

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

Gabriella Luciana de Oliveira

**EFEITOS DE UM INIBIDOR DA CALCINEURINA EM UM MODELO ANIMAL DE
ADICÇÃO INDUZIDO POR COCAÍNA**

BELO HORIZONTE

2023

Gabriella Luciana De Oliveira

**EFEITOS DE UM INIBIDOR DA CALCINEURINA EM UM MODELO ANIMAL DE
ADICÇÃO INDUZIDO POR COCAÍNA**

Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira

BELO HORIZONTE

2023

043

Oliveira, Gabriella Luciana de.

Efeitos de um inibidor da calcineurina em um modelo animal de adicção induzido por cocaína [manuscrito] / Gabriella Luciana de Oliveira. – 2023.

58 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia e Farmacologia. 2. Cocaína. 3. Inibidores de Calcineurina. 4. Proteínas de Ligação a Tacrolimo. I. Oliveira, Antônio Carlos Pinheiro de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DE MESTRADO Nº 577 GABRIELLA LUCIANA DE OLIVEIRA

"Efeitos de Um Inibidor da Calcineurina em Um Modelo Animal de Adicção Induzido por Cocaína"

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **20 de outubro de 2023**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Cleiton Lopes Aguiar, ICB/UFMG

Prof. Dr. Bruno Rezende de Souza, ICB/UFMG

Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira, ICB/UFMG - Orientador

Belo Horizonte, 20 de outubro de 2023

*"It does no harm to the romance of the sunset to
know a little about it."*

Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marcos e Analine e minha irmã, Bruna, por todo suporte, confiança e esforço investido na minha educação. Por proporcionarem tudo o que estavam a seu alcance, e em muitas vezes além disso, para que eu pudesse concluir mais uma etapa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira, pelas contribuições científicas significativas e pela sua paciência e compreensão ao longo da conclusão do mestrado.

Aos professores e colegas do NEUROFAR, pela ótima convivência, colaboração mútua e momentos de descontração. Em especial a Carol, onde os ensinamentos não se mantiveram somente em protocolos e procedimentos, como também no pensamento científico.

Aos meus amigos, Mariana, Audrey e Paulo, por fazerem dessa reta final mais leve, pelas conversas, cafés e risadas. A minha amiga Ana, por se manter presente, pelo suporte e apoio em momentos de incerteza.

Aos laboratórios colaboradores, LNP e professor Fabrício e LANEK e professor Cleiton, pela parceria e discussões que culminaram no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores e pesquisadores que fazem parte do departamento de Farmacologia e do PGFISFAR, por permitirem que o nível de excelência do programa seja mantido.

Aos técnicos e funcionários do departamento e da universidade, por toda a simpatia e realização de um trabalho cuidadoso.

E a todos que por acaso não tenham sido mencionados, mas que contribuíram com mais essa realização.

Às agências financiadoras: CAPES, CNPq e FAPEMIG.

APOIO FINANCEIRO

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) – Processo APQ-02559-17.
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Processo 308628/2022-5.
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

Apesar do crescente número de estudos na literatura sobre os mecanismos cerebrais que contribuem para a dependência em cocaína, os tratamentos terapêuticos ainda são limitados. Além disso, sabemos que o uso de cocaína está associado a questões sociais e médicas bastante significativas e representa um grave problema de saúde pública. Estudos indicam uma relação entre a calcineurina na aprendizagem baseada no hipocampo e na plasticidade sináptica. O FK506, um imunossupressor inibidor da calcineurina, foi associado a efeitos neurais importantes, incluindo liberação de neurotransmissores, produção de fatores neurotróficos e proteção contra neurotoxicidade, além de poder modificar a atividade locomotora e a sensibilização induzida por outros psicoestimulantes. Contudo, não são totalmente estabelecidos o seu papel na neuroinflamação e na plasticidade sináptica envolvida no processo de adicção. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos de um inibidor da calcineurina no comportamento e no processo neuroinflamatório em modelo animal de adicção induzido por cocaína. Foram utilizados camundongos C57Bl/6, machos e fêmeas, com idade entre 9 e 12 semanas (CEUA: 261/2021). O inibidor da calcineurina, FK506 (5 mg/kg), foi administrado por injeção subcutânea 90 minutos antes da cocaína (15 mg/kg). Esta última foi, por sua vez, administrada por injeção intraperitoneal imediatamente antes de cada teste comportamental. Utilizou-se o teste comportamental de sensibilização para avaliação da atividade locomotora e o teste de preferência condicionada pelo lugar. Após cada teste, os animais foram eutanasiados por perfusão e os cérebros dissecados, retirando hipocampo e estriado para dosagem de BDNF, GDNF, NGF, TNF- α , IL-6, IL-10 e CX3CL1 por meio do ELISA. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey. A diferença entre os grupos foi considerada estatisticamente significativa quando $P < 0,05$. O FK506 atenuou significativamente a sensibilização locomotora induzida por cocaína em machos a partir do quarto dia ($p < 0,05$). Apesar disso, não foram encontradas diferenças estatísticas no comportamento das fêmeas. Não foram encontradas diferenças no teste de preferência condicionada ao lugar em nenhum dos sexos. Nos grupos tratados com cocaína, o FK506 reduziu as concentrações de GDNF ($p = 0,0130$), TNF- α ($p = 0,0397$) e IL-10 ($p = 0,0259$) no hipocampo dos machos quando comparado aos grupos tratados apenas com cocaína. Também houve um aumento da IL-10 no estriado do grupo tratado com cocaína em comparação ao grupo controle ($p = 0,0180$). Não foram encontradas diferenças nas concentrações de BDNF, NGF, IL-6 e CXCL1 no hipocampo e BDNF, GDNF, NGF, TNF- α , IL-6 e CXCL1 no estriado de machos. Nossos resultados sugerem o envolvimento da via da calcineurina nos efeitos locomotores causados pela cocaína em machos. Esse efeito poderia estar relacionado à alterações na concentração de fatores neurotróficos e mediadores inflamatórios. Apesar disso, mais estudos são necessários para que a relação entre a calcineurina e o transtorno por uso de substância seja estabelecida.

Palavras-chave: Adicção; Cocaína; Inibidor de Calcineurina.

ABSTRACT

Despite the growing number of studies in the literature on the brain mechanisms that contribute to cocaine dependence, therapeutic treatments are still limited. Furthermore, we know that cocaine use is associated with significant social and medical issues and represents a serious public health problem. Studies indicate a relationship between calcineurin in hippocampus-based learning and synaptic plasticity. FK506, an immunosuppressant that inhibits calcineurin, has been associated with important neural effects, including neurotransmitter release, production of neurotrophic factors, and protection against neurotoxicity, as well as the ability to modify locomotor activity and sensitization induced by other psychostimulants. However, its role in neuroinflammation and synaptic plasticity involved in the addiction process is not fully established. Therefore, the objective of the work was to evaluate the effects of a calcineurin inhibitor on behavior and the neuroinflammatory process in an animal model of cocaine-induced addiction. C57Bl/6 mice, male and female, aged between 9 and 12 weeks (CEUA: 261/2021) were used. The calcineurin inhibitor, FK506 (5 mg/kg), was given by subcutaneous injection 90 minutes before cocaine (15 mg/kg). The latter was, in turn, administered by intraperitoneal injection immediately before each behavioral test. The behavioral sensitization test was used to assess locomotor activity and the conditioned preference for place test. After each test, the animals were euthanized by perfusion and the brains were dissected, removing the hippocampus and striatum for BDNF, GDNF, NGF, TNF- α , IL-6, IL-10 and CX3CL1 dosage through ELISA. Results were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's post-test. The difference between groups was considered statistically significant when $P < 0.05$. FK506 significantly attenuated locomotor sensitization induced by cocaine in males from the fourth day onwards ($p < 0.05$). Despite this, no statistical differences were found in the behavior of females. No differences were found in the conditioned place preference test for either sex. In groups treated with cocaine, FK506 reduced the concentrations of GDNF ($p = 0.0130$), TNF- α ($p = 0.0397$) and IL-10 ($p = 0.0259$) in the hippocampus of males when compared to groups treated only with cocaine. There was also an increase in IL-10 in the striatum of the cocaine-treated group compared to the control group ($p = 0.0180$). No differences were found in the concentrations of BDNF, NGF, IL-6 and CXCL1 in the hippocampus and BDNF, GDNF, NGF, TNF- α , IL-6 and CXCL1 in the striatum of males. Our results suggest the involvement of the calcineurin pathway in the locomotor effects caused by cocaine in males. This effect could be related to changes in the concentration of neurotrophic factors and inflammatory mediators. Despite this, further studies are needed to establish the relationship between calcineurin and substance use disorder.

Keywords: Addiction; Cocaine; Calcineurin inhibitor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Circuito das principais conexões dopaminérgicas e glutamatérgicas na via mesolímbica no cérebro de roedores	13
Figura 2 - Metabolismo da DA em neurônios dopaminérgicos	14
Figura 3 - <i>Erythroxylon coca</i>	16
Figura 4 - Mecanismo de ação da cocaína	18
Figura 5 - Visão geral das vias e alvos farmacológicos envolvidos na dependência de psicoestimulantes	21
Figura 6 - Via de sinalização da calcineurina	22
Figura 7 - Campo aberto	26
Figura 8 - Protocolo da sensibilização locomotora	26
Figura 9 - Aparato do preferência condicionada ao lugar	27
Figura 10 - Protocolo de preferência condicionada ao lugar	27
Figura 11 - Representação da perfusão transcardíaca	28
Figura 12 - Atividade locomotora na sensibilização comportamental de machos após o tratamento com FK506	30
Figura 13 - Atividade locomotora na sensibilização comportamental de fêmeas após o tratamento com FK506	31
Figura 14 - Preferência condicionada ao lugar de machos tratados com FK506	32
Figura 15 - Preferência condicionada ao lugar de fêmeas tratados com FK506	33
Figura 16 - Níveis dos fatores neurotróficos no hipocampo	34
Figura 17 - Níveis de fatores neurotróficos no estriado	35
Figura 18 - Níveis das citocinas no hipocampo	36
Figura 19 - Níveis das citocinas no estriado	37

LISTA DE ABREVIATURAS

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro

CaM - Calmodulina

CaN - Calcineurina

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CPF - Córtex pré-frontal

CX3CL1 - Fractalquina

DATs - Transportadores de dopamina

DEA - Drug Enforcement Administration

DSM-5 - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática

GDNF - Fator neurotrófico derivado da glia

IL-10 - Interleucina 10

IL-6 - Interleucina 6

LDP - Depressão de longa duração

LNUD - Levantamento Nacional sobre uso de Drogas pela População Brasileira

LTP - Potenciação de longa duração

NAc - Núcleo accumbens

NET - Transportador de noradrenalina

NGF - Fator de crescimento do nervo

PCL - Preferência condicionada pelo lugar

SERT - Transportador de serotonina

TH - Tirosina hidroxilase

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TRN - Terapia de reposição de nicotina

TUA - Transtorno por uso de álcool

TUO - Transtorno por uso de opióides

UNODC - United Nations Office on Drugs and Crime

VMAT 2 - Transportador monoaminérgico vesicular 2

VTA - Área tegmental ventral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Aspectos gerais da adicção	14
1.2. Cocaína.....	17
1.2.1 Histórico e Epidemiologia	17
1.2.2 Mecanismo de ação.....	19
1.2.3 Tratamento	20
1.3 Calcineurina	23
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivo geral	26
2.2. Objetivos específicos	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Animais	27
3.2. Tratamentos	27
3.3. Análise comportamental.....	27
3.3.1 Sensibilização comportamental	27
3.3.2 Preferência condicionada ao lugar	28
3.4 Coleta de tecidos.....	30
3.5 Análise de Fatores Neurotróficos e Citocinas	31
3.6 Análise estatística	31
4. RESULTADOS	32
4.1 O inibidor de calcineurina atenua significativamente a sensibilização locomotora induzida por cocaína em machos, mas não em fêmeas.....	32
4.2 O inibidor de calcineurina não reverteu o efeito da preferência condicionada ao lugar por cocaína em machos e fêmeas	33
4.3 Quantificação dos níveis de fatores neurotróficos no hipocampo e estriado	35

4.4	Quantificação dos níveis de citocinas no hipocampo e estriado.	37
4.	DISCUSSÃO	40
5.	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS.....	48
	ANEXO A – APROVAÇÃO CEUA.....	59

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da adicção

Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5 (DSM-5), o transtorno por uso de substâncias é definido como um distúrbio crônico e recidivante, caracterizado pela busca e uso compulsivo de drogas apesar dos efeitos adversos (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). É considerado um distúrbio, uma vez que causa alterações funcionais nos circuitos cerebrais envolvidos na recompensa, estresse e autocontrole. Além disso, a adicção é considerada como uma doença, uma vez que perturba o funcionamento normal e saudável de um órgão do corpo, com efeitos nocivos graves (TAYLOR et al., 2013; SINHA et al., 2008).

Sabe-se que a exposição crônica às drogas causa adaptações neuroquímicas e celulares, resultando em alterações neuroplásticas que também podem estar envolvidas no uso compulsivo de drogas e nas recaídas, mesmo após longos períodos de abstinência (COROMINAS et al., 2007; FRANCIS et al., 2019). A transição do uso para a dependência em drogas é afetada por vários fatores, incluindo genética, influências ambientais (como estresse e experiências iniciais da vida) e alterações neuroquímicas e neuroanatômicas (ROCHA; KALIVAS, 2010; TAYLOR et al., 2013; SINHA et al., 2008).

As estruturas cerebrais envolvidas no uso de drogas de abuso e na adicção envolvem a via mesolímbica, também chamada de via de recompensa. O circuito de recompensa do SNC inclui vias de dopamina que se estendem desde a área tegmental ventral (VTA) do mesencéfalo até o córtex pré-frontal (CPF) e regiões límbicas, incluindo os núcleos da base, sendo as áreas-chaves para a recompensa estimulante o córtex pré-frontal e o núcleo accumbens (NAc) (CICARONE, 2011; RICH et al., 2019). Outras estruturas cerebrais importantes associadas às memórias emocionais e ao uso e dependência de drogas incluem a amígdala, o hipocampo e o hipotálamo (VOLKOW et al., 2010) (FIGURA 1). Em níveis moleculares, os efeitos induzidos pelo uso crônico de drogas também envolvem várias vias de sinalização intracelular que levam à sensibilização aos efeitos das drogas e modificação nos circuitos de aprendizagem e memória relacionados ao uso (HAILE et al., 2012).

Os progressos na compreensão da neurobiologia da adicção foram facilitados por estudos envolvendo modelos animais. Esses estudos têm fornecido suporte para o papel da atividade dopaminérgica como mediadora dos efeitos comportamentais observados com estimulantes nas vias de adicção (KOOB; VOLKOW, 2009).

O sistema mesolímbico de recompensa é definido por corpos celulares dopaminérgicos na VTA e suas projeções para o NAc e CPF (FIGURA 1) (ROCHA; KALIVAS, 2010). A liberação de dopamina no NAc desempenha um papel crucial nas propriedades reforçadoras dos psicoestimulantes e, subsequentemente, no desenvolvimento do comportamento de busca por drogas (ROBINSON; BERRIDGE, 1993). A administração aguda de psicoestimulantes pode reduzir os limiares de recompensa da estimulação cerebral, enquanto a administração repetida leva à interrupção crônica da homeostase da recompensa cerebral, resultando em aumento dos limiares durante a abstinência (KOOB; VOLKOW, 2009).

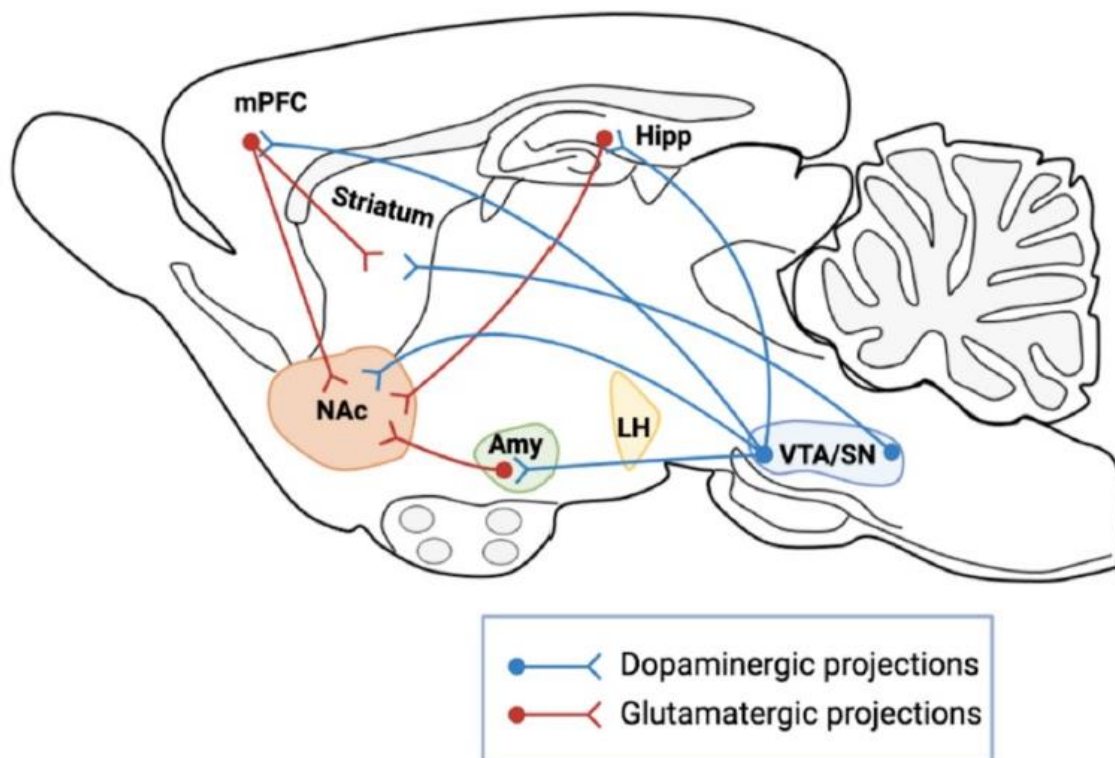


Figura 1 - Circuito das principais conexões dopaminérgicas e glutamatérgicas na via mesolímbica no cérebro de roedores.

