

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

EFEITOS DA DEPLEÇÃO DA MICRÓGLIA NA SENSIBILIZAÇÃO
COMPORTAMENTAL E NA PREFERÊNCIA CONDICIONADA AO
LUGAR INDUZIDAS POR COCAÍNA

MARIA CAROLINA MACHADO DA SILVA

BELO HORIZONTE, 2019

MARIA CAROLINA MACHADO DA SILVA

**EFEITOS DA DEPLEÇÃO DA MICRÓGLIA NA SENSIBILIZAÇÃO
COMPORTAMENTAL E NA PREFERÊNCIA CONDICIONADA AO
LUGAR INDUZIDAS POR COCAÍNA**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia - da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira

BELO HORIZONTE, 2019

"EFEITOS DA DEPLEÇÃO DA MICRÓGLIA NA SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL E NA PREFERÊNCIA CONDICIONADA AO LUGAR INDUZIDA POR COCAÍNA"

MARIA CAROLINA MACHADO DA SILVA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 28 de maio de 2019, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Laila da Silva Asth Fernandes

PROFA. DRA. LAILA DA SILVA ASTH FERNANDES
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Aline Silva de Miranda

PROFA. DRA. ALINE SILVA DE MIRANDA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira

PROF. DR. ANTÔNIO CARLOS PINHEIRO DE OLIVEIRA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 28 de maio de 2019

“Aprendi que todas as formas de conhecimento são transitórias e que elas só têm real valor quando utilizadas em benefício dos seres e de tudo o que existe no campo universal. Todavia de nada vale todo o conhecimento do mundo se não houver amor”.

Alcione Leite da Silva

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, por ter sido a pessoa que mais me deu apoio em toda minha vida acadêmica, e que sempre se dedicou tanto para me ajudar no que eu precisasse.

Ao meu pai, que infelizmente não está mais aqui comigo, mas foi a pessoa que mais acreditou no meu potencial e que possibilitou a realização dos meus sonhos.

Ao professor Dr. Antônio Carlos, por ter me dado a oportunidade de trabalhar em um projeto tão incrível, e também pelos ensinamentos. Agradeço de verdade por ter um orientador sempre tão atencioso e gentil.

Aos professores Dr. Helton José Reis e Dra. Luciene Bruno Vieira, pelo acolhimento no laboratório e por serem pessoas maravilhosas.

A Paula Bellozi, por ter me recebido de braços abertos como sua IC e por ter me ensinado tudo com tanta paciência.

Aos demais amigos do laboratório de neurofarmacologia, em especial ao Giovanni e o Wenderson, por terem contribuído para a realização dos experimentos.

Aos professores do Laboratório de neuropsicofarmacologia Dr. Fabrício Moreira e Dra. Daniele Aguiar, pela colaboração que possibilitou a realização dos meus experimentos.

As minhas amigas do Laboratório de neuropsicofarmacologia Anna Paula, Nícia, Juliana e Laila, por tornarem meus dias mais alegres.

A professora Dra. Aline Miranda, pela realização dos experimentos bioquímicos e por compartilhar seus conhecimentos de forma tão atenciosa.

Ao professor Dr. Antônio Lúcio Teixeira, por ter disponibilizado o PLX3397 que possibilitou a realização do meu projeto.

Aos meus amigos Rodrigo, Paola, Carol e Raissa, por serem pessoas tão incríveis na minha vida.

Ao meu namorado Gustavo, que sempre esteve ao meu lado me ajudando em tudo que eu precisasse.

Aos funcionários Cíntya, Webster e Rinaldo, por serem sempre tão educados e simpáticos.

E às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo auxílio financeiro.

APOIO FINANCEIRO

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) - Processo CBB - APQ-02044-15;
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
 - Processo 424588/2016-1;
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

INTRODUÇÃO: O uso de drogas recreativas pode modificar a função cerebral induzindo alterações no sistema de recompensa, principalmente devido à liberação de dopamina na via mesocorticolímbica. Apesar disso, a etiopatogenia da adicção é um processo muito mais complexo. Diferentes dados sugerem que as células gliais podem participar do processo de dependência de drogas, uma vez que respondem a alterações neuroquímicas induzidas pela administração dessas substâncias. Entretanto, o papel da micróglia nesse processo patológico ainda é pouco conhecido. **OBJETIVO:** Testar hipótese de que a micróglia participa das alterações comportamentais induzidas por cocaína nos testes de sensibilização comportamental e preferência condicionada ao lugar. **MÉTODOS:** Camundongos da linhagem swiss com idade entre 8 e 9 semanas foram tratados com o depletor de micróglia PLX3397 (40 mg/kg *p.o.*) e submetidos aos testes de sensibilização comportamental ou preferência condicionada ao lugar induzidos por cocaína (15 mg/kg, *i.p.*). O tratamento com o PLX3397 teve a duração de 7 ou 9 dias nos testes de sensibilização comportamental e preferência condicionada, respectivamente. Após os testes comportamentais, os animais foram eutanasiados e tiveram seus encéfalos retirados para análise do número e da morfologia de células Iba-1⁺ no núcleo accumbens e hipocampo, e dosagem dos fatores neurotróficos BDNF, NGF e GDNF, no córtex pré-frontal (PFC), hipocampo e estriado. **RESULTADOS:** O tratamento com o PLX3397 atenuou a sensibilização comportamental, mas não a preferência condicionada ao lugar induzidos por cocaína. Em ambos os grupos tratados com cocaína ou veículo, o PLX3397 reduziu o número de células Iba-1⁺ no núcleo accumbens core (NAcc), núcleo accumbens shell (NAcSh), e região CA1 do hipocampo. A droga também aumentou o índice de ativação das células Iba-1⁺ no NAcc e NAcSh nos grupos tratados com cocaína e veículo. O PLX3397 reduziu a diminuição dos níveis de BDNF no PFC induzidos pela cocaína, mas não a de NGF no estriado. Além disso, os animais tratados com cocaína em associação ao PLX3397 apresentaram uma diminuição dos níveis de NGF no hipocampo. Por fim, a cocaína, o PLX3397 e a associação de ambos foram capazes de diminuir os níveis de GDNF no PFC. **CONCLUSÃO:** De acordo com os resultados encontrados no presente estudo, podemos sugerir que a micróglia participa das alterações patológicas que ocorrem na neurobiologia da adicção. A demonstração da participação dessas células em transtornos por uso de substâncias pode abrir um novo campo para o desenvolvimento de novos tratamentos farmacológicos.

Palavras-chave: adicção, cocaína, micróglia, fatores neurotróficos.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The use of recreational drugs can modify brain function by inducing changes in the reward system, mainly due to release of dopamine in the mesocorticolimbic pathway. Despite this, the etiopathogenesis of addiction is a much more complex process. Different data suggest that glial cells may participate in the drug addiction process, since they respond to neurochemical changes induced by the administration of these substances. **OBJECTIVE:** To test the hypothesis that microglia is related in behavioral changes induced by cocaine in behavioral sensitization and conditioned place preference tests. **METHODS:** Swiss mice aged 8-9 weeks were treated with the microglial depletor PLX3397 (40 mg/kg, *p.o.*) and submitted to behavioral sensitization or conditioned place preference induced by cocaine (15 mg/kg, *i.p.*). The treatment with PLX3397 lasted 7 or 9 days in the behavioral sensitization and conditioned place preference tests, respectively. Thereafter, the animals were euthanized and had their brain removed for analysis of number and morphology of Iba-1⁺ cells, and quantification of neurotrophic factors BDNF, NGF and GDNF on prefrontal cortex (PFC), hippocampus and striatum. **RESULTS:** Treatment with PLX3397 attenuated behavioral sensitization, but had no effect in the conditioned place preference induced by cocaine. In both cocaine or vehicle treated groups, PLX3397 reduced the number of Iba-1⁺ cells in nucleus accumbens core (NAcc), nucleus accumbens shell (NAcSh), and CA1 region of hippocampus. The drug also increased the rate of activation of Iba-1⁺ cells in NAcc and NAcSh in cocaine and vehicle groups. PLX3397 reversed the decrease in BDNF levels in PFC induced by cocaine, but not the NGF levels in striatum. In addition, animals treated with cocaine in combination with PLX3397 revealed a decrease in NGF levels in the hippocampus. Finally, cocaine, PLX3397, and the association of both drugs were able to decrease GDNF levels in the PFC. **CONCLUSION:** Considering the data of this study, we suggest that microglia participates in the pathological alterations that occur in neurobiology of addiction. The demonstration of the involvement of these cells in substance use disorders could open a new field for the development of new pharmacological treatments.

Keywords: addiction, cocaine, microglia, neurotrophic factors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Relação entre o número de pessoas que usam droga e pessoas com Transtorno por uso de substâncias (Adaptado de World Drug Report 2018).

Figura 2: As drogas de abuso compartilham a capacidade de aumentar os níveis de dopamina no NAc, sendo este aumento de forma direta ou indireta (Koob, 2014).

Figura 3: Principais circuitos neurobiológicos da adicção (Adaptado de Nestler, 2004).

Figura 4: Comportamentos motivados aumentam a liberação de dopamina (Adaptado de Carter e colaboradores, 2009).

Figura 5: Estágios da neurobiologia da adicção e os circuitos envolvidos (Adaptado de Volkow et al., 2016).

Figura 6: Fórmula estrutural da cocaína (Adaptado de Oliveira et al., 2018).

Figura 7: Aumento da liberação de dopamina na fenda sináptica devido ao mecanismo de ação da cocaína que consiste no bloqueio de transportadores de dopamina (Adaptado de McCarthy et al., 2012).

Figura 8: Participação da micróglia em processos fisiológicos e patológicos (Adaptado de Wake et al., 2013).

Figura 9: Micróglia estimula a formação de filopódios e fagocita elementos sinápticos (Adaptado de Wake et al., 2013).

Figura 10: Desenho representativo da sensibilização comportamental (Adaptado de Brooks and Dunnet, 2009).

Figura 11: Protocolo da padronização da sensibilização comportamental.

Figura 12: Protocolo do teste de sensibilização comportamental em animais tratados com PLX3397 ou veículo.

Figura 13: Protocolo da padronização da hiperlocomoção condicionada.

Figura 14: Desenho representativo da preferência condicionada ao lugar (Adaptado de Castilla-Ortega et al., 2017).

Figura 15: Protocolo da padronização da preferência condicionada ao lugar.

Figura 16: Protocolo da preferência condicionada ao lugar de animais tratados com PLX3397 ou veículo.

Figura 17: Atividade locomotora dos animais no teste de sensibilização comportamental.

Figura 18: Atividade locomotora dos animais na hiperlocomoção condicionada.

Figura 19: Taxa de preferência dos animais na preferência condicionada ao lugar.

Figura 20: Massa corporal durante a sensibilização comportamental.

Figura 21: Massa corporal durante a preferência condicionada ao lugar.

Figura 22: Atividade locomotora dos animais na sensibilização comportamental após o tratamento com PLX3397.

Figura 23: Delta da atividade locomotora dos animais na sensibilização comportamental após o tratamento com PLX3397.

Figura 24: Taxa de preferência dos animais na preferência condicionada ao lugar após o tratamento com PLX3397.

Figura 25: Número de células Iba-1⁺ no NAcc.

Figura 26: Imagem representativa das fotomicrografias utilizadas para quantificar células Iba-1⁺ no NAcc.

Figura 27: Número de células Iba-1⁺ no NAcSh.

Figura 28: Imagem representativa das fotomicrografias utilizadas para quantificar células Iba-1⁺ no NAcSh.

Figura 29: Número de células Iba-1⁺ em CA1.

Figura 30: Imagem representativa das fotomicrografias utilizadas para quantificar células Iba-1⁺ em CA1.

Figura 31: Índice de ativação microglial no NAcc.

Figura 32: Imagem representativa das fotomicrografias utilizadas para avaliar o índice de ativação microglial no NAcc.

Figura 33: Índice de ativação microglial no NAcSh.

Figura 34: Imagem representativa das fotomicrografias utilizadas para avaliar o índice de ativação microglial no NAcSh.

Figura 35: Índice de ativação microglial no CA1.

Figura 36: Imagem representativa das fotomicrografias utilizadas para avaliar o índice de ativação microglial em CA1.

Figura 37: Níveis de BDNF no PFC.

Figura 38: Níveis de GDNF no PFC.

Figura 39: Níveis de NGF no PFC.

Figura 40: Níveis de BDNF no estriado.

Figura 41: Níveis de GDNF no estriado.

Figura 42: Níveis de NGF no estriado.

Figura 43: Níveis de BDNF no hipocampo.

Figura 44: Níveis de GDNF no hipocampo.

Figura 45: Níveis de NGF no hipocampo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios para o diagnóstico do transtorno de uso de substância de acordo com o DSM-5.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH: *adrenocorticotropic hormone* (hormônio adenocorticotrófico)

AMPA: *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*

BDNF: *brain-derived neurotrophic factor* (fator neurotrófico derivado do cérebro)

CA1: Corno de Ammon 1

CREB: *cAMP response element-binding* (Fator de Transcrição regulada pelo AMPc)

CRF: *corticotropin-releasing hormone* (hormônio libertador de corticotropina)

ΔfosB: Delta FosB

DSM-5: Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais - 5

ERK: *extracellular signal-regulated kinase* (quinase regulada por sinal extracelular)

GDNF: *glial cell line-derived neurotrophic factor* (fator neurotrófico derivado da glia)

IGF-1: *insulin-like growth factors 1* (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1)

IFN-γ: interferon-gamma

IL-1β: interleucina-1β

IL-4: interleucina 4

IL-6: interleucina 6

IL-10: interleucina 10

IL-13: interleucina 13

LPS: lipopolissacarídeos

LTD: *long-term depression* (depressão de longa duração)

LTP: *long-term potentiation* (potenciação de longa duração)

MHC: *major histocompatibility complex* (complexo principal de histocompatibilidade)

MEF2: *myocyte enhancer factor-2* (fator potenciador de miócito 2)

NAc: Núcleo Accumbens

NAcc: Núcleo Accumbens core

NAcSh: Núcleo Accumbens shell

NFκB: *nuclear factor κB* (fator nuclear κB)

NGF: *nerve growth factor* (fator de crescimento do nervo)

NO: *nitric oxide* (óxido nítrico)

PFC: *prefrontal cortex* (córtex pré-frontal)

PRRs: *pathogen-associated molecular pattern* (receptores de reconhecimento de padrões)

SNC: sistema nervoso central

STAT: *signal transducer and activator of transcription*

TLR4: *toll-like receptors 4* (receptores tipo toll 4)

TNF: *tumor necrose factor α* (fator de necrose tumoral α)

VTA: *ventral tegmental area* (área tegmental ventral)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Transtornos por uso de substâncias e adicção	17
1.1.1 Aspectos sociais e epidemiológicos da adicção	17
1.1.2 Neurobiologia da adicção	20
1.2 Cocaína e adicção	30
1.3 Micróglia e adicção	34
2. OBJETIVOS	41
2.1 Objetivos gerais	41
2.2 Objetivos específicos	41
3. MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 Animais	42
3.2 Drogas	42
3.3 Testes comportamentais	42
3.3.1 Sensibilização comportamental	42
3.3.2 Hiperlocomoção condicionada	44
3.3.3 Preferência condicionada ao lugar	45
3.4 Perfusão transcardíaca e preparo do cérebro para avaliações histológicas	47
3.5 Retirada de tecidos a fresco para ELISA	48
3.6 Avaliação da micróglia	48
3.6.1 Marcação de células Iba-1 por imunofluorescência	48
3.6.2 Marcação de células Iba-1 por imunohistoquímica	49
3.7 Avaliação dos níveis de fatores neurotróficos	50
3.8 Análise estatística	50
4. RESULTADOS	51
4.1 Padronização dos modelos comportamentais	51
4.1.1 O tratamento com cocaína aumentou a atividade locomotora na sensibilização comportamental	51
4.1.2 O tratamento com cocaína foi capaz de promover um aumento na hiperlocomoção condicionada	52
4.1.3 Padronização da preferência condicionada ao lugar induzida por cocaína	53

4.2	Massa dos animais ao longo dos dias de tratamento	53
4.3	O tratamento com PLX3397 foi capaz de diminuir a sensibilização comportamental induzida por cocaína	55
4.4	O tratamento com PLX3397 não foi capaz de reverter a preferência condicionada ao lugar induzida por cocaína	57
4.5	O tratamento com PLX3397 foi capaz de reduzir as células Iba-1 ⁺ no NAc e no CA1	58
4.5.1	Quantificação das células microgliais de animais tratados com PLX3397 no NAc	58
4.5.2	Quantificação das células microgliais de animais tratados com PLX3397 no hipocampo	61
4.6	O tratamento com PLX3397 foi capaz de aumentar o índice de ativação das células microgliais no NAc e no CA1	64
4.6.1	Índice de ativação microglial no núcleo accumbens	64
4.6.2	Índice de ativação microglial no hipocampo	68
4.7	Efeitos do tratamento com PLX3397 e/ou cocaína nos níveis de fatores neurotróficos	70
4.7.1	Quantificação dos níveis de BDNF, NGF e GDNF no córtex pré-frontal	70
4.7.2	Quantificação dos níveis de BDNF, NGF e GDNF no estriado	73
4.7.3	Quantificação dos níveis de BDNF, NGF e GDNF no hipocampo ...	75
5.	DISCUSSÃO	78
6.	CONCLUSÃO	89
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

1. INTRODUÇÃO

1.1 TRANSTORNOS POR USO DE SUBSTÂNCIAS E ADICÇÃO

1.1.1 Aspectos sociais e epidemiológicos da adicção

O uso de drogas de abuso tem se tornado um problema universal que compromete a qualidade de vida, promove o aumento da criminalidade, e requer gastos com tratamento e controle, além de causar uma queda na produtividade laboral (NATIONAL DRUG THREAT ASSESSMENT, 2011; BARI et al., 2018; MOULAHOUIM et al., 2019).

Apesar das consequências associadas às drogas de abuso serem bem conhecidas, a prevalência de pessoas com problemas relacionadas ao seu uso continua alta, sendo um problema de saúde pública mundial. De acordo com o Relatório Mundial Sobre Drogas de 2018 (*World Drug Report 2018*), divulgado pela Organização das Nações Unidas (ONU), cerca de 275 milhões de pessoas usaram drogas em 2016, e 31 milhões apresentam algum transtorno devido ao uso de drogas ilícitas (figura 1). Além disso, a taxa de mortalidade chegou a 450.000 óbitos em 2015, sendo overdose a principal causa. No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, o número de internações relacionadas ao uso dessas substâncias chegou a 604.965 entre 2005 e 2015, e o número de óbitos chegou a 7.511 no ano de 2013 (TEIXEIRA, 2016; WORLD DRUG REPORT, 2018).

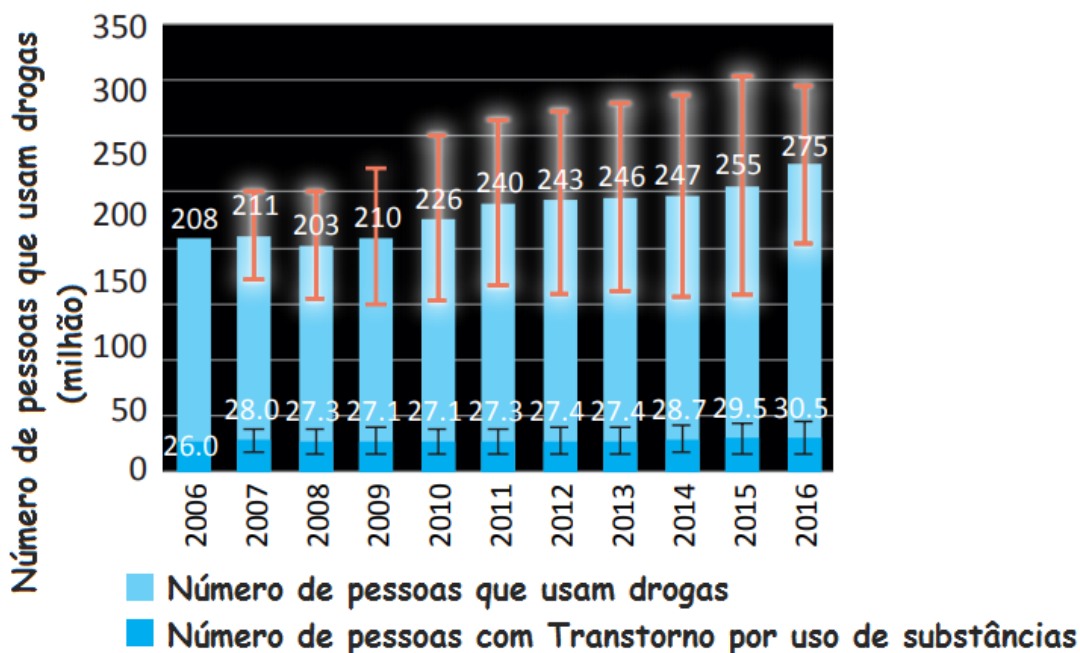


Figura 1: Relação entre o número de pessoas que usam droga e pessoas com transtorno por uso de substâncias (Adaptado de World Drug Report 2018).

Os problemas devido ao uso de drogas de abuso começaram a ter seus estudos ampliados no século XVIII, e até o final século XX a adicção era vista como um problema de caráter. Apenas em 1987 a *American Medical Association* definiu adicção como uma doença (LESHNER 1997; CROCCO 2007). No Brasil, a primeira mudança foi a lei 10.216 de 06 de abril de 2001, que ratificou diretrizes básicas do SUS, garantindo atendimento na área da saúde mental a pessoas que apresentam transtornos decorrentes do uso de substâncias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Porém ainda hoje a definição de adicção como doença é criticada devido a valores sociais de que o uso de drogas é um ato hedonista e voluntário, relacionado com a autodeterminação e responsabilidade pessoal (HOLDEN, 2012; VOLKOW et al., 2016; LEWIS, 2017).

O estudo da adicção como doença tem sido de extrema importância não só para uma melhor compreensão dos sistemas de sinalização e circuitos neurais afetados com o uso de drogas, mas também no desenvolvimento de políticas públicas preventivas e de redução de danos (FACING ADDICTION IN AMERICAN, 2016; LAMONTAGNE et al., 2018). Estima-se que o uso/abuso de drogas tem

gerado gastos mundiais de 442 bilhões de dólares anualmente. Esse valor se deve principalmente à perda da produtividade laboral, e gastos no sistema de saúde e na justiça criminal. Sobre esse último, sabe-se que 19% da população carcerária masculina e 32% da feminina estão detidos por delitos relacionados às drogas (NATIONAL DRUG INTELLIGENCE CENTER, 2011; WORLD DRUG REPORT, 2018). Nesse sentido, foram criadas as abordagens de redução de danos, que são estratégias políticas e sociais cujo objetivo é minimizar os danos biológicos, psicossociais e econômicos relacionados ao uso de drogas lícitas e ilícitas, mesmo que o consumo não seja interrompido (HARM REDUCTIONAL INTERNATIONAL, 2019).

Estudos demonstram que os programas de prevenção e de redução de danos foram eficazes para: melhorar a produtividade de trabalhadores que apresentam o transtorno por abuso de substâncias; reduzir gastos com justiça criminal, uma vez que cada dólar gasto no tratamento promove a economia de quatro dólares em custos de assistência médica; e diminuir a transmissão de HIV causada pelo compartilhamento de seringas (ETTNER et al., 2006; JORDAN et al., 2008; NATIONAL COUNCIL FOR BEHAVIORAL HEALTH, 2014, ASPINALL et al., 2014). Apesar dos programas de prevenção e redução terem se mostrado eficientes, o número de mortes relacionadas a drogas aumentou mais de 60% desde o ano de 2000 (WORLD DRUG REPORT, 2018).

O Brasil registrou o funcionamento de mais de 150 programas de redução de danos em 2003. Ainda assim, o número de atendimentos relacionados ao uso de drogas chegou a 62.229 em 2014, sendo que o gasto com tratamento e manutenção de programas de prevenção foi de R\$ 950,9 milhões. Considerando estes valores, os gastos no Brasil relacionados a drogas tem sido de 9.139 bilhões a cada década (TEIXEIRA et al., 2016).

A criminalização dos usuários de drogas tem se mostrado uma forma ineficaz de combate às drogas, pois, de acordo com o Levantamento Nacional de Informações Penitenciárias (Infopen) do

Ministério da Justiça, houve um crescimento de 707% de presos no Brasil desde a década de noventa. Além de o Brasil apresentar hoje a terceira maior população carcerária do mundo, sendo que em 2016 o número de presidiários chegou a 726.000. Porém essas prisões não parecem ser eficazes contra o aumento da criminalidade, já que apenas 17% destes encarceramentos estão relacionados com latrocínio e homicídio e os 26% decorrentes do tráfico de drogas incluem pequenos traficantes ou apenas usuários (INFOPEN, 2016).

1.1.2 Neurobiologia da adicção

O transtorno por uso de substâncias é definido como uma doença crônica na qual ocorrem alterações dos circuitos do sistema de recompensa, motivação e memória, e do comportamento adaptativo. Essas alterações ocorrem porque o uso de drogas é capaz de alterar a função cerebral por meio de insultos farmacológicos repetitivos. Assim ocorre uma reorganização destes sistemas através de processos neuroplásticos, que decorre principalmente de um desbalanço nos níveis de neurotransmissores na via dopaminérgica mesocorticolímbica e na via glutamatérgica corticolímbica (KALIVAS and O'BRIEN, 2008; ROSS and PESELOW, 2009; BOBADILLA et al., 2017; LUSHER et al., 2013; KOSKELA et al., 2017; HANCOCK et al., 2018; SIMMONS et al., 2019).

O transtorno por uso de substâncias engloba dez classes distintas de drogas: cafeína; álcool; tabaco; maconha; opióides; ansiolíticos, sedativos e hipnóticos; inalantes; cocaína, anfetaminas e outros estimulantes; alucinógenos; e outras substâncias ou substâncias desconhecidas (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), 2014). Apesar de estarem divididas em diferentes categorias e apresentarem diferentes propriedades neurofarmacológicas, um estudo realizado por Chiara e colaboradores (1998) demonstrou por microdiálise que as drogas de abuso compartilham a capacidade de aumentar os níveis de dopamina no Núcleo Accumbens (NAc) (figura 2), e este seria o

principal mecanismo neurobiológico da adicção (CHIARA and IMPERATO, 1998; REYNOLDS et al., 2003; VOLKOW et al., 2004).

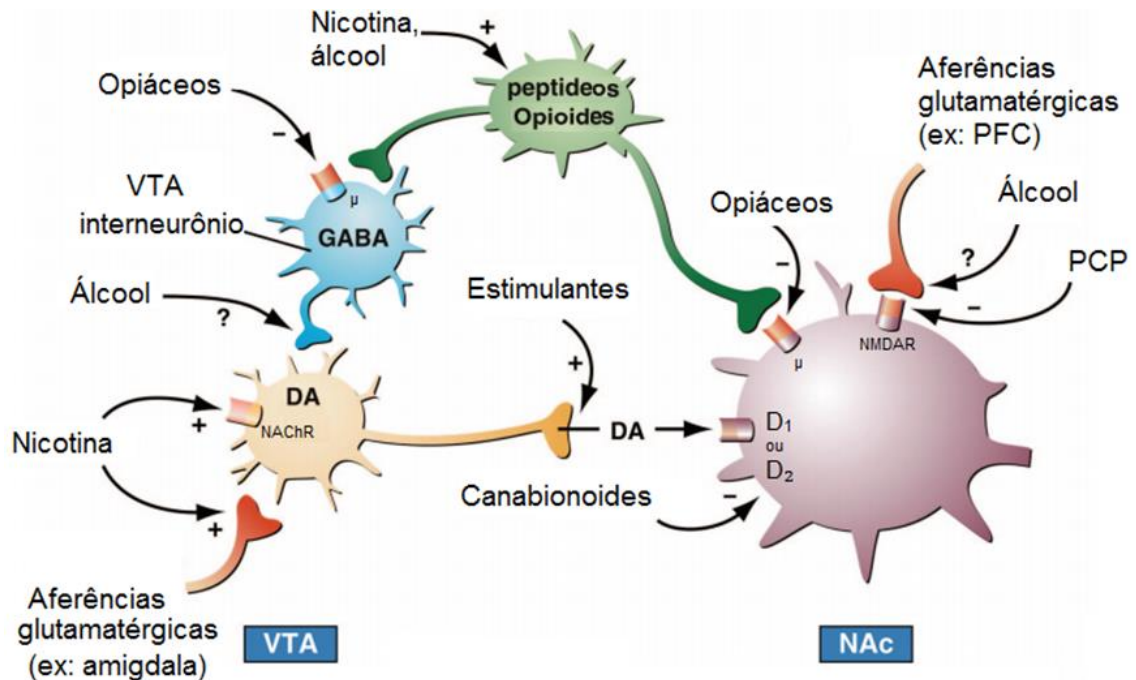


Figura 2: As drogas de abuso compartilham a capacidade de aumentar os níveis de dopamina no NAc. De forma resumida, os estimulantes aumentam de forma direta os níveis de dopamina no NAc, enquanto os opiáceos inibem os interneurônios GABAérgicos na VTA, desinibindo os neurônios dopaminérgicos nesta região. Além disso, os opiáceos também atuam nos receptores opioides presentes nos neurônios do NAc. A nicotina se liga em receptores colinérgicos presentes nos neurônios dopaminérgicos da VTA, e também em terminais nervosos glutamatérgicos que inervam neurônios dopaminérgicos. O álcool é capaz de inibir terminais glutamatérgicos que inervam neurônios no NAc, além de outros mecanismos não demonstrados. A fenciclidina (PCP) inibe receptores NMDA pós-sinápticos no NAc. E por fim, os canabionoides se ligam em receptores CB1 em terminais nervosos glutamatérgicos e GABAérgicos no NAc (Adaptado de Koob, 2014).

O NAc, juntamente com a área tegmentar ventral (VTA, *ventral tegmental area*) e o córtex pré-frontal (PFC, *prefrontal cortex*), formam o sistema de recompensa (LAMMEL et al., 2012; SIMMONS et al., 2019), que foi primeiramente estudado por Olds e Milner (1954) ao desenvolverem um modelo de recompensa por estimulação encefálica intra-cranial (*self-stimulation*, auto-estimulação).

A VTA possui corpos celulares de neurônios dopaminérgicos que emitem projeções para o núcleo accumbens core (NAcc) e para o PFC, formando as vias mesolímbicas e mesocorticais, respectivamente; e também para o hipocampo ventral e para a amígdala basolateral. Já o PFC envia projeções glutamatérgicas para a VTA e para o NAcc, sendo que este último envia projeções GABAérgicas para a VTA, além de receber projeções glutamatérgicas do hipocampo e da amígdala (Figura 3) (FRIEDMAN et al., 2002; PIERCE e KURASEMAN, 2006; SUN et al., 2008; BRITT et al., 2012; ZHANG et al., 2018; SIMMONS et al., 2019).

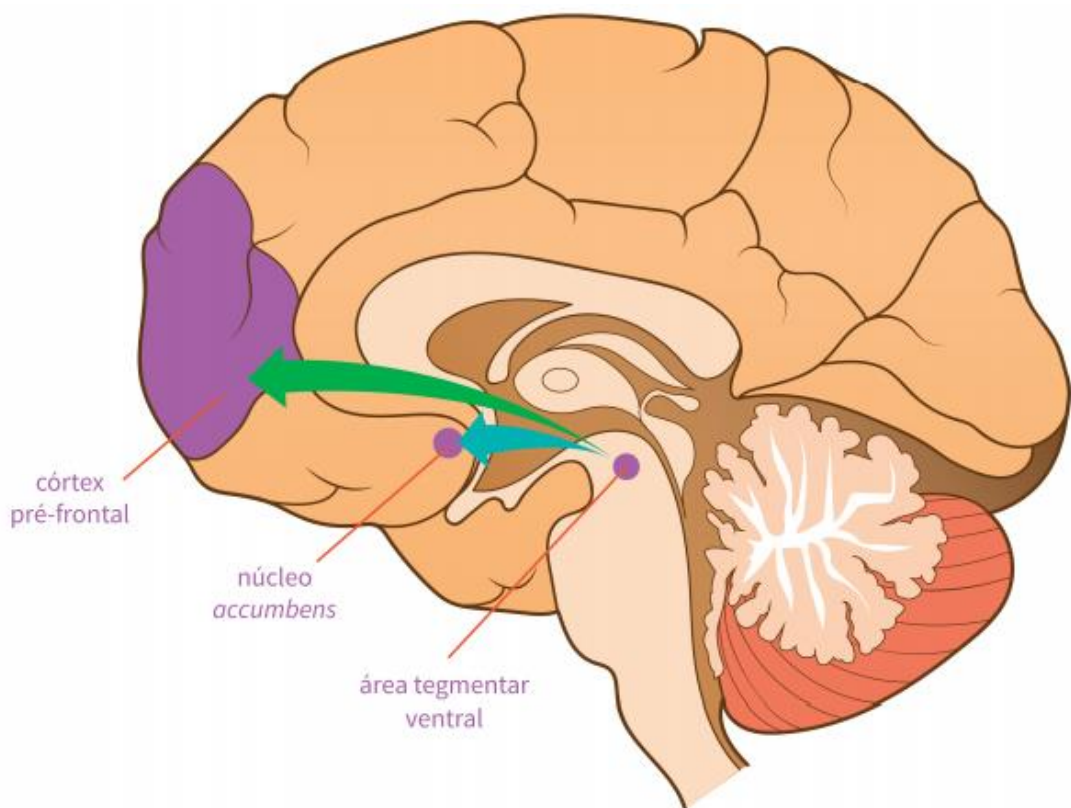


Figura 3: Principais circuitos neurobiológicos da adicção. O sistema límbico é formado principalmente pela área tegmentar ventral, pelo NA e pelo PFC (Adaptado de NUTE-UFSC, 2016)

Uma das funções do sistema de recompensa é a regulação dos comportamentos motivados relacionados ao prazer, como alimentação, comportamento sexual, interação social; e outros que são vitais para a sobrevivência e manutenção da homeostase (HULL, 1943; MITCHEL et al., 1994; ROSS AND PESELOW, 2009; FERRARIO et al; 2016). Neste

contexto, o NAc é o principal regulador de atividades relacionadas com valência positiva (recompensa); a amígdala com valência negativa (aversão); o PFC no processo de tomadas de decisões, determinando a resposta comportamental perante os estímulos; e o hipocampo no processo de formação de memória (KALIVAS and VOLKOW, 2005).

