

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Laura Hautrive Milanesi

**MODULAÇÃO DOPAMINÉRGICA E GLUTAMATÉRGICA NA  
RECAÍDA POR MORFINA EM RATOS: INFLUÊNCIA DA DIETA  
E DE FÁRMACOS NANOPARTICULADOS**

Santa Maria, RS  
2021

**Laura Hautrive Milanesi**

**MODULAÇÃO DOPAMINÉRGICA E GLUTAMATÉRGICA NA RECAÍDA  
POR MORFINA EM RATOS: INFLUÊNCIA DA DIETA E DE FÁRMACOS  
NANOPARTICULADOS**

Defesa de Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para obtenção do título de **Doutor em Farmacologia.**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marilise Escobar Burger

Santa Maria, RS  
2021

Milanesi, Laura Hautrive  
MODULAÇÃO DOPAMINÉRGICA E GLUTAMATÉRGICA NA RECAÍDA POR  
MORFINA EM RATOS: INFLUÊNCIA DA DIETA E DE FÁRMACOS  
NANOPARTICULADOS / Laura Hautrive Milanesi.- 2021.  
90 p.; 30 cm

Orientador: Marilise Escobar Burger  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Farmacologia, RS, 2021

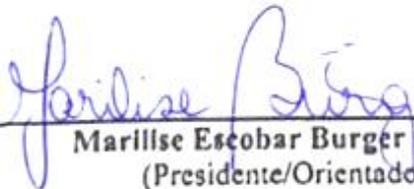
1. Opióide 2. Drogadição 3. Dieta 4. Topiramato 5.  
Ácido Ferulico I. Escobar Burger, Marilise II. Título.

Laura Hautrive Milanesi

**MODULAÇÃO DOPAMINÉRGICA E GLUTAMATÉRGICA NA RECAÍDA  
POR MORFINA EM RATOS: INFLUÊNCIA DA DIETA E DE FÁRMACOS  
NANOPARTICULADOS**

Defesa de Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para obtenção do título de **Doutor em Farmacologia**.

Aprovada em 30 de setembro de 2021



Marilise Escobar Burger (UFSM)  
(Presidente/Orientadora)



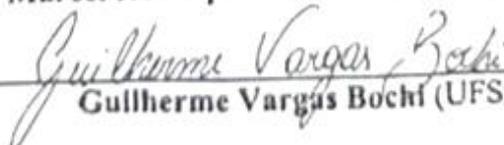
Lucielli Savegnago (UFPEL)



Cesar Augusto Bruning (UFPEL)



Marcel Henrique Marcondes Sarl (IDEAU)



Guilherme Vargas Bochi (UFSM)

Santa Maria, RS  
2021

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo que alcancei até o presente momento, por todas as portas que me foram abertas, pelas pessoas maravilhosas que Ele colocou em minha vida e por todo o aprendizado.

À Capes pela bolsa de estudos, ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e em especial ao programa CAPES-PRInt que me permitiu realizar o Doutorado Sanduíche.

À UFSM por ter sido minha casa por 11 anos. Tenho muito orgulho de ter sido tanto tempo aluna desta instituição.

À família, meu pai Derli, minha mãe Cleuza e minha irmã Louize, que batalharam junto comigo para concretizar esta etapa e que sempre estiveram ao meu lado. Muito obrigada por vocês existirem e me apoiarem em todos os momentos da minha vida.

Ao meu namorado Guillermo, por todo o amor, carinho e paciência, que mesmo longe sempre esteve presente me incentivando e me dando forças para chegar até aqui!

À minha grande e querida Professora Orientadora Marilise Escobar Burger que sempre acreditou em mim, sempre esteve ao meu lado e que me ensinou muito além de farmacologia. Muito obrigada pela oportunidade de ter sido sua aluna, pelo incentivo, pelo carinho, compreensão e por ter me ensinado tanto!!

À todos os colegas do FARMATOX, por serem grandes companheiros de trabalho, por me auxiliarem em todos os experimentos e me ajudarem a crescer. Todo este trabalho não teria sido realizado sem a ajuda e apoio de todos!!

Ao instituto Cajal e a Dra. Rosário Moratalla por ter me recebido em seu laboratório em Madrid durante o doutorado sanduíche e por todos os colegas de laboratório que lá acompanhei: Noélia, Adrián, Paco, Mônica, Oscar, Samuel, Patricia, Helena, Victória, Irene, Cris e Guiomar, muito obrigada pelo acolhimento e pelo carinho recebido!

À secretária da Pós-graduação em Farmacologia, Zeli Carvalho, pela disponibilidade e auxílio nos processos burocráticos.

À todos os docentes do Programa de Pós-graduação em Farmacologia que contribuíram para a minha formação, meu agradecimento.

À todos que de alguma forma contribuíram e participaram da realização deste trabalho. Meu sincero muito obrigada!

## RESUMO

# MODULAÇÃO DOPAMINÉRGICA E GLUTAMATÉRGICA NA RECAÍDA POR MORFINA EM RATOS: INFLUÊNCIA DA DIETA E DE FÁRMACOS NANOPARTICULADOS

AUTORA: Laura Hautrive Milanesi

ORIENTADORA: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marilise Escobar Burger

A morfina, além de fármaco analgésico também apresenta alto potencial aditivo relacionado à neuroadaptações das vias dopaminérgica e glutamatérgica, além do aumento de eventos oxidativos na área mesocorticolímbica, o que caracteriza a drogadição. Os tratamentos disponíveis para esta patologia apresentam limitações, pois atuam apenas na retirada da droga, sem prevenir a recaída. As funções neurais podem ser modificadas pelos constituintes da dieta, especialmente pelo tipo de ácido graxo (AG) consumido, a influência da suplementação de gorduras presentes na dieta mediterrânea (DM, rica em ômega-3) e nas dietas ocidentais (DOs: óleo de palma-OP e gordura interesterificada-GI) sobre as propriedades aditivas da morfina foi avaliada. Ratos machos foram submetidos ao protocolo de preferência de lugar condicionado (PLC) com morfina (4mg/Kg, i.p.), seguido de avaliações comportamentais de preferência, abstinência e recaída à droga e subsequente eutanásia para análises moleculares. O consumo das DOs aumentou parâmetros de ansiedade *per se*, sensibilização locomotora e recaída à droga, o que não foi observado com a DM. Em nível molecular, as DOs aumentaram a imunoreatividade do receptor glicocorticoide no córtex-frontal, do transportador de dopamina (DAT) e receptor dopaminérgico tipo 2 (D2R) no núcleo accumbens (NAc), reduzido a imunoreatividade do D1R na mesma área. A partir destas evidências é importante enfatizar que o consumo de DOs facilita comportamentos de recaída à morfina, o que pode dificultar a desintoxicação de opioides. Sabe-se que o uso crônico de opioides pode modificar a neurotransmissão glutamatérgica bem como a hedonia evocada pela maior liberação de dopamina, favorecendo a geração de danos oxidativos. Tais dados conduziram o desenvolvimento de dois protocolos subsequentes: avaliação do antagonista glutamatérgico topiramato em sua forma livre (S-TPM, 0.5mg/Kg, i.p.) e nanoencapsulada (TPM-CS-NP, 0.57mg/Kg, i.p.), e avaliação do antioxidante ácido ferúlico, em sua forma livre (F-FA, 0.5mg/Kg, v.o) e nanoencapsulada (FA-Nc, 0.5mg/Kg, v.o.), frente à recaída à morfina. Tratamentos com TPM-CS-NP e FA-Nc preveniram a recaída à droga, preservando a memória, a qual foi prejudicada pela morfina e pelo S-TPM. No protocolo do TPM, a morfina aumentou a imunoreatividade de D1R, D2R, D3R, DAT, GluA1 e MOR no NAc e de D1R, DAT, GluA1 e MOR no hipocampo dorsal, enquanto o TPM-CS-NP diminuiu os níveis de D1R, D3R e GluA1 e aumentou DAT no NAc, diminuiu GluA1 e aumentou D2 e DAT no hipocampo dorsal, prevenindo a recaída à droga e protegendo a memória, o que indica a superioridade terapêutica desta nanoformulação. No protocolo do AF, a morfina aumentou os níveis de D1R, D3R, DAT,  $\Delta$ FosB no NAc, enquanto o FA-Nc diminuiu D1R, D3R e  $\Delta$ FosB e aumentou D2R, DAT e NRF2 no NAc, prevenindo a recaída à droga, indicando um papel neuroprotetor desta nanoformulação. A drogadição por morfina é multifatorial podendo ser evitada através de um consumo de DM, bem como prevenida através de tratamentos com nanopartículas de TPM e AF durante a abstinência.

**Palavras-chave:** Opioides, Drogadição, Dieta, Topiramato, Ácido Ferúlico.

## ABSTRACT

### **DOPAMINERGIC AND GLUTAMATERGIC MODULATION IN MORPHINE REINSTATEMENT IN RATS: INFLUENCE OF DIET AND NANOPARTICULATED DRUGS**

AUTHOR: Laura Hautrive Milanese

ADVISOR: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilise Escobar Burger

Morphine, in addition to being an analgesic drug, also has a high addictive potential related to neuroadaptations of the dopaminergic and glutamatergic pathways, in addition to the increase in oxidative events in the mesocorticolimbic area, which characterizes drug addiction. The treatments available for this pathology have limitations, as they act only in drug withdrawal, without preventing relapse. Neural functions can be modified by dietary constituents, especially by the type of fatty acid (FA) consumed, the influence of supplementation of fats present in the Mediterranean diet (MD, rich in omega-3) and in Western diets (WDs: palm oil -PO and interesterified fat-IF) on the addictive properties of morphine was evaluated. Male rats were submitted to the Conditioned Place Preference (CPP) protocol with morphine (4mg/Kg, i.p.), followed by behavioral assessments of preference, abstinence and drug relapse and subsequent euthanasia for molecular analysis. The consumption of WDs increased parameters of anxiety per se, locomotor sensitization and drug relapse, which was not observed with MD. At the molecular level, the WDs increased the immunoreactivity of the glucocorticoid receptor in the frontal cortex, of the dopamine transporter (DAT) and type 2 dopaminergic receptor (D2R) in the nucleus accumbens (NAc), reducing the immunoreactivity of D1R in the same area. Based on this evidence, it is important to emphasize that the consumption of WDs facilitates morphine reinstatement, which can make opioid detoxification more difficult. It is known that the chronic use of opioids can modify the glutamatergic neurotransmission as well as the hedonia evoked by the increased release of dopamine, favoring the generation of oxidative damage. These data led to the development of two subsequent protocols: evaluation of the glutamatergic antagonist topiramate in its free (S-TPM, 0.5mg/Kg, ip) and nanoencapsulated (TPM-CS-NP, 0.57mg/Kg, ip), and evaluation of the antioxidant ferulic acid, in its free form (F-FA, 0.5mg/Kg, po) and nanoencapsulated (FA-Nc, 0.5mg/Kg, po), against morphine reinstatement. Treatments with TPM-CS-NP and FA-Nc prevented drug relapse, preserving memory, which was impaired by morphine and S-TPM. In the TPM protocol, morphine increased the immunoreactivity of D1R, D2R, D3R, DAT, GluA1 and MOR in NAc and of D1R, DAT, GluA1 and MOR in the dorsal hippocampus, while TPM-CS-NP decreased the levels of D1R, D3R and GluA1 and increased DAT in NAc, decreased GluA1 and increased D2 and DAT in dorsal hippocampus, preventing drug relapse and protecting memory, which indicates the therapeutic superiority of this nanoformulation. In the FA protocol, morphine increased the levels of D1R, D3R, DAT,  $\Delta$ FosB in the NAc, while the FA-Nc decreased D1R, D3R and  $\Delta$ FosB and increased D2R, DAT and NRF2 in the NAc, preventing relapse to the drug, indicating a neuroprotective role of this nanoformulation. Morphine drug addiction is multifactorial and can be avoided through a consumption of MD, as well as prevented through treatments with nanoparticles of TPM and FA during abstinence.

**Key words:** Opioids, Drug Addiction Diet, Topiramate, Ferulic acid.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
ALA	Ácido alfa-linolênico
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AF	Ácido ferúlico
AG	Ácido graxo
AGE	Ácido graxo essencial
AGPI	Ácido graxo poliinsaturado
AGS	Ácido graxo saturado
AGT	Ácido graxo <i>trans</i>
AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ATV	Área tegumental ventral
CORT	Corticosterona
D1R	Receptor dopaminérgico 1
D2R	Receptor dopaminérgico 2
D3R	Receptor dopaminérgico 3
DAT	Transportador de dopamina
DHA	Ácido decosaheptaenóico
EPA	Ácido eicosapentaenóico
GI	Gordura interesterificada
HLC	Hormônio liberador de corticotrofina
HPA	Hipotálamo pituitária adrenal
LA	Ácido linoleico
MOR	Receptor opioide $\mu$
NAC	Núcleo accumbens
NMDA	N-metil D-aspartato
NRF2	Fator Nuclear Eritroide 2
OP	Óleo de palma
PLC	Preferência de lugar condicionada
RG	Receptor de glicocorticoide
SNC	Sistema nervoso central
TG	Triacilglicerol

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Sistema dopaminérgico e distribuição de receptores de dopamina no cérebro .....	16
Figura 2 - Reação química dos triacilgliceróis .....	23
Figura 3 – Via metabólica dos ácidos graxos essenciais n-6 e n-3 .....	24
Figura 4 – Triacilgliceróis do óleo de palma .....	27
Figura 5 – Processo de interesterificação entre os triacilgliceróis .....	29

### MANUSCRITO CIENTÍFICO

Figure 1 - Chemical compost of ferulic acid. ....	45
Figure 2 - Experimental design. ....	46
Figure 3 - MORPH preference (CPP) (A) MORPH-preference extinction 3 (B) and MORPH-preference reinstatement in CPP (C): Influence of the FA treatments. ....	50
Figure 4 - Influence of FA treatments in morphine conditioned rats on the novel object recognition test (NORT) .....	51
Figure 5 - Influence of morphine exposure and FA treatments on the immunoreativity of $\Delta$ FosB (A) and <i>NRF2</i> (B) in the NAc .....	52
Figure 6 - Influence of morphine exposure and FA treatments on the immunoreativity of D1R (A), D2R (B), D3R (C) and DAT (D) in the NAc .....	53

### CONCLUSÃO

Figura 6 – Resumo gráfico dos resultados apresentados na tese .....	67
---	----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>DESENVOLVIMENTO</b> .....	14
2.1	Os opioides e o sistema dopaminérgico .....	14
2.2	Os opioides e o sistema glutamatérgico .....	17
2.3	Recaída à busca pelas drogas aditivas .....	20
2.4	Dieta e ácidos graxos .....	21
2.5	A dieta mediterrânea.....	23
2.6	As dietas ocidentais .....	26
2.7	Estresse, ácidos graxos e drogadição.....	30
2.8	Os ácidos graxos e o sistema dopaminérgico.....	31
2.9	Alvos farmacológicos para prevenção da recaída: Topiramato e Ácido Ferúlico .....	32
3.0	Nanotecnologia .....	34
3.1	Novas terapêuticas que envolvem nanoformulações .....	34
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	38
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	39
4.1	Objetivo Geral.....	39
4.2	Objetivos Específicos .....	39
<b>5</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO 1</b> .....	40
<b>6</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO 2</b> .....	40
<b>7</b>	<b>MANUSCRITO CIENTÍFICO</b> .....	40
<b>8</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	63
<b>9</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	66
<b>10</b>	<b>DOUTORADO SANDUÍCHE</b> .....	68
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	70
	<b>ANEXO A:</b> Carta de aprovação do Comitê de ética -1.....	89
	<b>ANEXO B:</b> Carta de aprovação do Comitê de ética -2.....	90

## APRESENTAÇÃO

Esta tese de doutorado está estruturada em seções dispostas da seguinte forma: **Introdução, Desenvolvimento, Objetivos, Artigo Científico 1 e 2, Manuscrito Científico, Discussão, Conclusões, Doutorado Sanduiche e Referências.**

Esta tese apresenta os métodos e resultados em dois artigos científicos na sessão **ARTIGO CIENTÍFICO 1 e 2**, e um manuscrito que se encontra na sessão **MANUSCRITO CIENTÍFICO**, o qual encontra-se na formatação da revista, para a qual o mesmo será submetido.

As **Referências** dizem respeito somente as citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO, DESENVOLVIMENTO e DISCUSSÃO** desta tese.

## 1. INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas duas décadas, o uso de drogas opioides, as quais são os fármacos analgésicos mais utilizados no mundo, aumentou em dores crônicas não-cancerosas e representou um número alarmante (MANCHIKANTI et al., 2012). Os opioides possuem um alto poder aditivo, semelhando a outras drogas psicoestimulantes uma vez que estimulam a transmissão dopaminérgica na região mesolímbica a qual desempenha um papel crítico na drogadição (HAGHPARAST et al., 2014). O maior obstáculo no tratamento da drogadição é a recaída e a busca pela droga após um período de detoxificação e abstinência (STRANG et al., 2020).

Já foi descrito na literatura que o estilo de vida, especialmente os hábitos alimentares, pode exercer influências significativas nas vias de recompensa relacionadas ao desenvolvimento e à manutenção da drogadição, no caso o sistema dopaminérgico (CARTER et al., 2016). Além de alterações dopaminérgicas na região mesolímbica, a recaída a opioides também se relaciona a alterações glutamatérgicas nesta região, especialmente aos receptores de ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiônico (AMPA) (HEARING et al., 2016). De modo semelhante a drogadição por morfina bem como sua recaída esta relacionada a maior geração de espécies reativas podendo levar a um dano oxidativo (ROBERTSON et al., 2009).

As gorduras consumidas são fontes de ácidos graxos essenciais (AGE), os quais compõem as membranas fosfolipídicas das células, incluindo as células do sistema nervoso central (COTMAN et al., 1969). Os AGE são classificados principalmente em duas famílias, ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) n-3 e n-6 (LAURITZEN et al., 2001). Atualmente as dietas consumidas (dieta ocidental), se caracterizam por um alto consumo de alimentos processados e pouco consumo de alimentos de origem natural, os quais possuem concentrações ideais de AGE, incluindo o n-3 (dieta mediterrânea) (CORDAIN et al., 2005).

Os alimentos processados apresentam altas quantidades de gordura como a gordura interesterificada (GI) como também altas concentrações de óleo de palma (OP), ricos em ácidos graxos saturados (AGS) e AGPI n-6 e baixo teor de n-3 (KANOSKI et al., 2011). Sabe-se que o consumo crônico de alimentos processados pode ocasionar a perda de AGE influenciando diretamente as propriedades de membrana das células como receptores, enzimas e canais iônicos, alterando a plasticidade sináptica e a neurotransmissão, incluindo a dopaminérgica (SONGUR et al., 2004). Atualmente não existem dados na literatura onde

demonstre o efeito do consumo crônico dessas gorduras sobre os parâmetros de drogadição a morfina.

Os AMPAR representam um papel importante na regulação dos mecanismos moleculares associados ao uso de opioides além de serem recrutados para a sinapse durante a formação da memória como a potenciação a longo prazo (long term potentiation-LTP) (PARK, 2018). A morfina aumenta a eficácia sináptica excitatória e também aumenta a liberação de glutamato pré-sináptica, refletindo assim um mecanismo adicional ao tráfego pós-sináptico de AMPARs (BAIMEL et al., 2015). Nesse sentido o efeito benéfico do bloqueio deste receptor, através do fármaco Topiramato (TPM) já foi demonstrado em transtornos de drogadição e entre outros distúrbios psiquiátricos como uso “extra-bula” (GUGLIERMO et al., 2015). No entanto o uso deste fármaco está associado a diversos efeitos colaterais especialmente efeitos cognitivos (BRANDT et al., 2015). Sendo assim a nanotecnologia desempenha um papel importante para a redução dos efeitos adversos de fármacos e uma melhor vetorização para o local de ação (ROCHA et al., 2016).

O transtorno de uso de opioides também está associado com a maior geração de estresse oxidativo devido a alta liberação de dopamina na fenda sináptica tornando-se suscetível a auto-oxidação (ROBERTSON et al., 2009). A partir disso, o uso de agentes antioxidantes já foi demonstrado possuir benefícios para a redução da drogadição (ZHOU; KALIVAS, 2008). Nesse sentido, o uso de ácido ferúlico, e atualmente sua forma nanoencapsulada, vem ganhando atenção por além de possuir propriedades antioxidantes já possuir atividade contra distúrbios do sistema nervoso central como Parkinson (ASKAR et al., 2019), Alzheimer (BENCHEKROUN et al., 2016) e depressão (XU et al., 2013). Porém até o momento a literatura carece de dados que demonstrem o efeito do uso de ácido ferúlico associado a nanotecnologia no distúrbio de uso de opioides.

Descobrir o possível mecanismo e a ligação da dieta à tendência ao abuso de drogas é de extrema importância visto que poderá resultar em uma estratégia de prevenção para um problema de saúde pública, bem como alertar sobre problemas relacionados à dieta consumida atualmente. Investigar possíveis alvos moleculares e novas estratégias farmacológicas para um distúrbio o qual possui tratamento limitado também é essencial para redução no número de recaídas a qual gera gastos para a saúde pública. O presente estudo investiga alguns mecanismos neurobiológicos evidentes que poderiam suportar a alta incidência de recaída ao uso de drogas após o período de abstinência, bem como investiga possíveis mecanismos de ação e tratamentos referentes, frente a recaída a opioide.

## 2. DESENVOLVIMENTO

### 2.1 Os opioides e o Sistema dopaminérgico

Entre os opioides, morfina, codeína, fentanil e a buprenorfina são considerados os analgésicos mais eficazes contra a dor pós-operatória e a do câncer (FRIDELL et al., 2019). Os opioides exercem seu efeito analgésico através da inibição da liberação de neurotransmissores como glutamato e substância P liberados pelo neurônio do gânglio dorsal ao nível da medula espinhal, e a nível cerebral através da ativação de proteínas G da subfamília Gi (inibitória), que inibem a adenilato ciclase e regulam canais iônicos pela ligação aos receptores opioides (KOOB, 2009). Peptídeos opioides e os seus receptores são expressos em todo o circuito neural além de regiões críticas como a região de recompensa, ou seja o sistema mesolímbico (MORALES et al., 2016). Existem três diferentes tipos de receptores opioides (MOR ( $\mu$ ), KOR ( $\kappa$ ) e DOR ( $\delta$ )) todos eles acoplados a uma proteína G inibitória (DHAWAN et al., 1996). Os opioides agonistas do receptor MOR e DOR têm ação, sobretudo, analgésica, sendo que o receptor MOR é o mais potente. Por outro lado, opioides agonistas do receptor DOR apresentam menos efeitos colaterais após longo período de uso. Enquanto o receptor KOR, é responsável por alguns comportamentos de alucinação e disforia (HENRIKSEN; WILLOCH, 2008).

A terapia com opioides continua sendo a estratégia mais comum para o tratamento da dor severa e crônica, principalmente na dor do câncer (DOWELL et al, 2016). Ao longo das últimas duas décadas, o uso de drogas opioides aumentou em dores crônicas não-cancerosas (MANCHIKANTI et al., 2012). Os opioides, apesar de serem um dos fármacos analgésicos mais utilizados no mundo, possuem um alto poder aditivo, semelhando a outras drogas psicoestimulantes (HYMAN et al., 2006; MILTON; EVERITT, 2012).

Nas últimas décadas, houve um aumento alarmante de pessoas com transtorno do uso de opioides (“Opioid use disorder”- OUD) com aproximadamente dois milhões de diagnósticos e, em 2017, a overdose de opioides foi declarada uma emergência nacional de saúde pública nos EUA (KLIMAS et al., 2019). Em 2017, os usuários de opioides no mundo são 56% mais altos que os estimado anteriormente (34,3 milhões) em 2016. Em 2017, havia cerca de 53,4 milhões de usuários de opioides, pessoas que usam opiáceos e pessoas que usam opioides prescritos para fins não médicos, dados que representam 1,1% da população mundial entre 15-64 anos de idade (UNODC 2019/WDR 2019).

De acordo com o Relatório Mundial de Drogas das Nações Unidas de 2019, o uso de opioides é responsável por dois terços das mortes atribuídas a transtornos por uso de drogas. Além disso, a dependência de opioides também está associada a excesso de morbidades e custos sociais (UNODC, 2019). Os usuários de opioides também experimentam uma alta taxa de overdose não fatal ou sobredosagem. A sobredosagem não fatal pode contribuir significativamente para a morbidade envolvida no transtorno do uso de opioides, o que inclui hipóxia cerebral, edema pulmonar, pneumonia e arritmia cardíaca, que podem resultar em hospitalizações prolongadas e danos cerebrais (WARNER-SMITH et al., 2002). As intervenções farmacêuticas para o transtorno de uso de opioides, metadona ou buprenorfina, atualmente são o tratamento de primeira linha, no entanto, elas têm uma eficácia limitada na contenção de episódios de recaída (MATTICK et al., 2014).

O distúrbio do uso de substâncias é classificado como uma doença crônica recorrente do sistema nervoso central (SNC), que leva a distúrbios de personalidade, comorbidades e morte (NESTLER et al., 2001). A dependência é um quadro caracterizado pelo conjunto de sintomas que indicam o uso compulsivo de uma ou mais substâncias, ou seja, é um comportamento que foge do controle do indivíduo (KOOB; Le MOAL, 2008). As substâncias psicoativas possuem um alto poder aditivo, levando o indivíduo adicto a perda do controle emocional e ao comportamento compulsivo, resultando em consequências sociais e sobre a saúde (MILTON; EVERITT, 2012).

Os opioides estimulam a transmissão dopaminérgica na região mesolímbica provocando mudanças que desempenha um papel crítico no desenvolvimento da drogadição e na regulação dos comportamentos de busca de drogas (HAGHPARAST et al., 2014; REISI et al., 2014). A administração de morfina aumenta a atividade de neurônios dopaminérgicos na via mesolímbica, aumentando a liberação de dopamina especialmente na estrutura cerebral chamada Nucleo Acumbens (NAc). Esse aumento de dopamina no NAc está relacionado a desinibição de neurônios dopaminérgicos através da ação da morfina sobre os receptores MOR localizados em interneurônios GABAérgicos na Área tegumental ventral (ATV) (MATTEWS; GERMAN, 1984).

A dopamina é fortemente implicada nos processos de aprendizagem e no comportamento de condicionamento às propriedades de reforço das drogas aditivas, sendo que a ativação deste sistema é o que leva ao desenvolvimento de drogadição (WISE, 2002). A atividade dos neurônios dopaminérgicos é fortemente regulada pela neurotransmissão excitatória glutamatérgica e inibitória gabaérgica, sendo que alterações na plasticidade destes

sistemas ocorrem desde a primeira exposição a drogas aditivas (BAIMEL; ORGLAND, 2015).

Os receptores de dopamina são amplamente expressos no cérebro humano. Os receptores de dopamina são receptores acoplados a proteína G (GPCR) e são classificados em duas famílias; O tipo D1R (D1 e D5), que medeiam as ações excitatórias (acoplados a proteína Gs), e o tipo D2R (D2, D3 e D4), que controla os efeitos inibitórios (Acoplados a proteína Gi). Apesar de possuírem ações opostas, os receptores D1 (D1R) e D3 (D3R) frequentemente co-localizam ou formam heterodímeros (CRUZ-TRUJILLO et al., 2013). Os neurônios DA na substância negra (SN) e na área tegmental ventral (ATV) representam os dois maiores aglomerados de células DA no cérebro de mamíferos. Os axônios dos neurônios DA da SN projetam-se principalmente para o estriado dorsal (sistema nigrostriatal). Enquanto apenas um pequeno número de neurônios ATV se projeta no estriado dorsal, os neurônios DA ATV inervam principalmente o Núcleo Accumbens (NAc) e várias áreas corticais (sistemas DA mesolímbicos e mesocorticais). Os neurônios DA VTA também projetam estruturas adicionais, incluindo o hipocampo e hipotálamo (BEAULIEU et al., 2011) (Figura 1).

