



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

TAYNARA GABRIELE CAMPOS

**O POTENCIAL EFEITO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO NA PREVENÇÃO E
TRATAMENTO DA DEPENDÊNCIA QUÍMICA DE COCAÍNA EM
CAMUNDONGOS: UM ESTUDO COMPORTAMENTAL E MOLECULAR**

VITÓRIA, ES

2022

TAYNARA GABRIELE CAMPOS

**O POTENCIAL EFEITO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO NA PREVENÇÃO E
TRATAMENTO DA DEPENDÊNCIA QUÍMICA DE COCAÍNA EM
CAMUNDONGOS: UM ESTUDO COMPORTAMENTAL E MOLECULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Bioquímica

Orientador(a): PhD. Rita Gomes Wanderley Pires

Coorientador(a): PhD. Alice Laschuk Herlinger

VITÓRIA, ES

2022

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

C198p Campos, Taynara Gabriele, 1996-
O potencial efeito do Ácido Rosmarínico na prevenção e
tratamento da dependência química de cocaína em
camundongos: um estudo comportamental e molecular. /
Taynara Gabriele Campos. - 2022.
61 f. : il.

Orientadora: Rita Gomes Wanderley Pires.
Coorientadora: Alice Laschuk Herlinger.
Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Cocaína. 2. Ácido Rosmarínico. 3. Córtex pre-frontal. 4.
Comportamento. 5. Bioquímica. I. Pires, Rita Gomes Wanderley.
II. Herlinger, Alice Laschuk. III. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

Taynara Gabriele Campos

“O potencial efeito do ácido rosmarínico na prevenção e tratamento da dependência química de cocaína em camundongos: um estudo comportamental e molecular”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovado(a) em 17 de fevereiro de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Profª. Drª. Rita Gomes Wanderley Pires – Orientadora



Drª. Alice Laschuk Herlinger – Coorientadora

Profª. Drª. Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves – Examinador Interno

Profª. Drª. Mariana Ferreira Pereira de Araújo – Examinador Externo

**Vitória/ES
2022**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
JULIANA BARBOSA COITINHO GONCALVES - SIAPE 2077211
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS
Em 25/02/2022 às 12:23

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/368209?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
MARIANA FERREIRA PEREIRA DE ARAUJO - SIAPE 3127710
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS
Em 25/02/2022 às 13:00

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/368261?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
RITA GOMES WANDERLEY PIRES - SIAPE 1721379
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS
Em 25/02/2022 às 13:13

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/368273?tipoArquivo=O>

AGRADECIMENTO

À Deus, por escrever certo por linhas tortas, sempre colocando oportunidades incríveis no meu caminho e por ter protegido os meus durante essa trajetória.

À ciência, por trazer tão rápido a vacina para a COVID-19.

Aos meus pais, por estarem do meu lado em toda e qualquer decisão, por mais maluca que seja. Por terem embarcado nessa comigo e me acompanhado (mesmo com medo de camundongos) nos domingos e noites de experimento.

Ao meu amor, que mesmo não entendendo nada sobre o meu trabalho, sempre esteve ao meu lado ouvindo e tentando ajudar no que podia, que na maioria, era trabalho braçal: ajudando a subir e descer com caixas e caixas de animais ou passando um cafézinho.

Aos meus amigos, que por mais que falassem “você ainda não acabou esse mestrado?”, eram os primeiros a pedirem para eu não desistir de jeito nenhum.

Aos meus colegas de turma por tudo que passamos juntos nesses anos de mestrado.

Aos professores membros do Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Farmacologia por manterem esse programa de pé mesmo com todas as dificuldades. Vocês são incríveis.

À Sarah, Clara, Ana e Tamara, que estiveram do meu lado todo esse tempo, me auxiliando e instruindo. Sem vocês, não teria conseguido dar nem o primeiro passo.

À minha orientadora Rita por ter me permitido cumprir esse sonho mesmo com todas as dificuldades. À minha coorientadora Alice por todas as dicas e ajudas. Vocês são inspiradoras.

E principalmente, à mim, que por muitas vezes me questioneei sobre o mestrado e pensei em desistir. Mas que cheguei até aqui. Cheguei mesmo com o CEUA perdido pelo comitê atrasando em um ano o início dos experimentos, mesmo com uma prova de residência que estragou um dos dias do experimento, mesmo trabalhando 8h/dia, mesmo com a pandemia, mesmo com amostras perdidas e análises perdidas por falta de infraestrutura.

Não era mais o mesmo

Mas estava em seu lugar.

Astronauta de mármore - Nenhum de nós

RESUMO

A cocaína é uma droga ilegal que se apresenta como um grave problema social e de saúde pública. A ação da cocaína se dá por meio do bloqueio dos transportadores dopaminérgicos (DATs) que são responsáveis pela recaptação da dopamina (DA) liberada na fenda sináptica. Com sua atividade inibida, a DA se acumula na fenda aumentando a sinalização dopaminérgica no sistema nervoso central (SNC). No SNC, os neurônios dopaminérgicos se localizam na Área Tegmental Ventral (VTA), projetando-se para o Núcleo Accumbens (NAc) e o Córtex pré-frontal (CPF), compondo a via mesolímbica. Essa via é responsável pela codificação cerebral de processos de avaliação de recompensa, comportamento e tomada de decisão. A constante evocação dessa via provoca modulações no SNC que causam os estágios de dependência e fissura. Hoje não há um tratamento eficaz para a dependência da cocaína. Em casos de dependência, a única ação é a abstinência. Com isso, há a necessidade do estudo de novos fármacos para esse fim, uma vez que a abstinência reúne uma série de efeitos colaterais como vômitos, febre e depressão. O ácido rosmarínico (AR), um composto derivado de temperos como alecrim, sálvia, manjerição entre outros; tem apresentado um papel fundamental como antioxidante, anti-inflamatório e neuroprotetor. Dessa forma, o presente estudo objetivou atrelar as ações já observadas no AR como proposta de um fármaco para a dependência química de cocaína. Utilizamos um modelo animal com camundongos C57BL/6 machos que receberam cocaína durante cinco dias. Após a etapa de indução à dependência da droga, os animais foram deixados cinco dias em abstinência e um modelo de recaída foi feito a partir da reexposição à droga. O potencial farmacêutico do AR foi analisado em três diferentes contextos: um pré-tratamento, um tratamento constante e um tratamento apenas durante a abstinência. Foram analisados os efeitos comportamentais a partir do teste de campo aberto e o âmbito bioquímico com avaliação da expressão gênica dos marcadores de adição (CREB, BDNF e Δ FosB) na região do CPF por qRT-PCR. Foi identificado uma atenuação no aumento da atividade locomotora em todos os grupos tratados com o AR. Um efeito positivo em relação à primeira exposição foi visto nos grupos pré-tratados. Porém, o AR demonstrou um efeito temporário visto pelo comportamento do grupo que recebeu o composto apenas no pré-tratamento quando relacionado ao grupo controle. Quanto à reexposição, o grupo tratado continuamente demonstrou uma atividade locomotora menor em relação aos demais, mostrando uma resistência à droga em um cenário

de recaída. O perfil bioquímico não mostrou alteração na expressão de CREB. Foi identificado um perfil diferencial nos animais tratados com AR durante a abstinência com os efeitos da cocaína no dia do desafio, mostrando um aumento na expressão de Δ FosB e BDNF nesses grupos. O AR se mostrou com um bom potencial para ser utilizado como fármaco para a dependência química em cocaína, porém os estudos moleculares devem ser ainda melhor explorados e, adicionalmente, o AR deve ser testado no âmbito de protocolos que utilizam a procura voluntária pela droga.

Palavras-chave: cocaína, AR, córtex pré-frontal, sistema dopaminérgico, atividade locomotora, marcadores de adição.

ABSTRACT

Cocaine is an illegal drug that presents itself as a serious social and public health problem. Cocaine acts by blocking dopaminergic transporters (DATs) that are responsible for the reuptake of dopamine (DA) released in the synaptic cleft. With its activity inhibited, DA accumulates in the cleft, increasing dopaminergic signaling in the Central Nervous System (CNS). In the CNS, dopaminergic neurons are located in the Ventral Tegmental Area (VTA), projecting to the Nucleus Accumbens (NAc) and the Prefrontal Cortex (PFC), composing the mesolimbic pathway. This pathway is responsible for the brain encoding of reward evaluation, behavior and decision-making processes. Today there is no effective treatment for cocaine addiction. In cases of dependence, the only action is abstinence. Thus, there is a need to study new drugs for this purpose, since abstinence brings together a series of side effects such as vomiting, fever and depression. Rosmarinic acid (AR), a compound derived from spices such as rosemary, sage, basil, among others; has shown a key role as an antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective. Thus, the present study aimed to link the actions already observed in RA as a proposal for a drug for cocaine addiction. We used an animal model with male C57BL/6 mice that received cocaine for five days. After the drug dependence induction step, the animals were left for five days in abstinence and a relapse model was made from drug re-exposure. The pharmaceutical potential of RA was analyzed in three different contexts: a pre-treatment, a constant treatment and a treatment only during abstinence. The behavioral effects from the open field test and the biochemical scope were analyzed with evaluation of the gene expression of addition markers (CREB, BDNF and Δ FosB) in the CPF region by qRT-PCR. An attenuation in the increase in locomotor activity was identified in all AR-treated groups. A positive effect with respect to the first exposure was seen in the pre-treated groups. However, the AR demonstrated a temporary effect seen by the behavior of the group that received the compound only in the pre-treatment when related to the control group. As for re-exposure, the group treated continuously showed lower locomotor activity compared to the others, showing drug resistance in a relapse scenario. The biochemical profile showed no change in CREB expression. A differential profile was identified in the animals treated with RA during abstinence with the effects of cocaine on the day of challenge, showing an increase in the expression of Δ FosB and BDNF in these groups. AR has shown good potential to be used as a drug for cocaine addiction, but

molecular studies must be further explored and, additionally, AR must be tested within the scope of protocols that use the voluntary search for the drug.

Keywords: cocaine, AR, prefrontal cortex, dopaminergic system, locomotor activity, addiction markers.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estimativa global do número de usuários de cocaína e prevalência anual do uso de cocaína, 2010–2019. Adaptado de: WORLD DRUG REPORT 2021.....	15
FIGURA 2. Composição química dos principais componentes da cocaína. Adaptado de: ROSÁRIO et al, 2019.....	16
FIGURA 3. Processos de produção da cocaína e seus derivados psicoativos. Adaptado de ZACCA, 2014.....	17
FIGURA 4. Cascata de sinalização dopaminérgica (KNAB, LIGHTFOOT, 2010).....	20
FIGURA 5. Comunicação dopaminérgica através do circuito mesolímbico a partir de distúrbios neuronais. Adaptado de SERAFINI et al., 2020.....	21
FIGURA 6. Plasticidade sináptica baseada na no impacto na alteração da velocidade das atividades neuronais (alta e baixa atividade). Adaptado de: VON BERNHARDI et al., 2017.....	22
FIGURA 7. Plasticidade sináptica baseada na duração do estímulo (segundos até minutos e horas até dias). Adaptado de: VON BERNHARDI et al., 2017.....	23
FIGURA 8. Estrutura química do AR (Amoah et al., 2016).....	24
FIGURA 9. Mecanismo de ação do AR em disordens do sistema nervoso central. (Ghasemzadeh e Hosseinzadeh, 2020).....	25
FIGURA 10. Delineamento experimental dividido pelas etapas da sensitização.....	29
FIGURA 11. Delineamento experimental dividido pelas etapas da sensitização com os respectivos tratamentos.....	31
FIGURA 12. Animais que receberam cocaína apresentaram sensitização comportamental à droga.....	34
FIGURA 13. Os tratamentos frente ao grupo Controle.....	35
FIGURA 14. Os tratamentos frente ao grupo Cocaína.....	35

FIGURA 15. Efeito positivo do tratamento no primeiro episódio de uso da droga quando comparado com o grupo controle.....	36
FIGURA 16. Efeito neutro do tratamento no primeiro episódio de uso da droga quando comparado com o grupo cocaína.....	37
FIGURA 17. Efeito neutro do tratamento em um episódio de recaída quando comparado com o grupo controle.....	38
FIGURA 18. Efeito positivo do tratamento constante em um episódio de recaída quando comparado com o grupo cocaína.....	38
FIGURA 19. Expressão gênica dos genes relacionados à adicção em comparativo entre os tratamentos.	39

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Primers.....	32
-------------------------------	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

AR - Ácido Rosmarínico

ATP - Trifosfato de adenosina

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro

cAMP - Adenosina monofosfato cíclico

COMT - Catecol-O-metil transferase

CPF - Córtex pré-frontal

CREB - Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico

DA - Dopamina

DAT - Transportador de dopamina

DOPA - Descarboxilase

DOPAC - Ácido dihidroxifenilacético

D1R - Receptor de dopamina 1

D2R - Receptor de dopamina 2

D3R - Receptor de dopamina 3

D4R - Receptor de dopamina 4

D5R - Receptor de dopamina 5

GABA - Ácido gama-aminobutírico

Gi - Proteína G inibitória

GPCR - Receptores acoplados à proteína G

GDP - Guanosina difosfato

Gq - Proteína G responsável pela ativação da enzima fosfolipase C

Gs - Proteína G estimulatória

GTP - Guanosina trifosfato

HVA - Ácido homovanílico

NAc - Núcleo Accumbens

NE - Norepinefrina

MAO - Monoamina oxidase

MAO-B - Monoamina oxidase na isoforma B

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PKA - Proteína quinase A

ERO - Espécies reativas de oxigênio

RRF - Campo Retrorubral

SNC - Sistema nervoso central

SNc - Substância Negra pars compacta

SUS - Sistema único de saúde

VMAT2 - Transportador vesicular de monoamina 2

VTa - Área Tegmental Ventral

Δ FosB - Delta FosB

5-HT - Serotonina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 A cocaína	15
1.2 Mecanismo de ação da cocaína	18
1.3 Ácido Rosmarínico.....	24
2. OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.2 Objetivo Específico	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Animais	28
3.2 Fármacos	28
3.3 Delineamento experimental	29
3.4 Teste de campo aberto	31
3.5 Análise bioquímica	31
3.6. Análises estatísticas	33
4. RESULTADOS	34
4.1 Análise comportamental	34
4.2 Análise bioquímica	39
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÃO.....	45
7. BIBLIOGRAFIA.....	46

1. INTRODUÇÃO

1.1 A cocaína

Em 2019, cerca de 20 milhões de pessoas fizeram uso de cocaína e seus derivados ao redor do mundo, conforme demonstrado na Figura 1. Estima-se que na América do Sul, quase 3 milhões de pessoas entre 15 a 64 anos foram usuários de cocaína em 2019 (WORLD DRUG REPORT 2021).

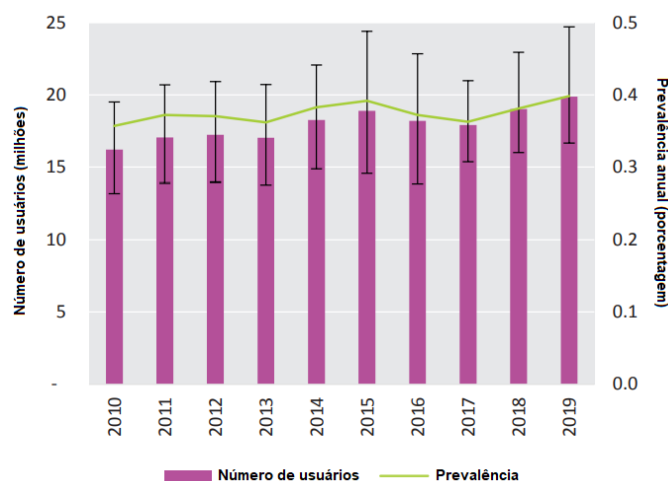


FIGURA 1. Estimativa global do número de usuários de cocaína e prevalência anual do uso de cocaína, 2010–2019. Adaptado de: WORLD DRUG REPORT 2021.