As drogas de abuso induzem a liberação de dopamina em quantidades significativamente mais elevadas que os estímulos naturais (figura 4) (WISE, 1980; DI CHIARA, 1999; GARAVAN et al., 2000; VOLKOW e LI; 2004). Dessa forma, as drogas de abuso são capazes de reorganizar e promover mudanças plásticas nesses circuitos do sistema nervoso central (SNC), “sequestrando” os mecanismos motivacionais adaptativos neurais. Dessa forma, o transtorno por abuso de substâncias é considerado uma doença do processo motivacional (GARAVAN et al., 2000; KALIVAS E VOLKOW, 2005; ROSS et al., 2009; MAMELI et al., 2011).

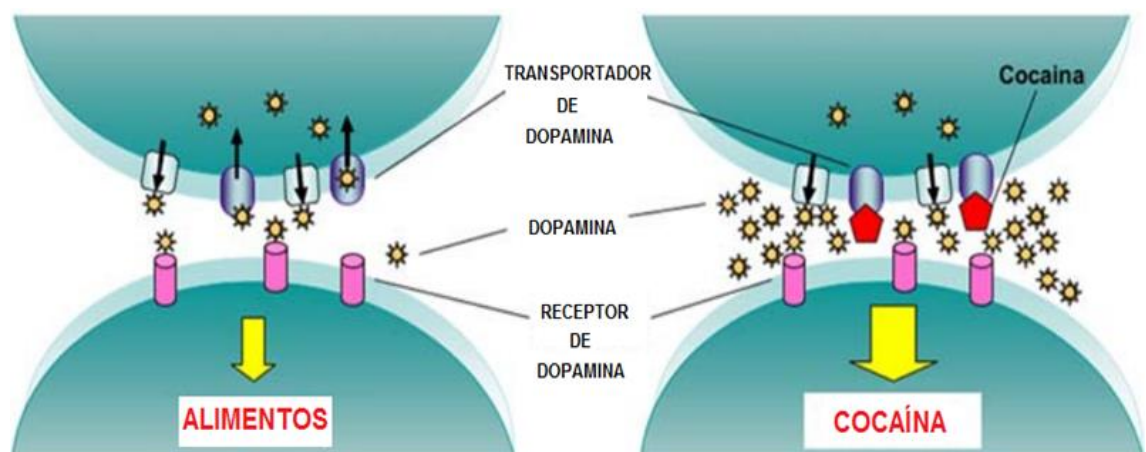


Figura 4: Comportamentos motivados aumentam os níveis de dopamina. Tanto os alimentos quanto a cocaína são capazes de aumentar os níveis de dopamina no NAc. Porém a cocaína é capaz de aumentar os níveis desse neurotransmissor de forma suprafisiológicas (Adaptado de Carter et al., 2009).

Koob e Volkow (2010) dividiram o desenvolvimento da adicção em três estágios, sendo eles a compulsão (*binge*) e intoxicação, abstinência e afeto negativo, e preocupação/antecipação ou desejo (*craving*). Apesar de estarem relacionados, estes estágios envolvem diferentes circuitos neurobiológicos, neurotransmissores e características comportamentais.

O estágio inicial, chamado de compulsão e intoxicação, é caracterizado pelo consumo inicial da droga e uma intensa sensação de euforia e prazer que o indivíduo sente. Durante essa fase, ocorre principalmente um aumento dos níveis de dopamina e glutamato no sistema mesocorticolímbico (VOLKOW et al., 1999; SUN et al., 2008, MAMELI et al., 2011; VOLKOW et al., 2016; ZHANG et al., 2013). As modificações dos níveis extracelulares destes neurotransmissores promovem o aprendizado ou condicionamento associativo, no qual o indivíduo relaciona os efeitos recompensadores da droga com estímulos presentes durante o uso (pessoas, lugares, objeto, humor) (KALIVAS, 2009; BOWERS et al; 2009; MAMELI et al., 2011; PASCOLI et al., 2015).

Este tipo de condicionamento Pavloviano faz com que o uso recorrente de drogas promova a ativação antecipatória dos neurônios dopaminérgicos em resposta a estímulos condicionados (chamados de “pistas”) que pressagiam o efeito recompensador. Como consequência, a exposição ao ambiente, pessoas ou objetos associados ao uso da substância podem servir como “gatilhos” que promovem a liberação antecipada de dopamina e desencadeiam um desejo intenso pela droga, busca e obtenção, e uso compulsivo. Com o passar do tempo, as alterações plásticas que ocorrem consolidam o hábito de usar a droga (PHILIPPS et al., 2002; VANDERSCHUREN et al., 2005; VOLKOW et al., 2006; PASCOLI et al., 2015; SADDORIS et al., 2015; MCGLINCHEY et al., 2016).

Na fase de abstinência e afeto negativo, as adaptações que ocorrem no cérebro após o uso recorrente de drogas fazem com que o sistema de recompensa se torne menos responsivo aos estímulos recompensadores naturais e aos relacionados com a droga. Isso ocorre principalmente pela diminuição de receptores dopaminérgicos D₂ e também da liberação de dopamina. Como consequência, o indivíduo acaba perdendo o interesse por suas atividades cotidianas que anteriormente eram motivadoras, e aumenta a busca pela recompensa máxima proveniente dos gatilhos e uso da droga (VOLKOW et al., 1997;

KONOVA et al., 2012; ZHANG et al., 2013; VOLKOW et al., 2014; HAGELE et al., 2015).

A amígdala estendida também sofre adaptações que promovem um aumento de neurotransmissores relacionados ao estresse, como a norepinefrina, o hormônio adenocorticotrófico (ACTH, *adrenocorticotropic hormone*), o hormônio liberador de corticotrofina (CRF, *corticotropin-releasing hormone*) e a dinorfina. Essa região está relacionada com o restabelecimento da homeostase do sistema de recompensa, após sua ativação, promovendo uma fase disfórica quando o efeito da droga cessa (DELFIS et al., 2000; ZORRILA et al., 2012; KOOB et al., 2017; BAZOV et al., 2018).

Neste contexto, a diminuição da atividade de vias dopaminérgicas e serotoninérgicas, associada à hiperatividade dos sistemas de estresse, desencadeia alterações fisiológicas e psicológicas negativas na ausência da substância (e.g. irritabilidade, ansiedade e disforia), que caracterizam a fase de abstinência e afeto negativo. Como consequência, a principal motivação do uso da droga não é mais a busca pelo prazer, mas evitar esses sintomas (BELUJON et al., 2015; KOOB et al., 2017; NEGUS and BANKS; 2018).

A fase de preocupação/antecipação está relacionada com alterações neuroplásticas que ocorrem no PFC, como, por exemplo, o desequilíbrio das sinalizações dopaminérgicas e glutamatérgicas. Consequentemente, funções executivas, como tomada de decisões e controle de impulsos, que são imprescindíveis para evitar o uso compulsivo de drogas e recaídas, acabam sendo prejudicadas (VOLKOW and GOLDSTEIN, 2011; SHINORARA et al., 2017, ZHANG et al., 2018).

Em suma, a diminuição da atividade do sistema de recompensa, associada com o aumento da ativação dos sistemas de estresse e com a sinalização alterada nos circuitos regulatórios do PFC, promovem um desequilíbrio neurobiológico no qual o indivíduo apresenta um desejo intenso, comportamento compulsivo de busca pela droga, e ausência de autocontrole durante a utilização (figura 5).

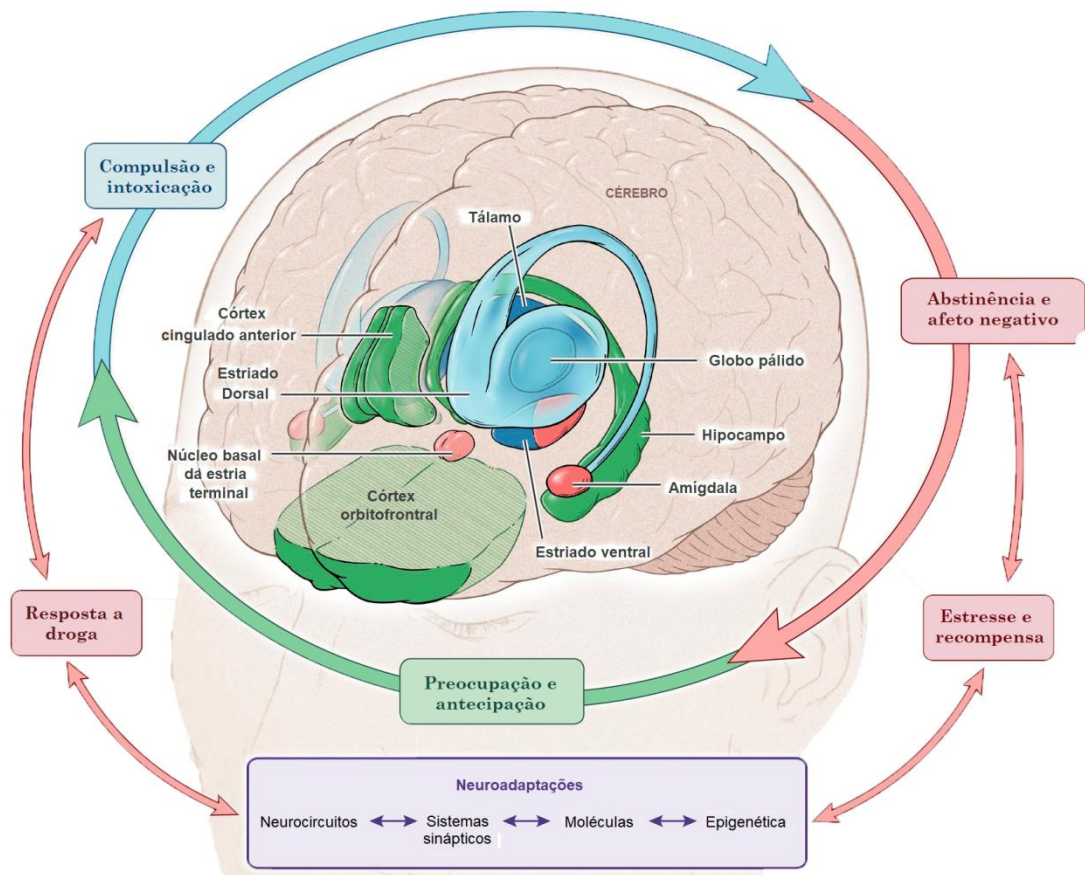


Figura 5: Estágios da neurobiologia da adicção e os circuitos envolvidos. Durante a fase de intoxicação e compulsão, ocorre ativação das regiões relacionadas ao prazer (azul), em resposta aos estímulos condicionados em áreas relacionadas ao aumento da sensibilização (verde). Na ausência da substância, regiões relacionadas às emoções (rosa) promovem uma fase caracterizada por humor negativo e maior sensibilidade ao estresse. Na fase de preocupação e antecipação, a diminuição da responsividade do PFC leva ao uso compulsivo da droga. Os comportamentos durante os três estágios da adicção mudam à medida que a pessoa passa de um uso recreativo para o uso compulsivo da droga, em função das adaptações neurais progressivas que ocorrem no cérebro (Adaptado de Volkow et al., 2016).

As disfunções que ocorrem nestes circuitos levam a manifestações biológicas, psicológicas e sociais características que são utilizadas como critérios do DSM-5 para diagnosticar a doença. Os onze critérios utilizados são divididos em quatro grupos e estão listados na tabela a seguir:

Tabela 1: Critérios para o diagnóstico do transtorno de uso de substância de acordo com o DSM-5

CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DO TRANSTORNO DE USO DE SUBSTÂNCIA
Critérios A - Baixo controle
<p>I - Consumo da substância em quantidades maiores ou ao longo de um período maior de tempo do que o pretendido originalmente.</p> <p>II- Desejo persistente de reduzir ou regular o uso da substância e pode haver relatos de vários esforços mal sucedidos para diminuir ou descontinuar o uso.</p> <p>III- O indivíduo pode gastar muito tempo para obter a substância, usá-la ou recuperar-se de seus efeitos.</p> <p>IV - Fissura - manifestação de um desejo ou necessidade intensa de usar a droga que podem ocorrer a qualquer momento, mas com maior probabilidade quando em um ambiente onde a droga foi obtida ou usada anteriormente.</p>
Critérios B – Prejuízo social
<p>V- O uso recorrente de substâncias pode resultar no fracasso em cumprir as principais obrigações no trabalho, na escola ou no lar.</p> <p>VI- O indivíduo pode continuar o uso da substância, apesar de apresentar problemas sociais ou interpessoais, persistentes ou recorrentes, causados ou exacerbados por seus efeitos.</p> <p>VII- Atividades importantes de natureza social, profissional ou recreativa podem ser abandonadas ou reduzidas devido ao uso da substância.</p>
Critérios C – Uso arriscado da substância
<p>VIII- Pode ocorrer uso recorrente da substância em situações que envolvem risco à integridade física.</p> <p>IX- O indivíduo pode continuar o uso, apesar de estar ciente de um problema físico ou psicológico, persistente ou recorrente, que provavelmente foi causado ou exacerbado pela substância.</p>
Critérios D – Critérios farmacológicos
<p>X- Tolerância - quando uma dose acentuadamente maior da substância é necessária para obter o efeito desejado ou quando um efeito acentuadamente reduzido é obtido após o consumo da dose habitual.</p> <p>XI- Abstinência - síndrome que ocorre quando as concentrações de uma substância no sangue ou nos tecidos diminuem em um indivíduo que manteve uso intenso prolongado. Após desenvolver sintomas de abstinência, o indivíduo tende a consumir a substância para aliviá-los.</p>

De acordo com a quantidade de sintomas apresentados por um paciente, seu transtorno por uso de substâncias é classificado como leve, moderado ou severo. A presença de dois ou três critérios classificam o transtorno como leve, e quatro ou cinco critérios classificam o transtorno como moderado. A partir de seis critérios, o transtorno por uso de substâncias é considerado grave e é denominado adicção. Entretanto, devido à sua conotação negativa, esse termo foi excluído do DMS-5, sendo feita a utilização de uma abordagem mais ampla: transtorno de uso de substâncias (DSM-5, 2014; FACING ADDICTION IN AMERICA, 2016; VOLKOW et al., 2016).

Apenas 11% das pessoas que utilizaram drogas desenvolveram algum tipo de transtorno (WORLD DRUG REPORT, 2018). Demonstrando que a etiopatogenia da adicção é um processo complexo, no qual as pessoas apresentam diferentes susceptibilidades, que podem estar associadas com questões biológicas, culturais e socioeconômicas (classe social, desigualdades raciais, contextos comunitários, entre outros) (NIDA, 2013; FACING ADDICTION IN AMERICA, 2016).

Os fatores genéticos compreendem cerca de 40-70% do risco para uso e abuso de drogas, sendo que grande parte dos genes já estudados estão relacionados com receptores, neurotransmissores ou proteínas que fazem parte da neurobiologia da adicção. Por exemplo, o poliformismo em genes que codificam o receptor D₂ e o receptor canabinoide CNR1, estão relacionados com aumento da susceptibilidade para o uso de álcool e cocaína, respectivamente (DEMERS et al., 2014; ZHONG et al., 2015; DRGONOVA et al., 2015; OUZIR, et al., 2019).

Outro fator de risco para o uso de drogas é o histórico familiar. Cerca de 50% dos mecanismos genéticos são hereditários, mas evidências sugerem que as interações sociais e familiares também podem aumentar a vulnerabilidade do indivíduo a adicção, uma vez que estado civil dos pais, condição socioeconômica da família, e até mesmo abuso e negligência na relação pais-filhos podem promover um ambiente hostil que ativa os sistemas de estresse do cérebro (WHITESSELL et al., 2012; KENDLER et al., 2019).

A exposição precoce ao uso de drogas também pode ser um facilitador para o desenvolvimento do transtorno por uso de substâncias, pois durante a adolescência o cérebro é particularmente vulnerável à exposição de substâncias, devido à intensa plasticidade que ocorre neste período (SQUEGLIA et al., 2017). Outros fatores de risco incluem doenças psiquiátricas, alteração nos níveis de fatores neurotróficos, alterações hormonais, estresse, sensibilidade alterada a estímulos relacionados ao sistema de recompensa, acesso às drogas (SINHA et al., 2011; PIERCE et al., 2018).

Essa grande heterogeneidade na susceptibilidade para o uso de drogas também promove diferenças na intensidade e na frequência de uso da droga e seus dados associados, o que contribui para a complexidade do tratamento. Entender a natureza e a severidade do transtorno do paciente é de extrema importância na determinação do tratamento que pode ser por intervenção comportamental, farmacológica ou ambos (NUTT et al., 2010; FACING ADDICTION IN AMERICAN, 2016).

A intervenção farmacológica tem como principal função diminuir os sintomas da síndrome de abstinência e aumentar a adesão do paciente ao tratamento, sendo as mais utilizadas a terapia de substituição e a terapia antagonista (LIN et al., 2003; VOKOW AND BALER, 2006; FACING ADDICTION IN AMERICAN, 2016). A terapia de substituição ou terapia agonista é baseada em fármacos que atuam nos mesmos mecanismos moleculares que a droga de abuso, porém com menor efeito deletério. Alguns exemplos são a metadona e a buprenorfina, utilizadas no tratamento de adicção a heroína, e adesivos de nicotina, utilizados no tratamento de adicção ao tabaco. Já a terapia antagonista é utilizada para bloquear os efeitos da droga de abuso. Essa terapia é utilizada principalmente no tratamento de adicção aos opióides, sendo os principais fármacos utilizados a naloxona e a naltrexona (LIN et al., 2014; VOKOW AND BALER, 2006; FACING ADDICTION IN AMERICAN, 2016).

Apesar do número de pessoas que usam drogas estar aumentando de forma drástica, as opções de tratamentos não têm se desenvolvido na

mesma magnitude. Apenas 1 a cada 6 pessoas que sofrem com o transtorno por uso de substâncias recebeu tratamento em 2016, além da taxa de adesão ser extremamente baixa, com abandono de quase 90% (FERNANDES et al., 2017; WORLD DRUG REPORT, 2018). E ainda, as abordagens farmacológicas disponíveis afetam funções fisiológicas do cérebro, além de serem incapazes de prevenir recaídas (CHEN et al., 2016).

É nítida a forma como o transtorno por uso de substâncias tem gerado grandes gastos, tanto em termos econômicos quanto em termos sociais. Neste contexto, são necessários estudos que investiguem os mecanismos fisiopatológicos associados à adicção. Uma melhor compreensão da sua neurobiologia é essencial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e também para a descriminalização dos usuários de drogas, de modo a deslocá-los do âmbito criminal para o da saúde.

1.2 COCAÍNA E ADICÇÃO

O uso de cocaína é registrado em escavações arqueológicas há pelo menos 4.500 anos, datando de quando civilizações andinas utilizavam a folha de coca em rituais religiosos. Para estas civilizações, o Deus Sol (Inti) enviou seu filho Manco Capac para a terra, que desceu sobre as águas do lago Titicaca e lhes presenteou com as folhas de coca e o ensinamento de técnicas agrícolas (PIAZZA et al., 1989; BAILEY, 1996).

A cocaína é extraída das folhas *Erythroxylon coca* e *Erythroxylon novogratense*, encontradas na América do Sul e na região alta dos Andes, sendo cultivada em clima tropical e altitudes que variam entre 450 e 1.800 m acima do nível do mar. Recebeu a denominação “coca”, por ser derivada da palavra aimará “*Khoka*” cujo significado é “árvore” ou “planta”, termo que foi designado por índios bolivianos conquistados pelos Incas no século X. No início, o uso da planta era exclusividade da elite Inca, que a mastigava ou consumia em forma de chá para aumentar força e

resistência, além de proporcionar euforia. Porém, na época colonial seu uso foi popularizado entre os demais índios e com a colonização hispânica, ela foi introduzida na Espanha para fins medicinais e afrodisíacos (KARCH, 1989; BAILEY, 1996; HAAS, 1995; AKERELE et al., 2017; OLIVEIRA and DINIS-OLIVEIRA, 2018).

Friedrich Gaedecke conseguiu o extrato das folhas *Erythroxylene* em 1859 e em 1855, o químico alemão Albert Niemann isolou a cocaína pura e a descreveu como uma substância cristalizada e com sabor amargo característico de substâncias alcalóides (MARK and CREGLER, 1986; KARCH, 1989). Porém somente em 1898 é que foi descoberta a fórmula exata da estrutura química da cocaína (figura 6) (MARK and CREGLER, 1986; KARCH, 1989), que em 1902 foi sintetizada pela primeira vez por Willstatt, sob a forma de um pó branco e cristalino (MARK and CREGLER, 1986; BAILEY, 1996; JAY, 2015).

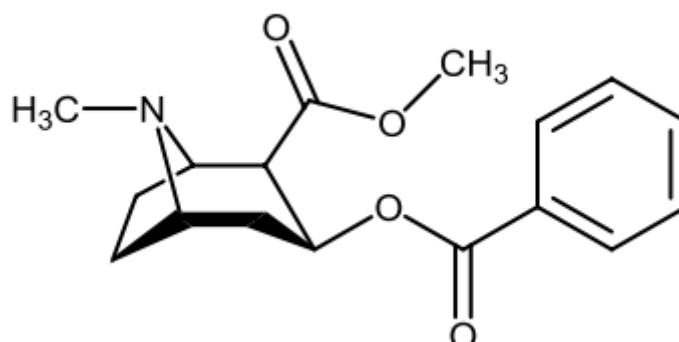


Figura 6: Fórmula estrutural da cocaína (Adaptado de Oliveira et al., 2018).

Em 1884, houve um aumento da popularização da cocaína, uma vez que Sigmund Freud lançou um livro chamado “Über Coca”, no qual ele recomendava a droga no tratamento de diversas doenças como depressão, histeria, exaustão e nervosismo, doenças digestivas, alcoolismo, entre outras (JAY, 2015). Além disso, o médico Dr. Carl Koller investigou os efeitos da cocaína como anestésico e apresentou seus resultados na Sociedade Médica de Viena. No mesmo ano, ela foi utilizada por William Haseld pela primeira vez para o bloqueio do nervo vago, o que contribuiu ainda mais para sua divulgação (BAILEY, 1996;

REDMAN, 2011; JAY, 2015). Em seguida, em 1885, a Parke Davis Company começou a comercializar a cocaína em larga escala, sendo a mesma considerada um fármaco milagroso e utilizado no tratamento de dores, cansaço e até mesmo como substituto alimentar. Isso acarretou um livre comércio da cocaína em forma de cigarros, charutos e inalantes, dentre outros, que eram encontrados em farmácias, bares e mercearias (KARCH, 1989; HAAS, 1995).

Porém, no século XX, o uso de seringas hipodérmicas, que facilitavam a chegada da cocaína na circulação sanguínea, associado à ausência de leis que regulamentassem a sua venda, promoveu o aumento de episódios de dependência, intoxicação, tolerância e morte; eventos que começaram a ser relatados em revistas médicas. Em consequência, foram necessárias medidas de intervenção para limitar e/ou proibir a comercialização da cocaína e de outras drogas em vários países (MARK and KREGLER, 1986; KARCH, 1989; BAILEY, 1996).

O número de usuários de cocaína chegou a 18.2 milhões em 2016, um aumento de 7% em relação a 2015, sendo um dos motivos o aumento de 76% das áreas de cultivo das plantas de coca no período de 2013 a 2016. Como consequência, a produção global de cocaína bateu seu recorde em 2016, chegando a 1.410 toneladas, um aumento de 25% em relação ao ano anterior (WORLD DRUG REPORT, 2018).

Os maiores produtores de cocaína são a Colômbia, o Peru, e a Bolívia. Devido à localização geográfica do território brasileiro, 60% da droga produzida na Colômbia é destinada ao Brasil, o que juntamente com outros fatores, fez com que o Brasil se tornasse o 2º maior consumidor de cocaína do mundo, perdendo apenas para os Estados Unidos. Dessa forma, o número de usuários de cocaína chegou a 3,2 milhões no Brasil em 2014 (ABDALLA et al., 2014; WORLD DRUG REPORT, 2018). Estes dados são alarmantes, uma vez que a cocaína é responsável por 40% dos atendimentos emergenciais relacionados a drogas de abuso, e classificada como a 2ª droga mais prejudicial, além de ser uma das drogas ilícitas mais relacionadas com a violência associada

ao tráfico (NUTT et al., 2007, ABDALLA et al., 2014; AKERELE et al., 2017).

De acordo com uma revisão sistemática por metanálise publicada por Chan e colaboradores (2018), os tratamentos farmacológicos disponíveis e em estudo para o tratamento de adicção por psicoestimulantes não apresentam eficácia em reduzir a quantidade de droga utilizada, amenizar a abstinência e aumentar a taxa de adesão. Dessa forma, o desenvolvimento de estratégias eficazes no tratamento da adicção por cocaína tem se mostrado um grande desafio (CHEN et al., 2016).

O uso recreacional da cocaína ocorre devido aos efeitos de euforia, prazer, aumento no desempenho de atividades motoras e intelectuais, e perda da sensação de cansaço. Seus efeitos psicoestimulantes são causados principalmente pelo aumento de dopamina na via mesocorticolímbica (BAILEY 1996; VOLKOW et al., 1999; WOOD et al., 2007; GARAVAN et al., 2008). Seu mecanismo de ação consiste no bloqueio dos transportadores de membrana das monoaminas serotonina, noradrenalina e, em especial, a dopamina (figura 7), o que aumenta a disponibilidade destes neurotransmissores na fenda sináptica e a potencialização de seus efeitos em seus respectivos receptores. Além disso, a cocaína interage de forma indireta com outros circuitos neuromodulatórios, como o glutamatérgico, endocabinoide e GABAérgico (MATSUI and ALVAREZ; 2018).

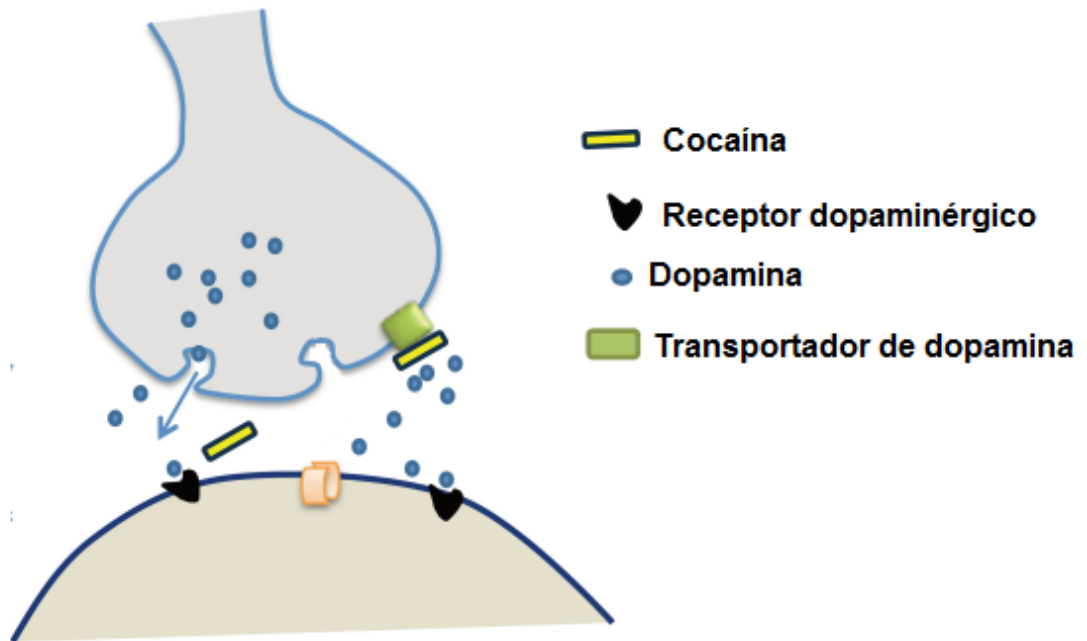


Figura 7: Aumento da disponibilidade de dopamina na fenda sináptica devido ao mecanismo de ação da cocaína, que consiste no bloqueio de transportadores das monoaminas (Adaptado de McCarthy et al., 2012).

Os níveis elevados de dopamina levam a um aumento de sua sinalização principalmente via receptores D₁ e D₂, que são receptores metabotrópicos. Esses modulam vias de sinalização intracelular e fatores de transcrição como delta FosB (Δ FosB), fator de transcrição regulada pelo AMPc (CREB, *cAMP response element-binding*), fator potenciador de miócito 2 (MEF2, *myocyte enhancer factor-2*) e fator nuclear kappa B (NF κ B, *nuclear factor κ B*), que estão relacionados com alterações na expressão de genes e proteínas (PULIPPARACHARUVIL et al., 2008; RUSSO et al., 2009; HASBI et al., 2018). Dessa forma, a cocaína é capaz de modificar cascatas de sinalização que estão relacionadas a neuroplasticidade, como por exemplo a via de sinalização da quinase regulada por sinal extracelular (ERK, *extracellular signal-regulated kinase*) e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*). Essa droga regula também atividades sinápticas glutamatérgicas que envolvem processos de potencial de longa duração (LTP, *long-term potentiation*) e depressão de longa duração (LTD, *long-term depression*) (LI and WOLF, 2015; HASBI et al., 2018; PRESTON et

al., 2019; RICH et al., 2019). Assim, a cocaína induz adaptações em processos de memória e aprendizado, relacionados com o reforço positivo no sistema de recompensa, sendo considerada uma das drogas com maior potencial de abuso. Por isso, apesar de seus efeitos deletérios, a cocaína continua sendo uma das drogas mais utilizadas no mundo (NUTT et al., 2007; KUTLU and GOULD, 2016).

1.3 MICRÓGLIA E ADICÇÃO

A micróglia foi estudada pela primeira vez por Nissl em 1899, que a descreveu como entidade celular distinta, com capacidade migratória e fagocítica, sendo chamada de Stäbchenzellen, ou *rod cells*, devido a forma de seu núcleo. Já em 1913, Ramón y Cajal denominou a micróglia, juntamente com os oligodendrócitos, de “terceiro elemento”, sendo os neurônios e os astrócitos os primeiros e segundos elementos, respectivamente. Logo depois, Pío del Rio-Hortega introduziu em 1932 o termo “micróglia” e as caracterizou fenotipicamente (KETTENMANN et al., 2011; GLIAL PHYSIOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY, 2013; PEREZ-CERDÁ et al., 2015).

Os microglíocitos ou micróglia são células residentes do sistema imunológico que constituem cerca de 5-10% das células cerebrais, e em seu estado quiescente são caracterizadas por uma morfologia altamente ramificada e com um pequeno soma celular. Estão presentes no parênquima cerebral, sendo capazes de interagir com neurônios, astrócitos e oligodendrócitos; e juntamente com os macrófagos perivascularares, ocupam nichos estratégicos, cobrindo todo o SNC (LI and BARRES, 2017; FRANK et al., 2019).

A micróglia é capaz de detectar alterações no cérebro através de seus receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, *pathogen-associated molecular pattern*) levando a uma resposta inflamatória. Neste processo, a micróglia exerce uma função neuroprotetora com o objetivo de trazer novamente a homeostase desse tecido (LANNES et al., 2017; GUPTA et al., 2018). Uma vez expostas a patógenos, estas células se

polarizam em um fenótipo reativo com alta atividade fagocítica, sendo caracterizadas por uma morfologia “amebóide”, com corpo celular maior e formato arredondado; e ramificações mais curtas e grossas (AKIRA et al., 2006; RAWJI et al., 2016,). Além disso, ocorre um aumento de moléculas como as citocinas e do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, major histocompatibility complex) (GUPTA et al., 2018). Essas características morfológicas e perfil secretório específico ocorrem devido à capacidade da micróglia de exercer funções como fagocitose de neurônios em apoptose e debris celulares, proteção do cérebro contra infecções, eliminação do patógeno e reparo tecidual (AKIRA et al., 2006; RAWJI et al., 2016).

Para melhor entendimento do fenótipo reativo da micróglia, sua polarização era classificada em M1 e M2, baseado no paradigma da polarização dos macrófagos. Neste modelo, ao ser estimulada com lipossacarídeos (LPS) ou interferon-gama (IFN- γ), a micróglia se polarizaria para um perfil pró-inflamatório ou “tóxico” chamado M1, que resultaria na liberação de citocinas inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF, *tumor necrose factor*), interleucina (IL)-1 β e óxido nítrico (NO, *nitric oxide*). Por outro lado, ao ser estimulada com IL-4 ou IL-13, a micróglia se polarizaria em um fenótipo anti-inflamatório ou “protetor” chamado M2, que promoveria o remodelamento tecidual através da liberação de fatores como IL-10 e arginase-1 (MURRAY et al., 2014; MARTINEZ and GORDON, 2014; RANSOHOFF, 2016; GINHOUX et al., 2016). Porém estudos têm demonstrado que este modelo linear é falho e não explica a polarização microglial, uma vez que este processo é extremamente dinâmico e que há alterações de expressão gênica, propriedades eletrofisiológicas, morfologia e motilidade, o que possibilita mudanças funcionais de acordo com os estímulos e condições do ambiente. Dessa forma, esse amplo espectro de ativação da micróglia lhe confere uma versatilidade em participar de diferentes processos cerebrais (XUE et al., 2014; RANSOHOFF, 2016; GINHOUX et al., 2016).

Durante anos, a micróglia foi erroneamente considerada uma célula estática quando presente em um ambiente saudável, e seus estudos

eram focados para compreensão apenas de seu papel fagocítico e imunológico na resolução de infecções, com funções homeostáticas mínimas. Porém com o advento de tecnologias que permitem, por exemplo, uma análise de imagens em tempo real, houve crescimento das pesquisas que buscam entender as interações fisiológicas entre o sistema imunológico e o cérebro (NIMMERJAHN et al., 2005; WAKE et al., 2009; CROTTI et al., 2016).

Estudos têm demonstrado que, além de sua função neuroinflamatória como resposta a danos teciduais, a micróglia desempenha um importante papel no estabelecimento e remodelação de circuitos neuronais, participando ativamente de processos como neurogênese, morte celular programada, plasticidade sináptica, sobrevivência e proliferação celular (figura 8). Esse conhecimento contribuiu para a compreensão de sua participação no neurodesenvolvimento e em doenças do SNC (CHOI et al., 2008; CUNNINGHAM et al., 2013; MORSCH et al., 2015; WU et al., 2015; WHITELOW, 2017).