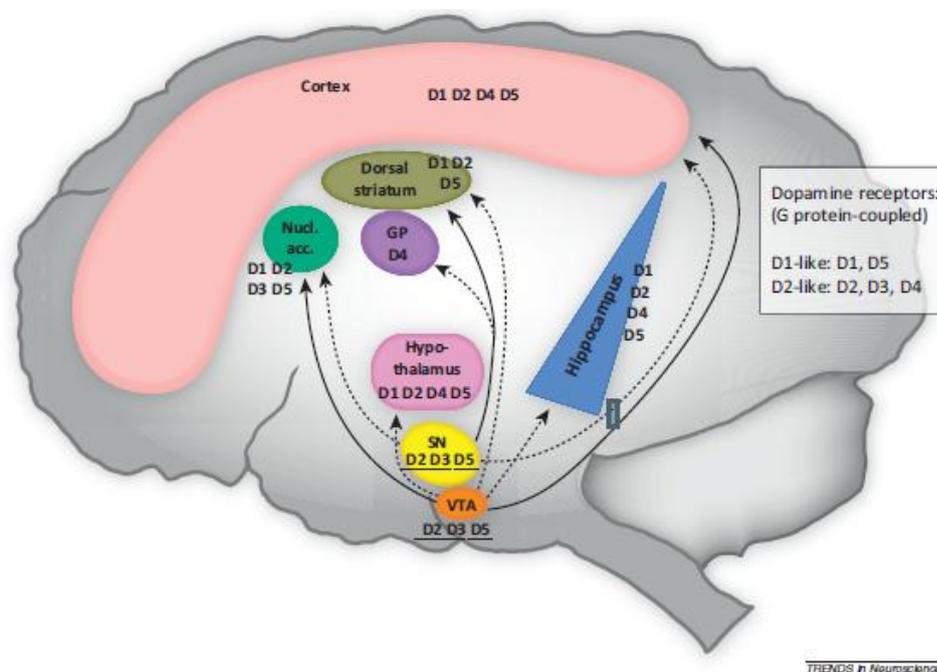


FIGURA 1: Sistema dopaminérgico e distribuição de receptores de dopamina no cérebro (Adaptado de: Brichta et al., 2013).

Além do uso crônico de morfina levar à dependência física e psicológica através da ativação do sistema dopaminérgico, a sua retirada em indivíduos adictos desencadeia

sintomas aversivos conhecidos como síndrome da abstinência (O'BRIEN et al., 1997). A síndrome da abstinência é caracterizada principalmente por sintomas como ansiedade, irritabilidade, hipersensibilidade à dor, estresse, e busca por drogas (ZHANG et al., 2016), que estão associadas ao estado emocional negativo e contribuem para a recaída após períodos de abstinência (KOOB; Le MOAL, 2005). Além disso, a retirada da morfina é caracterizada pelo aumento dos níveis de cortisol no sangue que são indicativos de estresse e ansiedade (ROY et al., 2006). Durante a retirada da droga estudos indicam que um dos sintomas de abstinência também está relacionado a alterações no processo hedônico, ou seja, redução da motivação natural (ASTON-JONES; HARRIS, 2004).

Os efeitos hedônicos das drogas responsáveis pela drogadição são conhecidos tanto em humanos como em animais experimentais (LESHNER; KOOB 1999). O paradigma de Preferência de Lugar Condicionado (PLC) é usado em animais experimentais para avaliar os efeitos de recompensa de drogas com potencial aditivo, incluindo a morfina (TZSCHENTKE, 2007). Este paradigma baseia-se no pareamento ou associações dos estímulos contextuais e as propriedades de recompensa da droga (RIBEIRO do COUTO et al., 2005) e tem sido usado para o estudo dos mecanismos neuroquímicos envolvidos na recompensa e desenvolvimento da drogadição (LIN et al., 2014). Para que ocorra a drogadição, a partir dos efeitos de recompensa pela droga, é necessário que haja a aprendizagem e a formação de uma memória relacionada ao estímulo e ao contexto (TORREGROSSA et al., 2011). O paradigma de PLC é baseado em uma associação positiva de um contexto com a droga utilizada, sendo esta associação chamada de *condicionamento Pavloviano* (SHETTY et al., 2017).

## **2.2 Os opioides e o sistema glutamatérgico**

No decorrer dos anos, muita atenção foi dada aos substratos neurobiológicos subjacentes aos efeitos recompensadores das drogas aditivas, concentrando-se principalmente na dopamina mesolímbica e no circuito de recompensa. Entretanto nas últimas décadas, um papel crítico da neurotransmissão glutamatérgica foi bem documentado tanto na drogadição pela morfina (POPIKE; WROBEL, 2002; MILANESI et al., 2017), como para sua recaída em modelo de PLC (PORTUGAL et al., 2014).

O glutamato, ou ácido L-glutâmico, é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central (SNC), e representa mais de 90% das sinapses (ATTWELL; LAUGHLIN, 2001). Este neurotransmissor pode ligar três classes diferentes de receptores

ionotrópicos de glutamato (iGluRs): N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), e Ácido Kaínico (Kainic acid: KA) e três classes diferentes receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs), cada um com sua própria distribuição distinta no sistema nervoso, farmacologia e mecanismos de sinalização. A síntese de glutamato, metabolismo, tráfego de receptores, sinalização e transmissão excitatória são componentes cruciais para o funcionamento fisiológico do cérebro (KALIVAS, 2009).

No circuito mesolímbico, existem inúmeras inervações glutamatérgicas para o NAc, ATV, amígdala e córtex frontal (GASS; OLIVE, 2008). A plasticidade sináptica glutamatérgica foi descrita nos neurônios dopaminérgicos e nos neurônios médios espinhais (Medium spiny neuron: MSN) GABAérgicos durante exposição prolongada a drogas, abstinência e recaída (VAN HUIJSTEE; MaASVELDER, 2015). Como a região do NAc recebe informações glutamatérgicas das áreas corticais, a recaída e o comportamento de procura de drogas pode ser mediada pela ativação da via glutamatérgica no processo de reativação de memórias relacionadas a drogas (SCOFIELD; KALIVAS, 2016).

O NMDAR é o principal receptor glutamatérgico envolvido tanto na plasticidade como na citotoxicidade mediada pelo  $\text{Ca}^{+2}$ . O NMDAR é um dos três tipos de iGluRs e está criticamente envolvido em inúmeras funções neuronais e cerebrais, incluindo transmissão excitatória rápida, plasticidade sináptica, aprendizado e memória (MYERS et al., 2011). A ativação dos receptores NMDA tem um papel importante na tolerância e na dependência dos opioides (MILANESI et al., 2017; AHMADI et al., 2014).

Os AMPAR representa um papel importante na regulação dos mecanismos moleculares subjacentes à reatividade a estímulos associados a opioides (ZHONG et al., 2006). O principal mecanismo regulatório no controle da plasticidade sináptica está ligado ao tráfego de AMPAR, que são recrutados para fazer sinapses quando o traço de memória está em um estado plástico, como a potenciação de longo prazo (LTP) (PARK, 2018). A morfina aumenta a eficácia sináptica excitatória e também aumenta a liberação de glutamato pré-sináptica, refletindo assim um mecanismo adicional ao tráfego pós-sináptico de AMPARs (BAIMEL et al., 2015).

O AMPAR é composto de várias combinações de quatro subunidades homólogas GluR1 a GluR4 para formar subtipos de receptores distintos (NURIYA et al., 2005). A maioria dos receptores AMPA são complexos heteroméricos contendo a subunidade GluR2 (GluR2-containing - GluR1/GluR2 e GluR2/GluR3) (SONG; HUGANIR, 2002). Os

AMPARs contendo GluR2 têm baixa permeabilidade aos íons  $\text{Ca}^{+2}$  e os AMPARs ausentes no GluR2 (GluR2-lacking) têm alta permeabilidade ao  $\text{Ca}^{+2}$  (CULL-CANDY et al., 2006).

Mudanças na composição do AMPAR causam perturbações na montagem das subunidades e eficiência no tráfego do receptor para a membrana alterando diretamente a transmissão sináptica (PASSAFARO et al., 2001). Enquanto os AMPA contendo GluR2 (impermeáveis ao  $\text{Ca}^{+2}$ : CI-AMPA) apresentam uma maior função fisiológica, os receptores AMPA sem a subunidade GluR2 (permeáveis ao  $\text{Ca}^{+2}$ : CP-AMPA) estão envolvidos na plasticidade sináptica (WILTGEN et al., 2010) e exercem papel no aprendizado e na memória (LIU; ZUKIN, 2007; CUUL-CANDY et al., 2006). Os CI-AMPARs são conhecidos por serem estáveis nas sinapses e contribuem para a neurotransmissão basal, enquanto os CP-AMPARs são transitoriamente expressos e recrutados durante a plasticidade sináptica, um fenômeno dependente de  $\text{Ca}^{+2}$  (CLEM; HUGANIR, 2010).

Diferentes subtipos de AMPARs desempenham papéis distintos na regulação do tráfego de AMPAR e da plasticidade sináptica (MENG et al., 2003). A função AMPAR é regulada de várias maneiras, incluindo mudanças dinâmicas na densidade dos receptores (NURIYA et al., 2005), a qual se acredita ser um dos mecanismos de suas funções (NURIYA et al., 2005). Além do tráfico de receptores, a função dos AMPAR é regulada pela proteína quinase II dependente de  $\text{Ca}^{+2}$ /calmodulina (CaMKII), uma proteína quinase que atua como fator chave na plasticidade sináptica (BAYER et al., 2001).

Alterações das subunidades AMPAR sinápticas podem contribuir para a expressão de mudanças de longo prazo na plasticidade sináptica. A exposição repetida à morfina aumenta a expressão sináptica hipocampal de GluR1, GluR2/3 e pCaMKII, consistente com dados anteriores de que os níveis das subunidades AMPAR aumentaram após a auto-administração de drogas aditivas (BOUDREAU; WOLF, 2005; TANG et al., 2004). Dados da literatura demonstram que a administração de morfina foi capaz de aumentar a plasticidade sináptica hipocampal com a formação de receptores AMPA ausente de GluR2 ou seja receptores homômeros para GluR1 permeáveis ao  $\text{Ca}^{+2}$  (CP-AMPA) (BILLA et al., 2010).

De mesmo modo, dados na literatura demonstram que a exposição repetida a opiáceos aumenta os AMPARs sinápticos ausentes de GluA2 no NAc (HEARING et al., 2016, RUSSEL et al., 2016), bem como a elevada transmissão glutamatérgica no Nac esta subjacente aos sintomas de abstinência (RUSSELL et al. 2016; ZHU et al. 2016). Dados indicam que o aumento da sinalização AMPAR no NAc também foi atribuído aos efeitos

aversivos da retirada da morfina (RUSSELL et al. 2016). Nesse sentido, a modulação de subtipos específicos de AMPAR pode fornecer uma intervenção terapêutica viável no desenvolvimento de dependência de opiáceos.

### **2.3 A recaída à busca pelas drogas aditivas**

A recaída as drogas aditivas é um grande problema clínico apresentando uma alta porcentagem de usuários que recaem novamente sobre o uso das drogas após um período de desintoxicação (AGUILAR et al. 2009). Durante a abstinência, existem três principais fatores que podem desencadear a recaída a droga aditivas. A recaída é frequentemente precipitada por reexposição aguda a sinais associados à droga, como por exemplo, o contexto a qual ela é utilizada, estresse e desregulação neuroadaptativa previamente induzida pelo uso crônico de drogas (SHAHAM; HOPE, 2005).

Evidências crescentes sugerem que a plasticidade induzida por opioides relacionada tanto à dependência como à retirada pode ser responsável por estabelecer comportamentos de busca podendo provocar a recaída (HEARING et al. 2018; RUSSELL et al. 2016; ZHU et al. 2016). O uso repetido de drogas proporciona uma forte associação entre os efeitos gratificantes da droga e o ambiente de administração, sendo que o ambiente associado pode contribuir para o uso continuado, bem como para o alto risco de recaída após abstinência (HYMAN et al., 2006).

Em animais de laboratório, é possível medir a recaída quando, após a aquisição e subsequente extinção de uma resposta comportamental específica, o animal reinicia essa resposta. Em outras palavras, o modelo de recaída é usado para avaliar os mecanismos subjacentes ao comportamento de busca e de associação de estímulos (AGUILAR et al., 2009; EVERITT 2014; TANAKA et al., 2011). O paradigma PLC é um modelo clássico para memória de dependência e comportamento de busca de drogas. Ao emparelhar a droga com um contexto ambiental específico, as propriedades de recompensa da droga contribuem para construir a associação entre a droga e as pistas contextuais. Além disso, a reexposição às pistas contextuais pode, por si só, desencadear um comportamento de busca de drogas na recaída do PLC (LIU et al., 2008). Além do contexto outros fatores podem desencadear a recaída no período de abstinência como fatores estressantes e os efeitos hedônicos da própria droga (SHALEV et al, 2002).

O paradigma de recaída permite que o comportamento de busca de drogas, após a extinção dos efeitos hedônicos, seja estudado (VASSOLER et al. 2013). A extinção é uma forma de aprendizagem inibitória; durante o período de extinção, uma resposta previamente condicionada é suprimida. O período de extinção potencializa a inibição e também envolve a redução da atividade de vias excitatórias de aprendizagem relacionada com recompensas (PETERS, 2009). Nesse sentido o modelo de PLC nos permite avaliar de uma maneira segura o comportamento tanto aditivo como de recaída as drogas em animais experimentais.

Recentemente, vários fatores de transcrição foram identificados para ter algum efeito nos procedimentos de dependência de drogas (SUN et al., 2020). O  $\Delta$ FosB é frequentemente considerado um marcador molecular na drogadição que ajuda a iniciar e, em seguida, manter um estado aditivo, além de ser um biomarcador para avaliar as potenciais intervenções terapêuticas para a drogadição (RUFFLE, 2014). O  $\Delta$ FosB é induzido nas regiões de recompensa do cérebro pela exposição a quase todas as drogas psicofarmacêuticas e pistas ou contextos associados a drogas (BOURNE et al., 2013).

## **2.4 Dieta e ácidos graxos**

Estudos realizados no início do século 20 demonstraram que a gordura era conhecida por ser uma excelente fonte de energia a qual também possuía componentes necessários para o crescimento (BURR, 1929). Os ácidos graxos (AG) desempenham papéis múltiplos em humanos e outros organismos. Mais importante ainda, os AG são parte substancial dos lipídios, um dos três principais componentes da matéria biológica (junto com proteínas e carboidratos) (NELSO; COX, 2005). Os ácidos graxos também são substratos energéticos importantes, compreendendo cerca de 30% do consumo total de energia para humanos (TVRZICKA et al., 2011).

Os óleos e gorduras da dieta, além de conferir maior palatabilidade aos alimentos, possuem um importante papel nutricional, nos fornecendo calorias e ácidos graxos essenciais (AGE) (FENNEMA, 2010). Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos saturados (AGS) ou insaturados com cadeias de carbono variando entre 2 e 36 átomos de carbono, podendo ser monoinsaturado ou poliinsaturado. Os AGE são ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) e são importantes constituintes de todas as membranas fosfolipídicas, porém estes AG não são sintetizados no corpo humano, sendo obtidos somente através da dieta (DAS, 2008).

Os AGPI, ácido linoleico (LA) e ácido alfa-linolênico (ALA), precisam ser metabolizados em seus respectivos metabólitos de cadeia longa, isto é, ácido di-homo-gama-linolênico e ácido araquidônico (AA) a partir do LA; e ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) a partir do ALA. Alguns desses metabólitos de cadeia longa não apenas formam precursores para as respectivas prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, mas também dão origem a lipoxinas e resolvinas que têm ações antiinflamatórias potentes. Os AGE e seus derivados estão envolvidos em uma variedade de funções fisiológicas bem como processos patológicos (DAS et al., 2006).

Nesse sentido AGE são classificados em duas classes principais, o ômega-6 (n-6 AGPI), com o ácido araquidônico (AA) como principal representante, e o ômega-3 (n-3 AGPI) com o ácido decosahexaenóico (DHA) como principal representante (SIMOPOULOS, 2009). Os AGPI possuem diversas funções fisiológicas, incluindo a integridade e fluidez das membranas celulares, atuando como principais constituintes dos diferentes reservatórios lipídicos circulantes, servindo como produtores e armazenadores de energia, além de serem precursores de numerosos eicosanóides bioativos e outros mediadores lipídicos que atuam na transdução de sinal e expressão gênica (LAURITZEN et al., 2001).

O sistema nervoso é o órgão com a segunda maior concentração de lipídios, apenas ultrapassado pelo tecido adiposo. O cérebro adulto contém aproximadamente 50 ~ 60% do seu peso seco como lipídeo, e aproximadamente 35% dos lipídios são AGPI (YEHUDA et al., 1999), além disso, os ácidos graxos compreendem todas as membranas fosfolipídicas neuronais (LEE et al., 1986). O AA e o DHA compreendem 23% dos lipídios totais no cérebro humano adulto (FRASER et al., 2010), onde desempenham papéis principalmente na neurotransmissão, metabolismo (WAINWRIGHT et al., 2002), crescimento sináptico (DARIOS et al., 2006) e comunicação neuronal (RICHARDS et al., 2003). Os AGE possuem funções essenciais para a manutenção das membranas celulares, nesse sentido, a substituição destes AGE nas membranas por outro tipo de AG pode alterar a sua fluidez bem como o funcionamento de enzimas, receptores, transportadores e a plasticidade sináptica (SONGUR et al., 2004; SALEM et al., 2001).

Quimicamente, as gorduras são formadas pela união de três ácidos graxos com uma molécula de glicerol, conhecendo-se essa molécula com o nome de triglicerídeos ou triacilgliceróis (TG) (Figura 2). As moléculas de TG podem ser sólidas ou líquidas em temperatura ambiente, dependendo de sua estrutura e de sua composição. Usualmente o termo

"gordura" se refere aos TG em seu estado sólido, enquanto que o termo óleo, aos TG no estado líquido (KODALI; LIST, 2006).

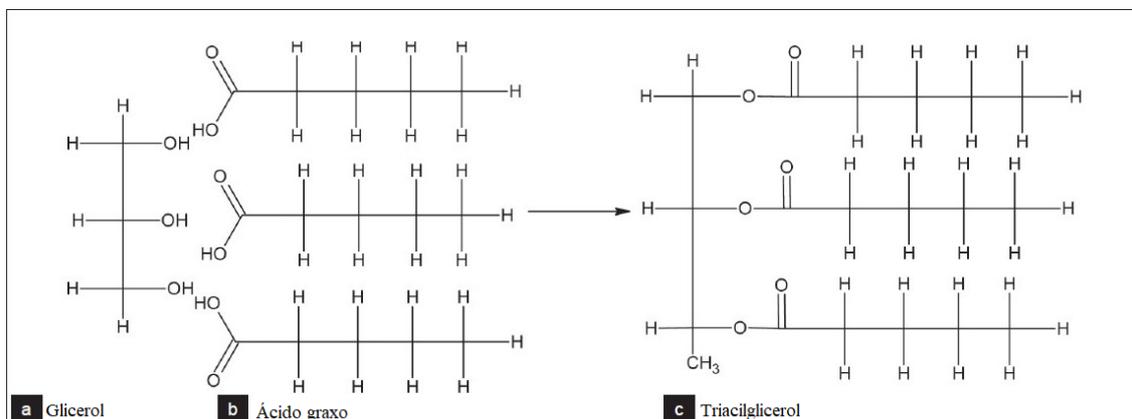


Figura 2: Reação química dos triacilgliceróis (ASIF, 2011).

## 2.5 A dieta mediterrânea

O termo Dieta mediterrânea, têm sido utilizado para se referir à dieta padrão consumida pelas populações na Bacia do Mediterrâneo há mais de 2000 anos atrás até o momento. A dieta mediterrânea é rica em cereais, vegetais, frutas, legumes, peixes, azeitona e óleo de oliva. Através destes alimentos, a dieta mediterrânea é caracterizada por possuir baixos níveis de colesterol e ácidos graxos saturados (AGS), e altos níveis de n-3 AGPI (ARBONES-MARINAR et al., 2007). Os n-3 AGPI como o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o DHA, têm sido responsáveis por produzir efeitos benéficos na saúde mental (Da SILVA et al., 2008) como citados posteriormente.

Ingerir uma quantidade equilibrada de ácidos graxos n-6 e n-3 é de extrema importância porque estes AG compartilham enzimas de tal forma que a proporção de AG consumidos pode ditar a disponibilidade de dessaturase e elongase nas vias metabólicas (Figura 3) (ANDRUCHOW et al., 2017). D-6 Desaturase, que é a enzima limitante da taxa nesta via, é necessária duas vezes no metabolismo do DHA (SHEPPARD; CHEATHAM 2013). De fato, os n-6 modulam a quantidade de n-3 disponíveis no organismo (TAHA et al., 2014), pois o LA (18: 2n-6) e ALA (18: 3n-3) competem as mesmas enzimas dessaturase (NAKAMURA; NARA, 2004). Assim, seus metabolismos estão intimamente ligados e competitivos (NAKAMURA; NARA, 2004; YEHUDA et al., 1999). Os derivados eicosanóides da n-3 e do n-6 são anti e pró-inflamatórios, respectivamente, e funcionam de

forma distinta (NAKAMURA; NARA, 2004). Sendo assim, a quantidade relativa de ácidos graxos n-6 a n-3 poderia modular os processos neuronais e a progressão da doença através de suas funções individuais e sua interação (ANDRUCHOW et al., 2017).

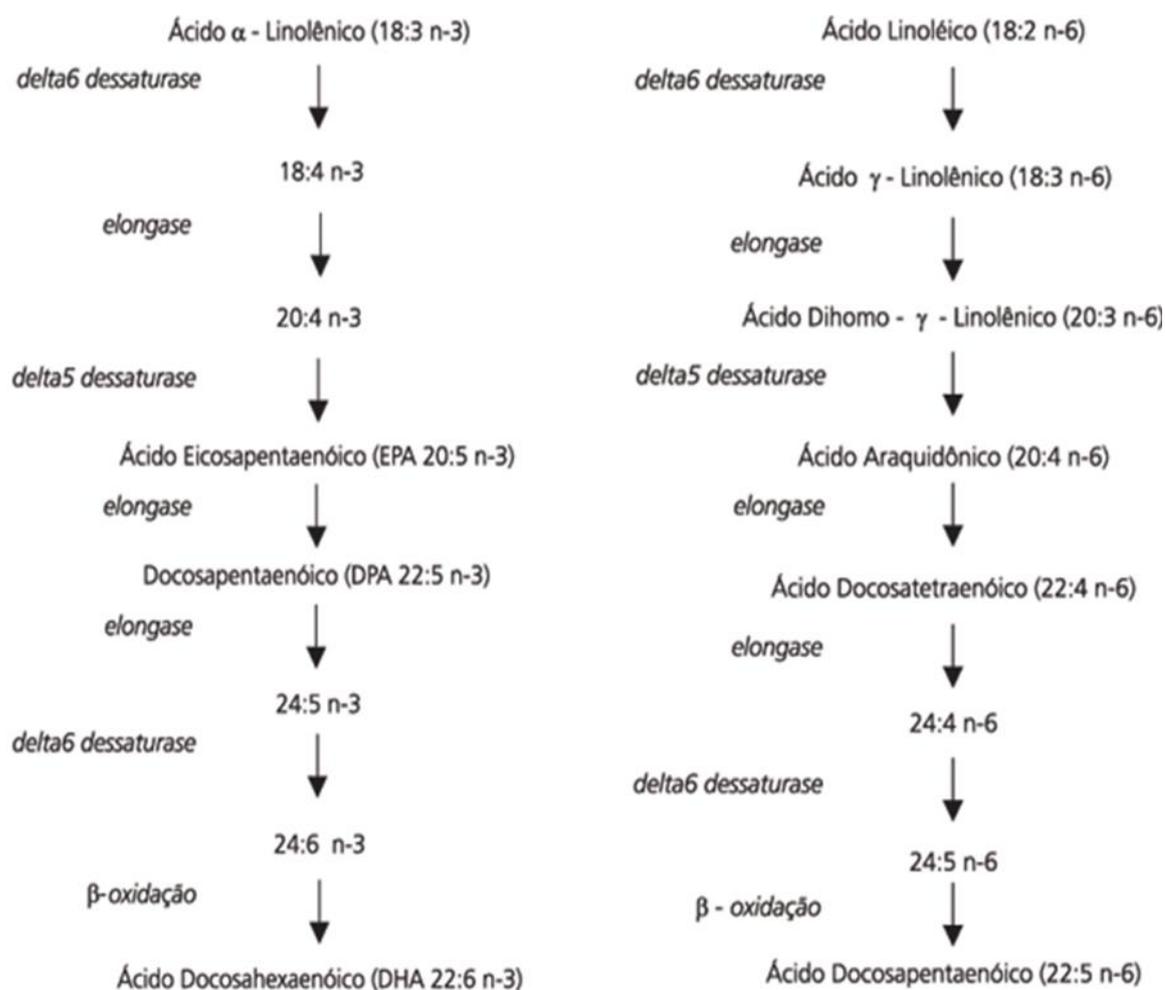


Figura 3: Via metabólica dos ácidos graxos essenciais n-6 e n-3. (Adaptado de ANDRUCHOW et al., 2017)

Dados demonstraram que um desequilíbrio na razão n-6/n-3 pode influenciar o desenvolvimento de diversos distúrbios tanto metabólicos como dislipidemias como neurológicos como depressão por aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias que tanto podem ativar o eixo HPA como podem alterar a fluidez das membranas o que potencialmente afeta enzimas ligadas à membrana, canais iônicos, atividade do receptor e ligação de neurotransmissores (HUSTED; BOUZINOVA, 2016). Nesse sentido, há indícios crescentes que apoiam os efeitos benéficos de um aumento da ingestão de n-3, exibindo

propriedades neuroprotetoras em uma variedade de condições neurológicas e neurodegenerativas (DYALL et al., 2010; DENIS et al., 2015).

A suplementação com n-3 tem sido reportada por ter um papel promissor no tratamento da depressão (JAZAYERI et al., 2008). Curiosamente, o metabolismo serotoninérgico também é afetado pela razão n-6/n-3 AGPI (Da SILVA et al., 2008; BORSONELO; GALDUROZ, 2008), uma vez que a suplementação com n-3 demonstrou efeitos antidepressivos mediado pelo aumento da serotonina (VINES et al., 2012). Outro efeito benéfico da suplementação com n-3 foi a redução da severidade dos sintomas de Transtorno de Deficit de Atenção e Hiperatividade em crianças (BLOCH; QAWASMI, 2011; SONUGA-BARKE et al., 2013) bem como na redução de sintomas psicóticos (AMMINGER et al., 2010).

O consumo da dieta mediterrânea também têm mostrado um papel protetor no risco de desenvolver doença de Alzheimer e no comprometimento cognitivo leve (COOPER et al., 2015). Um estudo transversal demonstrou que uma população idosa sem demência que aderiu a uma dieta mediterrânea possui maiores volumes cerebrais visualizados através de imagem por ressonância magnética (GU et al., 2015). Estudos recentes do nosso grupo demonstram que o consumo de uma dieta mediterrânea impede prejuízos cognitivos em um modelo de perda cognitiva induzida por escopolamina (HAYGERT et al., 2018)

Estudos experimentais demonstraram que a suplementação com n-3 melhora as deficiências motoras relacionadas ao parkinsonismo induzido por reserpina (BARCELOS et al., 2011), bem como a nanoformulação contendo n-3 reduziu os sintomas motores causados por antipsicótico haloperidol (BENVEGNÚ et al., 2018). Em relação à drogadição, estudos experimentais recentes do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a suplementação com n-3 impediu a drogadição por anfetamina através da redução do estresse oxidativo cerebral (METZ et al., 2019) além de impedir a recaída por morfina através da redução da ativação do eixo HPA e redução da ativação dopaminérgica (MILANESI et al., 2019).

