

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Domenika Rubert Rossato

**DROGADIÇÃO: A ESTIMULAÇÃO TÁTIL RECUPERA ASPECTOS
MOLECULARES E COMPORTAMENTAIS ASSOCIADOS À RECAÍDA
POR ANFETAMINA EM RATOS ADULTOS**

Santa Maria, RS

2022

Domenika Rubert Rossato

**DROGADIÇÃO: A ESTIMULAÇÃO TÁTIL RECUPERA ASPECTOS
MOLECULARES E COMPORTAMENTAIS ASSOCIADOS À RECAÍDA POR
ANFETAMINA EM RATOS ADULTOS**

Trabalho de Dissertação apresentado ao
Curso de Pós-Graduação em Farmacologia,
da Universidade Federal de Santa Maria
(UFSM, RS), como requisito para obtenção
do **Grau de Mestre em Farmacologia.**

Orientadora: Prof^a. Dra. Marilise Escobar Bürger

Santa Maria, RS
2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Rossato, Domenika

Drogadição: a estimulação tátil recupera aspectos moleculares e comportamentais associados à recaída por anfetamina em ratos adultos / Domenika Rossato.- 2022.
54 p.; 30 cm

Orientadora: Marilise Escobar Bürger
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, RS, 2022

1. Psicoestimulantes 2. Drogas aditivas 3. Terapias não-farmacológicas 4. Estimulação tátil 5. Anfetamina I. Escobar Bürger, Marilise II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

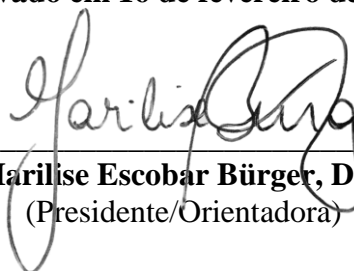
Declaro, DOMENIKA ROSSATO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Domenika Rubert Rossato

**DROGADIÇÃO: A ESTIMULAÇÃO TÁTIL RECUPERA ASPECTOS
MOLECULARES E COMPORTAMENTAIS ASSOCIADOS À RECAÍDA POR
ANFETAMINA EM RATOS ADULTOS**

Trabalho de Dissertação apresentado ao
Curso de Pós-Graduação em Farmacologia,
da Universidade Federal de Santa Maria
(UFSM, RS), como requisito para obtenção
do **Grau de Mestre em Farmacologia.**

Aprovado em 16 de fevereiro de 2022:



Marilise Escobar Bürger, Dra.
(Presidente/Orientadora)

Caren T. Antoniazzi

Caren Tatiane de David Antoniazzi, Dra. (DCU)



Hecson Jessor Segat, Dr. (UFSM)

Santa Maria,
Fevereiro/2022

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos aos que me proporcionaram um crescimento pessoal e profissional muito grande!

- ❖ Agradeço de forma especial minha orientadora Marilise Escobar Burger, por ter me proporcionado com a oportunidade de entrar e ficar no seu laboratório. Ao apoio, compreensão, incentivo, disponibilidade e carinho pelo qual me foi transmitido durante esse período.
- ❖ Ao Higor Zuquette Rosa, que de forma singular foi meu mentor durante a graduação e desde a origem desse trabalho. Obrigada pelo auxílio, disposição, confiança e parceria.
- ❖ Ao pessoal do laboratório que se fez presente na realização desse estudo, Jéssica Leandra da Rosa, Laura Hautrive Milanesi, Vínicia Garzella Metz e Lívia Ferraz D'Ávila.
- ❖ Ao Gustavo Cassol, que foi desde o início minha alavanca, meu protetor, minha inspiração, meu apoio, e quem me socorreu muitas vezes no meus experimentos e análises.
- ❖ Aos que já passam pelo Farmatox e deixaram sua sementinha em mim, que com uma palavra, auxílio, explicação, experimentos, sugestões, foram me moldando para ser quem sou hoje.
- ❖ Aos professores do programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSM, que contribuíram com suas aulas e seminários para minha formação.

A minha mais profunda GRATIDÃO!

*“Ninguém fracassa enquanto não
se rende”*

Saint Germain

RESUMO

DROGADIÇÃO: A ESTIMULAÇÃO TÁTIL RECUPERA ASPECTOS MOLECULARES E COMPORTAMENTAIS ASSOCIADOS À RECAÍDA POR ANFETAMINA EM RATOS ADULTOS

AUTORA: Domenika Rubert Rossato

ORIENTADORA: Prof^ª. Dra. Marilise Escobar Bürger

A drogadição é um transtorno neuropsiquiátrico crônico caracterizado pelo desenvolvimento de dependência, compulsão e frequentes episódios de recaída, já que os tratamentos disponíveis são ineficazes para prevenir tal situação. Considerando a drogadição, a anfetamina (ANF) exerce potente ação psicoestimulante, por atuar em receptores dopaminérgicos como D1R, transportador relacionado a recaptção de dopamina (DAT), podendo modular também fatores de transcrição como o deltaFosB, tendo como principal efeito o aumento de dopamina no espaço sináptico, sendo por isso frequentemente utilizada para fins recreacionais e relacionada à drogadição e recaída. Na busca de novas abordagens terapêuticas para tratar a drogadição e especialmente prevenir sua recorrência, a estimulação tátil (ET) é um manuseio que desperta interesse por sua capacidade de exercer neuroproteção em diferentes etapas do desenvolvimento. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da ET sobre parâmetros de drogadição em ratos adultos expostos a um protocolo comportamental de preferência à ANF. Dois grupos de ratos *Wistar* machos (50 dias) foram expostos ao paradigma de preferência de lugar condicionado (PLC) com salina (NaCl 0,9%; n=20) ou Anfetamina (ANF - 4,0 mg/Kg; n=20) por 8 dias. Após o condicionamento e avaliação do comportamento de preferência pela droga (PLC-1), metade dos animais de cada grupo experimental foi submetida ao protocolo de ET, através de um manuseio aplicado gentilmente na superfície dorsal do rato no sentido crânio-sacal durante 8 dias (15 min, 3x/dia). A partir do 9º dia, os animais foram novamente expostos à ANF ou salina, por 3 dias adicionais no PLC para realização do teste de recaída à droga (PLC-2). A memória de trabalho e locomoção foram monitorados no labirinto em Y. Na sequência, os animais foram eutanasiados e o *nucleus accumbens* (NAc) foi dissecado para análises moleculares feitas através de western blot. As observações comportamentais mostraram que os animais condicionados com ANF apresentaram preferência pelo local em que receberam a droga no PLC-1, enquanto que a memória de trabalho e locomoção não mostraram diferença entre os grupos experimentais, indicando que a PLC foi decorrente dos efeitos hedônicos da ANF. Destaca-se que além de prevenir a recaída pela droga, como observado no teste de PLC-2, em nível molecular a ET foi capaz de modular o sistema dopaminérgico, por impedir o aumento ocasionado pela ANF na imunoreatividade dos receptores D1 (D1R) de dopamina, do transportador de dopamina (DAT), e da enzima tirosina hidroxilase (TH). Também exerceu esse mesmo efeito no fator de transcrição Δ FosB e nos níveis de receptores Mu-opioides (MOR) na área do NAc. Através desse estudo foi possível observar que a ET foi capaz de exercer influência neuroprotetora no NAc, a qual é uma importante área dopaminérgica mesolímbica do sistema nervoso central associada ao desenvolvimento e manutenção da drogadição, prevenindo a recaída à droga. Deste modo, sendo uma manipulação não invasiva e isenta de efeitos adversos, pode-se inferir que a ET pode ser um procedimento terapêutico adjuvante ou complementar no tratamento de drogadição por psicoestimulantes como a ANF.

