treatment of autism spectrum disorders: A review of literature and early safety and efficacy data in youth. *Brain Research*, *1580*, 188-198. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.01.049>
- Araya-Ajoy, Y. G., Westneat, D. F., & Wright, J. (2020). Pathways to social evolution and their evolutionary feedbacks. *Evolution*, *74*(9), 1894-1907. <https://doi.org/10.1111/evo.14054>
- Bosch, O. J., Meddle, S. L., Beiderbeck, D. I., Douglas, A. J., & Neumann, I. D. (2005). Brain Oxytocin Correlates with Maternal Aggression: Link to Anxiety. *Journal of Neuroscience*, *25*(29), 6807-6815. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1342-05.2005>
- Brenes, J. C., Fornaguera, J., & Sequeira-Cordero, A. (2020). Environmental Enrichment and Physical Exercise Attenuate the Depressive-Like Effects Induced by Social Isolation Stress in Rats. *Frontiers in Pharmacology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00804>
- Burke, A. R., McCormick, C. M., Pellis, S. M., & Lukkes, J. L. (2017). Impact of adolescent social experiences on behavior and neural circuits implicated in mental illnesses. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *76*, 280-300. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.01.018>
- Burke, A. R., & Miczek, K. A. (2014). Stress in adolescence and drugs of abuse in rodent models: Role of dopamine, CRF, and HPA axis. In *Psychopharmacology* (Vol. 231). <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3369-1>
- Cacioppo, J. T., Cacioppo, S., Capitanio, J. P., & Cole, S. W. (2015). The Neuroendocrinology of Social Isolation. *Annual Review of Psychology*, *66*(1), 733-767. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-010814-015240>
- Campos, A. C., Fogaca, M. V., Aguiar, D. C., & Guimaraes, F. S. (2013). Animal models of anxiety disorders and stress. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, *35*(suppl 2), S101-S111. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2013-1139>
- Carter, C. S., Grippo, A. J., Pournajafi-Nazarloo, H., Ruscio, M. G., & Porges, S. W. (2008). Oxytocin, vasopressin and sociality. *Progress in Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)00427-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)00427-5)
- Cilz, N. I., Cymerblit-Sabba, A., & Young, W. S. (2018). Oxytocin and vasopressin in the rodent hippocampus. *Genes, Brain and Behavior*, *18*(1), e12535. <https://doi.org/10.1111/gbb.12535>

- Dafny, N., & Yang, P. B. (2006). The role of age, genotype, sex, and route of acute and chronic administration of methylphenidate: A review of its locomotor effects. *Brain Research Bulletin*, 68(6), 393-405. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2005.10.005>
- De Dreu, C. K. W., & Kret, M. E. (2016, February 1). Oxytocin Conditions Intergroup Relations Through Upregulated In-Group Empathy, Cooperation, Conformity, and Defense. *Biological Psychiatry*, Vol. 79, pp. 165-173. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.03.020>
- de Jong, T. R., & Neumann, I. D. (2017). Oxytocin and Aggression. In *Brain Imaging in Behavioral Neuroscience* (pp. 175-192). https://doi.org/10.1007/7854_2017_13
- De Micheli, D., & Formigoni, M. L. O. S. (2004). Drug use by Brazilian students: Associations with family, psychosocial, health, demographic and behavioral characteristics. *Addiction*, 99, 570-578. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2003.00671.x>
- Decety, J., Bartal, I. B., Uzefovsky, F., & Knafno-Noam, A. (2016). Empathy as a driver of prosocial behaviour: highly conserved neurobehavioural mechanisms across species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 371, 1-11.
- Doremus-Fitzwater, T. L., Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2010). Motivational systems in adolescence: Possible implications for age differences in substance abuse and other risk-taking behaviors. *Brain and Cognition*, 72(1), 114-123. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2009.08.008>
- Douglas, L. A., Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2004). Rewarding properties of social interactions in adolescent and adult male and female rats: Impact of social versus isolate housing of subjects and partners. *Developmental Psychobiology*, 45(3), 153-162. <https://doi.org/10.1002/dev.20025>
- Fosnocht, A. Q., Lucerne, K. E., Ellis, A. S., Olimpo, N. A., & Briand, L. A. (2019). Adolescent social isolation increases cocaine seeking in male and female mice. *Behavioural Brain Research*, 359(October 2018), 589-596. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.10.007>
- Freese, L., Muller, E. J., Souza, M. F., Couto-Pereira, N. S., Tosca, C. F., Ferigolo, M., & Barros, H. M. T. (2012). GABA system changes in methylphenidate sensitized female rats. *Behavioural Brain Research*, 231(1), 181-186. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.03.017>
- Goh, J. Y., O'Sullivan, S. E., Shortall, S. E., Zordan, N., Piccinini, A. M., Potter, H. G., ... King, M. V. (2020). Gestational poly(I:C) attenuates, not exacerbates, the behavioral, cytokine and mTOR changes caused by isolation rearing in a rat 'dual-hit' model for neurodevelopmental disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*, 89(January), 100-117. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.05.076>