Além dos efeitos da dieta mediterrânea no SNC, esta também possui efeitos benéficos a nível periférico e no metabolismo. A aderência do consumo da dieta mediterrânea está associada a uma prevenção do desenvolvimento do diabetes melitos tipo II (VILLANI et al., 2018) e redução de doenças cardiovasculares (FITÓ et al., 2016), além de influenciar positivamente a microbiota intestinal (COSTANTINI et al., 2017).

Uma dieta mediterrânea é um padrão alimentar que se encaixa no paradigma atual de avaliação de padrões alimentares, em vez de alimentos isolados ou nutrientes. Além disso, a

dieta mediterrânea é um exemplo de um padrão alimentar que fornece evidências para uma associação entre qualidade da dieta, envelhecimento saudável e prevenção de doenças (VILLANI et al., 2018).

## 2.6 A dieta ocidental

A dieta atual, também chamada de dieta ocidental, mudou acentuadamente no decorrer dos anos, apresentando um enorme declínio na ingestão de n-3 AGPI em favor de um aumento de n-6 AGPI, além do alto consumo de AGS e de ácidos graxos trans (AGT) presentes em alimento processados (KANOSKI et al., 2011). A dieta ocidental apresenta uma razão de n-6/n-3 AGPI cerca de 15-20:1 (SIMOPOULOS 2009) que contrasta fortemente com a proporção ideal de cerca de 2:1 recomendada (SIMOPOULOS 1999). Um desequilíbrio na proporção n-6/n-3 a favor do n-6 é altamente pró-trombótico e pró-inflamatória, o que contribui para a prevalência da aterosclerose, obesidade e diabetes (KROMHOUT; GOEDE, 2014; SIMOPOULOS, 2013).

A gordura vegetal parcialmente hidrogenada foi a pioneira na produção de alimentos processados por conferir aos alimentos maior consistência, palatabilidade e aumentar o prazo de validade aos alimentos. No entanto essa gordura apresenta altas concentrações de AGT o qual é responsável por efeitos prejudiciais à saúde, como por exemplo aterosclerose e diabetes mellitus tipo 2 (MOZAFARIAN; CLARKE, 2009; SUN et al., 2007). A presença de AGT nos alimentos é restrita pela atual legislação vigente tanto no Brasil bem como proibido em outros países (RATNAYAKE et al., 2014).

O consumo regular de AGT pode resultar em uma substituição dos AGE nas membranas lipídicas, incluindo as membranas no SNC ocasionando alterações na plasticidade e neurotransmissão (ACAR et al., 2003). Além disso, o consumo de AGT tem sido associado a disfunção cognitiva (MORGAN et al., 2007; YAFFE et al., 2007), alterações na neurotransmissão dopaminérgica (ACAR et al., 2003), a drogadição (KUHN et al., 2013), mania (TREVIZOL et al, 2011), perturbações do movimento (TEIXEIRA et al., 2012) e uma maior sensibilidade a drogas aditivas (ROVERSI et al., 2016). Atualmente, a gordura *trans* está sendo substituída pelo óleo de palma (OP) bem como pela gordura interesterificada (GI) na produção de alimentos (AFONSO et al., 2016).

O uso de OP na indústria de alimentos ganha lentamente aceitação como um substituto de gordura vegetal hidrogenada (SEN et al., 2007). Nas últimas décadas, a aplicação do OP

nas indústrias alimentícias tem crescido exponencialmente pela textura, a fragrância e o sabor neutro que garante nos produtos acabados. OP é geralmente encontrado em: assados, doces, bolos, análogos de queijo, chips, chocolate, gorduras de confeitaria, biscoitos, óleo de cozinha, bolachas, donuts, refeições congeladas (panquecas, tortas, pizza, batatas), sorvetes, gorduras industriais de fritura, macarrão instantâneo e farinha de aveia, margarinas, pipoca de microondas, cremes não lácteos, manteiga de amendoim, molhos de salada (MANCINI et al., 2015).

A crescente demanda por óleos vegetais é um fenômeno mundial e o OP contribui significativamente para o suprimento global de óleos comestíveis (SUN et al., 2015). O OP é inteiramente livre de OGM (organismos geneticamente modificados) e produz até 10 vezes mais óleo por unidade de área que outras culturas de sementes oleaginosas. Em 2012, o OP representou 32% da produção global de óleos e ultrapassou o óleo de soja como o óleo vegetal mais importante do mundo (MBA et al., 2015).

O óleo de palma é um tipo de óleo comestível obtido a partir do mesocarpo dos frutos da planta tropical *Elaeis guineenses*, popularmente conhecida como palmeira. Em comparação com a maioria dos outros óleos vegetais, como óleos de oliva e girassol, o óleo de palma contém uma grande quantidade de gordura saturada (40-50% da gordura total), sendo a maioria na forma de ácido palmítico (C16:0) (SUN et al., 2015).

Os TGs contidos no OP são constituídos principalmente de ácido oleico (C18:1), predominantemente localizado na posição SN-2, e de ácido palmítico (C16:0), localizados principalmente no SN-1 e posições SN-3 (Figura 4) (MANCINI et al., 2015).

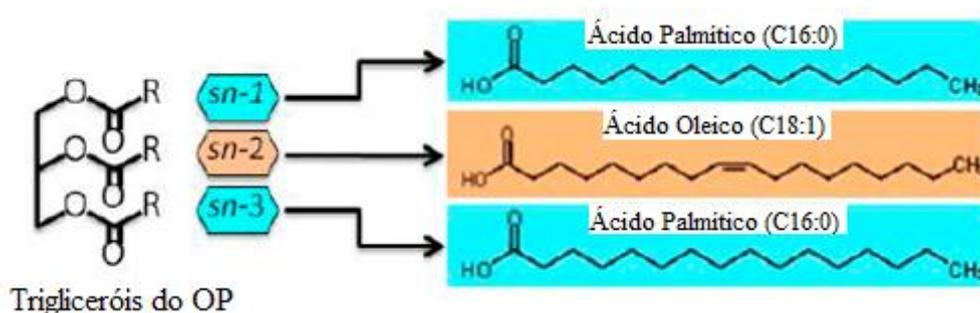


Figura 4: Triacilgliceróis do óleo de palma (adaptado de MANCINI et al., 2015).

Os AG são componentes essenciais das células e servem principalmente como fonte de energia. Além de suas funções celulares bem conhecidas, quando há um desequilíbrio na homeostase dos AG pode ocasionar efeitos nocivos celulares, ou seja, acúmulo excessivo de AG livres celulares pode causar citotoxicidade (LIU; CZAIA, 2013). Os AGS de cadeia

longa, tais como ácido palmítico, são direcionados para a mitocôndria para oxidação e para o retículo endoplasmático (RE) para síntese lipídica complexa; porém, o excesso de AGS pode fornecer modificação na composição fosfolipídica da membrana do RE, comprometendo sua estrutura e integridade (BORRADAILE et al., 2006). Nesse sentido, a sobrecarga de ácido palmítico induz a morte celular por apoptose pelo estresse do ER (CAO et al., 2012; GU et al., 2010).

Em modelos animais, a dieta suplementada com OP induz a tolerância à glicose, o que pode ser atribuída à redução da sensibilidade à insulina (KOCHIKUZHYIL et al., 2010, WEN et al., 2011), contribui para a ativação das vias de sinalização inflamatórias (TRAN et al., 2016), induziu a hipertrofia dos adipócitos (SUGANAMI et al., 2007) além de estar relacionada com a lipotoxicidade hepática o que contribui para a progressão de doença hepática não-alcoolica (Leamy et al., 2013; Sutter et al., 2016). O papel deste AG em doenças crônicas também está relacionado à sua capacidade de promover alterações no metabolismo das lipoproteínas. Nesse sentido, foi demonstrado que o enriquecimento do ácido palmítico diminui a expressão e a atividade do receptor de LDL nos hepatócitos, o que contribui para o aumento das concentrações plasmáticas de LDL (FATTORE et al., 2014). São diversos estudos, como os citados acima, envolvendo o consumo de AGS, em especial o OP, em distúrbios metabólicos, porém a literatura carece de dados que informem as conseqüências deste consumo relacionado a danos ao SNC.

Misturas de gorduras ricas em ácidos palmítico e esteárico são amplamente utilizadas a nível industrial, para produzir gorduras interesterificadas, a fim de atender às recomendações das organizações de saúde para substituir ácidos graxos *trans* em alimentos industrializados (BERRY et al., 2009; ARDISSON et al., 2014). Os processos tecnológicos de modificações de óleos e gorduras, como a interesterificação, é de grande interesse industrial uma vez que tem por objetivo obter gorduras com propriedades como fusão e cristalização adequadas (SENANAYAKE; SHAHIDI, 2005). A gordura interesterificada (GI) resulta da modificação (rearranjo) da posição dos AG na molécula de glicerol, formando um novo TG (BERRY et al., 2009; ARDISSON et al., 2014) (Figura 5). Esse processo é onde dois ou mais óleos e/ou gorduras são misturados para se obter um produto com composição e consistência desejáveis (GUNSTONE, 1998; SENANAYAKE; SHAHIDI, 2005).

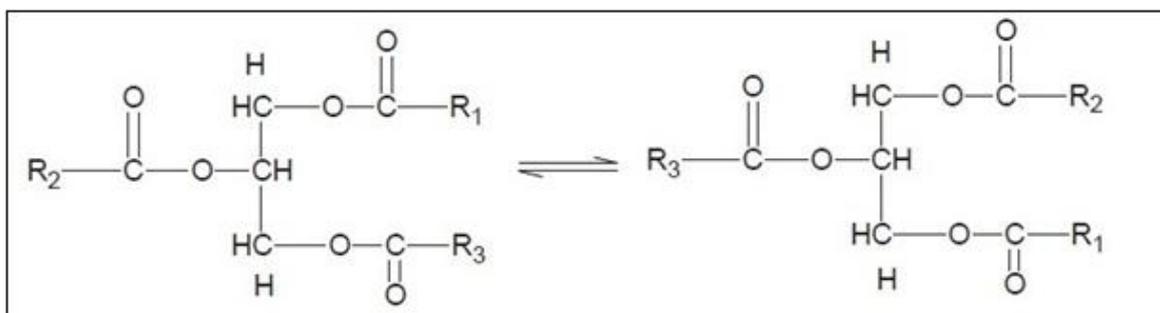


Figura 5: Processo de interesterificação entre os trigliceróis (ASIF, 2011).

No processo de interesterificação não há mudança na composição de AG, somente seu rearranjo na molécula de TG, o que leva à modificação das propriedades físicas dessa gordura, tornando-a com uma textura desejável (AHMADI; MARANGONI, 2009; RIBEIRO et al., 2007; REENA et al., 2009). A interesterificação de óleos e gorduras está se tornando rapidamente uma alternativa, em que a inserção de AGS, tipicamente na forma de ácido esteárico, é empregada para endurecer um óleo para uma plasticidade comparável a gordura *trans* ou a dureza de uma gordura saturada natural (WARNICK et al., 1982). Sendo assim a gordura interesterificada resultante contém elevados níveis de AGS porém sem a presença de AGT (GUNSTONE, 1998).

Existem dois processos para a obtenção de GI: enzimático e químico. No processo enzimático é utilizado lipases microbianas enquanto na interesterificação química utiliza-se catalisadores como, por exemplo, metóxido de sódio (MeONa) (RIBEIRO et al., 2007). A interesterificação química é a mais utilizada pela indústria por ser a alternativa mais econômica e mais rápida (MARANGONI; ROUSSEAU, 1995; ALLEN et al., 1996).

Alguns autores mostraram que o consumo de GI pode aumentar os riscos metabólicos envolvidos no diabetes tipo 2, doença cardiovascular (ROBINSON et al., 2009) e aterosclerose (AFONSO et al., 2016). Um estudo realizado por Bispo e colaboradores (2015) demonstrou que o consumo de GI, resultou no comprometimento do efeito da insulina no centro hipotalâmico, responsável por inibir a ingestão de comida (BISPO et al., 2015). Além disso, estudos em animais mostraram que o consumo de GI foi capaz de aumentar assim a relação LDL / HDL e a pressão arterial (SUNDRAM et al., 2007).

Estudos experimentais recentes do nosso laboratório demonstraram que o consumo de gordura interesterificada causou aumento de citocinas pró-inflamatórias tanto no plasma como no cérebro, acompanhado de perda neuronal no hipocampo (HAYGERT et al., 2018).

Ademais, a suplementação de ratos com GI está relacionado a prejuízo de memória, acompanhado do aumento de parâmetros oxidativos e redução de neurotrofinas (BDNF) no SNC (D'AVILA et al., 2017). Sobretudo, um estudo atual demonstrou que a suplementação com GI causou prejuízos motores juntamente com alterações moleculares da neurotrofina (GDNF) no SNC (D'AVILA et al., 2021).

Além disso, Milanesi e colaboradores (2017) demonstraram o efeito da suplementação com GI em ratas, as quais apresentaram aumento da sensibilidade térmica e alterações no sistema opioidérgico (MILANESI et al., 2017). Um estudo recente demonstrou que a suplementação com GI e OP aumenta a recaída por morfina após um período de abstinência em um modelo de drogadição além de apresentar alterações no eixo HPA e alterações dopaminérgicas (MILANESI et al., 2019).

## **2.7 Estresse, ácidos graxos e drogadição**

Os hormônios desempenham um papel crítico no desenvolvimento e expressão de uma ampla gama de comportamentos. Um aspecto da influência dos hormônios no comportamento é a sua potencial contribuição para a fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos (JURUENA et al., 2004). De todos os eixos endócrinos, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) tem sido o mais amplamente estudado. A atividade do eixo HPA é governada pela secreção de hormônio liberador de corticotrofina (HLC) e vasopressina (AVP) pelo hipotálamo, os quais, por sua vez, ativam a secreção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela pituitária, que finalmente estimula a secreção de glicocorticóides pelo córtex adrenal (HABIB et al. 2001; STROHLE; HOLSBOER 2003). Os glicocorticóides, então, interagem com seus receptores em múltiplos tecidos-alvo, incluindo o eixo HPA, onde são responsáveis pela inibição negativa por feedback da secreção do ACTH pela pituitária e do HLC a partir do hipotálamo (de KLOET et al., 1998).

Anormalidades na função do eixo HPA têm sido descritas em pessoas que apresentam transtornos psiquiátricos. Essas anormalidades parecem estar relacionadas às mudanças na capacidade dos glicocorticóides circulantes em exercer seu feedback negativo na secreção dos hormônios do eixo HPA por meio da ligação aos receptores de mineralocorticoides (RM) e glicocorticóides (RG) nos tecidos (JURUENA et al., 2003). Ou seja, em algumas doenças como exemplo na depressão, é descrito que há desregulação do feedback negativo no eixo HPA levando à hipercortisolemia (PARIANTE et al., 2001).

A exposição aguda ou crônica ao estresse evoca inúmeras respostas fisiológicas e comportamentais que alteram significativamente o estado metabólico e comportamental em humanos e animais experimentais (DALLMAN et al., 2003). A exposição ao estresse pode alterar tanto a quantidade quanto a qualidade das calorias consumidas, e as alterações induzidas pelo estresse na ingestão alimentar e no balanço energético podem interagir com o estado emocional (EPEL et al., 2001). O estresse também tem sido relacionado ao desenvolvimento de obesidade e síndrome metabólica. Uma dieta com alta concentração de gordura demonstrou aumentar os níveis de corticosterona no sangue (CORT) e a expressão de receptores de glicocorticóides (RG) no hipotálamo e no hipocampo (BOUKOUVALAS et al., 2018; 2010).

O estresse também está implicado em alterações a longo prazo em numerosos sistemas comportamentais e neurobiológicos que contribuem para a vulnerabilidade ao uso de drogas aditivas (CANDACE et al., 2016). O estresse tem sido repetidamente associado ao uso contínuo de drogas aditivas (KOOB, 2008), além de ser um dos fatores mais comumente relatados que precedem a recaída de drogas após período de abstinência (BREWER et al., 1998). A função do HPA na recaída induzida pelo estresse foi identificada para várias drogas aditivas, incluindo heroína, cocaína e álcool (BUFFALARI et al. 2012; LE et al. 2011; SHALEV et al. 2010). Nesse sentido o eixo HPA desempenha um papel significativo na drogadição.

## **2.8 Os ácidos graxos e o sistema dopaminérgico**

Uma série de transtornos neuropsiquiátricos, incluindo doença de Parkinson, esquizofrenia, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade e, até certo ponto, depressão, envolvem a desregulação dos sistemas dopaminérgico (HEALY-STOFFEL; LEVANT, 2018). Sobretudo, o sistema dopaminérgico é um alvo bem conhecido de drogas com potencial aditivo e a plasticidade dentro deste circuito neural é que está envolvida na drogadição (HYMAN et al., 2006; KAUER; MALENKA, 2007). O sistema dopaminérgico controla comportamentos motivados através da via dopaminérgica mesolímbica, que se projetam da área tegmental ventral (ATV) para as regiões límbicas, incluindo o nucleus accumbens (NAc) e o córtex pré-frontal (SIM et al., 2013). As projeções dopaminérgicas da ATV que terminam no NAc desempenham um papel crucial em fenômenos relacionados à recompensa, bem como comportamentos de busca de drogas (YOUNG et al., 2005). Sugere-

se que o NAc é a principal área do sistema dopaminérgico para mediar os comportamentos relacionados à recompensa, bem como a recaída de drogas (FARZINPOUR et al., 2018).

Evidências obtidas a partir de modelos animais e resultados de neuroimagem em humanos indicam que a função dopaminérgica no cérebro pode ser alterada pela dieta e pelo peso (CARR et al., 2011; VAL-LAILLET et al., 2015; DÉCARIE-SPAIN et al., 2016). O consumo prolongado de uma dieta rica em gordura é conhecido por causar obesidade e diabetes tipo 2, que são caracterizados pela resistência à insulina (VINUESA et al., 2016). Alterações no nível de insulina no cérebro e na sensibilidade dos receptores para insulina sob diferentes condições dietéticas podem, portanto, ser fatores importantes na sinalização dopaminérgica e no comportamento direcionado as drogas aditivas (STOUFFER et al., 2015).

Sabe-se que tanto uma dieta de restrição alimentar como uma dieta obesogênica alteram a transmissão dopaminérgica e exercem efeitos modulatórios opostos na responsividade comportamental às drogas psicoestimulantes. A restrição alimentar e dieta obesogênica aumentam ou diminuem, respectivamente, os efeitos recompensadores e de drogas aditivas (POTHOS et al., 1995; CARR et al., 2011; HRYHORCZUK et al., 2016).

Estudos realizados por Kuhn e colaboradores (2013, 2015) demonstraram que a suplementação com gordura vegetal hidrogenada, rica em AGT, pode alterar o conteúdo fosfolipídico das membranas do SNC alterando a neurotransmissão dopaminérgica após administração de anfetamina. Outro estudo demonstrou que o consumo de AGT modifica os parâmetros aditivos da morfina (ROVERSI et al., 2016).

No SNC, os ácidos graxos n-3 modulam a sinalização celular afetando além do sistema serotoninérgico o sistema dopaminérgico também. As evidências sugerem que níveis inadequados de n-3 no cérebro podem representar um fator de risco para distúrbios neuropsiquiátricos (HEALY-STOFFEL; LEVANT, 2018). Com base nisso, uma nova aplicação para ácidos graxos ômega-3 foi proposta, relacionada ao tratamento de vários destes diversos transtornos (BOZZANELO et al., 2019).

## **2.9 Alvos farmacológicos para prevenção da recaída: Topiramato e Ácido Ferúlico**

Nas últimas décadas, um papel crítico da neurotransmissão glutamatérgica foi documentado na drogadição de morfina (POPIK; WROBEL, 2002; MILANESI et al., 2017),

bem como em sua recaída (PORTUGAL et al., 2014). O sistema glutamatérgico está envolvido na plasticidade neuronal induzida por opioides (MILANESI et al., 2017) e o AMPAR representa uma chave importante na regulação dos mecanismos moleculares subjacentes a esta plasticidade (MORON et al. al., 2007).

Foi demonstrado que os receptores AMPA compõem um dos mecanismos de recompensa relacionados a drogas e tem um papel crítico na memória de estímulo de recompensa (expressão de PLC) (SHUKLA et al., 2017). A ativação dos receptores AMPA é essencial para comportamentos de busca de drogas, de modo que o antagonismo do receptor AMPA atenua este comportamento (FAMOUS et al., 2008). O antagonista do receptor AMPA diminui a aquisição e expressão da PLC, indicando que a neurotransmissão glutamatérgica tem um papel crítico na indução de PLC (MALDONADO et al. 2007). Recentemente, Siahposht-Khachaki (2017) demonstraram que o bloqueio do receptor AMPA pela injeção de intracerebroventricular de CNQX durante o período de extinção atenua a recaída por morfina (SIAHPOSHT-KHACHAKI et al., 2017).

Em relação ao sistema glutamatérgico, o topiramato é uma medicação antiepiléptica aprovada para o tratamento da epilepsia (WENZEL et al., 2006). O topiramato reduz a ação excitatória do glutamato através do antagonismo AMPAR e facilita a ação inibidora do GABA no seu sítio não benzodiazepínico (ANGEHAGEN et al., 2005). Os efeitos secundários do topiramato incluem a redução da condutância dos canais de cálcio voltagem dependente e a redução da liberação de dopamina, neurotransmissor o qual está envolvido nos efeitos de reforço das drogas (SHINN; GREENFIELD 2010).

O topiramato tem uma alta eficácia antiepiléptica, tanto para epilepsia focal como generalizada, porém é frequentemente associado a problemas adversos psiquiátricos (KANNER et al., 2003) ou cognitivos (KOCKELMANN et al., 2004). Uma grande proporção de pacientes usuários de topiramato apresentam efeitos adversos cognitivos especialmente em fluência verbal, memória de trabalho (BRANDT et al., 2015), concentração e confusão mental (KNAPP et al., 2015). O uso do topiramato também tem sido associado a outros efeitos adversos tais como tonturas, nervosismo, fadiga, sonolência (SOYKA; MULLER, 2017). Menos comumente, tem sido associado ao desenvolvimento de sintomas psicóticos como alucinações (REGISTER et al., 2017).

O uso extra-bula do topiramato vem aumentando em outras condições como enxaqueca, obesidade, estresse pós-traumático e transtorno bipolar (STENLOF et al., 2007). O topiramato tem sido avaliado em alguns estudos clínicos em dependentes de álcool

(GUGLIELMO et al., 2015). Em estudos pré-clínicos, ele mostrou ser eficaz na redução da ingestão de álcool, redução dos seus efeitos de recompensa (JOHNSON et al., 2005; MOORE et al., 2014), bem como aumentou os dias de abstinência (KRANZLER et al., 2014). As evidências indicam que a transmissão glutamatérgica desempenha um papel fundamental na drogadição e, portanto, pode ser um alvo-chave para possíveis novos tratamentos farmacológicos (GASS et al., 2008; NEMIROVSKY et al., 2012).

Outro fator relacionado a drogadição, incluindo o distúrbio de uso de opioides, é a geração de radicais livres e por consequência dano e estresse oxidativo em áreas cerebrais. O estresse oxidativo, definido como um distúrbio no equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (radicais livres) e as defesas antioxidantes, é discutido em relação ao seu possível papel na produção de danos aos tecidos (BETTERIDGE, 2000). As drogas aditivas se relacionam ao estresse oxidativo uma vez que liberam dopamina para fenda sináptica e principalmente porque DA acumulada é suscetível à autooxidação e geração de DA-quinonas, que são capazes de danificar e inibir a função das macromoléculas (TEIXEIRA et al., 2009). Essas espécies reativas são capazes de inibir as funções mitocondriais, reduzindo assim a produção de ATP (BROWN; YAMAMAMOTO, 2003).

Na última década, a visão do estresse oxidativo se ampliou consideravelmente e agora é frequentemente visto como um desequilíbrio que tem suas origens em nossos genes e nas maneiras pelas quais a expressão gênica é regulada. No centro desse novo foco está o fator de transcrição denominado fator nuclear eritróide 2 ou *NRF2*. *NRF2* é referido como o “regulador mestre” da resposta antioxidante, modulando a expressão de centenas de genes, incluindo não apenas as conhecidas enzimas antioxidantes, mas um grande número de genes que controlam processos como respostas imunológica e inflamatórias, fibrose de tecidos, carcinogênese e metástase e até mesmo disfunção cognitiva e comportamento viciante. Assim, a desregulação de genes regulados por Nrf2 fornece uma explicação lógica para as conexões, diretas e indiretas, entre o estresse oxidativo observável e doenças envolvendo esses vários processos fisiológicos, cada um refletindo uma rede envolvendo muitos produtos genéticos (HYBERTSON et al., 2011). Até o momento não existe nenhum dado na literatura relacionando o *NRF2* com a drogadição ou até mesmo opioides.

A literatura demonstrou um aumento de espécies reativas no hipocampo em animais condicionados com morfina no modelo PLC (ROVERSI et al., 2016). Outras drogas estão relacionadas à geração de stress oxidativo a nível de SNC como por exemplo cetamina (SCHIMITES et al., 2020), cocaína (ANTONIAZZI et al., 2014), anfetamina (SEGAT et al.,

2014, METZ et al., 2019). Agentes oxidantes como ácido gálico já demonstraram possuir efeitos benéficos na redução de padrões oxidativos causado pela drogadição por ketamina tanto a nível central como periférico (SCHIMITES et al., 2020). Se tratando de geração de espécies reativas e estresse oxidativo, a utilização de um agente antioxidante também se torna um alvo para o tratamento de drogadição e recaída as drogas.

### **3. Nanotecnologia**

A falta de tratamento eficaz para a drogadição torna evidente que somente compostos ou fármacos já existentes não são atualmente suficientes para combater patologias como a drogadição. Nesse contexto destaca-se a importância do uso da nanotecnologia para o desenvolvimento de medicamentos com propriedades farmacêuticas aprimoradas.

A nanotecnologia foi desenvolvida com aplicação em ciências biomédicas a qual refere-se a intervenção médicas, prevenção, diagnóstico, monitoramento e tratamento de doenças (MOGHIMI, 2005). A partir de diferentes matérias primas e suas organizações em sistemas nanométricos torna-se possível modificar parâmetros farmacocinéticos como absorção e distribuição, consequentemente aumentando a eficácia e potência terapêutica, apresentando liberação controlada sem alteração do mecanismo de ação farmacológico (MOGHIMI, 2005).

Através da nanotecnologia, um fármaco pode ser incorporado a um sistema nanoestruturado e alcançar concentrações efetivas em tecidos alvos os quais não seriam alcançados na forma convencional do medicamento (DIMER et al., 2003). Um fármaco ou compostos que apresentam algumas limitações como baixa biodisponibilidade, potencial tóxico, estabilidades relativas, podem ter suas características melhoradas através de um nanocarreador (FORREST; KWON, 2008).

#### **3.1 Novas terapias que envolvem nanoformulações**

Nanotecnologia refere-se à criação, investigação e aplicação de estruturas, materiais, moléculas, interfaces internas ou superfícies com, pelo menos, uma dimensão crítica ou tipicamente inferior a 100 nm, resultando em novas funcionalidades e propriedades para melhorar produtos ou desenvolver novos produtos e aplicações (SULLIVAN et al., 2014). A nanotecnologia desempenha um papel importante para terapias futuras, através de sua união com medicamentos como “nanomedicamentos”, que são sistemas de tamanho nanométrico

que apresentam liberação direcionada e com velocidade controlada, maior estabilidade e biodisponibilidade, favorecendo sua eficácia e reduzindo sua toxicidade (SARAIVA et al., 2016). Esses novos sistemas de liberação de fármacos possibilitam a diminuição de doses requeridas para a resposta terapêutica reduzindo os efeitos adversos, como também aumenta os perfis de segurança (KOO et al., 2005).