Palavras-chave: Psicoestimulantes. Drogas aditivas. Terapias não-farmacológicas.

ABSTRACT

DRUG ADDICTION: TACTILE STIMULATION RECOVERS MOLECULAR AND BEHAVIOURAL ASPECTS ASSOCIATED WITH RELAPSE BY AMPHETAMINE IN ADULT RATS

AUTHOR: Domenika Rubert Rossato

ADVISOR: Prof^a. Dra. Marilise Escobar Bürger

Drug addiction is a chronic neuropsychiatric disorder characterized by the development of dependence, compulsion and frequent episodes of relapse, as available treatments are ineffective to prevent such a situation. Considering drug addiction, amphetamine (AMPH) exerts a potent psychostimulant action, by acting on dopaminergic receptors such as D1R, a transporter related to dopamine reuptake (DAT), and may also modulate transcription factors such as deltaFosB, with the main effect of increasing dopamine in the synaptic space, which is why it is often used for recreational purposes and is related to drug addiction and relapse. In the search for new therapeutic approaches to treat drug addiction and especially to prevent its recurrence, tactile stimulation (TS) is a technique that arouses interest due to its ability to exert neuroprotection, being beneficial in situations of stress and anxiety at different stages of development. The aim of the present study was to evaluate the influence of TS on drug addiction parameters in adult rats exposed to an AMPH-preference behavioral protocol. Two groups of male Wistar rats (50 days old) were exposed to the conditioned place preference (CPP) paradigm with saline (0.9% NaCl; n=20) or Amphetamine (AMPH - 4.0 mg/Kg; n=20) for 8 days. After conditioning and evaluation of drug preference behavior (CPP-1), half of the animals from each experimental group were submitted to the TS protocol, through by handling gently applied to the dorsal surface of the rat in the cranio-sacral direction for 8 days (15 min, 3x/day). From the 9th day, the animals were exposed again to AMPH or saline, for 3 additional days in the CPP to perform the drug relapse test (CPP-2). Working memory and locomotion were monitored in the Y-maze. Afterwards, the animals were euthanized and the *nucleus accumbens* (NAc) was dissected for molecular analysis by western blot. Behavioral observations showed that animals conditioned with AMPH showed a preference for the drug paired side in CPP-1, while working memory and locomotion showed no difference between the experimental groups, indicating that CPP was due to the hedonic effects of AMPH. It is noteworthy that in addition to preventing the drug relapse, as observed in the CPP-2 test, at the molecular level TS was able to modulate the dopaminergic system, by preventing the increase caused by AMPH in the immunoreactivity of D1 receptors (D1R) of dopamine, the dopamine transporter (DAT), and the enzyme tyrosine hydroxylase (TH). It also exerted this same effect on the transcription factor Δ FosB and on the levels of Mu-opioid receptors (MOR) in the NAc area. Through this study, it was possible to observe that TS was able to exert a neuroprotective influence on NAc, which is an important mesolimbic dopaminergic area of the central nervous system associated with the development and maintenance of drug addiction, preventing drug relapse. Thus, being a non-invasive manipulation and free from adverse effects, it can be inferred that TS can be an adjuvant or complementary therapeutic procedure in the treatment of drug addiction by psychostimulants such as AMPH.

Keywords: Psychostimulants. Addictive drugs. Non-pharmacological therapies.

APRESENTAÇÃO

O estudo realizado para o desenvolvimento deste trabalho de dissertação está descrito e estruturado em seções dispostas na seguinte ordem: Introdução, Referencial teórico, Objetivos, Manuscrito Científico, Conclusões e Referências.

O item Manuscrito Científico que representa a íntegra deste estudo, encontra-se redigido em Inglês, no qual constam os itens Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Referências e submissão à revista Internacional Molecular Neurobiology.

As Referências referem-se somente às citações que aparecem no item Introdução e Desenvolvimento deste trabalho.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismo de ação da anfetamina.....	13
Figura 2 - Papel dos opióides na via de recompensa no sistema mesolímbico.....	14
Figura 3 - Demonstração em desenho da estimulação tátil em ratos adultos.....	19
Figura 4 - Resumo dos efeitos observados nesse trabalho pela estimulação tátil em parâmetros moleculares e comportamentais em ratos adultos após reexposição à anfetamina.....	43

MANUSCRITO CIENTÍFICO

Figure 1. Experimental design.....	25
Figure 2. Amphetamine conditioned place preference (AMPH-CPP) observed in CPP paradigm before 8 days of TS, (1 st CPP test) (2A); AMPH-CPP after AMPH withdrawal, TS exposed and AMPH re-exposed (2 nd CPP test) (2B).....	28
Figure 3. Quantification of both locomotor performance (A) and working memory (B) of adult animals exposed to AMPH and submitted to TS.....	29
Figure 4. D1R (A), DAT (B) and TH (C) levels were quantified in the NAc of rats submitted to TS and re-exposed to AMPH.....	30
Figure 5. Δ FosB (A) and MOR (B) levels were quantified in the NAc of rats submitted to TS and re-exposed to AMPH.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANF	Anfetamina
ATS	Estimulantes tipo anfetamínicos (do inglês: <i>Amphetamine-type stimulants</i>)
ATV	Área tegmental ventral
D1	Receptor dopaminérgico do tipo 1
D2	Receptor dopaminérgico do tipo 2
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina (do inglês: <i>Dopamine transporter</i>)
ET	Estimulação tátil
HPA	Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
MOR	Receptor μ -opioide
NA	Noradrenalina
NAc	<i>Nucleus accumbens</i>
NAT	Transportador de noradrenalina (do inglês: <i>Noradrenaline transporter</i>)
PLC	Preferência de lugar condicionado
SERT	Transportador de serotonina (do inglês: <i>Serotonin transporter</i>)
SNC	Sistema Nervoso Central
TDAH	Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade
VMAT2	Transportador vesicular de monoaminas 2