Fonte: Speranza et al., 2021.

A transmissão neuronal e liberação dopaminérgica é um evento crucial no circuito de recompensas, principalmente no processo de adicção. A dopamina é

sintetizada a partir da tirosina através de uma série de etapas enzimáticas, principalmente catalisadas pela tirosina hidroxilase (TH). Posteriormente, é armazenada em vesículas sinápticas através do transportador monoaminérgico vesicular 2 (VMAT 2) (LOHR et al., 2017). A atividade dos neurônios dopaminérgicos da ATV e a subsequente liberação de dopamina no NAc são essenciais para a experiência de prazer e reforços. Duas grandes classes de receptores de dopamina, do tipo D1 (D1 e D5) e do tipo D2 (D2, D3 e D4), mediam vias de sinalização distintas (BEAULIEU, GAINETDINOV; 2011). Os transportadores de dopamina (DATs) também desempenham um papel fundamental na regulação dos níveis de dopamina ao recaptar a dopamina libertada da fenda sináptica (FIGURA 2). Além disso, também é demonstrado a catecol- O -metiltransferase (COMT), envolvida na degradação de catecolaminas, também pode aumentar o risco de dependência de cocaína (Aksoy et al., 1993).

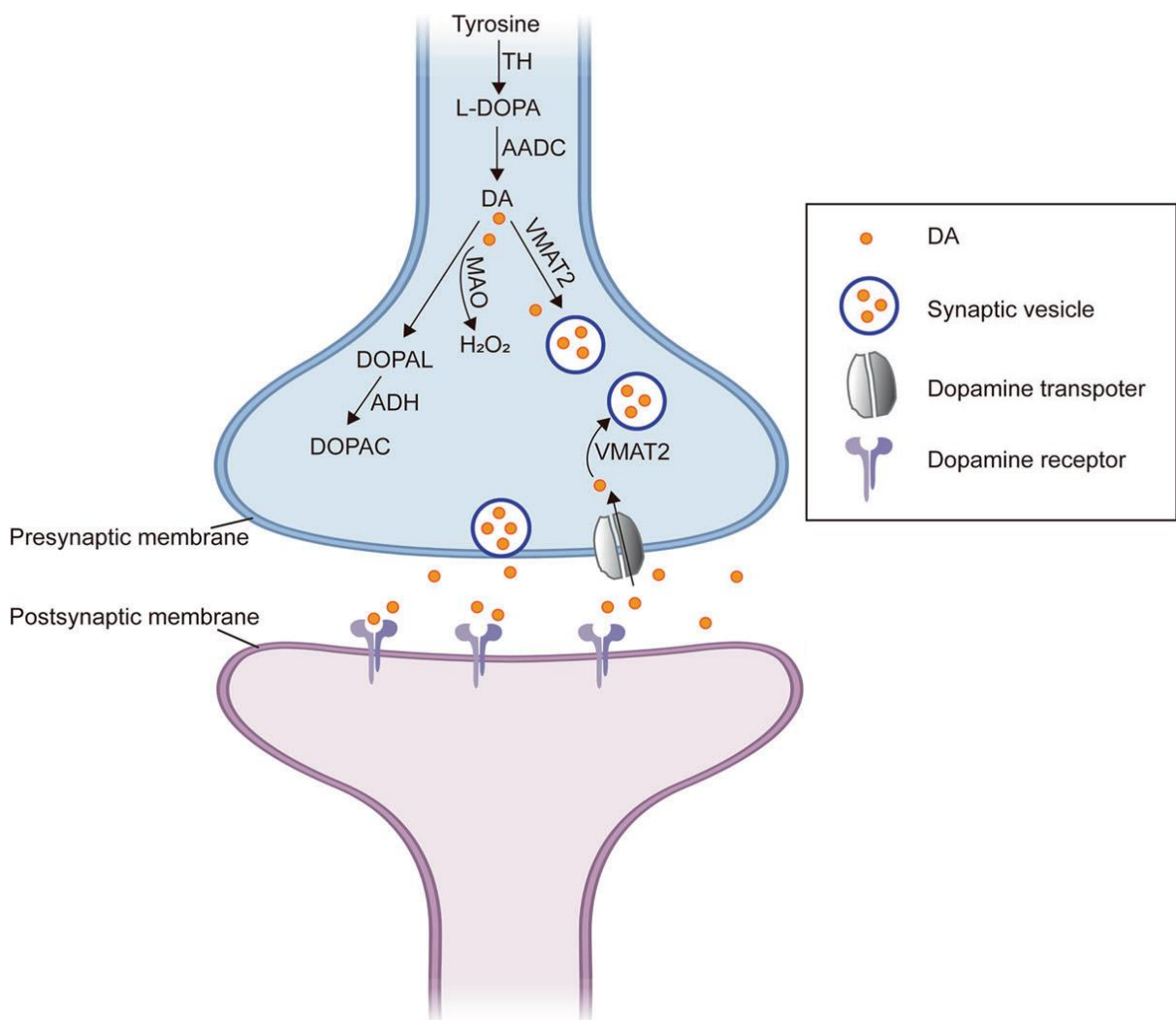


Figura 2 - Metabolismo da DA em neurônios dopaminérgicos.
Fonte: Xu; Yang, 2022.

O DATs atuam na adicção, uma vez que a sua função pode ser modulada pelas drogas de abuso, afetando a duração e a magnitude da sinalização de dopamina (KOOB; VOLKOW, 2016; VOLKOW et al., 2019; SULZER, 2012).

O sistema mesolímbico dopaminérgico também é uma das principais hipóteses na compreensão da neuroplasticidade associada à adicção. A liberação prolongada e desregulada de DA, em comparação com estímulos naturais, resulta em alterações na plasticidade sináptica tanto no sistema dopaminérgico quanto nos neurônios receptores de dopamina (WOLF, et al., 2004).

Essas alterações nos circuitos cerebrais podem persistir após a desintoxicação, principalmente em indivíduos com transtornos graves por uso de substâncias. As consequências comportamentais dessas mudanças são evidentes em recaídas persistentes e desejos intensos de drogas, particularmente quando expostos a estímulos relacionados à droga (PIERCE et al., 2006).

A fase em que os indivíduos reestabelecem o comportamento de busca de drogas após um período de abstinência é um foco fundamental para identificação dos mecanismos neurobiológicos subjacentes à recaída e para desenvolvimento de estratégias de tratamentos eficazes (KOOB; VOLKOW, 2016). Como a prevenção de recaídas representa um desafio no tratamento eficaz de indivíduos com dependência de substâncias, uma perspectiva de longo prazo é essencial para lidar com os efeitos persistentes de drogas (PIERCE et al., 2006).

1.2. Cocaína

1.2.1 Histórico e Epidemiologia

A cocaína é um alcalóide vegetal purificado das folhas de *Erythroxylon coca* (FIGURA 3), proveniente da região andina da América do Sul. É também objeto de investigação científica desde o final do século XIX (CARROL et al, 1992). Por milhares de anos, os indígenas sul-americanos consumiam chá de coca ou mastigaram folhas secas de coca, promovendo a liberação de cocaína na saliva. Além dos efeitos estimulantes associados à coca, incluindo o alívio da fome e da sede, a prática era usada pelos habitantes locais ou viajantes da América do Sul a fim de aliviar o mal da altitude (DRAKE e SCOTT, 2018; ROBINSON; ADINOFF, 2016).



Figura 3 - *Erythroxylon coca*.
Fonte: Cocaine.org

Por volta do século XIX, a substância foi isolada e começou a ser usada como anestésico local, tratamento para o transtorno do uso de opiáceos e como aditivo em alimentos (BIONDICH; JOSLIN, 2015). A popularização da cocaína também pode ser conferida a Sigmund Freud, que documentou seus efeitos estimulantes e eufóricos em 1884 (DRAKE e SCOTT, 2018).

Alguns anos depois, foi descoberta sua propriedade de causar dependência, além do aumento de problemas sociais e médicos, o que levou os Estados Unidos a proibir a droga em 1914. (CICCARONE et al., 2011; BIONDICH; JOSLIN, 2015). Apesar disso, em 1970 foi iniciada uma nova onda de epidemia, seguida pelo aumento do uso de crack. Nesse mesmo ano, a Lei Abrangente de Prevenção e Controle do Abuso de Drogas definiu a cocaína como apenas para uso médico e alto potencial de abuso. A cocaína continua sendo controlada e é classificada como Classe II pela Drug Enforcement Administration (DEA) (BJERK, 2017).

Segundo dados apresentados no relatório do United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) (World Drug Report, 2022), no ano de 2020, cerca de 284 milhões de pessoas em todo o mundo usaram drogas ilícitas. Esse número corresponde a aproximadamente 1 em cada 18 pessoas na faixa etária entre 15 e 64 anos (5,6% da população) e é 26% maior do que o registrado em 2010. Além disso,

mais de 36 milhões sofreram de transtornos associados ao uso de drogas (UNODC, 2022).

Em 2020, estima-se que aproximadamente 21,5 milhões de pessoas tenham usado cocaína, representando 0,4% da população mundial entre 15 e 64 anos. A prevalência estimada de uso aumentou desde 2010, mas o número de pessoas que usam cocaína aumentou mais, em 32%, devido ao crescimento da população global. Ainda segundo a UNODC (2022) esse aumento também pode ser em razão da pandemia do COVID-19, aumentando o uso ocasional de cocaína associado a atividades recreativas, devido às medidas de distanciamento social.

No Brasil, a cocaína é a segunda substância ilícita mais consumida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Segundo o III Levantamento Nacional sobre uso de Drogas pela População Brasileira (III LNUD), 3,1% da população afirmou ter consumido cocaína alguma vez na vida e cerca de 1,3 milhões de pessoas entre 12 e 65 anos afirmaram ter consumido cocaína em 2015 (COUTINHO et al., 2019). Além disso, o uso varia bastante de acordo com sexo e idade, sendo 5,4% entre homens e 1,2% entre mulheres, com faixa etária de maior uso entre 25 e 34 anos de idade (SENAD, 2011).

Esses números indicam que a adicção em cocaína é um problema crescente de saúde pública e é associado a questões médicas e sociais (TAYLOR et al., 2013).

1.2.2 Mecanismo de ação

O principal mecanismo de ação dos psicoestimulantes envolve sua capacidade de se ligar ao DAT. Os DATs são uma classe de proteínas responsáveis pela remoção de monoaminas, como a dopamina, da fenda sináptica após a liberação neuronal (FIGURA 4) (FLECKENSTEIN et al., 2007). Ao inibir a recaptação de monoaminas por meio do bloqueio dos transportadores, a cocaína aumenta sua concentração na fenda sináptica. Conseqüentemente, isso leva à hiperativação dos receptores da membrana pós-sináptica, prejudicando as funções comportamentais e cognitivas (LAMARCHE et al., 2017; MARASCO et al., 2014). Uma importante área de investigação da neurobiologia da dependência é determinar os papéis específicos que não só o DAT, como o transportador de serotonina (SERT) e o transportador de noradrenalina (NET) desempenham no desenvolvimento da adicção (ROGGE; WOOD, 2013).

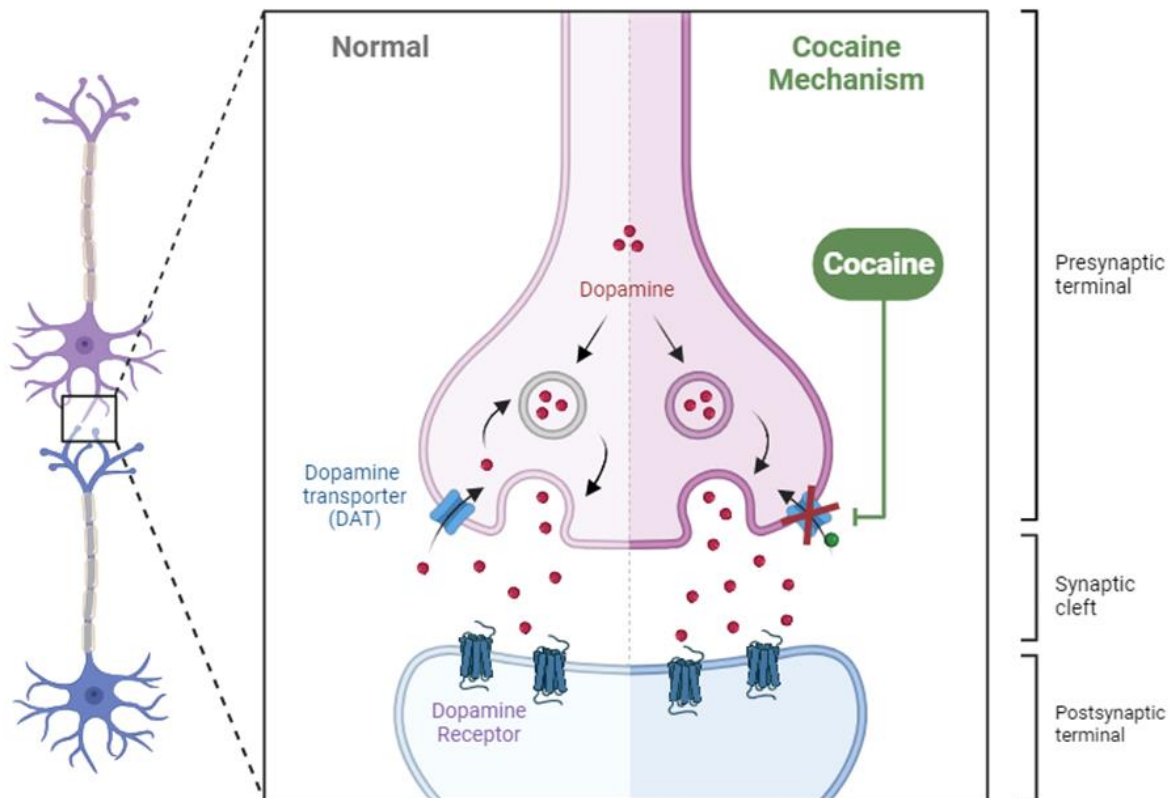


Figura 4 - Mecanismo de ação da cocaína
 Fonte: Created with BioRender.com

As propriedades reforçadoras e recompensadoras da cocaína são parcialmente atribuídas ao aumento indireto de DA ao longo da via mesocorticolímbica, originada na VTA, considerada a via de recompensa cerebral (ROBINSON; ADINOFF, 2016). No entanto, o bloqueio DAT e aumentos gerais na neurotransmissão de DA no VTA para NAc não explicam totalmente o comportamento complexo observado na adicção. Acredita-se que o consumo crônico de cocaína induz a neuroplasticidade que compõem a via de recompensa, o que leva a respostas comportamentais induzidas pela cocaína e ao desenvolvimento do transtorno (ROGGE; WOOD, 2013).

1.2.3 Tratamento

Apesar do crescente número de estudos na literatura sobre os mecanismos cerebrais que contribuem para o transtorno por uso de substâncias, os tratamentos ainda são limitados, devido às alterações distintas e persistentes em várias regiões do cérebro. Assim, aumentar as chances de sucesso terapêutico reside em uma maior compreensão da neurobiologia do uso de substâncias (BOLAÑOS; NESTLER, 2004).

Alguns medicamentos já são aprovados pela FDA e usados na clínica para transtorno por uso de substâncias (FIGURA 5). No transtorno por uso de opióides (TUO), são utilizados a metadona, buprenorfina e naltrexona, que atuam em receptores opióides para aliviar sintomas de abstinência, desejo ou reduzir os efeitos (MATTICK et al., 2014; CONNERY, 2015; KRUPITSKY et al., 2011). Já para o tratamento no transtorno por uso de álcool (TUA) são utilizados acamprosato, dissulfiram e naltrexona, que modulam as vias glutamatérgicas ou aversivas para reduzir o desejo por álcool (MAISEL et al., 2013; SUH et al., 2006; GARBUTT et al., 2005). E também, medicamentos para a adicção por nicotina, que pode ser feita com terapia de reposição de nicotina (TRN), bupropiona e vareniclina, visando sistemas neurotransmissores relacionados à nicotina para gerenciar sintomas de abstinência e auxiliar na cessação do tabagismo (WADGAVE et al., 2016; GONZALES et al., 2006).