As formas convencionais de liberação (liberação imediata) são formuladas para liberar o fármaco rapidamente após a administração, enquanto os sistemas de liberação modificada são projetados para modular a liberação do fármaco (PEZZINI et al., 2007). A literatura tem enfatizado a importância dos sistemas de liberação de medicamentos modificados. Os sistemas de liberação modificada promover melhorias na biodisponibilidade e farmacocinética dos medicamentos, trazendo a possibilidade de uma liberação local ou responsiva (em um local específico do corpo), possibilitando a redução dos efeitos adversos locais e sistêmicos (ROCHA et al., 2016). Atualmente têm se estudado as vantagens da nanoencapsulação de fármacos para o "delivery" cerebral. O emprego de sistemas nanoparticulados tem sido utilizado como carreadores de fármacos para delivery cerebral, por sua capacidade de modulação das propriedades físico-químicas e farmacocinética, e de controlar a liberação e distribuição em áreas alvos (SARAIVA et al., 2016). A entrega de drogas como sistemas nanométricos têm chamado a atenção por além de aumentar sua eficácia terapêutica (IANISKI et al., 2012), também sua propriedade inovadora de minimizar os efeitos colaterais (BENVEGNÚ et al., 2011; 2012; 2017).

A literatura já revela os benefícios da nanoencapsulação de fármacos já existentes. A encapsulação do haloperidol em nanocápsulas poliméricas demonstrou melhorar a eficácia terapêutica somado a uma redução de efeitos adversos e danos oxidativos cerebrais (BENVEGNÚ et al., 2011, 2012), e prevenindo a toxicidade periférica hepática e renal (ROVERSI et al., 2015). Além disso, modificações do núcleo lipídico dessa formulação indicaram superioridade terapêutica através da redução dos efeitos adversos (prejuízos motores) comuns ao uso deste fármaco (BENVEGNÚ et al., 2018).

Os fármacos antiepiléticos são conhecidos por apresentarem diversos efeitos adversos, entre estes fármacos destacamos o Topiramato. Além do seu uso antiepilético o topiramato tem sido utilizado com sucesso como tratamento para dependência de álcool (JOHNSON et al., 2003), dependência de metanfetamina (JOHNSON et al., 2005), dependência de cocaína (UMBRICHT et al., 2014; SÁNCHEZ-VILLAREJO et al., 2014), enxaqueca (SALISBURY-AFSHAR, 2014), obesidade (APPOLINARIO et al., 2002) e ganho de peso induzido por

antipsicóticos (WING et al., 2005). No entanto, o tratamento com topiramato apresenta uma série de efeitos adversos, como diminuição da atenção, confusão mental, problemas cognitivos dentre outros já citados anteriormente (KNAPP et al., 2015; SOYKA; MULLER, 2017). Alguns casos raros de tratamento com topiramato foram relatados para induzir miopia de início agudo durante o uso (MADAGMA et al., 2014).

O topiramato apresenta uma baixa biodisponibilidade cerebral e como consequência os efeitos adversos relacionados ao seu uso também se relacionam a sua elevada dose para alcançar a eficácia terapêutica (GUSTOW et al., 2008). Patel, Parikh (2020) demonstraram que a aplicação intranasal de nanoemulsão contendo topiramato ajuda consideravelmente a melhorar a biodisponibilidade do cérebro. Os quais também sugerem que esta nanoemulsão deve ajudar na redução da dose de TPM que minimiza ainda mais os eventos adversos relacionados à dose.

Ainda não existem relatos do uso do topiramato como tratamento para a drogadição a opioides. Diante da convergência entre o mecanismo de ação do topiramato e as alterações moleculares induzidas pela drogadição a opioides, utilizar a estratégia de vetorização cerebral pela nanoencapsulação de topiramato pode ser capaz de prevenir uma recaída a opioide apresentando menos efeitos adversos do fármaco em estudo.

Sabe-se que o estresse oxidativo se faz presente em diversas doenças neuropsiquiátricas como Alzheimer como no transtorno de uso de substâncias (CHEN; ZHONG, 2014). De tal forma o uso de agentes antioxidantes aliados a nanotecnologia pode ser uma ferramenta útil para a drogadição. Sendo assim, estudo *in vitro* demonstrou que o tratamento com nanopartículas de ácido ferúlico diminuiu a geração de Espécies reativas ao oxigênio, restabeleceu o potencial da membrana mitocondrial e diminuiu a ativação de vias apoptóticas em células de neuroblastomas (PICONE et al., 2009).

#### 4. JUSTIFICATIVA

Atualmente existem poucos tratamentos farmacológicos clinicamente úteis para a drogadição, especialmente com opioides, os quais apresentam eficácia limitada, já que não previnem os temidos episódios de recaída após retirada do uso da droga. Considerando a drogadição por opioides, a terapia de substituição da droga aditiva por outro opioide que desenvolva síndrome de abstinência mais curta e branda como a metadona ou buprenorfina, têm sido empregadas. Além da terapia de substituição com fármacos opioides não conferir eficácia e segurança que possibilite a cura ou total remissão da drogadição, ainda são capazes de desenvolver muitos efeitos adversos com possíveis complicações subsequentes (SCHUCKIT, 2016).

A alta taxa de recaída após abstinência prolongada constitui um desafio clínico central da drogadição, o qual representa a maior dificuldade para superação (EVERITT, 2014; TANAKA et al., 2011; O'BRIEN 1997). Até o presente, os tratamentos aplicados em clínicas especializadas apenas facilitam a retirada da droga, reduzindo os sintomas de abstinência, porém não evitam as freqüentes recaídas (MATTICK et al., 2014), como já comentado.

Desse modo, a identificação de mecanismos cerebrais responsáveis pela vulnerabilidade à recaída é crucial tanto para a prevenção da drogadição por opioides como para o desenvolvimento de tratamentos eficazes. Demonstrar que mudanças nos hábitos de vida, incluindo hábitos alimentares, podem influenciar na drogadição a opioides bem como demonstrar que estratégias farmacológicas podem ser aliadas aos fármacos já disponíveis, tornando-os mais eficazes na redução das taxas de recaídas é de extrema importância na temática da drogadição.

## 5. OBJETIVOS:

### 4.1 Objetivo geral:

Avaliar a influência do consumo de dietas composta por diferentes ácidos graxos sobre fatores relacionados à drogadição por morfina, bem como investigar adaptações neuromoleculares e as possíveis intervenções farmacológicas associadas a nanotecnologia sobre a recaída por morfina, utilizando um modelo de preferência de lugar condicionado em ratos.

### 4.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a influência da suplementação de diferentes ácidos graxos da dieta sobre comportamentos de recaída por morfina;
- Avaliar parâmetros de ansiedade, atividade locomotora e sensibilidade térmica, bem como possíveis alterações no eixo HPA durante o período de abstinência de morfina, nos mesmos animais suplementados com as diferentes dietas;
- Avaliar se a suplementação crônica dos ácidos graxos de uma dieta considerada benéfica para saúde pode ser capaz de prevenir o comportamento de recaída pela morfina;
- Verificar possíveis alterações na via dopaminérgica em áreas cerebrais relacionadas a drogadição após a recaída por morfina, nos mesmos animais suplementados com ácidos graxos de diferentes dietas.
- Avaliar o potencial terapêutico da administração de nanocápsulas contendo topiramato sobre comportamento de recaída por morfina, de memória de curto e longo prazo após o tratamento com nanocápsulas contendo topiramato, durante o período de abstinência da droga;
- Verificar possíveis alterações na via dopaminérgica e glutamatérgica em áreas do encéfalo relacionadas à drogadição após a recaída por morfina.
- Avaliar o potencial terapêutico da administração de nanocápsulas contendo ácido ferúlico sobre comportamentos de recaída por morfina;
- Avaliar parâmetros de memória de curto e longo prazo após o tratamento com nanocápsulas contendo ácido ferúlico, durante o período de abstinência da droga;

- Verificar possíveis alterações na via dopaminérgica, *NRF2* e  $\Delta$ FOSB em áreas do encéfalo relacionadas à drogadição após a recaída por morfina.

## **6. ARTIGO CIENTÍFICO 1**

O artigo científico intitulado “Mediterranean X Western based diets: Opposite influences on opioid reinstatement” foi publicado em 2019 na revista *Toxicology Letters* e seu acesso encontra-se aqui: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.03.009>

## **7. ARTIGO CIENTÍFICO 2**

O artigo científico intitulado “Topiramate-chitosan nanoparticles prevent morphine reinstatement with no memory impairment: Dopaminergic and glutamatergic molecular aspects in rats” foi publicado em 2021 na revista *Neurochemistry International* com o seguinte link de acesso: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105157>

## **8. MANUSCRITO CIENTÍFICO**

O manuscrito científico intitulado “Ferulic acid-loaded nanostructure prevents morphine reinstatement: dopaminergic involvement, *NRF2* and  $\Delta$ FosB in the nucleus accumbens of rats” será submetido posteriormente pois está pendente de outra publicação inicial.

**Ferulic acid-loaded nanostructure prevents morphine reinstatement: dopaminergic involvement, *NRF2* and  $\Delta$ FosB in the nucleus accumbens of rats**

Laura Hautrive Milanesi<sup>a</sup>; Domenika Rubert Rossato<sup>c</sup>; Livia Ferraz D'avila<sup>a</sup>; Jéssica Leandra Oliveira Rosa<sup>a</sup>; Vinícia Gazella Metz<sup>a</sup>; Camila Reck Rampelotto<sup>b</sup>; Viviane Gonçalves Pereira<sup>d</sup>; Scheila Rezende Schaffazick<sup>d</sup>; Cristiane de Bona da Silva<sup>b</sup>; Marilise E. Burger<sup>a,c\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFSM, RS, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Farmácia, UFSM, RS, Brazil

**\*Corresponding author:**

marilise.burger@ufsm.br

Physiology and Pharmacology Department

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Santa Maria-RS, 97105-900 Brazil.

**Highlights:**

- Morphine reinstatement upregulates *NRF2* and  $\Delta$ FosB and in Nac.
- Ferulic acid nanoencapsulated (FA-Nc) prevents morphine-reinstatement.
- Nanotechnology increase effects of FA-F.
- FA-Nc modulates positively DA neurotransmission.
-

- **Conflict of interest**
- 
- The authors declare that there are no conflicts of interest. **Abstract**

Ferulic acid (FA), a phenolic phytochemical, has been reported to exert antioxidative and neuroprotective effects. Morphine is among the most powerful analgesics and pain-relieving agents. However, its addictive properties limiting their medical use, making them susceptible to abuse and reinstatement, favoring the illicit use of opioid, what so adding to the global drug addiction problem. Morphine addiction occurs due to the release of dopamine in the mesolimbic brain area, which implies an increase in oxidative stress in this region. The aim of this study was evaluate the protective effects of a novel nanosystem with Ferulic acid (FA) on morphine reinstatement, as also on the consequent molecular adaptations in the mesolimbic region. Rats previously exposed to morphine in conditioned place preference (CPP) paradigm were treated with Ferulic acid-loaded nanocapsules (FA-Nc) or non-encapsulated FA (F-FA) during morphine-preference extinction; following memory performance evaluation in the novel object recognition test (NORT), animals were re-exposed to morphine reinstatement. Whereas morphine-preference extinction was comparable among all experimental groups, FA-Nc treatment prevented morphine reinstatement, preserving also the memory performance, which was impaired by morphine-conditioning. In the nucleus accumbens (NAc) morphine-reinstatement increased D1R, D3R, DAT,  $\Delta$ FosB immunoreactivity. FA-Nc treatment decreased D1R, D3R and  $\Delta$ FosB and increased D2R, DAT and *NRF2* in the NAc. In conclusion, FA-Nc treatment prevented morphine-reinstatement, modified the dopaminergic neurotransmission, *NRF2* and  $\Delta$ FosB in the NAc, what may indicate an antioxidant- and neuroprotective-role of this nanoformulation.

**Keywords:** opioid addiction, conditioned place preference (CPP),  $\Delta$ FosB, *NRF2* Dopamine receptor, *Nucleus accumbens* (NAc), nanoencapsulated- ferulic acid

## Introduction

Ferulic acid (FA) is a well-known phenolic compound (Figure 1) found in fruits, cereals, coffee and vegetables, thus exerting beneficial antioxidant activity in different situations, including neurodegenerative diseases (Barone et al., 2009; Zhao et al., 2008). Polyphenols like FA are effective scavengers of free radicals and superoxide anions, being frequently used to prevent lipoperoxidation of foods (Srinivasan et al., 2007). Furthermore, FA is also considered an inhibitor of enzymes that catalyze free radical generation, thus ameliorating its protective activity (Zduńska et al. 2018).

In addition to antioxidant properties, experimental studies have demonstrated that the FA presents extensive range of therapeutic effects, such as anti-inflammatory, antimicrobial, anticancer, and antidiabetic effects (Gao et al., 2018; Bumrungpert et al., 2018; Zduńska et al. 2018).

Considering the central nervous system (CNS), FA showed neuroprotective activity (Kim et al., 2004), useful on neurological disease such as focal cerebral ischemia (Cheng et al., 2008; Kim et al., 2004), epilepsy (Hassanzadeh et al., 2017), Parkinson's- (Askar et al., 2019) and Alzheimer's-disease (Benchekroun et al., 2016), besides depression (Xu et al., 2013).

In spite of its promissory important pharmacodynamics feature, FA presents significant limitations, what hinders its therapeutic use (Barrone et al., 2009). Due to hydrophobic nature, FA presents poor solubility in aqueous solution, representing a barrier in its bioavailability and clinical efficiency. Thus, when administered orally, FA undergoes marked first-pass effects which pose limitations on its bioavailability (Trombino et al., 2013). The development of new technologies has a great interest in developing a nano carrier system to improve therapeutic properties of bioactives (Mukherjee et al., 2015). Nanosystems permit a long-term administration of hydrophilic and lipophilic drugs to the target tissue. In this way, nanoparticles improve their pharmacokinetic properties, optimizing the delivery and pharmacological activity of the drug in the target tissue (Bairagi et al., 2018). Currently, nanoencapsulated FA is used in various topical formulations for aesthetic treatments and skin care (Harwansh et al., 2015).

Oxidative stress is frequently associated to different chronic diseases, including drug addiction. At molecular level, development of addiction and reinstatement modify different brain areas, evoking neuroadaptive and neurochemical mechanisms to dysregulate the

reward system (Ikemoto et al., 2015). In this sense, opioids are able to produce significant changes in dopaminergic neuronal pathways, leading to neurotoxic events, which are also related to oxidative stress, excitotoxicity and mitochondrial dysfunction (Goncalves et al., 2014, Xu et al., 2006). Considering an increasing of the DA release, favoring its accumulation in the synaptic cleft (Robertson et al., 2009), such excess is susceptible to autoxidation and generation of DA-quinones, which can damage neurons and other cells (Teixeira et al., 2009).

Opioid addiction is recognized as a psychiatric disorder characterized by chronic neuroadaptation and behavioral alterations that play a central role on a high risk of reinstatement (Koob, Volkow 2016). In fact morphine, a pivotal opioid representative, stimulates dopamine transmission in the nucleus accumbens (NAc), unbalancing the mesocorticolimbic brain area, thus exerting a critical role in the reinstatement (Milanesi et al., 2019). Morphine has a highly addictive power and its misuse is characterized by the uncontrolled drive to obtain the substance and failure to limit its use despite adverse (Kalivas et al., 2005). According to The United Nations World Drug Report 2019, the use of opioids is responsible for two thirds of the deaths attributed to drug use disorders. In addition, opioid addiction is also associated with excess morbidities and social costs (UNODC, 2019). The effective treatments for opioid addiction are still lacking since the current treatments, methadone or buprenorphine for example, have a known limited ability to attract and retain patients in treatment (Mattick et al., 2014), being also related to abuse.

The identification of brain mechanisms that can be responsible for the recognized vulnerability to reinstatement to opioid drugs is crucial for implementation of an effective treatment for drug addiction (Georgiou et al., 2015). Exogenous antioxidants could restrain the oxidative stress, even alleviate opioid reinstatement in addicted animals (Zhou, Kalivas et al., 2008) also FA has gained considerable attention as a low-toxicity dietary supplement for its potential antioxidant (Mancuso et al., 2014). The current study was developed to investigate possible beneficial influences of the FA loaded-nanocapsules (FA-Nc) on the prevention of morphine reinstatement, also accessing molecular changes in the dopaminergic system, transcription factors related to, besides antioxidant cascade in the mesolimbic brain area, which is closely related to reward and addiction.

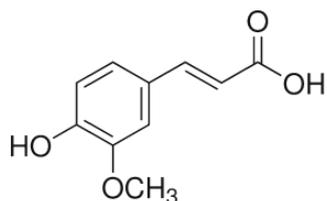


Figure 1: Chemical compost of ferulic acid.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Animals

Thirty six male Wistar rats (60-day old) from the breeding facility of the Federal University of Santa Maria (UFSM), RS, Brazil, were kept in Plexiglas cages with free access to food and water in a room with controlled temperature ( $22 \pm 2$  °C) and on a 12-h light/dark cycle. This study was approved by the Animal Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (7948130516-UFSM) affiliated to the Council for the Control of Animal Experiments (CONCEA).

### 2.2 Drugs and solutions

Morphine sulfate (Cristália®, São Paulo, Brazil) was diluted in 0.9% NaCl solution and intraperitoneally injected (i.p.) in a dose of 4 mg/kg for conditioning (Vey et al., 2015; Roversi et al., 2016; Milanesi et al., 2017), and 2 mg/kg for reinstatement (Milanesi et al., 2019) and vehicle injections were 0.9% NaCl solution in a 1mL. Ferulic acid and sorbitan monooleate were obtained from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil); polysorbate 80 and medium chain triglycerides were acquired from Delaware (Porto Alegre, Brazil) and ethycellulose was donated by Colorcon® (Cotia, Brazil).

### 2.3 Preparation of Ferulic acid-loaded nanocapsules

Nanocapsule suspensions containing ferulic-acid were prepared by the interfacial deposition of a preformed polymer (Fessi et al., 1989), according to the experimental conditions described by Rampelotto (2020). The organic phase constituted of ferulic acid, ethylcellulose, sorbitan monooleate, medium chain triglycerides and acetone which were poured under magnetic stirring into an aqueous solution containing polysorbate 80. The

organic solvent and part of water were removed by evaporation under reduced pressure. EDTA was added to a final phase and the final volume was adjusted in order to obtain 0.5 mg/mL of ferulic acid (NC-FA). Blank nanocapsules (B-NC) were prepared using the same protocol, but omitting the drug.

### 2.3 General procedures

After acclimatization, the animals were randomly assigned to two experimental groups (saline-0.9% NaCl n=6 per group, and morphine-4mg/Kg, n=30 per group) and submitted to the conditioned place preference (CPP) protocol with morphine (as described below). After the first CPP test, which was performed to verify morphine preference, the morphine group was re-assigned according to the following treatment by gavage for 9 days, during the CPP extinction: Vehicle (0.9% NaCl), Blank-Nc (B-Nc), ferulic acid nanocapsules (FA-Nc, 0.5mg/kg) and non-encapsulated ferulic acid (F-FA, 0.5mg/kg). Thus, the experimental protocol was performed with five experimental groups (n=6): i) Saline-Saline ii) Morphine-Vehicle, iii) Morphine-Blank-Nc, iv) Morphine-FA-Nc, v) Morphine-F-FA. Subsequently to the treatment, memory performance was assessed by Novel object recognition test (NORT). After treatments administration, the animals received an additional single dose of saline or morphine (2mg/kg) in the CPP paradigm to observe morphine-reinstatement (Milanesi et al., 2019). Following 24h of the CPP-reinstatement protocol, all animals were anesthetized (isofluorane), euthanized by exsanguination and and the brain tissue was removed for molecular analysis (Figure 2).

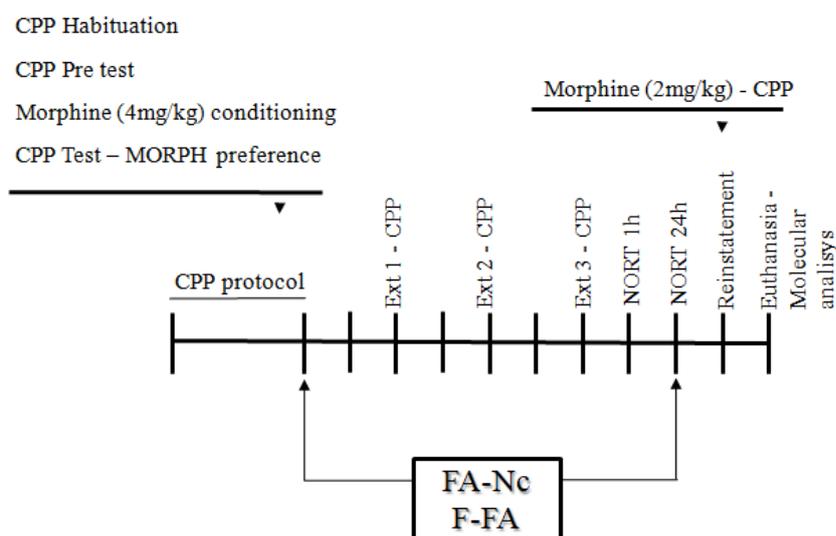


Figure 2: Experimental design: Animals were conditioned with morphine (4 mg/kg, i.p.) for four days in the CPP paradigm. After morphine-CPP, animals were submitted to the different treatments, when the morphine-preference was monitored in the CPP paradigm every two days until drug preference extinction. After morphine-CPP extinction and during treatments, memory performance was assessed in the NORT paradigm. Sequentially, animals were challenged with morphine-reinstatement (2 mg/kg, i.p.) in the CPP apparatus. Abbreviations: CPP: Conditioned place preference; Ext: Extinction test in CPP; NORT: Novel object recognition task, FA-Nc: ferulic acid-loaded nanocapsules; F-FA: non-encapsulated ferulic acid.

#### **2.4 Conditioned place preference (CPP) procedure**

The CPP procedure is a well-established behavioral paradigm that has been widely employed to assess symptoms of reward, extinction and relapse to addictive drugs (Thanos et al., 2010). It uses three compartments in the boxes, which are separated by manual guillotine doors: two compartments of equal size (45 cm × 45 cm × 50 cm) with different visual clues: one with white floor and striped walls and other with striped floor and smooth white walls. These two compartments converge to a third smaller compartment. The CPP procedure was performed following these steps: habituation, pre-test, conditioning, test, extinction and reinstatement test (Milanesi et al., 2019). On day 1, rats were kept for 15 min in each compartment for habituation. On the next day, we performed the pre-test, that consists of letting the animal freely choose one of the compartments for 15 min. Animals that showed preference (more than 70%) for any compartment were excluded from the experimental protocol. On the following 4 days, animals were conditioned with morphine (4 mg/kg, i.p.) placed for 45 min in the compartment they spent less time during the pre-test, and then with the vehicle in the paired compartment, with an interval of 6 h between each conditioning. The control group was injected with the vehicle (0.9% NaCl, i.p.) on both sides of the apparatus. On the testing day, rats were individually placed in the center of the chosen chamber with free access to both compartments for 15 min, without any injection. Time spent in the drug-paired environment was interpreted as morphine preference. For extinction of morphine CPP, the animals were placed in the CPP apparatus every other day and were allowed to freely access all compartments for 15 min. The time spent, in each compartment was recorded and the conditioning score was calculated in the same way as in the pre-test and test. This procedure was repeated until the calculated conditioning scores in two consecutive extinction tests

became similar to those on the pre-conditioning day. After morphine-CPP extinction, the animals were challenged to morphine reinstatement to induce drug relapse. The reinstatement test was performed on the day following a successful extinction test. On the reinstatement day, animals received the vehicle or morphine (2 mg/Kg, i.p.) and the test was immediately measured by giving the animals free access to both sides of the apparatus for 15 min (Milanesi et al., 2019).

### **2.5 Novel object recognition task (NORT)**

This protocol is related to the animal natural impulse to explore novelties, being considered an innate impulse to recognize their environment. An elevated score implies a higher recognition rate, indicating better memory. NORT was performed in the arena as previously described by de Lima et al., 2005: the arena floor was covered with sawdust (from bedding material) during the recognition memory training and test trials. On the first day (training trial), animals were exposed to two identical objects (O1 and O2, double Lego toys) that were positioned in two adjacent corners of the box. Rats freely explored the objects for 5 min. After the training session, testing of short-term memory and long-term memory was performed 1 and 24 h, respectively. Animals explored the arena for 5 min in the presence of two objects: the familiar Object O1 and a second novel Object O3 or O4, which were placed on the same locations as in the training session. The objects were similar to each other (color, texture and size), but presenting different shapes. All objects were cleaned with a 5% alcohol solution between each trial. Exploration event was defined as sniffing/ touching the object with the nose. A recognition index calculated for each animal was expressed by the ratio  $TN/(TF + TN)$  (TF = time spent exploring the familiar object; TN = time spent exploring the novel object).

### **2.6 Immunoblotting**

Nucleus Accumbens (NAc) was removed according to Paxinos and Watson (2013). The NAc was homogenized with a lysis buffer containing 137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% NP40, 10% glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 µg mL<sup>-1</sup> aprotinin, 0.1 mM benzethonium chloride, and 0.5 mM sodium orthovanadate. Protein determination was performed in the supernatant after sample centrifugation according to the MicroBCA procedure (Pierce, IL, USA). Proteins were separated by electrophoresis on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels (SDS-PAGE) and electrotransferred to PVDF

membranes. The membranes were incubated with primary antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA): anti-actin (1:1000), anti-dopamine transporter (DAT) (sc-14002, 1:500), anti-dopamine receptor 1 (D1R) (sc-33660, 1:500), anti-dopamine receptor 2 (D2R) (sc- 9113, 1:500), anti-dopamine receptor 3 (D3R) (sc-1362, 1:500), anti-GluA1 subunit (sc-55509, 1:500), anti-mu opioid receptor (MOR) (sc- 515933, 1:500) followed by anti-mouse or anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugate (1:40.000); Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Immune complexes were visualized by chemiluminescence using the ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc., NJ, USA) and the band intensities were quantified with ImageJ software (NIH). Actin was used as an internal control and data was standardized according to its values.

## 2.7 Statistical analysis

Comparison between saline group and morphine-conditioned group was analyzed by Student's t-test. Comparisons among the different treatments administered in the morphine-exposed animals were analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan's test (Software package Statistic 8.0 for Windows). The asterisk symbol (\*) was used to compare saline versus morphine-vehicle group (Student's t-test), lowercase letters were used to show statistical difference (one-way ANOVA/Duncan's test) among all morphine-conditioned experimental groups: different lowercase letters indicate significant difference. All data were expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.). Values of  $p < 0.05$  were considered statistic significant for all comparisons made. GraphPad Prism® (version 6) was used to design the figures.

## 3. Results

### 3.1 Morphine-conditioned place preference (CPP), morphine preference extinction and morphine reinstatement in CPP paradigm: Influence of FA treatments

In the CPP test, as expected, student's t-test showed that morphine group spent longer time in the drug-paired compartment in relation to saline group, indicating morphine preference (Fig 3A). In the the three morphine-preference extinction tests, which were performed in the CPP paradigm, Student's t-test (saline versus morphine group) and Duncan's test (among all morphine conditioned experimental groups) showed no significant differences. The last extinction test is shown in the figure (Fig 3B). Subsequently to

morphine-preference extinction and treatments, animals were challenged to morphine-preference reinstatement in the CPP paradigm: as expected, Student's t-test showed that morphine-exposed group spent 128.5% longer time in the drug-paired compartment in relation to saline, indicating drug reinstatement. Among morphine-conditioned groups, Duncan's test showed that FA-Nc treated group spent similar time in both CPP compartments, indicating no development of morphine-reinstatement, whereas other experimental groups stayed longer time in the morphine-paired compartment, indicating drug-reinstatement. In fact, FA-Nc group showed no place preference, unlike F-FA group, which stayed 38.79% more time in the morphine-paired compartment (Fig. 3C).