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	5
1. REFERÊNCIAL TEÓRICO	6
1.1 A ADIÇÃO.....	6
1.2 RECAÍDA: O PRINCIPAL PROBLEMA NO TRATAMENTO DE TRANSTORNOS NO USO DE DROGAS.....	9
1.3 EPIDEMIOLOGIA: USO ABUSIVO DE DROGAS ANFETAMINICAS	10
1.4 ANFETAMINA: FARMACODINÂMICA E MODULAÇÃO DE SISTEMAS CEREBRAIS ENVOLVIDAS NA ADIÇÃO.	11
1.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DE DROGADIÇÃO E RECAÍDA EM MODELOS ANIMAIS	15
1.6 TRATAMENTOS PARA A DROGADIÇÃO: DEPENDÊNCIA, ABSTINÊNCIA E RECAÍDAS	16
1.7 A ESTIMULAÇÃO TÁTIL (ET).....	17
1.8 JUSTIFICATIVA	19
2. OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
DESENVOLVIMENTO.....	21
3. MANUSCRITO CIENTÍFICO	21
Introduction	23
Materials and Methods	25
Results	28
Discussion.....	32
Conclusion.....	36
References	37
CONCLUSÃO.....	42
ANEXO I – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA	44
REFERÊNCIAS	45

INTRODUÇÃO

O consumo de substâncias aditivas no mundo, é alarmante e ocorre devido às suas propriedades hedônicas (WEIS e BUTTNER, 2017). O uso dessas substâncias psicoativas exerce influência negativa sobre as relações familiares, também modificando os valores pessoais e sociais, devido a um conjunto de fenômenos comportamentais, cognitivos e fisiológicos (ARGENTO et al., 2017). A busca por drogas psicoativas em conjunto com estímulos externos associados, pode levar à recaída após diferentes períodos de abstinência. Dependendo do tipo da droga, a ocorrência de recaídas é muito frequente e é geralmente acompanhada de prejuízos neuropsiquiátricos, sendo um grande problema no tratamento de indivíduos adictos (SINHA, 2008).

Experimentalmente, é possível quantificar o fenômeno de recaída após a aquisição e subsequente extinção de uma resposta comportamental específica, quando 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 inicialmente associados ao efeito hedônico causado pela droga (AGUILAR et al., 2009; EVERITT, 2014). Além desse contexto, outros fatores podem desencadear os episódios de recaída no período de abstinência, dentre esses, fatores estressantes e os efeitos hedônicos da própria droga (BALL et al., 2018).

Apesar do avanço nas descobertas dos mecanismos neuronais envolvidos na drogadição (VOLKOW et al., 2016), ainda não existe controle preventivo para o desenvolvimento de drogadição e sua conseqüente recaída, tendo em vista que há uma dificuldade em estabelecer um tratamento para os indivíduos adictos (GARDNER, 2011). Pode-se afirmar que tratamentos farmacológicos para prevenção das recaídas ao uso de drogas psicoestimulantes como anfetamina, ainda são inexistentes (VOLKOW e BOYLE, 2018).

Neste contexto, tratamentos não farmacológicos complementares e alternativos têm sido muito estudados e com resultados positivos (MAHONEY et al., 2020; WU et al., 2016). A estimulação tátil como uma forma de manipulação sensorial já demonstrou um potencial benéfico como prevenção da drogadição quando aplicada durante o período neonatal em ratos (ANTONIAZZI et al., 2014a; ANTONIAZZI et al., 2014b). Sabe-se que a chave para o sucesso do tratamento da drogadição a longo prazo é por meios não-farmacológicos e farmacológicos, por isso aqui aprofundaremos nosso

estudo utilizando a estimulação tátil na fase adulta dos animais na prevenção da recaída à busca por anfetamina.

1. REFERÊNCIAL TEÓRICO

1.1 A ADIÇÃO

Globalmente, em torno de 35 milhões de pessoas sofrem de transtornos decorrentes do uso de drogas e necessitam de tratamento (UNODC, 2021). Esse transtorno, referido como drogadição, já foi considerado um defeito moral ou de caráter, mas agora é entendido que se trata de uma doença crônica, onde o controle no uso de substâncias é prejudicado, o que ocasiona diversos prejuízos na saúde do indivíduo e na sociedade (BECHARA et al., 2019). Essa compreensão, ainda em evolução, sobre o uso de substâncias, teve implicações importantes para prevenção e tratamento, muito embora ainda não haja substância aprovada para esse fim (CHAN et al., 2019). Todas substâncias aditivas exercem poderosos efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC), proporcionando euforia e estímulos intensamente prazerosos, o que motiva o uso continuado, apesar dos riscos e danos potenciais (O'DONNELL et al., 2019).

Pesquisas mostram que a adição é desenvolvida por mudanças moleculares no cérebro, bem como pode ser influenciada por fatores genéticos, comportamentais, socioculturais e ambientais, resultando em potencial recorrência e dificuldade em seguir o tratamento prescrito. A adição é caracterizada pela compulsão de procurar e utilizar a droga com a perda do controle em limitar seu uso apesar de suas consequências adversas, apresentando um estado de homeostase alterado na presença crônica da droga (KOOB e LE MOAL, 2008). O uso crônico de drogas de abuso leva à dependência física e psicológica, e a retirada da droga desencadeia sintomas aversivos conhecidos como síndrome da abstinência (LERNER e KLEIN, 2019).

Deste modo, a adição está relacionada ao hábito e à recompensa ativando circuitos mesoestriatais e mesolímbicos, sendo considerada, portanto um distúrbio cerebral, causado pelo uso indevido de substâncias (GUST e MCCORMALLY, 2018). A adição parece surgir mais gradualmente e de forma duradoura como um processo de aprendizagem entre a droga e o ambiente. Assim, as condições variáveis para essa transição são o tipo de droga, o padrão de exposição e alterações que são individuais

quanto à vulnerabilidade para farmacodependência, como fatores ambientais e genéticos. Por isso, muitas pessoas podem usar drogas de potencial abuso durante a vida e mesmo assim não se tornarem adictos (MACNICOL, 2017).