O tratamento do transtorno por uso de psicoestimulantes, que inclui substâncias como a cocaína e as anfetaminas, representa um desafio significativo dentro da abordagem farmacológica. Nas últimas décadas, inúmeros estudos têm explorado tratamentos farmacológicos para esta condição; no entanto, nenhum dos medicamentos atendeu aos critérios de aprovação estabelecidos pela FDA.

Apesar de nenhum composto ter demonstrado eficácia, algumas classes têm sido investigadas para uso off-label (SCHWARTZ et al., 2022; CHAN et al., 2019). Entre essas classes, incluem-se antidepressivos, antipsicóticos e anticonvulsivantes, e os resultados de ensaios clínicos variam consideravelmente quanto à capacidade de reduzir a taxa de recaída, dependendo se a intervenção é aguda ou subaguda (LASSI et al., 2022; SINGH et al., 2016). Além disso, estudos têm sido conduzidos para avaliar a eficácia dessas abordagens farmacoterapêuticas em relação aos distúrbios de dupla substância. Foi demonstrado que a buprenorfina pode reduzir o uso de cocaína em indivíduos dependentes de opióides e cocaína (MONTROYA et al., 2004). Além disso, o dissulfiram, aprovado para o tratamento de TUA, surge como um potencial tratamento para o TUC (KAMPMAN et al., 2019; LANZ et al., 2023.).

As investigações também têm se direcionado para a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à recompensa inicial e ao efeito reforçador induzidos pelas substâncias de abuso (NESTLER et al., 2005; LÜSCHER et al., 2011). Dado o papel central da DA na mediação dos efeitos reforçadores das drogas, abordagens terapêuticas voltadas para a modulação do DAT têm sido consideradas promissoras em várias fases do tratamento (ORSINI et al., 2001). Pesquisas têm

demonstrado que agonistas parciais do receptor D2 possuem a capacidade de atenuar os efeitos reforçadores da cocaína, anfetaminas e álcool em modelos animais (HALL; KOSTEN, 2004). Em relação ao D3, antagonistas demonstraram eficácia em bloquear a busca compulsiva pela cocaína e em prevenir a reinstauração da auto administração da cocaína induzida por estímulos. Embora a pesquisa acerca dos agonistas parciais do receptor D1 apresente limitações, estudos indicaram sua capacidade competitiva de inibir a autoadministração de cocaína em camundongos (AUJLA; BENINGER, 2005; HEIDBREDEDER et al., 2005).

Com o intuito de restabelecer a plasticidade no NAc, que é prejudicada pelo uso repetido de psicoestimulantes e pela abstinência, estão sendo investigados alvos relacionados à sinalização glutamatérgica (QUINTERO et al., 2013). Uma abordagem terapêutica promissora envolve a modulação dos receptores AMPA, sendo necessários ensaios clínicos para avaliar sua eficácia. A modulação dos receptores metabotrópicos do glutamato pode ser um mecanismo para reverter os efeitos na plasticidade. (SCHEYER et al., 2016; CAPRIOLI et al., 2018; LI et al., 2015). Além disso, medicamentos como a ceftriaxona e N-acetilcisteína podem modular e restaurar a captação reduzida de glutamato, que é um mecanismo central na disfunção da plasticidade (DUALIBI et al., 2017; BECHARD et al., 2021).

Novas abordagens farmacológicas estão sendo investigadas em estudos pré-clínicos e clínicos, como as imunoterapias. As vacinas anti drogas funcionam por um mecanismo diferente dos tratamentos farmacológicos convencionais. O sistema imunológico do indivíduo vacinado é estimulado a gerar anticorpos direcionados contra o composto alvo. Tal resposta imunológica tem como consequência a limitação da disseminação do composto pelo SNC e outros tecidos, resultando na ineficácia do agente em produzir efeitos psicoativos (HOSSAIN et al., 2022).

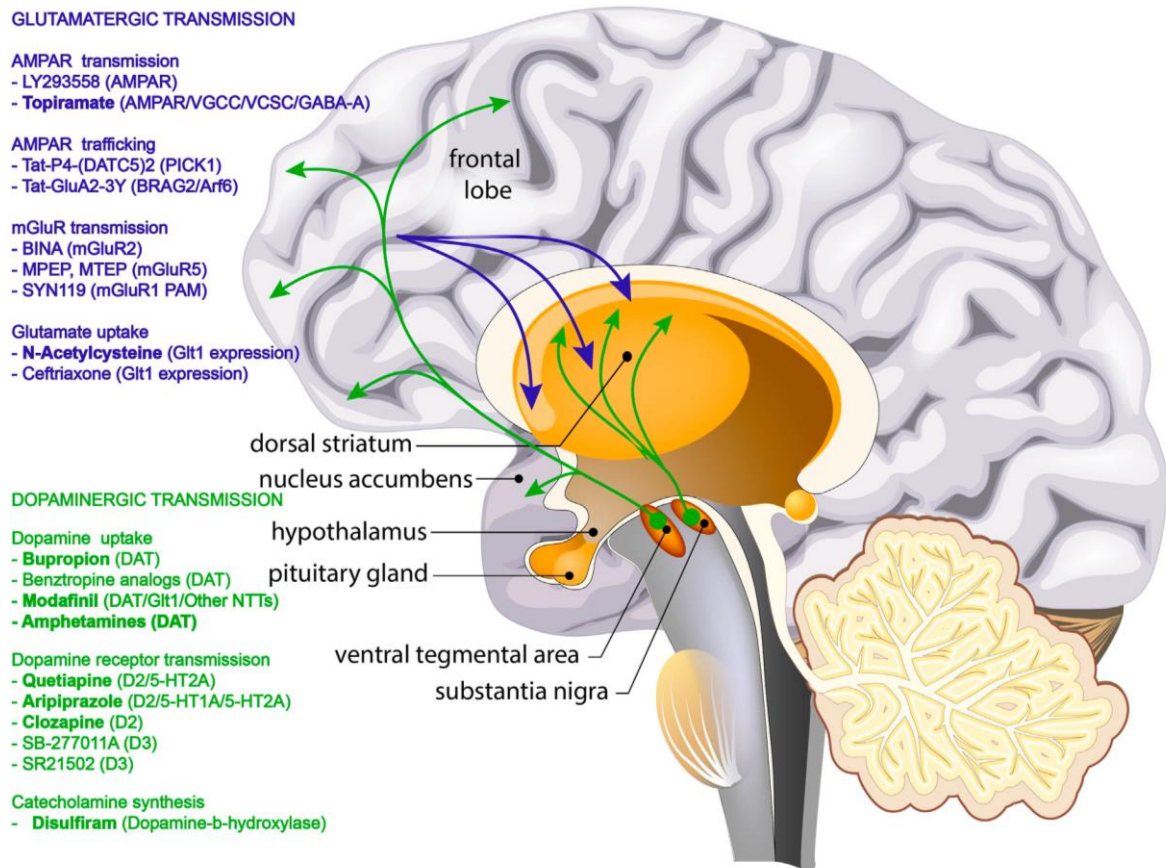


Figura 5 - Visão geral das vias e alvos farmacológicos envolvidos na dependência de psicoestimulantes.
Fonte: Jensen, 2022.

1.3 Calcineurina

A calcineurina (CaN) é uma proteína serina-treonina fosfatase dependente de cálcio/calmodulina (Ca^{2+} /CaM). Desempenha um papel fundamental na transdução de sinais dependentes de cálcio em uma ampla variedade de respostas celulares, devido a sua capacidade de detectar Ca^{2+} através de sua ativação pela calmodulina, ativada por um aumento na concentração de cálcio intracelular (ARAMBURU et al., 2004).

A CaN é composta por uma subunidade catalítica (CnA) e uma subunidade regulatória (CnB). O domínio catalítico compartilhado por essas isoformas controla a atividade de fosfatase da calcineurina, enquanto a CnB se liga a Ca^{2+} . A ligação do cálcio à CnB desencadeia uma mudança conformacional, ativando a calcineurina ao expor seu sítio catalítico (GALLAGHER et al., 2001; SARAF et al., 2018). A calcineurina ativada desfosforila o fator nuclear das proteínas das células T ativadas

(NFAT) que interage com moléculas transcricionais para promover a transcrição genética (FIGURA 7).

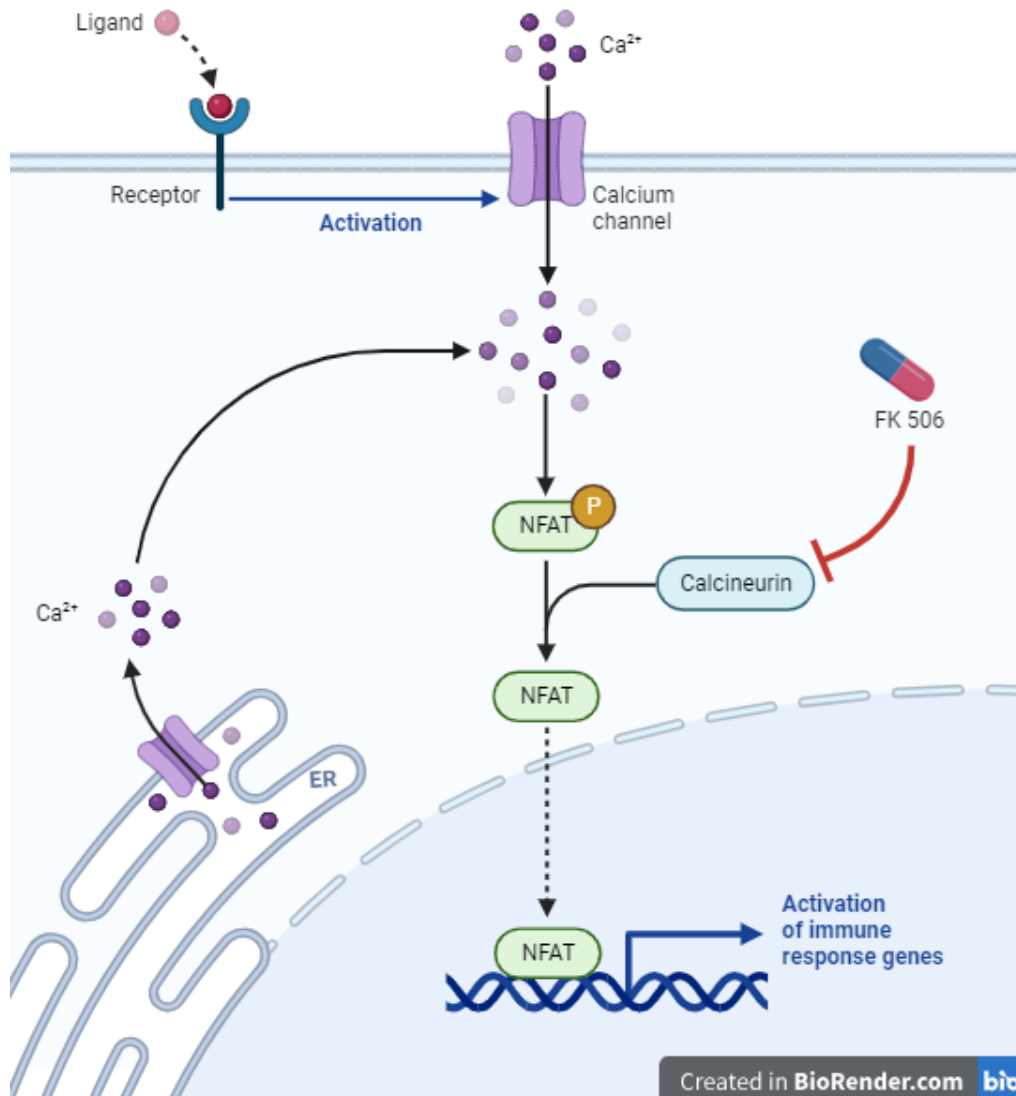


Figura 6 - Via de sinalização da Calcineurina.

Fonte: Created with BioRender.com

A atividade da calcineurina é controlada não apenas pelo cálcio e pela calmodulina, mas também por vários inibidores da calcineurina, que foram identificados durante os últimos anos. Estudos recentes, enfatizam a importância da sinalização calcineurina-NFAT nas respostas imunológicas. A calcineurina é um alvo terapêutico de destaque, principalmente na regulação imunológica, através dos inibidores da calcineurina, como ciclosporina A e tacrolimus (FK506) (MARTINEZ et al., 2021).

A identificação de inibidores da calcineurina como agentes terapêuticos promissores abre perspectivas para tratar distúrbios neurológicos e imunológicos. A calcineurina é prevalente no tecido nervoso e desempenha um papel vital em distúrbios neurológicos relacionados à excitotoxicidade do cálcio e desequilíbrio de neurotransmissores. Essa fosfatase também desempenha um papel importante na potenciação de longa duração (LTP) e depressão de longa duração (LTD) e regula a força sináptica por meio da desfosforilação de proteínas sinápticas, influenciando a plasticidade sináptica e memória (JOHNSON et al., 2019; ZENG et al., 2020). Inibidores da calcineurina apresentam efeitos neuroprotetores e restauram a plasticidade sináptica e a função cognitiva em modelo animal de doença de Alzheimer (LI et al., 2019; ZHU et al. 2019). O papel de calcineurina também já foi demonstrado no contexto de adicção. O tratamento com os inibidores ciclosporina ou FK506, atenuou a resposta locomotora mediada pela nicotina (ADDY et al., 2007) e metanfetamina (TSUKATAMOTO et al., 2001).

O presente trabalho avaliou o efeito do FK506, um fármaco imunossupressor usado para evitar a rejeição de órgãos após transplantes, sobre as alterações promovidas pela administração de cocaína. Pesquisas contínuas nesse campo permitem a compreensão dos mecanismos subjacentes, o que pode propiciar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Além disso, a identificação de potenciais efeitos de um fármaco que está em uso na clínica poderia acelerar a aprovação para a farmacoterapia do transtorno por uso de substâncias.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Testar a hipótese de que o inibidor da calcineurina atenua a resposta comportamental e neuroinflamatória induzida por cocaína.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da inibição da calcineurina no teste comportamental de preferência condicionada ao lugar induzido por cocaína.
- Avaliar o efeito da inibição da calcineurina na sensibilização comportamental induzida por cocaína.
- Avaliar o efeito da inibição da calcineurina nos níveis de citocinas e fatores neurotróficos em animais submetidos a sensibilização comportamental induzidos por cocaína.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Neste trabalho, foram utilizados camundongos machos e camundongos fêmeas, C57Bl/6, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram recebidos com aproximadamente 4 semanas e utilizados no protocolo experimental com idade entre 9 e 12 semanas. Os camundongos possuíam acesso à água e ração *ad libitum* e foram mantidos em ciclo claro/escuro a cada 12 h com temperatura local de aproximadamente 24 °C.

Todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação com animais adotados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e foram aprovadas sob o protocolo 261/2021 (ANEXO A).

3.2. Tratamentos

Os animais foram tratados com o inibidor da calcineurina FK506 (Tacrolimo; LC Laboratory, EUA), que foi diluído em solução de DMSO 1%, *tween* 80 5% e solução salina estéril, com volume de 5 mg/kg, administrada por injeção subcutânea 80 minutos antes de cada teste comportamental. Para indução da adicção, foi utilizada a cocaína (Merck & Co., Inc.), diluída em solução salina, com volume de 15 mg/kg e administrada por injeção intraperitoneal (i.p.) imediatamente antes de cada teste comportamental. Também foi utilizado veículo como controle de ambos os tratamentos.

3.3. Análise comportamental

3.3.1 Sensibilização comportamental

Os animais foram submetidos em um campo aberto para avaliação da atividade locomotora (FIGURA 7), onde foram colocados individualmente no centro da arena e avaliado a distância total percorrida por 30 minutos durante 7 dias.

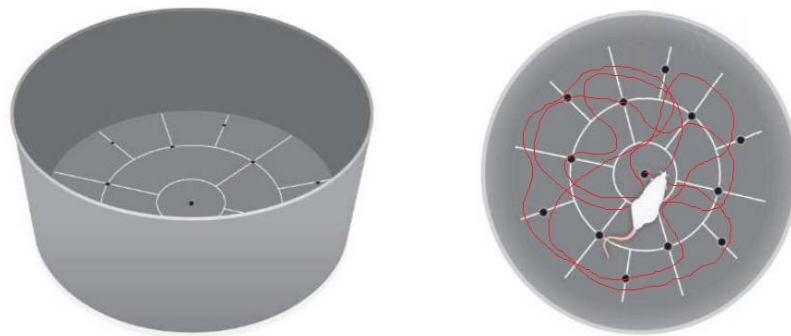


Figura 7 – Campo Aberto
Fonte: Khoomsab et al., 2019.

Nos dias 1 e 2, os animais foram habituados na arena. Dos dias 3 ao 7, os animais foram tratados com FK506 ou veículo por via subcutânea na dose de 5 mg/kg. Depois de 80 minutos, os animais foram tratados com cocaína ou solução salina por via i.p. na dose de 15 mg/kg, e imediatamente colocados no aparato (FIGURA 8). O teste foi filmado e analisado pelo software ANY-maze (versão 6.0).