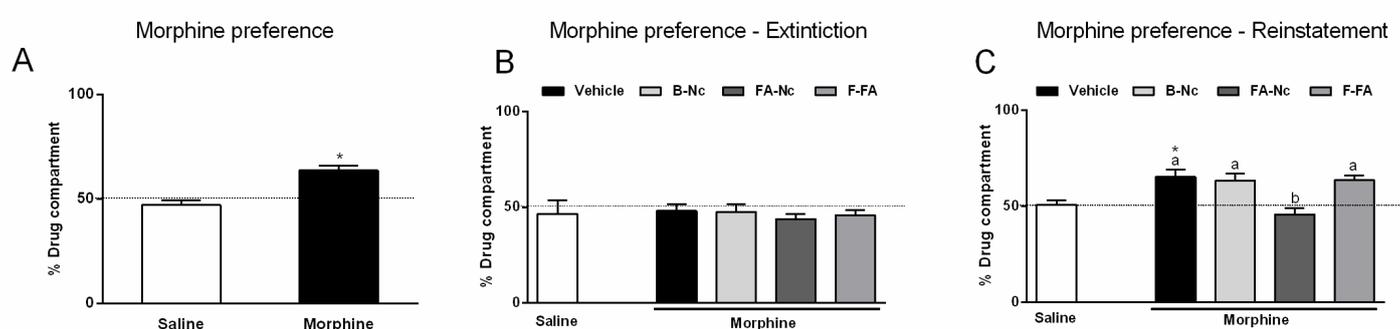


Figure 3: MORPH preference (CPP) (A) MORPH-preference extinction 3 (B) and MORPH-preference reinstatement in CPP (C): Influence of the FA treatments. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. ( $p < 0.05$ ). \*indicates significant difference from saline; Different lowercase indicates significant difference among morphine-conditioned groups. Abbreviations: MORPH: morphine; B-Nc: blank; FA-Nc: ferulic acid-loaded nanocapsules; F-FA: non-encapsulated ferulic acid.

### 3.2 Novel object recognition test (NORT) in morphine-conditioned rats: Influence of FA treatments

After morphine-preference extinction and during the FA treatment, memory behavior was evaluated in two different periods. Student's t-test showed that morphine exposure impaired short-term recognition memory (1h) in relation to saline (Fig. 4A). Comparisons among morphine-conditioned groups showed that FA-Nc treatment increased the recognition index (1h) in relation to all other morphine-conditioned groups (Fig. 4A)

indicating a recover of the short-term memory. In the long-term recognition index test (24h) no statistical differences were observed among the experimental groups (Fig 4B).

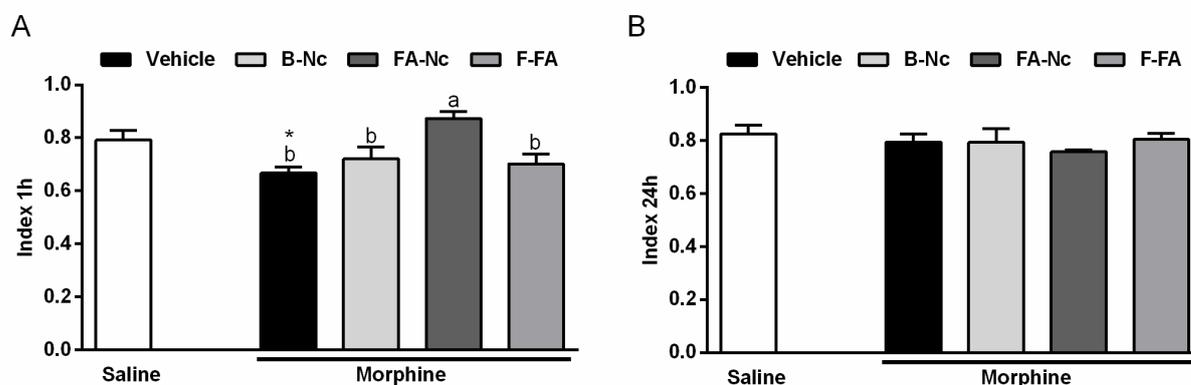


Figure 4: Influence of FA treatments in morphine conditioned rats on the novel object recognition test (NORT): Short-term memory (STM) and long-term memory (LTM) retention tests were performed 1 h (A) and 24 h (B) after training, respectively. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. ( $p < 0.05$ ). \*indicates significant difference of saline; Different lowercase indicates significant difference among morphine-conditioned groups. Abbreviations: B-Nc: blank; FA-Nc: ferulic acid-loaded nanocapsules; F-FA: non-encapsulated ferulic acid.

### 3.3 Influence of morphine exposure and FA treatments on $\Delta$ FosB and *NRF2* immunoreactivity in the NAc

Student's t-test showed that morphine increased  $\Delta$ FosB levels in the NAc in comparison to saline group (Fig 5A). Among morphine-exposed animals, Duncan's test showed that both Nc-FA and F-FA decreased  $\Delta$ FosB immunocontent in relation to vehicle group, whose levels were similar each other (Fig 5A). Furthermore, Nc-FA increased *NRF2* in relation to both vehicle and B-Nc, presenting comparable *NRF2* level in relation to F-FA group (Fig 5B).

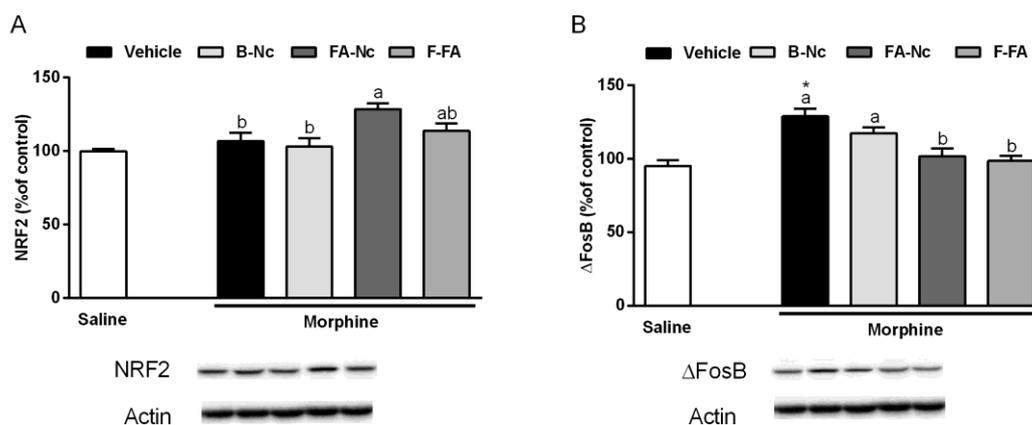


Figure 5: Influence of morphine exposure and FA treatments on the immunoreactivity of  $\Delta$ FosB (A) and *NRF2* (B) in the NAc. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. ( $p < 0.05$ ). \*indicates significant difference from saline group; Different lowercase indicates significant difference among morphine-exposed groups. Abbreviations: B-Nc: blank; FA-Nc: ferulic acid-loaded nanocapsules; F-FA: non-encapsulated ferulic acid; NAc: Nucleo accumbens.

### 3.4 Influence of morphine exposure and FA treatments on dopaminergic targets immunoreactivity in the NAc

Student's t-test showed that morphine increased D1R, D3R and DAT levels in relation to saline group (Fig 6 A, C and D). As expected, among morphine-exposed animals, Duncan's test showed that both vehicle and Nc-B injected groups presented comparable immunoreactivity in all receptors and transporter here evaluated. Interestingly, FA-Nc treatment decreased D1R and D3R (Fig 6A, C) immunocontent in relation to vehicle, indicating be comparable to F-FA, which was similar to both vehicle and -B-Nc injected groups. Additionally, FA-Nc treatment increased D2R and DAT (Fig 6B, D) immunocontent in relation to vehicle. In fact F-FA treatment presented both D2R and DAT levels similar to those observed in vehicle and -B-Nc administrations (Fig. 6B and 6D).

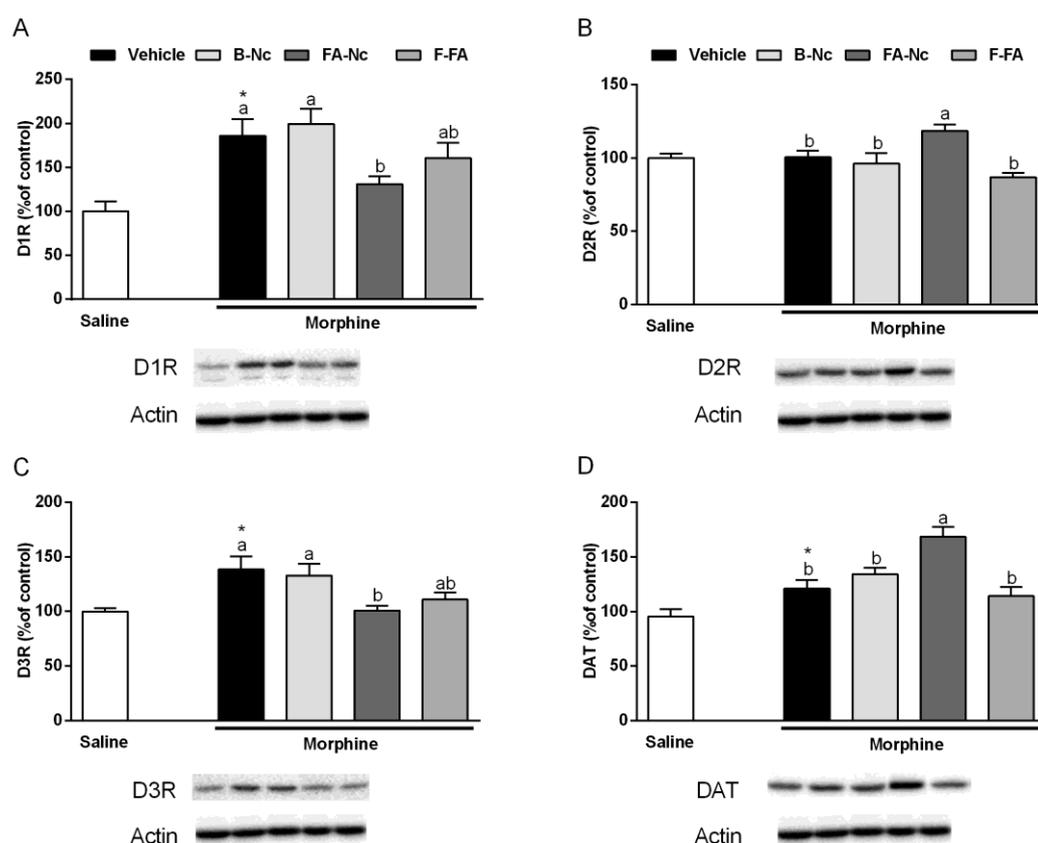


Figure 6: Influence of morphine exposure and FA treatments on the immunoreactivity of D1R (A), D2R (B), D3R (C) and DAT (D) in the NAc. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. ( $p < 0.05$ ). \*indicates significant difference of saline; Different lowercase indicates significant difference among morphine-exposed groups. Abbreviations: B-Nc: blank; FA-Nc: ferulic acid-loaded nanocapsules; F-FA: non-encapsulated ferulic acid; NAc: Nucleo accumbens; D1R: Dopamine 1 receptor D2R: Dopamine 2 receptor; D3R: Dopamine 3 receptor; DAT: Dopamine transporter.

## Discussion

Drug reinstatement following periods of abstinence and treatment is a major obstacle in the addiction success and healing. In this study, we aimed to investigate the effect of FA loaded-nanocapsules (FA-Nc) on morphine reinstatement also accessing molecular changes and transcription factors besides antioxidant cascade in the dopaminergic system. Interestingly, our findings are showing that, regardless of the nanoencapsulation, FA treatment (FA-Nc and F-FA) did not modify the extinction of morphine-preference, however, the nanoencapsulated FA, but not the non encapsulated FA preserved short-term

memory, which was impaired by morphine exposure. Sequentially, we also observed the superiority of the FA nanoformulation, when this treatment was able to prevent morphine reinstatement, since non-encapsulated FA did not show this beneficial effect. In fact, the absence of place preference observed in FA-Nc treated group was not related to memory loss, since this experimental group did not show memory impairment, as observed in the NORT paradigm. Besides these beneficial behavioral changes, FA-Nc treatment was also capable to modify immunoreactivity of molecular targets in the NAc, a dopaminergic brain area closely related to addiction: i) increased the levels of the antioxidant NRF2; ii) restored the morphine-induced D1-R and D3-R increased levels, also increasing DAT levels, which is closely related to DA self-regulation pathway; iii) decreased  $\Delta$ FosB levels, desactivating the addiction chronic cascade. Based in these outcomes, we propose an important role of the nanotechnology to optimize the beneficial effects of the FA, which was here used in the same dosis as its non-encapsulated, also contributing to a better understanding of the morphine reinstatement pathway.

Continuing about argumentation of the subject proposed here, studies have shown that morphine and other opioidergic agents negatively affect cognitive and learning functions (Chen et al., 2016), whose impairments can be easily observed in the NORT paradigm (Gong et al., 2019). However, it is difficult to explain learning and memory deficits that are concurrent with drug triggered contextual memories (Dacher, Nugent 2011). In this context, rodents successfully learn CPP to morphine, suggesting that normal drug-context learning occurs through the drug reinforcing effects. One possibility is that opiate use related cues are flagged as salient, so grabbing the drug users' attention and impairing the context-dependent memory in a natural environment (Wang et al., 2018). In view that our findings showed impairments in the short- but not in long-term memory morphine-induced itself, FA-Nc treatment ameliorated the short-term memory of animals that were also exposed to morphine. Considerable evidences have shown positive effects of the FA on cognitive, learn and memory (Mori et al., 2019, Wang et al., 2017), but to the best of our knowledge, there are no data that have shown this effect with nanoencapsulated FA. The positive influence of the FA-Nc on learning and memory parameters deserves further study in the near future.

Among other opioid drugs, morphine induces changes on synaptic plasticity of the mesolimbic brain area such as NAc, which is directly involved in opioid-induced reward behaviors (Zhu et al., 2016). In this sense, in relation to other tissues, the brain is highly

susceptible to oxidative damages, especially due to its vulnerability to neurotransmitters autooxidation processes together with its high oxygen consumption (Friedman et al. 2010). The nuclear factor erythroid 2 – related factor 2 (*NRF2*) is a master regulator of a complex biological network of both molecules and enzymes implicated in the redox homeostasis (Sivandzade et al., 2019). *NRF2* signaling is indeed a critical cytoprotective system for the cells to survive oxidative stress stimuli and maintain the appropriate redox balance in the brain (Kansanen et al., 2013).

Literature data showed that *NRF2*-knockout mice substantially presented increased susceptibility to diseases development consequent to oxidative damages (Kensler et al., 2007). Hedonic effects related to reward system generated by addictive drugs are closely consequent to DA release in the mesolimbic region, whose cumulation may favor oxidative damages due to high susceptibility of this neurotransmitter to autooxidation and generation of DA-quinones able to damage macromolecules function (Segat et al., 2017). Indeed, our findings showed that while FA-Nc treatment increased the *NRF2* immunoreactivity, non-encapsulated FA treatment was not different of the vehicle, suggesting superiority of the nanotechnology on the antioxidant properties and also on FA neuroprotection on the *NRF2*.

$\Delta$ FosB and FosB are members of the Fos family, constituting transcription factors that are implicated in the addiction neural plasticity. Induced expression of  $\Delta$ FosB is considered a biomarker of specific neural plasticity after chronic use of addictive drugs (Nestler, 2015). Previous studies have demonstrated that repeated exposure to morphine increases  $\Delta$ FosB levels in brain regions related to the positive reinforcing effects of drugs, such as the NAc (Muschamp et al., 2012). The outcomes shown here indicate that morphine exposure increase the  $\Delta$ FosB immunoreactivity in the NAc, whereas both treatments FA-Nc and F-FA reduced this effect. Literature still lacks data that demonstrate effects of both F-FA and FA-Nc on the  $\Delta$ FosB, however, as far as we know, we are showing by the first time that the FA-Nc reduced this transcription factor closely related to drug addiction.

$\Delta$ FosB accumulation serves a more general role in the formation and maintenance of compulsive behaviors by reinforcing the efficacy of neural circuits (Nestler 2013). It has also been shown that the induction of  $\Delta$ FosB is mediated by the D1R pathway, since Morphine-induced  $\Delta$ FosB up-regulation in the NAc was partially blocked by pretreatment with SCH 23390, a selective D1R antagonist (Muller, Unterwald, 2005), suggesting that D1R is involved in the regulation of  $\Delta$ FosB morphine-induced. Taken together, our findings

of D1R immunoreactivity were also increased by morphine exposure, while FA-Nc treatment completely reduced and F-FA partially decreased these levels.

The enhanced DA release as well as the activation of dopaminergic receptors have been proposed to mediate positive reinforcing effects of the addictive drugs, and may also highlight the motivational value of drugs, following their withdrawal, then promoting the drug reinstatement (Koob, Le Moal 2001). Through D1R and D3R in the NAc, dopaminergic pathway plays a key role in morphine addiction (Galaj et al., 2018) and reinstatement (Milanesi et al., 2017).

Pharmacological studies have demonstrated that D1R activation in the NAc is critical for opioid reinstatement (Milanesi et al., 2019), whereas its antagonism prevents morphine reinstatement (Nazari-Serenjeh et al., 2020). Literature data indicate the central role of D3R antagonism in the opioid addiction prevention (Hu et al., 2013) and reinstatement (You et al., 2019). Besides, both D1R and D3R, co-expressed in dopaminergic neurons, can interact physically by forming a functional interaction between them, in addition to forming heteromers (Cruz-Trujillo et al., 2013, Marcelino et al., 2008).

There is few data on the effect of FA on the dopaminergic system however it is already known the protective effect of FA on striatal dopaminergic neuron against oxidative stress and apoptosis (Asano et al., 2017). From that, our current findings are showing increased D1R and D3R immunoreactivity in the same experimental groups that presented morphine-reinstatement, whereas FA-Nc treated group did not present drug reintegration, thus presenting decreased levels of both D1R and D3R. Given the involvement of D1 and D3 receptors in addiction-related behaviors, we suggest that the similar effect on both receptors caused by FA-Nc treatment may have prevented the morphine reinstatement.

Following release, clearance of dopamine from the extracellular space is primarily determined by uptake by the dopamine transporter (DAT) (Ford et al., 2010). Moreover, D2-autoreceptors also regulate DA neurotransmission by decreasing the neuronal excitability, reducing DA synthesis (Ford, 2014) and inhibiting DA release (Congar et al., 2002). In light of this, our findings showed that morphine-reinstatement increased DAT immunoreactivity, causing no changes in the D2R immunoreactivity in the NAc. Additionally, our findings of FA-Nc treatment, which did not present morphine-reintegration, showed increased immunoreactivity of both DAT and D2R in the NAc. From these findings we can infer that greater DAT and D2R immunoreactivity may contribute for reducing dopaminergic signaling, thus preventing morphine reinstatement.

It is known that both regulatory transcription factors, *NRF2* and  $\Delta$ FosB, as changes in dopaminergic system in the mesolimbic region are related to morphine-addiction and -reinstatement. So far, literature lacks data showing favorable effects of both non-encapsulated- and nanoencapsulated-ferulic acid on the addiction parameters analyzed here. Bringing this context for our findings, we are showing for the FA-Nc treatment was able to prevent morphine reinstatement, also increasing levels of transcription factors of the antioxidant cascade, *NRF2*, dopaminergic negative feedback, thus decreasing  $\Delta$ FosB and dopaminergic pathway activation. Indeed, a better understanding of both plasticity and reinstatement morphine-induced is needed in order to provide more effective therapies for opioid addiction disorder.

## **Conclusion**

The recent rise in opioid addiction has made development of new treatments a public health priority. In order to ameliorate this public health crisis, the development of effective pharmacotherapies for the prevention and treatment of opioid abuse and addiction is urgent. In summary, our study is showing the FA-Nc treatment prevents morphine-reinstatement, conferring an antioxidant neuroprotective role to this innovative nanoformulation.

## **Acknowledgements and funding**

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. This study is part of the National Institute of Science and Technology in Pharmaceutical Nanotechnology: a transdisciplinary approach INCT-NANOFARMA, which is supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil) Grant #2014/50928–2, and by “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq, Brazil) Grant # 465687/2014–8. Authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil); CAPES, Brasil; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brasil) and PRPGP-UFSM (PROAP) for their fellowships and financial support.

## References

Asano, T., Matsuzaki, H., Iwata, N., Xuan, M., Kamiuchi, S., Hibino, Y., Sakamoto, T. Protective Effects of Ferulic Acid against Chronic Cerebral Hypoperfusion-Induced Swallowing Dysfunction in Rats. *Int J Mol Sci.* 2017 Mar 3;18(3):550. doi: 10.3390/ijms18030550.

Askar MH, Hussein AM, Al-Basiony SF, Meseha RK, Metias EF, Salama MM, Antar A, El-Sayed A. Effects of Exercise and Ferulic Acid on Alpha Synuclein and Neuroprotective Heat Shock Protein 70 in An Experimental Model of Parkinsonism Disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2019;18(2):156-169. doi: 10.2174/1871527317666180816095707.

Barone E, Calabrese V, Mancuso C. Ferulic acid and its therapeutic potential as a hormetin for age-related diseases. *Biogerontology*, 10, 97–108 (2009).

Benchekroun M, Romero A, Egea J, León R, Michalska P, Buendía I, Jimeno ML, Jun D, Janockova J, Sepsova V, Soukup O, Bautista-Aguilera OM, Refouvelet B, Ouari O, Marco-Contelles J, Ismaili L. The Antioxidant Additive Approach for Alzheimer's Disease Therapy: New Ferulic (Lipoic) Acid Plus Melatonin Modified Tacrines as Cholinesterases Inhibitors, Direct Antioxidants, and Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like 2 Activators. *J Med Chem.* 2016 Nov 10;59(21):9967-9973.

Bumrungpert A, Lilitchan S, Tuntipopipat S, Tirawanchai N, Komindr S. Ferulic Acid Supplementation Improves Lipid Profiles, Oxidative Stress, and Inflammatory Status in Hyperlipidemic Subjects: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Nutrients.* 2018 Jun 2;10(6):713. doi: 10.3390/nu10060713.

Chen, Y., Fu, Y., An, Y., Cao, J., Wang, J., Zhan, J. Interactive Effects of Morphine and Dopamine Receptor Agonists on Spatial Recognition Memory in Mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2018 doi: 10.1111/1440-1681.12889.

Cheng CY, Su SY, Tang NY, Ho TY, Chiang SY, Hsieh CL (2008) Ferulic acid provides neuroprotection against oxidative stress-related apoptosis after cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting ICAM-1 mRNA expression in rats. *Brain Res* 1209:136–150 27.

Congar P, Bergevin A, Trudeau LE. D2 receptors inhibit the secretory process downstream from calcium influx in dopaminergic neurons: implication of K<sup>+</sup> channels. *J Neurophysiol.* 2002; 87:1046–1056. [PubMed: 11826068]

Cruz-Trujillo, R., Avalos-Fuentes, A., Rangel-Barajas, C., Paz-Bermudez, F., Sierra, A., Escartín-Perez, E., Aceves, J. Erlij, D., Florán, B. D3 Dopamine Receptors Interact With Dopamine D1 but Not D4 Receptors in the GABAergic Terminals of the SNr of the Rat. *Neuropharmacology.* 2013 doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.11.032. Epub

Dacher M, Nugent FS. Opiates and plasticity. *Neuropharmacology.* 2011 Dec;61(7):1088-96. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.01.028. Epub 2011 Jan 25.

Nestler, E.J. FosB: a transcriptional regulator of stress and antidepressant responses, *Eur. J. Pharmacol.* 753 (2015) 66–7

Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.Ph., Ammoury, N., Benita, S., 1989. Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. *Int. J. Pharm.* 55, r1-r4. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90281-0](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90281-0).

Ford CP, Gantz SC, Phillips PE, Williams JT. Control of extracellular dopamine at dendrite and axon terminals. *J Neurosci.* 2010; 30:6975–6983. [PubMed: 20484639]

Ford, C.P. The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission. *Neuroscience.* 2014. Dec 12;282:13-22.

Galaj, E., Ewing, S., Ranaldi, R. Dopamine D1 and D3 Receptor Polypharmacology as a Potential Treatment Approach for Substance Use Disorder. *Neurosci Biobehav Rev.* 2018 doi: 10.1016/j.neubiorev.2018.03.020. Epub 2018 Mar 22.

Gao J, Yu H, Guo W, Kong Y, Gu L, Li Q, Yang S, Zhang Y, Wang Y. The anticancer effects of ferulic acid is associated with induction of cell cycle arrest and autophagy in cervical cancer cells. *Cancer Cell Int.* 2018 Jul 13;18:102. doi: 10.1186/s12935-018-0595-y. eCollection 2018.

Georgiou, P. Zanos, P., Garcia-Carmona, J.-A., Hourani, S., Kitchen, I., Kieffer, B.L., Laorden, M-L., Bailey, A. The oxytocin analogue carbetocin prevents priming-induced reinstatement of morphine-seeking: Involvement of dopaminergic, noradrenergic and MOPr systems, *European Neuropsychopharmacology* 25(12) (2015) 2459-2464.

Goncalves, J., Baptista, S., Silva, A.P., 2014. Psychostimulants and brain dysfunction: a review of the relevant neurotoxic effects. *Neuropharmacology* 87, 135–149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.01.006>.

Gong, D., Zhao, H., Liang, Y., Chao, R., Chen, L., Yang, S., Yu, P. Differences in cocaine- and morphine-induced cognitive impairments and serum corticosterone between C57BL/6J and BALB/cJ mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2019 Jul;182:1-6. doi: 10.1016/j.pbb.2019.05.006. Epub 2019 May 16.

Hassanzadeh, P.; Arbabi, E.; Atyabi, F.; Dinarvand, R. Ferulic acid exhibits antiepileptogenic effect and prevents oxidative stress and cognitive impairment in the kindling model of epilepsy. *Life Sci.* 2017, 179, 9–14. [CrossRef]

Hu, R., Song, R., Yang, R., Su, R., Li, J. The dopamine D3 receptor antagonist YQA14 that inhibits the expression and drug-primed reactivation of morphine induced conditioned place preference in rats. *Eur J Pharmacol*, 2013 720: 212-217.

Ikemoto S, Yang C, Tan A (2015). Basal ganglia circuit loops, dopamine and motivation: a review and enquiry. *Behav Brain Res* 290:17–31.

Kansanen, E., Kuosmanen, S.M., Leinonen, H. et al., The Keap1-Nrf2 pathway: mechanisms of activation and dysregulation in cancer (2013/09/12), *Redox Biol.* 1 (2013) 45–49, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.10.001>.

Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2007; 47:89–116. [PubMed: 16968214]

Kim HS, Cho JY, Kim DH, Yan JJ, Lee HK, Suh HW, Song DK (2004) Inhibitory effects of long-term administration of ferulic acid on microglial activation induced by intracerebroventricular injection of beta-amyloid peptide (1-42) in mice. *Biol Pharm Bull* 27: 120–121

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

Koob, G.F., Le Moal, M., 2001. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* 24, 97e129.

Mancuso, C.; Santangelo, R. Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects. *Food Chem. Toxicol.* 2014, 65, 185–195. [CrossRef] [PubMed]

Marcellino, D., Ferré, S., Casadó, V., Cortés, A., Le Foll B., Mazzola, C., Drago, F., Saur, O., Stark, H., Soriano, A., Barnes, C., Goldberg, A.R, Lluís, C., Fuxe, K., Franco, R.. Identification of Dopamine D1-D3 Receptor Heteromers. Indications for a Role of Synergistic D1-D3 Receptor Interactions in the Striatum. *J Biol Chem.* 2008. doi: 10.1074/jbc.M710349200.

Mattick RP, Breen C, Kimber J, et al. Buprenorphine maintenance versus placebo or methadone maintenance for opioid dependence. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;66:CD002207.