- Goh, K. K., Chen, C.-H., & Lane, H.-Y. (2021). Oxytocin in Schizophrenia: Pathophysiology and Implications for Future Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 2146. <https://doi.org/10.3390/ijms22042146>
- Gunnar, M., & Quevedo, K. (2007). The Neurobiology of Stress and Development. *Annual Review of Psychology*, 58(1), 145-173. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.58.110405.085605>
- Han, R. T., Kim, Y.-B., Park, E., Kim, J. Y., Ryu, C., Kim, H. Y., ... Na, H. S. (2018). Long-Term Isolation Elicits Depression and Anxiety-Related Behaviors by Reducing Oxytocin-Induced GABAergic Transmission in Central Amygdala. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11(August), 1-12. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00246>
- Heck, A. L., Sheng, J. A., Miller, A. M., Stover, S. A., Bales, N. J., Tan, S. M. L., ... Handa, R. J. (2020). Social isolation alters hypothalamic pituitary adrenal axis activity after chronic variable stress in male C57BL/6 mice. *Stress*, 23(4), 457-465. <https://doi.org/10.1080/10253890.2020.1733962>
- Hodges, T. E., Baumbach, J. L., Marcolin, M. L., Bredewold, R., Veenema, A. H., & McCormick, C. M. (2017). Social instability stress in adolescent male rats reduces social interaction and social recognition performance and increases oxytocin receptor binding. *Neuroscience*, 359, 172-182. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.07.032>
- Huang, L., Duan, C., Xia, X., Wang, H., Wang, Y., Zhong, Z., ... Yang, Y. (2021). Commensal microbe-derived propionic acid mediates juvenile social isolation-induced social deficits and anxiety-like behaviors. *Brain Research Bulletin*, 166(December 2020), 161-171. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.12.001>
- Ieraci, A., Mallei, A., & Popoli, M. (2016). Social Isolation Stress Induces Anxious-Depressive-Like Behavior and Alterations of Neuroplasticity-Related Genes in Adult Male Mice. *Neural Plasticity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6212983>
- Insel, T. (2000). Neuropeptides and the evolution of social behavior. *Current Opinion in Neurobiology*, 10(6), 784-789. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00146-X](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00146-X)
- Jirikowski, G. F. (2019). Diversity of central oxytocinergic projections. *Cell and Tissue Research*, 375(1), 41-48. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2960-5>
- Jurek, B., & Neumann, I. D. (2018). The oxytocin receptor: From intracellular signaling to behavior. *Physiological Reviews*, 98(3), 1805-1908. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2017>
- Kikusui, T., Winslow, J. T., & Mori, Y. (2006). Social buffering: Relief from stress and anxiety. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1476), 2215-2228. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1941>
- King, C. E., Gano, A., & Becker, H. C. (2020). The role of oxytocin in alcohol and drug abuse. *Brain Research*, 1736, 146761. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.146761>