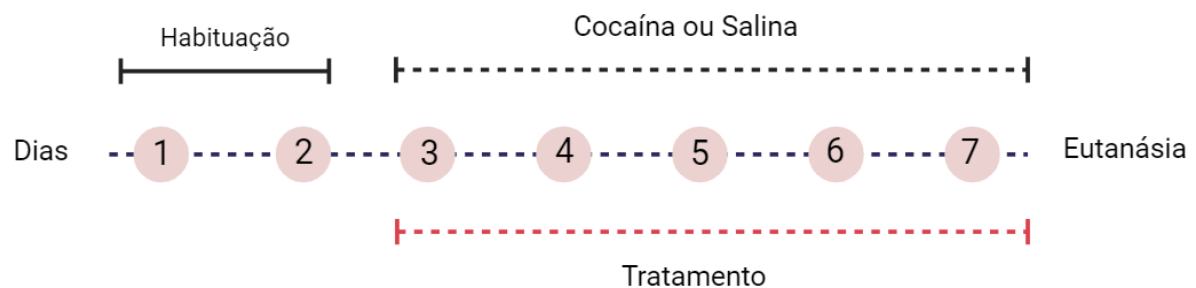


Figura 8 - Protocolo da sensibilização locomotora.
Fonte: Do Autor.

3.3.2 Preferência condicionada ao lugar

Para o teste de preferência condicionada pelo lugar (PCL), foi utilizada uma caixa de acrílico dividida em três compartimentos e ambos os compartimentos possuem padrões distintos nas paredes internas e no piso. Os compartimentos laterais são ligados por um compartimento central neutro e o acesso se dá através de portas removíveis, permitindo que os animais sejam confinados a cada um dos compartimentos ou que tenham livre acesso a todo o aparelho (FIGURA 9).



Figura 9 – Aparato do PCL.
Fonte: Created with BioRender.com

O PCL foi realizado em três fases: pré-teste, condicionamento e teste. No pré-teste (dia 1) os animais foram colocados de forma individual no corredor central, podendo explorar livremente os três compartimentos. O pré-teste foi filmado e avaliado o tempo gasto dentro de cada compartimento durante 15 minutos. A fase de condicionamento teve duração de 6 dias, e os animais foram tratados com FK506 ou veículo por via subcutânea na dose de 5 mg/kg. Depois de 80 minutos, os animais foram tratados com cocaína ou solução salina por via intraperitoneal (i.p.) na dose de 15 mg/kg em dias alternados em um lado da caixa. Dessa forma, nos dias 2, 4 e 6, os animais foram tratados com cocaína e imediatamente confinados em um lado da caixa, onde permaneceram 30 minutos. Nos dias 3, 5 e 7, os animais foram tratados com solução salina e confinados no lado oposto. O grupo controle foi tratado com solução salina todos os dias. No dia do teste (dia 8), os animais foram colocados novamente no corredor central para explorar livremente o ambiente durante 15 minutos (FIGURA 10).

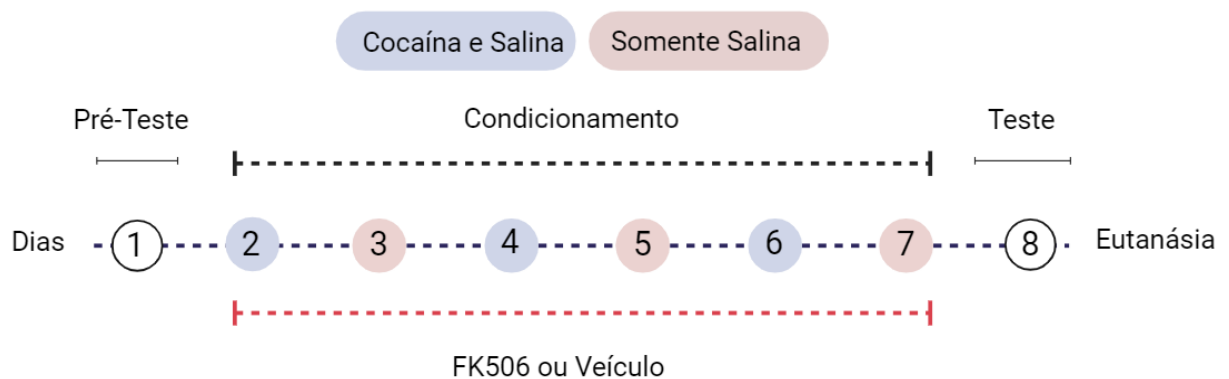


Figura 10 - Protocolo de Preferência Condicionada ao Lugar.
Fonte: Do Autor.

Todas as etapas foram filmadas e analisadas pelo software ANY-maze, onde foi avaliado o tempo de exploração de cada compartimento no segundo dia. O cálculo do CPP é demonstrado em porcentagem e calculado da seguinte forma: $((A2-A1) * 100) / (A2+A1)$, onde (A2) representa o tempo gasto do lado onde o animal recebeu a droga no dia do teste e (A1) representa o tempo gasto do lado onde o animal recebeu salina.

3.4 Coleta de tecidos

Após o término da sensibilização locomotora e do PCL, foi realizada a perfusão transcardíaca para posterior coleta do tecido cerebral (FIGURA 11). Para isso, os animais foram anestesiados com xilazina (8 mg/kg, i.p.) e cetamina (80 mg/kg, i.p.) e perfundidos com solução de tampão fosfato em salina (PBS – pH 7,4). Depois foram decapitados com retirada do encéfalo, que foi cortado ao meio. O hemisfério esquerdo foi dissecado, com retirada do córtex, hipocampo e estriado e armazenados a -80 °C até a análise. E o hemisfério direito foi colocado em solução de paraformaldeído 4% (PFA – pH 7,4), seguidos de crioproteção e congelamento.

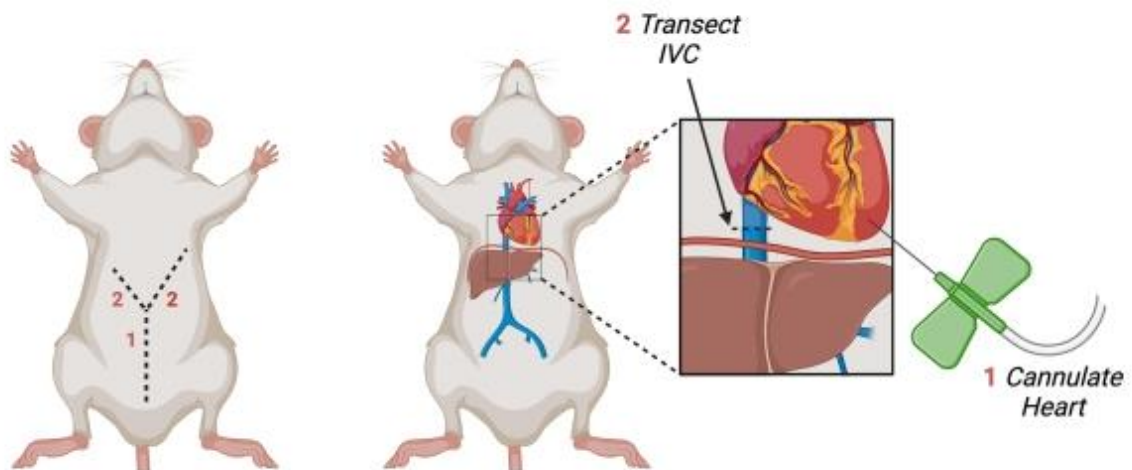


FIGURA 11 - Representação da perfusão transcardíaca.
Fonte: Rana et al., 2022.

3.5 Análise de Fatores Neurotróficos e Citocinas

As amostras dissecadas (hipocampo e estriado) foram descongeladas e homogeneizadas em solução tampão de extração de citocinas [Tris-HCl 2mM pH 8,0; NaCl 1337 mM; NP40 1%; glicerol 10%; fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 0,1 mM; pepstatina A 1 μ M; EDTA 10mM; E-64 10 μ M e vanadato de sódio 0,5mM diluídos em água destilada].

Em seguida, foram centrifugadas a 4 °C em 10000 rpm por 20 minutos, aliqüotadas e armazenadas no -20 °C. Em seguida, foi realizado o ensaio de imunoabsorção enzimática (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) para quantificação das citocinas (interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fractalquina (CX3CL1) e fatores neurotróficos (fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator de crescimento do nervo (NGF). Foram utilizados os kits da e seguidas as instruções do fabricante.

3.6 Análise estatística

Para análise estatística utilizou-se o software Prisma 8.0 (GraphPad, CA, USA). Todos os testes foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de duas vias (TWO-way ANOVA), seguidos pelo teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão e a diferença entre os grupos foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 O inibidor de calcineurina atenua significativamente a sensibilização locomotora induzida por cocaína em machos, mas não em fêmeas.

Avaliamos o efeito do FK506 em um modelo clássico em estudos sobre adicção. As figuras 12 e 13 representam as atividades locomotoras de machos e fêmeas tratados com FK506 e grupo controle.

Nos machos, foi demonstrado que a cocaína aumentou a atividade locomotora a partir do dia 3 e esse efeito estimulador foi atenuado a partir do dia 4, quando comparado com os controles. Da mesma forma, o tratamento com FK506 por si só não alterou a locomoção desses animais em comparação ao controle. A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas para os fatores cocaína [$F(6,12)=21,77$; $p<0,0001$] e fator tratamento [$F(3,12)=124,8$; $p<0,0001$], bem como uma interação significativa entre esses fatores [$F(18,21)=11,82$; $p<0,0001$]. O pós-teste mostrou que o tratamento com o FK506 reduziu significativamente a sensibilização comportamental induzida por cocaína nos dias 4, 5, 6 ($p<0,05$) e 7 ($p<0,001$) (FIGURA 12).

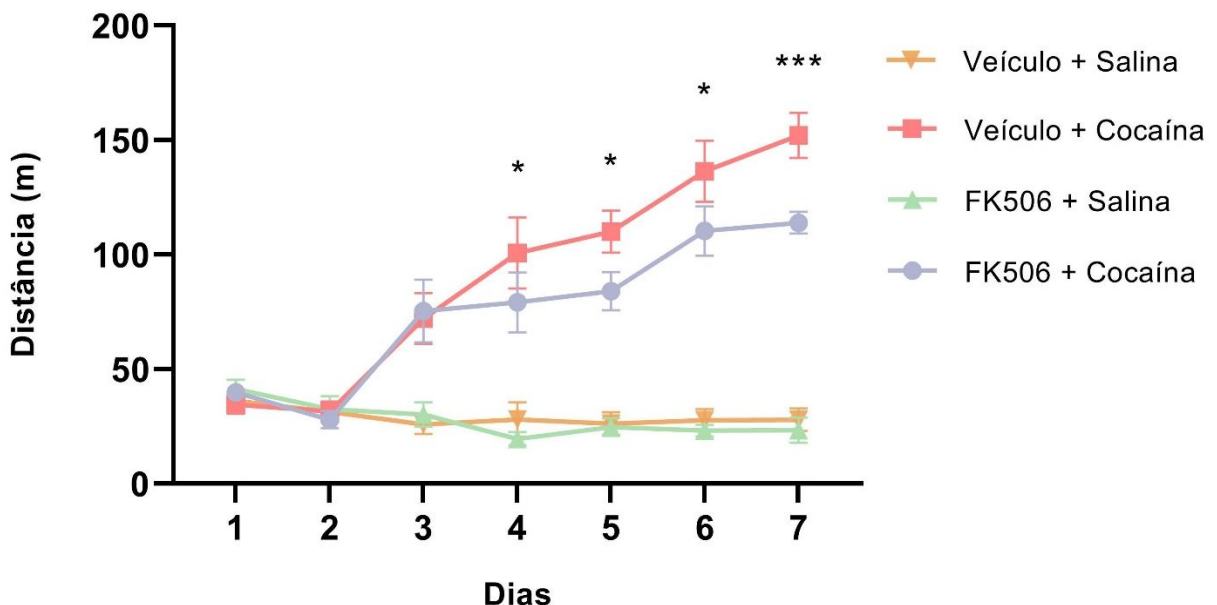


Figura 12 - Atividade locomotora na sensibilização comportamental de machos após o tratamento com FK506. Análise da atividade locomotora dos animais tratados com FK506 + cocaína (n=9), veículo + cocaína (n=9), FK506 + solução salina (8) e veículo + salina (n=8) no teste de sensibilização comportamental por 7 dias. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo pós teste de Tukey. * $p<0,05$ nos dias 4, 5 e 6 e *** $p<0,001$ no dia 7.

Já na sensibilização locomotora das fêmeas, foi demonstrado que a cocaína aumentou a atividade locomotora a partir do dia 3, contudo, o FK506 não foi capaz de atenuar esse efeito estimulador até o dia 7.

A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas para os fatores cocaína [$F(6,217)=9,3$; $p<0,0001$] e fator tratamento [$F(3,217)=72,41$; $p<0,0001$], bem como uma interação significativa entre esses fatores [$F(18,217)=5,7$; $p<0,0001$]. Porém, o pós-teste não mostrou diferenças significativas no grupo FK506 + cocaína (FIGURA 13).

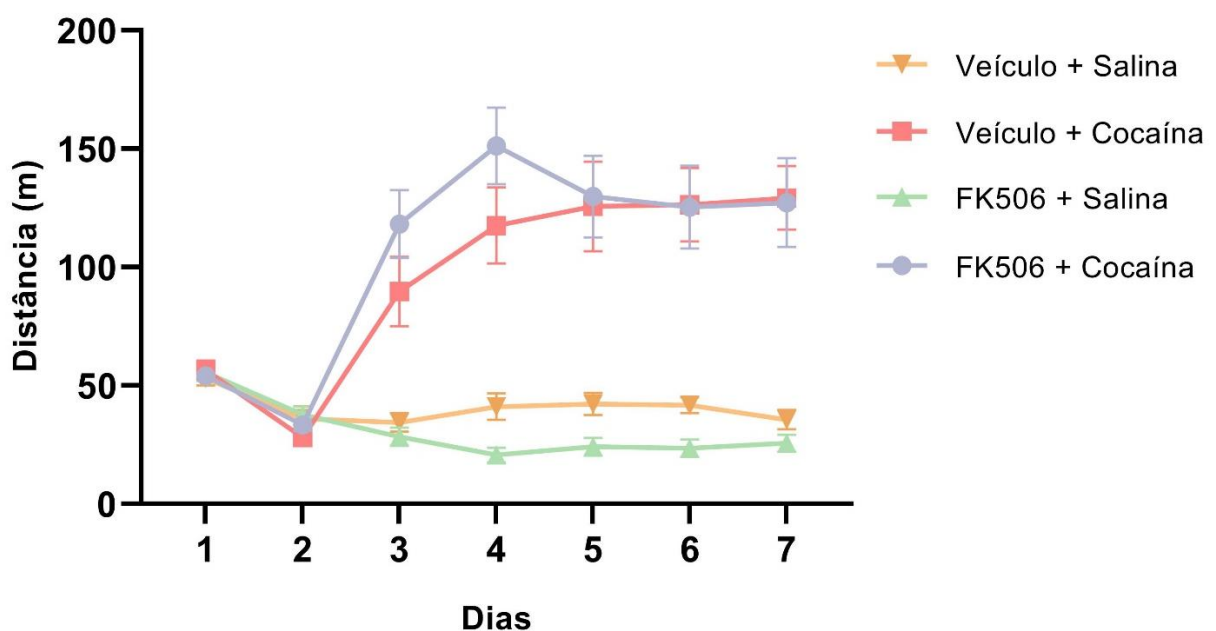


Figura 13 - Atividade locomotora na sensibilização comportamental de fêmeas após o tratamento com FK506. Análise da atividade locomotora dos animais tratados com FK506 + cocaína (10), veículo + cocaína (9), FK506 + solução salina (8) e veículo + salina (n=8) no teste de sensibilização comportamental por 7 dias. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey.

4.2 O inibidor de calcineurina não reverteu o efeito da preferência condicionada ao lugar por cocaína em machos e fêmeas

As figuras 14 e 15 mostram os resultados da avaliação da PCL de machos e fêmeas induzidas por cocaína e tratados com FK506 ou grupo controle.

Nos machos, foi demonstrado que os animais tratados com cocaína apresentaram uma maior taxa de preferência pelo lado em que foram pareados com

a droga do que os animais que receberam salina. Contudo, o FK506 não reverteu a preferência induzida pela cocaína. A ANOVA de duas vias mostrou variação significativa para o fator cocaína ($\% = 47,67$; $p < 0,0001$). O pós-teste apresentou diferenças significativas entre os grupos que receberam salina ou cocaína ($p < 0,0001$) (FIGURA 14).