Milanesi, L.H., Roversi, K., Antoniazzi, C.T.D., Segat, H.J., Kronbauer, M., D'avila, L.F., Dias, V.T., Sari, M.H.M., Barcelos, R.C.S., Maurer, L.H., Emanuelli, T., Burger, M.E., Trevizol, F. Toxicological aspects of the interesterified-fat from processed foods: Influences on opioid system and its rewards effects in rats. *Food Chem Toxicol.* 2017 Dec;110:25-32. doi: 10.1016/j.fct.2017.09.048. Epub 2017 Sep 30.

Mori T, Koyama N, Tan J, Segawa T, Maeda M, Town T.J Combined treatment with the phenolics (-)-epigallocatechin-3-gallate and ferulic acid improves cognition and reduces Alzheimer-like pathology in mice. *Biol Chem.* 2019 Feb 22;294(8):2714-2731. doi: 10.1074/jbc.RA118.004280. Epub 2018 Dec 18.

Mukherjee, P.K. Harwansh, R.K., Bhattacharyya, S. Bioavailability of herbal products: approach toward improved pharmacokinetics, in: P.K. Mukherjee (Eds.), Evidencebased validation of herbal medicine, Elsevier, Amsterdam, 2015, pp. 217-245.

Muller, L.D., Unterwald, E.M. D1 dopamine receptors modulate deltaFosB induction in rat striatum after intermittent morphine administration. *J Pharmacol Exp Ther* . 2005 Jul;314(1):148-54. doi: 10.1124/jpet.105.083410. Epub 2005 Mar 16.

Muschamp, J.W., Nemeth, C.I., Robison, A.J., Nestler, E.J., Carlezon W.A. DeltaFosB enhances the rewarding effects of cocaine while reducing the pro-depressive effects of the kappa-opioid receptor agonist U50488, *Biol. Psychiatry* 71 (2012) 44–50.

Nazari-Serenjeh F, et al. D1- but not D2-like dopamine receptor antagonist in the CA1 region of the hippocampus reduced stress-induced reinstatement in extinguished morphine-conditioning place preference in the food-deprived rats. *Behav Pharmacol.* 2020. PMID: 32040018

Paxinos, G., Watson, C., 2013. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 7th ed. Elsevier, Amsterdam.

Rampelotto, C. R. Nanocápsulas contendo ácido ferúlico : desenvolvimento , avaliação da segurança e citoproteção em células mononucleadas humanas . Dissertação. Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. UFSM. 2020.

Ranjit K Harwansh, Pulok K Mukherjee , Shiv Bahadur, Rajarshi Biswas : Enhanced permeability of ferulic acid loaded nanoemulsion based gel through skin against UVA mediated oxidative stress. *Life Sci* . 2015 Nov 15;141:202-11. doi: 10.1016/j.lfs.2015.10.001. Epub 2015 Oct 5.

Robertson, S.D., Matthies, H.J., Galli, A., 2009. A closer look at amphetamine-induced reverse transport and trafficking of the dopamine and norepinephrine transporters. *Mol. Neurobiol.* 39, 73–80. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-009-8053-4>.

Roversi, K., Pase, C.S., Roversi, K., Vey, L.T., Dias, V.T., Metz, V.G., Burger, M.E., 2016. Trans fat intake across gestation and lactation increases morphine preference in females but not in male rats: behavioral and biochemical parameters. *Eur. J. Pharmacol.* 788, 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.06.031>.

Segat, H.J., Barcelos, R.C.S., Metz, V.G., Rosa, H.Z., Roversi, Kr., Antoniazzi, C.T.D., Vey, L.T. Kronbauer, M., Veit, J.C., Piccolo, J.C., Emanuelli, T., Burger, M.E. Influence of physical activity on addiction parameters of rats exposed to amphetamine which were previously supplemented with hydrogenated vegetable fat. *Brain Res Bull.* 2017 Oct;135:69-76. doi: 10.1016/j.brainresbull.2017.09.013. Epub 2017 Sep 28.

Sivandzade, F., Prasad, S., Bhalerao, A., Cucullo, L. NRF2 and NF-κB interplay in cerebrovascular and neurodegenerative disorders: Molecular mechanisms and possible therapeutic approaches. *Redox Biol.* 2019 Feb;21:101059. doi: 10.1016/j.redox.2018.11.017. Epub 2018 Nov 28.

Srinivasan, M., Sudheer, A. R., and Menon, V. P. (2007). Ferulic acid: therapeutic potential through its antioxidant property. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 40, 92–100. doi: 10.3164/jcbtn.40.92

Teixeira, A.M., Reckziegel, P., Müller, L.G., Pereira, R.P., Roos, D.H., Rocha, J.B.T., Bürger, M.E., 2009. Intense exercise potentiates oxidative stress in striatum of reserpine-treated animals. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 92, 231–235. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2008.11.015>.

Trombino S, Cassano R, Ferrarelli T, et al. Trans-ferulic acid-based solid lipid nanoparticles and their antioxidant effect in rat brain microsomes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013;109:273-279.

Ujjawal Bairagi<sup>1</sup>, Pooja Mittal<sup>1</sup>, Juhi Singh<sup>1</sup>, Brahmeshwar Mishra Preparation, characterization, and in vivo evaluation of nano formulations of ferulic acid in diabetic wound healing. *Drug Dev Ind Pharm* .2018 Nov;44(11):1783-1796. doi: 10.1080/03639045.2018.1496448. Epub 2018 Aug 31.

Vey, L.T., Rosa, H.Z., Barcelos, R.C., Segat, H.J., Metz, V.G., Dias, V.T., Duarte, T., Duarte, M.M., Burger, M.E., 2015. Stress during the gestational period modifies pups' emotionality parameters and favors preference for morphine in adolescent rats. *Behav. Brain Res*. 296, 408–417. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.08.012>.

Wang H, Sun X, Zhang N, Ji Z, Ma Z, Fu Q, Qu R, Ma S Ferulic acid attenuates diabetes-induced cognitive impairment in rats via regulation of PTP1B and insulin signaling pathway. *Physiol Behav*. 2017 Dec 1;182:93-100. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.10.001. Epub 2017 Oct 4.

Wang, Y., Zhang, H., Cui, J., Zhang, J., Yin, F., Guo, H., Lai, J., Xing, B. Opiate-associated contextual memory formation and retrieval are differentially modulated by dopamine D1 and D2 signaling in hippocampal-prefrontal connectivity. *Neuropsychopharmacology* . 2019 Jan;44(2):334-343. doi: 10.1038/s41386-018-0068-y. Epub 2018 Apr 17.

Xu, B., Wang, Z., Li, G., Li, B., Lin, H., Zheng, R., Zheng, Q. 2006: Heroin-Administered Mice Involved in Oxidative Stress and Exogenous Antioxidant-Alleviated Withdrawal Syndrome. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2006 Aug;99(2):153-61. doi: 10.1111/j.1742-7843.2006.pto\_461.x.

Zduńska K, Dana A, Kolodziejczak A, Rotsztejn H (2018) Antioxidant properties of ferulic acid and its possible application. *Skin Pharmacol Physiol* 31:332–336

Zhao Z, Moghadasian MH (2008) Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: a review. *Food Chem* 109(4):691–702. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.039>

Zhi-Bing You, Guo-Hua Bi, [...], and Amy Hauck Newman 2019. Dopamine D<sub>3</sub>R antagonist VK4-116 attenuates oxycodone self-administration and reinstatement without compromising its antinociceptive effects. *Neuropsychopharmacology* 2019 Jul;44(8):1415-1424. doi: 10.1038/s41386-018-0284-5. Epub 2018 Nov 27.

Zhou W, Kalivas PW. N-acetylcysteine reduces extinction responding and induces enduring reductions in cue- and heroin-induced drug-seeking. *Biol Psychiatry*. 2008 Feb 1;63(3):338-40. doi: 10.1016/j.biopsych.2007.06.008. Epub 2007

Zhu, Yingjie, Wienecke, F.R. Carl<sup>1</sup>, Gregory Nachtrab<sup>1</sup>, Xiaoke Chen<sup>1</sup> A thalamic input to the nucleus accumbens mediates opiate dependence. *Nature* 2016 Feb 11;530(7589):219-22. doi: 10.1038/nature16954. Epub 2016 Feb 3.

## 9. DISCUSSÃO

Esta tese está baseada em fatores ambientais que podem exercer influências sobre comportamento de drogadição induzido por morfina, em busca do conhecimento dos mecanismos neurobiológicos relacionados, como também de possíveis fatores da dieta e de intervenções farmacológicas a fim de reduzir os altos índices de recaída. A drogadição e sua recaída após período de abstinência é um problema de saúde pública mundial a qual apresenta diversas comorbidades como depressão, redução da qualidade de vida e social e familiar (STRONG et al., 2020). Diante dos dados epidemiológicos de recaídas sabe-se que os atuais protocolos de tratamento para drogadição são limitados e de difícil permanência pelos pacientes (MATTICK et al., 2014).

A literatura já demonstra que manter hábitos dietéticos e estilo de vida saudável protege os indivíduos de uma série de enfermidades tanto metabólicas como psiquiátricas (COOPER et al., 2015). Por outro lado, manter hábitos alimentares prejudiciais pode tornar um indivíduo suscetível a desenvolver estes mesmos fatores (KUHN et al., 2015). Através de estudos comportamentais, foi demonstrado que hábitos alimentares podem operar como fatores suscetíveis a drogadição por morfina (ROVERSI et al., 2016). Aqui demonstramos que o consumo de uma dieta baseada na dieta mediterrânea, com concentrações adequadas de AG n-3 apresenta efeitos benéficos em relação a recaída pela morfina bem como efeitos ansiolíticos e na redução de efeitos de abstinência incluindo a ativação do eixo HPA.

Por outro lado o consumo de dietas ocidentais, com altos índices de AGS como OP e GI apresentaram prejuízos comportamentais e moleculares a nível de SNC. O consumo de dietas ocidentais favoreceu a recaída por morfina após período de abstinência, favoreceu sintomas de abstinência como sensibilização locomotora e hipersensibilidade térmica, além de ativar a cascata dopaminérgica. Sabe-se que os AGE, estes consumidos pela dieta e não sintetizados pelo metabolismo, são os maiores formadores de membranas fosfolipídicas incluindo as presentes nas células neuronais (SONGUR et al., 2004; SALEM et al., 2001).

Nesse sentido a presença de AGS e altos índices de AG n-6 conferem além de uma maior rigidez a membrana e alteração das macromoléculas presentes nela, como enzimas, receptores transportadores etc, incorpora AG o qual é substrato para a produção de citocinas pró-inflamatórias (HUSTED; BOUZINOVA, 2016). Por outro lado o consumo de AG n-3 e conseqüentemente a incorporação deste nas membranas fosfolipídicas, apresentam benéficas propriedades uma vez que são precursores de citocinas anti-inflamatórias (DYALL et al.,

2010) além de se relacionarem a prevenção de diversas doenças neurológicas (BLOCH; QAWASMI, 2011; SONUGA-BARKE et al., 2013). Apesar de nosso estudo não fornecer dados de incorporação de AG nas membranas do cérebro dos animais que consumiram cronicamente diferentes dietas, foi possível demonstrar efeitos opostos tanto comportamentais na redução da adição a morfina, como moleculares no SNC a partir da influência do consumo de diferentes AG.

Modelos animais de drogadição e recaída às drogas aditivas, especialmente PLC, permitem aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos de ação relacionados com este tema, o que nos fornece uma melhor base farmacológica para a busca de novos fármacos (TANAKA et al., 2011). A busca por novos fármacos e novas estratégias farmacológicas para redução de efeitos colaterais dos medicamentos podem ser úteis no combate a drogadição e recaída uma vez que esta apresenta tratamento limitado (MATTICK et al., 2014). A partir de dados atuais demonstrando a influência da via glutamatérgica e alteração nos receptores AMPA na recaída por morfina os quais se demonstraram importantes na busca por fármacos para o tratamento da drogadição (POPIKE; WROBEL, 2002; ZHONG et al., 2006).

O Topiramato (TPM), fármaco antiepilético, vem ganhando atenção para uso em transtornos psiquiátricos e abuso de drogas (STENLOF et al., 2007; MOORE et al., 2014) com exceção de opióides, os quais não há dados na literatura. A partir do uso da nanotecnologia a fim de reduzir os diversos e significativos efeitos colaterais deste fármaco, demonstramos neste trabalho os efeitos do tratamento com TPM nanoencapsulado durante o período de abstinência, frente a recaída por morfina. Foi possível observar alterações na subunidade do receptor AMPA, condizentes com os dados na literatura (ZHONG et al., 2006) a partir da recaída da morfina e a partir disso o efeito benéfico do tratamento com TPM nanoencapsulado na prevenção de recaída bem como prevenção dos efeitos deletérios na memória causados pelo fármaco livre. Através destes dados, demonstramos que o sistema glutamatérgico possui um papel fundamental na drogadição além do sistema dopaminérgico e que a nanotecnologia é uma ferramenta útil e aliada na melhoria de fármacos já existentes e no seu uso extra-bula.

O sistema dopaminérgico é o maior responsável pelos efeitos hedônicos das drogas aditivas e de maneira semelhante às outras drogas aditivas como anfetamina e cocaína, a morfina libera a DA na fenda sináptica o que resultam nos efeitos aditivos (WISE, 2002). A partir disso a DA exerce seus efeitos de recompensa além de estar disponível para sofrer

auto-oxidação quando presente na fenda sináptica (ROBERTSON et al., 2009). O uso de agentes antioxidantes em benefício da drogadição já foi documentado (ZHOU; KALIVAS, 2008), porém o uso do ácido ferúlico (AF) nanoencapsulado no combate a recaída pela morfina constitui uma inovação terapêutica.

Aqui estamos mostrando que o tratamento com AF nanoencapsulado foi capaz de prevenir comportamentos de recaída por morfina, tendo restaurado o prejuízo da memória de curta duração, o qual foi uma consequência da exposição à droga. Além disso, demonstramos que este agente antioxidante foi capaz de alterar positivamente a imunoreatividade dos fatores de transcrição relacionados à drogadição, tais como a  $\Delta$ FosB e o fator de transcrição relacionado à capacidade antioxidante, como o *NRF2*. Através dessas alterações somadas àquelas relacionadas ao feedback negativo da via dopaminérgica na região mesolímbica, pode-se interpretar que tratamento com AF nanoencapsulado foi eficaz na prevenção do comportamento de recaída pela morfina.

Tomados em conjunto, os resultados mostrados nesta tese indicam que a drogadição por opioides, incluindo os comportamentos de preferência e de recaída pela droga, apresentam aspecto multifatorial, passível de influências dos AG consumidos através da dieta, das diferentes neuro-adaptações nas vias dopaminérgica e glutamatérgica, além de sofrer influência do estresse oxidativo, consequente ao excesso dopaminérgico hedônico, via comum da drogadição. Nesse sentido, foi possível observar adaptações sobre os diferentes alvos moleculares em áreas hedônicas encefálicas evocadas pela exposição e/ou recaída à morfina, os quais foram claramente modificados pela suplementação de diferentes AG da dieta e pela administração de TPM e de AF, associados ou não à nanotecnologia, os quais se mostraram efetivos na prevenção dos comportamentos de recaída pela morfina.

## 10. CONCLUSÕES

A partir dos resultados e interpretações realizadas a partir deste estudo, foi possível concluir que:

- O consumo crônico de uma dieta do tipo mediterrânea, rica em AGPI-3, é capaz de favorecer a prevenção de comportamentos de recaída por morfina, modificando alvos moleculares dopaminérgicos na região mesolímbica, responsáveis pela recaída;

-O consumo crônico de uma dieta do tipo ocidental, a qual possui altos níveis de AGS, GI e OP, pode favorecer a recaída pela morfina por aumentar comportamentos de ansiedade, atividade locomotora e sensibilidade térmica, também alterando o eixo HPA durante o período de abstinência da droga;

- O consumo de dieta do tipo ocidental favorece alterações na via dopaminérgica em diferentes áreas da região mesolímbica após a recaída por morfina;

-O tratamento com nanocápsulas contendo topiramato após a PLC com morfina não alterou o período de extinção da preferência pela droga, porém preveniu o comportamento de recaída;

- A memória de curto prazo foi reduzida durante o período de abstinência da morfina, igualmente ao grupo tratado com TPM livre. Diferentemente, o tratamento com nanocápsulas contendo TPM mostrou benefícios sobre a memória de curto prazo, demonstrando assim superioridade da nanoformulação sobre o efeito adverso de prejuízo de memória, comumente relacionado ao fármaco livre;

- A nanoformulação com TPM também mostrou superioridade em relação à sua forma livre em relação à ativação dopaminérgica e glutamatérgica no hipocampo dorsal e NAC. Nenhum tratamento modificou a resposta do receptor MOR nessas mesmas estruturas;

- Após PLC com morfina, o tratamento com nanocápsulas contendo AF não alterou o período de extinção da droga, porém reduziu o comportamento de recaída pela droga, em relação ao AF livre, demonstrando a superioridade terapêutica da forma nanoencapsulada;

- A exposição à morfina provocou prejuízos na memória de curto prazo após o período de abstinência da droga; o AF nanoencapsulado demonstrou ser capaz de melhorar esta memória. Nenhum tratamento alterou a memória a longo prazo.

- O tratamento com AF nanoencapsulado ativou a autoregulação dopaminérgica, possivelmente reduzindo os efeitos hedônicos da dopamina, visualizados através da ausência do comportamento de recaída, o que indica os benefícios da nanotecnologia.

- O AF, independente de ser nanoencapsulado ou livre, reduziu a imunoreatividade do  $\Delta$ FosB no NAc, sendo este um alvo molecular de manifestação crônica envolvida na drogadição. Ademais, observa-se que o tratamento com AF nanoencapsulado foi capaz de exercer influência molecular antioxidante, já que aumentou a imunoreatividade do *NRF2*, o qual é um fator nuclear responsável intimamente relacionado à homeostase redox e à sobrevivência celular frente ao estresse oxidativo.

Os principais resultados desta tese estão demonstrados na seguinte figura (Figura 6):

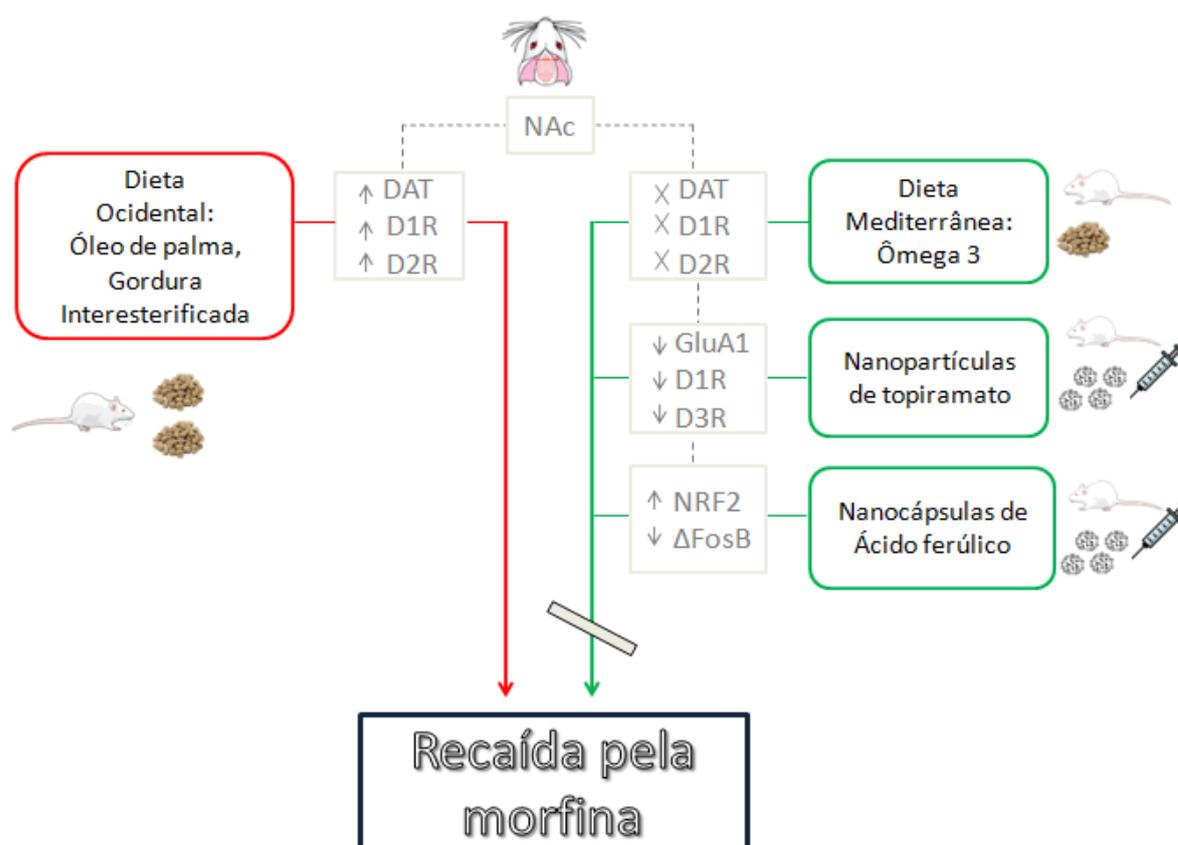


Figura 6: Resumo gráfico dos resultados apresentados na tese.

## **DOCTORADO SANDUICHE**

Os estudos conduzidos durante o doutorado sanduíche, através da concessão de uma bolsa CAPES-PRInt-USFM desde setembro de 2019 até março de 2020, sob orientação da professora doutora Rosário Moratalla no Departamento de Neurobiología Funcional y de Sistemas do Instituto Ramón & Cajal, vinculado ao Consejo Superior de Investigaciones científicas (CSIC) em Madri, Espanha. Durante esse período, foi possível a realização de experimentação animal envolvendo comportamentos de hipersexualidade em camundongos Aphakia (Pitx3<sup>-/-</sup>) para a Doença de Parkinson tratados com terapia de reposição de dopamina L-DOPA, seguidos de técnicas de imunohistoquímica. Os dados obtidos resumidos conforme segue, encontram-se incluídos em estudos e tese de alunos de doutorado do Instituto Cajal. As técnicas desenvolvidas no referido laboratório espanhol estão sendo introduzidas no laboratório brasileiro de origem, FARMATOX, UFSM.

### **AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE HIPERSEXUALIDADE INDUZIDO POR L-DOPA EM CAMUNDONGOS APHAKIA**

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa complexa e progressiva associada à deficiência de dopamina e a déficits motores e não-motores. Atualmente o tratamento utilizando a terapia de reposição de dopamina (TRD) como a L-DOPA, apresenta diversos sintomas não motores relacionados a desordens de impulsividade como exemplo a hipersexualidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de hipersexualidade induzido por L-DOPA utilizando camundongos nocaute para DP, e avaliar alterações na via dopaminérgica e fatores de transcrição na região mesolímbica. Foram utilizados camundongos selvagens e camundongos Aphakia nocaute (Pitx3<sup>-/-</sup>) para DP. Os camundongos foram tratados com salina (NaCl 0,9%, i.p.) ou L-DOPA (5mg/Kg, i.p.) por 15 dias 1 vez ao dia e após 20 minutos da administração de Benzeracida (10mg/Kg, i.p.) (n=6 por grupo). Nos últimos 5 dias de tratamento os animais foram isolados individualmente em gaiolas. As fêmeas utilizadas no teste de hipersexualidade foram tratadas para superovulação com a administração de PMSG (0,15ml/animal, i.p.) 48h antes do teste e HCG (0,10ml/animal, i.p.) 10 minutos antes do teste. No dia do teste de hipersexualidade uma fêmea receptiva foi adicionada na gaiola do macho e durante 30 minutos foram contabilizado os seguintes parâmetros: Latência para primeira farejada, número de farejadas, número de montas e tempo total em montas. Os resultados demonstram uma redução no tempo da primeira farejada nos

grupos tratados com L-DOPA independente do genótipo e um aumento no número de montas e tempo em montas no grupo Aphakia tratado com L-DOPA. O comportamento de impulsividade aqui avaliado é relatado em pacientes com DP e tratados com TRD, porém foi realizado pela primeira vez em estudos pré-clínicos o que permite uma melhor compreensão das alterações dopaminérgicas na via mesolímbica para redução dos sintomas causados pela TRD o que possibilita uma melhor adesão do paciente ao tratamento.

## REFERÊNCIAS

- ACAR, N., et al. Modification of the dopaminergic neurotransmitters in striatum, frontal cortex and hippocampus of rats fed for 21 months with *trans* isomers of  $\alpha$ -linolenic acid. **Neurosci Res.** n. 45, p.375-382, 2003.
- AFONSO, M.S., et al. Dietary interesterified fat enriched with palmitic acid induces atherosclerosis by impairing macrophage cholesterol efflux and eliciting inflammation. **J Nutr Biochem** n. 36, p. 89-90, 2016.
- AGUILAR, M.A., Rodriguez-Arias, M., Minarro, J. Neurobiological mechanisms of reinstatement of drug-conditioned place preference. **Brain Res Rev** n. 59, p. 253-77, 2009.
- AHMADI, L.; Marangoni, A. G. Functionality and physical properties of interesterified high oleic shortening structured with stearic acid. **Food Chemistry**, v 117, p. 668-673, 2009.
- ALLEN, D. A. Interesterification: a vital tool for the future? **Lipid Technology**, p. 11-15, 1996.
- AMMINGER GP, Schafer MR, Papageorgiou K, et al. Long-chain -3 fatty acids for indicated prevention of psychotic disorders. **Arch General Psychiatry** v.67, p. 146–154, 2010.
- ANDRUCHOW, N.D., Konishi, K., Shatenstein, B., Bohbot, V.D. A lower ratio of omega-6 to omega-3 fatty acids predicts better hippocampus-dependent spatial memory and cognitive status in older adults. **Neuropsychology**. n. 31, p.724-734, 2017.
- ANGEHAGEN, M., Rönnbäck, L., Hansson, E., Ben-Menachem, E. Topiramate reduces AMPA-induced Ca(2+) transients and inhibits GluR1 subunit phosphorylation in astrocytes from primary cultures. **J Neurochem**, n. 94(4), p. 1124-30, 2005.
- ANTONIAZZI, C.T.D, Bouffleur, N., Pase, C.S.<sup>3</sup>, Kuhn, F.T, Dias, V.T, Segat H.J., Roversi, K., Roversi, Kt, Dalila M Benvegnú, D.M., Burger, M.E. Tactile stimulation and neonatal isolation affect behavior and oxidative status linked to cocaine administration in young rats. **Behav Processes**. v.103, p. 297-305, 2014
- APPOLINARIO, J.C.; Fontenelle, L.F.; Papelbaum, M.; Bueno, J.R.; Coutinho,W. Topiramate use in obese patients with binge eating disorder: An open study. **Can. J. Psychiatry**, v. 47, p. 271–273, 2002.
- ARBONÉS-MAINAR, J.M., Navarro, M.A., Carnicer, R., Guillén, N., Surra, J.C., Acín, S., Guzmán, M.A., Sarría, A.J., Arnal, C., Aguilera, M.P., Jiménez, A., Beltrán, G., Uceda, M., Osada, J. Accelerated atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice fed Western diets containing palm oil compared with extra virgin olive oils: a role for small, dense high-density lipoproteins. **Atherosclerosis**. n. 194, p. 372-82, 2007.

ARDISSON K, A.V.; Willett, W.C.; Hu, F.B. Diet, lifestyle, and genetic risk factors for type 2 diabetes: A review from the Nurses' Health Study, Nurses' Health Study 2, and Health Professionals' Follow-up Study. **Curr. Nutr. Rep.** v. 3, p. 345–354, 2014.

ASIF, M. Process advantages and product benefits of interesterification in oils and fats. **Int J Nutr Pharmacol Neurol Dis** n. 1, p. 134-8, 2009.

ASKAR MH, Hussein AM, Al-Basiony SF, Meseha RK, Metias EF, Salama MM, Antar A, El-Sayed A. Effects of Exercise and Ferulic Acid on Alpha Synuclein and Neuroprotective Heat Shock Protein 70 in An Experimental Model of Parkinsonism Disease. **CNS Neurol Disord Drug Targets.** 18(2), p. 156-169, 2019.