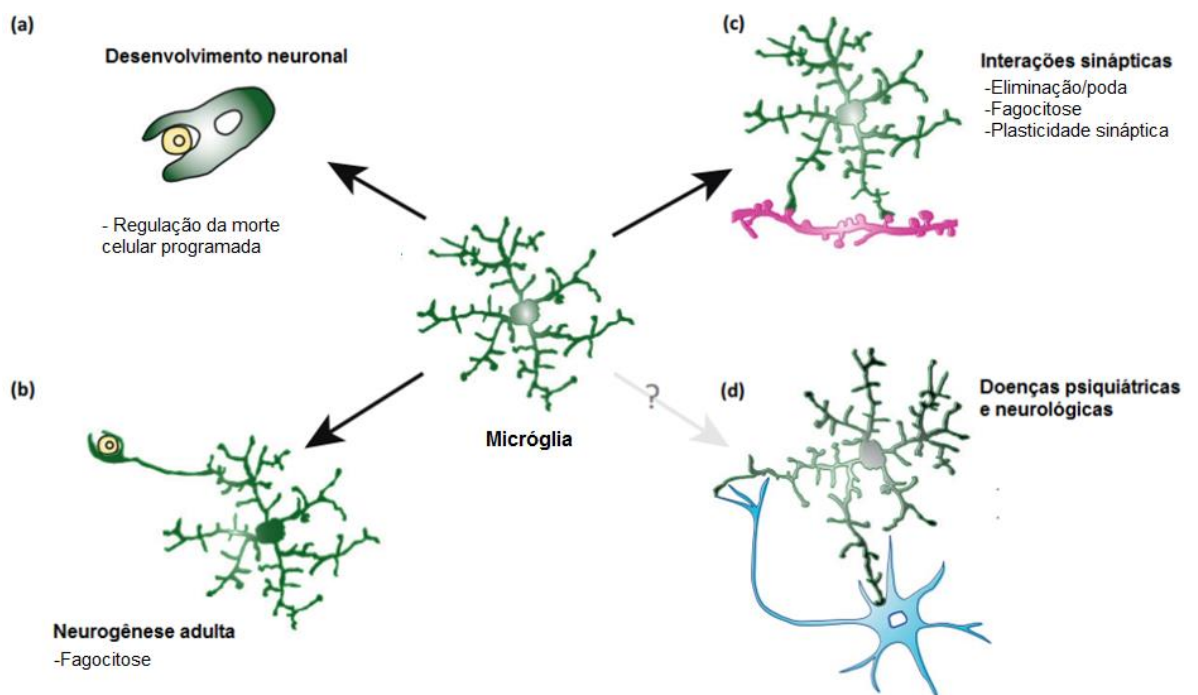


Figura 8: Participação da micróglia em processos fisiológicos e patológicos. Estudos demonstraram a capacidade da micróglia de participar de processos do desenvolvimento

neuronal (a), da neurogênese adulta (b), e de interações sinápticas (c), permitindo uma melhor compreensão do papel da micróglia em doenças psiquiátricas e neurológicas (d) (Adaptado de Wake et al., 2013).

A micróglia tem sido reconhecida como um importante regulador da plasticidade sináptica, devido a sua capacidade de alterar elementos pré e pós- sinápticos que mudam a morfologia das sinapses, por meio da liberação de fatores tróficos ou até mesmo pelo contato micróglia-neurônio (WU et al., 2015). Esse remodelamento sináptico pode ocorrer por sinalizações que induzem a proliferação e a sobrevivência celular, como por exemplo, aquelas que envolvem IL-9, IL-10, BDNF e fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1, *insulin-like growth factors* 1). Por outro lado, sinalizações que envolvem TNF- α e IFN- γ são capazes de estimular a poda sináptica, que ocorre para eliminar o excesso de sinapses imaturas que são produzidas (BEATTIE et al., 2002; FONTAINE et al., 2008; PARKHURST et al., 2013; UENO et al., 2013; LIM et al., 2013; HAGEMeyer et al., 2017).

Outra forma de remodelamento sináptico é pelo contato micróglia-neurônio, que é modulado por alguns receptores como de fractalquina CX3CR1, o receptor de complemento CR3 e receptores purinérgicos. A micróglia é capaz de fagocitar espinhas dendríticas, de trogocitar pequenas porções de axônios e de estimular a formação de filopódios modulando a conexão neuronal (figura 9) (ROGERS et al., 2011; SHAFER et al., 2012; STEPHAN et al., 2012; SIPE et al., 2015; EYO et al., 2016; WEINHARD et al., 2018).

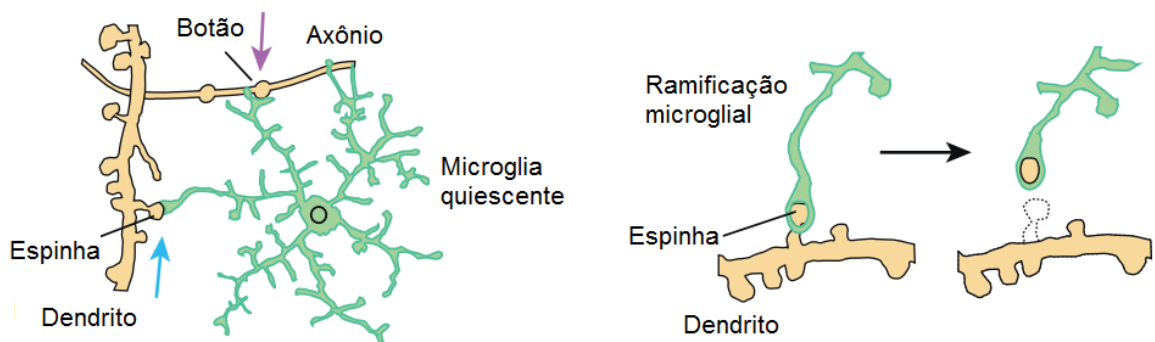


Figura 9: A micróglia estimula a formação de filopódios e fagocita elementos sinápticos (Adaptado de Wake et al., 2013).

Dessa forma, a micróglia parece ser indispensável na participação das alterações neuroplásticas que ocorrem nos processos de memória e aprendizado, e em aspectos do comportamento adaptativo, que fazem parte do modelo de adicção como doença. Além disso, a micróglia expressa diferentes canais iônicos e receptores de neurotransmissores, encontrados em neurônios, o que lhe confere a capacidade de responder às alterações neuroquímicas induzidas pela administração de drogas (KENTTEMANN et al., 2011; PARKHURST et al., 2013; WILIAMSON et al., 2011; BACHTTELL et al., 2017; COTTO et al., 2018).

Nesse contexto, as drogas de abuso são reconhecidas como substâncias exógenas que, ao atravessarem a barreira hematoencefálica, são capazes de induzir uma neuroinflamação crônica e persistente, caracterizada por alterações na expressão de citocinas no SNC, como aumento de IFN- γ , CCL2 e CCL5, e diminuição da CX3C (SCHWARZ et al., 2013; NORTH CUTT et al., 2015; LASHKARIZADEH et al., 2015, LACAGNINA et al., 2017; BROWN et al., 2018).

Um dos possíveis mecanismos envolvidos é a ativação direta ou indireta, pela cocaína, dos receptores tipo toll 4 (TLR4, *toll-like receptors 4*) presentes na micróglia, culminando na translocação de fatores como o NF- κ B e consequente transcrição de citocinas, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Dessa forma, o TLR4 participaria da modulação dos efeitos agudos motivacionais de drogas como etanol, cocaína e opióides (BATCHELL et al., 2015; CREWS et al., 2017). Outro possível receptor envolvido é o μ opióide, que está relacionado com a sensação de euforia e reforço positivo causado pelas drogas. Pesquisas demonstraram que este receptor está associado com quimiocinas como CCL3, CCL4, CCL5 e com o receptor CCR5 e seus ligantes (CONTET et al., 2004; MAHAJAN et al., 2005; AVDOSHINA et al., 2010).

Diferentes estudos mostraram que o bloqueio farmacológico da atividade microglial reverte os comportamentos induzidos por drogas em testes comportamentais. Poland e colaboradores (2016) utilizaram um

anti-inflamatório inibidor da fosfodiesterase, chamado ibudilast, que foi capaz de atenuar a sensibilização comportamental induzida por cocaína. Já Northcutt e colaboradores (2015) mostraram que o tratamento com minociclina, um antibiótico do grupo das tetraciclina, foi capaz de diminuir a taxa de preferência induzida por cocaína no teste de preferência condicionada ao lugar. Os mesmos resultados foram obtidos por Hutchinson e colaboradores (2008 e 2009) utilizando as duas drogas em modelos de adicção por opióides; e Syapin e colaboradores (2016) utilizando a minociclina em modelo de adicção por álcool.

Apesar dessas drogas apresentarem atividades anti-inflamatórias, as mesmas possuem outros alvos farmacológicos, o que dificulta a compreensão de seu exato mecanismo de ação. Por exemplo, a minociclina é capaz de diminuir a sinalização de cálcio glutamatérgico e potencializar a fosforilação da subunidade GluR1 do receptor α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA), promovendo alterações na via glutamatérgica, que é extremamente importante nos processos de aprendizado e memória (GONZALÉZ et al., 2007; IMBESI et al., 2008).

Nesse contexto, o uso de modelos de depleção microglial é importante para uma melhor compreensão do papel dessas células em diversos processos fisiológicos (HAN et al., 2017; GUTTENPLAN et al., 2018). São utilizados modelos genéticos, como por exemplo, animais CD11b-HSVTK e CX3CR1^{CreER}; e modelos farmacológicos onde os animais são tratados com diferentes drogas como, por exemplo, o PLX3397, GW2580, clodronato lipossomal e mac-1-SAP (PARKHURST et al., 2013; ELMORE et al., 2014; BRUTTGER et al., 2015; HAN et al., 2017; HAN et al., 2019).

O PLX3397 é uma droga que se encontra em fase clínica Ib/IIa para o tratamento de tumores estromais gastrointestinais. Seu mecanismo de ação consiste na inibição do receptor CSF1R, que é essencial para a viabilidade microglial (ELMORE et al., 2014; BUTOWSKI et al., 2017). Assim a administração crônica dessa droga promove a depleção dessas células.

Embora existam evidências científicas de que a micróglia possa participar das adaptações induzidas por drogas (BACHETLL et al., 2015; CREWS et al., 2017), os estudos nesta área ainda são escassos. Dessa forma, é necessária uma melhor elucidação de seu papel na neurobiologia da adicção para o desenvolvimento de possíveis terapias.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Testar hipótese de que a micróglia participa das alterações comportamentais induzidas por cocaína nos testes de sensibilização comportamental e preferência condicionada ao lugar.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar os testes de sensibilização comportamental, hiperlocomoção condicionada e preferência condicionada ao lugar induzidos por cocaína em camundongos Swiss no laboratório de Neurofarmacologia da UFMG.
- Testar a hipótese de que a depleção da micróglia é capaz de reverter a sensibilização comportamental e a preferência condicionada ao lugar.
- Quantificar as células microgлияis no núcleo accumbens e no hipocampo de animais tratados com depletor de micróglia e submetidos a sensibilização comportamental.
- Avaliar o índice de ativação das células microgлияis no núcleo accumbens e no hipocampo de animais tratados com depletor de micróglia e submetidos a sensibilização comportamental.
- Avaliar a produção de fatores neurotróficos no PFC, hipocampo e estriado de animais tratados com depletor de micróglia e submetidos a preferência condicionada ao lugar.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss, machos, com idade entre 8 e 9 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO-ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais ficaram alojados em gaiolas plásticas e tiveram livre acesso a água e comida, sendo mantidos em ciclo claro/escuro a cada 12 horas com temperatura local de 24 °C. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação com animais, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, sendo este projeto aprovado pelo protocolo CEUA nº 231/2018.

3.2 Drogas

Para a realização do presente estudo, foram utilizadas as seguintes drogas: cocaína (Merck & Co.Inc.®) diluída em solução salina (NaCl 0,9%); pexidartinib (PLX3397 – MedChemExpress) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO - Neon) 1%, polietileno glicol 300 (PEG-300 - Synth) 45%, Tween-80 5% e solução salina; cloridrato de cetamina 10% (Syntec, Brasil); e cloridrato de xilazina 2% (Syntec, Brasil). A cocaína foi doada gentilmente pelo Prof. Dr. Fabrício Moreira, do grupo de pesquisa de Neuropsicofarmacologia, sendo que foram utilizadas aproximadamente 208 mg dessa droga.

3.3 Testes comportamentais

3.3.1 Sensibilização comportamental

No teste de sensibilização comportamental, os animais foram submetidos ao campo aberto para avaliação da atividade locomotora. O equipamento consiste em uma arena circular com aproximadamente 120 cm de diâmetro, circundada por uma parede circular de 45 cm de altura. Os animais foram colocados individualmente no centro da arena e foi

avaliada a distância total percorrida por 30 minutos durante 7 dias (LEWITUS et al., 2016; SMITH et al., 2016).

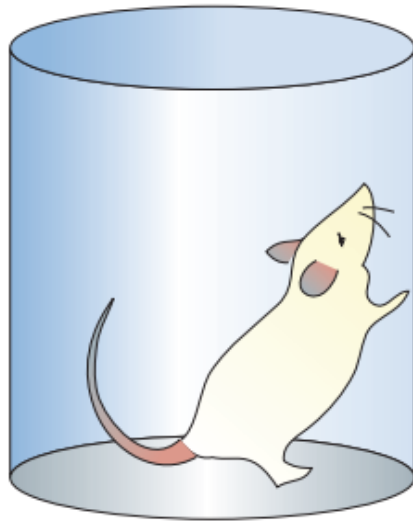


Figura 10: Desenho representativo da sensibilização comportamental (Adaptado de Brooks and Dunnet, 2009).

No protocolo 1, foi feita uma padronização do modelo comportamental no laboratório de Neurofarmacologia, no qual os animais foram habituados na arena nos dias 1 e 2. Já do 3º ao 7º dia, os animais foram tratados com cocaína na dose de 15 mg/kg por via intraperitoneal (i.p.) ou solução salina, e imediatamente colocados no aparato. A arena foi limpa com álcool 70% entre os testes com cada animal, bem como as fezes de cada roedor foram retiradas da caixa antes do teste seguinte. O teste foi filmado e analisado pelo software ANY-maze (versão 6.0).

Protocolo 1: Sensibilização comportamental

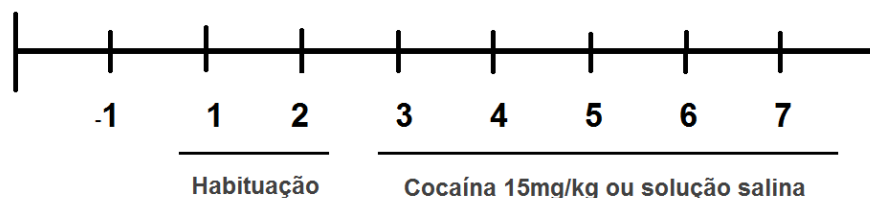


Figura 11: Protocolo da padronização da sensibilização comportamental.

No protocolo 2, os animais foram tratados com a droga PLX3397 (40 mg/kg) por via *per os* (*p.o.*) (ELMORE et al., 2014; JIN et al., 2018) ou veículo uma vez ao dia, iniciando 1 dia antes do teste e com duração de 7 dias. Em seguida o protocolo foi realizado normalmente, com os 2 primeiros dias sendo feita apenas a habituação do animal e do 3º ao 7º dia o tratamento com cocaína ou solução salina. Para se prevenir a influência do estresse induzido pela administração da droga, diariamente o tratamento com o PLX3397 era realizado após os testes comportamentais.

Protocolo 2: Sensibilização comportamental

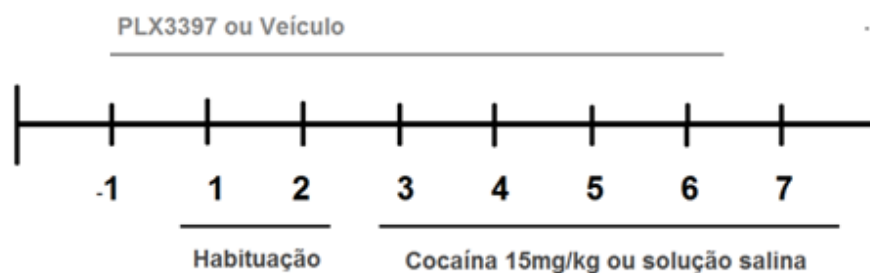


Figura 12: Protocolo do teste de sensibilização comportamental em animais tratados com PLX3397 ou veículo.

3.3.2 Hiperlocomoção condicionada

O teste de hiperlocomoção foi padronizado de forma semelhante ao teste de sensibilização comportamental. Nos dias 1 e 2 os animais foram colocados no campo aberto para habituação durante 30 minutos, e do 3º ao 7º dia os animais foram tratados com cocaína (15 mg/kg, *i.p.*) ou solução salina e imediatamente colocados na arena. Nos dias 8 e 9 os animais permaneceram em suas gaiolas e não receberam nenhum tratamento. No 10º dia todos os animais foram tratados com solução salina e colocados novamente no aparato para avaliação da atividade locomotora (MICHEL and TIRELLI et al., 2002).

A arena foi limpa com álcool 70% entre os testes com cada animal, bem como as fezes de cada roedor foram retiradas da caixa antes do teste seguinte. O teste foi filmado e analisado pelo software ANY-maze.

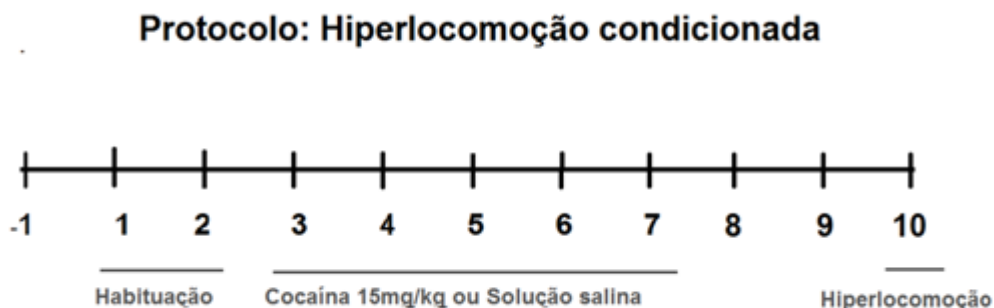


Figura 13: Protocolo da padronização da hiperlocomoção condicionada.

3.3.3 Preferência condicionada ao lugar

O teste de preferência condicionada ao lugar consiste de três fases: pré-teste, condicionamento e teste (BARDO et al., 2015; SMITH et al., 2016). No pré-teste (dia 1) os animais foram colocados de forma individual no corredor central (9,5 cm de comprimento, 5 cm de largura e 12 cm de altura) de uma caixa de acrílico que contém outros dois lados de dimensões iguais (15 cm de comprimento, 12 de largura e 12 de altura), podendo explorar livremente os três compartimentos. O pré-teste foi filmado e foi avaliado o tempo gasto dentro de cada compartimento durante 15 minutos, pelo software ANY-maze. Os camundongos que gastaram mais de 70% do tempo explorando um dos lados foram excluídos da próxima análise para que o condicionamento não tivesse nenhum viés.

A fase de condicionamento teve duração de 6 dias, e os animais foram tratados com cocaína ou solução salina em dias alternados em um lado da caixa. Nos dias 2, 4 e 6 os animais foram tratados com cocaína e imediatamente confinados em um lado da caixa, onde permaneceram por 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. A escolha de qual animal receberia cocaína em qual lado da caixa foi feita de maneira randomizada.

No dia do teste (dia 8), os animais foram colocados novamente no corredor central e puderam explorar livremente o ambiente durante 15 minutos. O teste foi filmado e foi avaliado o tempo de exploração de cada compartimento. O resultado foi apresentado como taxa de preferência (s) e o cálculo utilizado foi a subtração do tempo que cada animal permaneceu no lado pareado com a cocaína no dia do teste, pelo tempo gasto neste mesmo lado no dia do pré-teste.

O aparato foi limpo com álcool 70% entre os testes com cada animal, bem como as fezes de cada roedor foram retirados da caixa antes do animal seguinte, todos os dias.

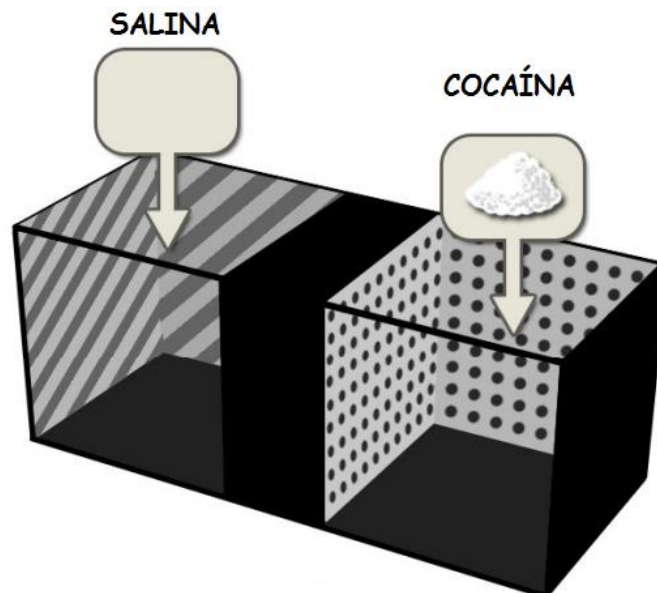


Figura 14: Desenho representativo da preferência condicionada ao lugar (Adaptado de Castilla-Ortega et al, 2017).

No protocolo 1 foi realizada a padronização deste modelo comportamental no Laboratório de Neurofarmacologia com cocaína (15 mg/kg, i.p.).

Protocolo 1: Preferência Condicionada ao Lugar

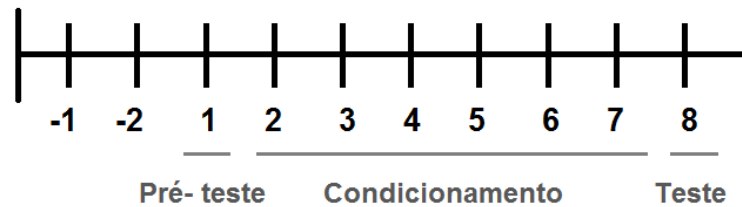


Figura 15: Protocolo da padronização da preferência condicionada ao lugar.

No protocolo 2, os animais foram tratados com a droga PLX3397 (40 mg/kg, *p.o.*) ou veículo por 9 dias, sendo o tratamento iniciado 2 dias antes do pré-teste, e realizado após o teste comportamental.

Protocolo 2: Preferência Condicionada ao Lugar

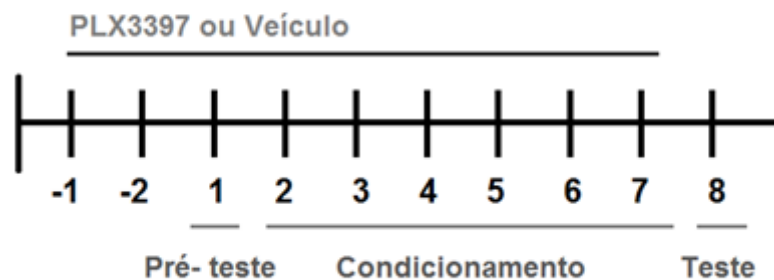


Figura 16: Protocolo da preferência condicionada ao lugar de animais tratados com PLX3397 ou veículo.

3.4 Perfusão transcardíaca e preparo do cérebro para avaliações histológicas

Ao final de cada teste comportamental (exceto os animais do protocolo 2 de Preferência Condicionada ao Lugar), os animais foram anestesiados por via *i.p.* com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg), e em seguida foi realizada uma toracotomia para exposição da cavidade torácica e visualização do coração. Posteriormente, foi inserida uma agulha hipodérmica conectada a um sistema de perfusão (Bomba

peristáltica - Insight®) no ventrículo direito, permitindo a troca do sangue por uma solução de tampão fosfato em salina (PBS – pH 7,4), a uma taxa de perfusão de 4 mL/min. Após a perfusão de cerca de 30 mL de PBS, os animais foram perfundidos com solução de paraformaldeído 4% (PFA – pH 7,4).

Logo após a perfusão, os animais foram decapitados e seus encéfalos foram retirados para os processos de pós-fixação, crioproteção e congelamento. O processo de pós-fixação consiste na estocagem dos encéfalos em solução de PFA 4% durante a noite. Posteriormente, os cérebros foram colocados em solução de sacarose 30% para desidratação das células, até a saturação, promovendo então uma crioproteção. E por fim, os cérebros foram cortados, dividindo seus dois hemisférios, congelados em isopentano 99% e gelo seco, e estocados em freezer de -80°C.

Para o preparo dos cortes histológicos, o hemisfério esquerdo foi cortado em um criostato (Leica) a -20 °C na espessura de 30 µm e os cortes foram armazenados em solução anticongelante (etilenoglicol 24%; glicerol 24%; NaH₂PO₄ 0,1256%; Na₂HPO₄ 0,436% diluídos em PBS) a -20 °C.

3.5 Retirada de tecidos a fresco para ELISA

Após o término do Protocolo 2 da Preferência Condicionada ao Lugar, os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca apenas com PBS e seus encéfalos foram retirados e cortados ao meio. O hemisfério direito foi imerso em solução de PFA 4% e depois submetido aos processos de crioproteção e congelamento, conforme descrito anteriormente. Já o hemisfério esquerdo foi dissecado para retirada do PFC, hipocampo e estriado, e em seguida foram armazenados a -80 °C.

3.6 Avaliação da micróglia

3.6.1 Marcação de células Iba-1 por imunofluorescência

Para a técnica de imunofluorescência, cortes de NAc e hipocampo de 30 µm foram lavados 3 vezes com tampão tris em salina (TBS) para

retirada da solução anticongelante na qual estavam estocados e foram incubados com tampão citrato (pH 7,6) durante 1 hora para recuperação antigênica. Os cortes foram novamente lavados 3 vezes com TBS e incubados com solução de bloqueio (4% de albumina bovina sérica – BSA e 0,5% de Triton-X 100 em TBS) para bloqueio dos sítios inespecíficos durante 1 hora.

Em seguida, os cortes foram incubados a 4 °C com o anticorpo primário anti-Iba-1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*; 1:500 – Wako) durante 24 horas, lavados 3 vezes com TBS e incubados com o anticorpo secundário anti-coelho Alexa Fluor 594 (1:1000 - Life Technologies) durante 2 horas. Posteriormente, os cortes foram lavados 4 vezes com TBS, incubados com DAPI 1,75 µg/mL (1:1000) durante 20 minutos e lavados com TBS por mais 4 vezes.

Para montagem dos cortes foram utilizadas lâminas gelatinizadas e meio de montagem Fluoromount (Sigma-Aldrich). As lâminas foram observadas no microscópio LSM880 (Axio Imager A2, Carl Zeiss, Alemanha) no aumento de 20X, e com o auxílio de uma câmera digital acoplada ao microscópio, foram retiradas fotos das regiões NAcc, Núcleo Accumbens Shell (NacSh) e na região do Corno de Ammon 1 (CA1) do hipocampo. A quantificação de células marcadas foi realizada pelo software ImageJ 1.52a e os resultados estão representados como número de células positivas por campo.

3.6.2 Marcação de células Iba-1 por imunohistoquímica

Cortes de NAc e hipocampo de 30 µm foram lavados 3 vezes com TBS, incubados com tampão citrato (pH 6,0) durante 1 hora, lavados novamente com TBS, incubados com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 1% durante 15 minutos, para bloqueio da peroxidase endógena, e incubados com solução de bloqueio (BSA 4% e 0,5% de Triton-X 100 em TBS) durante 1 hora.

Em seguida, os cortes foram incubados a 4°C com o anticorpo primário anti-Iba-1 (1:500) durante 72 horas, lavados 3 vezes com TBS e incubados com o anticorpo secundário anti-coelho biotilado (1:500 -

Vector) durante a noite. Depois de lavados com TBS, os cortes foram incubados com o complexo Avidina-Biotina (Vector) durante 1 hora, lavados novamente e revelados com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) em H₂O₂.

Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e em seguida passaram por um processo de diafanização, no qual foram imersos em sequência em soluções de álcool 70%, 80% e 95% durante 3 minutos cada, álcool 100% 2 vezes, durante 4 minutos cada e xileno 2 vezes, durante 5 minutos.

As lamínulas foram montadas com DPX Mountant for Histology (Sigma-Aldrich) e foram observadas no microscópio LSM880 (Axio Imager A2, Carl Zeiss, Alemanha) no aumento de 40 vezes, e com o auxílio de uma câmera digital acoplada ao microscópio, foram retiradas fotos das regiões NAcc, NacSh e CA1. A avaliação da morfologia das células marcadas foi realizada pelo software ImageJ 1.52a, onde foi calculada a razão entre o corpo celular e o tamanho da célula (HOVENS et al., 2014) e os resultados estão representados como índice de ativação. Quanto maior a razão corpo celular/tamanho da célula, maior é o índice de ativação.

3.7 Avaliação dos níveis de fatores neurotróficos

Os PFC, hipocampos e estriados previamente dissecados foram descongelados e tratados com 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 µM; EDTA 10mM; E-64 10 µM e vanadato de sódio 0,5mM diluídos em água destilada] e em seguida centrifugados a 4°C em 14.000rpm durante 20 minutos.

Posteriormente, foi realizado o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) para detecção da concentração dos fatores neurotróficos BDNF, fator neurotrófico derivado da glia (GDNF, *glial cell line-derived neurotrophic factor*) e fator de crescimento do nervo (NGF, *nerve growth factor*), utilizando kits da R&D

Systems (DuoSet), de acordo com os procedimentos descritos pelo fabricante.

3.8 Análise estatística

Foram utilizados 126 animais neste trabalho. A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico Prisma 8.0 (GraphPad, CA, USA). Os dados comportamentais, histológicos e bioquímicos foram analisados pelo teste t de Student não-pareado ou análise de variância de duas vias (Two-way ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Padronização dos modelos comportamentais

4.1.1 O tratamento com cocaína aumentou a atividade locomotora na sensibilização comportamental

A administração aguda de drogas psicoestimulantes, como a cocaína e as anfetaminas, promove alterações comportamentais passíveis de serem avaliadas, sendo uma delas o aumento da atividade locomotora que o animal apresenta. Além disso, a administração repetida da mesma dose da droga ao longo dos dias pode promover alterações plásticas que fazem com que essa hiperlocomoção seja acentuada (KALIVAS e DUFFY, 1990; KOKS, 2015).

Neste contexto, foi realizada a padronização da sensibilização comportamental induzida por cocaína no laboratório de Neurofarmacologia da UFMG. Observou-se que a cocaína, na dose de 15 mg/kg, foi capaz de induzir um aumento agudo da atividade locomotora no dia T1 (primeiro dia de tratamento com cocaína) e de promover a sensibilização comportamental [fator cocaína vs fator dia ($F(1,26)=41,34$; $p<0,0001$), fator cocaína ($F(1,26)=116,40$; $p<0,0001$) e fator dia 1x5 ($F(1,26)=28,57$; $p<0,0001$)] (figura 17).

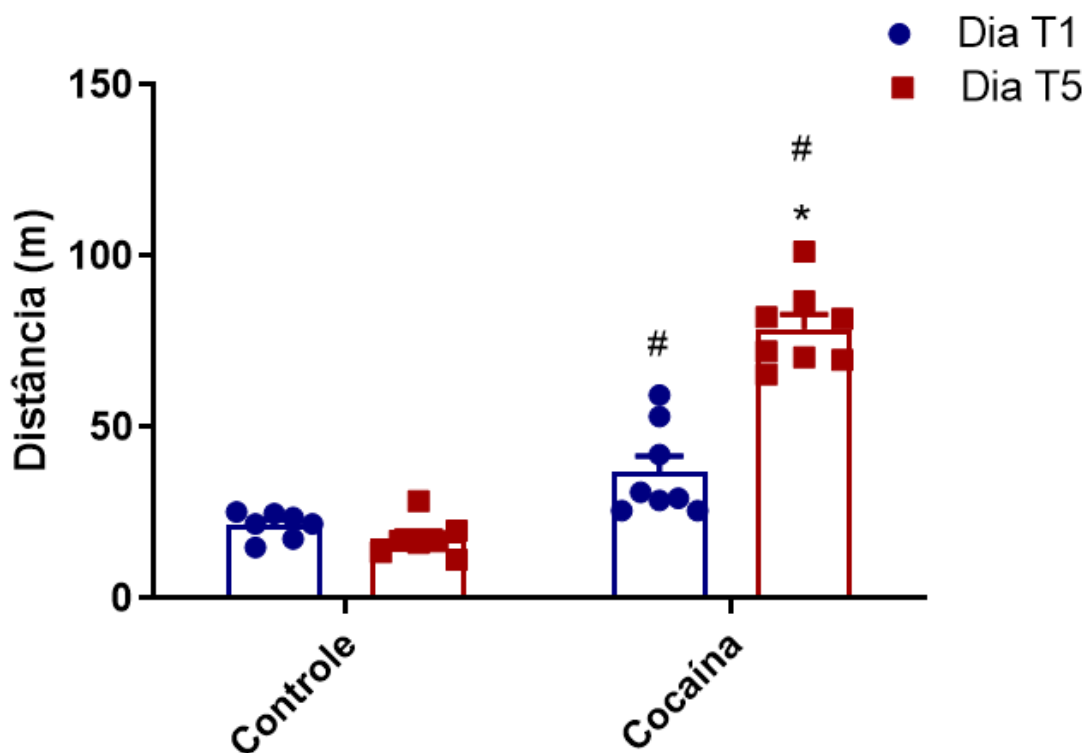


Figura 17: Atividade locomotora dos animais no teste de sensibilização comportamental. Análise da atividade locomotora dos animais tratados com solução salina ou cocaína 15 mg/kg no teste de sensibilização comportamental. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey. * $p < 0,05$ quando comparado com o dia 1; # $p < 0,05$ quando comparado com o controle.