O Brasil é o maior mercado de cocaína da América do Sul e a prevalência do uso de crack e cocaína em 2020 era de 2,2% da população adulta (WORLD DRUG REPORT 2021). Durante a pandemia, de acordo com dados do Ministério da Saúde, os hospitais credenciados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) tiveram um aumento de 54%, em 2020, no atendimento de dependentes químicos se compararmos a 2019 (UNIAD, 2021).

O uso da cocaína se iniciou a partir dos povos Incas, na região dos Andes na América do Sul que religiosamente consumiam a folha como chá e atribuíam os efeitos psicoestimulantes ao contato com os deuses. Com o passar dos anos, a folha de coca foi utilizada nessa região na sua forma mascável para auxiliar os trabalhadores em grandes altitudes, diminuindo a sensação de frio e de fome (BIONDICH, JOSLIN, 2016).

A cocaína foi isolada e nomeada pela primeira vez pelo químico alemão Albert Niemann (ISENSCHMID, 2010) e se popularizou na Europa a partir da criação de uma mistura de vinhos e folhas de coca, o *Vin Mariani* (SMITH, 2008). Em 1885, o psicanalista Freud publicou o livro “Über coca”, listando os efeitos benéficos da cocaína como remédio para a depressão. Também em 1885, Karl Koller identificou a cocaína como um anestésico local (REIS, 2009; MARKEL, 2011). Em 1886, a primeira formulação da Coca-Cola era composta por noz de cola e folhas de cocaína, tendo sua composição modificada somente em 1906, com a substituição da cocaína por cafeína (BAHLS, 2002). O uso de cocaína na sociedade aumentou e os perigos do uso contínuo da droga se tornaram mais evidentes. Em 1912 foram registradas 5.000 mortes relacionadas à cocaína em um ano nos Estados Unidos. Em 1922, a droga foi determinada como ilegal nos EUA. (ISENSCHMID, 2010; MARKEL, 2011).

A cocaína ($C_{17}H_{21}NO_4$) é uma substância ativa na composição de uma variedade de psicoestimulantes, sendo encontrada principalmente na sua forma de base e como o sal cloridrato de cocaína (UNODC, 2021). É um alcalóide produzido a partir da maceração das folhas da planta *Erythroxylum coca*, nativa da América do Sul, tratadas com diversos solventes orgânicos (NESTLER, 2005). A fórmula química da cocaína e seus principais componentes é demonstrado na Figura 2.

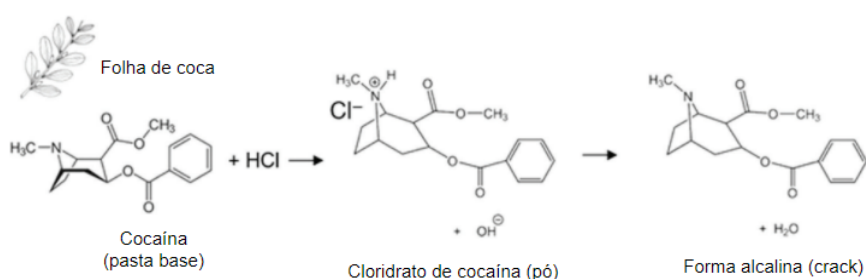


FIGURA 2. Composição química dos principais componentes da cocaína. Adaptado de: ROSÁRIO et al, 2019.

Após a maceração das folhas, o processo de fabricação começa com a adição de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e carbonato de sódio (Na_2CO_3), produzindo a cocaína na forma de base. O posterior tratamento da forma base com mais solventes orgânicos como o querosene ou a

gasolina, origina a pasta base de coca que, por sua vez, pode ser tratada com outros solventes para a produção da merla ou refinada para a produção do pó de cocaína. O refinamento é realizado com ácido clorídrico (HCl) formando o sal cloridrato de cocaína, conhecido como cocaína em pó. O sal de cocaína é neutralizado pela reação do cloridrato de cocaína com uma solução aquosa de um álcali (amônia ou bicarbonato de sódio) aquecido, posteriormente resfriado e quebrado, resultando no crack (NIDA, 2004; ZACCA, 2014; DRAKE, SCOTT, 2018). Esse processo de produção foi demonstrado na Figura 3.

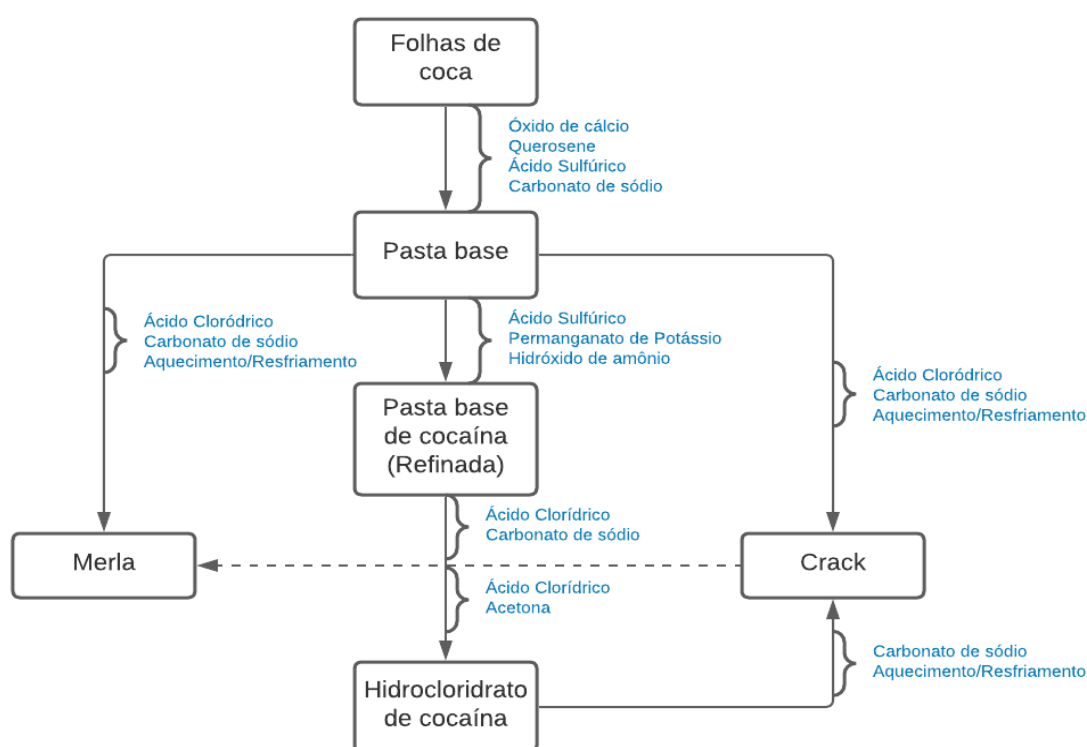


FIGURA 3. Processos de produção da cocaína e seus derivados psicoativos. Adaptado de ZACCA, 2014.

As diversas etapas de fabricação fazem com que a cocaína traficada possua uma pureza baixa e elevada toxicidade caracterizadas pela adulteração dos solventes e dos aditivos potencializadores de efeitos (EVRARDA, 2010).

A cocaína e seus subtipos são administrados por diversas vias. Pela fácil dissolução em água e alta absorção pela mucosa nasal, sua forma de pó é utilizada de forma intravenosa ou aspirada. Já o crack e a pasta base/merla são fumados (DRAKE, SCOTT, 2018;

FATTINGER et al., 2000). A cocaína também pode ser utilizada misturada com outras drogas, como por exemplo, o uso injetável em uma mistura com a heroína (“speedball”) ou a pasta base misturada com tabaco e maconha (“basuco”) (BOTELHO, 2014).

1.2 Mecanismo de ação da cocaína

A ação da cocaína no SNC ocorre através do bloqueio dos transportadores de dopamina (DAT) que impedem a recaptação do neurotransmissor, aumentando a concentração de dopamina (DA) na fenda sináptica. Esse processo resulta na hiperestimulação dos neurônios pós-sinápticos e provoca efeitos de euforia e agitação (CALIPARI, et al., 2013). A cocaína também age aumentando os neurotransmissores norepinefrina (NE) e serotonina (5-HT), além de interagir paralelamente com múltiplos sistemas como o GABAérgico, glutamatérgico e endocanabinóide (SAMMUT, WEST, 2008).

A dopamina é sintetizada a partir da descarboxilação da DOPA (3,4 – hidroxifenilalanina), produzida pela interação da enzima tirosina hidroxilase com o aminoácido tirosina (CERNAT et al. 2020) (Figura 4). Ela é transportada para vesículas - através da ação do transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2) -, onde fica armazenada nos terminais pré-sinápticos; após um estímulo elétrico, essas vesículas se fundem com o terminal neuronal, liberando o neurotransmissor na fenda sináptica (LERNER et al., 2021).

Uma vez na fenda sináptica, a dopamina se liga aos receptores dopaminérgicos. Os receptores dopaminérgicos são tipos de receptores acoplados à proteína G (GPCR). A proteína executa três vias de sinalização principais mediadas pelas suas isoformas: Gs (responsável pela ativação da adenilato ciclase), Gq (ativação da enzima fosfolipase C) e Gi (responsável pela desativação da adenilato ciclase) (BEAULIEU et al., 2015; BAIK, 2013).

Os receptores dopaminérgicos são subdivididos de acordo com sua função de modular bioquimicamente a atividade da adenilato ciclase para geração do segundo mensageiro adenosina monofosfato cíclico (AMPC) (BAIK, 2013). Os receptores do tipo D1 (D1-like) agem na isoforma Gs e são compostos pelos receptores D1R e D5R. A ação da família de receptores D1 resulta no desencadeamento de abertura dos canais iônicos de cálcio, levando a excitação neuronal e a consequente propagação do impulso elétrico. Os receptores da

família D2 (composto pelos receptores D2R, D3R e D4R) são considerados inibitórios e agem na isoforma G_i . Sua atividade resulta na hiperpolarização do neurônio, impedindo a propagação do impulso elétrico. Os receptores tipo D1 são encontrados, em sua maioria, nos neurônios pós-sinápticos. Os receptores do tipo D2 estão localizados pré e pós-sinápticamente (XIA et al., 2019; REGUILÓN et al., 2017; WORHUNSKY et al., 2021).

Pós-sinápticamente, a DA age como um primeiro mensageiro no complexo dopamina/receptores dopaminérgicos D1 (XIA et al., 2019). A cascata de sinalização se inicia pela subunidade α se dissociando do dímero $\beta\gamma$ da isoforma G_s . A subunidade α interage com o nucleotídeo guanílico que catalisa a troca de GDP por GTP e assume a forma ativa da isoforma. A forma ativa age acionando o sistema de efetores, composto por enzimas como a fosfolipase C e a adenilato ciclase. A adenilato ciclase é responsável por catalisar a formação da AMPc a partir do trifosfato de adenosina (ATP) com o auxílio de um cofator. O aumento na concentração de AMPc intracelular resulta na ativação da proteína cinase dependente de AMPc (PKA) que é responsável pela fosforilação de resíduos de serina em outras proteínas na cascata de sinalização (BEAULIEU et al., 2015; DUC et al., 2015). A fosforilação consiste na transferência de um grupo fosfato, a partir do trifosfato de adenosina, para resíduos específicos de aminoácidos. A subunidade ativa da PKA catalisa a fosforilação de fatores de transcrição que atuam regulando a expressão gênica (TARRANT & COLE, 2009). A ativação constante dessa cascata de sinalização resulta na modulação da expressão gênica de genes-alvo da PKA, como CREB, c-Fos e BDNF, característicos de cada estágio de fissura, vício, abstinência e recaída da cocaína, identificados como marcadores de adição (FREEMAN et al. 2002; FREEMAN et al. 2010; LULL et al. 2008; WALKER et al., 2018)

Após a ligação com os receptores dopaminérgicos, a dopamina é retirada da fenda por meio de dois processos básicos: a degradação por enzimas e a recaptação para o terminal pré-sináptico. A recaptação é realizada pelo DAT, que captura para o neurônio pré-sináptico grande parte da dopamina liberada para ser reciclada em vesículas e usada subsequente na neurotransmissão. A parte não reciclada é degradada pela ação da enzima monoamina oxidase (MAO), principalmente pela isoforma B (MAO-B), produzindo o ácido

dihidroxifenilacético (DOPAC). A dopamina que permanece na fenda é degradada pela ação da catecol-O-metil transferase (COMT) que produz o ácido homovanílico (HVA) (BAIK, 2020; AHMED, 2006; CHOW et al., 2021).

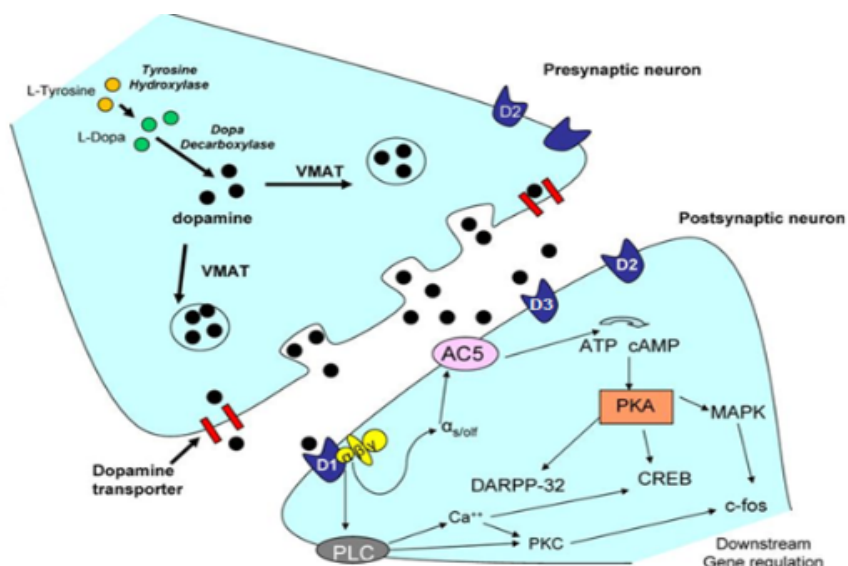


FIGURA 4. Cascata de sinalização dopaminérgica (KNAB, LIGHTFOOT, 2010).

O metabolismo da dopamina, principalmente a sua degradação, está fortemente relacionado à geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (MEISER, et al., 2013). A recorrente evocação do sistema dopaminérgico com uso crônico de cocaína, eleva o estresse oxidativo no cérebro, enfatizando disfunções como a peroxidação lipídica no hipocampo e a oxidação de proteínas no córtex pré-frontal (CPF) e no núcleo accumbens (NAc) (PREEDY, 2017). Além disso, o incremento de ERO está relacionado a diversos distúrbios neuronais como a doença de Parkinson (DORSZEWSKA et al., 2016), depressão (OLGUÍN et al., 2016) e o Alzheimer (YANG, LIAN, 2020; SAEEDI, RASHIDY-POUR, 2021).

A alta atividade do sistema dopaminérgico relacionado ao uso crônico da cocaína, compromete todo o SNC, principalmente os neurônios da via mesolímbica, alterando sua estrutura e resultando nos estágios de fissura e dependência (FRANCIS et al., 2019; CAMERON et al., 2019) (Figura 5). Os neurônios dopaminérgicos estão localizados principalmente em três regiões cerebrais: o Campo Retrorubral (RRF), a Substância Negra pars compacta (SNc) e a Área Tegmental Ventral (VTA). Os neurônios do VTA se projetam

do mesencéfalo para o NAc e o CPF, compondo a via mesolímbica (SOLINAS, et al. 2019). Essa interligação das regiões é fortemente envolvida com a codificação cerebral de processos de avaliação de recompensa, comportamento e tomada de decisão, e por isso, ligada a diversos distúrbios cerebrais (CHOW et al., 2021).