Em virtude de divergentes denominações em relação a drogadição, o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5) - um manual de diagnóstico para médicos que contém descrições e sintomas de todos os transtornos mentais classificados pela American Psychiatric Association (APA), atualizou em 2013, tornando uma única categoria com diferentes níveis, onde tem-se hoje a denominação transtorno por uso de substâncias, com três subclassificações – leve, moderada e grave (APA, 2014).

Juntamente com a privação do uso da droga, ocorre a abstinência que é a presença de sintomas físicos e psicológicos associados que são provocados quando o uso da substância é interrompido. A interrupção na utilização de drogas em indivíduos adictos é caracterizada por ansiedade, agitação, irritabilidade os quais estão associados ao estado emocional negativo e contribuem para a recaída após períodos de abstinência (KOOB e LE MOAL, 2005). Além disso, na abstinência, ocorre aumento dos níveis de cortisol no sangue que são indicativos de estresse e ansiedade, devido a alterações no eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) (KOOB, 2008). Este eixo está indiretamente ligado ao sistema de recompensa modulando a liberação de dopamina (DA) o que pode ter impacto na adição (KOOB e SCHULKIN, 2019).

As drogas modulam a neuroplasticidade e perturbam circuitos neuronais e as cascatas de sinalização intracelular, promovendo mudanças duradouras associadas à drogadição (SINHA, 2008). A tolerância ocorre quando há necessidade de utilizar doses crescentes da substância para obter o mesmo efeito, (exposição a doses mais elevadas de drogas facilita as mudanças neuroplásticas) ou quando a quantia usada habitualmente passa a não produzir efeito, e quando se trata de drogas abusivas essa tolerância é excessivamente rápida (GARDNER, 2011). O uso de drogas aditivas a longo prazo também causa mudanças negativas em funções cognitivas, como déficit de aprendizado, prejudica a tomada de decisões e a capacidade de julgamento, bem como facilita comportamentos estressores e perda de memória. (BECHARA, 2001).

Autorregulação é um processo básico relacionado ao funcionamento cognitivo e controle das emoções, como um processamento que visa ajustar o estado mental e fisiológico de forma adaptativa ao contexto (NIKMANESH et al., 2014). Indivíduos que apresentam baixa capacidade de autorregulação, geralmente estão envolvidos com

abuso de substâncias, jogos de azar, compulsão por alimentos que são considerados comportamentos mal-adaptativos (WYPYCH e POTENZA, 2020). Um fator que pode ser crucial para essa questão é que somente no início da idade adulta os circuitos necessários para a autorregulação são totalmente desenvolvidos (POKHREL et al., 2013). Logo, a idade e o estágio de desenvolvimento também podem ser fatores determinantes para a transição da exposição inicial à droga para o uso repetido e, posteriormente, para a dependência.

Embora o uso de drogas em qualquer idade possa levar ao desenvolvimento de drogadição, quanto mais cedo começar o uso da droga, mais provável é que a adição ocorra (CREWS et al., 2007). A adolescência é um período crítico, onde a exposição a drogas ou a estímulos ambientais adversos em períodos de desenvolvimento cerebral podem levar a consequências prejudiciais e danosas, além de exacerbar os efeitos adversos das drogas (CREWS et al., 2007).

Quatro comportamentos são importantes na vulnerabilidade e desenvolvimento da adição: Impulsividade, reforço positivo, reforço negativo e compulsão (craving). (DALLEY et al., 2011). Os efeitos do reforço positivo tendem a reduzir com o uso repetido (Tolerância), e isso resulta em aumento do consumo para obter a mesma sensação ou resposta do nível inicial de reforço (KOOB, 2015). Além disso, emoções negativas relacionadas a abstinência, como sentir-se fisicamente doente, estresse, ansiedade e depressão, são fatores que levam o indivíduo ao retorno do uso, para redução desses sintomas (KOOB e SCHULKIN, 2019). Aos poucos o reforço positivo se transforma em reforço negativo, onde a remoção do estímulo, aumenta a probabilidade de consumo para sentir alívio (KOOB e LE MOAL, 2001). Com a continuação do uso a impulsividade se transformará em compulsão, que está ainda mais relacionada ao uso contínuo, pois a exposição aos estímulos da droga desencadeia o desejo de utilizar a droga (craving) e isso ocorre também durante o consumo, é o que manterá a motivação para continuar a consumi-la, mesmo sabendo que esse comportamento é prejudicial. (BERLIN e HOLLANDER, 2014; VOLKOW e MORALES, 2015).

A impulsividade gera a necessidade de obter recompensas rápidas, se deve a sensibilização do sistema de recompensa que prioriza os estímulos que gerem resultados rápidos e intensos (ROBINSON e BERRIDGE, 2008). Esse sistema de recompensa cerebral é conhecido por ser ativado, de diferentes maneiras, por todas as drogas de abuso, e têm em comum a ativação do sistema dopaminérgico como consequência aumento da liberação de DA muito rápido (fásico), mecanismo pelo qual o cérebro

sinaliza recompensa (KOOB e VOLKOW, 2016). Esse mecanismo se dá principalmente através de neurônios dopaminérgicos localizados na área tegmental ventral (VTA) que se projetam para o *nucleus accumbens* (NAc) para estimular os receptores D1 (D1R) (XIA et al., 2011). Esse processo pode induzir aprendizagem associativa, que é conhecida como condicionamento (BECHARA, 2001). Essa forte associação entre os efeitos hedônicos da droga e o ambiente de administração, pode contribuir para o uso continuado, bem como para o alto risco de recaída após abstinência (HYMAN et al., 2006).

1.2 RECAÍDA: O PRINCIPAL PROBLEMA NO TRATAMENTO DE TRANSTORNOS NO USO DE DROGAS.

As drogas abusivas promovem uma neuromodulação patológica no SNC após períodos de uso prolongado, que perduram mesmo após a cessação do uso, podendo a vulnerabilidade ao uso perdurar por meses ou anos (HUBBARD et al., 2003). Sendo a recaída um retorno ao comportamento de busca/consumo de drogas após um período de abstinência autoimposta ou forçada, a prevenção da recaída é a parte mais difícil do tratamento do abuso de drogas (HYMAN e MALENKA, 2001). Uma base para a explicação para a predisposição ou vulnerabilidade pode ser mecanismos deficientes na tomada de decisão e controle de impulso (KOOB e LE MOAL, 2008).