4.1.2 O tratamento com cocaína foi capaz de promover um aumento na hiperlocomoção condicionada

A hiperlocomoção condicionada é outra forma de avaliar as mudanças plásticas que os psicoestimulantes podem induzir, uma vez que o animal irá apresentar alterações locomotoras ao ser exposto às “pistas” associadas à droga (KALIVAS e DUFFY, 1990). Dessa forma, a reexposição ao ambiente e sua pista associada (injeção de solução salina), foi capaz de aumentar a atividade locomotora de animais tratados previamente com cocaína 15 mg/kg, quando comparados aos animais tratados previamente com solução salina ($t=5,754$; $df=13$; $p < 0,0001$) (figura 18).

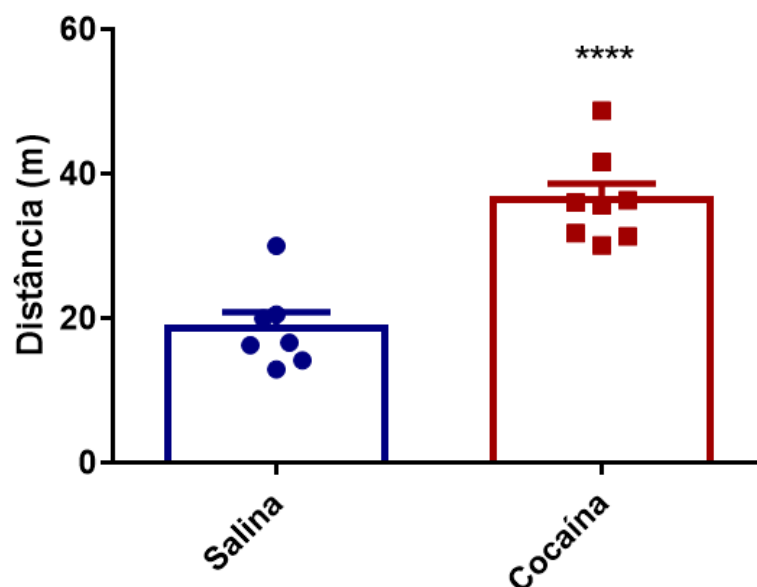


Figura 18: Atividade locomotora dos animais na hiperlocomoção condicionada. Análise da atividade locomotora dos animais tratados previamente com solução salina ou cocaína 15 mg/kg no teste de hiperlocomoção condicionada. Os dados foram analisados por Teste t de student; **** $p < 0,0001$ quando comparado com o grupo controle.

4.1.3 Padronização da preferência condicionada ao lugar induzida por cocaína

O teste de preferência condicionada ao lugar é utilizado para avaliar a capacidade recompensadora ou aversiva de uma droga (KOKS et al., 2015). Diante disso, foi feita a padronização desse teste com o intuito de avaliar as propriedades reforçadoras positivas da cocaína.

Os animais tratados com cocaína na dose de 15 mg/kg apresentaram uma maior taxa de preferência pelo lado em que foram pareados com a droga do que os animais tratados com solução salina ($t=4,212$; $df=11.59$; $p < 0,005$) (figura 19).

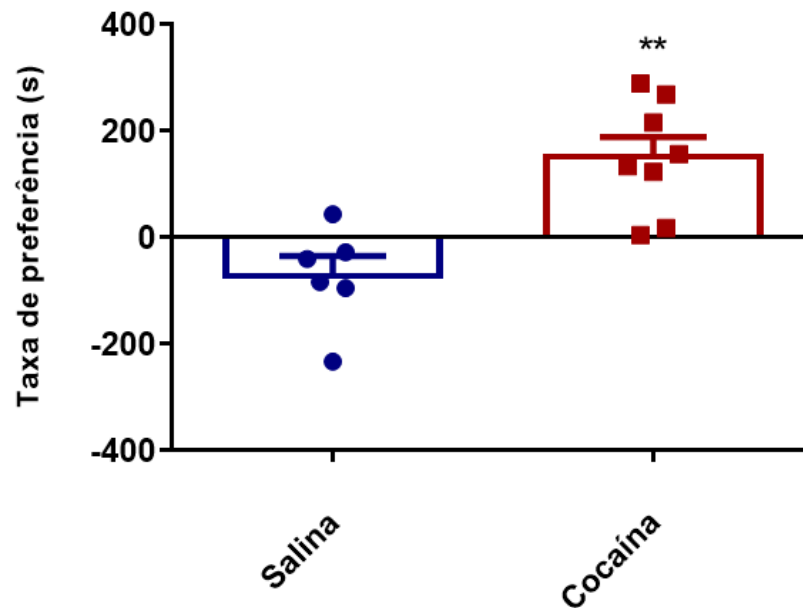


Figura 19: Taxa de preferência dos animais na preferência condicionada ao lugar. Análise da taxa de preferência de animais tratados com solução salina ou cocaína (15 mg/kg) no teste de Preferência Condicionada ao Lugar. Os dados foram analisados por Teste t de student; ** $p < 0,005$ quando comparado com o grupo controle.

4.2 Massa dos animais ao longo dos dias de tratamento

Todos os animais foram pesados a cada 2 dias durante os experimentos comportamentais. Nenhum grupo apresentou diferenças significativas na massa corporal ao longo dos dias de tratamentos na sensibilização comportamental (fator dia ($F(3,10)=0,05$; ns), fator tratamento ($F(3,10)=2,67$; ns) e fator dia vs fator tratamento ($F(9,10)=0,02$; ns)] (figura 20) e na preferência condicionada ao lugar [fator dia ($F(4,60)=0,3797$; ns), fator tratamento ($F(60,18)=1,23$; ns) e fator dia vs fator tratamento ($F(12,18)=0,06$; ns)] (figura 21).

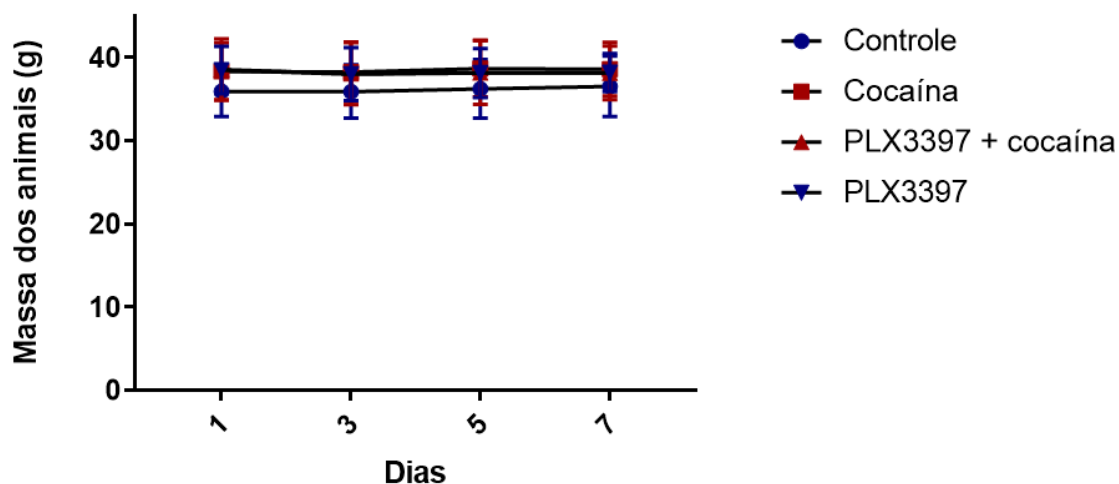


Figura 20: Massa corporal durante a sensibilização comportamental. Massa corporal dos animais tratados com solução salina + veículo, cocaína + veículo, solução salina + PLX3397 ou cocaína + PLX3397 submetidos a sensibilização comportamental. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey.

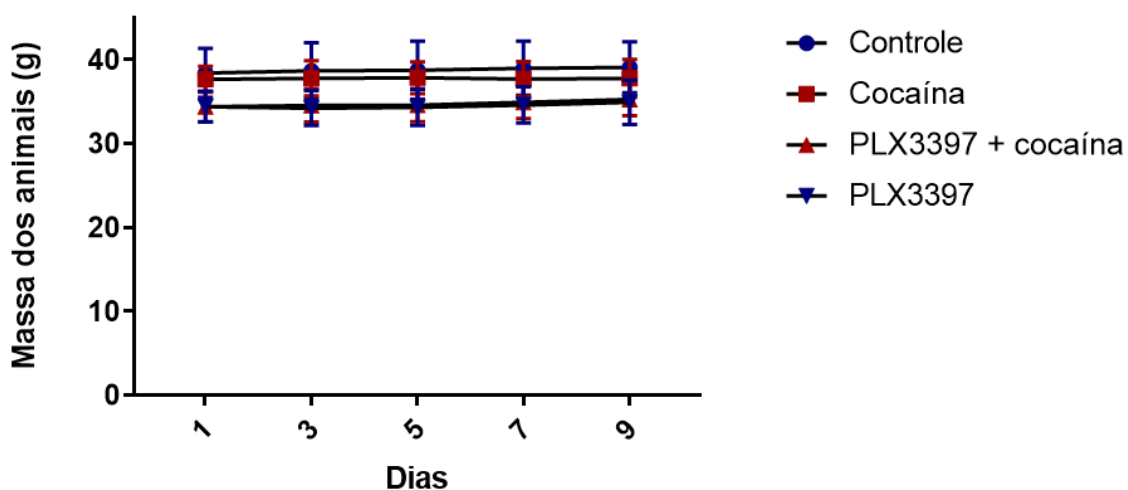


Figura 21: Massa corporal durante a preferência condicionada ao lugar. Massa corporal dos animais tratados com solução salina + veículo, cocaína + veículo, solução salina + PLX3397 ou cocaína + PLX3397 submetidos à preferência condicionada ao lugar. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey.

4.3 O tratamento com PLX3397 foi capaz de diminuir a sensibilização comportamental induzida por cocaína

Com o objetivo de verificar se a micróglia participa das alterações neurobiológicas induzidas pela cocaína, os animais foram tratados com o depletor de micróglia PLX3397. De acordo com Elmore e colaboradores

(2014), três dias de tratamento com o PLX3397 é capaz de promover a depleção de 50% da micróglia. Dessa forma, com o objetivo de que os animais apresentassem 50% da micróglia depletada ao receber a primeira dose de cocaína, eles começaram a ser tratados um dia antes do início do teste comportamental.

O tratamento com o PLX3397 reduziu a sensibilização comportamental induzida por cocaína ao longo dos dias [fator depleção vs fator cocaína ($F(12,12)=3,63$; $p<0,001$), fator cocaína ($F(4,12)=5,82$; $p<0,001$) e fator depleção ($F(3,12)=66,08$; $p<0,0001$)] (figura 22). O PLX3397 reduziu a sensibilização a partir do dia 6 (Controle vs PLX3397 + cocaína; $p=ns$). Além disso, não houve diferença estatística entre os animais controle e os animais tratados somente com PLX3397 e veículo de cocaína, o que demonstra que esta droga não altera a atividade locomotora basal dos animais.

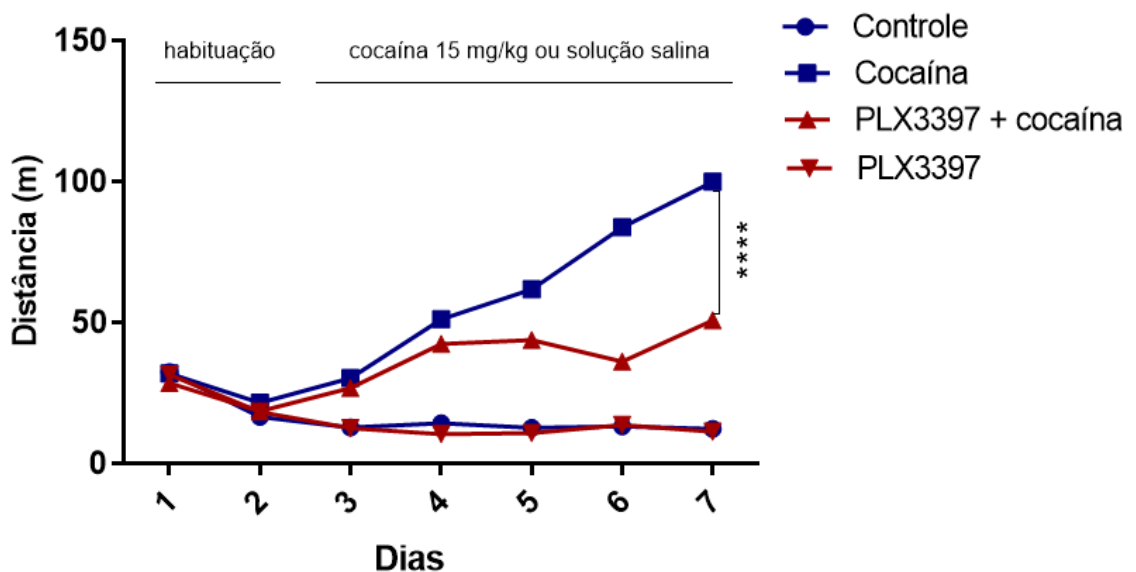


Figura 22: Atividade locomotora dos animais na sensibilização comportamental após o tratamento com PLX3397. Análise da atividade locomotora dos animais tratados com solução salina + veículo ($n=6$), cocaína + veículo ($n=7$), solução salina + PLX3397 ($n=7$) ou cocaína + PLX3397 ($n=7$) no teste de sensibilização comportamental ao longo dos dias. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey. **** $p<0.0001$ entre o grupo cocaína + veículo e o grupo cocaína + PLX3397.

Os dados também foram plotados na forma de Δ da distância total percorrida no dia 5 e no dia 1 para melhor visualização. Observa-se na

figura 21 que o tratamento com o PLX3397 foi capaz de reduzir o Δ da distância total percorrida induzida por cocaína [fator depleção vs fator cocaína ($F(1,24)=11,89$; $p<0,01$), fator cocaína ($F(1,24)=54,09$; $p<0,0001$) e fator depleção ($F(1,24)=12,70$; $p<0,01$)] (figura 23).

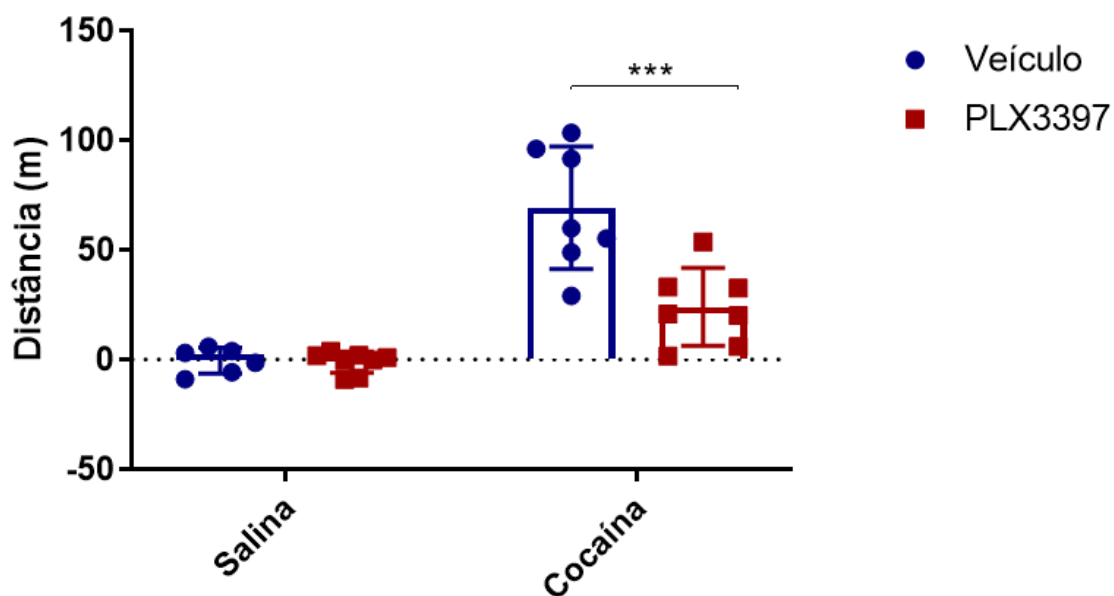


Figura 23: Delta da atividade locomotora dos animais na sensibilização comportamental após o tratamento com PLX3397. Análise do Δ (entre os dias 5 e 1) da atividade locomotora dos animais tratados com solução salina + veículo, cocaína + veículo, solução salina + PLX3397 ou cocaína + PLX3397 no teste de sensibilização comportamental ao longo dos dias. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey. *** $p<0.001$ entre o grupo cocaína + veículo e cocaína + PLX3397.

4.4 O tratamento com PLX3397 não foi capaz de reverter a preferência condicionada ao lugar induzida por cocaína

Após verificar que a micróglia pode participar das alterações neurobiológicas induzidas pela cocaína na sensibilização comportamental, os animais foram tratados com o PLX3397 na dose de 40 mg/kg e submetidos ao teste de preferência condicionada ao lugar, com o intuito de corroborar o resultado obtido no item 4.3. O tratamento com PLX3397 foi iniciado dois dias antes do teste comportamental, com o intuito de que o animal já tivesse 50% da micróglia depletada ao receber a primeira dose de cocaína.

O tratamento com cocaína foi capaz de aumentar a taxa de preferência ao compartimento pareado com a droga. Porém o tratamento com o PLX3397 não foi capaz de reverter esta preferência [fator cocaína ($F(1,45)=34,32$; $p<0,0001$); fator depleção ($F(1,45)=0,29$; ns) e fator cocaína vs fator depleção ($F(1,45)=3,36$; ns)] (figura 24).

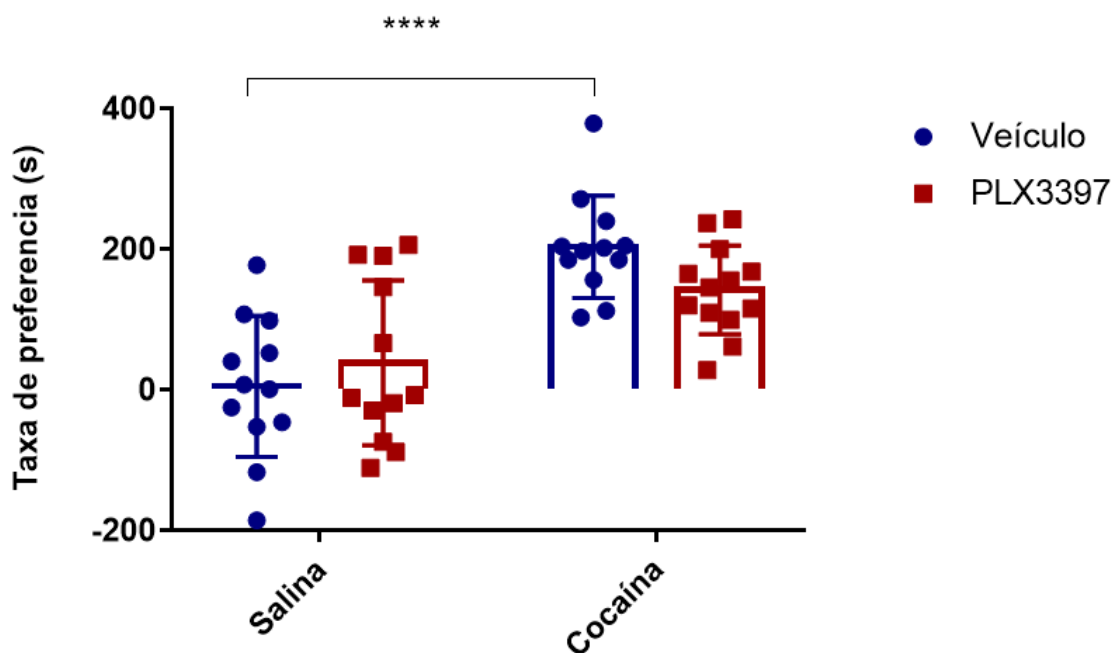


Figura 24: Taxa de preferência dos animais na preferência condicionada ao lugar após o tratamento com PLX3397. Análise da taxa de preferência dos animais tratados com solução salina + veículo, cocaína + veículo, solução salina + PLX3397 ou cocaína + PLX3397 no teste de sensibilização comportamental ao longo dos dias. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey. **** $p<0.0001$ entre o grupo salina + veículo e o grupo cocaína + veículo.

4.5 O tratamento com PLX3397 foi capaz de reduzir as células Iba-1⁺ no NAc e no CA1

4.5.1 Quantificação das células microgliais de animais tratados com PLX3397 no NAc

Para verificar se realmente houve uma diminuição do número de micróglia, foi realizada a técnica de imunofluorescência para marcação de células Iba-1⁺ no NAcc e no NacSh dos animais tratados com o PLX3397 e submetidos a sensibilização comportamental.

Observou-se que o tratamento com PLX3397 diminuiu o número de células Iba-1⁺ no Nacc [fator depleção (F(1,21)=47,37; p<0,0001)]. Apesar disso, o tratamento com cocaína não alterou a quantidade de células nessa região [fator cocaína (F(1,21)=2,15; ns) e fator depleção vs fator cocaína (F(1,21)=0,63; ns)]. (figuras 25 e 26). Resultados semelhantes foram observados no NacSh [fator depleção (F(1,21)=42,44; p<0,0001)], fator cocaína (F(1,21)=3,84; ns) e fator depleção vs fator cocaína (F(1,21)=0,59; ns)], (figuras 27 e 28).

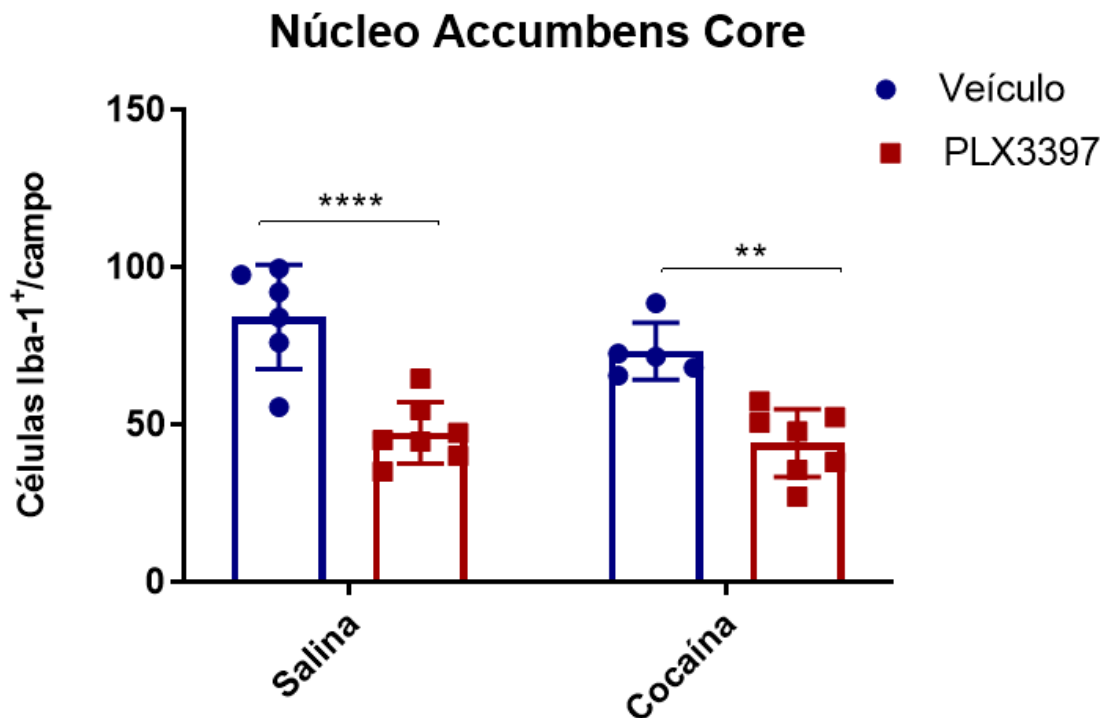


Figura 25: Número de células Iba-1⁺ no NAcc. Quantificação de células Iba-1⁺ (micróglia) no NAcc de animais tratados com solução salina + veículo, cocaína + veículo, solução salina + PLX3397 ou cocaína + PLX3397. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey. ****p<0,0001 entre o grupo salina + veículo e salina + PLX3397; **p<0,01 entre o grupo cocaína + veículo e o grupo cocaína + PLX3397.

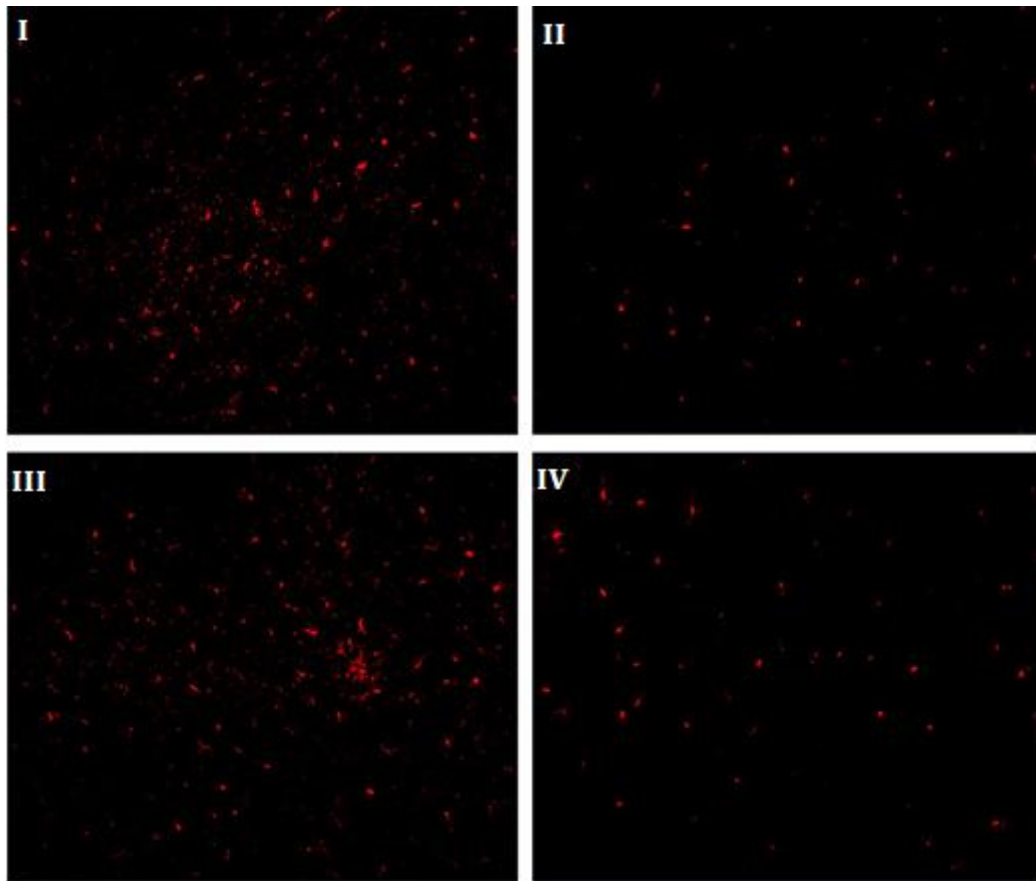


Figura 26: Imagem representativa das fotomicrografias utilizadas para quantificar células Iba-1⁺ no NAcc. Grupos: I - salina + veículo, II - salina + PLX3397, III - cocaína + veículo, IV - cocaína + PLX3397.

Núcleo Accumbens Shell

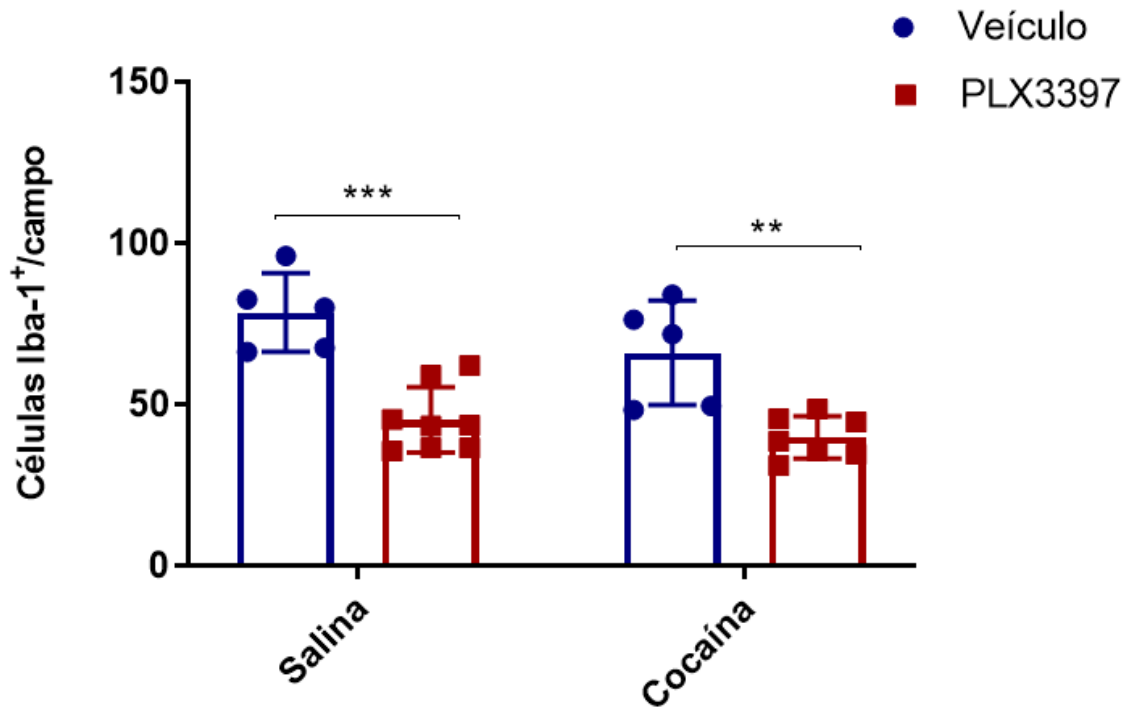


Figura 27: Número de células Iba-1⁺ no NAcSh. Quantificação de células Iba-1⁺ no NAcSh de animais tratados com solução salina + veículo, cocaína + veículo, solução salina + PLX3397 ou cocaína + PLX3397. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey. *** $p < 0,001$ entre o grupo salina + veículo e salina + PLX3397; ** $p < 0,01$; entre o grupo cocaína + veículo e o grupo cocaína + PLX3397.

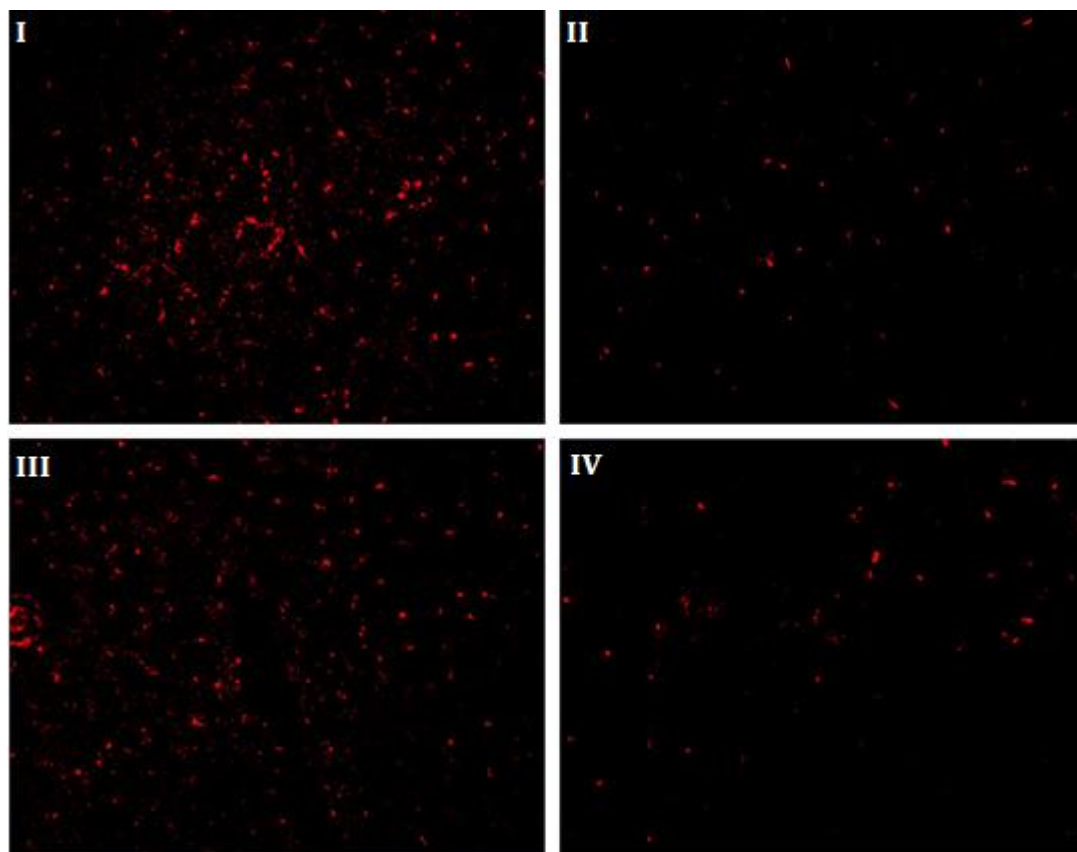


Figura 28: Imagem representativa das fotomicrografias utilizadas para quantificar células Iba-1⁺ no NAcSh. Grupos: I - salina + veículo, II - salina + PLX3397, III - cocaína + veículo, IV - cocaína + PLX3397.

4.5.2 Quantificação das células microgliais de animais tratados com PLX3397 no hipocampo

Uma vez que a região (CA1) do hipocampo recebe inervações dopaminérgicas da VTA e projeta fibras glutamatérgicas para o NAc, também foram quantificadas as células Iba-1⁺ dos animais tratados com o PLX3397 e submetidos a sensibilização comportamental nesta região (PRESTON et al., 2018).

O tratamento com o PLX3397 diminuiu o número de células Iba-1⁺ na região CA1 [fator depleção ($F(1,22)=96,71$; $p<0,0001$)]. Apesar disso, a cocaína não alterou a quantidade de células nessa região [fator cocaína ($F(1,22)=2,19$; ns) e fator cocaína vs fator depleção ($F(1,22)=0,02$; ns)] (figuras 29 e 30).