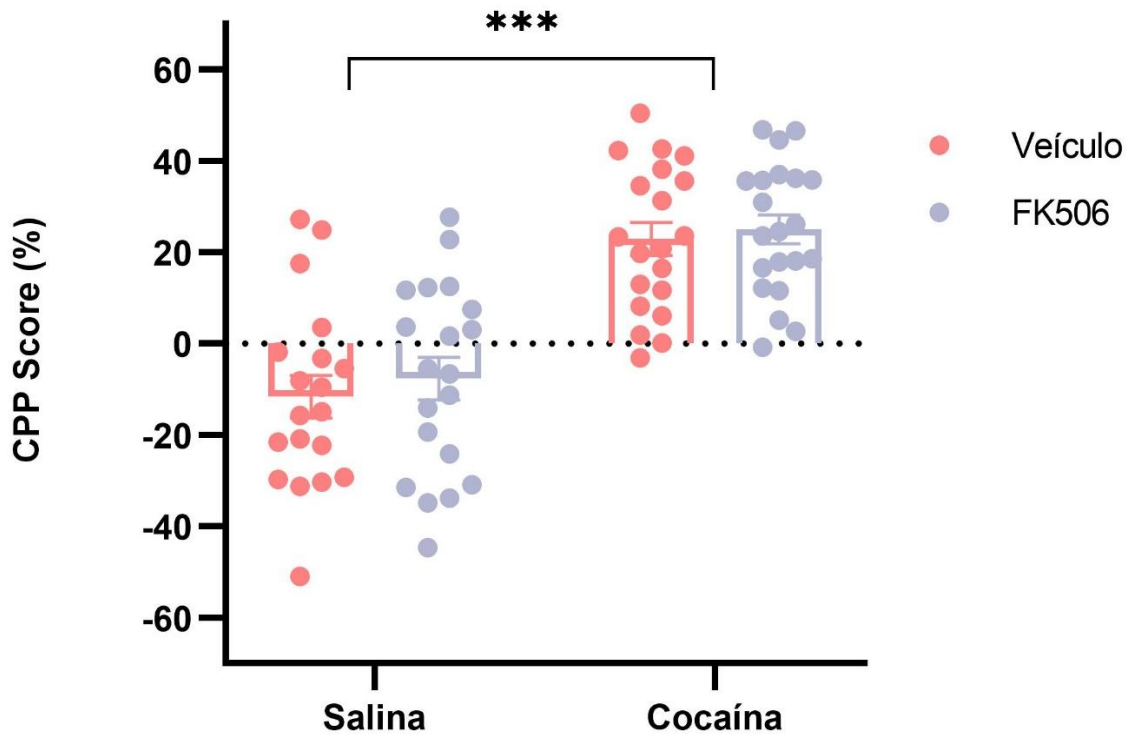


Figura 14 – Preferência condicionada ao lugar de machos tratados com FK506. Análise da taxa de preferência de machos tratados com FK506 + cocaína ($n=23$), veículo + cocaína ($n=23$), FK506 + solução salina (22) e veículo + salina (21). As barras representam a média \pm SEM da porcentagem de tempo no lado pareado com a droga. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey. *** $p < 0,0001$ entre os grupos salina e cocaína.

No comportamento realizado com fêmeas, também foi observada a preferência ao lado pareado com cocaína, onde o FK506 também não foi capaz de reverter. Assim como nos machos, a ANOVA de duas vias demonstrou variação significativa para o fator cocaína ($\% = 59,83$; $p < 0,0001$). O pós-teste demonstrou diferenças significativas entre os grupos que receberam salina e cocaína sem o tratamento com o FK506 ($p < 0,0001$) (FIGURA 15).

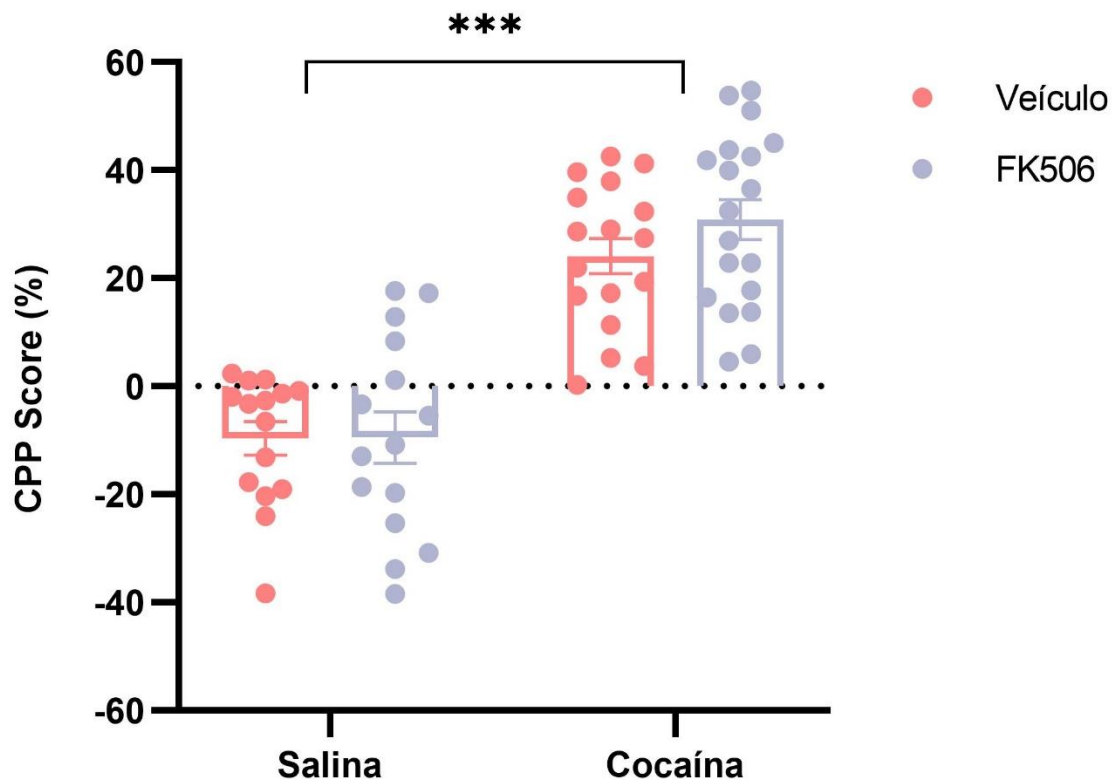


Figura 15 - Preferência condicionada ao lugar de fêmeas tratadas com FK506. Análise da taxa de preferência de fêmeas tratadas com FK506 + cocaína (18), veículo + cocaína (17), FK506 + solução salina (18) e veículo + salina (15). As barras representam a média \pm SEM da porcentagem de tempo no lado pareado com a droga. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey. *** $p < 0,0001$ entre os grupos salina e cocaína.

4.3 Quantificação dos níveis de fatores neurotróficos no hipocampo e estriado.

Fatores neurotróficos, essenciais na regulação do crescimento e sobrevivência neuronal, são descritos por influenciar as mudanças neuroadaptativas causadas pela sensibilização induzida por cocaína (LEAL et al., 2017). Por isso, avaliamos o perfil de fatores neurotróficos no hipocampo e estriado de animais que foram submetidos à sensibilização comportamental por meio do ELISA. Foram dosados os níveis de GDNF, BDNF e NGF nos grupos tratados com solução salina + veículo, cocaína + veículo ou cocaína + FK506.

No hipocampo, observou-se uma diminuição significativa nos níveis de GDNF ($p=0,0150$) em animais tratados com cocaína + FK506 em comparação com cocaína

+ veículo. No entanto, não foram observadas alterações significativas nos níveis de de BDNF ($p=0,0955$) e NGF ($p=0,4303$) (FIGURA 16).

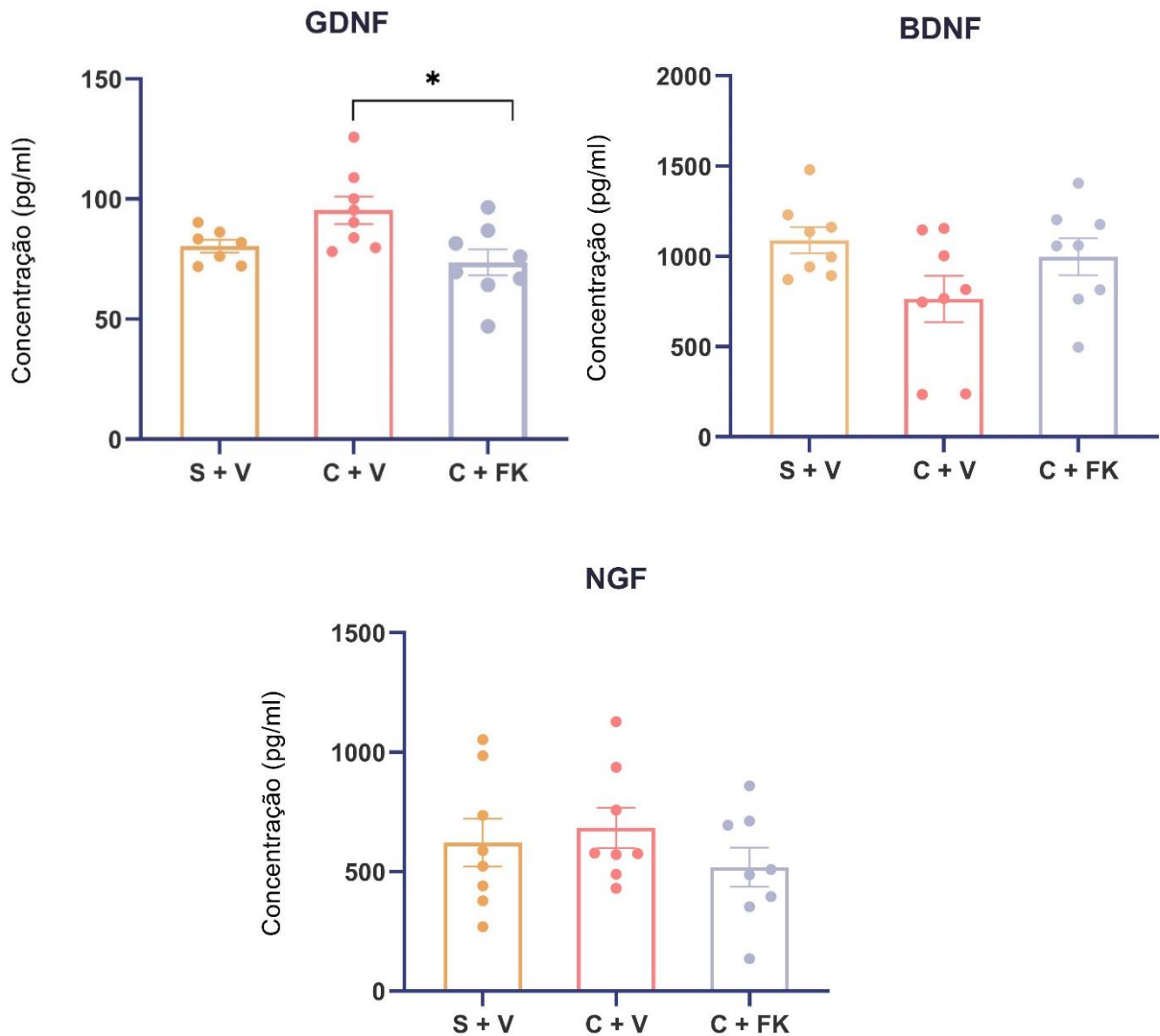


Figura 16- Níveis dos fatores neurotróficos GDNF, BDNF e NGF no hipocampo. Quantificação dos níveis de BDNF (A), GDNF (B), NGF (C) no hipocampo de machos submetidos à sensibilização comportamental e tratados com solução salina + veículo ($n=8$), cocaína + veículo ($n=8$) ou cocaína + FK506 ($n=8$). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey. * $p<0,05$ entre o grupo cocaína + veículo e cocaína + FK506.

Já no estriado, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de BDNF ($p=0,8080$), GDNF ($p=0,4802$) e NGF ($p=0,5622$) (FIGURA 17).

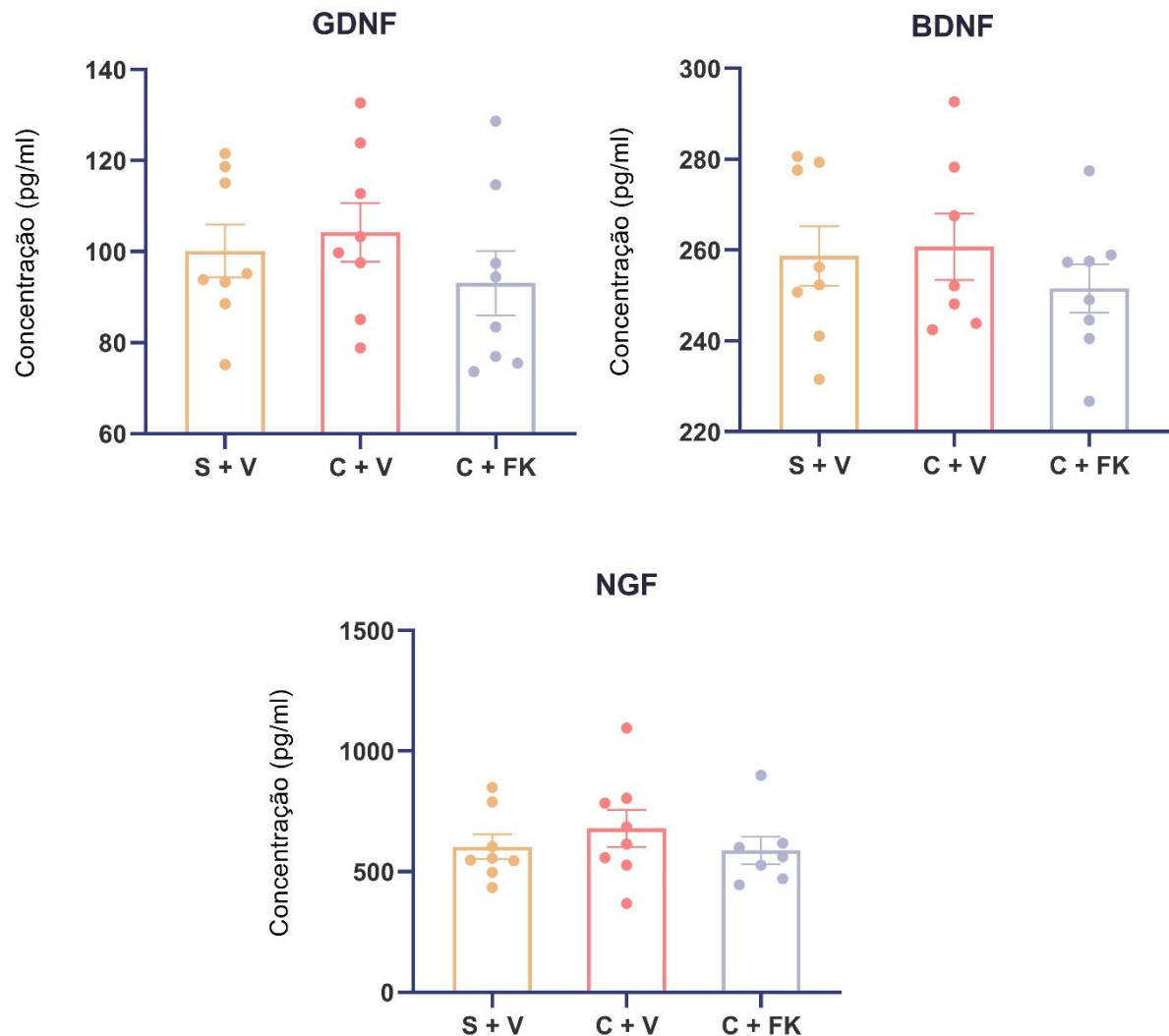


Figura 17- Níveis de GDNF, BDNF e NGF no estriado. Quantificação dos níveis de BDNF (A), GDNF (B), NGF (C) no estriado de machos submetidos à sensibilização comportamental e tratados com solução salina + veículo (n=8), cocaína + veículo (n=8) ou cocaína + FK506 (n=8). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey. * $p < 0,05$ entre o grupo cocaína + veículo e salina + veículo.

4.4 Quantificação dos níveis de citocinas no hipocampo e estriado.

A exposição aguda e crônica a psicoestimulantes promove respostas neuroinflamatórias, que envolvem a liberação de citocinas. Estas moléculas, tradicionalmente reconhecidas por seu papel na modulação da resposta imunológica, também exercem influência na neurotransmissão e desempenham um papel significativo na plasticidade neural adaptativa associada ao desenvolvimento de adicção (NORTHCUTT et al., 2015). A investigação das citocinas no contexto da sensibilização locomotora induzida pela cocaína desempenha um papel crucial na

compreensão dessa interação, além de elucidar os mecanismos subjacentes e as potenciais estratégias terapêuticas.

Assim, através do ELISA, foram avaliados o perfil de citocinas no hipocampo e estriado dos animais que foram submetidos à sensibilização comportamental, tratados com solução salina + veículo, cocaína + veículo ou cocaína + FK506. Para isso, foram dosados os níveis de TNF- α , IL-10, IL-6 e CX3CL1.

No hipocampo, observou-se uma diminuição significativa nos níveis de IL-10 ($p=0,0261$) e TNF- α ($p=0,0499$) de animais tratados com cocaína + FK506 em comparação com cocaína + veículo. No entanto, não foram observadas alterações significativas nos níveis de IL-6 ($p=0,0968$) e CX3CL1 ($p=0,6704$) (FIGURA 18).