O controle da impulsividade é um fator chave para redução de recaída, tendo em vista ser um fator de risco para transtorno do uso de substâncias, bem como para uso contínuo (LOREE et al., 2015). Foi demonstrado que a impulsividade tem associação com a liberação de DA estriatal, atentando que indivíduos com alta impulsividade relataram efeitos mais agradáveis com ANF (OSWALD et al., 2007). O sistema opioide também tem envolvimento com o sistema regulatório da impulsividade, onde foi demonstrado que o aumento do receptor μ aumenta a impulsividade motora (OLMSTEAD et al., 2009). Uma maior disponibilidade do receptor μ , também está relacionado ao desejo, estando aumentado no uso de outras drogas de abuso como por exemplo álcool, opioides e cocaína (GORELICK et al., 2005; WILLIAMS et al., 2007; WILLIAMS et al., 2009).

Apesar do avanço das descobertas das alterações neuroadaptativas e mecanismos comportamentais (COOPER et al., 2017) existe ainda uma dificuldade na compreensão

do mecanismo exato referente à recaída, e uma dificuldade em estabelecer a relação direta entre reintegração estudada na parte pré-clínica e a recaída, na qual os indivíduos adictos são acometidos (EPSTEIN et al., 2006; KATZ e HIGGINS, 2003). Há sim, um progresso clínico no tratamento dos sintomas da síndrome de abstinência, (YAHYAVI-FIROUZ-ABADI e SEE, 2009) porém para controle dos problemas básicos da drogadição como desejo e recaída, ainda não se possui tratamento adequado para tal. Depreende-se que a chave para sucesso do tratamento da drogadição a longo prazo é a prevenção da recaída por não-farmacológicos e farmacológicos.

1.3 EPIDEMIOLOGIA: USO ABUSIVO DE DROGAS ANFETAMINICAS

O abuso de drogas representa um grave problema de saúde em todo o mundo. A estimativa da “United Nations Office on Drugs and Crime” é que 11 milhões de pessoas em todo mundo, em 2016, usavam drogas injetáveis e esse número corresponde a 0,22% da população entre 15 e 64 anos. Entre as drogas de uso ilícito, a canábis é a de maior prevalência anual de uso seguida imediatamente pelos opiáceos, anfetaminas e cocaína (UNODC, 2020). O uso abusivo de ANF cresce a uma taxa alarmante e apresenta elevado índice em países que cumprem regras rigorosas contra o uso de drogas ilícitas, como os Estados Unidos (UNODC, 2021). A Análise Executiva da Questão de Drogas no Brasil, estima que 0,5% da população adulta mundial tenha usado anfetaminas, entre 2018 e 2020 o que representa aproximadamente 27 milhões de pessoas (UNODC, 2020). A apreensão de drogas Estimulantes tipo anfetamínicos (ATS, do inglês, Amphetamine type stimulants) globalmente quadriplicou no período de 2009-2018, sendo os ATS responsáveis por 21% de todas as drogas apreendidas. (UNODC, 2021).

Um estudo feito pelo CEBRID (Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas) (2010) mostrou que 22,6% dos estudantes do ensino médio já fizeram uso de drogas na vida, e que o início do uso de anfetamínicos acontece aproximadamente, aos 14 anos de idade. Outro estudo realizado com pessoas de 14 a 58 anos, demonstrou que o início do uso de substâncias psicoativas anfetamínicas, foi com o intuito de melhorar o desempenho no trabalho, ou o desempenho sexual, sentir a sensação de pertencimento pessoal (estar em um grupo social por afinidade) e para ajudar no gerenciamento do estresse (O'DONNELL et al., 2019). Além disso, o que

motiva o uso continuado é o desafio de controlar os efeitos adversos que são relacionados aos sintomas da retirada (O'DONNELL et al., 2019).

Drogas psicoestimulantes, como ANF, são capazes de reduzir o sono, a fadiga e o apetite, além de aumentar a sensação de autoconfiança e a capacidade de concentração (WOOD et al., 2014). Porém, o uso clínico dessas substâncias é altamente restrito, uma vez que tem o poder de desenvolver quadros de dependência (VOLKOW e MORALES, 2015). Mesmo assim, muitos atletas, estudantes, médicos motoristas e pilotos fazem o uso indiscriminado dessas drogas (NEGRETE et al., 2004). Eles as utilizam por suas capacidades de manter estado de alerta por maior período de tempo, aumentar a capacidade de concentração e raciocínio (WOOD et al., 2014), sem considerar os efeitos indesejáveis da droga. Como todo psicoestimulante, o indivíduo terá como principais efeitos colaterais: irritabilidade, agressividade, elevação da temperatura corporal, frequência cardíaca e respiratória, ocorre a perda excessiva de peso, ansiedade e insônia, (SMITH et al., 2017), bem como pode levar a graves prejuízos a longo prazo, como uma série de danos neuropsiquiátricos, tal como acidente vascular cerebral, deficiência neurocognitiva, doença de Parkinson, convulsões e doença psicótica (LAPPIN e SARA, 2019).

Tendo em consideração que a utilização de substâncias que modulem o estado mental está em constante crescimento, não obstante a relevância dessa comorbidade não se dá apenas pela alta prevalência, mas também pela dificuldade em gerenciá-la. Especialmente a falta de uma melhor integração entre o serviço de saúde com o usuário com outras medidas além do tratamento medicamentoso, tendo em vista que este na sua majoritária utilização não tem sucesso no controle da drogadição (SISNAD, 2021).

1.4 ANFETAMINA: FARMACODINÂMICA E MODULAÇÃO DE SISTEMAS CEREBRAIS ENVOLVIDAS NA ADIÇÃO.

As anfetaminas e seus derivados são clinicamente empregados no tratamento do transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (GOLMIRZAEI et al., 2016). Dessa forma, as drogas anfetamínicas constituem uma entidade terapêutica, mas também são substâncias de abuso, dependendo do contexto do seu emprego (WOOD et al., 2014). Outras drogas anfetamínicas como o metilenedioximetanfetamina (MDMA,

popularmente conhecido como êcstasy), a dextroanfetamina e a metanfetamina são utilizadas com caráter abusivo (HEAL et al., 2013).