No âmbito do abuso de drogas, a dopamina está envolvida na mediação das mudanças funcionais e estruturais da circuitaria, incluindo o CPF (SERAFINI et al., 2020). O CPF gerencia aspectos cognitivos, emocionais, de recompensa e comportamentais, desempenhando um papel fundamental na resolução de problemas, mudança de estratégia e predição de erros (CHAN et al., 2019). Sob situações de estresse, a modulação do sistema dopaminérgico monitora e seleciona o processo ideal para lidar com as situações que regulam negativamente o sistema (BAIK, 2020). O uso de cocaína, nas suas mais diversas formas, é amplamente conhecido por ativar as regiões de recompensa cerebral (DI CHIARA, 2002). Durante a fase de efeito da droga, essas regiões estimuladas geram um efeito de euforia, sensação de prazer e felicidade (BUFFALARI, SEE, 2010). Assim que seu efeito termina, as regiões voltadas aos processos emocionais, como a amígdala e o Nac, entram em um modo negativo de estimulação, reduzindo a energia e tornando-se mais sensíveis ao estresse, depressão e ansiedade (WISE, 2008). Em compensação desse efeito negativo, as regiões responsáveis pela tomada de decisão, como o CPF, são ativadas para buscarem meios de retornar ao estágio de euforia e prazer inicial, gerando desejo e obsessão pela droga (WEISS, 2005; SEE, 2005; DRAKE, SCOTT, 2018).

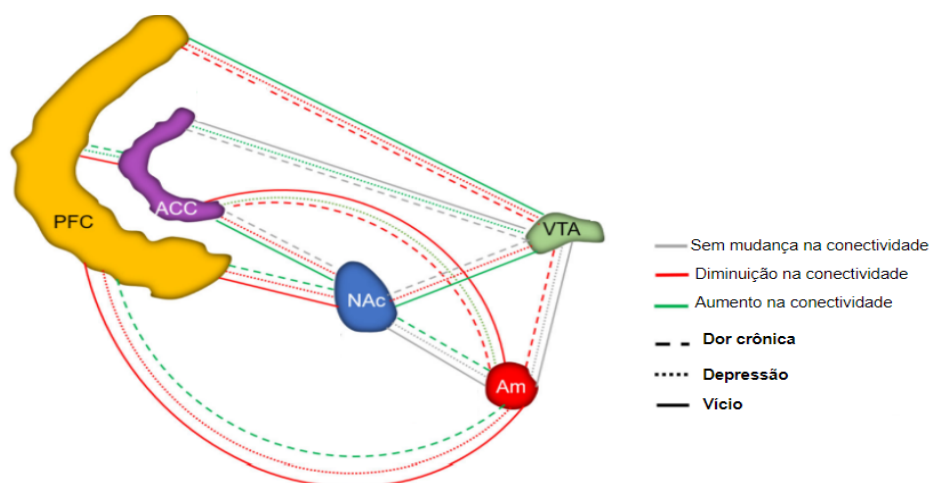


FIGURA 5. Comunicação dopaminérgica através do circuito mesolímbico a partir de distúrbios neuronais. Adaptado de SERAFINI et al., 2020.

A constante evocação desse neurocircuito a partir do uso crônico da droga arquiteteta rápidas alterações nos mecanismos fisiopatológicos no SNC, conhecidas como plasticidade neuronal (SWEATT, 2016; PREEDY, 2017). A plasticidade neuronal é um fenômeno natural descrito pela capacidade do sistema nervoso de se modificar funcionalmente e estruturalmente para responder mais rapidamente aos estímulos, tanto negativos quanto positivos, que são variavelmente e persistentemente experimentados pelo cérebro (VON BERNHARDI et al. 2017; CRAMER et al, 2011).

As alterações causadas pela exposição recorrente à cocaína se desdobram principalmente em duas esferas: alterações na capacidade transmissora, caracterizada pelas mudanças na transmissão sináptica, e alterações na capacidade estrutural, definida pela alteração na estrutura e propriedades elétricas dos neurônios (FAUTH, TETZLAFF, 2016). Essas neuroadaptações levam o cérebro a uma nova condição de taxas de disparo e regulação do tráfego de neurotransmissores (TURRIGIANO, 2008).

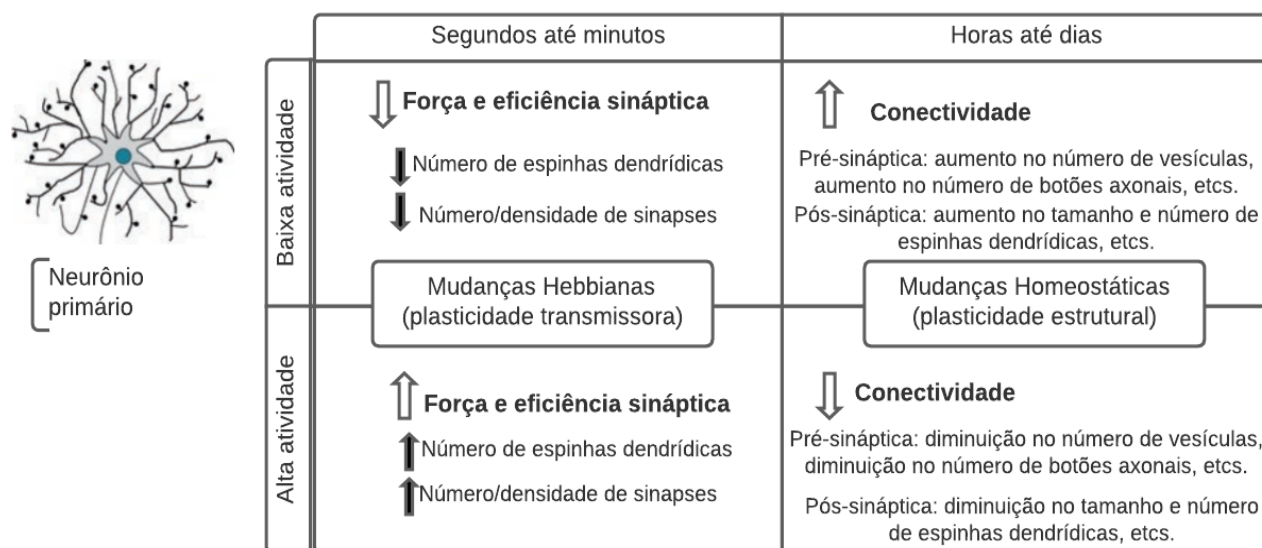


FIGURA 6. Plasticidade sináptica baseada no impacto na alteração da velocidade das atividades neuronais (alta

e baixa atividade). Adaptado de: VON BERNHARDI et al., 2017.

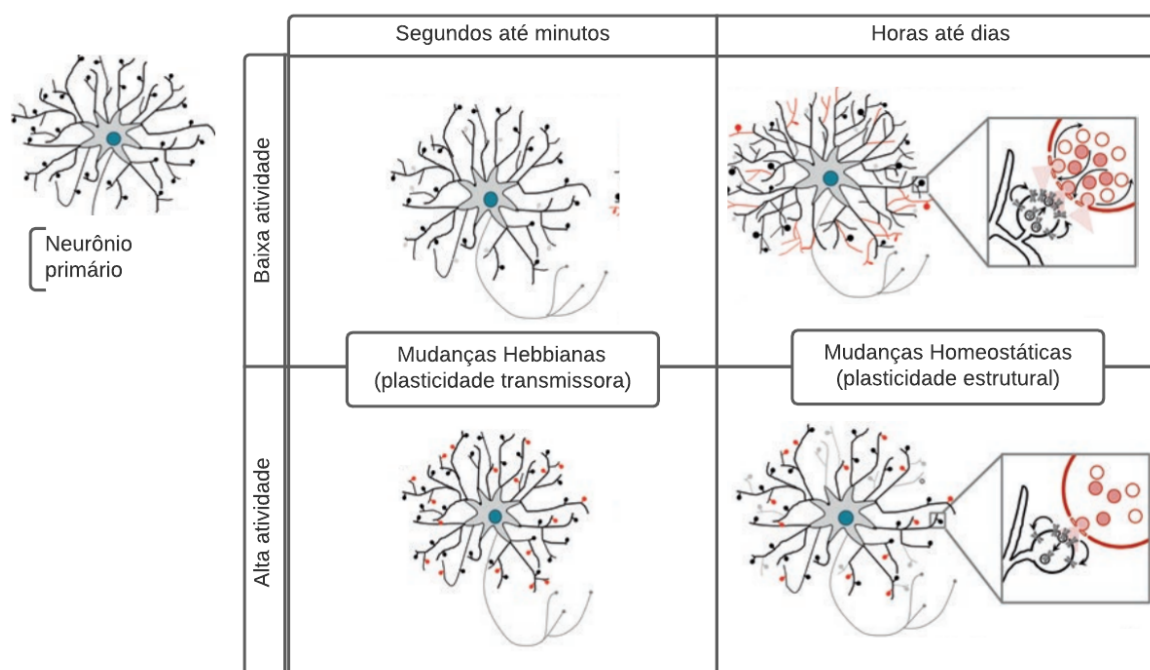


FIGURA 7. Plasticidade sináptica baseada na duração do estímulo (segundos até minutos e horas até dias). Adaptado de: VON BERNHARDI et al., 2017.

Devido à plasticidade, um novo condicionamento cerebral fazendo com que os neurônios DA disparem quando expostos às pistas preditivas da droga, preparando o palco para as respectivas mudanças comportamentais buscando uma resposta de recompensa e habituação que caracterizam o vício, incluindo um risco persistente de recaída que torna o tratamento tão desafiador.

Modelos animais tratados com psicoestimulantes, como a cocaína, são utilizados com base no processo de sensibilização (FARRELL et al., 2018; VADASZ, GYETVAI, 2020). A sensibilização comportamental ou psicomotora é um processo definido por um aumento do efeito das substâncias psicoativas após doses repetidas, evidenciado pelo aumento da atividade locomotora. (VANDERSCHUREN, KALIVAS, 2000). Nesse contexto, a habilidade da cocaína de elevar a locomoção após uma administração aguda é aumentada quando a exposição é repetida, idealizando um estado de dependência humana (VEZINA,

LEYTON, 2009). No estado sensitizado, há o aumento na liberação de DA mesolímbica (hipersensibilidade neuronal) a níveis maiores do que os produzidos anteriormente devido a plasticidade produzida pelo uso recorrente, elevando o desejo patológico e aumentando a necessidade de busca da drogas, o que contribui para episódios de recaída (TEUNS, 2015).

Assim, devido a todas as consequências provenientes do uso de cocaína, segue necessária a continuação de estudos que proporcionem maior sucesso nos tratamentos e/ou prevenção da dependência (CHAN et al., 2019; KAMPMAN, 2019). A busca por tratamentos farmacológicos e não-farmacológicos para a dependência química de cocaína tem sido alvo de estudo durante séculos. Porém, a gama de fármacos utilizados é direcionada para a atenuação dos efeitos colaterais causados pela abstinência, como convulsões e depressão, carecendo de tratamentos eficazes para a dependência em si (CHAN et al., 2019).

1.3 Ácido Rosmarínico

O ácido rosmarínico (AR) tem se evidenciado como tratamento promissor de diversas doenças neurodegenerativas tanto *in vitro* quanto *in vivo* (FACHEL et al., 2019). O AR é um éster do ácido cafeico e do ácido R-(+)-3-(3,4-dihidroxifenil) láctico (Figura 8) cujo nome deriva da planta da família *Lamiaceae* em que foi isolado pela primeira vez, *Rosmarinus officinalis* (Alecrim) (AMOAHA et al., 2016). O AR é extraído de muitas plantas além *R. officinalis* L, como a *Lavandula angustifolia* (lavanda), *Mentha arvensis* (hortelã), *M. piperita* (hortelã pimenta), *Lippia alba* (erva cidreira, chá de tabuleiro) e *L. graveolens* (orégano mexicano), e a presença do AR nestas ervas e temperos é responsável, pelo menos em parte, pelos efeitos benéficos destas plantas e também por suas importantes ações na promoção da saúde (BULGAKOV et al, 2012; ROY, MUKHOPADHYAY, 2012; SALTAS et al., 2013)

A estrutura química do AR confere a propriedade de liberação de prótons que agem de maneira direta sobre espécies oxidantes, diminuindo o estresse oxidativo e inibindo a morte de células neuronais (HABTEMARIAM, 2018).

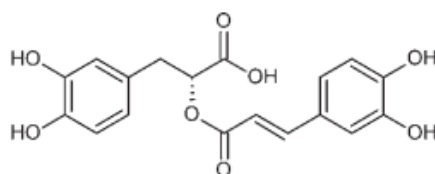


FIGURA 8. Estrutura química do AR (AMOA et al., 2016).

O AR tem se evidenciado em diversos estudos relacionados às desordens neuronais atuando em diversas vias (AMOA et al., 2016). Machado et al. (2009) estudaram os efeitos do AR como antidepressivo no âmbito do sistema monoaminérgico e demonstram o efeito antidepressivo do extrato hidroalcoólico das folhas e caules de alecrim (100 mg/kg) por 14 dias em testes comportamentais em camundongos, a partir da dependência na interação com os sistemas noradrenérgicos, dopaminérgicos e serotoninérgicos. Hase et al. (2019) demonstrou a supressão do desenvolvimento de Alzheimer pela redução de agregados de proteína β -amilóide pelo aumento na secreção monoaminérgica mediada pelo AR. Ghaffari et al. (2014) avaliaram o efeito do AR como neuroprotetor contra os efeitos de danos celulares induzidos por H_2O_2 , o resultado foi positivo, sugerindo que o AR potencialmente possui ação de prevenção em diversas doenças neurodegenerativas causadas pelo estresse oxidativo. Além disso, nosso grupo também demonstrou a eficácia do AR na prevenção de alterações comportamentais em modelo animal da Doença de Parkinson (Presti-Silva, 2018). Alguns outros mecanismos de ação do AR já encontrados na literatura estão descritos na Figura 9.

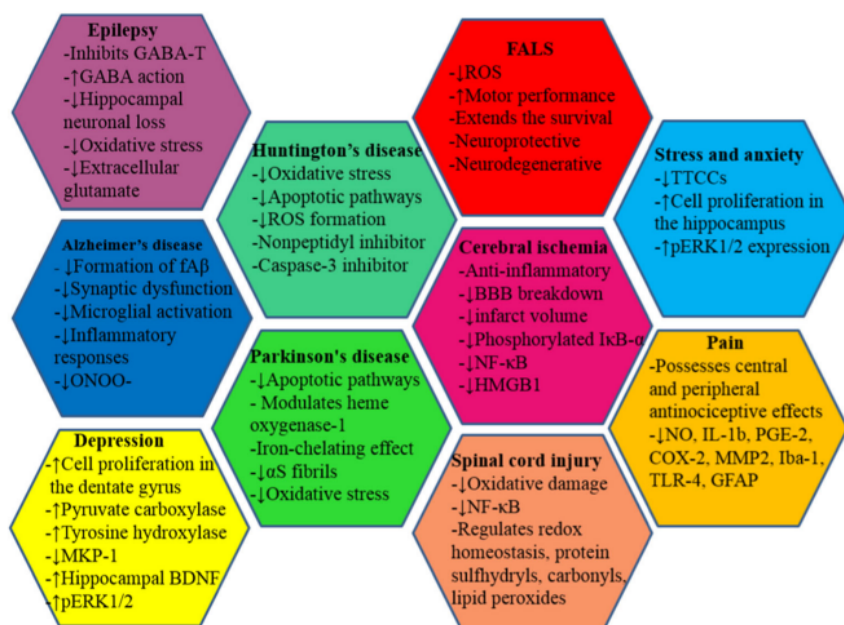


Figura 9. Mecanismo de ação do AR em distúrbios do sistema nervoso central. (GHASEMZADEH e HOSSEINZADEH, 2020).