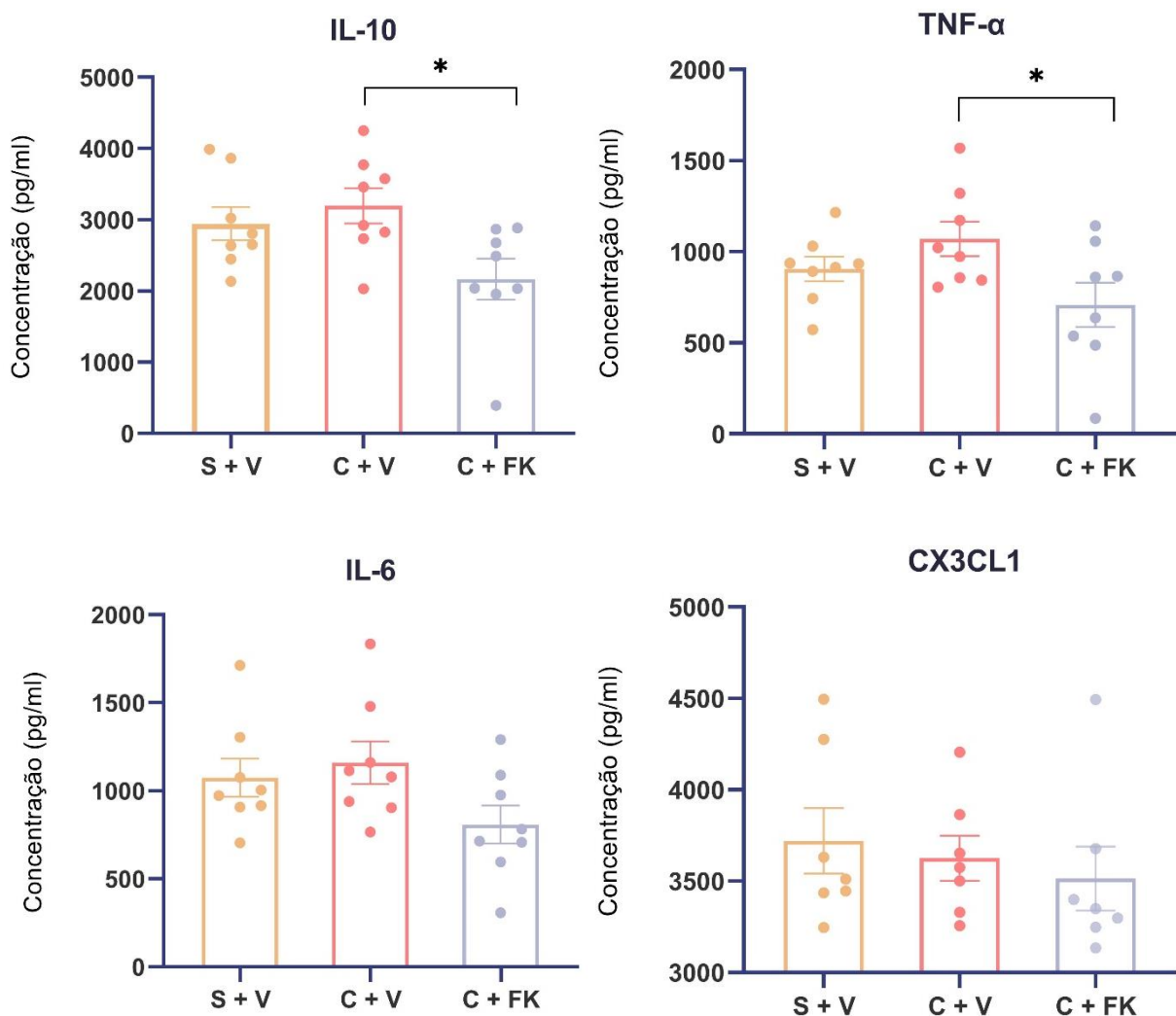


Figura 18- Níveis das citocinas no hipocampo. Quantificação dos níveis de IL-10, TNF- α , IL-6 e CX3CL1 no hipocampo de machos submetidos à sensibilização comportamental e tratados com solução salina + veículo ($n=8$), cocaína + veículo ($n=8$) ou cocaína + FK506 ($n=8$). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey. * $p<0,05$ entre o grupo cocaína + veículo e cocaína + FK506.

No estriado foi observado um aumento nos níveis de IL-10 nos animais que receberam cocaína + veículo quando comparados com o grupo controle, salina + veículo ($p=0,0225$). Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de TNF- α ($p=0,3918$), IL-6 ($p=0,3773$) e CX3CL1 ($p=0,6550$) (FIGURA 20).

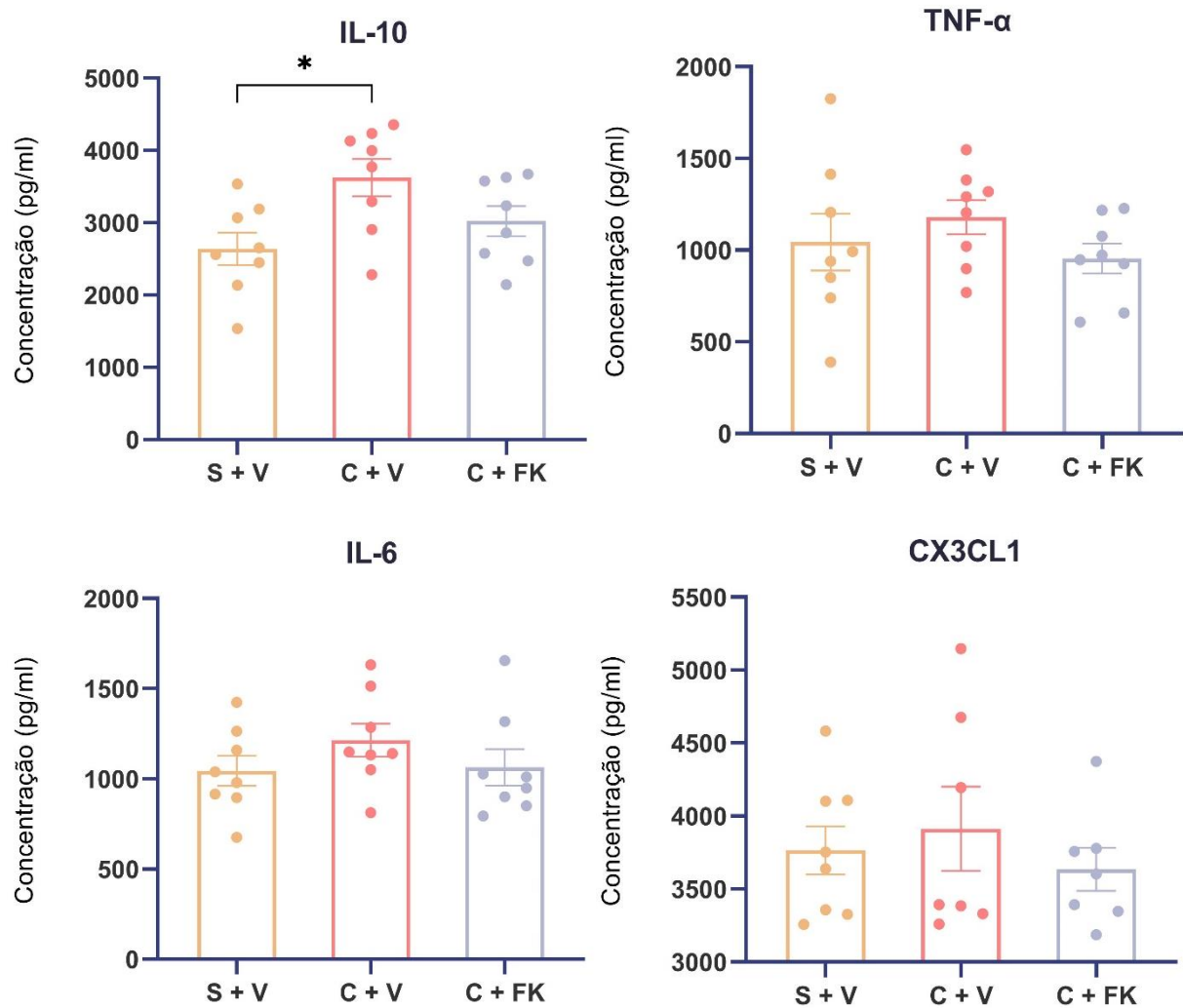


Figura 20 - Níveis de citocinas no estriado. Quantificação dos níveis de IL-10, TNF- α , IL-6 e CX3CL1 no estriado de machos submetidos à sensibilização comportamental e tratados com solução salina + veículo ($n=8$), cocaína + veículo ($n=8$) ou cocaína + FK506 ($n=8$). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey. * $p<0,05$ entre o grupo cocaína + veículo e salina + veículo.

4. DISCUSSÃO

Investigamos o efeito de um inibidor da calcineurina nos testes comportamentais de sensibilização locomotora e preferência condicionada ao lugar em animais induzidos por cocaína. Avaliamos ainda o efeito da inibição da calcineurina nos níveis de citocinas e fatores neurotróficos em camundongos submetidos a sensibilização comportamental induzida por cocaína.

Nossos resultados demonstraram que (I) a cocaína induziu a sensibilização locomotora, efeito que foi atenuado pelo FK506 em machos, mas não em fêmeas; (II) a cocaína induziu a preferência condicionada ao lugar, mas esse comportamento não foi alterado pelo tratamento com FK506 em nenhum dos sexos; (III) o FK506 reduziu as concentrações de GDNF, TNF- α e IL-10 no hipocampo dos animais que receberam cocaína; (IV) a cocaína aumentou IL-10 no estriado de animais cocaína em comparação ao grupo controle.

Estudos comportamentais em animais desempenham um papel crucial no avanço da compreensão dos mecanismos neurobiológicos da adicção. Compreender as bases das diferenças na resposta aos psicoestimulantes, ajuda no desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento mais eficazes para o transtorno por uso de substâncias (EVERITT et al., 2018).

Os testes de sensibilização comportamental e CPP são ferramentas importantes na pesquisa sobre adicção, possibilitando maior compreensão acerca dos mecanismos neurais e comportamentais subjacentes ao transtorno por uso de substâncias (VANDERSCHUREN et al., 2004). Embora ambos os testes avaliem comportamentos relacionados à cocaína, eles demonstram diferentes aspectos da adicção, como a sensibilização aos efeitos da droga e as propriedades recompensadoras (EVERITT et al., 2004; BARDO et al., 2000; BADIANI et al., 2004). A sensibilização comportamental concentra-se principalmente na progressão temporal da atividade locomotora e psicomotora induzida pela cocaína, sendo uma ferramenta eficaz para estudar o desenvolvimento de neuroadaptações ao longo do tempo (ROBINSON; BERRIDGE, 2000). Em contraste, o CPP fornece informações sobre os efeitos recompensadores duradouros da cocaína, muitas vezes avaliando respostas condicionadas ao longo de períodos mais longos (CUNNINGHAM et al., 2006; TZSCHENTKE et al., 2007).

Nesse contexto, o termo “sensibilização” indica o aumento progressivo da eficácia de um determinado fármaco ou droga após sua administração repetida. Pode ser gerado especialmente pelos psicoestimulantes, como anfetamina e cocaína (STEWART; BADIANI, 1993). Robinson e Berridge (1993) propuseram a teoria da sensibilização, sugerindo que a exposição repetida a drogas de abuso poderiam levar a mudanças duradouras no sistema de recompensa do cérebro. Essas neuroadaptações causadas pela exposição a drogas resultam em hipersensibilidade ou sensibilização dos circuitos cerebrais envolvidos.

A administração aguda de cocaína em camundongos leva a um aumento da atividade locomotora, que pode ser comparada à euforia induzida por psicoestimulantes em humanos (WISE; BOZARTH, 1987). A administração repetida da droga resulta em uma resposta comportamental intensificada, caracterizada por um início mais rápido da estimulação comportamental e da atividade locomotora (BOROWSKY; KUHN, 1991).

Neste estudo, investigamos os efeitos do FK506 na hiperlocomoção induzida por cocaína durante a sensibilização. Nossos achados demonstram que nos machos, o fármaco reverteu efetivamente a hiperlocomoção induzida pela cocaína, a partir do 4º dia de sensibilização. Esses resultados sugerem fortemente o envolvimento da calcineurina nas mudanças comportamentais associadas à sensibilização à cocaína.

Esse resultado corrobora com estudos anteriores que destacam o papel da calcineurina na sensibilização induzida por psicoestimulantes ou drogas de abuso. Tsukamoto et al. (2001) relataram que o FK506 atenuou a sensibilização locomotora induzida por anfetaminas. Da mesma forma, Addy et al. (2007) demonstraram a atenuação da sensibilização locomotora mediada pela nicotina através do uso de dois inibidores da calcineurina, ciclosporina e FK506, apoiando ainda mais a ligação entre a inibição da calcineurina e os efeitos comportamentais.

Addy et al. (2008) também apresentaram evidências de que a via da calcineurina modula a sensibilização locomotora induzida por cocaína. Porém, os mecanismos pelos quais o inibidor da calcineurina modula a sensibilização induzida por cocaína ainda não estão completamente elucidados.

Entretanto, o mesmo resultado não foi encontrado nas fêmeas, onde não foi capaz de inibir a hiperlocomoção em fêmeas. Uma vez que existe uma grande variabilidade na resposta inicial à cocaína, é esperado que sejam encontradas diferenças individuais em camundongos machos e fêmeas na resposta locomotora

(YAMAMOTO, 2014). Mandt et al. (2009) demonstrou que as fêmeas são mais sensíveis à cocaína, em que a dose de 5 mg/kg induziu ativação locomotora semelhante à de 10 mg/kg em machos. A sensibilidade diferencial de mulheres e homens a psicoestimulantes é um fenômeno complexo e com evidências sugerindo que as diferenças hormonais desempenham um papel fundamental na formação dessas disparidades. Já foi demonstrado que variações específicas nos níveis hormonais, especialmente o estrogênio e a progesterona nas mulheres e a testosterona nos homens, estão intimamente ligadas à modulação dos sistemas de neurotransmissores que são alvos dos psicoestimulantes (TORRES, 2020; BARTH et al., 2015). A interação entre esses hormônios e a sensibilidade aos psicoestimulantes é ainda mais complexa devido às flutuações nos níveis hormonais ao longo do ciclo menstrual nas mulheres, acrescentando uma dimensão dinâmica às diferenças de gênero na resposta às drogas (EVANS, 2007; LILE et al., 2007).

Em seguida, investigamos o papel do inibidor da calcineurina no CPP, um método amplamente utilizado para avaliar as propriedades motivacionais e recompensadoras de drogas. O CPP é utilizado para avaliar diferentes aspectos do comportamento aditivo, incluindo tolerância e sensibilização aos efeitos reforçadores de substâncias psicoativas (TZSCHENTKE, 1998). Durante o procedimento de CPP, os animais passam por várias sessões de condicionamento onde recebem cocaína ou solução salina em ambientes distintos. Supõe-se que as propriedades de reforço da droga se tornem associadas a estímulos ambientais específicos, levando a uma preferência pelo lado pareado com a droga. Assim, um animal que passa significativamente mais tempo no ambiente associado à droga recompensadora indica o desenvolvimento de uma preferência de lugar condicionada (SPYRAKI et al., 1982; HOFFMAN, 1989). Descobertas recentes em humanos mostraram que eles também exibem uma preferência por um quarto pareado com anfetamina em vez de um quarto não pareado, sugerindo paralelos entre as respostas animal e humana a ambientes associados a drogas (CHILDS, WIT, 2009).

Corroborando com estudos anteriores (LETT, 2009), nós demonstramos que a cocaína induziu a preferência pelo compartimento pareado com a droga no paradigma do CPP tanto em machos quanto em fêmeas. Entretanto, o FK506 não reverteu o comportamento. As evidências sobre a interação entre a calcineurina e o condicionamento por psicoestimulantes permanecem inconclusivas. Gerdjikov et al (2005) demonstrou que a calcineurina exerce um efeito regulatório negativo na

consolidação do CPP induzido por anfetaminas. Em contraste, Biala et al (2005) mostraram que a inibição da calcineurina não interfere na preferência condicionada ao local para anfetamina ou morfina. Portanto, a aplicabilidade da inibição da calcineurina na reversão do condicionamento induzido pela cocaína requer investigações adicionais.