As Anfetaminas, quando administradas em doses repetidas, podem gerar dano psicomotor e potencial de reforço positivo (MILLER et al., 2015) e esse fenômeno, pode afetar a neuroplasticidade no sistema de recompensa como o sistema mesolímbico dopaminérgico, contribuindo para a adição (ROBINSON e BERRIDGE, 2008). Em estudos pré-clínicos demonstram que os psicoestimulantes aumentam a atividade locomotora, são facilmente auto-administrados em modelos de auto-administração (KUHN et al., 2015; ROTHMAN e BAUMANN, 2003; VEZINA, 2004) e da mesma forma mostram preferência condicionada de lugar, no aparato de PLC (ANTONIAZZI et al., 2014b; ROSA et al., 2020b; SEGAT et al., 2017), pelo seu potente efeito aditivo ou de reforço. A ANF, em doses clinicamente aprovadas, se liga aos mesmos sítios onde as monoaminas se conectam com seu transportador, como o transportador de noradrenalina (NAT), de dopamina (DAT), fazendo com que a receptação dessas monoaminas fique inibida com conseqüente aumento na fenda sináptica ver Fig. 1A, (AGGARWAL e MORTENSEN, 2017). Quando utilizada em maiores doses, como o que ocorre no abuso dessa substância ela também é um inibidor competitivo do transportador vesicular (VMAT2) tanto da DA quanto da NA (Fig. 1B). Desse modo, quando a anfetamina entra nas vesículas, ela desloca a DA, produzindo um excesso de liberação de DA no citoplasma neuronal (Fig. 1C). Conforme a DA se acumula no citoplasma do neurônio pré-sináptico, causa uma inversão na direção do DAT, liberando DA intracelular na sinapse, abrindo os canais pré-sinápticos para a liberação adicional de DA (Fig. 1D) (STAHL, 2017).

Figura 1. Mecanismo de ação da anfetamina

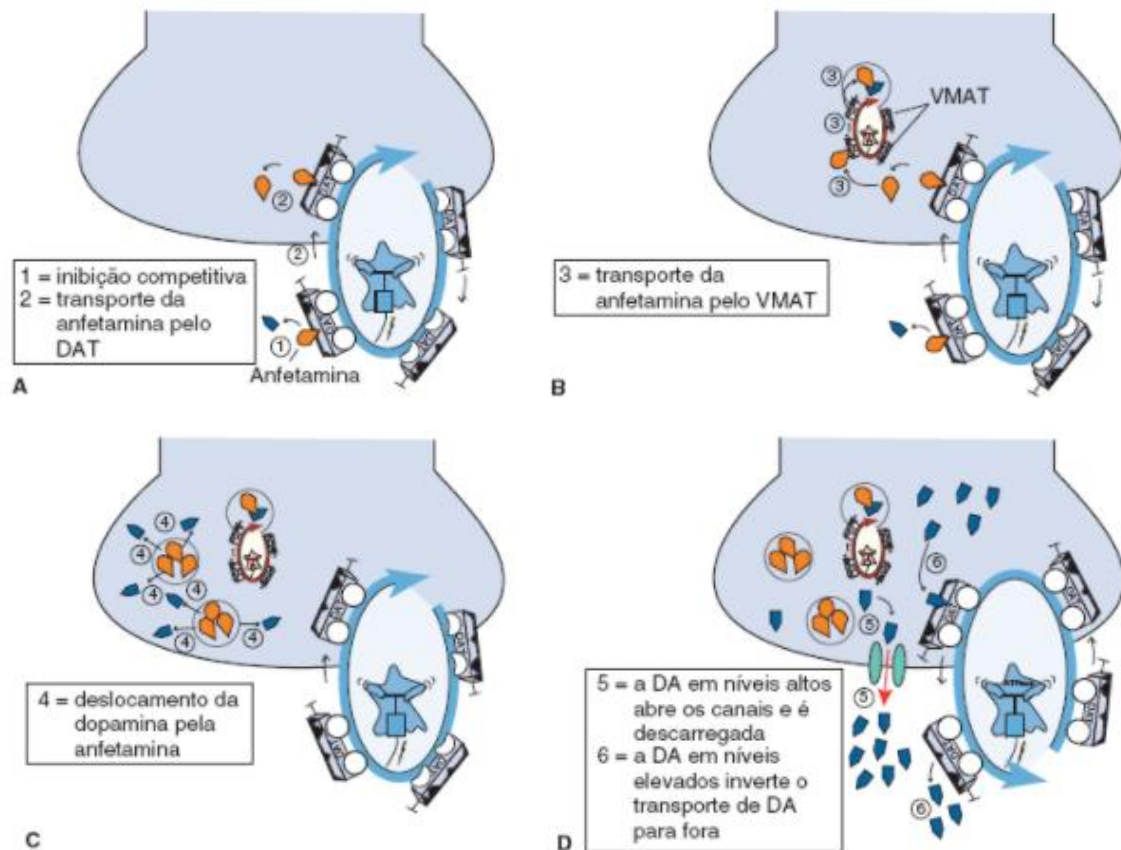


Figura 1. STHAL, 2017

Substâncias psicoestimulantes como as anfetaminas, atuam diretamente no sistema neurotransmissor dopaminérgico, o qual desempenha um importante papel no sistema mesolímbico-mesocortical, relacionados com mecanismos de recompensa, motivação e excitação. Tais mecanismos são mediados por receptores dopaminérgicos do tipo 1, 2 e 3 (D1, D2 e D3, respectivamente).

A atividade dos neurônios dopaminérgicos também é fortemente regulada pela neurotransmissão excitatória glutamatérgica e inibitória gabaérgica, sendo que alterações na plasticidade desses sistemas ocorre desde a primeira exposição a drogas de abuso (BAIMEL e BORGLAND, 2015). Os neurônios que sintetizam DA cumprem a maior parte desta neurotransmissão, estando também envolvidos no sistema de recompensa (STEINBERG et al., 2014). Esse sistema origina-se na área tegmental ventral (ATV), e situa-se na extremidade do tronco cerebral projetando-se para o *nucleus accumbens* (NAc), amígdala e córtex pré-frontal, o que resulta em

concentrações aumentadas de dopamina no NAc (BERRIDGE e KRINGELBACH, 2015). Como os neurônios dopaminérgicos são encontrados em diversas áreas cerebrais, as consequências geradas devido ao aumento de monoaminas causado pela ANF afetam desde a cognição até o comportamento motor devido a possível perda de corpos neuronais e terminais axônicos podendo causar prejuízos irreparáveis (WESTOVER et al., 2007).