Essas propriedades evidenciadas no SNC demonstram um potencial na eficiência do AR no tratamento da dependência química. A utilização do AR para esse fim carece de estudos. Dessa forma, o presente projeto busca avaliar o potencial efeito do AR na atividade locomotora de camundongos tratados com cocaína em diferentes estágios do processo de dependência, assim como buscar os mecanismos moleculares envolvidos nesse eventual efeito através na análise da expressão gênica de marcadores de dependência química.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o potencial efeito do AR na prevenção e tratamento da dependência química de cocaína através de estudos comportamentais e moleculares em modelo animal usando camundongos C57BL/6 tratados ou não com a droga.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar se o AR previne as alterações locomotoras exploratórias induzidas pela cocaína (sensitização comportamental) através do teste de atividade locomotora em Campo Aberto.
- Avaliar se o AR previne as possíveis alterações na expressão gênica dos marcadores de adição Δ FOSB, CREB e BDNF no córtex pré-frontal por qRT-PCR.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6, com idade de 8-12 semanas. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo e, mantidos em caixas de acrílico (38cm x 20cm x 13 cm) acopladas à estante ventilada, numa temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) com fornecimento de ração e água *ad libitum*. Condicionados sob ciclo claro-escuro 12:12h. Os experimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética dos Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA/UFES) sob o protocolo 34/2019.

3.2 Fármacos

A cocaína (Sigma-Aldrich, CAS 53-21-4) utilizada apresenta pureza analítica confirmada a partir de análises realizadas no Departamento Médico Legal do Espírito Santo (DML/ES). A administração da dose ocorreu via intraperitoneal (i.p.) em uma concentração de 15 mg/kg durante 5 dias consecutivos (Dia 4-8) e também para o teste desafio (Dia 14) em todos os grupos (excluso o grupo controle), conforme literatura (ZHOU et al., 2019; BAIMEL et al., 2019) e estudos no próprio laboratório (AREAL et al. 2019). A solubilização do pó de cocaína foi realizada em solução salina (0.9 % NaCl). A administração foi feita uma vez ao dia, anteriormente ao início dos testes comportamentais.

O AR (Sigma-Aldrich, CAS 20283-92-5) foi administrado via oral a partir da dissolução em veículo (5% Tween 80 em salina). A concentração da dose foi de 20mg/kg conforme estudos prévios do nosso laboratório para modelos da Doença de Parkinson e com base em estudos em modelos animais já publicados (PRESTI-SILVA, manuscrito em preparação; WANG et al., 2012; RAHBARDAR et al., 2018). A dosagem foi aplicada em diferentes dias, de acordo com cada grupo, para análise do melhor efeito preventivo do AR. A administração foi realizada durante as primeiras horas da manhã, no início da fase clara do ciclo claro-escuro.

3.3 Delineamento Experimental

O delineamento experimental foi dividido em quatro fases que durou 13 dias consecutivos, conforme Figura 10:

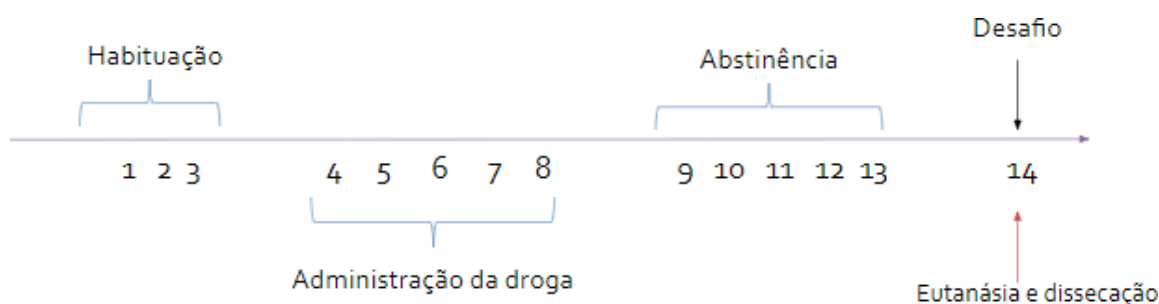


FIGURA 10. Delineamento experimental dividido pelas etapas da sensitização.

- 1) Habituação (dias 1-3): para a estabilização da linha de base antes do início dos tratamentos, os animais foram injetados com salina e submetidos ao teste de campo aberto (1h) para familiarização com o aparato e com a forma de administração.
- 2) Administração da droga (dias 4-8): durante o período todos os animais receberam injeções da droga [excluído grupo de Controle, que recebeu salina] e imediatamente foram testados em campo aberto uma vez ao dia, durante 1h.
- 3) Abstinência (dias 9-13): os animais foram mantidos em suas gaiolas sem receber a administração de cocaína. Nessa etapa, o grupo Abstinência iniciou a administração de AR.
- 4) Desafio (dia 14): os animais foram novamente injetados apenas com cocaína (exceto no grupo Controle) e testados no campo aberto por 1h para avaliar a sensitização comportamental. Após o teste, os animais foram eutanasiados e imediatamente dissecados em gelo seco para a coleta do NAc e CPF. As amostras foram guardadas armazenadas à temperatura de -80 ± 1 °C.

De acordo com os tipos de tratamento que queríamos averiguar, os animais foram divididos randomicamente em 5 grupos:

- Controle - Grupo que recebeu salina durante os cinco dias de administração da droga e do desafio, e o veículo durante todo o experimento
- Cocaína - Grupo que recebeu cocaína durante os cinco dias de administração da droga e no desafio, e o veículo durante todo o experimento.
- Pré-tratamento - Grupo que recebeu cocaína durante os cinco dias de administração da droga e no desafio e recebeu AR durante os três dias da habituação (dia 1-3) para verificarmos se o composto, quando administrado precocemente, possui um efeito preventivo.
- Abstinência - Grupo que recebeu cocaína durante os cinco dias de administração da droga e no desafio e recebeu AR apenas durante o período de abstinência (dia 9-13) de modo a verificar se o composto, quando administrado durante o período de abstinência, atenua os efeitos da mesma.
- Constante - Grupo que recebeu cocaína durante os cinco dias de administração da droga e no desafio e recebeu AR durante os 14 dias de tratamento para analisar se o AR interfere no efeito da cocaína e, principalmente, se o uso contínuo do composto revertia os efeitos da cocaína.

Os grupos foram escolhidos com a finalidade de verificarmos o momento adequado para a utilização do composto ativo e sua maior eficiência para a prevenção e/ou tratamento da dependência. A administração da cocaína foi realizada conforme Figura 11:

Ácido Rosmarínico

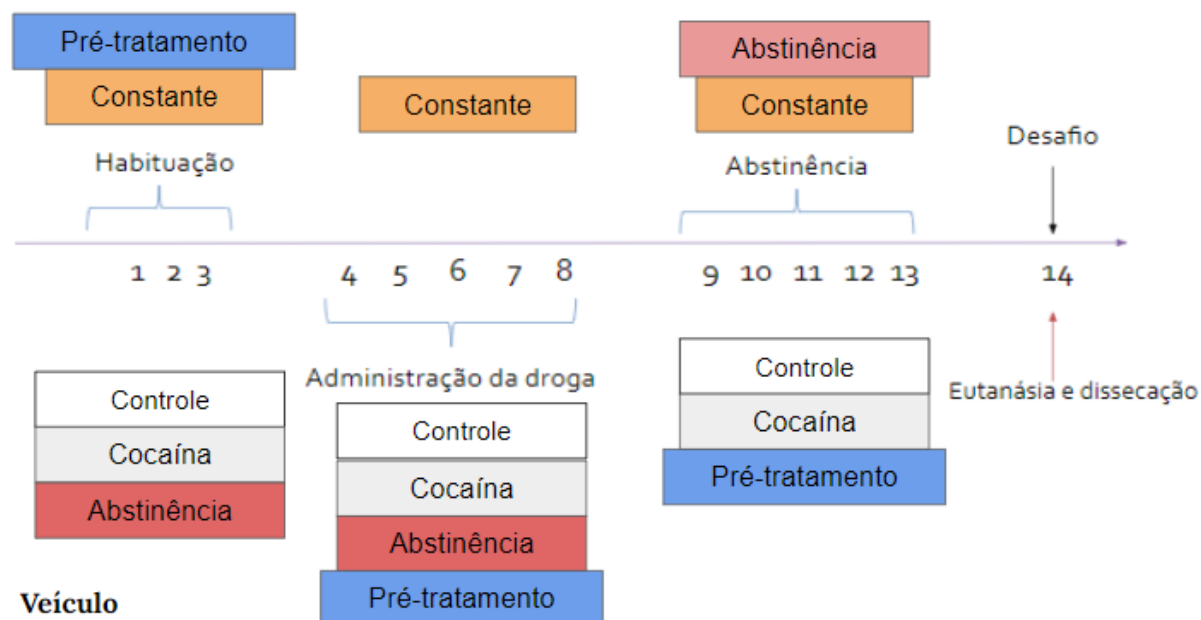


FIGURA 11. Delineamento experimental dividido pelas etapas da sensibilização com os respectivos tratamentos.

3.4 Teste de Campo Aberto

O Teste de Campo Aberto foi utilizado para a avaliação da atividade locomotora do animal durante a administração da droga para a avaliação da sensibilização devido à hiperlocomotoção característica da administração de cocaína (AREAL, 2019; EISENER-DORMAN, 2011). Foi realizado em caixas (41x34x16 cm) e computadas pelo Software Any Maze® durante 1h. A distância percorrida foi expressa em metros.

3.5 Análise Bioquímica

A análise bioquímica objetivava a investigação do perfil de expressão gênica dos marcadores de adição (BDNF, CREB e Δ FosB). Após a dissecação, os tecidos biológicos foram colhidos e imediatamente congelados em gelo seco. As amostras ficaram estocadas no freezer -80°C até o dia da análise. A análise bioquímica foi feita a partir da técnica do PCR em tempo real (qPCR) para a avaliação da expressão gênica dos marcadores de adição.

O RNA total foi extraído utilizando TRI Reagent RNA Isolation Reagent (Sigma-Aldrich, MO, USA). Os tecidos foram solubilizados em trizol (1mL) com o uso de um

homogeneizador elétrico. A separação ocorreu a partir da centrifugação (12.000 x g, 10min, 4°C). Foi adicionado clorofórmio (200µl) ao sobrenadante, misturado por inversão e incubado por 5 minutos (temperatura ambiente). Novamente foi centrifugado (12.000 x g, 15 min, 4°C) e a fase aquosa foi coletada. À essa fase foi adicionado isopropanol (500µl) para a precipitação do RNA. Após 5 min à temperatura ambiente, foi centrifugado pela terceira vez (12.000 xg, 10min, 4°C). O precipitado foi lavado com 1mL de etanol 75%, agitado e centrifugado (7500 xg, 5min, 4°C). O etanol foi removido. O RNA foi ressuspensionado em água deionizada previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). Foi utilizado o NanoDrop (ThermoScientific, Wilmington, USA) para medir a concentração e a pureza do RNA. A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit iScript cDNA synthesis kit (Biorad, CA, USA).

Posteriormente, a reação de PCR em tempo real foi feita utilizando um CFX96 Real Time PCR (Biorad, CA, USA) e o kit iQ SYBR Green Supermix (Biorad). A quantificação da expressão gênica foi feita pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando o gene da β -actina para a normalização dos dados. Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 1:

TABELA 1. Caracterização dos primers utilizados nas reações de qPCR.

Gene	Sequência (5'-3')	TM (°C)
Δ FosB	F: TGC AGC TAA GTG CAG GAA CCG T	64
	R: GAG GAC TTG AAC TTC ACC TGG CCA	64
CREB	F: GGA GCT TGT ACC ACC GGT AA	59
	R: GAT GTT GCA TGA GCT GCT GG	59
BDNF	F: GGC TGA CAC TTTT GAG CAC GTC	76
	R: CTC CAA AGG CAC TTG ACT GCT G	76

Actina	F: TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG A	61
	R: AAT GCC TGG GTA CAT GGT GGT A	61

3.6 Análises Estatísticas

Para as análises estatísticas e criação dos gráficos foi utilizado o software GraphPad Prism v.8.4.3. Todos os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e o nível de significância utilizado foi de $p < 0,05$. Os dados comportamentais foram analisados utilizando Anova mista de duas vias com pós-teste de Bonferroni e o dado bioquímico foi analisado a partir da Anova mista de uma via, com pós-teste de Tukey.

4. RESULTADOS

4.1 Análise comportamental

O protocolo comportamental da sensibilização frente à cocaína foi avaliado a partir de uma ANOVA de duas vias relacionando ao grupo Controle [$F(7, 112) = 15,52, p < 0,0001$]. A sensibilização mostrou um crescimento linear com o aumento da atividade locomotora no comparativo distância percorrida ao longo dos dias administrados indicando o efeito já demonstrado em modelos animais relacionados ao abuso de cocaína. Os resultados podem ser vistos na Figura 12.

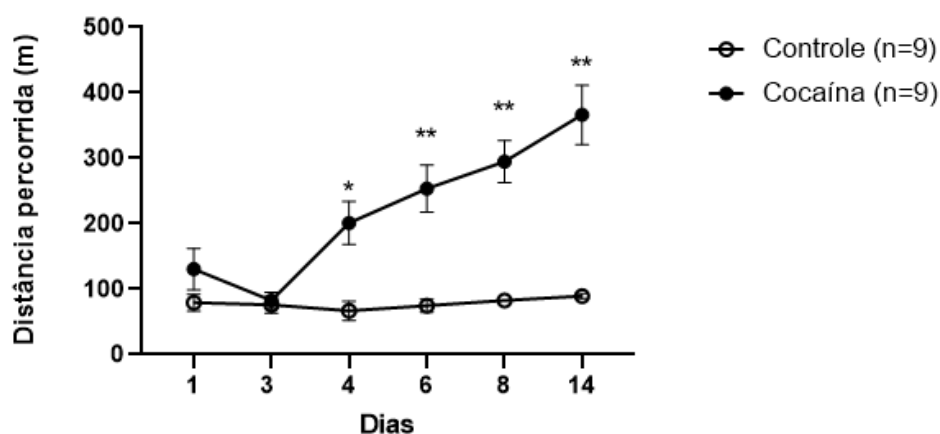


FIGURA 12. Animais que receberam cocaína apresentaram sensibilização comportamental à droga. Média $\pm$ erro padrão da distância percorrida por sessão ao longo de cinco dias de administração da droga e no desafio (dia 14). ANOVA de duas vias com post-hoc de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Para a verificação dos possíveis tratamentos com o AR, foi realizada uma nova análise por ANOVA de duas vias. Em relação ao grupo Controle [$F(21, 238) = 2,021, p < 0,0001$], foi identificado um perfil de atenuação das curvas dos grupos pré-tratados com o AR (grupo Pré-tratamento e grupo Constante). Todos os tratamentos apresentaram diferença significativa na distância percorrida no dia do desafio (grupo Pré-tratamento $p < 0,0001$; grupo Constante $p = 0,0016$; grupo Abstinência $p < 0,0001$). O comparativo com o grupo Controle foi demonstrado na Figura 13.