ASTON-JONES G.; HARRIS G.C. Brain substrates for increased drug seeking during protracted withdrawal. **Neuropharmacology** n. 47, p. 167-179, 2004.

ATTWELL, D., Laughlin SB. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. **J Cereb Blood Flow Metab** v. 21, p. 133–145, 2001.

BAIMEL, C., Borgland, S.L Orexin Signaling in the VTA Gates Morphine-Induced Synaptic Plasticity. **J Neurosci.** 2015

BARCELOS RC, Benvegnú DM, Boufleur N, Pase C, Teixeira AM, Reckziegel P, Emanuelli T, da Rocha JB, Bürger ME. Short term dietary fish oil supplementation improves motor deficiencies related to reserpine-induced parkinsonism in rats. **Lipids.** V. 46(2), p. 143-9, 2011.

BAYER, K.U., De Koninck, P., Leonard, A.S., Hell, J.W., Schulman, H. Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation. **Nature** v. 411, p. 801–805, 2001.

BEAULIEU JM, Gainetdinov RR. The physiology. Signaling and pharmacology of dopamine receptor. **Pharmacol Rev.** v.63(1), p. 182-217, 2011.

BENCHEKROUN M, Romero A, Egea J, León R, Michalska P, Buendía I, Jimeno ML, Jun D, Janockova J, Sepsova V, Soukup O, Bautista-Aguilera OM, Refouvelet B, Ouari O, Marco-Contelles J, Ismaili L. The Antioxidant Additive Approach for Alzheimer's Disease Therapy: New Ferulic (Lipoic) Acid Plus Melatonin Modified Tacrines as Cholinesterases Inhibitors, Direct Antioxidants, and Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like 2 Activators. **J Med Chem.** 10;59(21), p. 9967-9973, 2016.

BENVEGNÚ DM, Barcelos RC, Boufleur N, Pase CS, Reckziegel P, Flores FC, Ourique AF, Nora MD, da Silva Cde B, Beck RC, Bürger ME. Haloperidol-loaded polysorbate-coated polymeric nanocapsules decrease its adverse motor side effects and oxidative stress markers in rats. **Neurochem Int.** n. ;61(5), p. 623-31, 2012.

BENVEGNÚ DM, Barcelos RC, Boufleur N, Reckziegel P, Pase CS, Ourique AF, Beck RC, Bürger ME. Haloperidol-loaded polysorbate-coated polymeric nanocapsules increase its efficacy in the antipsychotic treatment in rats. **Eur J Pharm Biopharm.** N.77(2), p.332-6, 2011.

- BENVEGNÚ DM, Roversi K, Barcelos RCS, Trevizol F, Pase CS, Segat HJ, Dias VT, Savian AL, Piccoli BL, Piccolo J, Dutra-Filho CS, Emanuelli T, de Bona da Silva C, Beck RCR, Burger ME. Effects of Fish and Grape Seed Oils as Core of Haloperidol-Loaded Nanocapsules on Oral Dyskinesia in Rats. *Neurochem Res.* n.43(2). p, 477-487, 2018.
- BERRY, S.E. Triacylglycerol structure and interesterification of palmitic and stearic acid-rich fats: an overview and implications for cardiovascular disease. *Nutr. Res. Rev.* n, 22, p. 3–17, 2009.
- BETTERIDGE, D.J. What is oxidative stress? *Metabolism* n. 49(2 Suppl 1), p.3-8, 2000.
- BILLA, s., Liu, J., Bjorklund, N.K., Sinha, N., Fu, Y., Shinnick-Gallagher, P., Moron, J.A. Increased insertion of glutamate receptor 2-lacking alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) receptors at hippocampal synapses upon repeated morphine administration. *Mol Pharmacol* n. 77(5), p. 874-83, 2010.
- BISPO K.P. et al., *Trans* and interesterified fat and palm oil during the pregnancy and lactation period inhibit the central anorexigenic action of insulin in adult male rat offspring. *J Physiol Sci.* n. 65, p. 131-138, 2015.
- BLOCH, M.H., Qawasmi, A. Omega-3 fatty acid supplementation for the treatment of children with attention-deficit/hyperactivity disorder symptomatology: systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* n.50(10), p. 991-1000, 2011.
- BORRADAILE, N.M.; Han, X.; Harp, J.D.; Gale, S.E.; Ory, D.S.; Schaffer, J.E. Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death. *J. Lipid Res.* n. 47, p. 2726–2737, 2006.
- BORSONELO, E.C., Galduroz, J.C. The role of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in development, aging and substance abuse disorders: review and propositions. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* n. 78, p. 237e245, 2008.
- BOUDREAU, A.C., Wolf, M.E. Behavioral sensitization to cocaine is associated with increased AMPA receptor surface expression in the nucleus accumbens. *The Journal of Neuroscience* n. 25, p. 9144–9151, 2005.
- BOUKOUVALAS, G., Antoniou, K., Papalexi, E., Kitraki, E. Post weaning high fat feeding affects rats' behavior and hypothalamic pituitary adrenal axis at the onset of puberty in a sexually dimorphic manner. *Neuroscience* n. 153, p. 373-382, 2008.
- BOURNE, A. R., Mohan, G., Stone, M. F., Pham, M. Q., Schultz, C. R., Meyerhoff, J. L., et al. Olfactory cues increase avoidance behavior and induce fos expression in the amygdala, hippocampus and prefrontal cortex of socially defeated mice. *Behav. Brain Res.* v. 256, p. 188–196, 2013.
- BRANDT, C., Lahr, D., May, T.W. Cognitive adverse events of topiramate in patients with epilepsy and intellectual disability. *Epilepsy Behav* v. 45, p. 261-4, 2015

BREWER, D.D., Catalano, R.F., Haggerty, K., Gainey, R.R., Fleming, C.B. A meta-analysis of predictors of continued drug use during and after treatment for opiate addiction. **Addiction** n. 93, p.73–92, 1998.

BRICHTA L, Greengard P, Flajolet M. Advances in the pharmacological treatment of Parkinson's disease: targeting neurotransmitters system. **Trends Neurosci.** v. 36(9), p. 543-54, 2013.

BROWN, JM, Yamamoto BK. Effects of amphetamines on mitochondrial function: role of free radicals and oxidative stress. **Pharmacol Therapeut** v. 99, p. 45–53, 2003

BUFFALARI, D.M., Baldwin, C.K., Feltenstein, M.W., See RE. Corticotrophin releasing factor (CRF) induced reinstatement of cocaine seeking in male and female rats. **Physiol Behav.** n.105, p. 209–214, 2012.

BURR , G. O. , M. M. Burr. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. **J. Biol. Chem.** V. 82, p. 345 – 367, 1929.

CANDACE, R., Lewis, Kelsey Staudinger, Seven E. Tomek, Raymundo Hernandez, Tawny Manning, and M. Foster Olive. Early Life Stress and Chronic Variable Stress in Adulthood Interact to Influence Methamphetamine Self-Administration in Male Rats. **Behav Pharmacol.** n. 27, p. 182–184, 2016.

CAO, J.; Dai, D.L.; Yao, L.; Yu H.H.; Ning, B.; Zhang, Q.; Chen, J.; Cheng, W.H.; Shen, W.; Yang, Z.X. Saturated fatty acid induction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human liver cells via the PERK/ATF4/CHOP signaling pathway. **Mol. Cell. Biochem.** n. 364, p. 115–129, 2012.

CARR, K.D. Food scarcity, neuroadaptations, and the pathogenic potential of dieting in an unnatural ecology: binge eating and drug abuse. **Physiol Behav.** n. 104, p.162–7, 2011.

CARTER, A., Hendrikse, J., Lee, N., Yücel, M., Verdejo-Garcia, A., Andrews, Z., Hall, W. The neurobiology of “food addiction” and its implications for obesity treatment and policy. **Annu. Rev. Nutr.** n. 36, p. 105–128, 2016.

CHEN Z, Zhong C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Neurosci Bull.** V. 30(2), p. 271-81, 2014.

CHILDRESS AR, et al. Limbic activation during cue-induced cocaine craving. **Am J Psychiatry** n. 156, p. 11–18, 1999.

CLEM RL, Haganir RL. Calcium-permeable AMPA receptor dynamics mediate fear memory erasure. **Science.** V. 19;330(6007), p. 108-12, 2010.

COOPER, R.E., Tye, C., Kuntsi, J., Vassos, E., Asherson, P. Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation and cognition: A systematic review and meta-analysis. **J Psychopharmacol.** v. 29(7), p. 753-63, 2015.

CORDAIN, L., Eaton, S. B., Sebastian, A., Mann, N., Lindeberg, S., Watkins, B. A., et al. Origins and evolution of the Western diet: Health implications for the 21<sup>st</sup> century. **American Journal of Clinical Nutrition**, n. 81, p. 341–354, 2005.

COSTANTINI, I., Molinari, R., Farinon, B., Merendino, N. Impact of Omega-3 Fatty Acids on the Gut Microbiota. **Int J Mol Sci**. v. 7;18(12), p.2645, 2017.

COTMAN, C., Blank, M.L., Moehl, A., Snyder, F. Lipid composition of synaptic plasma membranes isolated from rat brain by zonal centrifugation. **Biochemistry** n. 8, p. 4606–12, 1969.

CRUZ-TRUJILLO R, Avalos-Fuentes A, Rangel-Barajas C, Paz-Bermúdez F, Sierra A, Escartín-Perez E, Aceves J, Erlij D, Florán B. D3 dopamine receptors interact with dopamine D1 but not D4 receptors in the GABAergic terminals of the SNr of the rat. **Neuropharmacology** v. 67, p. 370-378, 2013.

CULL-CANDY, Kelly, L., Farrant, M. Regulation of CA<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptor: synaptic plasticity and beyond. **Curr Opin. Neurobiol**. N. 16, p. 288-297, 2006.

D'AVILA, L.F., Dias, Vt., Milanesi, L.h., Roversi, K., Trevizol, F., Haselein, L.M., Emanuelli, T., Burger, M.E. Interesterified fat consumption since gestation decreases striatal dopaminergic targets levels and gdnf impairing locomotion of adult offspring. **Toxicol Lett**. V. 15, p. 339:23-31, 2021.

Da SILVA, T.M., Munhoz, R.P., Alvarez, C., Naliwaiko, K., Kiss, A., Andreatini, R., Ferraz, A.C. Depression in Parkinson's disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study of omega-3 fatty-acid supplementation. **J. Affect Disord**. n. 111, p. 351e359, 2008.

DALLMAN, M.F., Pecoraro, N., Akana, S.F., Fleur, S.E., Gomez, F., Houshyar, H., Bell, M.E., Bhatnagar, S., Laugero, K.D., Manalo, S. Chronic stress and obesity: A new view of "comfort food". **Proc Natl Acad Sci U S A**. n. 100, p. 11696–11701, 2003.

DARIOS, F., Davletov, B. Omega-3 and omega-6 fatty acids stimulate cell membrane expansion by acting on syntaxin 3. **Nature** n. 440, p. 813–7, 2006.

DAS, U.N. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. **Biotechnol J**, v. 1(4), p. 420-39, 2006.

D'AVILA, L.F., Dias, V.T., Vey, L.T., Milanesi, L.H., Roversi, K., Emanuelli, T., Bürger, M.E., Trevizol, F., Maurer, H.L. Toxicological aspects of interesterified fat: Brain damages in rats. **Toxicol Lett**. n. 5, p.276:122-128, 2017.

de KLOET, E.R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S., Joels, M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. **Endocr Rev**. n. 19, p. 269-301, 1998

DÉCARIE-SPAIN L, Hryhorczuk C, Fulton S. Dopamine signalling adaptations by prolonged high-fat feeding. **Current Opinion in Behavioral Sciences**. n. 9, p.136–143, 2016.

DENIS, I., et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and brain aging. **Curr. Opin.Clin.Nutr.Metab.Care** n. 18, p.139-146, 2015.

DHAWAN, B.N., et al. União Internacional de Farmacologia XII: A classificação dos receptores. **Pharmacol. Rev.** v. 48, p. 567-592, 1996.

DIMMER F.A., et al., Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química nova.** v.36, n.100. p. 1520-1526, 2013.

DOWELL, D., Haegerich, T.M., Chou, R. CDC Guideline for Prescribing Opioids for Chronic Pain—United States. **MMWR Recomm Rep** n. 65: p.1–49, 2016.

DYALL, S.C., MICHAEL, G.J.; MICHAEL-TITUS, A.T. Omega-3 fatty acids reverse age-related decreases in nuclear receptors and increase neurogenesis in old rats. **J. Neurosci.Res.**v. 88, p. 2091-2102, 2010.

EPEL, E, Lapidus R, McEwen B, Brownell K. Stress may add bite to appetite in women: a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. **Psychoneuroendocrinology.** n. 26, p. 37–49, 2001.

FAMOUS, K. R. et al. Phosphorylation-dependent trafficking of GluR2- containing AMPA receptors in the nucleus accumbens plays a critical role in the reinstatement of cocaine seeking. **J. Neurosci.** n. 28, p. 11061–11070, 2008.

FARZINPOUR, Z., Mousavi, Z., Karimi-Haghighi, S., Haghparast, A. Antagonism of the D1- and D2-like dopamine receptors in the nucleus accumbens attenuates forced swim stress- and morphine priming-induced reinstatement of extinguished rats. **Behav Brain Res.** n. 341, p.16-25, 2018.

FATTORE, E.; Bosetti, C.; Brighenti, F.; Agostoni, C.; Fattore, G. Palm oil and blood lipid-related markers of cardiovascular disease: A systematic review and meta-analysis of dietary intervention trials. **Am. J. Clin. Nutr.** N. 99, p. 1331–1350, 2014.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. Química de Alimentos de Fennema – 4ª ed. - Editora Artmed, 2010.

FITÓ, M., Melander, O., Martínez, J.A., Toledo, E., Carpéné, C., Corella, D. Advances in Integrating Traditional and Omic Biomarkers When Analyzing the Effects of the Mediterranean Diet Intervention in Cardiovascular Prevention. **Int J Mol Sci.** n. 2;17(9), 2016.

FORREST, M.L., KWON, G.S. Clinical development in drug delivery nanotechnology. **Advanced Drug Delivery Reviews.** V.60. n.8, p.861-862, 2008.

FRASER, T., Tayler, H., Love, S. Fatty acid composition of frontal, temporal and parietal neocortex in the normal human brain and in Alzheimer's disease. **Neurochem Res** n. 35, p. 503–13, 2010.

FRIDELL, M.; Bäckström, M.; Hesse, M.; Krantz, P.; Perrin, S.; Nyhlén, A. Prediction of psychiatric comorbidity on premature death in a cohort of patients with substance use disorders: A 42-year follow-up. **BMC Psychiatry**, n. 19, p.150, 2019.

GASS, J.T.; OLIVE, M.F. Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. **Biochem. Pharmacol.** V. 75, P. 218–265, 2008.

GU, X.; Li, K.; Laybutt, D.R.; He, M.L.; Zhao, H.L.; Chan, J.C.; Xu, G. Bip overexpression, but not CHOP inhibition, attenuates fatty-acid-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in HepG2 liver cells. **Life Sci.** v. 87, p. 724–732, 2010.

GU, Y., Brickman, A.M., Stern, Y., Habeck, C.G., Razlighi, Q.R., Luchsinger, J.A., Manly, J.J., Schupf, N., Mayeux, R., Scarmeas, N. Mediterranean diet and brain structure in a multiethnic elderly cohort. **Neurology**. n. 17, p. 1744-51, 2015.

GUGLIELMO, R., Martinotti, G., Quatralo, M., Ojome, L., Kadilli, I., Nicola, MD., Janiti, L. Topiramate in Alcohol Use Disorders: Review and Update. **CNS Drugs**. B. 29(5), p. 383-95, 2015.

GUNSTONE, F. D. Movements towards tailor-made fats: **Progress in Lipid Research**, v. 37, n. 5, p. 277-305, 1998.

GUSTOW, E., Ryde, T., Cooper, E.R. Nanoparticulate topiramate formulations. US7390505 B2, 2008.

HABIB, K.E., Gold PW, Chrousos GP. Neuroendocrinology of stress. **Endocrinol Metab Clin North Am.** n. 30, p. 695–728, 2001.

HAGHPARAST, A. Fatahi, Z. Alamdary, S.Z. Reisi, Z. Khodagholi, F. Changes in the levels of p-ERK, p-CREB, and c-fos in rat mesocorticolimbic dopaminergic system after morphine-induced conditioned place preference: the role of acute and subchronic stress, **Cell. Mol. Neurobiol.** n. 34, p. 277–288, 2014.

HAYGERT, P., Roversi, K., Milanesi, L.H., Maurer, L.H., Camponogara, C., Duarte, T., Barcelos, R.C.S., Emanuelli, T., Oliveira, S.M., Duarte, M.M.M.F., Trevizol, F., Burger, M.E. Can the dietary fat type facilitate memory impairments in adulthood? A comparative study between Mediterranean and Western-based diet in rats. **J Nutr Biochem.** 2018.

HEALY-STOFFEL, M., Levant, B. N-3 (Omega-3) Fatty Acids: Effects on Brain Dopamine Systems and Potential Role in the Etiology and Treatment of Neuropsychiatric Disorders. **CNS Neurol Disord Drug Targets.** V. 17(3), p.216-232, 2018.

HEARING M, Graziane N, Dong Y, Thomas MJ (2018) Opioid and psychostimulant plasticity: targeting overlap in nucleus accumbens glutamate signaling. **Trends Pharmacol Sci** v. 39, p. 276–294, 2018.

HEARING, M.C., Jesynak, J., Ebner, S., Ingebretson, A., Asp, A.J., Fischer, R.A., Shimidt, C., Larson, E.B., Thomas, M.J. Reversal of morphine-induced cell-type-specific synaptic

- plasticity in the nucleus accumbens shell blocks reinstatement. **Proc Natl Acad Sci U S A** . n 19;113(3):757-62, 2016
- HENRIKSEN, G., Willoch, F. Imaging of opioid receptors in the central nervous system. **Brain**. 2008
- HUSTED, K.S., Bouzinova, E.V. The importance of n-6/n-3 fatty acids ratio in the major depressive disorder. **Medicina (Kaunas)**. n. 52, p. 139-47, 2016.
- HYBERTSON BM, Gao B, Bose SK, McCord JM. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. **Mol Aspects Med**. V. 32(4-6), p.234-46, 2011.
- IANISKI, FR et al. Protective effect of meloxicam-loaded nanocapsules against amyloid- $\beta$  peptide-induced damage in mice. **Behav Brain Res**, n. 230, p. 100–107, 2012.
- JAZAYERI, S, Tehrani-Doost, M., Keshavarz, S.A., Hosseini, M., Djazayeri, A., Amini, H., et al. Comparison of therapeutic effects of omega-3 fatty acid eicosapentaenoic acid and fluoxetine, separately and in combination, in major depressive disorder. **Aust N Z J Psychiatry** n. 42, p. 192–8, 2008.
- JOHNSON, B.A., Roache, J.D., Ait-Daoud, N., Wells, L.T., Wallace, C.L., Dawes, M.A., Liu, L., Wang, X.Q. Effects of acute topiramate dosing on methamphetamine-induced subjective mood. **Int J Neuropsychopharmacol**. N. 10(1), p.85-98, 2007.
- JOHNSON, B.A.; Ait-Daoud, N.; Bowden, C.L.; DiClemente, C.C.; Roache, J.D.; Lawson, K.; Javors, M.A.; Ma, J.Z. Oral topiramate for treatment of alcohol dependence: A randomised controlled trial. **Lancet** n. 361, p. 1677–1685, 2003.
- JOHNSON, B.A.; Roache, J.D.; Ait-Daoud, N.; Wallace, C.; Wells, L.T.; Wang, Y. Eects of isradipine on methamphetamine-induced changes in attentional and perceptual-motor skills of cognition. **Psychopharmacology** n.178, p. 296–302, 2005.
- JURUENA, M.F., Cleare, A.J., Bauer, M.E., Pariante, C.M. Molecular mechanism of GR sensitivity and relevance for affective disorders for special issue. **Acta Neuropsychiatrica**. n. 15, p. 354-67, 2003.
- KALIVAS, P.W. The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. **Nat. Rev. Neurosci**. n. 10, p. 561–572, 2009.
- KANNER AM, Wu J, Faught E, Tatum WO 4th, Fix A, French JA; PADS Investigators. A past psychiatric history may be a risk factor for topiramate-related psychiatric and cognitive adverse events. **Epilepsy Behav**. n.4(5), p. 548-52, 2003.
- KANOSKI, S.E., Davidson, T.L., 2011. Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity. **Physiol Behav**. n. 103(1), p. 59-68, 2011.
- KANOSKI, S.E., Davidson, T.L. Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity. **Physiol Behav**. n. 103(1), p. 59-68, 2011, 2011.

KAUER, J.A.; MALENKA, R.C. Synaptic plasticity and addiction. **Nat Ver Neurosci** v. 8, p. 844-858, 2007.

KLIMAS J, Gorfinkel L, Giacomuzzi SM, Ruckes C, Socías ME, Fairbairn N, Wood E. Slow release oral morphine versus methadone for the treatment of opioid use disorder. **BMJ Open**. n. 2;9(4), e025799, 2019.

KNAPP C.M, Ciraulo DA, Sarid-Segal O, Richardson MA, Devine E, Streeter CC, Oscar-Berman M, Surprise C, Colaneri L, Putnam M, Waters M, Richambault C. Zonisamide, topiramate, and levetiracetam: efficacy and neuropsychological effects in alcohol use disorders. **J Clin Psychopharmacol**. 2015.

KOCHELMANN, E., Elgar, C.E., Helmstardter, C. Cognitive profile of topiramate as compared with lamotrigine in epilepsy patients on antiepileptic drug polytherapy: relationships to blood serum levels and comedication. **Epilepsy Behav**, n. 5(5)p. 716-21, 2004.

KOCHIKUZHYIL, B.M.; Devi, K.; Fattepur, S.R. Effect of saturated fatty acid-rich dietary vegetable oils on lipid profile, antioxidant enzymes and glucose tolerance in diabetic rats. **Indian J. Pharmacol**. 2010, 42, 142–145.

KODALI, D. R.; LIST, G. R. *Trans* fat alternatives. **Champaign**: AOCS press, 2005.

KOO OM, Rubinstein I, Onyuksel H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. **Nanomedicine**. n.1(3), p. 193-212, 2005.

KOOB, G.F. A role for brain stress systems in addiction. **Neuron** n. 59, p. 11–34, 2008.

KOOB, G.F., Le Moal, M. Plasticity of reward neurocircuitry and the ‘dark side’ of drug addiction. **Nat. Neurosci**. n. 8, p. 1442–1444, 2005.

KOPELMAN, P.G. Obesity as a medical problem. **Nature** n. 404, p. 635–643, 2000.

KRANZLER HR, Feinn R, Gelernter J, Pond T, Covault J. Topiramate's reduction of body mass index in heavy drinkers: lack of moderation by a GRIK1 polymorphism. **Exp Clin Psychopharmacol**. n. 22(5), p. 419-23, 2014.

KROMHOUT, D.; de GOEDE, J. Update on cardiometabolic health effects of omega-3 fatty acids. **Curr. Opin. Lipidol**. v. 25, p. 85-90, 2014.

KUHN FT, et al. Cross-Generational trans Fat Consumption Favors Self- Administration of Amphetamine and Changes Molecular Expressions of BDNF, DAT, and D1/D2 Receptors in the Cortex and Hippocampus of Rats. **Neurotox Res** v. 28, p. 319-331, 2015.

LAURITZEN, L., Hansen, H.S., Jørgensen, M.H., Michaelsen, K.F. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. **Prog Lipid Res**. n. 40, p. 1-94, 2001.

LE AD, Funk D, Coen K, Li Z, Shaham Y. Role of corticotropin-releasing factor in the median raphe nucleus in yohimbine-induced reinstatement of alcohol seeking in rats. **Addict Biol.** 2011

LEAMY, A.K.; Egnatchik, R.A.; Young, J.D. Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. **Prog. Lipid Res.** n. 52, p. 165–174, 2013.

LEE AG, East JM, Froud RJ. Are essential fatty acids essential for membrane function? **Prog Lipid Res** n. 25, p. 41–6, 1986.

LESHNER, A.I.; KOOB, G.F. Drugs of abuse and the brain. **Proc Assoc Am Physicians** n. 111, p. 99-108, 1999.

LIN, J., et al. Rapamycin prevents drug seeking via disrupting reconsolidation of reward memory in rats. **Int J Neuropsychopharmacol** n. 17, p. 127-136, 2014.

LIU Y, Le Foll B, Liu Y, Wang X, Lu L. Conditioned place preference induced by licit drugs: establishment, extinction, and reinstatement. **ScientificWorldJournal.** 2008

LIU, K.; Czaja, M.J. Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy. **Cell. Death Differ.** n. 20, p. 3–11, 2013.

LIU, S.L., Zukin, R.S. CA<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptor synaptic plasticity and neuronal death. **Trends Neurosci.** 30, 126-134, 2007.

MALDONADO C, Rodríguez-Arias M, Castillo A, Aguilar MA, Miñarro J. Effect of memantine and CNQX in the acquisition, expression and reinstatement of cocaine-induced conditioned place preference. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** n. 9;31(4), p. 932-939, 2007.

MANCHIKANTI, S.L, et al. Opioid epidemic in the United States. **Pain Phys.** n. 15, p. ES9-ES38, 2012.

MANCINI, A., Imperlini, E., Nigro, E., Montagnese, C., Daniele, A., Orrù, S., Buono, P. Biological and Nutritional Properties of Palm Oil and Palmitic Acid: Effects on Health. **Molecules.** n. 18, p. 17339-61, 2015.

MARANGONI, A. G., ROUSSEAU, D. Engineering triacylglycerols: the role of interesterification. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, p. 329-336, 1995.

MATTHEWS, R.T., German, D.C. Electrophysiological evidence for excitation of rat ventral tegmental area dopamine neurons by morphine. **Neuroscience** n.11, p. 617–625, 1984.

MATTICK, R.P., Breen, C., Kimber, J. & Davoli, M. Buprenorphine maintenance versus placebo or methadone maintenance for opioid dependence. **Cochrane Database Syst. Rev.**, 6, CD002207, 2014.

MBA, O.I.; Dumont, M.J.; Ngadi, M. Palm Oil: Processing, characterization and utilization in the food industry. A review. **Food Biosci.** n. 10, p. 26–41, 2015.

MEDAGMA, A.; Senaratne, T.; Bandara, J.M.R.P.; Abeysekera, R.A.; Imbulpitiya, I.V.B. Topiramate-induced acute onset myopia: A case report. **BMC Res.** n. 7, p. 665, 2014.

MENG, Y., Zhang, Y., Jia, Z. Synaptic transmission and plasticity in the absence of AMPA glutamate receptor GluR2 and GluR3. **Neuron** n. 39, p. 163–176, 2003.

METZ VG, Segat HJ, Dias VT, Barcelos RCS, Maurer LH, Stiebe J, Emanuelli T, Burger ME, Pase CS. Omega-3 decreases D1 and D2 receptors expression in the prefrontal cortex and prevents amphetamine-induced conditioned place preference in rats. **J Nutr Biochem.** N. 67, p. 182-189, 2019.

MILANESI LH, Rossato DR, Dias VT, Kronbauer M, D'avila LF, Somacal S, Duarte T, Duarte MMF, Emanuelli T, Burger ME. Mediterranean X Western based diets: Opposite influences on opioid reinstatement. **Toxicol Lett.** N. 15, p. 308:7-16, 2019.

MILANESI LH, Roversi K, Antoniazzi CTD, Segat HJ, Kronbauer M, D'avila LF, Dias VT, Sari MHM, Barcelos RCS, Maurer LH, Emanuelli T, Burger ME, Trevizol F. Toxicological aspects of the interesterified-fat from processed foods: Influences on opioid system and its reward effects in rats. **Food Chem Toxicol.** 2017

MILTON, A.L., Everitt, B.J. The persistence of maladaptive memory: addiction, drug memories and anti-relapse treatments. **Neurosci. Biobehav. Rev.** n. 36, p. 1119–1139, 2012.