As alterações estruturais e de funcionamento no sistema de recompensa ainda podem ser através de fatores de transcrição, que alteram a expressão de proteínas e que vão causar adaptações moleculares a longo prazo desempenhando um papel no comportamento de dependência e recaída (NESTLER, 2005). As proteínas do tipo FosB (FosB/ Δ FosB) são produtos da família de genes primários Fos e desempenham papéis críticos na regulação neural após a administração repetida de drogas psicoativas (BRENHOUSE e STELLAR, 2006). Nesse sentido, um desses fatores é Δ FosB, uma proteína mais estável que sua forma truncada FosB, e por isso após administração crônica de drogas de abuso, é intensamente acumulada nos neurônios espinhosos médios que contêm D1R principalmente em regiões estriatais destacando-se o NAc (EHLICH et al., 2002; LOBO et al., 2013; PERROTTI et al., 2008).

Opióides endógenos também foram implicados nas respostas de recompensa de drogas, por meio da regulação de opióides da via mesolímbica DA, (Fig.2) implicados em respostas hedônicas (LE MERRER et al., 2009) e também nas adaptações ocasionadas pela administração repetida e recaídas aos medicamentos (WISE e KOOB, 2014). Essas mudanças moleculares dentro do sistema sustentam as modificações alostáticas e perpetuam estados emocionais negativos que contribuem para a continuação da busca de drogas (KOOB e LE MOAL, 2001).

Figura 2. Papel dos opióides na via de recompensa no sistema mesolímbico.

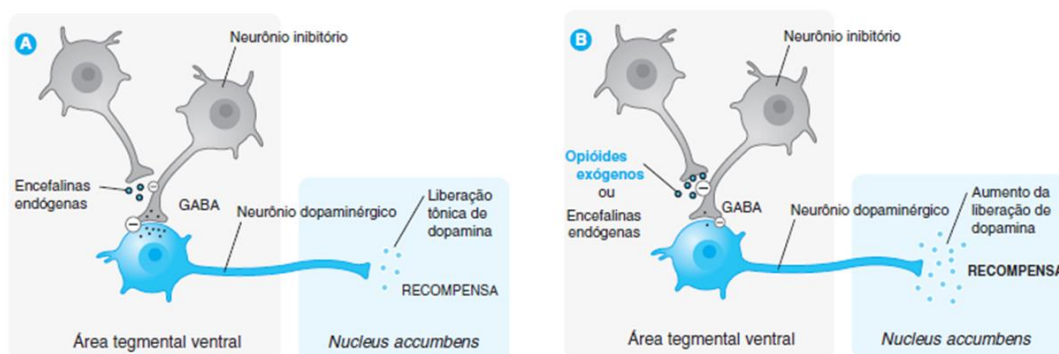


Figura 2. (GOLAN, 2009)

1.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DE DROGADIÇÃO E RECAÍDA EM MODELOS ANIMAIS

As condições pavlovianas são um mecanismo básico de aprendizagem baseado na experiência anterior, um método simples e quantificável de condicionamento pavloviano (CRUZ et al., 2010). A estimulação ambiental está relacionada à principal recompensa e a motivação uma vez que os estímulos ambientais são muito facilmente associados aos efeitos de drogas (SANCHIS-SEGURA e SPANAGEL, 2006). Para avaliar esta influência, os animais são primeiro treinados para associar apresentações de um estímulo com a entrega de uma recompensa primária (substância aditiva). Assim, dois principais modelos são usados em pesquisa pré-clínica para modelar a recaída: Preferência de lugar condicionado (PLC), onde ocorre a associação de estímulos baseados no modelo pavloviano e a autoadministração com base no condicionamento operante e pavloviano (GARCÍA PARDO et al., 2017). Em animais de laboratório é possível avaliar a recaída a partir de paradigmas de reintegração, onde estímulos como ambiente, drogas ou estresse são capazes de restaurar a resposta comportamental à droga, após um período de retirada (CRUZ et al., 2010).

O protocolo de PLC tem sido amplamente utilizado para a pesquisa na área da adição a drogas de abuso (DIAS et al., 2017; ROSA et al., 2020a). Esse teste baseia-se na capacidade de estímulos ambientais originalmente neutros adquirirem propriedades motivacionais positivas (preferência pelo lugar) ou negativas (aversão ao ambiente), após serem apresentados repetidamente na presença de uma substância com potencial de abuso como as drogas psicoestimulantes (BOUTON, 2019). Não só a exposição repetida, mas também, apenas uma dose de cocaína ou ANF é capaz de induzir uma preferência de lugar (RUNEGAARD et al., 2018).

Estímulos variados como cor, textura e odor podem ser usados na indução do PLC e têm sido amplamente empregados em modelos animais que utilizam ratos (METZ et al., 2019; MILANESI et al., 2021). Os animais recebem a droga em um compartimento e o veículo em outro compartimento do mesmo aparato. Seguindo esses pareamentos, é permitido aos animais, sem o efeito da droga, o livre acesso entre os dois ambientes e o tempo gasto no ambiente associado à droga é considerado como um índice de preferência (SANCHIS-SEGURA e SPANAGEL, 2006). Em outras palavras,

um maior tempo gasto no compartimento pareado com a droga indica uma maior preferência do animal à droga, enquanto que o menor tempo indica aversão à droga.

O protocolo de PLC empregado em roedores encontra validade frente à dependência em humanos, demonstrado por relatos de indivíduos com transtorno no uso de substâncias que apresentaram fortes associações com ambientes nos quais faziam uso de drogas de abuso (KHOURY et al., 2010). Além disso, as propriedades de incentivo associados aos lugares relacionados ao uso da droga de abuso podem provocar recaída dos adictos abstinentes (GOLDEN et al., 2019). Desse modo, o protocolo de PLC tem sido amplamente utilizado para evidenciar a dependência e testar possíveis terapêuticas na recaída por drogas de abuso (METZ et al., 2021; ROSA et al., 2020b; SEGAT et al., 2019).