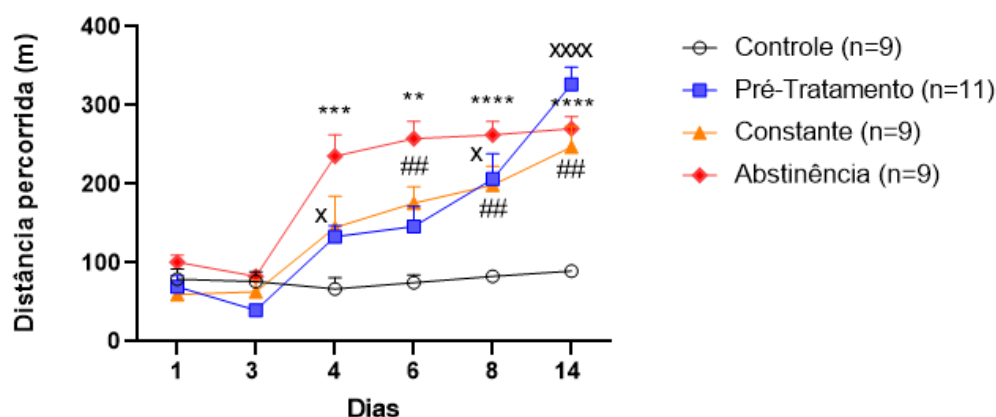


FIGURA 13. Os tratamentos frente ao grupo Controle. O pré-tratamento e o tratamento constante com AR mostraram um perfil atenuante em comparação ao grupo controle [(x) para o grupo Pré-tratamento, (#) para o grupo C e (*) para o grupo Abstinência). Média $\pm$ erro padrão da distância percorrida por sessão ao longo de cinco 5 dias de administração da droga e no desafio. ANOVA de duas vias com post-hoc de Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Em comparativo com o grupo Cocaína [$F(21, 238) = 2,021$, $p = 0,0063$] foi encontrada uma tendência de atenuação no perfil das curvas de tratamento, porém os resultados não mostraram significância entre os tratamentos frente ao grupo Cocaína. Essa tendência em relação ao grupo Cocaína está demonstrada na Figura 14.

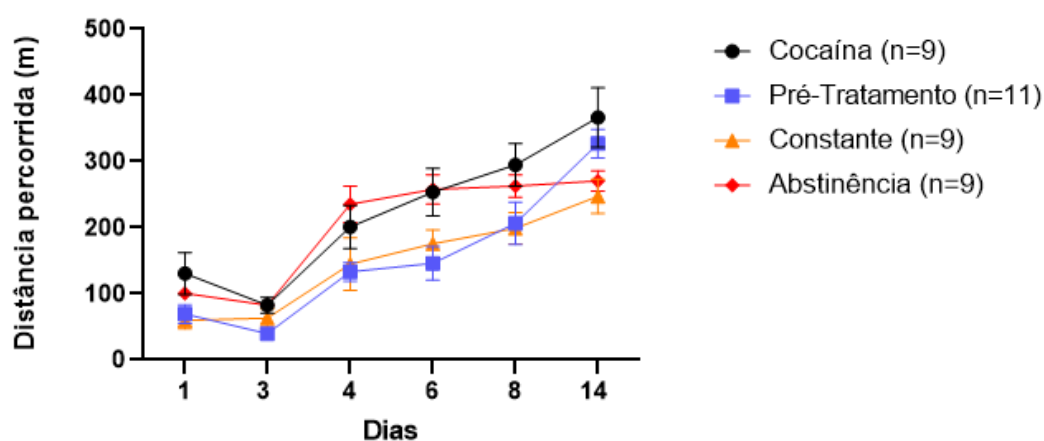


FIGURA 14. Os tratamentos frente ao grupo Cocaína. Média $\pm$ erro padrão da distância percorrida por sessão ao longo de cinco 5 dias de administração da droga e no desafio. ANOVA de duas vias com post-hoc de Bonferroni.

Foi analisado o potencial do tratamento com AR em um primeiro episódio de uso da droga avaliando a diferença da distância percorrida no último dia de habituação (dia 3) e o primeiro dia de administração de cocaína (dia 4) [$F(3, 34) = 6,711$, $p=0,0011$]. Dentro do mesmo grupo, todos os grupos que receberam cocaína apresentaram diferença significativa. Uma tendência foi identificada no grupo Pré-Tratamento ($p=0,0014$) e no grupo Controle ($p=0,0133$). No comparativo entre grupos, quando relacionados ao grupo Controle, não foi identificada diferença significativa no grupo Pré-tratamento. O perfil do grupo Abstinência, que não havia recebido nenhum tratamento até então, teve uma mudança notável de distância percorrida tanto comparada dentro do grupo ($p<0,0001$), quanto relacionada ao controle ($p<0,0001$), conforme Figura 15.

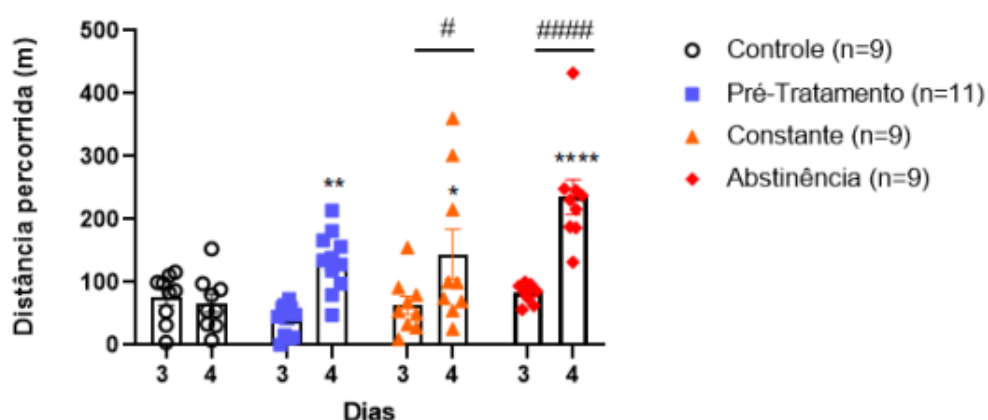


FIGURA 15. Efeito positivo do tratamento no primeiro episódio de uso da droga quando comparado com o grupo controle. (*) Comparativo entre o dia 3 (último dia de habituação) e o dia 4 (primeiro dia de administração de cocaína). (#) Comparativo entre os dias 4 (primeiro dia de administração de cocaína) dos tratamentos com o controle. Média $\pm$ erro padrão da distância percorrida por sessão ao longo de 2 dias de administração da habituação e administração da droga. ANOVA de duas vias com post-hoc de Bonferroni. * $p<0,05$, ** $p<0,005$, **** $p<0,0001$; # $p<0,05$, #### $p<0,0001$.

Em comparação com o grupo Cocaína [$F(3, 34) = 1,338$, $p=0,2782$], não houve diferença significativa em nenhum dos tratamentos, de acordo com a Figura 16.

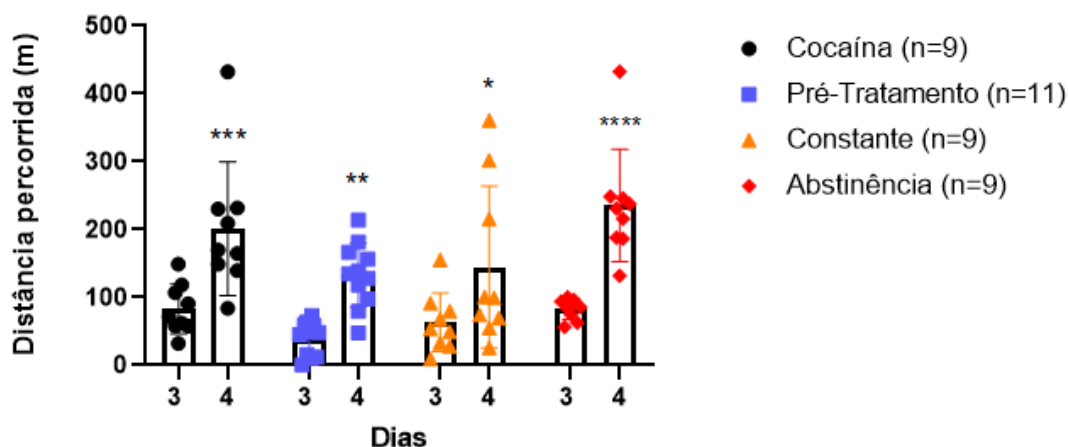


FIGURA 16. Efeito neutro do tratamento no primeiro episódio de uso da droga quando comparado com o grupo cocaína. Comparativo entre o dia 3 (último dia de habituação) e o dia 4 (primeiro dia de administração de cocaína). Média $\pm$ erro padrão da distância percorrida por sessão ao longo de cinco 2 dias de habituação e administração da droga. ANOVA de duas vias com post-hoc de Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, **** $p < 0,0001$.

Para uma construção do efeito do tratamento em um cenário de recaída, foi analisado o comparativo entre o dia 8 (último dia de administração da droga) e o dia 14 (desafio) [$F(3, 34) = 6,004$, $p = 0,0021$]. Todos os grupos apresentaram diferença significativa quando comparados com o controle (Pré-tratamento $p < 0,0001$; Constante $p < 0,0001$; Abstinência $p < 0,0001$). Quando comparados entre o mesmo grupo, o grupo que recebeu o tratamento de forma contínua (grupo Constante, $p = 0,1784$) e o tratamento apenas durante a abstinência (grupo Abstinência, $p > 0,9999$) foi identificado um platô entre o dia 8 e o desafio. O grupo Pré-tratamento apresentou uma diferença expressiva entre o dia 8 e o dia 14 ($p < 0,0001$). Esses resultados estão descritos na Figura 17.

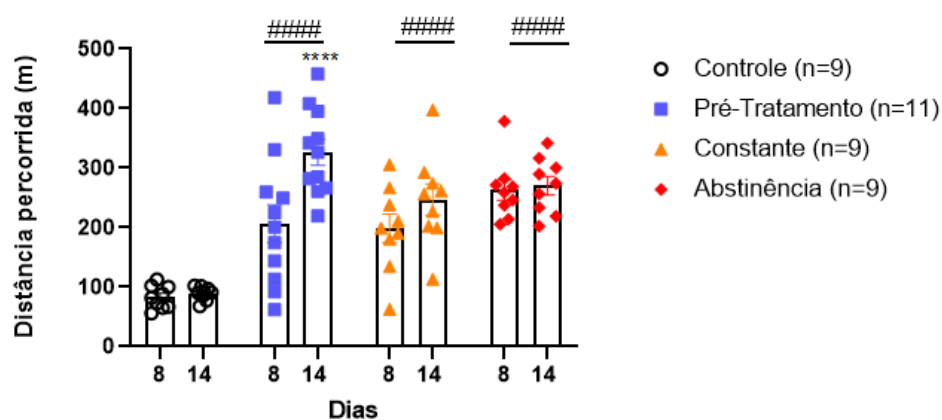


FIGURA 17. Efeito neutro do tratamento em um episódio de recaída quando comparado com o grupo controle. (*) Comparativo entre os dias 8 (último dia de administração) e o 14 (desafio) dentro de um mesmo grupo. (#) Comparativo entre o dia 14 (desafio) dos tratamentos com o controle. Média $\pm$ erro padrão da distância percorrida por sessão ao longo de dois dias, habituação e desafio. ANOVA de duas vias com post-hoc de Bonferroni. **** $p < 0,0001$; # $p < 0,0001$.

Quando comparados com o grupo Cocaína [$F(3, 34) = 2,292$, $p = 0,0957$], não encontramos diferenças significativas entre o dia 8 (último dia de administração da droga) e o dia 14 (desafio) dos grupos Pré-tratamento e grupo Abstinência. Porém, o grupo que recebeu o tratamento contínuo (grupo Constante, $p = 0,0010$) apresentou um comportamento atenuante, mostrando um efeito positivo na constância do tratamento para eventos de recaída. Os resultados estão descritos na Figura 18.

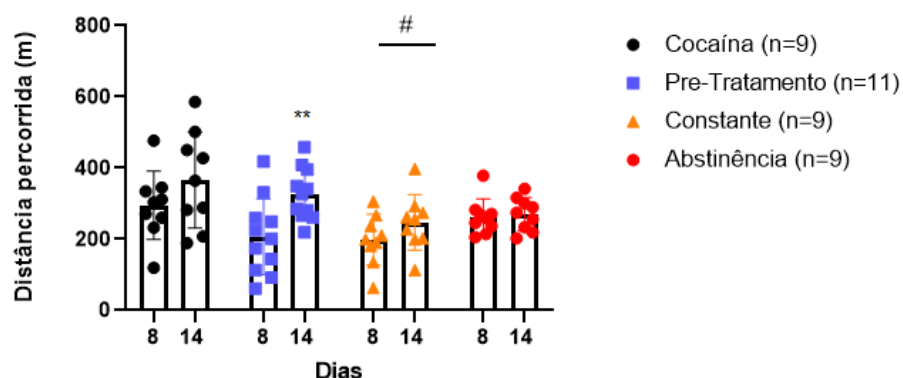


FIGURA 18. Efeito positivo do tratamento constante em um episódio de recaída quando comparado com o grupo cocaína. (*) Comparativo entre os dias 8 (último dia de administração) e o 14 (desafio) dentro de um mesmo grupo. (#) Comparativo entre o dia 14 (desafio) dos tratamentos com a cocaína. Média $\pm$ erro padrão da

distância percorrida por sessão ao longo de 2 dias de habituação e desafio. ANOVA de duas vias com post-hoc de Bonferroni. **p=0,001.

5.2 Análise bioquímica dos tratamentos

Utilizamos o PCR em tempo real para a avaliação das possíveis alterações transcricionais no córtex pré-frontal do tratamento com o AR para a dependência de cocaína, os dados obtidos foram demonstrados na Figura 19.