Parte da investigação da neurobiologia da adicção se concentra no papel das citocinas. Existe um crescente corpo de evidências de que as citocinas inflamatórias desempenham um papel fundamental na integridade neuronal e podem exercer efeitos nos neurocircuitos e neurotransmissores no cérebro, afetando diretamente o comportamento (HAROON et al., 2012). A neuroinflamação pode ser descrita como uma resposta inflamatória no SNC que é mediada por várias citocinas, espécies reativas de oxigênio, quimiocinas e outros marcadores inflamatórios. Por sua vez, o sistema imunológico central é composto principalmente por micróglia, astrócitos e oligodendrócitos, que liberam as citocinas e outros mediadores inflamatórios (SCHWARZ; BILDO, 2013; DISABATO et al., 2016). Já foi documentado que a administração aguda e crônica de drogas de abuso resulta no desequilíbrio da produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias dentro do SNC (NORTHCUTT et al., 2015; HUTCHINSON et al., 2012). Além disso, é estabelecido que a cocaína e outros psicoestimulantes induzem o aumento da sinalização imunológica no cérebro (COOLER; HUTCHINSON, 2012). Essas substâncias estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , ao mesmo tempo que suprimem a produção de citocinas anti-inflamatórias, como interleucina-10 (IL-10) (FELGER; TREADWAY, 2017). Tal desregulação na sinalização de citocinas contribui para a neuroinflamação e amplifica os circuitos de recompensa e motivação associados à adicção. No entanto, o mecanismo específico que desencadeia essa sinalização imunológica central induzida pela cocaína permanece desconhecido (NORTHCUTT et al., 2015; SCHWARZ; BILDO, 2013).

Neste trabalho, foram investigadas as citocinas pró-inflamatórias IL-6 e o TNF- α , a anti-inflamatória IL-10, e a CXCL1, que medeia a comunicação entre neurônio e micróglia, no hipocampo e estriado. É importante enfatizar que os papéis dessas citocinas, apesar de serem bem estabelecidos em condições inflamatórias diversas, não são conhecidos em contexto de adicção em cocaína. Já foi demonstrado que as células imunológicas de usuários de cocaína podem responder de maneira diferente

a estímulos inflamatórios (ZAPARTE et al., 2005), o que poderia contribuir não só para o transtorno por uso de substâncias, mas também para outras comorbidades.

A IL-10 é uma citocina com propriedades anti-inflamatórias, sendo, por isso, investigada como uma influência na adicção por uso de substâncias (KWILASZ et al., 2015). Por exemplo, em modelo de adicção em opióides, a expressão de IL-10 no núcleo acumbens reduz a autoadministração de remifentanil (LACAGNINA et al., 2017). Em pacientes, já foi demonstrado que os níveis séricos são reduzidos em usuários de cocaína em comparação a não usuários (MOREIRA et al., 2016). Por outro lado, foi observado que os níveis séricos de IL-10 estavam elevados em mulheres usuárias de cocaína na primeira semana de tratamento do transtorno por uso dessa substância. Com a progressão do tratamento, os níveis dessa citocina foram reduzidos (LEVANDOWSKI, et al., 2016). No presente estudo, a cocaína elevou os níveis de IL-10 no estriado, mas não no hipocampo. Além disso, o FK reduziu esses valores apenas no hipocampo. Essa discrepância de dados pode estar relacionada à cinética de produção de mediadores inflamatórios em cada região do SNC. Além disso, o microambiente de cada região, que possui diferentes neurotransmissores e fatores neurotróficos, poderia influenciar a produção diferencial dessa citocina. Por fim, somente esses dados nos permitem inferir o papel de IL-10 no efeito do FK no comportamento de sensibilização comportamental induzido por cocaína.

A IL-6, uma citocina que possui propriedades tanto pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias, também é investigada em modelos de adicção. A IL-6 aumenta a sensibilidade dos animais aos efeitos estimulantes de anfetamina (ZALCMAN t al., 1996). Usuários de cocaína possuem níveis mais elevados de IL-6, dependendo do contexto (MOREIRA et al., 2016; LEVANDOWSKI, et al., 2016). Também foi demonstrado que doses elevadas de cocaína (45 mg/kg) aumentam IL-6 no hipocampo de camundongos (Nhu-Mai et al. 2018; MAI et al., 2018). No presente trabalho, não houve diferença nos níveis de IL-6 nas regiões avaliadas, possivelmente devido à menor dose usada ou ao momento de avaliação.

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória, e que pode desempenhar um papel complexo na dependência de cocaína. Gonçalves et al. (2017) mostraram aumento na expressão de TNF- α no estriado e hipocampo após sete dias de autoadministração de metanfetamina. Já Lewitus et al. (2016) demonstraram que administração repetida de cocaína ativa a microglia do estriado e induz a produção de TNF- α , sugerindo, assim, que a sinalização de citocinas da microglia pode regular tanto a indução quanto

a expressão de comportamentos induzidos por drogas de abuso. No presente estudo, o FK reduziu o TNF- α no hipocampo. Assim, é possível sugerir que um dos mecanismos promovidos pelo FK para a redução da sensibilização comportamental induzida pela cocaína seja a redução dos níveis de TNF- α . Apesar disso, mais estudos são necessários para se estabelecer essa relação causal.

Outra quimiocina que pode estar envolvida no processo na adicção é a CXCL1. Saika et al. (2018) sugerem que CXCL1 como um regulador chave na recompensa induzida pela cocaína. Montesinos et al. (2020) também demonstraram que a cocaína induz alterações na CXCL1, e que estão associadas às concentrações de IL1 β , ativando assim, vias inflamatórias convergentes no hipocampo. Apesar disso, no presente trabalho, não houve diferença desse mediador inflamatório no momento avaliado.

Uma revisão sistemática sobre a regulação neuroimune na adicção (BRAVO et al, 2023) demonstrou que há muitas evidências confirmando o papel dos psicoestimulantes na produção e liberação de citocinas. Contudo, os resultados dos estudos ainda variam uma vez que os níveis de citocinas e suas variações são dependentes da região, dose e duração do tratamento do psicoestimulante que foi utilizado. São necessários mais estudos para esclarecer o curso temporal da desregulação das citocinas ao longo da transição do uso episódico para o uso crônico de drogas de abuso.

Outras alterações causadas pelo transtorno por uso de substâncias são nos fatores neurotróficos, responsáveis por regular o desenvolvimento neuronal. A plasticidade comportamental e neural estão entre os aspectos mais importantes do funcionamento do cérebro que são modulados por mecanismos imunológicos. Assim, as citocinas desempenham um papel importante na plasticidade sináptica, impactando diferentes respostas comportamentais (YIRMIYA et al., 2011; SALVADOR et al., 2021). Fatores neurotróficos como GDNF, BDNF e NGF, têm recebido considerável atenção devido aos seus papéis na neuroplasticidade e sobrevivência neuronal.

Entre muitos tipos de adaptações induzidas por drogas, foi proposto que alterações no BDNF e suas vias de sinalização alteram a função dos neurônios dentro do circuito VTA-NAc e outras regiões de recompensa para modular a motivação no uso de drogas de abuso (BOLANÇOS, et al., 2004). O BDNF está envolvido na plasticidade sináptica e é conhecido por modular as mudanças neuroplásticas induzidas pela cocaína no circuito de recompensa do cérebro. Vários estudos

demonstraram seu aumento após administração de cocaína no NAc e VTA, e também em abstinência prolongada (GRAHAM et al., 2007; ZHANG et al., 2002; GRIMM et al., 2003).

O GDNF é um fator de crescimento conhecido por suas propriedades neuroprotetoras. Além disso, GDNF também é um potente fator neurotrófico para neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo, mas sua função no desenvolvimento e manutenção de neurônios dopaminérgicos in vivo ainda não foi elucidada (JAIN et al., 2006). Carnicella et al. (2008) mostraram uma diminuição no consumo de etanol mediada por GDNF, sugerindo que este fator esteja envolvido no aspecto da recaída. Também foi demonstrado que a administração crônica de morfina e cocaína regula a sinalização do GDNF no circuito VTA-NAc (MESSER et al., 2000).

Embora menos estudado que o GDNF e o BDNF, o NGF é outro fator neurotrófico que parece desempenhar um papel na neuroplasticidade induzida por drogas de abuso de cocaína e nas respostas neuroinflamatórias. Alguns estudos relataram níveis elevados de NGF em resposta à exposição crônica a drogas de abuso (ROSA et al., 2021; CECI et al., 2021). Apesar disso, pouco se sabe sobre suas funções no contexto de transtorno por uso de substâncias.

Apesar dos potenciais papéis dos fatores neurotróficos nas alterações induzidas por cocaína, no presente estudo não observamos diferenças em seus níveis nas regiões cerebrais analisadas. De forma semelhante ao que ocorreu com as citocinas, é possível que o momento de avaliação não tenha sido adequado. Porém, ainda é possível que essas neurotrofinas modulem as alterações mediadas pela cocaína ou o efeito do FK, uma vez que fatores como alteração de expressão de receptores ou de vias de sinalização podem ter ocorrido.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, constatamos que o tratamento com o inibidor da calcineurina é capaz de diminuir a locomoção induzida pela cocaína. Esses resultados contribuem para o entendimento do papel de um imunossupressor em modelo animal de transtorno por uso de cocaína. Embora nos permitam sugerir possíveis implicações terapêuticas dos inibidores de calcineurina no contexto da adicção, é importante enfatizar que os resultados observados são preliminares. A interação entre as vias de sinalização da calcineurina, os processos neurais subjacentes à adicção e as respostas inflamatórias requerem uma investigação mais aprofundada.

REFERÊNCIAS

Addy NA, et al. Administration of the calcineurin inhibitor cyclosporine modulates cocaine-induced locomotor activity in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2008 Sep;200(1):129-39. doi: 10.1007/s00213-008-1189-5.

Addy, N. A. et al. Role of calcineurin in nicotine-mediated locomotor sensitization. *J Neurosci*. 2007. Aug 8;27(32):8571-80. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2601-07.

American Psychiatric Association. *DSM-5: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais*. Artmed Editora; 2014.

Aksoy S, Klener J, Weinshilboum RM (1993). Catechol O-methyltransferase pharmacogenetics: photoaffinity labelling and western blot analysis of human liver samples. *Pharmacogenetics* 3: 116–122.

Badiani A, Robinson TE. Drug-induced neurobehavioral plasticity: the role of environmental context. *Behav Pharmacol*. 2004 Sep;15(5-6):327-39. doi: 10.1097/00008877-200409000-00004.

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. doi: 10.1007/s002130000569.

Barth C, et al. Sex hormones affect neurotransmitters and shape the adult female brain during hormonal transition periods. *Front Neurosci*. 2015 Feb 20;9:37. doi: 10.3389/fnins.2015.00037.

Beaulieu JM, Gainetdinov RR (2011) The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* 63(1):182-217.

Bechara AR. et al. Role of prefrontal cortex projections to the nucleus accumbens core in mediating the effects of ceftriaxone on cue-induced cocaine seeking. *Addict Biol*. 2021 Mar;26(2):e12928.

Beth, B.; Cynthia, M. Chronic cocaine administration sensitizes behavioral but not neuroendocrine responses. 1991, 543(2), 0–306.

Biala G, et al. The reinforcing effects of chronic D-amphetamine and morphine are impaired in a line of memory-deficient mice overexpressing calcineurin. *Eur J Neurosci*. 2005 Jun;21(11):3089-96. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04132.x.

Biondich, A. S., Joslin, J.D. Coca: High Altitude Remedy of the Ancient Incas. *Wilderness Environ Med.* 2015 Dec;26(4):567-71. doi: 10.1016/j.wem.2015.07.006.

Bjerk, D. Mandatory minimum policy reform and the sentencing of crack cocaine defendants: an analysis of the Fair Sentencing Act. *Journal of Empirical Legal Studies.* 2017 Jun;14(2):370-96.

Blednov YA, et al. Neuroimmune regulation of alcohol consumption: behavioral validation of genes obtained from genomic studies. *Addict Biol.* 2012 Jan;17(1):108-20. doi: 10.1111/j.1369-1600.2010.00284.x.

Bolaños, C.; Nestler, E. Neurotrophic mechanisms in drug addiction. *Neuromolecular Med.* 2004;5(1):69-83. doi: 10.1385/NMM:5:1:069.

Bravo J, et al. The impact of psychostimulants on central and peripheral neuro-immune regulation: a scoping review of cytokine profiles and their implications for addiction. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2023 May 26;17:1109611.

Burechailo, L. et al. Behavioral sensitization to cocaine, but not cocaine-conditioned behavior, is associated with increased dopamine occupation of its receptors in the nucleus accumbens. 1996. *Behavioral Neuroscience*, 110(6), 1388–1396.

Burkovetskaya, et al. Cocaine self-administration differentially activates microglia in the mouse brain. *Neurosci Lett.* 2020 May 29;728:134951. doi: 10.1016/j.neulet.2020.134951.

Camí J, Farré M. Drug addiction. *N Engl J Med.* 2003 Sep 4;349(10):975-86. doi: 10.1056/NEJMra023160.

Caprioli D, et al. Effect of Novel Allosteric Modulators of Metabotropic Glutamate Receptors on Drug Self-administration and Relapse: A Review of Preclinical Studies and Their Clinical Implications. *Biol Psychiatry.* 2018 Aug 1;84(3):180-192.

Carnicella, S. et al. GDNF is a fast-acting potent inhibitor of alcohol consumption and relapse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jun 10;105(23):8114-9. doi: 10.1073/pnas.0711755105.

Carroll, F. et al., Cocaine receptor: biochemical characterization and structure-activity relationships of cocaine analogues at the dopamine transporter. *J Med Chem.* 1992 Mar 20;35(6):969-81. doi: 10.1021/jm00084a001.

Ceci, F. M. et al. Nerve Growth Factor in Alcohol Use Disorders. *Curr Neuropharmacol.* 2021;19(1):45-60. doi: 10.2174/1570159X18666200429003239.

Chambers, S. A. et al. The DARK Side of Total Synthesis: Strategies and Tactics in Psychoactive Drug Production. *ACS Chem Neurosci*. 2018 Oct 17;9(10):2307-2330.
Chan B., Kondo K., Freeman M., Ayers C., Montgomery J., Kansagara D. Farmacoterapia para Transtorno por Uso de Cocaína – Uma Revisão Sistemática e Meta-análise. *J. Gen. Estagiário. Med.* 2019; 34 :2858–2873. doi: 10.1007/s11606-019-05074-8.

Childs, E.; Wit, H. Amphetamine-induced place preference in humans. *Biol Psychiatry*. 2009 May 15;65(10):900-4. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.11.016.

Coller JK, Hutchinson MR. Implications of central immune signaling caused by drugs of abuse: mechanisms, mediators and new therapeutic approaches for prediction and treatment of drug dependence. *Pharmacol Ther*. 2012 May;134(2):219-45. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.01.008.

Connery HS. Medication-assisted treatment of opioid use disorder: review of the evidence and future directions. *Harv Rev Psychiatry*. 2015 Mar-Apr;23(2):63-75.

Cunningham CL, Gremel CM, Groblewski PA. Drug-induced conditioned place preference and aversion in mice. *Nat Protoc*. 2006;1(4):1662-70. doi: 10.1038/nprot.2006.279.

DiSabato DJ, et al. Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem*. 2016 Oct;139 Suppl 2(Suppl 2):136-153. doi: 10.1111/jnc.13607. Epub 2016 May 4. PMID: 26990767; PMCID: PMC5025335.

Drake, L.R. Scott, P.J. DARK Classics in Chemical Neuroscience: Cocaine. *ACS Chem Neurosci*. 2018 Oct 17;9(10):2358-2372. doi: 10.1021/acschemneuro.8b00117.

Duailibi MS, et al. N-acetylcysteine in the treatment of craving in substance use disorders: Systematic review and meta-analysis. *Am J Addict*. 2017 Oct;26(7):660-666.

Evans SM. The role of estradiol and progesterone in modulating the subjective effects of stimulants in humans. *Exp Clin Psychopharmacol*. 2007 Oct;15(5):418-26. doi: 10.1037/1064-1297.15.5.418.

Everitt, B. J. et al. Addictive behavior in experimental animals: prospects for translation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2018 Mar 19;373(1742):20170027. doi: 10.1098/rstb.2017.0027.

Everitt, B., Robbins, T. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 8, 1481–1489 (2005).

Felger JC, Miller AH. Cytokine effects on the basal ganglia and dopamine function: the subcortical source of inflammatory malaise. *Front Neuroendocrinol.* 2012 Aug;33(3):315-27. doi: 10.1016/j.yfrne.2012.09.003.

Felger JC, Treadway MT. Inflammation Effects on Motivation and Motor Activity: Role of Dopamine. *Neuropsychopharmacology.* 2017 Jan;42(1):216-241. doi: 10.1038/npp.2016.143.

Gallagher SC, Gao ZH, Li S, Dyer RB, Trehella J, Klee CB. There is communication between all four Ca(2+)-bindings sites of calcineurin B. *Biochemistry.* 2001 Oct 9;40(40):12094-102.

Garbutt JC, et al. Efficacy and tolerability of long-acting injectable naltrexone for alcohol dependence: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2005 Apr 6;293(13):1617-25. doi: 10.1001/jama.293.13.1617.

Gerdjikov, TV, Beninger, RJ. Differential effects of calcineurin inhibition and protein kinase A activation on nucleus accumbens amphetamine-produced conditioned place preference in rats. *Eur J Neurosci.* 2005 Aug;22(3):697-705. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04256.x.

Goncalves, J. et al. (2017). Extended-access methamphetamine self-administration elicits neuroinflammatory response along with blood-brain barrier breakdown. *Brain Behav. Immun.* 62, 306–317. doi: 10.1016/j.bbi.2017.02.017

Gonzales D, et al. Varenicline, an alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, vs sustained-release bupropion and placebo for smoking cessation: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2006 Jul 5;296(1):47-55.