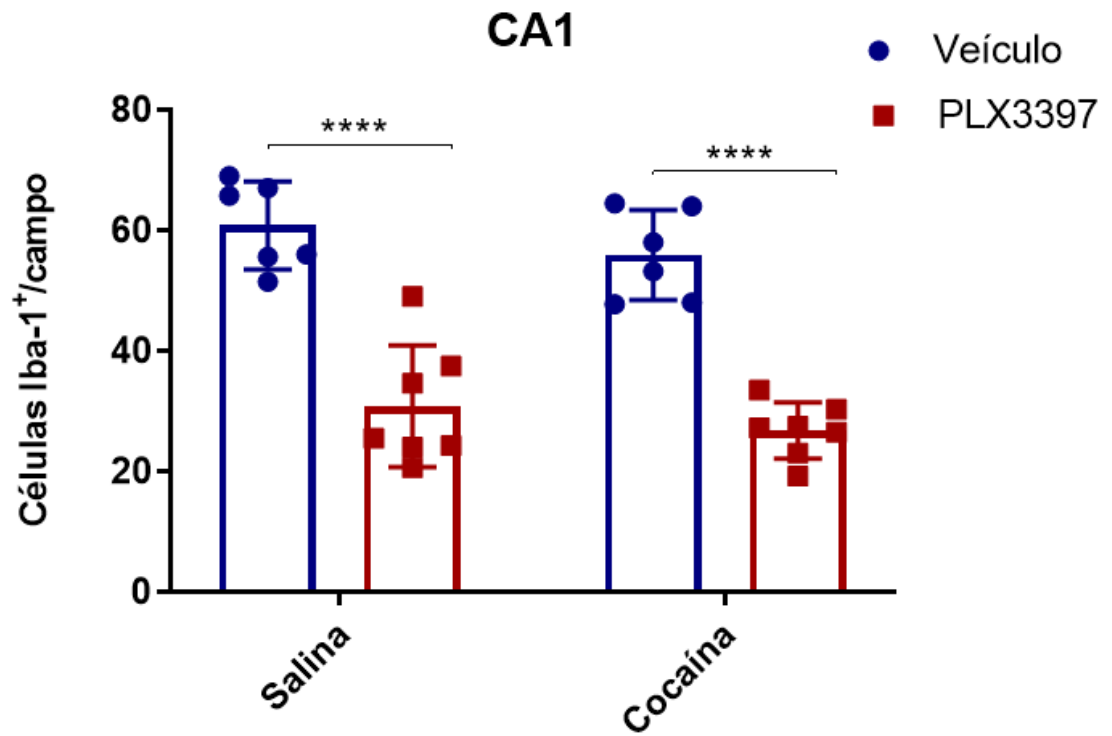


Figura 29: Número de células Iba-1⁺ no CA1. Quantificação de células Iba-1⁺ na região CA1 do hipocampo de animais tratados com solução salina + veículo, cocaína + veículo, solução salina + PLX3397 ou cocaína + PLX3397. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey. ****p<0,001 entre os grupos tratados com PLX3397 e seus respectivos grupo controle.

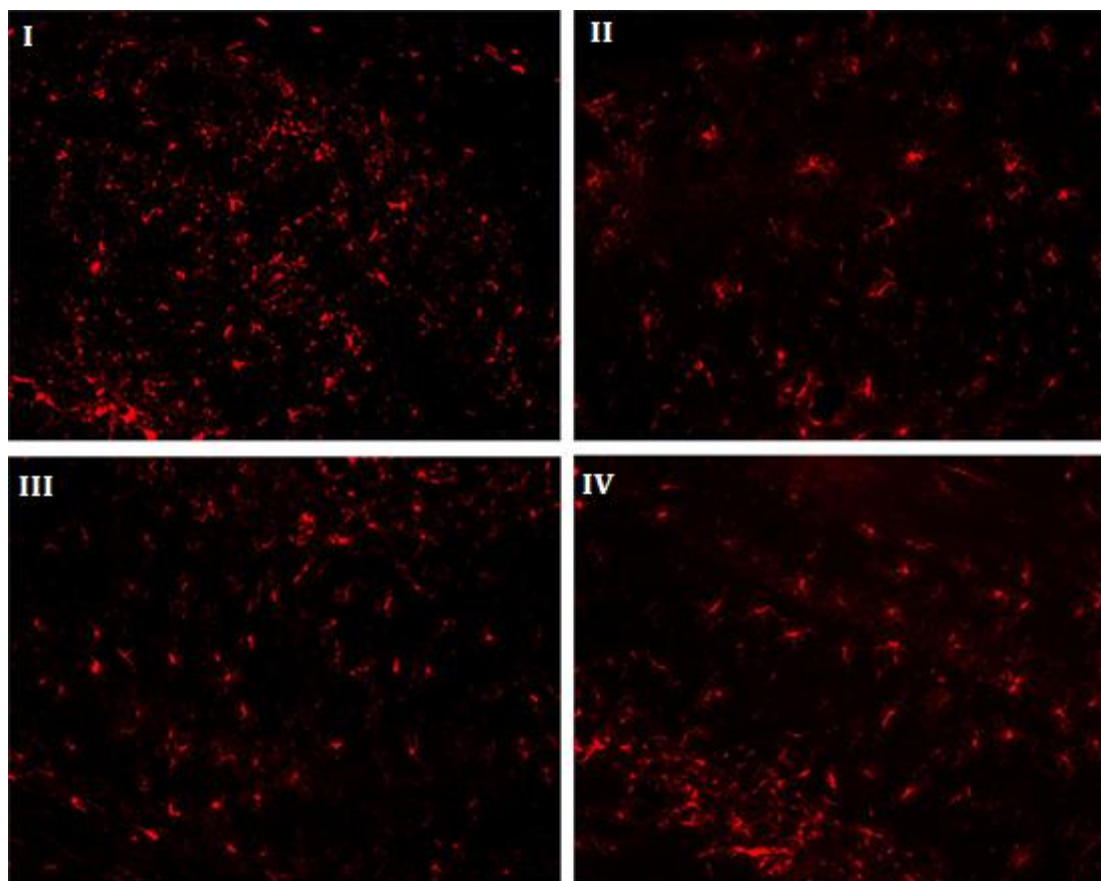


Figura 30: Imagem representativa das fotomicrografias utilizadas para quantificar células Iba-1⁺ em CA1. Grupos: I - salina + veículo, II - salina + PLX3397, III - cocaína + veículo, IV - cocaína + PLX3397.

4.6 O tratamento com PLX3397 foi capaz de aumentar o índice de ativação das células microgliais no NAc e no CA1

Uma vez que o perfil secretório da micróglia pode estar relacionado com seu perfil de reatividade (quiescente ou reativa) (MARTINEZ and GORDON, 2014) foi realizada pela técnica de imunohistoquímica a marcação de células Iba-1⁺ e avaliação da morfologia da micróglia de animais tratados com PLX3397 e/ou cocaína, com o intuito de quantificar seu índice de ativação.

4.6.1 Índice de ativação microglial no núcleo accumbens

Observou-se que tanto o tratamento com cocaína, quanto o tratamento com o PLX3397, foi capaz de aumentar o índice de ativação microglial no NAcc [fator cocaína ($F(1,20)=10,48$; $p=0,0041$), fator

depleção ($F(1,20)=26,42$; $p<0,0001$), e fator cocaína vs fator depleção ($F(1,20)=1,76$; ns)] (figuras 31 e 32), e no NAcSh [fator cocaína ($F(1,19)=15,76$; $p<0,001$), fator depleção ($F(1,19)=32,27$; $p<0,0001$) e fator cocaína vs fator depleção ($F(1,19)=1,03$, ns)] (figuras 33 e 34).

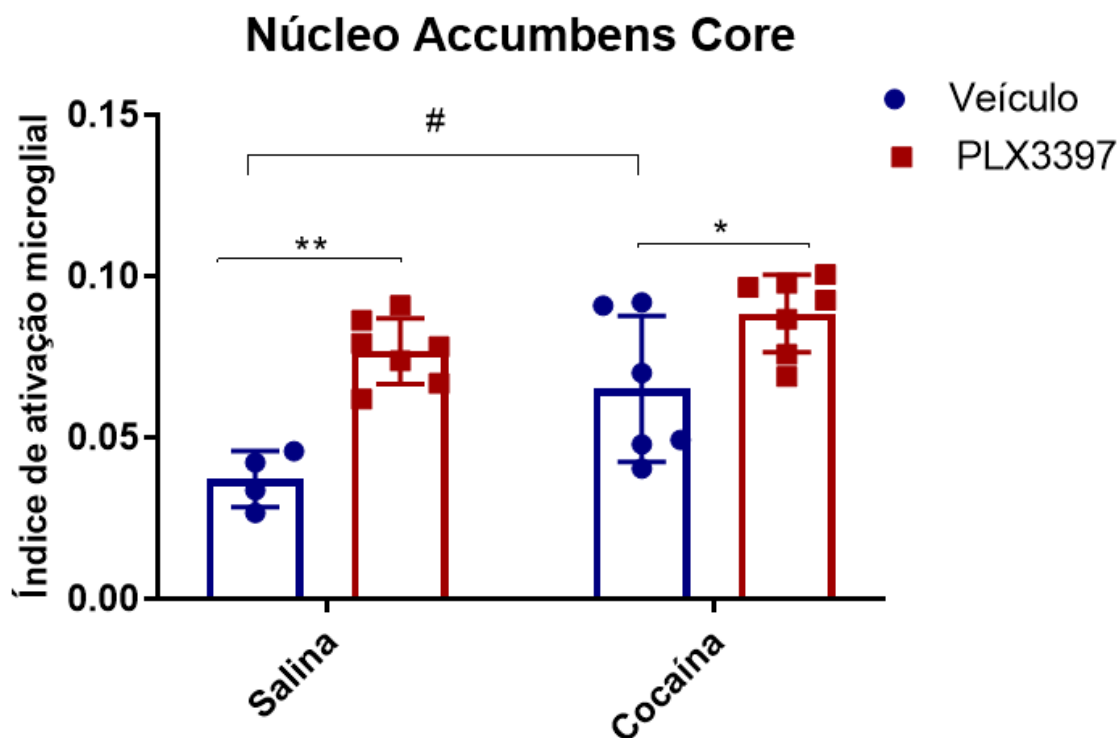


Figura 31: Índice de ativação microglial no NAcc. Quantificação do índice de ativação microglial no NAcc de animais tratados com solução salina + veículo, cocaína + veículo, solução salina + PLX3397 ou cocaína + PLX3397. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey. ** $p<0,01$; entre o grupo salina + veículo e o grupo salina + PLX3397; * $p<0,05$ entre o grupo cocaína + veículo e cocaína + PLX3397; # $p<0,05$ entre o grupo salina + veículo e o grupo cocaína + veículo.

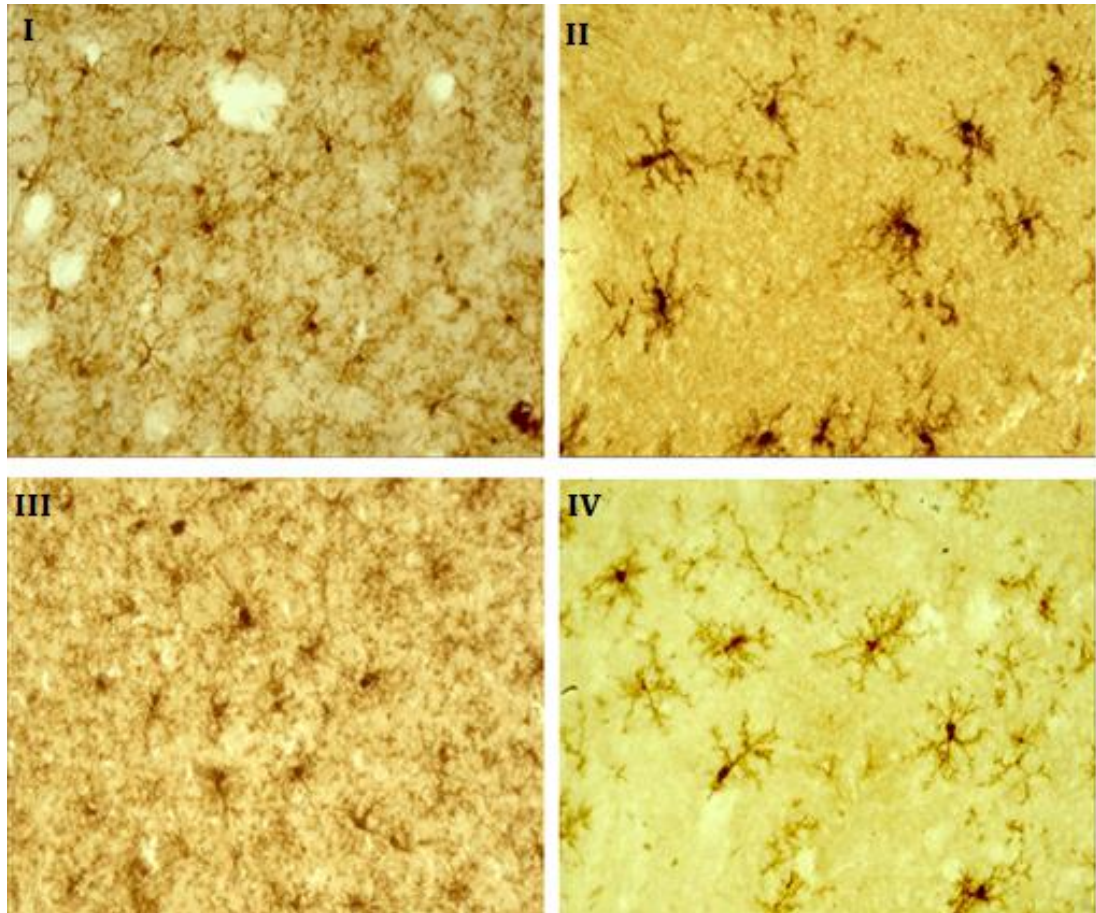


Figura 32: Imagem representativa das fotomicrografias utilizadas para avaliar o índice de ativação microglial no NAcc. Grupos: I - salina + veículo, II - salina + PLX3397, III - cocaína + veículo, IV - cocaína + PLX3397.

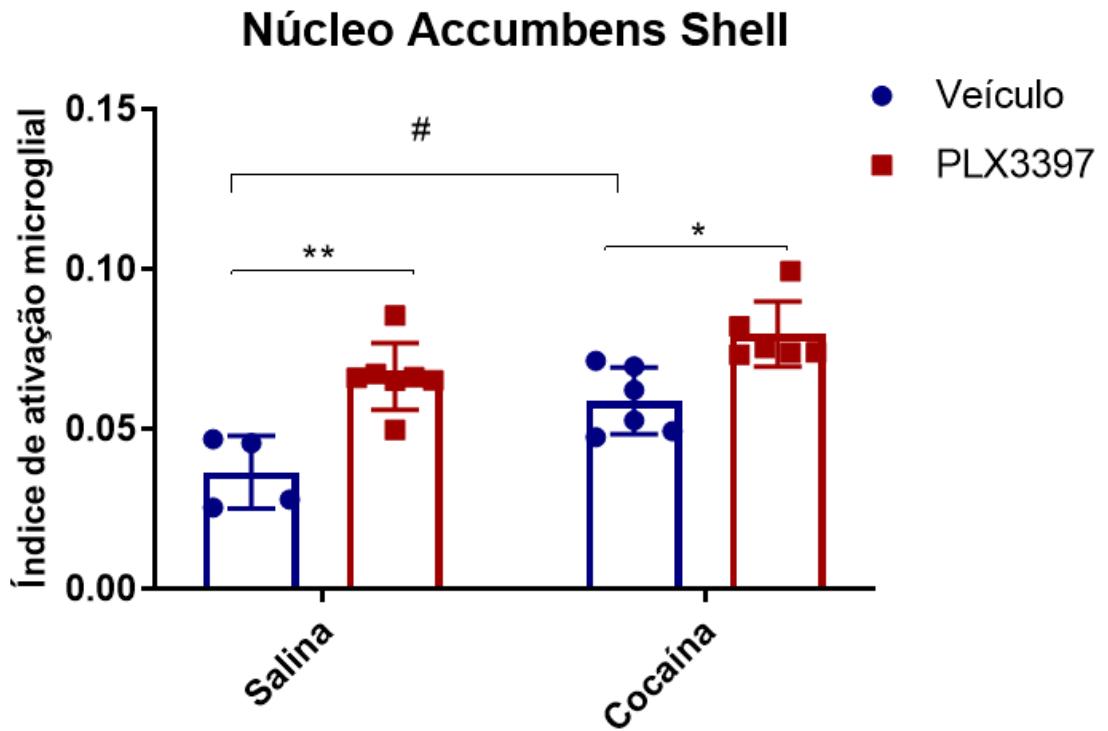


Figura 33: Índice de ativação microglial no NAcSh. Quantificação do índice de ativação microglial no NAcSh de animais tratados com solução salina + veículo, cocaína + veículo, solução salina + PLX3397 ou cocaína + PLX3397. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey. ** $p < 0,01$; entre o grupo salina + veículo e o grupo salina + PLX3397; * $p < 0,05$ entre o grupo cocaína + veículo e cocaína + PLX3397; # $p < 0,05$ entre o grupo salina + veículo e o grupo cocaína + veículo.

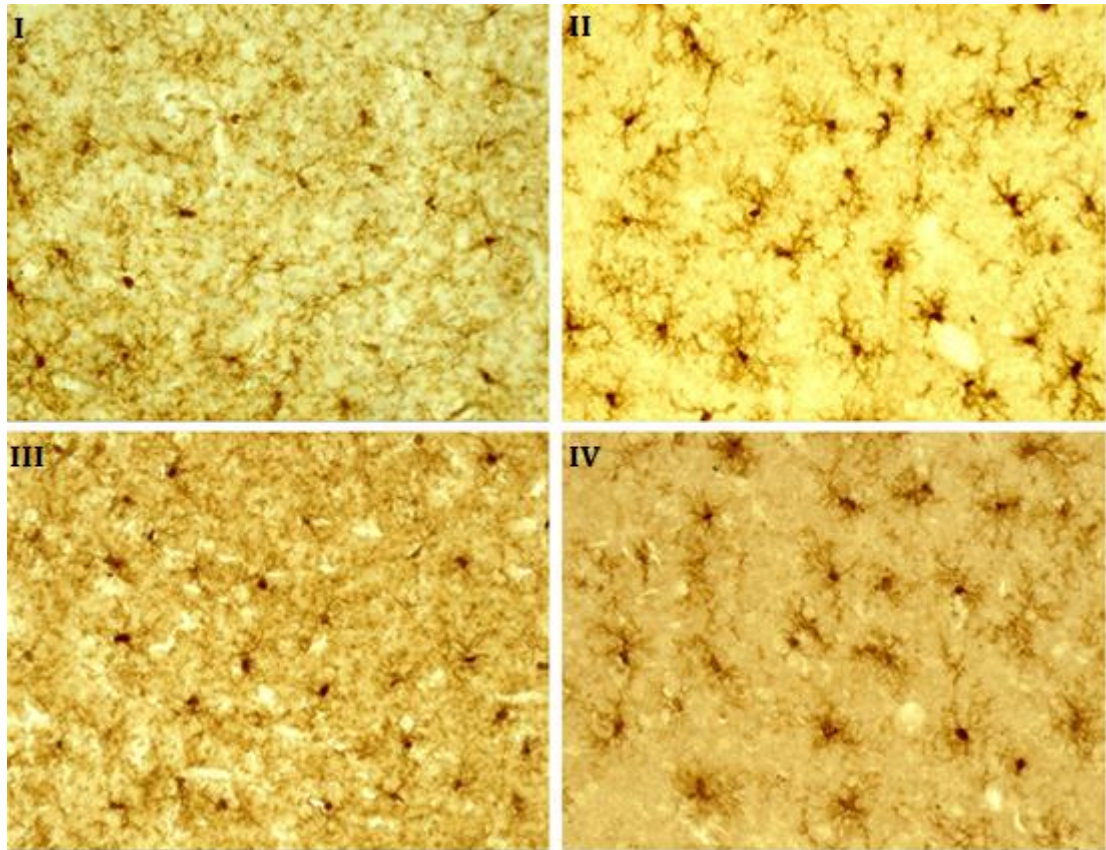


Figura 34: Imagem representativa das fotomicrografias utilizadas para avaliar o índice de ativação microglial no NAcSh. Grupos: I - salina + veículo, II - salina + PLX3397, III - cocaína + veículo, IV - cocaína + PLX3397.

4.6.2 Índice de ativação microglial no hipocampo

Também foi avaliado o índice de ativação microglial na região CA1 do hipocampo de animais tratados com o PLX3397 e submetidos à sensibilização comportamental. Foi observado um aumento do índice de ativação microglial de animais tratados com o PLX3397 [fator cocaína ($F(1,21)=3,92$; $p=0,06$), fator depleção ($F(1,21)=13,44$; $p<0,01$) e fator cocaína vs fator depleção ($F(1,21)=1,67$; ns)] (figuras 35 e 36).

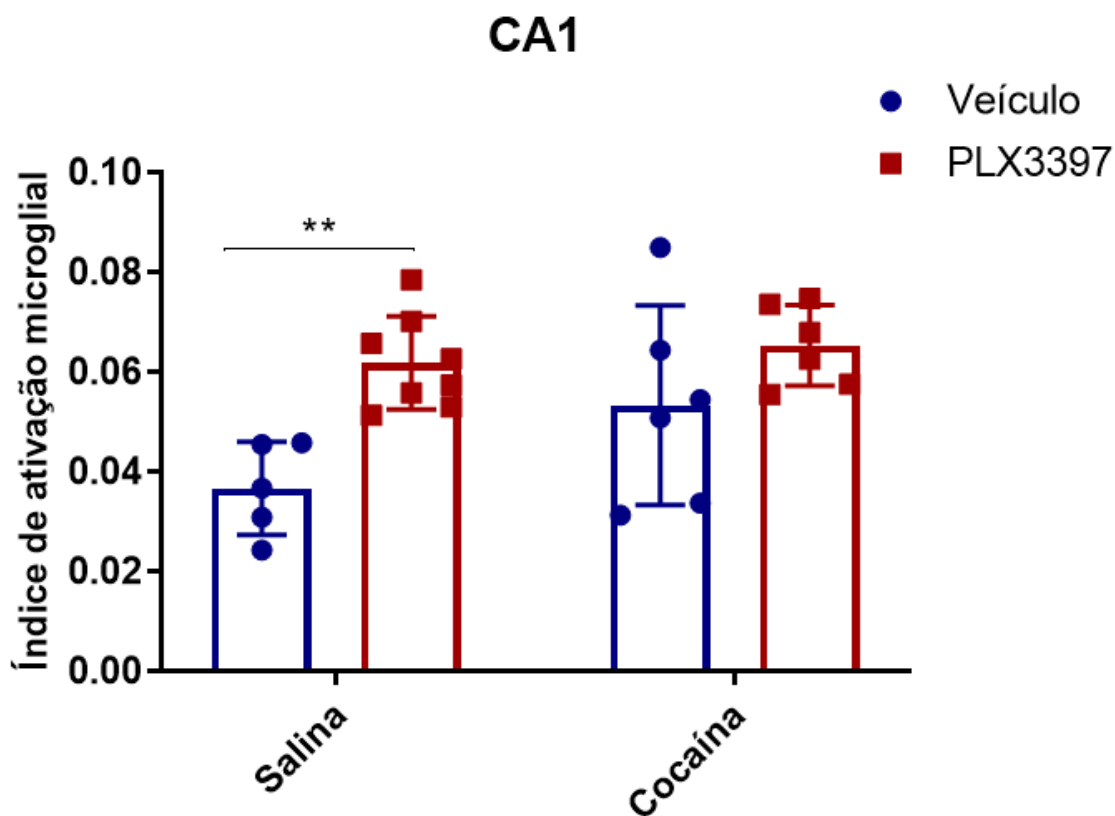


Figura 35: Índice de ativação microglial no CA1. Quantificação do índice de ativação microglial no CA1 de animais tratados com solução salina + veículo, cocaína + veículo, solução salina + PLX3397 ou cocaína + PLX3397. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey. ** $p < 0,01$ entre o grupo salina + veículo e o grupo salina + PLX3397.

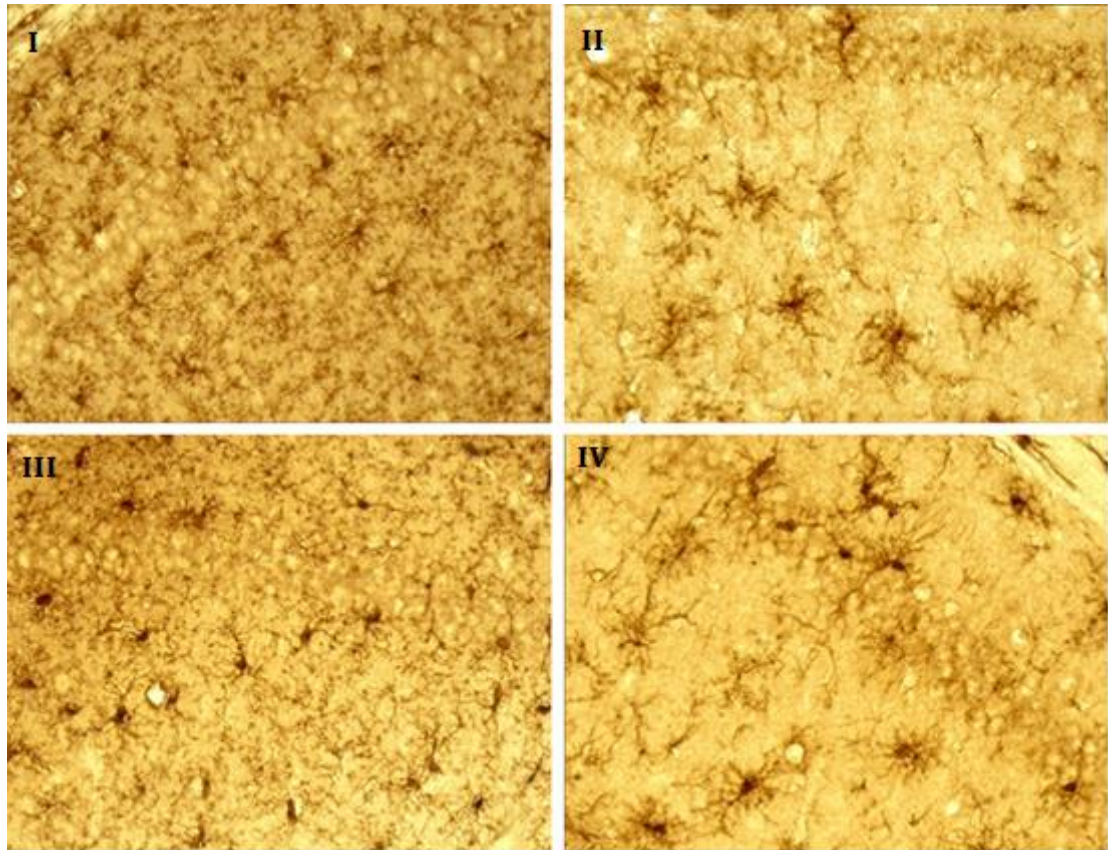


Figura 36: Imagem representativa das fotomicrografias utilizadas para avaliar o índice de ativação microglial em CA1. Grupos: I - salina + veículo, II - salina + PLX3397, III - cocaína + veículo, IV - cocaína + PLX3397.

4.7 Efeitos do tratamento com PLX3397 e/ou cocaína nos níveis de fatores neurotróficos

Para melhor compreensão do papel da micróglia nas alterações plásticas induzidas pela cocaína, foram avaliados os fatores neurotróficos BDNF, GDNF e NGF, no PFC, estriado e hipocampo de animais tratados com PLX3397 e/ou cocaína e submetidos à preferência condicionada ao lugar.

4.7.1 Quantificação dos níveis de BDNF, NGF e GDNF no córtex pré-frontal

Houve uma diminuição dos níveis de BDNF no PFC de animais tratados com cocaína [fator cocaína ($F(1,17)=6,54$; $p<0,05$)], que foi revertida pelo tratamento com o PLX3397 [fator depleção ($F(1,17) =2,35$; ns) e fator cocaína vs fator depleção ($F(1,17)=6,13$; $p<0,05$)] (figura 37).

Quanto aos níveis de GDNF, observou-se uma diminuição tanto nos animais tratados com cocaína, quanto nos animais tratados com PLX3397, quando comparados ao controle [fator cocaína ($F(1,19)=48,61$; $p<0,0001$), fator depleção ($F(1,19)=27,67$; $p<0,0001$), e fator cocaína vs fator depleção ($F(1,19)=34,84$; $p<0,0001$)] (figura 38). Por fim, não houve diferença significativa nos níveis de NGF entre os grupos [fator cocaína ($F(1,20)=0,05$; ns), fator depleção ($F(1,20)=1,81$; ns) e ($F(1,20)=0,70$; ns)] (figura 39).

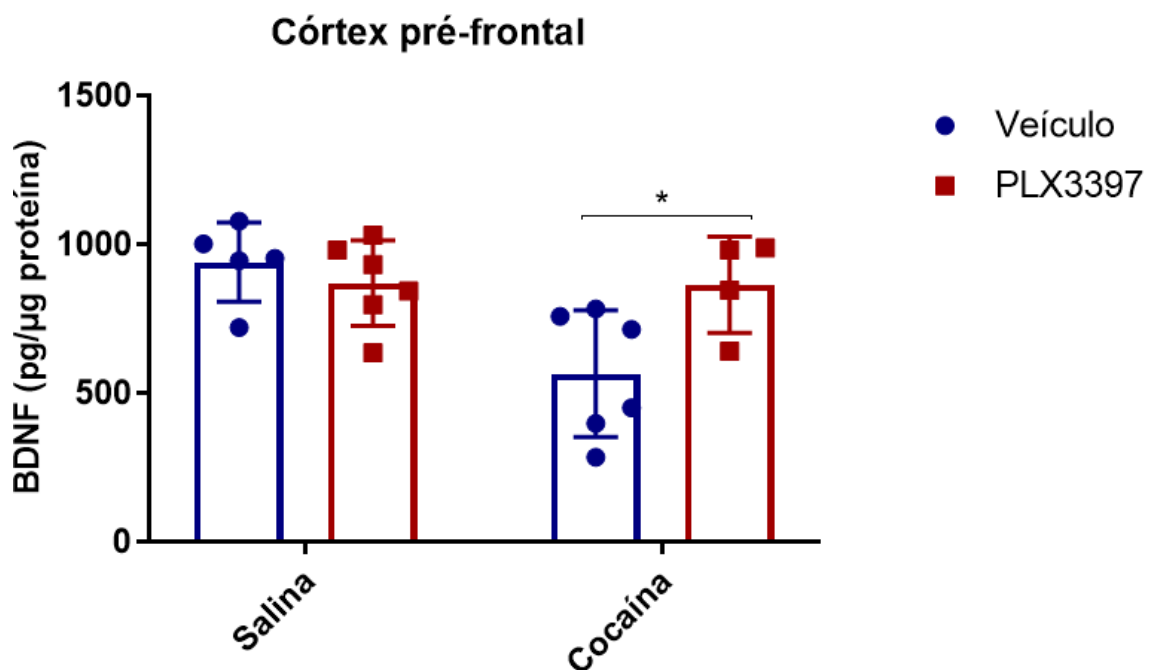


Figura 37: Níveis de BDNF no PFC. Quantificação dos níveis de BDNF no PFC de animais tratados com solução salina + veículo, cocaína + veículo, solução salina + PLX3397 ou cocaína + PLX3397. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey. * $p<0,05$ entre o grupo salina + veículo e o grupo cocaína + veículo.

Córtex pré-frontal

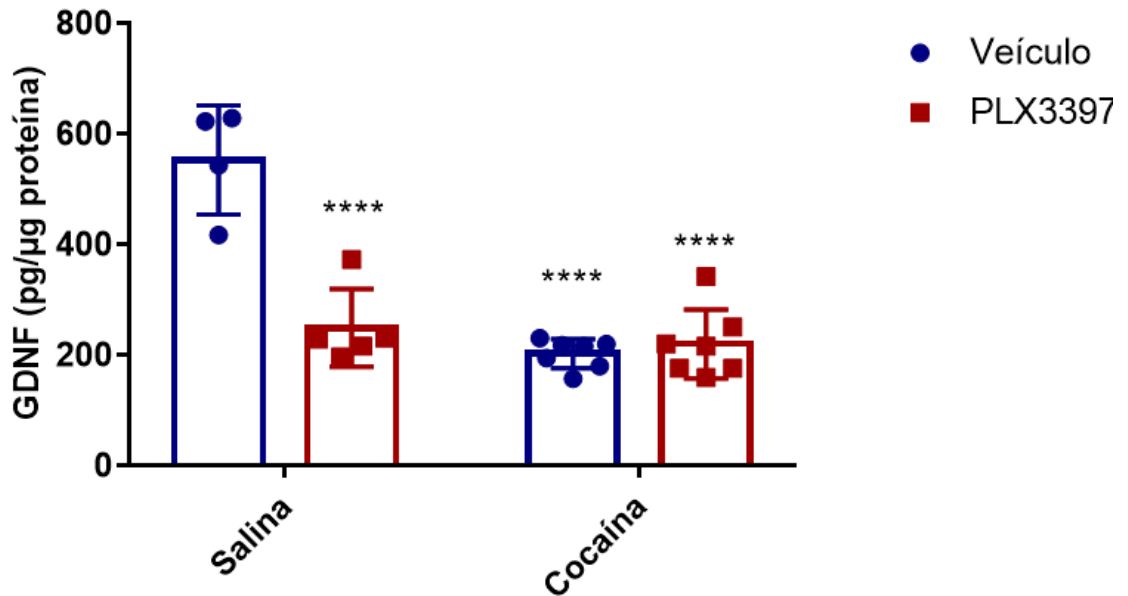


Figura 38: Níveis de GDNF no PFC. Quantificação dos níveis de GDNF no PFC de animais tratados com solução salina + veículo, cocaína + veículo, solução salina + PLX3397 ou cocaína + PLX3397. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey. **** $p < 0,0001$ entre os grupos salina + PLX3397, cocaína + veículo, cocaína + PLX3397 e o grupo salina + veículo.