- Krimberg, J. S., Lumertz, F. S., Orso, R., Viola, T. W., & de Almeida, R. M. M. (2022). Impact of social isolation on the oxytocinergic system: A systematic review and meta-analysis of rodent data. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 134(October 2021), 104549. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104549>
- Lampert, C., Arcego, D. M., de Sá Couto-Pereira, N., dos Santos Vieira, A., Toniazzo, A. P., Krolow, R., ... Dalmaz, C. (2017). Short post-weaning social isolation induces long-term changes in the dopaminergic system and increases susceptibility to psychostimulants in female rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 61(February), 21-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.05.003>
- Lara, F. (2017). Oxytocin, Empathy and Human Enhancement. *THEORIA*, 32(3), 367-384. <https://doi.org/10.1387/theoria.17890>
- Larsen, B., & Luna, B. (2018). Adolescence as a neurobiological critical period for the development of higher-order cognition. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 94(September), 179-195. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.09.005>
- Lockhart, S., Sawa, A., & Niwa, M. (2018). Developmental trajectories of brain maturation and behavior: Relevance to major mental illnesses. *Journal of Pharmacological Sciences*, 137(1), 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2018.04.008>
- Love, T. M. (2014). Oxytocin, motivation and the role of dopamine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 119, 49-60. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.06.011>
- Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., & Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 434-445. <https://doi.org/10.1038/nrn2639>
- Marlin, B. J., & Froemke, R. C. (2017). Oxytocin modulation of neural circuits for social behavior. *Developmental Neurobiology*, 77(2), 169-189. <https://doi.org/10.1002/dneu.22452>
- Masten, A. S., Lucke, C. M., Nelson, K. M., & Stallworthy, I. C. (2021). Resilience in Development and Psychopathology: Multisystem Perspectives. *Annual Review of Clinical Psychology*, 17(1), 521-549. <https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-081219-120307>
- Mumtaz, F., Khan, M. I., Zubair, M., & Dehpour, A. R. (2018). Neurobiology and consequences of social isolation stress in animal model—A comprehensive review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 105(December 2017), 1205-1222. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.086>
- Noschang, C., Lampert, C., Krolow, R., & de Almeida, R. M. M. (2021). Social isolation at adolescence: a systematic review on behaviour related to cocaine, amphetamine and nicotine use in rats and mice. *Psychopharmacology*, 1-36. <https://doi.org/10.1007/s00213-021-05777-z>

- Oliveira, V. E. de M., Neumann, I. D., & de Jong, T. R. (2019). Post-weaning social isolation exacerbates aggression in both sexes and affects the vasopressin and oxytocin system in a sex-specific manner. *Neuropharmacology*, 156(October 2018), 107504. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.01.019>
- Pedersen, C. A., Ascher, J. A., Monroe, Y. L., & Prange, A. J. (1982). Oxytocin Induces Maternal Behavior in Virgin Female Rats. *Science*, 216(4546), 648-650. <https://doi.org/10.1126/science.7071605>
- Perry, N. B., Dollar, J. M., Calkins, S. D., Keane, S. P., & Shanahan, L. (2020). Maternal socialization of child emotion and adolescent adjustment: Indirect effects through emotion regulation. *Developmental Psychology*, 56(3), 541-552. <https://doi.org/10.1037/dev0000815>
- Popova, J. S., & Petkov, V. V. (1990). Changes in 5-HT1 receptors in different brain structures of rats with isolation syndrome. *General Pharmacology*, 21(2), 223-225. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(90\)90905-2](https://doi.org/10.1016/0306-3623(90)90905-2)
- Potrebić, M., Pavković, Ž., Puškaš, N., & Pešić, V. (2022). The Influence of Social Isolation on Social Orientation, Sociability, Social Novelty Preference, and Hippocampal Parvalbumin-Expressing Interneurons in Peripubertal Rats - Understanding the Importance of Meeting Social Needs in Adolescence. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 16. <https://doi.org/10.3389/FNBEH.2022.872628>
- Robinson, K. J., Bosch, O. J., Levkowitz, G., Busch, K. E., Jarman, A. P., & Ludwig, M. (2019). Social creatures: Model animal systems for studying the neuroendocrine mechanisms of social behaviour. *Journal of Neuroendocrinology*, 31(12), 1-12. <https://doi.org/10.1111/jne.12807>
- Rubin, L. H., Carter, C. S., Drogos, L., Pournajafi-Nazarloo, H., Sweeney, J. A., & Maki, P. M. (2010). Peripheral oxytocin is associated with reduced symptom severity in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 124(1-3), 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2010.09.014>
- Shamay-Tsoory, S. G., & Abu-Akel, A. (2016). The Social Salience Hypothesis of Oxytocin. *Biological Psychiatry*, 79(3), 194-202. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.07.020>
- Shellenberg, T. P., Stoops, W. W., Lile, J. A., & Rush, C. R. (2020). An update on the clinical pharmacology of methylphenidate: therapeutic efficacy, abuse potential and future considerations. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 00(00), 1-9. <https://doi.org/10.1080/17512433.2020.1796636>
- Silvers, J. A. (2022). Adolescence as a pivotal period for emotion regulation development for consideration at current opinion in psychology. *Current Opinion in Psychology*, 44, 258-263. <https://doi.org/10.1016/j.copsyc.2021.09.023>