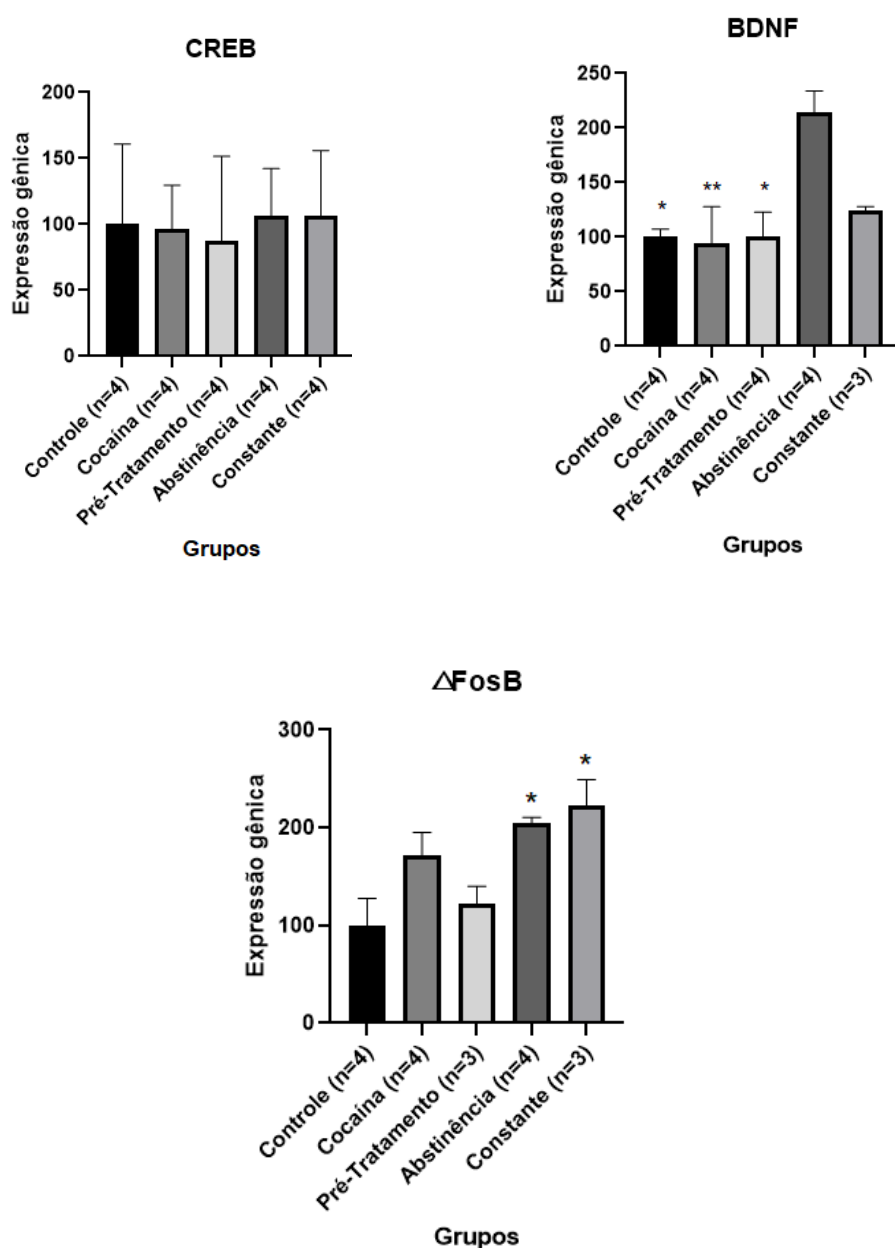


FIGURA 19. Expressão gênica dos genes do CPF relacionados à adicção em comparativo entre os

tratamentos. Média $\pm$ erro padrão de 3-4 animais por grupo. Para o BDNF, os asteriscos representam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo Abstinência e para o Δ FosB em relação ao grupo Controle (*). ANOVA de uma via com post-hoc de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Como as amostras bioquímicas de todos os animais foram coletadas somente após o desafio, foi encontrada uma tendência significativa quanto aos grupos que foram tratados com o AR durante o período de abstinência do delineamento experimental. Não houve alteração na expressão gênica do CREB. O BDNF [$F(4, 14) = 5,859$, $p = 0,0055$] apresentou um aumento quando comparado o grupo Abstinência com os grupos que não foram tratados com o AR durante a abstinência (Cocaína [$p = 0,0083$], Controle [$p = 0,0119$], Pré-tratamento [$p = 0,0124$]). A expressão do Δ FosB foi aumentada nos grupos tratados com o AR durante o período de abstinência (Abstinência [$p = 0,0452$], Constante [$p = 0,0175$]), quando comparado com o grupo Controle.

5. DISCUSSÃO

O delineamento experimental se mostrou eficaz quanto ao perfil de sensitização comportamental frente ao abuso de cocaína em modelos animais encontrados na literatura (MILLER et al. 2009; BLANCO et al. 2014; YANG et al. 2019). A sensitização depende diretamente do padrão de administração e da dose administrada (CALIPARI et al., 2014; ALGALLAL et al., 2019). Calipari et al. (2013) demonstrou que esses padrões de administração trazem diferentes perfis para a tolerância e a sensitização pois modulam diferentemente as alterações na atividade do DAT. Porém, o comportamento crescente da sensitização ao longo da curva é típico da sensitização com cocaína como demonstrado por Liu et al. (2018) em seu estudo com a mesma dose da droga (i.p. 15mg/kg).

O desenvolvimento da sensitização locomotora é associado pelo aumento da atividade dopaminérgica mesolímbica (Liu et al, 2018). Esse comportamento estereotipado do uso da cocaína a partir do aumento da atividade locomotora foi observado. A eficácia dos tratamentos quanto ao perfil comportamental foi demonstrada a partir da atenuação da hiperlocomoção induzida pelo uso da cocaína nos grupos pré-tratados e continuamente tratados com AR quando comparados ao grupo controle.

Para uma melhor análise dos efeitos da cocaína sobre a locomoção, foi investigada a diferença na distância percorrida em dois momentos distintos: a resposta aguda à cocaína (comparando-se o último dia de habituação com o primeiro dia de exposição à cocaína) e a resposta à reexposição à cocaína após um período de abstinência comparando-se o último dia de administração da droga com o desafio) .

A resposta aguda foi atenuada nos grupos que receberam o pré-tratamento com o AR, grupo Pré-tratamento e grupo Constante. No comparativo com o grupo Controle, vemos uma tendência no comportamento dos grupos pré-tratados. Essa tendência não foi observada no grupo Abstinência. Em relação ao grupo Cocaína, nenhum grupo apresentou diferença significativa, porém as curvas dos grupos pré-tratados se mostraram mais amenas que a curva do grupo Cocaína. Os resultados mostraram um efeito positivo em relação ao pré-tratamento com o AR. Nossa hipótese para esse efeito primário se baseia em

neuroadaptações cerebrais antecipadas ao uso de cocaína devido o aumento dos neurotransmissores na fenda sináptica derivada da ação do AR, responsável por inibir a expressão das enzimas de degradação, principalmente MAO-B. Andrade et al. (2016) verificaram a ação inibitória reversível do AR sobre as enzimas de degradação das monoaminas - a MAO-A, MAO-B e COMT - para explicar o perfil de acréscimo na concentração das monoaminas. Com esse aumento, a plasticidade neuronal iniciaria-se previamente, sendo responsável pelo comportamento dos grupos pré-tratados com AR.

Quanto à reexposição, nenhum grupo ultrapassou a média do grupo Cocaína no desafio. Os grupos Abstinência e Constate apresentaram um perfil mais brando em relação à re-exposição, não apresentando diferença significativa dentro do grupo quando comparados o último dia de administração da droga com o dia do desafio. Esse perfil demonstra a eficácia do AR também durante a abstinência na prevenção de uma recaída mais severa. Hase et al. (2019) demonstrou que um tratamento de 11 dias com AR adicionados à dieta dos animais elevou a concentração de DA no córtex cerebral e no estriado. O estudo ajuda a identificar que o possível motivo para que o uso do AR durante a abstinência tenha mostrado um efeito positivo é relacionado ao aumento do nível de DA no SNC. Esse acréscimo faz com que o período de abstinência não gere uma resposta tão negativa no sistema, uma vez que o aumento de DA supre as demandas da neuromodulação sofrida durante o uso da droga. Com isso, evita-se que, em um cenário de recaída, exista uma ativação exagerada das vias dopaminérgicas. O grupo Pré-tratamento apresentou diferença significativa dentro do grupo entre o último dia de administração da droga e o desafio. Isso leva à hipótese de que o efeito compensatório nos primeiros dias de habituação atua de forma contrária em um cenário de recaída, enfatizando a necessidade do tratamento contínuo.

Para compreender melhor os mecanismos moleculares dos tratamentos, avaliou-se a expressão gênica de alguns genes no CPF. Os genes analisados possuem alterações no seu perfil bioquímico relacionados ao abuso de cocaína, sendo considerados marcadores de adição, são eles: CREB, BDNF e Δ FosB (MCCLUNG, NESTLER, 2003; CHANG et al.,

2018; BLANCO et al., 2014, SOARES-SIMI et al. 2013) .

Drogas estimulantes como a cocaína ativam o CREB em diversas regiões cerebrais importantes para a adição e esta ativação, em geral, reduz a sensibilidade aos efeitos recompensadores das drogas e medeia o estado emocional negativo observado durante a abstinência (NESTLER, 2005). Castro-Zavala et al. (2021) em um estudo sobre as diferenças sexuais na vulnerabilidade dos efeitos viciantes a cocaína após estresse precoce na infância em camundongos, sugeriram que após a exposição crônica à cocaína, camundongos machos possuem um aumento na razão pCREB/CREB como um efeito compensatório para evitar os efeitos negativos da droga. Mattson et al. (2015) identificaram que o aumento nos níveis de fosforilação de CREB induzido pelo uso de cocaína são maiores no NAc após sete dias de administração repetida de cocaína. Porém, não foram identificadas alterações nos níveis de CREB no CPF em nenhum dos tratamentos deste estudo. De acordo com Sun et al. (2014), as fosfoproteínas induzidas pela abstinência, como o pCREB no CPF dorsomedial são normalizados após reexposição após sete dias de abstinência, sugerindo que a recaída alivia a atividade da PKA induzida pela abstinência no CPF. Valzachi et al. (2013) identificaram que a abstinência de cocaína aumentou substancialmente os níveis de CREB no PFC e hipocampo e pCREB no hipocampo em comparação com a administração repetida em camundongos adolescentes, mas não em camundongos adultos. Esses resultados demonstram que o fator CREB possui uma atividade mais marcante quanto à exposição a curto prazo.

O BDNF é um membro da família de neurotrofinas sintetizado inicialmente como um propeptídeo (pro-BDNF) e, posteriormente, clivado em sua forma madura (PITTS et al., 2016). É um gene responsável por regular a atividade neuronal e a plasticidade estrutural, sendo crucial em cenários de aprendizado, memória e em desordens neurológicas como depressão e transtorno obsessivo-compulsivo (LU et al., 2014; LEAL et al., 2016). Fumagalli et al., (2007) desmontaram que uma exposição repetida à cocaína (5 mg/kg/dia; 5 dias) aumenta a expressão e fosforilação do BDNF e de CREB em até duas horas após a última exposição à cocaína. Sadri-Vakili et al. (2010) mostraram que o uso repetido de cocaína auto-administrada (2 h/dia; 14 dias) aumenta a expressão do BDNF, mantendo esse

aumento quando analisado em até 1 semana após a última exposição. Zhang et al. (2015) demonstraram que o uso contínuo de cocaína (25 mg/kg/dias; 5 dias) aumenta os níveis BDNF e a expressão do *trkB* 25 dias após a administração. Porém, esse aumento é reversível. Li et al. (2013) demonstrou que o uso prolongado de cocaína por auto-administração (6 h/dia; 10 dias) não modifica a expressão do BDNF quando testado 45 dias após a exposição. Hearing et al. (2008) indicaram que após 15 dias de abstinência, o BDNF é regulado positivamente. No córtex, estudos demonstram um aumento na expressão do BDNF (CAFFINO et al., 2019; FARRELL et al., 2018). O efeito do AR na expressão do BDNF foi demonstrado por Jin et al. (2013) que encontraram que o AR (10 mg/kg/dia; 14 dias) reverteu comportamentos do tipo depressivo em ratos a partir da restauração da expressão da proteína *pERK1/2* que resultou no aumento do BDNF no hipocampo dos animais submetidos a um método de estresse crônico imprevisível. No presente estudo, não identificamos alterações nos níveis de expressão de BDNF no CPF no grupo cocaína quando comparado ao grupo controle. Porém, foi visto um aumento na expressão gênica do BDNF no grupo Abstinência. Esse grupo apenas não apresentou diferença significativa quando comparado com o grupo C, que também recebeu AR durante o período de abstinência. Comparando-se com a atividade locomotora dos animais com relação ao último dia de administração da droga e o desafio, o grupo Abstinência e C foram os únicos tipos de tratamento que não apresentaram diferença significativa dentro do grupo entre os dias.

O Δ FosB é um fator de transcrição que tem sido proposto como a molécula chave na transição do uso recreativo para a adição em drogas, tendo em vista que a elevação nos seus níveis também eleva as propriedades recompensadoras das drogas (NESTLER, 2012; KUFAHL, 2015; GRINSPUN, 2019). No desafio, quando comparado com o controle foi encontrado uma tendência no aumento do Δ FosB no grupo Cocaína, porém, não houve diferença significativa entre esses grupos. Essa diferença foi observada apenas nos dois grupos tratados com o AR durante a abstinência (Abstinência e Constante). Fallarini et al. (2009) demonstraram que o perfil neuroprotetor do AR é mediado pela prevenção do estresse oxidativo a partir de uma sobrecarga de Ca^{2+} intracelular e aumento na expressão de c-fos, o qual é resultado da fosforilação do Δ FosB. Como não houve administração de

AR no desafio, a variação no nível de expressão de Δ FosB nos grupos Abstinência e Constante e relacionado ao fato dos grupos não terem apresentado diferença significativa quando comparado o dia 8 e o desafio, pode ser atribuído ao efeito compensador do AR. Esse efeito seria derivado também do fato do AR inibir as enzimas de degradação durante a fase de abstinência, que como consequência despotencializa o efeito da ausência da droga.

6. CONCLUSÃO

O AR se mostrou um bom candidato como tratamento farmacológico para a dependência química, principalmente no uso contínuo.

No âmbito comportamental, os resultados do pré-tratamento mostraram que o AR quando administrado não causa efeito na atividade locomotora dos animais. Foi identificada uma tendência de atenuação dos efeitos relacionados ao abuso de cocaína a partir de uma diminuição da atividade locomotora dos animais tratados com AR. A hipótese levantada a partir dessa observação pode ser devido ao efeito compensatório causado pela inibição das enzimas degradadoras da DA, conforme literatura.

Bioquimicamente, o AR também apresentou uma tendência positiva como uma boa opção para diminuição dos efeitos da abstinência conforme mostrado a partir do resultado dos marcadores de adição. Esses resultados trazem a hipótese que os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes se mostraram primordiais na ação positiva do AR durante a abstinência. Com os resultados obtidos, podemos concluir que a utilização do AR deve ser contínua e que o abandono do tratamento seguido de um cenário de recaída pode gerar efeitos somatórios das alterações cerebrais provenientes do uso AR com as alterações rápidas provocadas pelo uso de cocaína.

Desenvolvimentos futuros nesta linha de pesquisa incluiriam um aprofundamento nos efeitos do AR durante cada fase de uso e o efeito de doses distintas de AR com a perspectiva de construir um feedback de ação do AR durante todas as fases da dependência química; e a realização de testes para a avaliação da fissura e busca pela droga para identificar o efeito do AR na procura espontânea da droga por meio de testes comportamentais de preferência, como a preferência condicionada por lugar (CPP).