Córtex pré-frontal

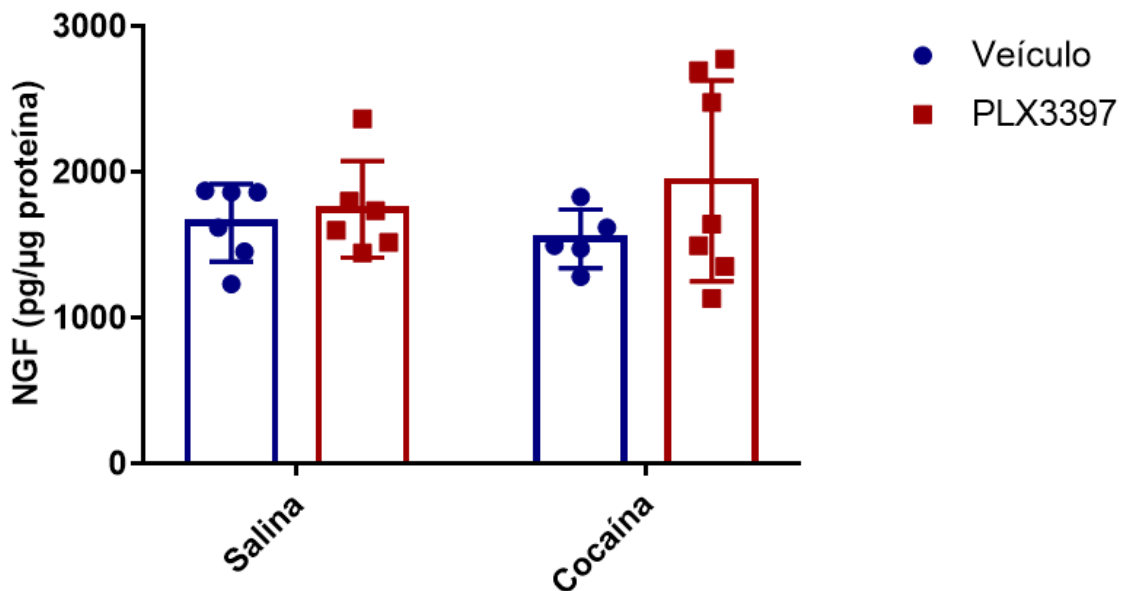


Figura 39: Níveis de NGF no PFC. Quantificação dos níveis de NGF no PFC de animais tratados com solução salina + veículo, cocaína + veículo, solução salina + PLX3397 ou

cocaína + PLX3397. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey.

4.7.2 Quantificação dos níveis de BDNF, NGF e GDNF no estriado

Não houve alterações significativas nos níveis de BDNF [fator cocaína ($F(1,18)=0,04$; ns), fator depleção ($F(1,18)=2,28$, ns)] e fator cocaína vs fator depleção ($F(1,18)=3,00$; ns)] (figura 40) e de GDNF (fator cocaína ($F(1,21)=0,22$, ns), fator depleção ($F(1,21)=0,56$; ns) e fator cocaína vs fator depleção ($F(1,21)=0,66$; ns)] (figura 41) no estriado. Porém observa-se uma diminuição nos níveis de NGF de animais tratados com cocaína [fator cocaína ($F(1,17)=8,91$; $p<0,01$), fator depleção ($F(1,17)=3,86$; ns) e fator cocaína vs fator depleção ($F(1,17)=4,37$, ns)] (figura 42). O PLX3397 não alterou os níveis dessas neurotrofinas.

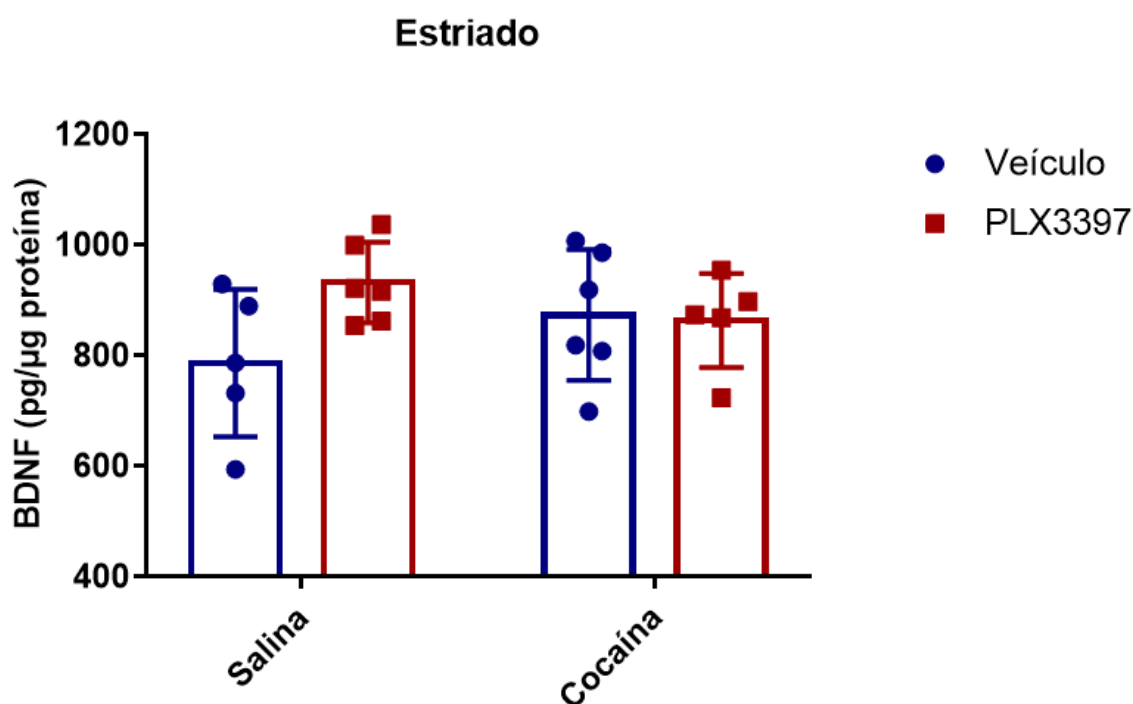


Figura 40: Níveis de BDNF no estriado. Quantificação dos níveis de BDNF no estriado de animais tratados com solução salina + veículo, cocaína + veículo, solução salina + PLX3397 ou cocaína + PLX3397. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey.

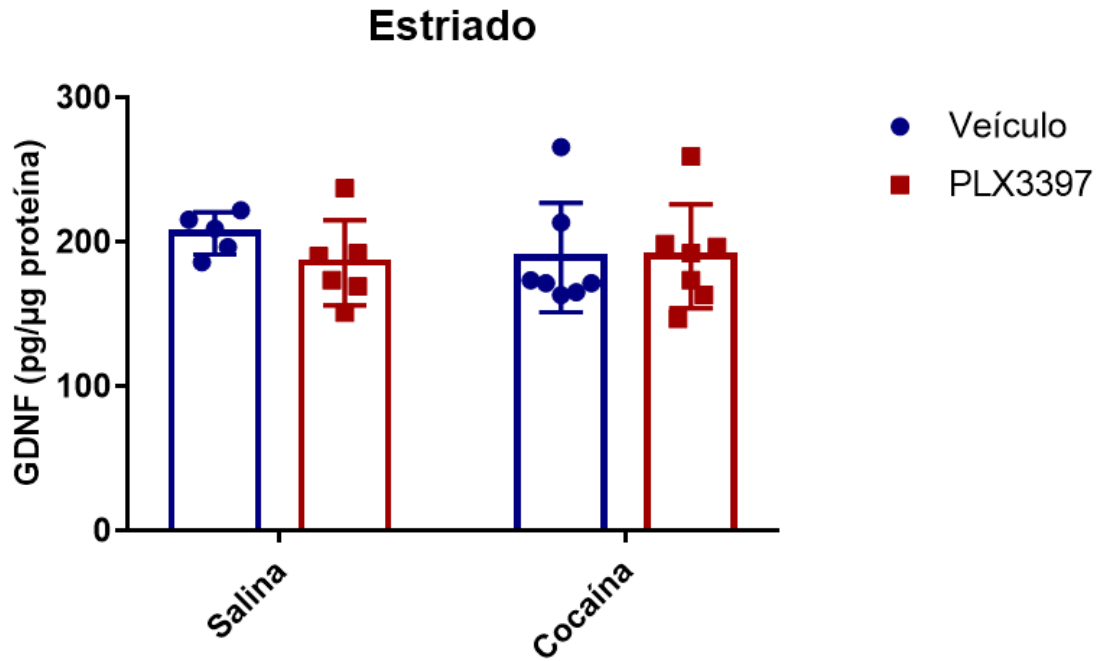


Figura 41: Níveis de GDNF no estriado. Quantificação dos níveis de GDNF no estriado de animais tratados com solução salina + veículo, cocaína + veículo, solução salina + PLX3397 ou cocaína + PLX3397. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey.

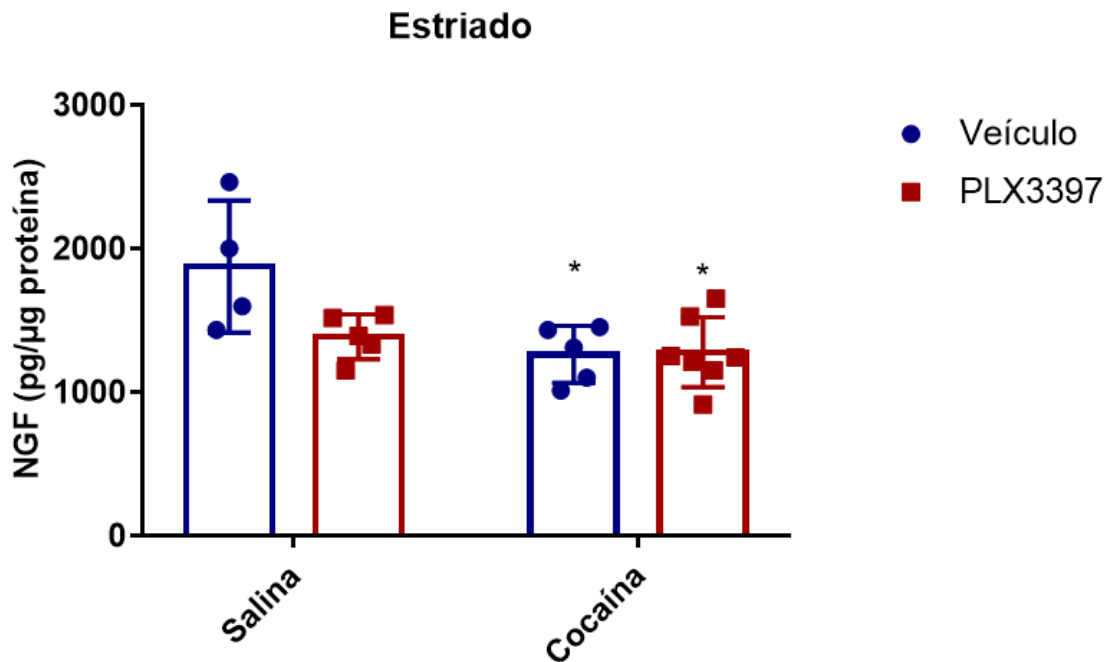


Figura 42: Níveis de NGF no estriado. Quantificação dos níveis de NGF no estriado de animais tratados com solução salina + veículo, cocaína + veículo, solução salina + PLX3397 ou cocaína + PLX3397. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey. * $p < 0,5$ entre os grupos cocaína + veículo e cocaína + PLX3397 e o grupo salina + veículo.

4.7.3 Quantificação dos níveis de BDNF, NGF e GDNF no hipocampo

Também não houve diferenças significativas nos níveis de BDNF [fator cocaína ($F(1,15)=0,06$; ns), fator depleção ($F(1,15)=0,45$; ns)] e fator cocaína vs fator depleção ($F(1,15)=1,57$; ns)] (figura 43) e GDNF [fator cocaína ($F(1,18)=3,42$; ns), fator depleção ($F(1,18)=0,37$; ns) e fator cocaína vs fator depleção ($F(1,18)=4,12$; ns)] na região hipocampal (figura 44). Por outro lado, a cocaína diminuiu os níveis de NGF nos animais tratados com PLX3397 em comparação aos animais tratados com o depletor e o veículo da cocaína [fator cocaína ($F(1,19)=4,791$, $p=0,0413$), fator depleção ($F(1,19)=2,21$; ns) e fator cocaína vs fator depleção ($F(1,19)=7,56$; $p<0,05$)] (figura 45).

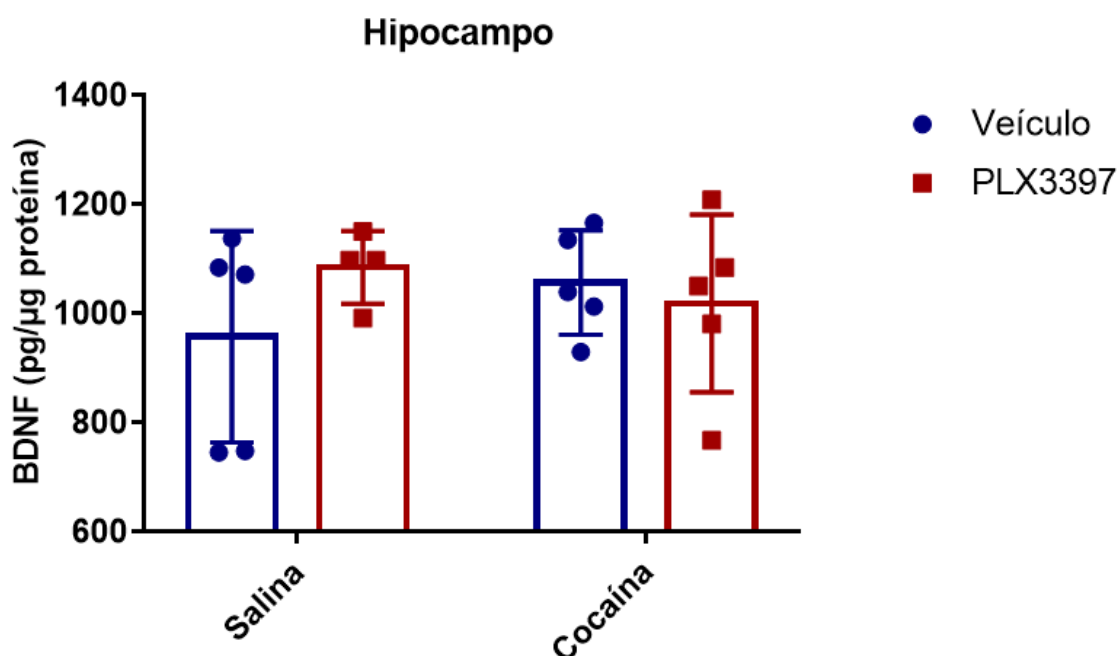


Figura 43: Níveis de BDNF no hipocampo. Quantificação dos níveis de BDNF no hipocampo de animais tratados com solução salina + veículo, cocaína + veículo, solução salina + PLX3397 ou cocaína + PLX3397. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey.

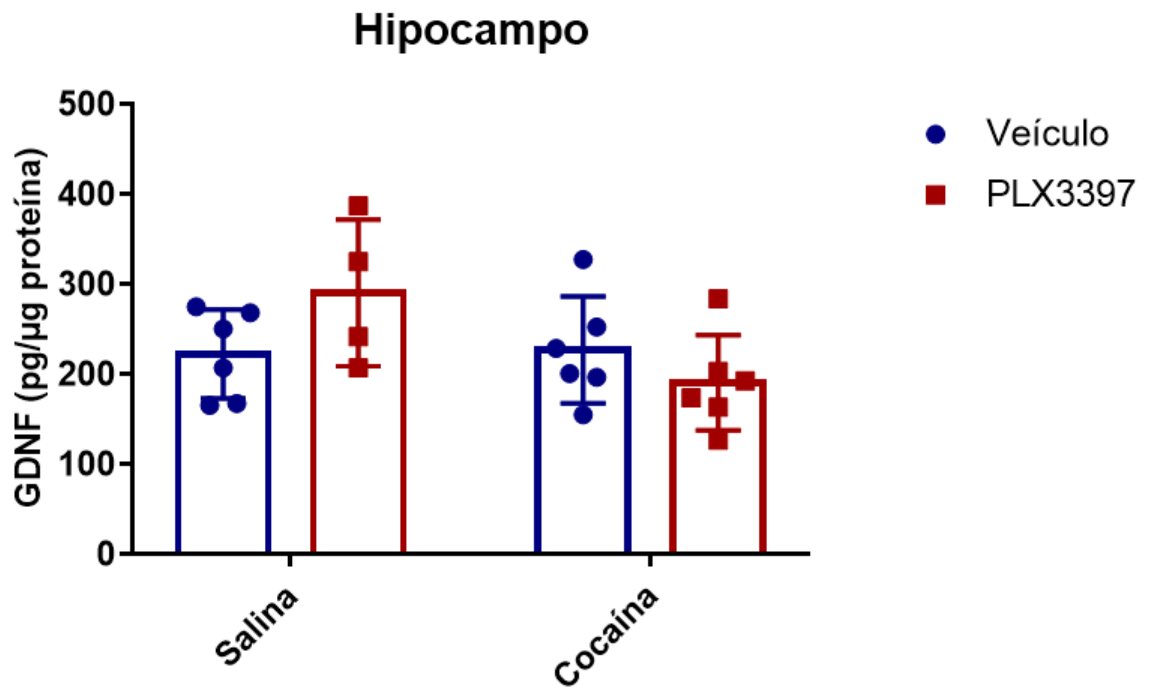


Figura 44: Níveis de GDNF no hipocampo. Quantificação dos níveis de GDNF no hipocampo de animais tratados com solução salina + veículo, cocaína + veículo, solução salina + PLX3397 ou cocaína + PLX3397. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey.

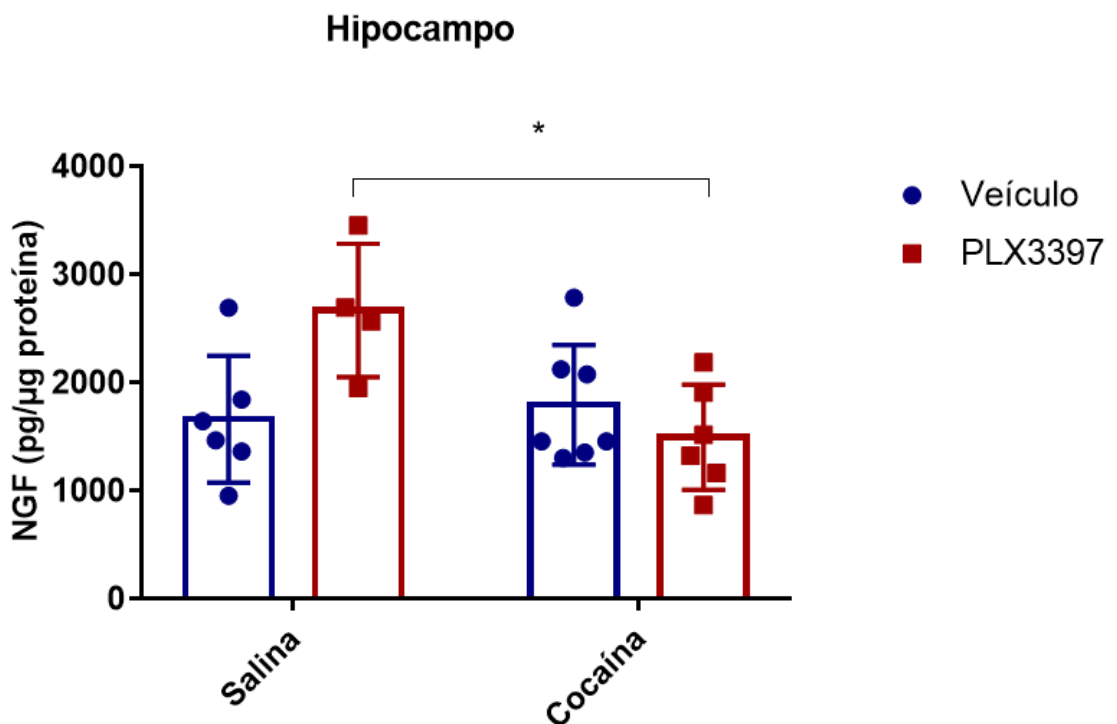


Figura 45: Níveis de NGF no hipocampo. Quantificação dos níveis de NGF no hipocampo de animais tratados com solução salina + veículo, cocaína + veículo, solução salina + PLX3397 ou cocaína + PLX3397. Os dados foram analisados por ANOVA de

duas vias, seguido pelo teste de Tukey. * $p < 0,5$ entre o grupo salina + PLX3397 e o grupo cocaína + PLX3397.

5. DISCUSSÃO

O transtorno por uso de substâncias é um problema de saúde pública que tem aumentado de forma drástica nos últimos anos. A busca por um melhor entendimento da neurobiologia da adicção tem sido de extrema importância para o desenvolvimento de políticas públicas de prevenção e redução de danos, no diagnóstico e no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (VOLKOW et al., 2016; MOLAHOUIM et al., 2019).

No presente estudo, foi realizada a padronização da sensibilização comportamental, da hiperlocomoção condicionada, e da preferência condicionada ao lugar. Demonstramos que o tratamento com cocaína na dose de 15 mg/kg foi capaz de promover um aumento da atividade locomotora dos animais nos testes de sensibilização comportamental e hiperlocomoção condicionada, além de um aumento na taxa de preferência no teste de preferência condicionada ao lugar.

A sensibilização comportamental é caracterizada pelo aumento de comportamentos (atividade locomotora, comportamentos estereotipados, entre outros) induzidos pela administração repetida de uma droga (BROWN et al., 2011). Um dos estudos pioneiros na compreensão dos mecanismos envolvidos neste modelo foi realizado por Kalivas e Duffy em 1990. Estes autores demonstraram que o tratamento agudo com cocaína, na dose de 10 mg/kg em ratos, foi capaz de promover um aumento da atividade locomotora acompanhada de um aumento dos níveis extracelulares de dopamina. Depois de sete dias de injeções diárias, a hiperlocomoção desses animais foi acentuada, associada a um aumento significativo dos níveis extracelulares de dopamina. Ainda, a injeção com solução salina após três dias de abstinência foi capaz de aumentar os níveis de dopamina e induzir uma hiperlocomoção.

Em humanos, estudos demonstraram que a administração aguda de drogas de abuso é capaz de induzir um aumento dos níveis de dopamina nas regiões estriatais, que também era acentuada com o uso repetitivo da droga. Além disso, o aumento desses níveis dopaminérgicos

estavam correlacionados com o aumento do efeito recompensador da substância, do comportamento de compulsão pela droga, e também em alterações comportamentais como, por exemplo, o piscar de olhos. Porém, ainda existe uma grande disparidade entre os resultados da sensibilização comportamental em humanos (LEYTON, 2007; VEZINA and LEYTON, 2009). Neste contexto, a sensibilização comportamental se assemelha a fase de compulsão e intoxicação do desenvolvimento da adicção, onde o uso inicial da droga é capaz de ativar vias dopaminérgicas no sistema mesocorticolímbico, promovendo alterações plásticas, tendo como consequência a sensibilização desses circuitos (ROBINSON and BERRIDGE, 2008; PASCOLI et al., 2015).

O paradigma da preferência condicionada ao lugar se baseia no condicionamento Pavloviano, no qual uma pista ambiental se associa com um estímulo (SMITH et al., 2016; KOKS, 2015), sendo este modelo utilizado para compreensão dos mecanismos recompensadores de uma droga. Dessa forma, a utilização deste modelo é de extrema importância, uma vez que as “pistas” associadas às drogas desempenham importante papel no comportamento de compulsão e facilitam recaídas, comprometendo a melhora do paciente (PARVAZ et al., 2016; COX et al., 2017).

Esses modelos comportamentais são capazes de mimetizar as alterações plásticas que ocorrem na transição entre um padrão de uso recreacional para um padrão de uso abusivo que caracteriza a adicção (KOKS et al., 2015). Estudos demonstraram que a sensibilização comportamental é acompanhada por um aumento da densidade e da porcentagem de botões sinápticos dopaminérgicos no NAcSh, assim como a formação de novas conexões cortico-estriatais (HECK et al., 2015; DOS SANTOS et al., 2017). Em relação a preferência condicionada ao lugar, animais tratados com cocaína 20 mg/kg e submetidos à este teste comportamental apresentam um aumento de sinalizações intracelulares dependentes de glutamato, que estão associadas ao processo de memória e aprendizado (NYGARD et al., 2017), além de aumentar a formação de novas sinapses (ZHANG et al., 2019).

Após a padronização dos modelos comportamentais, com o objetivo de entender o papel da micróglia na adicção, os animais foram tratados com a droga PLX3397. Esta substância é capaz de bloquear o receptor CSF-1 que é essencial para a viabilidade microglial (ELMORE et al., 2014; BUTOWSKI et al., 2017). De forma interessante, foi demonstrado que o tratamento com PLX3397 durante 21 dias é capaz de depletar cerca de 99% da micróglia sem promover alterações cognitivas e comportamentais, sendo então um eficiente método para estudar as funções microgliais (ELMORE et al., 2014; HILLMER et al., 2017).

No presente estudo, demonstramos que o tratamento com o PLX3397 foi capaz de depletar cerca de 50% da micróglia nas regiões NAcc, NAcSh e CA1 do hipocampo. Apesar de Elmore e colaboradores (2014) terem demonstrado que o tratamento com o PLX3397 durante sete dias é capaz de depletar cerca de 70% da micróglia, observamos em nosso estudo uma depleção de aproximadamente 50% dessas células no NAcc, NAcSh e CA1, com o tratamento pelo mesmo período. Tal discrepância poderia ser explicada pela diferença entre as linhagens usadas nos estudos, a idade dos animais, e biodisponibilidade da droga. De fato, utilizamos camundongos Swiss com 8-9 semanas de vida, sendo que o tratamento foi realizado por gavagem uma vez ao dia, enquanto que Elmore e colaboradores utilizaram animais C57BL/6J de 12 meses e a droga foi adicionada à ração. Além disso, análises farmacocinéticas do PLX3397 demonstraram que apenas cerca de 5% desta droga chega ao SNC, sendo sua concentração periférica 20 vezes maior. (ELMORE et al., 2014). Dessa forma, uma vez que a dose utilizada foi de 40 mg/kg, as baixas concentrações desta droga no cérebro, também poderiam estar relacionadas com a menor depleção observada em nosso estudo. Nesse contexto, Bennet e colaboradores (2018) observaram uma redução de apenas 30% da micróglia, utilizando a mesma dose do PLX3397 durante 21 dias, o que demonstra uma discrepância nos níveis de depleção induzida por esse tratamento.

O tratamento com PLX3397 também promoveu uma alteração morfológica na micróglia que sugere um aumento da sua ativação no NAC

e em CA1. Este resultado poderia ser explicado pela necessidade da micróglia remanescente polarizar para um estado reativo e fagocitar os debrís celulares da micróglia depletada pelo tratamento (LIAN et al., 2016). Também observamos um aumento do índice de ativação microglial no NA de animais tratados com cocaína, porém não houve diferença na quantidade de células Iba-1⁺. Este mesmo resultado foi encontrado por Wang e colaboradores (2017) e Lewitus e colaboradores (2016), o que sugere que a cocaína é capaz de ativar a micróglia. Um possível mecanismo é através da ativação de TLR4. Northcutt e colaboradores (2015) demonstraram que a cocaína é capaz de se ligar ao complexo MD-2/TLR4, sendo reconhecida como uma substância exógena, levando a uma resposta neuroinflamatória.

No presente estudo, demonstramos que o tratamento com o PLX3397 foi capaz de reduzir a sensibilização comportamental. Ademais, estudos que utilizaram os fármacos ibudilast e minociclina, capazes de bloquear a ativação de células Iba-1⁺, demonstraram a eficácia dessas drogas de atenuar a sensibilização comportamental induzida por cocaína (CHEN et al., 2009; POLAND et al., 2016). Nesse contexto, estudos sugerem que a ativação da micróglia associada a um aumento de citocinas inflamatórias no estriado é capaz de ativar neurônios dopaminérgicos, modulando os efeitos recompensadores da cocaína (NORTHCUTT et al., 2015; PERIYASAMI et al., 2018), o que explicaria como a diminuição do número dessas células poderia estar relacionada com a reversão das alterações comportamentais induzidas pela cocaína.

Diferentes dados têm demonstrado que a micróglia é uma célula fundamental na regulação da plasticidade sináptica. O receptor CX3CR1 é expresso nessas células e permite a comunicação micróglia-neurônio. Nesse sentido, animais nocaute para o receptor CX3CR1 ou animais CX3CR1^{cre}, apresentam uma redução das células microgliais (PARKHURST et al., 2013; ZHAN et al., 2014), e tem como consequência uma redução de LTP e alterações na funcionalidade neuronal devido à formação de sinapses aberrantes (ROGERS et al., 2011; ZHAN et al., 2014). Além disso, poderia haver redução da formação e eliminação de

espinhas dendríticas, e alteração dos níveis de proteínas sinápticas que regulam a sinalização glutamatérgica, comprometendo a formação de sinapses importantes no processo de aprendizagem (PARKHURST et al., 2013). Nesse contexto, a depleção da micróglia no NAc e no hipocampo induzida pelo tratamento com o PLX3397, poderia ter como consequência uma redução das alterações neuroquímicas e morfológicas que ocorrem após a administração de cocaína, que estaria relacionada com a redução da sensibilização comportamental. Nessa mesma linha de raciocínio, Reshef e colaboradores (2017) demonstraram que a depleção da micróglia induzida pelo PLX5622, outro inibidor do receptor CSF-1, foi capaz de diminuir em 25% a densidade das espinhas dendríticas.

Por outro lado, o aumento do índice de ativação microglial no presente estudo, poderia estar associado à indução de uma resposta neuroinflamatória. Nessa mesma linha de pensamento, Lewitus e colaboradores (2016), demonstraram que o uso de animais nocaute para TNF- α ou bloqueadores desta citocina, foram capazes de aumentar a sensibilização comportamental, enquanto o uso de um agonista do TLR4 reduziu esse parâmetro. Dessa forma, é possível especular que a micróglia exerceria uma função neuroprotetora perante a administração de cocaína através da liberação de citocinas. Porém, uma vez que esta célula apresenta um amplo espectro de ativação (GINHOUX et al., 2016) e nem sempre sua morfologia condiz com seu perfil secretório (BELLOZI et al., 2016), a dosagem de diferentes citocinas se torna necessária para uma melhor compreensão de sua polarização em um estado anti ou pró-inflamatório, bem como a utilização de técnicas como a citometria de fluxo, para verificar se os presentes mediadores são produzidos pela micróglia ou por macrófagos oriundos da periferia (MIRANDA et al., 2016).

No presente estudo, o tratamento com o PLX3397 não foi capaz de reverter a preferência condicionada ao lugar induzida por cocaína. Este resultado pode parecer contraditório em comparação à literatura, uma vez que as drogas minociclina e ibudilast são capazes de reverter alterações comportamentais induzidas por diferentes drogas de abuso como opioides, cocaína, metanfetamina e álcool (HUTCHISON et al, 2008;

ZHANG et al., 2013; NORTHCUTT et al., 2015; RAY et al., 2017; METZ et al., 2017). Porém a minociclina é capaz de atuar de diferentes formas no sistema glutamatérgico, inibir metaloproteinases, inibir apoptose, dentre outros efeitos (MOLLER et al., 2016). Já o ibudilast é capaz de prevenir a degradação de AMPc, que tem seus níveis alterados na presença de drogas de abuso (POLAND et al., 2016). Ademais, Liu e colaboradores (2017) demonstraram que o bloqueio da enzima fosfodiesterase 4, alvo do ibudilast, é capaz de reverter a sensibilização comportamental, além de restaurar o equilíbrio entre vias inibitórias e excitatórias após a administração de cocaína. Nesse contexto, a capacidade dessas drogas de modular outras vias poderia explicar a disparidade do nosso resultado com a literatura.

Os resultados comportamentais apresentados no presente estudo demonstram que a neurobiologia da adicção é um processo complexo e pode recrutar diferentes vias neurais e diferentes processos plásticos, como por exemplo, sensibilizações associativas e não associativas (ANAGNOSTARAS et al., 1996; ANAGNOSTARAS et al., 2002). Isso é corroborado por Adams e colaboradores (2001), que demonstraram que os antagonistas dopaminérgicos haloperidol, raclopride e SCH23390 foram capazes de reverter a sensibilização comportamental. Porém nenhuma dessas drogas alterou a hiperlocomoção condicionada, sendo que apenas o haloperidol reverteu a preferência condicionada ao lugar induzidos por cocaína. Além disso, o tratamento com o antagonista canabinoide SR 141716 atenuou a preferência condicionada ao lugar, porém não teve efeito na sensibilização comportamental induzida por morfina (SINGH et al., 2004).

O antagonista do receptor NMDA, CPP [\pm 3-(2-carboxy-piperazine-4-yl)-propyl-1-phosphonic], é capaz de reverter a preferência condicionada ao lugar induzida por cocaína e o medo condicionado, porém não tem efeito na sensibilização comportamental (CAMARCK et al., 2003). Dessa forma, é possível que as drogas utilizadas em diversos estudos sejam capazes de reverter a preferência condicionada ao lugar devido ao bloqueio de memória associativa. Nesse contexto, é possível justificar que este

seria o caso da minociclina, uma vez que a via glutamatérgica é imprescindível para o processo de formação de memória (RIEDEL et al., 2003). Porém, são necessários estudos para confirmação desta hipótese.

A ativação dos receptores TRL4 presentes na micróglia é capaz de modular os efeitos recompensadores das drogas de abuso. Nesse sentido, Chen e colaboradores (2017) demonstraram que o bloqueio da sinalização de TRL4/STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) é capaz de impedir a aquisição da memória relacionada a preferência condicionada ao lugar, porém, não a sua expressão. Ou seja, esse dado sugere que uma vez que a memória do condicionamento (estímulo associado com a pista) é consolidada, o animal irá apresentar a alteração comportamental (preferência pelo compartimento em que recebeu a droga) induzida pela droga. Tendo em vista que o tratamento com PLX3397 não aboliu completamente as alterações comportamentais induzidas pela cocaína no modelo de sensibilização, é razoável assumir que o tratamento com PLX3397 não bloqueia completamente a sinalização TRL4/STAT3. Ademais, observamos uma depleção de apenas 50% da micróglia, o que corrobora com o fato de que essa via é completamente bloqueada. Assim, ocorre a formação da memória relacionada ao condicionamento, e por isso o tratamento não foi capaz de reverter a preferência condicionada ao lugar no presente estudo.