MOGHMIMI, S.M. Nanomedicine: current status and future prospect. **FASEB J.** v.19, n3, p. 311-30, 2005.

MOORE CF, Protzuk OA, Johnson BA, Lynch WJ. The efficacy of a low dose combination of topiramate and naltrexone on ethanol reinforcement and consumption in rat models. **Pharmacol Biochem Behav.** n. 116, p. 107-15, 2014.

MORALES I, et al. Involvement of opioid signaling in food preference and motivation: Studies in laboratory animals. **Prog Brain Res.** v. 229, p. 159-187, 2016.

MORGAN, T.E.; WONG, A.M.; FINCH, C.E. Anti-inflammatory mechanisms of dietary restriction in slowing aging processes. **Interdiscip Top Gerontol** n. 35, p. 83-97, 2007.

MORÓN, J.A., Aul-Husn, N.S., Rozenfeld, R., Dolios, G., Wang, R., Devi, L.A. Morphine administration alters the profile of hippocampal postsynaptic density-associated proteins: a proteomics study focusing on endocytic proteins. **Mol Cell Proteomics.** N. 6(1), p. 29-42, 2007.

MOZAFARIAN, D.; CLARKE, R. Quantitative effects on cardiovascular risk factors and coronary heart disease risk of replacing partially hydrogenated vegetable oils with other fats and oils. **Eur. J. Clin. Nutr.** n. 63, p. S22–S33, 2009.

- MYERS, K.M.; Carlezon, W.A., Jr.; Davis, M. Glutamate receptors in extinction and extinction-based therapies for psychiatric illness. **Neuropsychopharmacology** n. 36, p. 274–293, 2011.
- NAKAMURA, M. T., & Nara, T. Y. Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. **Annual Review of Nutrition**, n. 24, p. 345–376, 2004.
- NEMIROVSKY, N.E.; Olive, M.F. Medications for the treatment of cocaine addiction: focus on glutamatergic compounds In *Cocaine Abuse: Pharmacology, Treatment and Relapse Prevention*; Fang, X.C.; Yue, L. Eds.; Nova Biomedical: Hauppauge, NY, USA; pp 115–129, 2012.
- NELSON, DL, Cox MM. Lipid Biosynthesis. In: *Principles of Biochemistry*. New York: W.H. Freeman and Company; p. 787-815, 2005.
- NESTLER, E.J. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. **Nat Rev Neurosci**. n. 2(2), p. 119-28, 2001.
- NURIYA, M., Oh, S., Haganir, R.L. Phosphorylation-dependent interactions of alpha-actinin-1/IQGAP1 with the AMPA receptor subunit GluR4. **Journal of Neurochemistry** n. 95, p. 544–552, 2005.
- O'BRIEN, C.P. A range of research-based pharmacotherapies for addiction. **Science** n. 278, p. 66-70, 1997.
- PARIANTE CM, Miller AH. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. **Biol Psychiatry**. n. 49, p. 391-404, 2001.
- PARK, M. AMPA Receptor Trafficking for Postsynaptic Potentiation. **Front Cell Neurosci**. PMID: 30364291 Free PMC article. Review, 2018.
- PASE, C.S., et al. Influence of perinatal *trans* fat on behavioral responses and brain oxidative status of adolescent rats acutely exposed to stress. **Neuroscience** n. 247, p. 242-52, 2013.
- PASSAFARO, M., Piech, V., Sheng, M., Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons. **Nat Neurosci**, n. 4(9), p. 917-26, 2001.
- PATEL, R.J., Parikh, R. Intranasal delivery of topiramate nanoemulsion: Pharmacodynamic, pharmacokinetic and brain uptake studies. **Int J Pharm**. 585:119486, 2020.
- PETERS, J., Kalivas, P.W., Quirk, G.J. Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. **Learn Mem**. n. 20, p. 279-88, 2009.
- PEZZINI, B.R Silva, M.A.S., Ferraz, H.G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados, **Rev. Bras. Ciências Farm**. 43, 2007.

- PICONE, P., Bondi, M.L., Montana, G., Bruno, A., Pitarresi, G., Giammona, G., Di Carlo, M. Ferulic acid inhibits oxidative stress and cell death induced by Ab oligomers: improved delivery by solid lipid nanoparticles. **Free Radic Res.** 43(11), p. 1133-45, 2009.
- POPIK P, Wróbel M. Morphine conditioned reward is inhibited by MPEP, the mGluR5 antagonist. **Neuropharmacology**. n. 43(8), p.1210-7, 2002.
- PORTUGAL, G.S., Al-Hasani, R., Fakira, A.K., Gonzalez-Romero, J.L., Melyan, Z., McCall, J.G., Bruchas, M.R., Moron, J.A. Hippocampal long-term potentiation is disrupted during expression and extinction but is restored after reinstatement of morphine place preference. **J. Neurosci.** 34, 527–538, 2014.
- POTHOS, E.N., Creese, I., Hoebel, B.G. Restricted eating with weight loss selectively decreases extracellular dopamine in the nucleus accumbens and alters dopamine response to amphetamine, morphine, and food intake. **J Neurosci.** n. 15, p. 6640–6650, 1995.
- POULETTY, P. Drug addictions: towards socially accepted and medically treatable diseases, **Nat. Rev. Drug Discov.** n.1, p. 731-736, 2002.
- RATNAYAKE, W.M., et al. Mandatory *trans* fat labeling regulations and nationwide product reformulations to reduce trans fatty acid content in foods contributed to lowered concentrations of trans fat in Canadian women's breast milk samples collected in 2009–2011. **Am. J. Clin. Nutr.** n. 100, p. 1036-1040, 2014.
- REENA, M.B.; REDDY, Y.R.S.; LOKESH, B.R. Changes in triglyceride molecular species and thermal properties of blended and interesterified mixtures of coconut oil with rice bran oil or sesame oil, and palm oil with rice bran oil or sesame oil. **Eur J Lipid Sci Technol.** n. 111, p. 346-357, 2009.
- REISI, Z. Bani-Ardalan, M. Zarepour, L. Haghparast, A. Involvement of D1/D2 dopamine receptors within the nucleus accumbens and ventral tegmental area in the development of sensitization to antinociceptive effect of morphine. **Pharmacol. Biochem. Behav.** n. 118, p. 16–21, 2014.
- RIBEIRO DO COUTO, B., et al. Long-lasting rewarding effects of morphine induced by drug primings. **Brain Res** n. 1050, p. 53-63, 2005.
- RIBEIRO, A.P.B. et al. Interesterificação química: alternativa para obtenção de gorduras zero trans. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, 1295-1300, 2007.
- RICHARDS DA, Bliss TVP, Richards CD. Differential modulation of NMDA-induced calcium transients by arachidonic acid and nitric oxide in cultured hippocampal neurons. **Eur J Neurosci** n. 17, p. 2323–8, 2003.
- ROBERTSON, S.D., Matthies, H.J., Galli, A. A closer look at amphetamine-induced reverse transport and trafficking of the dopamine and norepinephrine transporters. **Mol. Neurobiol.** N. 39, p. 73–80, 2009.

ROBINSON, D.M., et al. Influence of Interesterification of a Stearic Acid-Rich Spreadable Fat on Acute Metabolic Risk Factors. **Lipids** n.44, p.17-26, 2009.

ROCH, M.A., Constantino, V.R.L., Koh, I.H.J., de Faria, D.L.A., Gil, O.M. Modified drug release system based on Sulindac and layered double hydroxide: **An in vivo Raman investigation, Vib. Spectrosc.** N. 87, p. 60–66, 2016.

ROVERSI, K., et al. *Trans* fat intake across gestation and lactation increases morphine preference in females but not in male rats: Behavioral and biochemical parameters. **Eur J Pharmacol** v. 788, p. 210-217, 2016.

ROY, S., et al. Modulation of immune function by morphine: implications for susceptibility to infection. **J. Neuroimmune Pharmacol.** n. 1, p. 77-89, 2006.

RUFFLE, J. K. Molecular neurobiology of addiction: what's all the (delta)fosb about? **Am. J. Drug Alcohol Abuse** v. 40, p. 428–437, 2014.

RUSSEL, S.E., Puttick, D.J., Sawyer, A.M., Potter, D.N., Mague, S., Carlezon Jr, W.A., Chartoff, E.H. Nucleus Accumbens AMPA Receptors Are Necessary for Morphine-Withdrawal-Induced Negative-Affective States in Rats. **J Neurosci.** 2016

SALEM, N., Litman, B., Kim, H.Y., Gawrisch, K. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. **Lipids** 36:945–959, 2001.

SALISBURY-AFSHAR, E. Topiramate for the prophylaxis of episodic migraine in adults. **Am. Fam. Phys.** N. 90, p. 24, 2014.

SÁNCHEZ-VILLAREJO, M.V.; López-Pedrajas, R.; Sánchez-Vallejo, V.; Genovés, J.M.; Muriach, M.; Barcia, J.M.; Romero, F.J.; Miranda, M. Chronic cocaine effects in retinal metabolism and electrophysiology: Treatment with topiramate. **Curr. Eye Res.** n. 39, p. 493–503, 2014.

SARAIVA, C. et al. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases. **J Control Release.** v. 235, p. 34-47, 2016.

SCHIMITES, P.I, Segat, H.J, Teixeira L G, Martins, L R, Mangini, L.T., Baccin, P.S, Rosa, H.Z, Milanesi, L.H, Burger, M.E., Soares, A V. Gallic acid prevents ketamine-induced oxidative damages in brain regions and liver of rats. **Neurosci Lett** 1;714:134560, 2020.

SCHUCKIT, M.A. Treatment of opioid-use disorders. **N. Engl. J. Med.**, n. 375, p. 357–368, 2016.

SCOFIELD, M.D., Kalivas, P.W. Astrocytic dysfunction and addiction: consequences of impaired glutamate homeostasis. **Neuroscientist** n. 20(6), p. 610-622, 2014.

SENANAYAKE, S. P. J. N.; SHAHIDI, F. Modification of Fats and Oils via Chemical and Enzymatic Methods. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products.** N. 3, p.17, 2005.

- SHAHAM, Y., Hope, B.T. The role of neuroadaptations in relapse to drug seeking. **Nat Neurosci.** n. 8(11), p. 1437-1439, 2005.
- SHALEV U, Erb S, Shaham Y. Role of CRF and other neuropeptides in stress-induced reinstatement of drug seeking. **Brain Res.** 1314, p.15–28, 2010.
- SHEPPARD, K.W, Cheatham, C.L. Omega-6 to omega-3 fatty acid ratio and higher-order cognitive functions in 7- to 9-y-olds: a cross-sectional study. **Am J Clin Nutr.** n. 98, p. 659-67, 2013.
- SHETTY R.A., Rutledge MA, Forster MJ. Retrograde conditioning of place preference and motor activity with cocaine in mice. **Psychopharmacology** n. 234, p. 515-522, 2017
- SHINN, A.K., Greenfield, S.F. Topiramate in the treatment of substance-related disorders: a critical review of the literature. **J Clin Psychiatry** n. 71(5), p. 634-48, 2010.
- SHUKLA A, Beroun A, Panopoulou M, Neumann PA, Grant SG, Olive MF, Dong Y, Schlüter OM. Calcium-permeable AMPA receptors and silent synapses in cocaine-conditioned place preference. **EMBO J.** 15;36(4):458-474, 2017.
- SIAHPOSHT-KHACHAKI, A., Fatahi, Z., Yans, A., Khodaghali, F., Hagparast, A. Involvement of AMPA/Kainate Glutamate Receptor in the Extinction and Reinstatement of Morphine-Induced Conditioned Place Preference: A Behavioral and Molecular Study. **Cell Mol Neurobiol.** 2017
- SIM, H. et al. Role of dopamine D2 receptors in plasticity of stress-induced addictive behaviours. **Nat. Commun.** n. 4, p. 1579, 2013.
- SIMOPOULOS AP, Leaf A, Salem Jr N. Workshop on the essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. **J Am Coll Nutr** n. 18, p. 487–9, 1999.
- SIMOPOULOS AP. Evolutionary aspects of the dietary omega-6:omega-3 fatty acid ratio: medical implications. **World Rev Nutr Diet** n. 100, p. 1–21, 2009.
- SIMOPOULOS, A.P. An Increase in the Omega-6/Omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. **Nutrients**, v. 8, n. 3, p.1-17, 2016.
- SIMOPOULOS, A.P. Dietary Omega-3 fatty acid deficiency and high fructose intake in the development of metabolic syndrome, brain metabolic abnormalities, and non-alcoholic fatty liver disease. **Nutrients**, v. 5, n. 8, p. 2901-2923, 2013.
- SONG, I., Huganir, R.L. Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. **Trends in Neurosciences** v. 25, p. 578–588, 2002.
- SONGUR, A., Sarsilmaz, M., Sogut, S., Ozyurt, B., Ozyurt, H., Zararsiz, I., Turkoglu, A.O. Hypothalamic superoxide dismutase, xanthine oxidase, nitric oxide, and malondialdehyde in rats fed with  $\alpha$ -3 fatty acids. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** 28:693–698, 2004.

- SONUGA-BARKE EJS, Brandeis D, Cortese S, et al. Nonpharmacological interventions for ADHD: Systematic review and metaanalyses of randomized controlled trials of dietary and psychological treatments. **Am J Psychiatry** n. 170: p. 275–289, 2013.
- SOYKA, M., Muller, C.A. Pharmacotherapy of alcoholism - an update on approved and off-label medications. **Expert Opin Pharmacother**, 18(12), p. 1187-1199, 2017.
- STENLOF, K., Rossner, S., Vercauysse, F., Kumar, A., Fitchet, M., Sjostrom, L. OBDM-003 Study Group. Topiramate in the treatment of obese subjects with drug-naive type 2 diabetes. **Diabetes Obes Metab** n. 9(3), p. 360-368, 2007.
- STOUFFER, M.A., et al. Insulin enhances striatal dopamine release by activating cholinergic interneurons and thereby signals reward. **Nat Commun**. n. 6, p. 8543, 2015.
- STRANG J, Volkow ND, Degenhardt L, Hickman M, Johnson K, Koob GF, Marshall BDL, Tyndall M, Walsh SL. Opioid use disorder. **Nat Rev Dis Primers**. N. 9, p. 6(1):3, 2020.
- STROHLE, A., Holsboer, F. Stress responsive neurohormones in depression and anxiety. **Pharmacopsychiatry**. n. 36(Suppl 3), p. S207–S214, 2003.
- SUGANAMI, T.; Tanimoto-Koyama, K.; Nishida, J.; Itoh, M.; Yuan, X.; Mizuarai, S.; Kotani, H.; Yamaoka, S.; Miyake, K.; Aoe, S.; et al. Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**. N. 27, p.84–91, 2007.
- SULLIVAN, M.P., McHale, K.J., Parvizi, J., Mehta, S. Nanotechnology: current concepts in orthopaedic surgery and future directions. **Bone Joint J** 96-B(5), p. 569-73, 2014.
- SUN, Q., et al. A prospective study of trans fatty acids in erythrocytes and risk of coronary heart disease. **Circulation** n. 115, p. 1858-1865, 2007.
- SUNDRAM, K., Karupaiah, T., Hayes, K.C., 2007. Stearic acid-rich interesterified fat and trans-rich fat raise the LDL/HDL ratio and plasma glucose relative to palm olein in humans. **Nutr. Metab**. n. 4, p. 3. 2007.
- SUTTER, A.G.; Palanisamy, A.P.; Lench, J.H.; Eskilsen, S.; Geng, T.; Lewin, D.N.; Cowart, L.A.; Chavin, K.D. Dietary Saturated Fat Promotes Development of Hepatic Inflammation through Toll-Like Receptor 4 in Mice. **J. Cell. Biochem**. V. 117, p. 1613–1621, 2016.
- TAHA, A. Y., Cheon, Y., Faurot, K. F., Macintosh, B., Majchrzak-Hong, S. F., Mann, J. D., Ramsden, C.E. Dietary omega-6 fatty acid lowering increases bioavailability of omega-3 polyunsaturated fatty acids in human plasma lipid pools. **Prostaglandins**,
- TANAKA T, Kai N, Kobayashi K, Takano Y, Hironaka N. Up-regulation of dopamine D1 receptor in the hippocampus after establishment of conditioned place preference by cocaine. **Neuropharmacology** n. 61, p. 842-8, 2011.

TANG, W., Wesley, M., Freeman, W.M., Liang, B., Hemby, S.E. Alterations in ionotropic glutamate receptor subunits during binge cocaine self-administration and withdrawal in rats. **Journal of Neurochemistry** v. 89, p. 1021–1033, 2004.

TEIXEIRA AM, Reckziegel P, Müller LG, Pereira RP, Roos DH, Rocha JBT, et al. Intense exercise potentiates oxidative stress in striatum of reserpine-treated animals. **Pharmacol Biochem Behav** n. 92, p. 231–5, 2009.

TEIXEIRA, A.M., et al. Could dietary trans fatty acids induce movement disorders? Effects of exercise and its influence on Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase and catalase activity in rat striatum. **Behav Brain Res** n. 226, p. 504-510, 2012.

TORREGROSSA M.M., Corlett PR, Taylor JR. Aberrant learning and memory in addiction. **Neurobiol Learn Mem.** n. 96, p. 609-623, 2011.

TRAN, T.T.; Postal, B.G.; Demignot, S.; Ribeiro, A.; Osinski, C.; Pais de Barros, J.P.; Blachnio-Zabielska, A.; Leturque, A.; Rousset, M.; Ferré, P.; et al. Short-term palmitate supply impairs intestinal insulin signaling via ceramide production. **J. Biol. Chem.** N. 291, p.16328–16338, 2016.

TREVIZOL, F., et al. Comparative study between n – 6, trans and n – 3 fatty acids on repeated amphetamine exposure: a possible factor for the development of mania. **Pharmacol Biochem Behav** n. 97, p. 560-565, 2013.

TVRZICKA, E., K., Kremmyda, L., Stankova, B., Zak, A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**;155(2):117-30, 2011. doi: 10.5507/bp.2011.038.

TZSCHENTKE, T.M. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. **Addict Biol** 12:227-462, 2007.

UMBRICHT, A.; DeFulio, A.; Winstanley, E.L.; Tompkins, D.A.; Peirce, J.; Mintzer, M.Z.; Strain, E.C.; Bigelow, G.E. Topiramate for cocaine dependence during methadone maintenance treatment: A randomized controlled trial. **Drug Alcohol Depend.** N. 140, p. 92–100, 2014.

VAL-LAILLET, D., et al. Neuroimaging and neuromodulation approaches to study eating behavior and prevent and treat eating disorders and obesity. **Neuroimage Clin.** n. 8:1–31, 2015.

VAN HUIJSTEE AN, Mansvelder HD. Glutamatergic synaptic plasticity in the mesocorticolimbic system in addiction. **Front Cell Neurosci** v. 8, p. 1–13, 2105.

VASSOLER, F.M., Oliver, D.J., Wyse, C., Blau, A., Shtutman, M., Turner, J.R., Byrnes, E.M. Transgenerational attenuation of opioid self-administration as a consequence of adolescent morphine exposure. **Neuropharmacology.** n. 113, p. 271-280, 2017.

VILLANI, A., Sultana, J., Doecke, J, Mantzioris E. Differences in the interpretation of a modernized Mediterranean diet prescribed in intervention studies for the management of type 2 diabetes: how closely does this align with a traditional Mediterranean diet? **Eur J Nutr.** 2018.

VINES A1, Delattre AM, Lima MM, Rodrigues LS, Suchecki D, Machado RB, Tufik S, Pereira SI, Zanata SM, Ferraz AC. The role of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in fish oil-mediated increased BDNF expression in the rat hippocampus and cortex: a possible antidepressant mechanism. **Neuropharmacology.** n. 62(1), p. 184-91, 2012.

VINUESA, A., Pomilio, C., Menafrá, M., Bonaventura, M.M., Garay, L., Mercogliano, M.F., Schillaci, R., Lux Lantos, V., Brites, F., Beauquis, J., Saravia, F. Juvenile exposure to a high fat diet promotes behavioral and limbic alterations in the absence of obesity. **Psychoneuroendocrinology.** n. 72, p. 22–33, 2016

WAINWRIGHT, P.E. Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms. **Proc Nutr Soc** n.61, p. 61–9, 2002.

WARNER-SMITH, M., Darke, S., Day, C. Morbidity associated with non-fatal heroin overdoses. **Addiction,** v. 97, N. 8, p. 963-967, 2002.

WARNICK, G.H.; BENDERSON, J.; ALBERS, J.J. Dextran sulfate- Mg<sup>2+</sup> precipitation procedure for quantitation of high-density lipoprotein cholesterol. **Clin Chem.** 28, p.1379-1388, 1982.

WEN, H.; Gris, D.; Lei, Y.; Jha, S.; Zhang, L.; Huang, M.T.; Brickey, W.J.; Ting, J.P. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. **Nat. Immunol.** n. 12, p. 408–415, 2011.

WENZEL, R., Schwarz, K., Padiyara, R., Topiramate for migraine prevention. **Pharmacotherapy.** N. 26(3), p. 375-87, 2006.

WILTGEN, B.J., Royle, G.A., Gray, E.E., Abdipronoto, A., Thanthaeng, N., Jacobs, N., Saab, F., Tonegawa, S., Heinemann, S.F., O'Dell, T.J., Fannselow, M.S., Vissel, B. A role for calcium-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and learning. **PLoS ONE,** e12818, 2010.

WING, R.R.; Phelan, S. Long-term weight loss maintenance. **Am. J. Clin. Nutr.** V. 82, p 222S–225S, 2005.

WISE, R.A. Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. **Neuron.** n. 36, p. 229-40, 2002.

World Drug Report 2019 (United Nations publication, Sales No. E.19.XI.8).

XU, B., Wang, Z., Li, G., Li, B., Lin, H., Zheng, R., Zheng, Q. Heroin-Administered Mice Involved in Oxidative Stress and Exogenous Antioxidant-Alleviated Withdrawal Syndrome. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** N. 99(2), p. 153-161, 2006.

YEHUDA, S., Rabinovitz, S., & Mostofsky, D. I. Essential fatty acids are mediators of brain biochemistry and cognitive functions. **Journal of Neuroscience Research**, n. 56, p. 565–570, 1999.

YOUNG, A.M. Moran, P.M. Joseph, M.H. The role of dopamine in conditioning and latent inhibition: what, when, where and how? **Neurosci. Biobehav. Rev.** n. 29, p. 963–976, 2005.

ZHANG, Z., Schulteis, G. Withdrawal from acute morphine dependence is accompanied by increased anxiety-like behavior in the elevated plus maze. **Pharmacol Biochem Behav.** n. 89(3), p.392-403, 2008.

ZHONG, W., Dong, Z., Tian, M., Cao, J., Xu, T., Xu, L., Luo, J. Opiate withdrawal induces dynamic expressions of AMPA receptors and its regulatory molecule CaMKIIalpha in hippocampal synapses. **Life Sci**, 24;79(9), 861-869, 2006.

ZHOU, W, Kalivas PW. N-acetylcysteine reduces extinction responding and induces enduring reductions in cue- and heroin-induced drug-seeking. **Biol Psychiatry.** 1;63(3), p. 338-340, 2008.

ZHU Y, Wienecke CF, Nachtrab G, Chen X. A thalamic input to the nucleus accumbens mediates opiate dependence. **Nature** v. 530, p. 219–222, 2016.

## ANEXO A:

Carta de aprovação do projeto “Influência do consumo de diferentes gorduras sobre parâmetros comportamentais, neuroquímicos e epigenéticos da prole previamente exposta a morfina” na Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria.



Comissão de Ética no Uso de Animais

da  
Universidade Federal de Santa Maria

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Influência do consumo de diferentes gorduras sobre parâmetros comportamentais, neuroquímicos e epigenéticos da prole previamente exposta à morfina", protocolada sob o CEUA nº 7948130517 (ID 001631), sob a responsabilidade de **Marilise Escobar Bürger e equipe; Marilise Escobar Bürger; Laura Hautrive Milanesi; Fabiola Trevizol; Geisa Sorezina Dolci** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 14/09/2017.

We certify that the proposal "Influence of different dietary fatty acids on behavioral, neurochemical and epigenetic parameters of offspring previously exposed to morphine", utilizing 264 Heterogenics rats (168 males and 96 females), protocol number CEUA 7948130517 (ID 001631), under the responsibility of **Marilise Escobar Bürger and team; Marilise Escobar Bürger; Laura Hautrive Milanesi; Fabiola Trevizol; Geisa Sorezina Dolci** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 09/14/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2017** a **08/2021**

Área: **Farmacologia**

Origem:	Biotério Central UFSM	sexo:	Machos	idade:	24 a 34 dias	N:	96
Espécie:	Ratos heterogênicos						
Linhagem:	Wistar				Peso: 80 a 150 g		
Origem:	Biotério Central UFSM	sexo:	Fêmeas	idade:	50 a 60 dias	N:	24
Espécie:	Ratos heterogênicos						
Linhagem:	Wistar				Peso: 200 a 250 g		
Origem:	Biotério externo	sexo:	Machos	idade:	0 a 21 dias	N:	72
Espécie:	Ratos heterogênicos						
Linhagem:	Wistar				Peso: 5 a 50 g		
Origem:	Biotério externo	sexo:	Fêmeas	idade:	0 a 21 dias	N:	72
Espécie:	Ratos heterogênicos						
Linhagem:	Wistar				Peso: 5 a 50 g		

Local do experimento: Todas as etapas serão realizadas no prédio 21. O animais serão mantidos no biotério do mesmo prédio e para os procedimentos experimentais e comportamentais serão transferidos para a sala 5220 (prédio 21).

Santa Maria, 13 de fevereiro de 2020

**ANEXO B:**

Carta de aprovação do projeto “Desenvolvimento farmacotécnico de nanocápsulas poliméricas destinadas ao tratamento da dependência, síndrome de abstinência e recaída a drogas aditiva” na Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria.



Comissão de Ética no Uso de Animais

da  
Universidade Federal de Santa Maria

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Desenvolvimento farmacotécnico de nanocápsulas poliméricas destinadas ao tratamento da dependência, síndrome de abstinência e recaída a drogas aditivas.", protocolada sob o CEUA nº 7200081018 (ID 002287), sob a responsabilidade de **Marilise Escobar Bürger e equipe; Laura Hautrive Milansei; Vinícia Garzella Metz; Higor Zuquetto da Rosa; Jéssica Leandra Oliveira da Rosa; Gerson Fernandes de Brum; Patrícia Severo do Nascimento** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 29/01/2019.

We certify that the proposal "Pharmacotechnical development of polymeric nanocapsules intended for the treatment of dependence, abstinence syndrome and relapse to addictive drugs", utilizing 190 Heterogenics rats (190 males), protocol number CEUA 7200081018 (ID 002287), under the responsibility of **Marilise Escobar Bürger and team; Laura Hautrive Milansei; Vinícia Garzella Metz; Higor Zuquetto da Rosa; Jéssica Leandra Oliveira da Rosa; Gerson Fernandes de Brum; Patrícia Severo do Nascimento** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 01/29/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de 01/2019 a 01/2023 Área: [Farmacologia](#)

Origem: [Biotério Central UFSM](#)  
 Espécie: [Ratos heterogênicos](#) sexo: [Machos](#) idade: [40 a 60 dias](#) N: [190](#)  
 Linhagem: [Wistar](#) Peso: [100 a 270 g](#)

Local do experimento: Todas as etapas serão realizadas no prédio 21. O animais serão mantidos no biotério do mesmo prédio e para os procedimentos experimentais e comportamentais serão transferidos para a sala de comportamento animal (5220- prédio 21) sob responsabilidade do professor Dr. Guilherme Vargas Bochi.

Santa Maria, 13 de fevereiro de 2020

  
 Profa. Dra. Patrícia Severo do Nascimento  
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
 Universidade Federal de Santa Maria

  
 Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho  
 Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
 Universidade Federal de Santa Maria