7. BIBLIOGRAFIA

- AHMED, S. H.; CADOR, M. Dissociation of psychomotor sensitization from compulsive cocaine consumption. **Neuropsychopharmacology**. 31(3):563-71, 2006. doi: 10.1038/sj.npp.1300834. PMID: 16034440.
- ALGALLAL, H.; ALLAIN, F.; NDIAYE, N. A.; SAMAHA, A. N. Sex differences in cocaine self-administration behaviour under long access versus intermittent access conditions. **Addict Biol**. 25(5):12809, 2020. doi: 10.1111/adb.12809.
- AMOA, S., SANDJO, L., KRATZ, J., & BIAVATTI, M. (2016). **Rosmarinic Acid – Pharmaceutical and Clinical Aspects**. *Planta Medica*, 82(05), 388–406. doi:10.1055/s-0035-1568274
- ANDRADE, J. M.; DOS SANTOS PASSOS, C.; KIELING RUBIO, M. A.; MENDONÇA, J. N.; LOPES, N. P.; HENRIQUES, A. T. Combining in vitro and in silico approaches to evaluate the multifunctional profile of rosmarinic acid from *Blechnum brasiliense* on targets related to neurodegeneration. **Chem Biol Interact**. 254:135-45, 2016. doi: 10.1016/j.cbi.2016.06.005.
- AREAL, L. B.; HAMILTON, A.; MARTINS-SILVA, C.; PIRES, R. G. W.; FERGUSON, STEPHEN S. G. Neuronal scaffolding protein spinophilin is integral for cocaine-induced behavioral sensitization and ERK1/2 activation. **Molecular Brain**, v. 12, p. 15, 2019. doi:10.1186/s13041-019-0434-7.
- BAHLS, F.C.; BAHLS, S-C. Cocaína: origem, passado e presente. **Interação em Psicologia**, 6(2), 177-181, 2002
- BAIK, J. H. Stress and the dopaminergic reward system. **Exp Mol Med**. 2020 Dec;52(12):1879-1890. doi: 10.1038/s12276-020-00532-4. PMID: 33257725; PMCID: PMC8080624.
- BAIK, J. H. Dopamine signaling in reward-related behaviors. **Front Neural Circuits**. 2013 Oct 11;7:152. doi: 10.3389/fncir.2013.00152. PMID: 24130517; PMCID: PMC3795306.
- BAIMEL, C.; MCGARRY, L. M.; CARTER A. G. The Projection Targets of Medium Spiny Neurons Govern Cocaine-Evoked Synaptic Plasticity in the Nucleus Accumbens. **Cell Rep**. p 2256–2263, 2019. doi: 10.1016/j.celrep.2019.07.074.
- BEAULIEU, J. M., ESPINOZA, S, GAINETDINOV, R.R. Dopamine receptors - IUPHAR Review 13. **Br J Pharmacol**. 2015 Jan;172(1):1-23. doi: 10.1111/bph.12906. PMID: 25671228; PMCID: PMC4280963.
- BIONDICH, A.S., JOSLIN, J.D. Coca: The History and Medical Significance of an Ancient Andean Tradition. **Emerg Med Int**. 2016; 2016:4048764. doi:10.1155/2016/4048764
- BLANCO, E., PAVÓN, F. J., PALOMINO, A., LUQUE-ROJAS, M. J., SERRANO, A, RIVERA, P., BILBAO, A., ALEN, F., VIDA, M., SUÁREZ, J., RODRÍGUEZ DE

FONSECA, F. Cocaine-induced behavioral sensitization is associated with changes in the expression of endocannabinoid and glutamatergic signaling systems in the mouse prefrontal cortex. **Int J Neuropsychopharmacol.** 2014 Oct 31;18(1):pyu024. doi: 10.1093/ijnp/pyu024. Erratum in: *Int J Neuropsychopharmacol.* 2016 Apr 27;: PMID: 25539508; PMCID: PMC4368868.

BOTELHO E., CUNHA R., CAMPOS, A. and MALDANER, A. “Chemical Profiling of Cocaine Seized by Brazilian Federal Police in 2009-2012: Major Components”, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol. 25, n° 4.2014

BUFFALARI, D. M., SEE, R.E. Amygdala mechanisms of Pavlovian psychostimulant conditioning and relapse. **Curr Top Behav Neurosci.** 2010;3:73-99. doi:10.1007/7854_2009_18. PMID: 21161750.

BULGAKOV, V. P., INYUSHKINA, Y. V., FEDOREYEV, S. A. Rosmarinic acid and its derivatives: biotechnology and applications. **Crit Rev Biotechnol.** 2012 Sep;32(3):203-17. doi: 10.3109/07388551.2011.596804. Epub 2011 Aug 12. PMID: 21838541.

CAFFINO, L., GIANNOTTI, G., MESSA, G., MOTTARLINI, F., FUMAGALLI, F. Repeated cocaine exposure dysregulates BDNF expression and signaling in the mesocorticolimbic pathway of the adolescent rat. **World J Biol Psychiatry.** 2019 Sep;20(7):531-544. doi: 10.1080/15622975.2018.1433328. Epub 2018 Feb 21. PMID: 29380665.

CALIPARI, E. S.; FERRIS, M. J.; JONES, S. R. Extended access of cocaine self-administration results in tolerance to the dopamine-elevating and locomotor-stimulating effects of cocaine. **J Neurochem.** 128(2):224-32, 2014. doi: 10.1111/jnc.12452.

CALIPARI, E. S.; FERRIS, M. J.; ZIMMER, B. A.; ROBERTS, D. C.; JONES, S. R. Temporal pattern of cocaine intake determines tolerance vs sensitization of cocaine effects at the dopamine transporter. **Neuropsychopharmacology.** 38(12):2385-92, 2013. doi: 10.1038/npp.2013.136.

CAMERON, C. M. et al. Increased Cocaine Motivation Is Associated with Degraded Spatial and Temporal Representations in IL-NAc Neurons. **Neuron.** v.103, issue 1, p. 80-91, 2019. doi: 10.1016/j.neuron.2019.04.015.

CASTRO-ZAVALA, A., MARTÍN-SÁNCHEZ, A., LUJÁN, M. Á., VALVERDE, O. Maternal separation increases cocaine intake through a mechanism involving plasticity in glutamate signalling. **Addict Biol.** 2021 Mar;26(2):e12911. doi: 10.1111/adb.12911. Epub 2020 Apr 24. PMID: 32329565.

CHANG, W. H., LEE, I. H., CHI, M. H., ET AL. Prefrontal cortex modulates the correlations between brain-derived neurotrophic factor level, serotonin, and the autonomic nervous system. **Sci Rep.** 2018;8(1):2558. Published 2018 Feb 7. doi:10.1038/s41598-018-20923-y

CERNAT A., ȘTEFAN G., TERTIS M., CRISTEA C., SIMON I. An overview of the detection of serotonin and dopamine with graphene-based sensors. **Bioelectrochemistry.**

Dec;136:107620. 2020 doi: 10.1016/j.bioelechem.2020.107620. Epub 2020 Jul 27. PMID: 32791486.

CRAMER, S. C., SUR, M., DOBKIN, B. H., O'BRIEN, C., SANGER, T. D., TROJANOWSKI, J. Q., RUMSEY, J. M., HICKS, R., CAMERON, J., CHEN, D., CHEN, W. G., COHEN, L. G., DECHARMS, C., DUFFY, C. J., EDEN, G. F., FETZ, E. E., FILART, R., FREUND, M., GRANT, S. J., HABER, S., KALIVAS, P. W., KOLB, B., KRAMER, A. F., LYNCH, M., MAYBERG, H. S., MCQUILLEN, P. S., NITKIN, R., PASCUAL-LEONE, A., REUTER-LORENZ, P., SCHIFF, N., SHARMA, A., SHEKIM, L., STRYKER, M., SULLIVAN, E. V., VINOGRADOV, S. (2011) Harnessing neuroplasticity for clinical applications. **Brain** 134(Pt 6):1591–1609. doi:10.1093/brain/awr039

CHAN, B.; KONDO, K.; FREEMAN, M.; AYERS, C.; MONTGOMERY, J.; KANSAGARA, D.; Pharmacotherapy for Cocaine Use Disorder-a Systematic Review and Meta-analysis. **J Gen Intern Med.** 34(12):2858-2873, 2019. doi: 10.1007/s11606-019-05074-8.

CHOW, J. J; HOFFORD, R. S; BECKMANN, J. S.. Neuronal activity associated with cocaine preference: Effects of differential cocaine intake. *Neuropharmacology*. 184:108441, 2021. doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.108441.

DRAKE, L. R.; SCOTT, P. J. H. DARK Classics in Chemical Neuroscience: Cocaine. **ACS Chem Neurosci.** 9(10):2358-2372, 2018. doi: 10.1021/acscemneuro.8b00117.

DI CHIARA, G. Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. **Behav Brain Res** 2002;137:75-114

DORSZEWSKA, J.; KOWALSKA, M.; PRENDECKI, M.; PIEKUT, T.; KOZŁOWSKA, J.; KOZUBSKI, W. Oxidative stress factors in Parkinson's disease. **Neural Regen Res.** 16(7):1383-1391, 2016. doi: 10.4103/1673-5374.300980.

DUC, N. M., KIM, H. R., CHUNG, K.Y. Structural mechanism of G protein activation by G protein-coupled receptor. **Eur J Pharmacol.** 2015 Sep 15;763(Pt B):214-22. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.05.016..

EISENER-DORMAN, A. F.; GRABOWSKI-BOASE, L.; TARANTINO, L. M. Cocaine locomotor activation, sensitization and place preference in six inbred strains of mice. **Behav Brain Funct.**;7:29, 2011. doi: 10.1186/1744-9081-7-29.

EVVARDA, I., LEGLEYEB, S., TAÏROUA A. C. Composition, purity and perceived quality of street cocaine in France. **International Journal of Drugs Policy**, 2010.

FACHEL, F. N. S.; SCHUH, R. S.; VERAS, K. S.; BASSANI, V. L.; KOESTER, L. S.; HENRIQUES, A. T.; BRAGANHOL, E.; TEIXEIRA, H. F. An overview of the neuroprotective potential of rosmarinic acid and its association with nanotechnology-based delivery systems: A novel approach to treating neurodegenerative disorders. **Neurochem Int.** 122:47-58, 2019. doi:10.1016/j.neuint.2018.11.003.

FALLARINI, S., MIGLIO, G., PAOLETTI, T., MINASSI, A., AMORUSO, A., BARDELLI, C., BRUNELLESCHI, S., LOMBARDI, G. Clovamide and rosmarinic acid induce

neuroprotective effects in in vitro models of neuronal death. **Br J Pharmacol**. 2009 Jul;157(6):1072-84. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00213.x. Epub 2009 May 21. PMID: 19466982; PMCID: PMC2737666.

FARRELL, M. R., SCHOCH, H., MAHLER, S. V. Modeling cocaine relapse in rodents: Behavioral considerations and circuit mechanisms. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 2018 Dec 20;87(Pt A):33-47. doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.01.002. PMID: 29305936; PMCID: PMC6034989.

FAUTH, M., TETZLAFF, C. Opposing Effects of Neuronal Activity on Structural Plasticity. **Front Neuroanat**. 2016 Jun 28;10:75. doi: 10.3389/fnana.2016.00075. PMID: 27445713; PMCID: PMC4923203.

FATTINGER K., BENOWITZ N. L., JONES R. T., VEROTTA D. Nasal mucosal versus gastrointestinal absorption of nasally administered cocaine. **Eur J Clin Pharmacol**. 2000 Jul;56(4):305-10. doi:10.1007/s002280000147. PMID: 10954344.

FREEMAN, W. M., BREBNER, K., PATEL, K.M, LYNCH, W. J., ROBERTS, D. C., VRANA, K.E. Repeated cocaine self-administration causes multiple changes in rat frontal cortex gene expression. **Neurochem Res**. 2002 Oct;27(10):1181-92. doi: 10.1023/a:1020929526688. PMID: 12462416.

FREEMAN, W. M., LULL, M. E., PATEL, K. M., BRUCKLACHER, R. M, MORGAN, D., ROBERTS, D. C., VRANA, K. E. Gene expression changes in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens following abstinence from cocaine self-administration. **BMC Neurosci**. 2010 Feb 26;11:29. doi: 10.1186/1471-2202-11-29. PMID: 20187946; PMCID: PMC2837051.

FRANCIS, T. C.; GANTZ, S. C.; MOUSSAWI, K.; BONCI, A. Synaptic and intrinsic plasticity in the ventral tegmental area after chronic cocaine. **Curr Opin Neurobiol**. 54:66-72, 2019. doi: 10.1016/j.conb.2018.08.013.

FUMAGALLI, F., DI PASQUALE, L., CAFFINO, L., RACAGNI, G., RIVA, M. A. Repeated exposure to cocaine differently modulates BDNF mRNA and protein levels in rat striatum and prefrontal cortex. **Eur J Neurosci**. 2007 Nov;26(10):2756-63. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05918.x. PMID: 18001273.

GHAFFARI, H., VENKATARAMANA, M., JALALI GHASSAM, B., CHANDRA NAYAKA, S., NATARAJU, A., GEETHA, N. P., PRAKASH, H. S. Rosmarinic acid mediated neuroprotective effects against H₂O₂-induced neuronal cell damage in N2A cells. **Life Sci**. 2014 Sep 15;113(1-2):7-13. doi: 10.1016/j.lfs.2014.07.010. Epub 2014 Jul 21. PMID: 25058919.

GHASEMZADEH RAHBARDAR, M.; HOSSEINZADEH, H. Effects of rosmarinic acid on nervous system disorders: an updated review. **Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol**. 393(10):1779-1795, 2020. doi: 10.1007/s00210-020-01935-w.

GRINSPUN, N., FUENTEALBA, Y., FALCON, R., VALDÉS, J. L. c-Fos expression in the

ascending arousal system induced by physical exercise in rats: Implication for memory performance. **Brain Res.** 2019 Nov 15;1723:146376. doi:10.1016/j.brainres.2019.146376. Epub 2019 Aug 10. PMID: 31408622.

HABTEMARIAM, S. Molecular Pharmacology of Rosmarinic and Salvianolic Acids: Potential Seeds for Alzheimer's and Vascular Dementia Drugs. **Int J Mol Sci.** 19(2):458, 2018. doi: 10.3390/ijms19020458.

HASE, T., SHISHIDO, S., YAMAMOTO, S. ET AL. Rosmarinic acid suppresses Alzheimer's disease development by reducing amyloid β aggregation by increasing monoamine secretion. *Sci Rep* 9, 8711, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45168-1>

HEARING, M. C., MILLER, S. W., SEE, R. E., MCGINTY, J. F. Relapse to cocaine seeking increases activity-regulated gene expression differentially in the prefrontal cortex of abstinent rats. **Psychopharmacology** (Berl). 2008 May;198(1):77-91. doi: 10.1007/s00213-008-1090-2. Epub 2008 Mar 3. PMID: 18311559; PMCID: PMC5440231.

ISENSCHMID, D. S. Cocaine. In: Levine, B. (ed.). **Principles of Forensic Toxicology.** 3^a ed. New York, AACCC Press, pp. 245-268, 2010.

JIN, X., LIU, P., YANG, F., ZHANG, Y. H., MIAO, D. (2013) Rosmarinic acid ameliorates depressive-like behaviors in a rat model of CUS and upregulates BDNF levels in the hippocampus and hippocampal-derived astrocytes. **Neurochem Res** 38:1828–1837

KAMPMAN, K. M. The treatment of cocaine use disorder. **Sci Adv.** 16;5(10), 2019. doi:10.1126/sciadv.aax1532.

KNAB, A. M., LIGHTFOOT, J. T. Does the difference between physically active and couch potato lie in the dopamine system? **Int J Biol Sci.** 2010 Mar 9;6(2):133-50. doi: 10.7150/ijbs.6.133. PMID: 20224735; PMCID: PMC2836544.

KUFAHL, P. R., PEARTREE, N. A., HEINTZELMAN, K. L., CHUNG, M., NEISEWANDER, J. L. Region-specific effects of isoflurane anesthesia on Fos immunoreactivity in response to intravenous cocaine challenge in rats with a history of repeated cocaine administration. **Brain Res.** 2015 Jan 12;1594:256-66. doi: 10.1016/j.brainres.2014.10.027. Epub 2014 Oct 22. PMID: 25451087; PMCID: PMC4805112.

LEAL, G., BRAMHAM, C. R., DUARTE, C. B. BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity. **Vitam Horm.** 2017;104:153-195. doi: 10.1016/bs.vh.2016.10.004. Epub 2016 Nov 29. PMID: 28215294.

LERNER T. N., HOLLOWAY A. L., SEILER J. L. Dopamine, Updated: Reward Prediction Error and Beyond. **Curr Opin Neurobiol.** 2021 Apr;67:123-130. doi: 10.1016/j.conb.2020.10.012. Epub 2020 Nov 14. PMID: 33197709; PMCID: PMC8116345.

LI, Y. J., XU, M., GAO, Z. H., WANG, Y. Q., YUE, Z., ZHANG, Y. X., LI, X. X., ZHANG, C., XIE, S. Y., WANG, P. Y. Alterations of serum levels of BDNF-related miRNAs in patients with depression. **PLoS One.** 2013 May 21;8(5):e63648. doi: 10.1371/journal.pone.0063648.