Por fim, o tamanho amostral pode ter contribuído para a ausência de efeitos da depleção de micróglia no modelo do CPP. De acordo com o protocolo experimental publicado pela JOVE por SMITH e colaboradores (2016), o número de animais experimentais ideal para este modelo comportamental é entre 12 e 30 animais, dependendo do efeito do tratamento. Uma vez que a depleção microglial pode ter um efeito sutil na neurobiologia da adicção, o aumento do número de indivíduos por grupo poderia identificar possíveis diferenças. Essa avaliação pode ser considerada em estudos futuros

Uma hipótese em nosso estudo é de que a micróglia participa das adaptações plásticas que ocorrem nos testes comportamentais utilizados. Nesse sentido, uma via de comunicação entre micróglia e sinapses é

através de fatores neurotróficos, que desempenham importante papel na plasticidade sináptica (IRALA et al., 2016; GIBON et al., 2017). Nesse contexto, foram dosados os níveis de BDNF, NGF e GDNF para melhor compreensão dos mecanismos pelos quais a micróglia modula as alterações induzidas pela cocaína.

O BDNF e seu receptor TrkB desempenham importante papel na formação de circuitos neurais relacionados à memória, sendo capazes de promover um aumento na densidade sináptica no sistema de recompensa após a administração de cocaína (KA et al., 2016; ANDERSON et al., 2017). No presente estudo, observamos uma redução dos níveis de BDNF no PFC de animais tratados com cocaína, que foi revertido pelo tratamento com o PLX3397. Porém, não foram observadas alterações dos níveis de BDNF no hipocampo e no estriado.

A administração de cocaína promove redução da atividade do PFC, o que tem como consequência um comprometimento dos processos de tomada de decisão e favorece o uso compulsivo da droga. Rasakham e colaboradores (2014) demonstraram que a administração de cocaína promove uma diminuição da densidade sináptica no PFC, acarretando um comprometimento da sinalização glutamatérgica cortico-estriatal (GO et al., 2016), que é restaurada após a microinfusão de BDNF (BERGLIND et al., 2009). Nesse contexto, a redução dos níveis de BDNF no PFC encontrados no presente estudo pode estar relacionada com a redução das atividades corticais e alterações comportamentais observadas. Ademais, a restauração dos níveis de BDNF pelo PLX3397 pode ter contribuído para a diminuição da sensibilização comportamental. Nessa mesma linha de raciocínio, Fumagalli e colaboradores (2007), também observaram uma diminuição dos níveis de BDNF no PFC, e Berglind e colaboradores (2007) demonstraram que a infusão de BDNF no PFC foi capaz de reduzir a autoadministração de cocaína.

Entretanto, a hipótese da diminuição na sensibilização devido a restauração dos níveis de BDNF no PFC não pode ser especulada para a preferência condicionada ao lugar, uma vez que não observamos alteração neste comportamento. Porém a administração de 7,8-

dihydroxyflavone (7,8-DHF), um agonista do receptor TrkB, foi capaz de atenuar a sensibilização locomotora induzida por metanfetamina (REN et al., 2014), porém não teve efeito na preferência condicionada ao lugar induzida por cocaína (TZENG et al., 2013), o que pode justificar a disparidade dos resultados comportamentais encontrado em nosso estudo.

A cocaína promove modificações de conexões pré-existentes e também criação de novas sinapses no hipocampo, como consequência de um aumento das espinhas dendríticas e alteração de sua morfologia, através do aumento da sinalização BDNF-TrkB (KA et al., 2016). Porém, no nosso estudo, não foram encontradas alterações nos níveis de BDNF nesta região. De forma semelhante, Simchon-Tenenbaum e colaboradores (2015) também não observaram alterações dessa neurotrofina após a administração de cocaína.

O BDNF também é capaz de promover um aumento de espinhas dendríticas no NA (ANDERSON et al., 2017). Porém estudos demonstram que a sinalização BDNF-TrkB pode ser diferente entre o NAcc e o NAcSh (LI et al., 2013). Graham e colaboradores (2007) demonstraram que após o teste de autoadministração induzida por cocaína, ocorre um aumento dos níveis de BDNF e da sinalização TrkB no NAcSh, mas não no NAcc. Portanto, é razoável assumir que a análise do estriado inteiro pode comprometer a quantificação dos fatores neurotróficos e a compreensão exata de suas sinalizações e por isso não foram encontradas alterações nos níveis de BDNF no estriado.

Em uma revisão sistemática de meta-análise publicada por Ornell e colaboradores (2018), usuários ativos de cocaína apresentaram um maior nível plasmático de BDNF, o que pode estar relacionado com a severidade da adicção. E ainda, maiores níveis séricos de BDNF podem estar correlacionados com um maior desejo pela droga, e perda de controle durante seu uso (COROMINAS-ROSO et al., 2013). Assim, o BDNF apresenta ser uma importante neurotrofina em usuários de cocaína, o que demonstra a necessidade de mais estudos para melhor compreensão de seu papel nesta patologia.

O GDNF, outra neurotrofina, foi inicialmente descrito como um fator neurotrófico essencial para a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos. Porém estudos demonstram seu papel em outras funções celulares, como proliferação, crescimento neuronal, aprendizado e memória (GERLAI et al., 2001; CORTÉS et al., 2017), podendo então participar das alterações plásticas induzidas por drogas como álcool, cocaína e opioides (NIWA et al., 2007; LU et al., 2009; BARAK et al., 2014). No presente estudo demonstramos que tanto o tratamento com cocaína, quanto o tratamento com o PLX3397, ou a associação dos dois, foram capazes de reduzir os níveis de GDNF no PFC.

Messer e colaboradores (2000) demonstraram que a administração de cocaína induziu uma alteração nos níveis de GDNF, e que a infusão de GDNF na VTA promoveu uma diminuição da preferência condicionada ao lugar induzida por cocaína. O mesmo resultado foi encontrado por Green-Sadan e colaboradores (2003), no teste de autoadministração. Nesse sentido, a diminuição dos níveis de GDNF no PFC de animais tratados com cocaína ou cocaína + PLX3397, poderia estar relacionada com o aumento da taxa de preferência ao compartimento pareado com a droga encontrada em nosso estudo.

Messer e colaboradores (2000) também demonstraram uma maior sensibilização comportamental induzida por cocaína em animais nocaute para GDNF. Porém, Airavaara e colaboradores (2004) e Yan e colaboradores (2007) também utilizaram animais nocaute para GDNF, e não observaram diferenças em relação aos animais controle no teste de sensibilização comportamental induzida por cocaína e metanfetamina, respectivamente. Assim, essa disparidade de resultados promove uma difícil compreensão da sinalização do GDNF na sensibilização comportamental.

O NGF é uma neurotrofina que pode estar relacionada com crescimento de axônios e dendritos, e aumento da formação de sinapses (GIBON et al., 2017). Porém estudos que buscam compreender sua relação com drogas de abuso ainda são escassos. Grimm e colaboradores (2001) não observaram alterações nos níveis de NGF na

VTA, no NAc e na amígdala de animais tratados com cocaína. Peregud e colaboradores (2015) também não observaram alterações nos níveis de NGF no CPF, no estriado e no hipocampo de animais tratados com morfina. Assim, estes dados corroboram nosso resultado encontrado no CPF, região em que não foram observadas alterações dos níveis de NGF.

Já no estriado, observamos uma diminuição dos níveis de NGF nos animais tratados com cocaína e com cocaína + PLX3397, além de uma tendência de diminuição dos níveis de NGF nos animais tratados apenas com PLX3397. Ademais, houve uma diminuição dos níveis de NGF no hipocampo dos animais tratados com cocaína + PLX3397, sendo observada uma tendência do tratamento com PLX3397 em aumentar os níveis de NGF nesta região que seria revertida pela cocaína. Zachor e colaboradores (1994; 2000) demonstraram que a cocaína é capaz de inibir o crescimento de neuritos induzido por NGF em células P12, sendo essa inibição via D₁. Assim, este estudo mostra possíveis relações do mecanismo de ação da cocaína com a sinalização de NGF e consequentes alterações plásticas, o que pode estar relacionado com a diminuição dos níveis de NGF no estriado e no hipocampo de animais que receberam cocaína. Além disso, usuários de cocaína também apresentam uma diminuição dos níveis séricos de NGF (ANGELUCCI et al., 2007), o que possibilita especular que a cocaína tende a diminuir os níveis de NGF de forma central e periférica.

Em suma, nossos resultados sugerem que tanto a micróglia quanto os fatores neurotróficos poderiam apresentar diferentes funções no contexto da adicção, dependendo da região. Dessa forma, nosso estudo contribui para um melhor entendimento da micróglia na neurobiologia da adicção e possíveis mecanismos de ação.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que a cocaína é capaz de ativar as células microgliais, e que esta célula pode ser importante para as alterações comportamentais induzidas por esta droga. Além disso, nosso estudo sugere que a sinalização via fatores neurotróficos poderia ser um mecanismo pelo qual a micróglia participa das adaptações plásticas induzidas pela cocaína. Porém são necessários mais estudos para melhor compreensão do exato mecanismo envolvido.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, R. R. et al. Prevalence of cocaine use in Brazil: data from the II Brazilian national alcohol and drugs survey (BNADS). **Addict Behav**, v. 39, n. 1, p. 297-301, Jan 2014. ISSN 1873-6327. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24455783> >.

ADAMANTIDIS, A. R. et al. Optogenetic interrogation of dopaminergic modulation of the multiple phases of reward-seeking behavior. **J Neurosci**, v. 31, n. 30, p. 10829-35, Jul 2011. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21795535> >.

ADAMS, J. U. et al. Differential effects of dopamine antagonists on locomotor activity, conditioned activity and conditioned place preference induced by cocaine in rats. **Behav Pharmacol**, v. 12, n. 8, p. 603-11, Dec 2001. ISSN 0955-8810. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11856897> >.

AGUZZI, A.; BARRES, B. A.; BENNETT, M. L. Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? **Science**, v. 339, n. 6116, p. 156-61, Jan 2013. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23307732> >.

AKERELE, E.; OLUPONA, T. Drugs of Abuse. **Psychiatr Clin North Am**, v. 40, n. 3, p. 501-517, 09 2017. ISSN 1558-3147. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28800805> >.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, Feb 2006. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16497588> >.

ANAGNOSTARAS, S. G.; ROBINSON, T. E. Sensitization to the psychomotor stimulant effects of amphetamine: modulation by associative learning. **Behav Neurosci**, v. 110, n. 6, p. 1397-414, Dec 1996. ISSN 0735-7044. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8986341> >.

ANAGNOSTARAS, S. G.; SCHALLERT, T.; ROBINSON, T. E. Memory processes governing amphetamine-induced psychomotor sensitization. **Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 6, p. 703-15, Jun 2002. ISSN 0893-133X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12007741> >.

ANDERSON, E. M. et al. BDNF-TrkB controls cocaine-induced dendritic spines in rodent nucleus accumbens dissociated from increases in addictive behaviors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 114, n. 35, p. 9469-9474, 08 2017. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28808012> >.

ANGELUCCI, F. et al. Chronic heroin and cocaine abuse is associated with decreased serum concentrations of the nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. **J Psychopharmacol**, v. 21, n. 8, p. 820-5, Nov 2007. ISSN 0269-8811. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17715210> >.

ARIAS-CARRIÓN, O. et al. Dopaminergic reward system: a short integrative review. **Int Arch Med**, v. 3, p. 24, Oct 2010. ISSN 1755-7682. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20925949> >.

ASSOCIATION, American Psychiatric. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5**. 5 ed. Porto Alegre: ArtMed, 2014. 992 p.

ASPINALL, E. J. et al. Are needle and syringe programmes associated with a reduction in HIV transmission among people who inject drugs: a systematic review and meta-analysis. **Int J Epidemiol**, v. 43, n. 1, p. 235-48, Feb 2014. ISSN 1464-3685. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24374889> >.

AVDOSHINA, V. et al. Morphine induces the release of CCL5 from astrocytes: potential neuroprotective mechanism against the HIV protein gp120. **Glia**, v. 58, n. 13, p. 1630-9, Oct 2010. ISSN 1098-1136. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20578038> >.

BACHTELL, R. et al. Targeting the Toll of Drug Abuse: The Translational Potential of Toll-Like Receptor 4. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 14, n. 6, p. 692-9, 2015. ISSN 1996-3181. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26022268> >.

BACHTELL, R. K. et al. Glial and neuroinflammatory targets for treating substance use disorders. **Drug Alcohol Depend**, v. 180, p. 156-170, 11 2017. ISSN 1879-0046. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28892721> >.

BAIK, J. H. Dopamine signaling in reward-related behaviors. **Front Neural Circuits**, v. 7, p. 152, 2013. ISSN 1662-5110. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24130517> >.

BAILEY, B. J. Looking back at a century of cocaine--use and abuse. **Laryngoscope**, v. 106, n. 6, p. 681-3, Jun 1996. ISSN 0023-852X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8656949> >.

BALER, R. D.; VOLKOW, N. D. Drug addiction: the neurobiology of disrupted self-control. **Trends Mol Med**, v. 12, n. 12, p. 559-66, Dec 2006a. ISSN 1471-4914. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17070107> >.

_____. Drug addiction: the neurobiology of disrupted self-control. **Trends Mol Med**, v. 12, n. 12, p. 559-66, Dec 2006b. ISSN 1471-4914. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17070107> >.

BARDO, Michael T.; HORTON, David B.; YATES, Justin R.. **Nonclinical assessment of abuse potential for new pharmaceuticals**: Conditioned place preference as a preclinical model for screening pharmacotherapies for drug abuse. 1 ed. [S.L.]: Academic Press, 2015. 151-196 p.

BARI, A. et al. Neuromodulation for substance addiction in human subjects: A review. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 95, p. 33-43, 12 2018. ISSN 1873-7528. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30268433> >.

BARRY, S. M.; MCGINTY, J. F. Role of Src Family Kinases in BDNF-Mediated Suppression of Cocaine-Seeking and Prevention of Cocaine-Induced ERK, GluN2A, and GluN2B Dephosphorylation in the Prelimbic Cortex. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 10, p. 1972-1980, Sep 2017. ISSN 1740-634X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28585567> >.

BAZOV, I. et al. Dynorphin and κ -Opioid Receptor Dysregulation in the Dopaminergic Reward System of Human Alcoholics. **Mol Neurobiol**, v. 55, n. 8, p. 7049-7061, Aug 2018. ISSN 1559-1182. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29383684> >.

BEATTIE, E. C. et al. Control of synaptic strength by glial TNF α . **Science**, v. 295, n. 5563, p. 2282-5, Mar 2002. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11910117> >.

BELLOZI, P. M. et al. Neuroprotective effects of the anticancer drug NVP-BE235 (dactolisib) on amyloid- β 1-42 induced neurotoxicity and memory impairment. **Sci Rep**, v. 6, p. 25226, 05 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27142962> >.

BELUJON, P. et al. Withdrawal from Acute Amphetamine Induces an Amygdala-Driven Attenuation of Dopamine Neuron Activity: Reversal by Ketamine. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 2, p. 619-27, Jan 2016. ISSN 1740-634X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26129677> >.

BERGLIND, W. J. et al. A single intra-PFC infusion of BDNF prevents cocaine-induced alterations in extracellular glutamate within the nucleus accumbens. **J Neurosci**, v. 29, n. 12, p. 3715-9, Mar 2009. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19321768> >.

BOBADILLA, A. C. et al. Accumbens brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transmission inhibits cocaine seeking. **Addict Biol**, Jun 2018. ISSN 1369-1600. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29890020> >.

_____. Corticostriatal plasticity, neuronal ensembles, and regulation of drug-seeking behavior. **Prog Brain Res**, v. 235, p. 93-112, 2017. ISSN

1875-7855. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29054293> >.

BOWERS, M. S.; CHEN, B. T.; BONCI, A. AMPA receptor synaptic plasticity induced by psychostimulants: the past, present, and therapeutic future. **Neuron**, v. 67, n. 1, p. 11-24, Jul 2010. ISSN 1097-4199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20624588> >.

BRITT, J. P. et al. Synaptic and behavioral profile of multiple glutamatergic inputs to the nucleus accumbens. **Neuron**, v. 76, n. 4, p. 790-803, Nov 2012. ISSN 1097-4199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23177963> >.

BROWN, K. T. et al. Innate immune signaling in the ventral tegmental area contributes to drug-primed reinstatement of cocaine seeking. **Brain Behav Immun**, v. 67, p. 130-138, Jan 2018. ISSN 1090-2139. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28813640> >.

BRUTTGER, J. et al. Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System. **Immunity**, v. 43, n. 1, p. 92-106, Jul 2015. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26163371> >.

BUTOWSKI, N. et al. Orally administered colony stimulating factor 1 receptor inhibitor PLX3397 in recurrent glioblastoma: an Ivy Foundation Early Phase Clinical Trials Consortium phase II study. **Neuro Oncol**, v. 18, n. 4, p. 557-64, Apr 2016. ISSN 1523-5866. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26449250> >.

CARMACK, S. A. et al. The competitive NMDA receptor antagonist CPP disrupts cocaine-induced conditioned place preference, but spares behavioral sensitization. **Behav Brain Res**, v. 239, p. 155-63, Feb 2013. ISSN 1872-7549. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23153931> >.

CENTER, National Drug Intelligence. **National drug threat assessment 2011**. 2011-Q0317-001 ed. [S.L.: s.n.], 2011. 64 p.

CHAN, B. et al. **Pharmacotherapy for stimulant use disorders: a systematic review**. Washington, DC: QUERI, 2018.

CHEN, H.; MANEV, H. Effects of minocycline on cocaine sensitization and phosphorylation of GluR1 receptors in 5-lipoxygenase deficient mice. **Neuropharmacology**, v. 60, n. 7-8, p. 1058-63, Jun 2011. ISSN 1873-7064. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20868701> >.

CHEN, H.; UZ, T.; MANEV, H. Minocycline affects cocaine sensitization in mice. **Neurosci Lett**, v. 452, n. 3, p. 258-61, Mar 2009. ISSN 1872-7972. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19348734> >.

CHEN, J. X. et al. Activation of TLR4/STAT3 signaling in VTA contributes to the acquisition and maintenance of morphine-induced conditioned place preference. **Behav Brain Res**, v. 335, p. 151-157, 09 2017. ISSN 1872-7549. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28827130> >.

CHEN, X. et al. Metabolic Enzymes of Cocaine Metabolite Benzoyllecgonine. **ACS Chem Biol**, v. 11, n. 8, p. 2186-94, 08 2016. ISSN 1554-8937. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27224254> >.

CHOI, Y. S. et al. IGF-1 receptor-mediated ERK/MAPK signaling couples status epilepticus to progenitor cell proliferation in the subgranular layer of the dentate gyrus. **Glia**, v. 56, n. 7, p. 791-800, May 2008. ISSN 0894-1491. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18338791> >.

CONTET, C.; KIEFFER, B. L.; BEFORT, K. Mu opioid receptor: a gateway to drug addiction. **Curr Opin Neurobiol**, v. 14, n. 3, p. 370-8, Jun 2004. ISSN 0959-4388. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15194118> >.

CORTÉS, D. et al. The Non-Survival Effects of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor on Neural Cells. **Front Mol Neurosci**, v. 10, p. 258, 2017. ISSN 1662-5099. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28878618> >.

COTTO, B. et al. Cocaine-mediated activation of microglia and microglial MeCP2 and BDNF production. **Neurobiol Dis**, v. 117, p. 28-41, Sep 2018. ISSN 1095-953X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29859319> >.

COX, S. M. L. et al. Cocaine Cue-Induced Dopamine Release in Recreational Cocaine Users. **Sci Rep**, v. 7, p. 46665, Apr 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28443614> >.

CREGLER, L. L.; MARK, H. Medical complications of cocaine abuse. **N Engl J Med**, v. 315, n. 23, p. 1495-500, Dec 1986. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3537786> >.

CREWS, F. T. et al. Toll-like receptor signaling and stages of addiction. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 234, n. 9-10, p. 1483-1498, 05 2017. ISSN 1432-2072. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28210782> >.

CROCQ, M. A. Historical and cultural aspects of man's relationship with addictive drugs. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 9, n. 4, p. 355-61, 2007. ISSN 1294-8322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18286796> >.

CROTTI, A.; RANSOHOFF, R. M. Microglial Physiology and

Pathophysiology: Insights from Genome-wide Transcriptional Profiling. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 505-515, Mar 2016. ISSN 1097-4180. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26982357> >.

CRUNELLE, C. L. et al. Dysfunctional amygdala activation and connectivity with the prefrontal cortex in current cocaine users. **Hum Brain Mapp**, v. 36, n. 10, p. 4222-30, Oct 2015. ISSN 1097-0193. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26220024> >.

CUNNINGHAM, C. L.; MARTÍNEZ-CERDEÑO, V.; NOCTOR, S. C. Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. **J Neurosci**, v. 33, n. 10, p. 4216-33, Mar 2013. ISSN 1529-2401. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23467340> >.

DAGHER, N. N. et al. Colony-stimulating factor 1 receptor inhibition prevents microglial plaque association and improves cognition in 3xTg-AD mice. **J Neuroinflammation**, v. 12, p. 139, Aug 2015. ISSN 1742-2094. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26232154> >.

DE MIRANDA, A. S. et al. A Neuroprotective Effect of the Glutamate Receptor Antagonist MK801 on Long-Term Cognitive and Behavioral Outcomes Secondary to Experimental Cerebral Malaria. **Mol Neurobiol**, v. 54, n. 9, p. 7063-7082, 11 2017. ISSN 1559-1182. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27796746> >.

DEGENHARDT, L.; HALL, W. Extent of illicit drug use and dependence, and their contribution to the global burden of disease. **Lancet**, v. 379, n. 9810, p. 55-70, Jan 2012a. ISSN 1474-547X. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22225671> >.

_____. Extent of illicit drug use and dependence, and their contribution to the global burden of disease. **Lancet**, v. 379, n. 9810, p. 55-70, Jan 2012b. ISSN 1474-547X. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22225671> >.

DELFS, J. M. et al. Noradrenaline in the ventral forebrain is critical for opiate withdrawal-induced aversion. **Nature**, v. 403, n. 6768, p. 430-4, Jan 2000. ISSN 0028-0836. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10667795> >.

DEMERS, C. H.; BOGDAN, R.; AGRAWAL, A. The Genetics, Neurogenetics and Pharmacogenetics of Addiction. **Curr Behav Neurosci Rep**, v. 1, n. 1, p. 33-44, Mar 2014. ISSN 2196-2979. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25045619> >.

DI CHIARA, G.; IMPERATO, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 14, p. 5274-8, Jul 1988. ISSN 0027-8424. Disponible em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2899326> >.

DOS SANTOS, M. et al. Cocaine increases dopaminergic connectivity in the nucleus accumbens. **Brain Struct Funct**, v. 223, n. 2, p. 913-923, Mar 2018. ISSN 1863-2661. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29027032> >.

DRGONOVA, J. et al. Altered CSMD1 Expression Alters Cocaine-Conditioned Place Preference: Mutual Support for a Complex Locus from Human and Mouse Models. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0120908, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26171607> >.

ELMORE, M. R. et al. Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. **Neuron**, v. 82, n. 2, p. 380-97, Apr 2014. ISSN 1097-4199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24742461> >.

ETTNER, S. L. et al. Benefit-cost in the California treatment outcome project: does substance abuse treatment "pay for itself"? **Health Serv Res**, v. 41, n. 1, p. 192-213, Feb 2006. ISSN 0017-9124. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16430607> >.

EVANS, B. M.; BARTLETT, J. R. Prediction of outcome in severe head injury based on recognition of sleep related activity in the polygraphic electroencephalogram. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 59, n. 1, p. 17-25, Jul 1995. ISSN 0022-3050. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7608703> >.

EYO, U. B. et al. Regulation of Physical Microglia-Neuron Interactions by Fractalkine Signaling after Status Epilepticus. **eNeuro**, v. 3, n. 6, 2016 Nov-Dec 2016. ISSN 2373-2822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28101527> >.

FERNANDES, Sara Silva et al . Evasão do tratamento da dependência de drogas: prevalência e fatores associados identificados a partir de um trabalho de Busca Ativa. **Cad. saúde colet.**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p. 131-137, Apr. 2017. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1414-462X2017000200131&lng=en&nrm=iso >.

FERRARIO, C. R. et al. Homeostasis Meets Motivation in the Battle to Control Food Intake. **J Neurosci**, v. 36, n. 45, p. 11469-11481, 11 2016. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27911750> >.

FILIP, M. et al. Alterations in BDNF and trkB mRNAs following acute or sensitizing cocaine treatments and withdrawal. **Brain Res**, v. 1071, n. 1, p. 218-25, Feb 2006. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16423334> >.

FONTAINE, R. H. et al. IL-9/IL-9 receptor signaling selectively protects cortical neurons against developmental apoptosis. **Cell Death Differ**, v. 15, n. 10, p. 1542-52, Oct 2008. ISSN 1350-9047. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18551134> >.

FRANK, M. G. et al. Microglia: Neuroimmune-sensors of stress. **Semin Cell Dev Biol**, Jan 2019. ISSN 1096-3634. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30638704> >.

FRIEDMAN, D. P.; AGGLETON, J. P.; SAUNDERS, R. C. Comparison of hippocampal, amygdala, and perirhinal projections to the nucleus accumbens: combined anterograde and retrograde tracing study in the Macaque brain. **J Comp Neurol**, v. 450, n. 4, p. 345-65, Sep 2002. ISSN 0021-9967. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12209848> >.

FUMAGALLI, F. et al. Repeated exposure to cocaine differently modulates BDNF mRNA and protein levels in rat striatum and prefrontal cortex. **Eur J Neurosci**, v. 26, n. 10, p. 2756-63, Nov 2007. ISSN 0953-816X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18001273> >.

GARAVAN, H. et al. Cue-induced cocaine craving: neuroanatomical specificity for drug users and drug stimuli. **Am J Psychiatry**, v. 157, n. 11, p. 1789-98, Nov 2000. ISSN 0002-953X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11058476> >.

GERLAI, R. et al. Impaired water maze learning performance without altered dopaminergic function in mice heterozygous for the GDNF mutation. **Eur J Neurosci**, v. 14, n. 7, p. 1153-63, Oct 2001. ISSN 0953-816X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11683907> >.

GIBON, J.; BARKER, P. A. Neurotrophins and Proneurotrophins: Focus on Synaptic Activity and Plasticity in the Brain. **Neuroscientist**, v. 23, n. 6, p. 587-604, 12 2017. ISSN 1089-4098. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28303740> >.

GINHOUX, F. et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. **Science**, v. 330, n. 6005, p. 841-5, Nov 2010. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20966214> >.

_____. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. **Nat Immunol**, v. 17, n. 1, p. 34-40, Jan 2016a. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26681460> >.

_____. New insights into the multidimensional concept of macrophage

ontogeny, activation and function. **Nat Immunol**, v. 17, n. 1, p. 34-40, Jan 2016b. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26681460> >.

GO, B. S.; BARRY, S. M.; MCGINTY, J. F. Glutamatergic neurotransmission in the prefrontal cortex mediates the suppressive effect of intra-prelimbic cortical infusion of BDNF on cocaine-seeking. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 26, n. 12, p. 1989-1999, 12 2016. ISSN 1873-7862. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27765467> >.

GOLDSTEIN, R. Z.; VOLKOW, N. D. Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. **Nat Rev Neurosci**, v. 12, n. 11, p. 652-69, Oct 2011. ISSN 1471-0048. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22011681> >.

GONZÁLEZ, J. C. et al. Neuroprotectant minocycline depresses glutamatergic neurotransmission and Ca(2+) signalling in hippocampal neurons. **Eur J Neurosci**, v. 26, n. 9, p. 2481-95, Nov 2007. ISSN 0953-816X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17986028> >.

GRAHAM, D. L. et al. Dynamic BDNF activity in nucleus accumbens with cocaine use increases self-administration and relapse. **Nat Neurosci**, v. 10, n. 8, p. 1029-37, Aug 2007. ISSN 1097-6256. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17618281> >.

GRANT, J. E.; BREWER, J. A.; POTENZA, M. N. The neurobiology of substance and behavioral addictions. **CNS Spectr**, v. 11, n. 12, p. 924-30, Dec 2006a. ISSN 1092-8529. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17146406> >.

_____. The neurobiology of substance and behavioral addictions. **CNS Spectr**, v. 11, n. 12, p. 924-30, Dec 2006b. ISSN 1092-8529. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17146406> >.

GREEN-SADAN, T. et al. Transplantation of glial cell line-derived neurotrophic factor-expressing cells into the striatum and nucleus accumbens attenuates acquisition of cocaine self-administration in rats. **Eur J Neurosci**, v. 18, n. 7, p. 2093-8, Oct 2003. ISSN 0953-816X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14622243> >.

GRIMM, J. W. et al. 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**, v. 23, n. 3, p. 742-7, Feb 2003. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12574402> >.

HAAS, L. F. Coca shrub (*Erythroxylum coca*). **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 59, n. 1, p. 25, Jul 1995. ISSN 0022-3050. Disponível em:

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7608704> >.

HAGEMeyer, N. et al. Microglia contribute to normal myelinogenesis and to oligodendrocyte progenitor maintenance during adulthood. **Acta Neuropathol**, v. 134, n. 3, p. 441-458, 09 2017. ISSN 1432-0533. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28685323> >.

HAN, X. et al. Microglial Depletion with Clodronate Liposomes Increases Proinflammatory Cytokine Levels, Induces Astrocyte Activation, and Damages Blood Vessel Integrity. **Mol Neurobiol**, Feb 2019. ISSN 1559-1182. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30734229> >.

HANCOCK, D. B. et al. Human Genetics of Addiction: New Insights and Future Directions. **Curr Psychiatry Rep**, v. 20, n. 2, p. 8, 03 2018. ISSN 1535-1645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29504045> >.

HARM REDUCTIONAL INTERNATIONAL. **Harm reductional international**. Disponível em: <<https://www.hri.global/>>. Acesso em: 20 mar. 2019.

HARRIS, G. C.; ASTON-JONES, G. Critical role for ventral tegmental glutamate in preference for a cocaine-conditioned environment. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 73-6, Jan 2003. ISSN 0893-133X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12496942> >.

HASBI, A. et al. Activation of Dopamine D1-D2 Receptor Complex Attenuates Cocaine Reward and Reinstatement of Cocaine-Seeking through Inhibition of DARPP-32, ERK, and Δ FosB. **Front Pharmacol**, v. 8, p. 924, 2017. ISSN 1663-9812. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29354053> >.

HECK, N. et al. A new automated 3D detection of synaptic contacts reveals the formation of cortico-striatal synapses upon cocaine treatment in vivo. **Brain Struct Funct**, v. 220, n. 5, p. 2953-66, Sep 2015. ISSN 1863-2661. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25001083> >.

HILLMER, A. T. et al. Microglial depletion and activation: A [EJNMMI Res, v. 7, n. 1, p. 59, Dec 2017. ISSN 2191-219X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28741281> >.

HOLDEN, T. Addiction is not a disease. **CMAJ**, v. 184, n. 6, p. 679, Apr 2012. ISSN 1488-2329. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22473931> >.

HOVENS, Iris B; NYAKAS, Csaba; SCHOEMAKER, Regien G. A novel method for evaluating microglial activation using ionized calcium- binding

adaptor protein-1 staining: cell body to cell size ratio. **Neuroimmunol Neuroinflamm.** 2014 Sept; 1 (2); 82-8.

HULL, Clark. **Principles of behavior: an introduction to behavior theory.** 1 ed. New York: Appleton-Century, 1943. 444 p.

HUTCHINSON, M. R. et al. Opioid activation of toll-like receptor 4 contributes to drug reinforcement. **J Neurosci**, v. 32, n. 33, p. 11187-200, Aug 2012. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22895704> >.

HÄGELE, C. et al. Dimensional psychiatry: reward dysfunction and depressive mood across psychiatric disorders. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 232, n. 2, p. 331-41, Jan 2015. ISSN 1432-2072. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24973896> >.

IMBESI, M. et al. Minocycline increases phosphorylation and membrane insertion of neuronal GluR1 receptors. **Neurosci Lett**, v. 447, n. 2-3, p. 134-7, Dec 2008. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18852022> >.

IRALA, D. et al. The GDNF-GFR α 1 complex promotes the development of hippocampal dendritic arbors and spines via NCAM. **Development**, v. 143, n. 22, p. 4224-4235, 11 2016. ISSN 1477-9129. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27707798> >.

JASINSKA, A. J. et al. Factors modulating neural reactivity to drug cues in addiction: a survey of human neuroimaging studies. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 38, p. 1-16, Jan 2014. ISSN 1873-7528. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24211373> >.

JAY, M. Miracle or Menace?: The Arrival of Cocaine 1860-1900. **Int Rev Neurobiol**, v. 120, p. 27-39, 2015. ISSN 2162-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26070752> >.

JORDAN, N. et al. Economic benefit of chemical dependency treatment to employers. **J Subst Abuse Treat**, v. 34, n. 3, p. 311-9, Apr 2008. ISSN 0740-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17614238> >.

KA, M. et al. Transactivation of TrkB by Sigma-1 receptor mediates cocaine-induced changes in dendritic spine density and morphology in hippocampal and cortical neurons. **Cell Death Dis**, v. 7, n. 10, p. e2414, 10 2016. ISSN 2041-4889. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27735948> >.

KALIVAS, P. W.; DUFFY, P. Effect of acute and daily cocaine treatment on extracellular dopamine in the nucleus accumbens. **Synapse**, v. 5, n. 1, p. 48-58, 1990. ISSN 0887-4476. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2300906> >.

KALIVAS, P. W.; O'BRIEN, C. Drug addiction as a pathology of staged

neuroplasticity. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 166-80, Jan 2008. ISSN 0893-133X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17805308> >.

KALIVAS, P. W.; VOLKOW, N. D. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. **Am J Psychiatry**, v. 162, n. 8, p. 1403-13, Aug 2005. ISSN 0002-953X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16055761> >.

KARCH, S. B. The history of cocaine toxicity. **Hum Pathol**, v. 20, n. 11, p. 1037-9, Nov 1989. ISSN 0046-8177. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2680890> >.

KENDLER, K. S. et al. A Contagion Model for Within-Family Transmission of Drug Abuse. **Am J Psychiatry**, v. 176, n. 3, p. 239-248, Mar 2019. ISSN 1535-7228. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30818984> >.