- Tan, O., Musullulu, H., Raymond, J. S., Wilson, B., Langguth, M., & Bowen, M. T. (2019). Oxytocin and vasopressin inhibit hyper-aggressive behaviour in socially isolated mice. *Neuropharmacology*, *156*, 107573. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.03.016>
- Tanaka, K., Osako, Y., Takahashi, K., Hidaka, C., Tomita, K., & Yuri, K. (2019). Effects of post-weaning social isolation on social behaviors and oxytocinergic activity in male and female rats. *Heliyon*, *5*(5), e01646. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01646>
- Trezza, V., Baarendse, P. J. J., & Vanderschuren, L. J. M. J. (2014). On the interaction between drugs of abuse and adolescent social behavior. *Psychopharmacology*, *231*(8), 1715-1729. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3471-z>
- Venta, A., Ha, C., Vanwoerden, S., Newlin, E., Strathearn, L., & Sharp, C. (2019). Paradoxical Effects of Intranasal Oxytocin on Trust in Inpatient and Community Adolescents. *Journal of Clinical Child and Adolescent Psychology*, *48*(5), 706-715. <https://doi.org/10.1080/15374416.2017.1399401>
- Walker, D. M., Cunningham, A. M., Gregory, J. K., & Nestler, E. J. (2019). Long-Term Behavioral Effects of Post-weaning Social Isolation in Males and Females. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *13*(April), 1-20. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00066>
- Warfvinge, K., & Edvinsson, L. (2019). Distribution of CGRP and CGRP receptor components in the rat brain. *Cephalalgia*, *39*(3), 342-353. <https://doi.org/10.1177/0333102417728873>
- Warfvinge, K., Krause, D., & Edvinsson, L. (2020). The distribution of oxytocin and the oxytocin receptor in rat brain: Relation to regions active in migraine. *Journal of Headache and Pain*, *21*(1). <https://doi.org/10.1186/s10194-020-1079-8>
- Watt, M. J., Weber, M. A., Davies, S. R., & Forster, G. L. (2017). Impact of juvenile chronic stress on adult cortico-accumbal function: Implications for cognition and addiction. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *79*, 136-154. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.06.015>
- Welch, M. G., & Ruggiero, D. A. (2005). Predicted role of secretin and oxytocin in the treatment of behavioral and developmental disorders: implications for autism (D. D.M., Ed.). *International Review of Neurobiology*, Vol. 71, pp. 273-315. Department of Psychiatry, Division of Neuroscience, Columbia University College of Physicians Surgeons, New York, NY 10032, United States. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(05\)71012-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(05)71012-6)
- Williams, A. V., Duque-Wilckens, N., Ramos-Maciel, S., Campi, K. L., Bhela, S. K., Xu, C. K., ... Trainor, B. C. (2020). Social approach and social vigilance are differentially regulated by oxytocin receptors in the nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology*, *45*(9), 1423-1430. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-0657-4>

Zimmer, L. (2017). Contribution of Clinical Neuroimaging to the Understanding of the Pharmacology of Methylphenidate. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(7), 608-620. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.04.001>

ANEXO I: CARTA DE APROVAÇÃO DO CEUA



SIPESQ Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 10131

Porto Alegre, 26 de janeiro de 2021

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "ISOLAMENTO SOCIAL NA ADOLESCÊNCIA E PREFERÊNCIA POR METILFENIDATO OU SOCIALIZAÇÃO EM RATOS WISTAR" coordenado por THIAGO WENDT VIOLA.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Duração do Projeto: 26/01/2021 - 26/01/2023

Nº de Animais	Espécie
80	Rato
Total de Animais: 80	

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais(CEUA)