Graham, D. et al. Dynamic BDNF activity in nucleus accumbens with cocaine use increases self-administration and relapse. 2007. *Nat Neurosci* 10, 1029–1037. <https://doi.org/10.1038/nn1929>

Grimm, J. W. Time-dependent increases in brain-derived neurotrophic factor protein levels within the mesolimbic dopamine system after withdrawal from cocaine: implications for incubation of cocaine craving. *J Neurosci.* 2003 Feb 1;23(3):742-7. doi: 10.1523/Jneurosci.23-03-00742.2003.

Haroon E, Raison CL, Miller AH. Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacology.* 2012 Jan;37(1):137-62. doi: 10.1038/npp.2011.205.

Hoffman D. C. The use of place conditioning in studying the neuropharmacology of drug reinforcement. *Brain Res Bull.* 1989;23:373–387.

Hossain MK, et al. Immunotherapies for the Treatment of Drug Addiction. *Vaccines (Basel).* 2022 Oct 22;10(11):1778.

Hossain MK, et al. Immune to addiction: how immunotherapies can be used to combat methamphetamine addiction. *Expert Rev Vaccines.* 2021 Jun;20(6):707-715.

Hu, M., Becker, J. B. Effects of sex and estrogen on behavioral sensitization to cocaine in rats. *J Neurosci.* 2003 Jan 15;23(2):693-9.

Hutchinson MR, et al. Opioid activation of toll-like receptor 4 contributes to drug reinforcement. *J Neurosci.* 2012 Aug 15;32(33):11187-200. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0684-12.2012.

Jain, S. et al. Golden JP, Wozniak D, Pehek E, Johnson EM Jr, Milbrandt J. RET is dispensable for maintenance of midbrain dopaminergic neurons in adult mice. *J Neurosci.* 2006 Oct 25;26(43):11230-8. doi: 10.1523/jneurosci.1876-06.2006.

Jensen KL, Jensen SB, Madsen KL. A mechanistic overview of approaches for the treatment of psychostimulant dependence. *Front Pharmacol.* 2022 Sep 8;13:854176.

Kampman KM, Pettinati H., Lynch KG, Dackis C., Sparkman T., Weigley C., O'Brien CP Um ensaio piloto de topiramato para o tratamento da dependência de cocaína. *Depende de álcool de drogas.* 2004; 75 :233–240.

Kampman KM. The treatment of cocaine use disorder. *Sci Adv.* 2019 Oct 16;5(10):eaax1532. doi: 10.1126/sciadv.aax1532. PMID: 31663022; PMCID: PMC6795516.

Karch, S. B. Cocaine: history, use, abuse. *J R Soc Med.* 1999 Aug;92(8):393-7. doi: 10.1177/014107689909200803.

Khoomsab, K. et al. Using Circular Open Field Thigmotaxis to Test Fermented Plant Extracts as Rat Repellents. 2019. *OnLine Journal of Biological Sciences.* 19. 98-103. 10.3844/ojbsci.2019.98.103.

Koob, G. F., Volkow, N. D. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *Lancet Psychiatry* 3(8):760-773, 2016.

Koob, G. F.; Kenneth, L.; Mason, B. Development of pharmacotherapies for drug addiction: a Rosetta stone approach. *Nat Rev Drug Discov.* 2009 Jun;8(6):500-15. doi: 10.1038/nrd2828.

Krupitsky E. et al. Injectable extended-release naltrexone for opioid dependence: a double-blind, placebo-controlled, multicentre randomised trial. *Lancet*. 2011 Apr 30;377(9776):1506-13.

Kwilasz AJ, Grace PM, Serbedzija P, Maier SF, Watkins LR. The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases. *Neuropharmacology*. 2015 Sep;96(Pt A):55-69. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.10.020.

Lacagnina MJ, et al. Opioid Self-Administration is Attenuated by Early-Life Experience and Gene Therapy for Anti-Inflammatory IL-10 in the Nucleus Accumbens of Male Rats. *Neuropsychopharmacology*. 2017 Oct;42(11):2128-2140. doi: 10.1038/npp.2017.82.

Lacagnina, M. J. et al. Opioid Self-Administration is Attenuated by Early-Life Experience and Gene Therapy for Anti-Inflammatory IL-10 in the Nucleus Accumbens of Male Rats. *Neuropsychopharmacology*. 2017 Oct;42(11):2128-2140. doi: 10.1038/npp.2017.82.

Lanz J, Biniiaz-Harris N, Kuvaldina M, Jain S, Lewis K, Fallon BA. Disulfiram: Mechanisms, Applications, and Challenges. *Antibiotics (Basel)*. 2023 Mar 6;12(3):524.

Lassi DLS, et al. Pharmacological Treatments for Cocaine Craving: What Is the Way Forward? A Systematic Review. *Brain Sci*. 2022 Nov 14;12(11):1546. doi: 10.3390/brainsci12111546.

Lassi DLS, Malbergier A, Negrão AB, Florio L, De Aquino JP, Castaldelli-Maia JM. Pharmacological Treatments for Cocaine Craving: What Is the Way Forward? A Systematic Review. *Brain Sci*. 2022 Nov 14;12(11):1546.

Leal G, Bramham CR, Duarte CB. BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity. *Vitam Horm*. 2017;104:153-195. doi: 10.1016/bs.vh.2016.10.004.

Lett, B. T. Repeated exposures intensify rather than diminish the rewarding effects of amphetamine, morphine, and cocaine. *Psychopharmacology (Berl)* 1989;98:357–362.

Levandowski ML, et al. Distinct behavioral and immunoendocrine parameters during crack cocaine abstinence in women reporting childhood abuse and neglect. *Drug Alcohol Depend*. 2016 Oct 1;167:140-8. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2016.08.010.

Lewitus GM, Konefal SC, Greenhalgh AD, Pribiag H, Augereau K, Stellwagen D. Microglial TNF- α Suppresses Cocaine-Induced Plasticity and Behavioral Sensitization. *Neuron*. 2016 May 4;90(3):483-91. doi: 10.1016/j.neuron.2016.03.030.

Li X, Markou A. Metabotropic Glutamate Receptor 7 (mGluR7) as a Target for the Treatment of Psychostimulant Dependence. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2015;14(6):738-44.

Lile JA, et al. Evaluation of estradiol administration on the discriminative-stimulus and subject-rated effects of d-amphetamine in healthy pre-menopausal women. *Pharmacol Biochem Behav*. 2007 Jun-Jul;87(2):258-66. doi: 10.1016/j.pbb.2007.04.022.

Lohr K. M., et al. VMAT2: A dynamic regulator of brain monoaminergic neuronal function interacting with drugs of abuse. *Ann N Y Acad Sci* 1459(1):34-50, 2017.

Lüscher C, Malenka RC. Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron*. 2011 Feb 24;69(4):650-63. doi: 10.1016/j.neuron.2011.01.017.

Mai HN, et al. IL-6 knockout mice are protected from cocaine-induced kindling behaviors; possible involvement of JAK2/STAT3 and PACAP signalings. *Food Chem Toxicol*. 2018 Jun;116(Pt B):249-263. doi: 10.1016/j.fct.2018.04.031.

Maisel NC, et al. Meta-analysis of naltrexone and acamprosate for treating alcohol use disorders: when are these medications most helpful? *Addiction*. 2013 Feb;108(2):275-93. doi: 10.1111/j.1360-0443.2012.04054.x

Mattick RP, Breen C, Kimber J, Davoli M. Methadone maintenance therapy versus no opioid replacement therapy for opioid dependence. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009 Jul 8;2009(3).

Messer, C. J. et al. Role for GDNF in biochemical and behavioral adaptations to drugs of abuse. *Neuron*. 2000 Apr;26(1):247-57. doi: 10.1016/s0896-6273(00)81154-x.

Montesinos J, et al. Cocaine-induced changes in CX3CL1 and inflammatory signaling pathways in the hippocampus: Association with IL1 β . *Neuropharmacology*. 2020 Jan 1;162:107840. doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.107840.

Montoya ID, et al. Randomized trial of buprenorphine for treatment of concurrent opiate and cocaine dependence. *Clin Pharmacol Ther*. 2004 Jan;75(1):34-48.

Moreira FP, et al. Cocaine abuse and effects in the serum levels of cytokines IL-6 and IL-10. *Drug Alcohol Depend*. 2016 Jan 1;158:181-5. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2015.11.024.

Nhu, M. et al. IL-6 knockout mice are protected from cocaine-induced kindling behaviors; possible involvement of JAK2/STAT3 and PACAP signalings. *Food Chem Toxicol*. 2018 Jun;116(Pt B):249-263. doi: 10.1016/j.fct.2018.04.031.

Northcutt AL, et al. DAT isn't all that: cocaine reward and reinforcement require Toll-like receptor 4 signaling. *Mol Psychiatry*. 2015 Dec;20(12):1525-37. doi: 10.1038/mp.2014.177. Epub 2015 Feb 3.

Northcutt AL, et al. DAT isn't all that: cocaine reward and reinforcement require Toll-like receptor 4 signaling. *Mol Psychiatry*. 2015 Dec;20(12):1525-37. doi: 10.1038/mp.2014.177.

Parry, R., June, C. Calcium-independent calcineurin regulation. *Nat Immunol* 4, 821–823, 2003. <https://doi.org/10.1038/ni0903-821>.

Pierce, R.; Kumaresan, V. The mesolimbic dopamine system: The final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2006. 30. 215-38. 10.1016/j.neubiorev.2005.04.016.

Quintero GC. Role of nucleus accumbens glutamatergic plasticity in drug addiction. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2013;9:1499-512.

Rana, A., et al. A Gravity-Fed Transcardial Perfusion Method for Histologic Analysis of the Mouse Central Nervous System. 2022. *J. Vis. Exp.* (179), e63386, doi:10.3791/63386

Robinson TE, Berridge KC. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev*. 1993 Sep-Dec;18(3):247-91.

Robinson TE, Berridge KC. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction*. 2000 Aug;95 Suppl 2:S91-117. doi: 10.1080/09652140050111681.

Robinson, S. M., Adinoff, B. The Classification of Substance Use Disorders: Historical, Contextual, and Conceptual Considerations. *Behav Sci (Basel)*. 2016 Aug 18;6(3):18. doi: 10.3390/bs6030018.

Robinson, T. E; Berridge, K. Review. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2008 Oct 12;363(1507):3137-46

Rogge, G. A., Wood, M. A. The role of histone acetylation in cocaine-induced neural plasticity and behavior. *Neuropsychopharmacology*. 2013 Jan;38(1):94-110. doi: 10.1038/npp.2012.154.

Roque Bravo R, et al. Cocaine: An Updated Overview on Chemistry, Detection, Biokinetics, and Pharmacotoxicological Aspects including Abuse Pattern. *Toxins (Basel)*. 2022 Apr 13;14(4):278

Rosa, M. et al. Role of cytokine and neurotrophic factors in nicotine addiction in the conditioned place preference paradigm. *Neurosci Lett.* 2021 Nov 1;764:136235. doi: 10.1016/j.neulet.2021.136235.

Ryan, S. A. Cocaine Use in Adolescents and Young Adults. *Pediatr Clin North Am.* 2019 Dec;66(6):1135-1147. doi: 10.1016/j.pcl.2019.08.014.

Saika F, et al. Chemokine CXCL1 is responsible for cocaine-induced reward in mice. *Neuropsychopharmacol Rep.* 2018 Sep;38(3):145-148. doi: 10.1002/npr2.12018.

Salvador, A.F. et al. Neuromodulation by the immune system: a focus on cytokines. *Nat Rev Immunol* 21, 526–541 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00508-z>

Saraf J, et al. A Friend or Foe: Calcineurin across the Gamut of Neurological Disorders. *ACS Cent Sci.* 2018 Jul 25;4(7):805-819.

Scheyer AF, et al. AMPA Receptor Plasticity in Accumbens Core Contributes to Incubation of Methamphetamine Craving. *Biol Psychiatry.* 2016 Nov 1;80(9):661-670.

Schwartz EKC, et al. Cocaine Use Disorder (CUD): Current Clinical Perspectives. *Subst Abuse Rehabil.* 2022 Sep 3;13:25-46. doi: 10.2147/SAR.S337338.

Schwarz JM, Bilbo SD. Adolescent morphine exposure affects long-term microglial function and later-life relapse liability in a model of addiction. *J Neurosci.* 2013 Jan 16;33(3):961-71. doi: 10.1523/Jneurosci.2516-12.2013.

Singh M, et al. Topiramate for cocaine dependence: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Addiction.* 2016 Aug;111(8):1337-46.

Sinha, R. Chronic stress, drug use, and vulnerability to addiction. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Oct;1141:105-30. doi: 10.1196/annals.1441.030.

Speranza, L. et al. Dopamine: The Neuromodulator of Long-Term Synaptic Plasticity, Reward and Movement Control. *Cells* 2021, 10, 735. <https://doi.org/10.3390/cells10040735>

Spyraki, C.; Fibiger, H. C., Phillips, A. G. Dopaminergic substrates of amphetamine-induced place preference conditioning. *Brain Research*, 253(1-2), 185-193, 1982.

Stewart, J.; Badiani, A. Tolerance and sensitization to the behavioral effects of drugs. *Behavioral pharmacology*, 4(4), 289-312, 1993.

Suh J. et al. The status of disulfiram: a half of a century later. *J Clin Psycho pharmacol.* 2006 Jun;26(3):290-302. doi: 10.1097/01.jcp.0000222512.25649.08.

Taylor, S. B. et al. The neurocircuitry of illicit psychostimulant addiction: acute and chronic effects in humans. *Subst Abuse Rehabil.* 2013 Feb 8;4:29-43.

Tirelli E. et al. Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. *Neurosci Biobehav Rev.* 2003 Jan-Mar;27(1-2):163-78. doi: 10.1016/s0149-7634(03)00018-6.

Torres OV. Sex Differences in Psychostimulant Abuse: Implications for Estrogen Receptors and Histone Deacetylases. *Genes (Basel).* 2022 May 17;13(5):892. doi: 10.3390/genes13050892.

Tsukamoto, T. et al. The effects of FK506, a specific calcineurin inhibitor, on methamphetamine-induced behavioral change and its sensitization in rats. *Psychopharmacology* 158, 107–113, 2001.

Tsukamoto, T. et al. The effects of FK506, a specific calcineurin inhibitor, on methamphetamine-induced behavioral change and its sensitization in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2001 Nov;158(2):107-13. doi: 10.1007/s002130100870.

Tucker, E.; Creton R. Modulation of calcineurin signaling during development. *Dev Neurobiol.* 2022 Sep;82(6):505-516. doi: 10.1002/dneu.22895.

Tzschentke, T. M. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog Neurobiol.* 1998;56:613–672

UNODC, World Drug Report 2022 (United Nations publication, 2022).

Vanderschuren LJ, Everitt BJ. Drug seeking becomes compulsive after prolonged cocaine self-administration. *Science.* 2004 Aug 13;305(5686):1017-9. doi: 10.1126/science.1098975.

Volkow ND, et al. (2019) Dopamine in drug abuse and addiction: results from imaging studies and treatment implications. *Mol Psychiatry* 24(11):1649-1663

Volkow, N. D. Drugs, brains, and behavior: The science of addiction. Retrieved on March. 2010;23(2011):255-169.

Wadgave U, Nagesh L. Nicotine Replacement Therapy: An Overview. *Int J Health Sci (Qassim).* 2016 Jul;10(3):425-35.

Wise, R. A.; Bozarth, M. A. A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychological review*, 94(4), 469, 1987.

Xu, H., Yang, F. The interplay of dopamine metabolism abnormalities and mitochondrial defects in the pathogenesis of schizophrenia. *Transl Psychiatry* 12, 464 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41398-022-02233-0>

Yamamoto, D. J. Rats classified as low or high cocaine locomotor responders: a unique model involving striatal dopamine transporters that predicts cocaine addiction-like behaviors. *Neurosci Biobehav Rev.* 2013 Sep;37(8):1738-53. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.07.002.

Yirmiya R, Goshen I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun.* 2011 Feb;25(2):181-213. doi: 10.1016/j.bbi.2010.10.015.

Zalcman S, et al. Interleukin-6 increases sensitivity to the locomotor-stimulating effects of amphetamine in rats. *Brain Res.* 1999 Nov 20;847(2):276-83. doi: 10.1016/s0006-8993(99)02063-6.

Zaparte A, et al. Cocaine Use Disorder Is Associated With Changes in Th1/Th2/Th17 Cytokines and Lymphocytes Subsets. *Front Immunol.* 2019 Oct 15;10:2435. doi: 10.3389/fimmu.2019.02435..

Zhang, D. et al. The dopamine D1 receptor is a critical mediator for cocaine-induced gene expression. *J Neurochem.* 2002 Sep;82(6):1453-64. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.01089.x.

ANEXO A – APROVAÇÃO CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 261/2021

Título do projeto: Avaliação dos efeitos do inibidor da calcineurina em modelo de adicção induzido por cocaína

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Farmacologia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 21/02/2022. Validade: 21/02/2022 à 20/02/2027.

Belo Horizonte, 21/02/2022.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br