KETTENMANN, H. et al. Physiology of Microglia. p. 461-553, 2011.
KOBBER, H. et al. Regulation of craving by cognitive strategies in cigarette smokers. **Drug Alcohol Depend**, v. 106, n. 1, p. 52-5, Jan 2010. ISSN 1879-0046. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19748191> >.

KOHNO, M. et al. Neuroinflammation in addiction: A review of neuroimaging studies and potential immunotherapies. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 179, p. 34-42, Apr 2019. ISSN 1873-5177. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30695700> >.

KONOVA, A. B. et al. Structural and behavioral correlates of abnormal encoding of money value in the sensorimotor striatum in cocaine addiction. **Eur J Neurosci**, v. 36, n. 7, p. 2979-88, Oct 2012. ISSN 1460-9568. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22775285> >.

KOOB, G. F. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. **Trends Pharmacol Sci**, v. 13, n. 5, p. 177-84, May 1992. ISSN 0165-6147. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1604710> >.

_____. The role of CRF and CRF-related peptides in the dark side of addiction. **Brain Res**, v. 1314, p. 3-14, Feb 2010. ISSN 1872-6240. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19912996> >.

_____. Antireward, compulsivity, and addiction: seminal contributions of Dr. Athina Markou to motivational dysregulation in addiction. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 234, n. 9-10, p. 1315-1332, 05 2017. ISSN 1432-2072. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28050629> >.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Addiction and the brain antireward system.

Annu Rev Psychol, v. 59, p. 29-53, 2008a. ISSN 0066-4308. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18154498> >.

_____. Addiction and the brain antireward system. **Annu Rev Psychol**, v. 59, p. 29-53, 2008b. ISSN 0066-4308. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18154498> >.

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. **Lancet Psychiatry**, v. 3, n. 8, p. 760-73, Aug 2016a. ISSN 2215-0374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27475769> >.

_____. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. **Lancet Psychiatry**, v. 3, n. 8, p. 760-73, Aug 2016b. ISSN 2215-0374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27475769> >.

KOSKELA, M. et al. Update of neurotrophic factors in neurobiology of addiction and future directions. **Neurobiol Dis**, v. 97, n. Pt B, p. 189-200, 01 2017. ISSN 1095-953X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27189755> >.

KÖKS, S. Experimental Models on Effects of Psychostimulants. **Int Rev Neurobiol**, v. 120, p. 107-29, 2015. ISSN 2162-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26070755> >.

LACAGNINA, M. J.; RIVERA, P. D.; BILBO, S. D. Glial and Neuroimmune Mechanisms as Critical Modulators of Drug Use and Abuse. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 1, p. 156-177, 01 2017a. ISSN 1740-634X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27402494> >.

_____. Glial and Neuroimmune Mechanisms as Critical Modulators of Drug Use and Abuse. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 1, p. 156-177, 01 2017b. ISSN 1740-634X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27402494> >.

LAMMEL, S. et al. Projection-specific modulation of dopamine neuron synapses by aversive and rewarding stimuli. **Neuron**, v. 70, n. 5, p. 855-62, Jun 2011. ISSN 1097-4199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21658580> >.

_____. Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. **Nature**, v. 491, n. 7423, p. 212-7, Nov 2012. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23064228> >.

LAMONTAGNE, S. J.; OLMSTEAD, M. C. Animal models in addiction research: A dimensional approach. **Neurosci Biobehav Rev**, Oct 2018. ISSN 1873-7528. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30309630> >.

LASHKARIZADEH, M. R. et al. Impact of Opium Addiction on Levels of

Pro- and Anti-inflammatory Cytokines after Surgery. **Addict Health**, v. 8, n. 1, p. 9-15, 2016. ISSN 2008-4633. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27274788> >.

LAWSON, L. J. et al. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. **Neuroscience**, v. 39, n. 1, p. 151-70, 1990. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2089275> >.

LESHNER, A. I. Addiction is a brain disease, and it matters. **Science**, v. 278, n. 5335, p. 45-7, Oct 1997. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9311924> >.

LEWIS, M. Brain Change in Addiction as Learning, Not Disease. **N Engl J Med**, v. 379, n. 16, p. 1551-1560, Oct 2018. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30332573> >.

LEWITUS, G. M. et al. Microglial TNF- α Suppresses Cocaine-Induced Plasticity and Behavioral Sensitization. **Neuron**, v. 90, n. 3, p. 483-91, 05 2016. ISSN 1097-4199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27112496> >.

LI, Q.; BARRES, B. A. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 18, n. 4, p. 225-242, Apr 2018. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29151590> >.

LI, X. et al. Different roles of BDNF in nucleus accumbens core versus shell during the incubation of cue-induced cocaine craving and its long-term maintenance. **J Neurosci**, v. 33, n. 3, p. 1130-42, Jan 2013. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23325250> >.

LI, X.; WOLF, M. E. Multiple faces of BDNF in cocaine addiction. **Behav Brain Res**, v. 279, p. 240-54, Feb 2015. ISSN 1872-7549. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25449839> >.

LIAN, H.; ROY, E.; ZHENG, H. Microglial Phagocytosis Assay. **Bio Protoc**, v. 6, n. 21, Nov 2016. ISSN 2331-8325. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29104891> >.

LIM, S. H. et al. Neuronal synapse formation induced by microglia and interleukin 10. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e81218, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24278397> >.

LIN, S. K. Pharmacological means of reducing human drug dependence: a selective and narrative review of the clinical literature. **Br J Clin Pharmacol**, v. 77, n. 2, p. 242-52, Feb 2014. ISSN 1365-2125. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23701272> >.

LIU, X. et al. PDE4 Inhibition Restores the Balance Between Excitation and Inhibition in VTA Dopamine Neurons Disrupted by Repeated In Vivo Cocaine Exposure. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 10, p. 1991-1999, Sep 2017. ISSN 1740-634X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28497801> >.

LÜSCHER, C. Drug-evoked synaptic plasticity causing addictive behavior. **J Neurosci**, v. 33, n. 45, p. 17641-6, Nov 2013. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24198356> >.

MAHAJAN, S. D. et al. Morphine modulates chemokine gene regulation in normal human astrocytes. **Clin Immunol**, v. 115, n. 3, p. 323-32, Jun 2005a. ISSN 1521-6616. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15893700> >.

_____. Morphine modulates chemokine gene regulation in normal human astrocytes. **Clin Immunol**, v. 115, n. 3, p. 323-32, Jun 2005b. ISSN 1521-6616. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15893700> >.

MAMELI, M.; LÜSCHER, C. Synaptic plasticity and addiction: learning mechanisms gone awry. **Neuropharmacology**, v. 61, n. 7, p. 1052-9, Dec 2011. ISSN 1873-7064. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21277315> >.

MARCHAND, K. et al. Patient-centred care for addiction treatment: a scoping review protocol. **BMJ Open**, v. 8, n. 12, p. e024588, Dec 2018. ISSN 2044-6055. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30593556> >.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Rep**, v. 6, p. 13, 2014. ISSN 2051-7599. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24669294> >.

MARTINEZ, J. M. et al. Effective Reduction of Acute Ethanol Withdrawal by the Tetracycline Derivative, Tigecycline, in Female and Male DBA/2J Mice. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 40, n. 12, p. 2499-2505, 12 2016. ISSN 1530-0277. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27862011> >.

MATHER, M.; LIGHTHALL, N. R. Both Risk and Reward are Processed Differently in Decisions Made Under Stress. **Curr Dir Psychol Sci**, v. 21, n. 2, p. 36-41, Feb 2012. ISSN 0963-7214. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22457564> >.

MATSUI, A.; ALVAREZ, V. A. Cocaine Inhibition of Synaptic Transmission in the Ventral Pallidum Is Pathway-Specific and Mediated by Serotonin. **Cell Rep**, v. 23, n. 13, p. 3852-3863, Jun 2018. ISSN 2211-1247. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29949769> >.

MAZA-QUIROGA, R. et al. Evaluation of plasma cytokines in patients with cocaine use disorders in abstinence identifies transforming growth factor alpha (TGF α) as a potential biomarker of consumption and dual diagnosis. **PeerJ**, v. 5, p. e3926, 2017. ISSN 2167-8359. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29038767> >.

MCCARTHY, D. M.; BROWN, A. N.; BHIDE, P. G. Regulation of BDNF expression by cocaine. **Yale J Biol Med**, v. 85, n. 4, p. 437-46, Dec 2012. ISSN 1551-4056. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23239946> >.

MCCLUNG, C. A.; NESTLER, E. J. Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and DeltaFosB. **Nat Neurosci**, v. 6, n. 11, p. 1208-15, Nov 2003. ISSN 1097-6256. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14566342> >.

MCGLINCHEY, E. M. et al. Prelimbic to Accumbens Core Pathway Is Recruited in a Dopamine-Dependent Manner to Drive Cued Reinstatement of Cocaine Seeking. **J Neurosci**, v. 36, n. 33, p. 8700-11, 08 2016. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27535915> >.

MCLELLAN, A. T. et al. Drug dependence, a chronic medical illness: implications for treatment, insurance, and outcomes evaluation. **JAMA**, v. 284, n. 13, p. 1689-95, Oct 2000. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11015800> >.

MESSER, C. J. et al. Role for GDNF in biochemical and behavioral adaptations to drugs of abuse. **Neuron**, v. 26, n. 1, p. 247-57, Apr 2000. ISSN 0896-6273. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10798408> >.

METZ, V. E. et al. Effects of Ibudilast on the Subjective, Reinforcing, and Analgesic Effects of Oxycodone in Recently Detoxified Adults with Opioid Dependence. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 9, p. 1825-1832, Aug 2017. ISSN 1740-634X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28393896> >.

MICHEL, A.; TIRELLI, E. Post-sensitisation conditioned hyperlocomotion induced by cocaine is augmented as a function of dose in C57BL/6J mice. **Behav Brain Res**, v. 132, n. 2, p. 179-86, May 2002. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11997148> >.

DE MIRANDA, A. S. et al. A Neuroprotective Effect of the Glutamate Receptor Antagonist MK801 on Long-Term Cognitive and Behavioral Outcomes Secondary to Experimental Cerebral Malaria. **Mol Neurobiol**, v. 54, n. 9, p. 7063-7082, 11 2017. ISSN 1559-1182. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27796746> >.

MITCHELL, J. B.; GRATTON, A. Involvement of mesolimbic dopamine

neurons in sexual behaviors: implications for the neurobiology of motivation. **Rev Neurosci**, v. 5, n. 4, p. 317-29, 1994 Oct-Dec 1994. ISSN 0334-1763. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7697200> >.

MOGENSON, G. J.; HUANG, Y. H. The neurobiology of motivated behavior. **Prog Neurobiol**, v. 1, n. 1, p. 55-83, 1973. ISSN 0301-0082. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4591393> >.

MOORMAN, D. E. et al. Differential roles of medial prefrontal subregions in the regulation of drug seeking. **Brain Res**, v. 1628, n. Pt A, p. 130-46, Dec 2015. ISSN 1872-6240. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25529632> >.

MOREIRA, F. P. et al. Cocaine abuse and effects in the serum levels of cytokines IL-6 and IL-10. **Drug Alcohol Depend**, v. 158, p. 181-5, Jan 2016. ISSN 1879-0046. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26679059> >.

MORSCH, M. et al. In vivo characterization of microglial engulfment of dying neurons in the zebrafish spinal cord. **Front Cell Neurosci**, v. 9, p. 321, 2015. ISSN 1662-5102. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26379496> >.

MOULAHOU, H. et al. Novel technologies in detection, treatment and prevention of substance use disorders. **J Food Drug Anal**, v. 27, n. 1, p. 22-31, Jan 2019. ISSN 1021-9498. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30648574> >.

MUKHARA, D.; BANKS, M. L.; NEIGH, G. N. Stress as a Risk Factor for Substance Use Disorders: A Mini-Review of Molecular Mediators. **Front Behav Neurosci**, v. 12, p. 309, 2018. ISSN 1662-5153. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30622460> >.

MURRAY, P. J. et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 14-20, Jul 2014. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25035950> >.

National Council for Behavioral Health. (2014). The business case for effective substance use disorder treatment. Disponível em: <http://www.thenationalcouncil.org/wp-content/uploads/2015/01/14_Business-Case_Substance-Use.pdf>/. Acesso em: 27 mar. 2019.

NEGUS, S. S.; BANKS, M. L. Modulation of drug choice by extended drug access and withdrawal in rhesus monkeys: Implications for negative reinforcement as a driver of addiction and target for medications development. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 164, p. 32-39, 01 2018. ISSN 1873-5177. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28442370> >.

NESTLER, E. J. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 2, p. 119-28, Feb 2001. ISSN 1471-003X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11252991> >.

_____. Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. **Trends Pharmacol Sci**, v. 25, n. 4, p. 210-8, Apr 2004a. ISSN 0165-6147. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15063085> >.

_____. Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. **Trends Pharmacol Sci**, v. 25, n. 4, p. 210-8, Apr 2004b. ISSN 0165-6147. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15063085> >.

NIDA. Preventing Drug Use among Children and Adolescents. 2. ed. 2003. NIH Publication No. 04-4212(A). p. 6–17. Disponível em: <https://www.drugabuse.gov/sites/default/files/preventingdruguse_2_1.pdf >. Acesso em: 20 mar. 2019.

NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F.; HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, v. 308, n. 5726, p. 1314-8, May 2005. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15831717> >.

NORTHCUTT, A. L. et al. DAT isn't all that: cocaine reward and reinforcement require Toll-like receptor 4 signaling. **Mol Psychiatry**, v. 20, n. 12, p. 1525-37, Dec 2015. ISSN 1476-5578. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25644383> >.

NUTT, D. et al. Development of a rational scale to assess the harm of drugs of potential misuse. **Lancet**, v. 369, n. 9566, p. 1047-53, Mar 2007. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17382831> >.

NUTT, D. J. et al. Drug harms in the UK: a multicriteria decision analysis. **Lancet**, v. 376, n. 9752, p. 1558-65, Nov 2010. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21036393> >.

NYGARD, S. K. et al. Region and context-specific intracellular responses associated with cocaine-induced conditioned place preference expression. **Neuroscience**, v. 287, p. 1-8, Feb 2015. ISSN 1873-7544. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25522720> >.

_____. NMDAR dependent intracellular responses associated with cocaine conditioned place preference behavior. **Behav Brain Res**, v. 317, p. 218-225, 01 2017. ISSN 1872-7549. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27664298> >.

OLDS, J.; MILNER, P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. **J Comp Physiol Psychol**, v. 47, n. 6, p. 419-27, Dec 1954. ISSN 0021-9940. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13233369> >.

OLIVEIRA, N. G.; DINIS-OLIVEIRA, R. J. Drugs of abuse from a different toxicological perspective: an updated review of cocaine genotoxicity. **Arch Toxicol**, v. 92, n. 10, p. 2987-3006, Oct 2018. ISSN 1432-0738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30116851> >.

ORNELL, F. et al. Brain-derived neurotrophic factor in substance use disorders: A systematic review and meta-analysis. **Drug Alcohol Depend**, v. 193, p. 91-103, 12 2018. ISSN 1879-0046. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30347311> >.

OUZIR, M.; ERRAMI, M. Etiological theories of addiction: A comprehensive update on neurobiological, genetic and behavioural vulnerability. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 148, p. 59-68, 09 2016. ISSN 1873-5177. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27306332> >.

PAOLICELLI, R. C. et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. **Science**, v. 333, n. 6048, p. 1456-8, Sep 2011. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21778362> >.

PARIYADATH, V.; GOWIN, J. L.; STEIN, E. A. Resting state functional connectivity analysis for addiction medicine: From individual loci to complex networks. **Prog Brain Res**, v. 224, p. 155-73, 2016. ISSN 1875-7855. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26822358> >.

PARKHURST, C. N. et al. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. **Cell**, v. 155, n. 7, p. 1596-609, Dec 2013. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24360280> >.

PARVAZ, M. A.; MOELLER, S. J.; GOLDSTEIN, R. Z. Incubation of Cue-Induced Craving in Adults Addicted to Cocaine Measured by Electroencephalography. **JAMA Psychiatry**, v. 73, n. 11, p. 1127-1134, Nov 2016. ISSN 2168-6238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27603142> >.

PASCOLI, V. et al. Sufficiency of Mesolimbic Dopamine Neuron Stimulation for the Progression to Addiction. **Neuron**, v. 88, n. 5, p. 1054-1066, Dec 2015. ISSN 1097-4199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26586182> >.

PEREGUD, D. I. et al. Expression of BDNF and TrkB Phosphorylation in the Rat Frontal Cortex During Morphine Withdrawal are NO Dependent. **Cell Mol Neurobiol**, v. 36, n. 6, p. 839-849, Aug 2016. ISSN 1573-6830.

Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26346883> >.

PERIYASAMY, P. et al. Cocaine-Mediated Downregulation of miR-124 Activates Microglia by Targeting KLF4 and TLR4 Signaling. **Mol Neurobiol**, v. 55, n. 4, p. 3196-3210, Apr 2018. ISSN 1559-1182. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28478506> >.

PHILLIPS, P. E. et al. Subsecond dopamine release promotes cocaine seeking. **Nature**, v. 422, n. 6932, p. 614-8, Apr 2003. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12687000> >.

PIERCE, R. C. et al. Environmental, genetic and epigenetic contributions to cocaine addiction. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 7, p. 1471-1480, 06 2018. ISSN 1740-634X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29453446> >.

PIERCE, R. C.; KUMARESAN, V. The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? **Neurosci Biobehav Rev**, v. 30, n. 2, p. 215-38, 2006. ISSN 0149-7634. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16099045> >.

POLAND, R. S. et al. Ibudilast attenuates expression of behavioral sensitization to cocaine in male and female rats. **Neuropharmacology**, v. 109, p. 281-292, 10 2016. ISSN 1873-7064. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27343385> >.

PRESTON, C. J.; BROWN, K. A.; WAGNER, J. J. Cocaine conditioning induces persisting changes in ventral hippocampus synaptic transmission, long-term potentiation, and radial arm maze performance in the mouse. **Neuropharmacology**, v. 150, p. 27-37, Mar 2019. ISSN 1873-7064. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30831161> >.

PRIETO, G. A.; COTMAN, C. W. Cytokines and cytokine networks target neurons to modulate long-term potentiation. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 34, p. 27-33, Apr 2017. ISSN 1879-0305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28377062> >.

PULIPPARACHARUVIL, S. et al. Cocaine regulates MEF2 to control synaptic and behavioral plasticity. **Neuron**, v. 59, n. 4, p. 621-33, Aug 2008. ISSN 1097-4199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18760698> >.

PÉREZ-CERDÁ, F.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, M. V.; MATUTE, C. Pío del Río Hortega and the discovery of the oligodendrocytes. **Front Neuroanat**, v. 9, p. 92, 2015. ISSN 1662-5129. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26217196> >.

RANSOHOFF, R. M. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? **Nat Neurosci**, v. 19, n. 8, p. 987-91, 07 2016. ISSN 1546-1726. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27459405> >.

RASAKHAM, K. et al. Synapse density and dendritic complexity are reduced in the prefrontal cortex following seven days of forced abstinence from cocaine self-administration. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e102524, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25072653> >.

RAWJI, K. S. et al. Immunosenescence of microglia and macrophages: impact on the ageing central nervous system. **Brain**, v. 139, n. Pt 3, p. 653-61, Mar 2016. ISSN 1460-2156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26912633> >.

RAY, L. A. et al. Development of the Neuroimmune Modulator Ibudilast for the Treatment of Alcoholism: A Randomized, Placebo-Controlled, Human Laboratory Trial. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 9, p. 1776-1788, Aug 2017. ISSN 1740-634X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28091532> >.

REDMAN, M. Cocaine: What is the Crack? A Brief History of the Use of Cocaine as an Anesthetic. **Anesth Pain Med**, v. 1, n. 2, p. 95-7, 2011. ISSN 2228-7523. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25729664> >.

REN, Q. et al. 7,8-Dihydroxyflavone, a TrkB agonist, attenuates behavioral abnormalities and neurotoxicity in mice after administration of methamphetamine. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 231, n. 1, p. 159-66, Jan 2014. ISSN 1432-2072. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23934209> >.

RESHEF, R. et al. The role of microglia and their CX3CR1 signaling in adult neurogenesis in the olfactory bulb. **Elife**, v. 6, 12 2017. ISSN 2050-084X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29251592> >.

REYNOLDS, E. W.; BADA, H. S. Pharmacology of drugs of abuse. **Obstet Gynecol Clin North Am**, v. 30, n. 3, p. 501-22, Sep 2003. ISSN 0889-8545. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14664324> >.

RICE, R. A. et al. Elimination of Microglia Improves Functional Outcomes Following Extensive Neuronal Loss in the Hippocampus. **J Neurosci**, v. 35, n. 27, p. 9977-89, Jul 2015. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26156998> >.

RICH, M. T.; HUANG, Y. H.; TORREGROSSA, M. M. Plasticity at Thalamo-amygdala Synapses Regulates Cocaine-Cue Memory Formation and Extinction. **Cell Rep**, v. 26, n. 4, p. 1010-1020.e5, Jan 2019. ISSN 2211-1247. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30673597> >.

RIEDEL, G.; PLATT, B.; MICHEAU, J. Glutamate receptor function in

learning and memory. **Behav Brain Res**, v. 140, n. 1-2, p. 1-47, Mar 2003. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12644276> >.

ROGERS, J. T. et al. CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. **J Neurosci**, v. 31, n. 45, p. 16241-50, Nov 2011. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22072675> >.

ROSS, S.; PESELOW, E. The neurobiology of addictive disorders. **Clin Neuropharmacol**, v. 32, n. 5, p. 269-76, 2009 Sep-Oct 2009. ISSN 1537-162X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19834992> >.

RUISOTO, P.; CONTADOR, I. The role of stress in drug addiction. An integrative review. **Physiol Behav**, v. 202, p. 62-68, Apr 2019. ISSN 1873-507X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30711532> >.

RUSSO, S. J. et al. Nuclear factor kappa B signaling regulates neuronal morphology and cocaine reward. **J Neurosci**, v. 29, n. 11, p. 3529-37, Mar 2009. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19295158> >.

SAAH, T. The evolutionary origins and significance of drug addiction. **Harm Reduct J**, v. 2, p. 8, Jun 2005. ISSN 1477-7517. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15987511> >.

SADDORIS, M. P. et al. Differential Dopamine Release Dynamics in the Nucleus Accumbens Core and Shell Reveal Complementary Signals for Error Prediction and Incentive Motivation. **J Neurosci**, v. 35, n. 33, p. 11572-82, Aug 2015. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26290234> >.

SANTOS, T. et al. Levantamento nacional de informações penitenciárias: III Levantamento nacional de informações penitenciárias. 3 ed. Brasília: [s.n.], 2016. 65 p

SCHAFER, D. P. et al. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. **Neuron**, v. 74, n. 4, p. 691-705, May 2012. ISSN 1097-4199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22632727> >.

SCHULTZ, W. Dopamine reward prediction error coding. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 18, n. 1, p. 23-32, Mar 2016a. ISSN 1958-5969. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27069377> >.

_____. Dopamine reward prediction error coding. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 18, n. 1, p. 23-32, Mar 2016b. ISSN 1958-5969. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27069377> >.

_____. Dopamine reward prediction error coding. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 18, n. 1, p. 23-32, Mar 2016c. ISSN 1958-5969. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27069377> >.

SCHWARZ, J. M.; SMITH, S. H.; BILBO, S. D. FACS analysis of neuronal-glial interactions in the nucleus accumbens following morphine administration. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 230, n. 4, p. 525-35, Dec 2013. ISSN 1432-2072. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23793269> >.

SERVICES, U.S. Department Of Health & Human. **Facing addiction in america: The Surgeon General's Report on Alcohol, Drugs, and Health**. Washington, D.C: [s.n.], 2016. 413 p.

SCOFIELD, M. D. et al. The Nucleus Accumbens: Mechanisms of Addiction across Drug Classes Reflect the Importance of Glutamate Homeostasis. **Pharmacol Rev**, v. 68, n. 3, p. 816-71, 07 2016. ISSN 1521-0081. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27363441> >.

SHINOHARA, F. et al. The Role of Dopaminergic Signaling in the Medial Prefrontal Cortex for the Expression of Cocaine-Induced Conditioned Place Preference in Rats. **Biol Pharm Bull**, v. 40, n. 11, p. 1983-1989, 2017. ISSN 1347-5215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29093348> >.

SIMCHON-TENENBAUM, Y.; WEIZMAN, A.; REHAVI, M. Alterations in brain neurotrophic and glial factors following early age chronic methylphenidate and cocaine administration. **Behav Brain Res**, v. 282, p. 125-32, Apr 2015. ISSN 1872-7549. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25576963> >.

SIMMONS, S. C.; WHEELER, K.; MAZEI-ROBISON, M. S. Determination of circuit-specific morphological adaptations in ventral tegmental area dopamine neurons by chronic morphine. **Mol Brain**, v. 12, n. 1, p. 10, 02 2019. ISSN 1756-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30736837> >.

SINGH, M. E. et al. A cannabinoid receptor antagonist attenuates conditioned place preference but not behavioural sensitization to morphine. **Brain Res**, v. 1026, n. 2, p. 244-53, Nov 2004. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15488486> >.

SINHA, R. New findings on biological factors predicting addiction relapse vulnerability. **Curr Psychiatry Rep**, v. 13, n. 5, p. 398-405, Oct 2011. ISSN 1535-1645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21792580> >.

SIPE, G. O. et al. Microglial P2Y12 is necessary for synaptic plasticity in

mouse visual cortex. **Nat Commun**, v. 7, p. 10905, Mar 2016. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26948129> >.

SMITH, L. N. et al. Assessment of Cocaine-induced Behavioral Sensitization and Conditioned Place Preference in Mice. **J Vis Exp**, n. 108, p. 53107, Feb 2016. ISSN 1940-087X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26967472> >.

SQUEGLIA, L. M.; CSERVENKA, A. Adolescence and Drug Use Vulnerability: Findings from Neuroimaging. **Curr Opin Behav Sci**, v. 13, p. 164-170, Feb 2017. ISSN 2352-1546. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28111629> >.

STEPHAN, A. H.; BARRES, B. A.; STEVENS, B. The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease. **Annu Rev Neurosci**, v. 35, p. 369-89, 2012. ISSN 1545-4126. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22715882> >.

SUN, X. et al. Acute and chronic dopamine receptor stimulation modulates AMPA receptor trafficking in nucleus accumbens neurons cocultured with prefrontal cortex neurons. **J Neurosci**, v. 28, n. 16, p. 4216-30, Apr 2008. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18417701> >.

SYAPIN, P. J. et al. Effective Reduction in High Ethanol Drinking by Semisynthetic Tetracycline Derivatives. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 40, n. 12, p. 2482-2490, 12 2016. ISSN 1530-0277. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27859416> >.

TAI, B.; VOLKOW, N. D. Treatment for substance use disorder: opportunities and challenges under the affordable care act. **Soc Work Public Health**, v. 28, n. 3-4, p. 165-74, 2013. ISSN 1937-190X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23731411> >.

TEIXEIRA, Luciana Da Silva. **Impacto econômico da legalização das drogas no brasil**: subtítulo do livro. Brasília - DF: [s.n.], 2016. 59 p.

TZENG, W. Y. et al. Companions reverse stressor-induced decreases in neurogenesis and cocaine conditioning possibly by restoring BDNF and NGF levels in dentate gyrus. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 3, p. 425-37, Mar 2013. ISSN 1873-3360. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22832183> >.

UENO, M. et al. Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. **Nat Neurosci**, v. 16, n. 5, p. 543-51, May 2013. ISSN 1546-1726. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23525041> >.

UNGLESS, M. A. et al. Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. **Nature**, v. 411, n. 6837, p. 583-7, May

2001. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11385572> >.

VANDERSCHUREN, L. J.; DI CIANO, P.; EVERITT, B. J. Involvement of the dorsal striatum in cue-controlled cocaine seeking. **J Neurosci**, v. 25, n. 38, p. 8665-70, Sep 2005. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177034> >.

VERKHRATSKY, Alexei; BUTT, Arthur. **Glial physiology and pathophysiology 1st edition**. 1 ed. [S.L.]: Wiley-Blackwell, 2013. 560 p.
VOLKOW, N. D. et al. Dopamine in drug abuse and addiction: results of imaging studies and treatment implications. **Arch Neurol**, v. 64, n. 11, p. 1575-9, Nov 2007. ISSN 0003-9942. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17998440> >.

VOLKOW, N. D.; KOOB, G. F.; MCLELLAN, A. T. Neurobiologic Advances from the Brain Disease Model of Addiction. **N Engl J Med**, v. 374, n. 4, p. 363-71, Jan 2016. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26816013> >.

VOLKOW, N. D.; MORALES, M. The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. **Cell**, v. 162, n. 4, p. 712-25, Aug 2015. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26276628> >.

VOLKOW, N. D. et al. Stimulant-induced dopamine increases are markedly blunted in active cocaine abusers. **Mol Psychiatry**, v. 19, n. 9, p. 1037-43, Sep 2014. ISSN 1476-5578. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24912491> >.

_____. Prediction of reinforcing responses to psychostimulants in humans by brain dopamine D2 receptor levels. **Am J Psychiatry**, v. 156, n. 9, p. 1440-3, Sep 1999. ISSN 0002-953X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10484959> >.

_____. Decreased striatal dopaminergic responsiveness in detoxified cocaine-dependent subjects. **Nature**, v. 386, n. 6627, p. 830-3, Apr 1997. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9126741> >.

_____. Cocaine cues and dopamine in dorsal striatum: mechanism of craving in cocaine addiction. **J Neurosci**, v. 26, n. 24, p. 6583-8, Jun 2006. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16775146> >.

WAKE, H. et al. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. **J Neurosci**, v. 29, n. 13, p. 3974-80, Apr 2009. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19339593> >.

_____. Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit

structure and function. **Trends Neurosci**, v. 36, n. 4, p. 209-17, Apr 2013. ISSN 1878-108X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23260014> >.

WEINHARD, L. et al. Microglia remodel synapses by presynaptic trogocytosis and spine head filopodia induction. **Nat Commun**, v. 9, n. 1, p. 1228, 03 2018. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29581545> >.

WHITEFORD, H. A. et al. Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 382, n. 9904, p. 1575-86, Nov 2013. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23993280> >.

WHITELAW, B. S. Microglia-mediated synaptic elimination in neuronal development and disease. **J Neurophysiol**, v. 119, n. 1, p. 1-4, 01 2018. ISSN 1522-1598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28835520> >.

WHITESSELL, M. et al. Familial, social, and individual factors contributing to risk for adolescent substance use. **J Addict**, v. 2013, p. 579310, 2013. ISSN 2090-7834. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24826363> >.

WILLIAMSON, L. L. et al. Microglia and memory: modulation by early-life infection. **J Neurosci**, v. 31, n. 43, p. 15511-21, Oct 2011. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22031897> >.

WISE, R. A. Action of drugs of abuse on brain reward systems. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 13 Suppl 1, p. 213-23, 1980. ISSN 0091-3057. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6113601> >.

WOOD, S. C. et al. Cocaine and Pavlovian fear conditioning: dose-effect analysis. **Behav Brain Res**, v. 176, n. 2, p. 244-50, Jan 2007. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17098299> >.

WORLD DRUG REPORT 2018. **Unodc**. Disponível em: <<https://www.unodc.org/wdr2018/>>. Acesso em: 15 mar. 2019.

WU, Y. et al. Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. **Trends Immunol**, v. 36, n. 10, p. 605-613, Oct 2015. ISSN 1471-4981. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26431938> >.

XUE, J. et al. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. **Immunity**, v. 40, n. 2, p. 274-88, Feb 2014. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24530056> >.

YAMAGUCHI, T. et al. Mesocorticolimbic glutamatergic pathway. **J Neurosci**, v. 31, n. 23, p. 8476-90, Jun 2011. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21653852> >.

YAN, Y. et al. Enduring vulnerability to reinstatement of methamphetamine-seeking behavior in glial-cell-line-derived neurotrophic factor mutant mice. **FASEB J**, v. 21, n. 9, p. 1994-2004, Jul 2007. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17356005> >.

ZACHOR, D. et al. Cocaine differentially inhibits neuronal differentiation and proliferation in vitro. **J Clin Invest**, v. 93, n. 3, p. 1179-85, Mar 1994. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8132758> >.

ZACHOR, D. A. et al. Cocaine inhibition of neuronal differentiation in NGF-induced PC12 cells is independent of ras signaling. **Int J Dev Neurosci**, v. 18, n. 8, p. 765-72, Dec 2000. ISSN 0736-5748. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11154845> >.

ZHAN, Y. et al. Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. **Nat Neurosci**, v. 17, n. 3, p. 400-6, Mar 2014. ISSN 1546-1726. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24487234> >.

ZHANG, L. et al. Cocaine-induced synaptic structural modification is differentially regulated by dopamine D1 and D3 receptors-mediated signaling pathways. **Addict Biol**, v. 22, n. 6, p. 1842-1855, Nov 2017. ISSN 1369-1600. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27734601> >.

ZHANG, T. et al. Glutamatergic neurons in the medial prefrontal cortex mediate the formation and retrieval of cocaine-associated memories in mice. **Addict Biol**, Feb 2019. ISSN 1369-1600. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30734456> >.

ZHANG, X. et al. PI3 kinase is involved in cocaine behavioral sensitization and its reversal with brain area specificity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 340, n. 4, p. 1144-50, Feb 2006. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16414349> >.

ZHANG, Y. et al. Chronic escalating cocaine exposure, abstinence/withdrawal, and chronic re-exposure: effects on striatal dopamine and opioid systems in C57BL/6J mice. **Neuropharmacology**, v. 67, p. 259-66, Apr 2013. ISSN 1873-7064. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23164614> >.

ZHONG, X. et al. Human cell adhesion molecules: annotated functional subtypes and overrepresentation of addiction-associated genes. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1349, p. 83-95, Sep 2015. ISSN 1749-6632. Disponível em:

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25988664> >.

ZORRILLA, E. P.; LOGRIP, M. L.; KOOB, G. F. Corticotropin releasing factor: a key role in the neurobiology of addiction. **Front Neuroendocrinol**, v. 35, n. 2, p. 234-44, Apr 2014. ISSN 1095-6808. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24456850> >.