PMID: 23704927; PMCID: PMC3660391.

LIU, C. L., WANG, Y. K., JIN, G. Z., SHI, W. X., GAO, M. Cocaine-induced locomotor sensitization associates with slow oscillatory firing of neurons in the ventral tegmental area. **Sci Rep.** 2018 Feb 19;8(1):3274. doi: 10.1038/s41598-018-21592-7. PMID: 29459754; PMCID: PMC5818474.

LU, B., NAGAPPAN, G., LU, Y. BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. **Handb Exp Pharmacol.** 2014; 220:223–250. DOI: 10.1007/978-3-642-45106-5_9

LULL, M. E., FREEMAN, W. M., VRANA, K.E, MASH, D.C. Correlating human and animal studies of cocaine abuse and gene expression. **Ann N Y Acad Sci.** 2008 Oct;1141:58-75. doi: 10.1196/annals.1441.013. PMID: 18991951.

MACHADO, D. G., BETTIO, L. E. B., CUNHA, M. P., CAPRA, J. C., DALMARCO, J. B., PIZZOLATTI, M. G., ET AL. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** 2009; 33:642-650.

MARKEL, H. Über Coca: Sigmund Freud, Carl Koller, and Cocaine. **JAMA.** 305(13):1360–1361. doi:10.1001/jama.2011.394, 2011.

MATTSON, B. J., BOSSERT, J. M., SIMMONS, D. E., NOZAKI, N., NAGARKAR, D., KREUTER, J. D., HOPE, B. T. Cocaine-induced CREB phosphorylation in nucleus accumbens of cocaine-sensitized rats is enabled by enhanced activation of extracellular signal-related kinase, but not protein kinase A. **J Neurochem.** 2005 Dec;95(5):1481-94. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03500.x. Epub 2005 Oct 7. PMID: 16219028.

MCCLUNG, C. A., NESTLER, E. J. Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and DeltaFosB. **Nat Neurosci.** 2003 Nov;6(11):1208-15. doi: 10.1038/nn1143. Epub 2003 Oct 19. PMID: 14566342.

MEISER, J.; WEINDL, D.; HILLER, K. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun Signal.* 11(1):34, 2013. doi: 10.1186/1478-811X-11-34.

MILLER, J. S., TALLARIDA, R. J., UNTERWALD, E. M. Cocaine-induced hyperactivity and sensitization are dependent on GSK3. **Neuropharmacology.** 2009 Jun;56(8):1116-23. doi: 10.1016/j.neuropharm.2009.03.006. Epub 2009 Mar 27. PMID: 19328817; PMCID: PMC2721824.

NIDA – National Institute on Drug Abuse. Cocaine: Abuse and Addiction. **Research Report.** Number 99-4342, 2004.

NESTLER E. J. The neurobiology of cocaine addiction. **Sci Pract Perspect.** 3(1):4-10, 2005. doi: 10.1151/spp05314.

NESTLER, E. J. Transcriptional mechanisms of drug addiction. **Clin Psychopharmacol**

Neurosci. 2012;10(3):136-143. doi:10.9758/cpn.2012.10.3.136

OLGUÍN, H. J. et al. The role of dopamine and its dysfunction as a consequence of oxidative stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 9730467, 2016. doi:10.1155/2016/9730467.

PREEDY, V. R. The Neuroscience of Cocaine: Mechanisms and Treatment. United Kingdom, ed. **Elsevier Inc.**, p. 205-2017, 2017.

PRESTI-SILVA, S. M.; MARTINS-SILVA, C.; PIRES, R. G. W., **Efeitos do tratamento com ácido rosmarínico em parâmetros bioquímicos e motores em modelo pré-clínico da Doença de Parkinson**. Dissertação – Programa de Pós Graduação em Farmacologia e Bioquímica da Universidade Federal do Espírito Santo, 201.

PITTS, E. G., TAYLOR, J. R., GOURLEY, S. L. Prefrontal cortical BDNF: A regulatory key in cocaine- and food-reinforced behaviors. **Neurobiol Dis.** 2016 Jul;91:326-35. doi: 10.1016/j.nbd.2016.02.021. Epub 2016 Feb 26. PMID: 26923993; PMCID: PMC4913044.

RAHBARDAR, M.G.; AMIN, B.; MEHRI, S.; MIRNAJAFI-ZADEH, S.J.; HOSSEINZADEH, H. Rosmarinic acid attenuates development and existing pain in a rat model of neuropathic pain: An evidence of anti-oxidative and anti-inflammatory effects. **Phytomedicine**, v40, 59–67, 2018. doi: 10.1016/j.phymed.2018.01.001

REGUILÓN, M. D., MONTAGUD-ROMERO, S., FERRER-PÉREZ, C., ROGER-SÁNCHEZ, C., AGUILAR, M.A., MIÑARRO, J., RODRÍGUEZ-ARIAS, M. Dopamine D2 receptors mediate the increase in reinstatement of the conditioned rewarding effects of cocaine induced by acute social defeat. **Eur J Pharmacol.** 2017 Mar 15;799:48-57. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.01.039.

REIS, A. Sigmund Freud (1885-1939) and Karl Koller (1857-1944) and the Discovery of Local Anesthesia. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, Vol 59, 244-257, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0034-70942009000200013>

ROSÁRIO, B. D. A., DE NAZARÉ, M. F. S., ESTADELLA D., RIBEIRO D. A., VIANA M. B. Behavioral and neurobiological alterations induced by chronic use of crack cocaine. **Rev Neurosci.** Dec 18;31(1):59-75. doi: 10.1515/revneuro-2018-0118, 2019. PMID: 31129656.

ROY, D.; MUKHOPADHYAY, S. Enhanced rosmarinic acid production in cultured plants of two species of *Mentha*. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 50, n. 11, p. 817-25, 2012

SADRI-VAKILI, G., KUMARESAN, V., SCHMIDT, H. D., FAMOUS, K. R., CHAWLA, P., VASSOLER, F. M., OVERLAND, R. P., XIA, E., BASS, C. E., TERWILLIGER, E. F., PIERCE, R. C., CHA, J. H. Cocaine-induced chromatin remodeling increases brain-derived neurotrophic factor transcription in the rat medial prefrontal cortex, which alters the reinforcing efficacy of cocaine. **J Neurosci.** 2010 Sep 1;30(35):11735-44. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2328-10.2010. PMID: 20810894; PMCID: PMC2943400.

SAEEDI, M.; RASHIDY-POUR, A. Association between chronic stress and Alzheimer's

disease: Therapeutic effects of Saffron. **Biomed Pharmacother.** 133:110995, 2021. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110995.

SALTAS, D. et al. Determination of Rosmarinic Acid in Lamiaceae Herbs Using Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy (DRIFTS) and 55 Chemometrics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 61, n. 13, p. 3235- 41, 2013.

SAMMUT S., WEST A. R. Acute cocaine administration increases NO efflux in the rat prefrontal cortex via a neuronal NOS-dependent mechanism. **Synapse.** 2008 Sep;62(9):710-3. doi: 10.1002/syn.20537. PMID: 18566976.

SEE, R. E. Neural substrates of cocaine-cue associations that trigger relapse. **Eur J Pharmacol.** 2005 Dec 5;526(1-3):140-6. doi: 10.1016/j.ejphar.2005.09.034. PMID: 16253228.

SERAFINI, R. A., PRYCE, K. D., ZACHARIOU, V. The Mesolimbic Dopamine System in Chronic Pain and Associated Affective Comorbidities. **Biol Psychiatry.** 2020 Jan 1;87(1):64-73. doi: 10.1016/j.biopsych.2019.10.018. PMID: 31806085; PMCID: PMC6954000.

SMITH, D. "Hail Mariani: the transformation of Vin Mariani from Medicine to Food in American Culture, 1886-1910," **Social History of Alcohol and Drugs** 23/1, Fall 2008: 42-57. Coca wine.

SOARES-SIMI, S. L., PASTRELLO, D. M., FERREIRA, Z. S., YONAMINE, M., MARCOURAKIS, T., SCAVONE, C., & CAMARINI, R. (2013). Changes in CREB activation in the prefrontal cortex and hippocampus blunt ethanol-induced behavioral sensitization in adolescent mice. **Frontiers in integrative neuroscience**, 7, 94. <https://doi.org/10.3389/fnint.2013.0009>

SOLINAS, M.; BELUJON, P.; FERNAGUT, P. O.; JABER, M.; THIRIET, N. Dopamine and addiction: what have we learned from 40 years of research. *J Neural Transm (Vienna)*. 126(4):481-516, 2019. doi: 10.1007/s00702-018-1957-2.

SUN, W. L., COLEMAN, N. T., ZELEK-MOLIK, A., BARRY, S. M., WHITFIELD, T. W. J. R., MCGINTY, J. F. Relapse to cocaine-seeking after abstinence is regulated by cAMP-dependent protein kinase A in the prefrontal cortex. **Addict Biol.** 2014 Jan;19(1):77-86. doi: 10.1111/adb.12043. Epub 2013 Mar 6. PMID: 23461423; PMCID: PMC4110897.

SWEATT, J. D. Neural plasticity and behavior - sixty years of conceptual advances. **J Neurochem.** 2016 Oct;139 Suppl 2:179-199. doi: 10.1111/jnc.13580. PMID: 26875778.

TARRANT, M. K., & COLE, P. A. The chemical biology of protein phosphorylation. **Annual review of biochemistry.** 2009, 78, 797–825. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.070907.103047>

TEUNS, G. Assessing Physical Dependence. **Nonclinical Assessment of Abuse Potential**

for **New Pharmaceuticals**, 2015. 101–127. doi:10.1016/b978-0-12-420172-9.00005-9

TURRIGIANO, G. G. (2008) The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell* 135(3):422–435. doi:10.1016/j.cell.2008.10.008

Unidade de Pesquisa em álcool e Drogas (UNIAD), 2021.

UNODC, Cocaine – a spectrum of products, **Cocaine Insights 2**, UNODC, Vienna, October 2021.

VADASZ, C., GYETVAI, B. M. Cocaine-Induced Sensitization is Linked to Distal Chromosome 6 Region in Congenic Mouse Model. **Drug Alcohol Depend.** 2020 Oct 1;215:108185. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2020.108185. Epub 2020 Jul 23. PMID: 32768991; PMCID: PMC7502495

VALZACHI, M. C., TEODOROV, E., MARCOURAKIS, T., BAILEY, A., CAMARINI, R. Enhancement of behavioral sensitization, anxiety-like behavior, and hippocampal and frontal cortical CREB levels following cocaine abstinence in mice exposed to cocaine during adolescence. **PLoS One.** 2013 Oct 21;8(10):e78317. doi: 10.1371/journal.pone.0078317. PMID: 24205196; PMCID: PMC3804566.

VANDERSCHUREN, L. J, KALIVAS, P. W. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. **Psychopharmacology** (Berl). 2000 Aug;151(2-3):99-120. doi: 10.1007/s002130000493. PMID: 10972458.

VEZINA, P, LEYTON, M. Conditioned cues and the expression of stimulant sensitization in animals and humans. **Neuropharmacology.** 2009;56 Suppl 1(Suppl 1):160-8. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.06.070. Epub 2008 Jul 9. PMID: 18657553; PMCID: PMC2635339.

VON BERNHARDI, R., BERNHARDI, L. E., EUGENÍN, J. What Is Neural Plasticity? **Adv Exp Med Biol.** 2017;1015:1-15. doi: 10.1007/978-3-319-62817-2_1. PMID: 29080018.

VOLKOW, N. D, MICHAELIDES, M., BALER, R. The Neuroscience of Drug Reward and Addiction. **Physiol Rev.** 2019 Oct 1;99(4):2115-2140. doi: 10.1152/physrev.00014.2018. PMID: 31507244; PMCID: PMC6890985.

XIA, Q.-P., CHENG, Z.-Y., & HE, L. The modulatory role of dopamine receptors in brain neuroinflammation. **International Immunopharmacology**, 76, 105908. 2019 doi:10.1016/j.intimp.2019.105908

WANG, J.; XU, H.; JIANG, H; DU, X.; SUN, P. ; XIE, J. Neurorescue effect of rosmarinic acid on 6-hydroxydopamine-lesioned nigral dopamine neurons in rat model of Parkinson's disease. **J Mol Neurosci** v:47 p. 113–119, 2012. doi:10.1007/s12031-011-9693-1

WANG S, LIAN G. ROS and diseases: role in metabolism and energy supply. **Mol Cell Biochem.** 467(1-2):1-12, 2020. doi: 10.1007/s11010-019-03667-9.

WALKER, D. M., CATES, H. M., LOH, Y. E., PURUSHOTHAMAN, I., RAMAKRISHNAN, A., CAHILL, K. M., LARDNER, C.K., GODINO, A., KRONMAN, H. G., RABKIN, J., LORSCH, Z. S., MEWS, P., DOYLE, M. A., FENG, J., LABONTÉ, B., KOO, J. W., BAGOT, R. C., LOGAN, R.W., SENEY, M. L., CALIPARI, E. S., SHEN, L., NESTLER, E. J. Cocaine Self-administration Alters Transcriptome-wide Responses in the Brain's Reward Circuitry. **Biol Psychiatry**. 2018 Dec 15;84(12):867-880. doi: 10.1016/j.biopsych.2018.04.009. PMID: 29861096; PMCID: PMC6202276.

WEISS, F. Neurobiology of craving, conditioned reward and relapse. **Curr Opin Pharmacol**. 2005 Feb;5(1):9-19. doi: 10.1016/j.coph.2004.11.001. PMID: 15661620.

WISE, R. A. "Dopamine and reward: the anhedonia hypothesis 30 years on." **Neurotoxicity research** vol. 14,2-3 (2008): 169-83. doi:10.1007/BF03033808

WORHUNSKY, P. D., ANGARITA, G. A., ZHAI, Z. W., MATUSKEY, D., GALLEZOT, J. D., MALISON, R. T., CARSON, R. E, POTENZA, M. N. Multimodal investigation of dopamine D2/D3 receptors, default mode network suppression, and cognitive control in cocaine-use disorder. **Neuropsychopharmacology**. 2021 Jan;46(2):316-324. doi: 10.1038/s41386-020-00874-7.

World Drug Report 2021 (United Nations publication, Sales No. E.21.XI.8).

YANG, M., MA, H., JIA, M., LI, Y., MIAO, D., CUI, C., WU, L. The role of the nucleus accumbens OXR1 in cocaine-induced locomotor sensitization. **Behav Brain Res**. 2020 Feb 3;379:112365. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112365. Epub 2019 Nov 16. PMID: 31743729.

ZACCA, J. J., BOTELHO, É. D., VIEIRA, M. L., ALMEIDA, F. L. A., FERREIRA, L. S., & MALDANER, A. O. Brazilian Federal Police drug chemical profiling — The **PeQui Project**. **Science & Justice**, 54(4), 300–306. 2014 doi:10.1016/j.scijus.2014.02.008

ZHANG, Y., ZHU, X., HUANG, C., ZHANG, X. Molecular changes in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens are associated with blocking the behavioral sensitization to cocaine. **Sci Rep**. 2015 Nov 5;5:16172. doi: 10.1038/srep16172. PMID: 26538265; PMCID: PMC4633640.

ZHOU, Y., ZHU, H., LIU, Z., CHEN, X., SU, X., MA, C., ET AL. A ventral CA1 to nucleus accumbens core engram circuit mediates conditioned place preference for cocaine. **Nat. Neurosci**. 22, 1986–1999, 2019. doi: 10.1038/s41593-019-0524-y