1.6 TRATAMENTOS PARA A DROGADIÇÃO: DEPENDÊNCIA, ABSTINÊNCIA E RECAÍDAS

A adição está intimamente relacionada a elevados custos médico-hospitalar, perda de atividade cotidiana, marginalização e criminalidade, tornando-se assim uma desordem psiquiátrica cara aos cofres públicos (UNODC, 2020). Apesar da intensa pesquisa e dos avanços científicos, a adição é um gravíssimo problema de saúde pública, afetando não apenas os indivíduos dependentes, mas também seus familiares, empregadores e a sociedade em geral (O'DONNELL et al., 2019). De um modo geral, o uso de farmacoterapia similar a droga é capaz de reduzir os sintomas adversos da mesma, como por exemplo, o uso de opioides (metadona ou buprenorfina) para o tratamento da dependência da morfina (BELL et al., 2018), assim como a utilização de d-anfetamina para redução dos sintomas de abstinência em indivíduos dependentes de metanfetamina (GALLOWAY et al., 2011). Bem como o tratamento para transtorno de uso de substâncias como álcool e tabaco já possuem estratégias terapêuticas aprovadas (KLEIN, 2016).

Apesar disso, os tratamentos até agora desenvolvidos são pouco eficazes quando se trata de indivíduos intensamente dependentes de anfetaminas (LEE et al., 2018), visto que os fármacos são usados somente na redução dos sintomas de abstinência e não intimamente relacionado a dependência (VOLKOW e BOYLE, 2018). Dessa maneira, a busca por estratégias de prevenção e tratamento da drogadição por

ANF que seja capaz de reduzir a recaída ao uso dessas drogas torna-se imprescindível, frente aos danos que provoca nas famílias e sociedade.

Estudos do nosso grupo mostraram os benefícios de práticas não farmacológicas como o exercício físico (ROSA et al., 2020b; SEGAT et al., 2017; SEGAT et al., 2014) e da estimulação tátil neonatal (ANTONIAZZI et al., 2014a), frente a sinais de dependência por psicoestimulantes como a anfetamina. Nesse sentido, o presente estudo procurou investir esforços na busca de uma terapia não farmacológica que seja capaz de auxiliar no tratamento de adultos com transtorno no uso de substâncias.

1.7 A ESTIMULAÇÃO TÁTIL (ET)

Terapias não farmacológicas tem se mostrado promissoras no tratamento de transtornos relacionados ao uso de substâncias como tecnologias de estimulação neural, tais como estimulação magnética transcraniana (TMS), estimulação transcraniana por corrente contínua (tDCS), estimulação cerebral profunda (DSB) e dispositivos de estimulação periférica; e intervenções comportamentais (LUIGJES et al., 2019; VOLKOW e BOYLE, 2018). Nesse sentido, a estimulação tátil como forma de intervenção comportamental pode ser uma aliada nas intervenções usadas para o tratamento no transtorno no uso de drogas.

Em roedores, um ambiente enriquecido e a estimulação tátil são diferentes tipos de estímulos ambiental e comportamental que demonstram potenciais benefícios frente a situações prejudiciais induzidas em animais (HAKON et al., 2018; HORIQUINI-BARBOSA et al., 2020). A ET é uma forma de manipulação sensorial aplicada sobre a pele, e que, em certo nível, mimetiza o comportamento materno de cuidado como a lambadura e limpeza dos filhotes quando aplicado na fase neonatal (ROVERSI et al., 2020), já na fase adulta (Fig.3) pode ser considerado como um contato de enriquecimento social, onde em humanos poderia ser mimetizado através da massagem, podendo promover o bem-estar e melhora de distúrbios psiquiátricos (LINDGREN et al., 2012; WEZE et al., 2007).

A manipulação no período neonatal é uma forma de tratamento ambiental que tem sido muito utilizada para estudar mecanismos comportamentais e alterações neurobiológicas em animais (DENENBERG, 1964). Esta manipulação consiste em separar os filhotes das mães por um curto período de tempo e o manipulador realizar alguma intervenção enriquecedora, como mimetizado pela ET (DASKALAKIS et al.,

2009). Estudos pré-clínicos mostram que a ET tem efeitos importantes sobre o desenvolvimento normal do cérebro, como a melhora das funções cognitivas (DASKALAKIS et al., 2009; STAMATAKIS et al., 2008) da neurogênese hipocampal (DE LOS ANGELES et al., 2016), assim como melhora a neuroplasticidade (RICHARDS et al., 2012) e diminui a ansiedade (RÍO-ÁLAMOS et al., 2015). A ET também mostrou efeitos benéficos em alterar a sensibilidade à dor, onde estudos pré-clínicos avaliaram a sensibilidade à dor térmica onde observaram uma latência aumentada para retirada da pata da fonte de aquecimento (IMANAKA et al., 2008; STEPHAN et al., 2002).

Estudos do nosso grupo de pesquisa, mostraram benefícios da ET neonatal, sobre a redução da preferência por drogas psicoestimulantes (ANTONIAZZI et al., 2014a; ANTONIAZZI et al., 2014b), redução nos níveis de corticosterona plasmática (ANTONIAZZI et al., 2017)), melhora em comportamentos do tipo depressivos (FREITAS et al., 2015) e alteração na resposta a drogas ansiolíticas, revertendo os efeitos do estresse (BOUFLEUR et al., 2012). Outros estudos mostraram que a ET está associada ao aumento de receptores glicocorticoides no hipocampo em resposta ao estresse (MEANEY et al., 1991; PANAGIOTAROPOULOS et al., 2004).

A aplicação da ET na idade adulta também vem mostrando efeitos extremamente benéficos para o cérebro, como a prevenção de lesão cortical (GIBB et al., 2010) e aumento dos níveis de neurotrofinas e de DA em modelo de doença de Parkinson (EFFENBERG et al., 2014), bem como pode atuar aumentando comprimento dendrítico em regiões cerebrais importantes como estriado, hipocampo e córtex pré-frontal (EFFENBERG et al., 2014; ROVERSI et al., 2019) mostrando que a ET tem efeito não só em fases de desenvolvimento, mas também ao longo da vida.

Apesar de não haver um mecanismo único exato, os possíveis mecanismos do benefício da ET, independente do período de aplicação, sugerem a associação de efeitos ao eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), que é o primeiro a regular a resposta hormonal aos desafios homeostáticos de resposta ao estresse (HERMAN et al., 2016). Estudos mostram que a ET causa alterações na funcionalidade do eixo HPA, reduzindo a liberação de hormônio adrenocorticotrófico e corticosterona (ANTONIAZZI et al., 2017; FREITAS et al., 2015; MEANEY et al., 1991), assim como aumentando os níveis de receptores glicocorticoides cerebrais (ANTONIAZZI et al., 2017), levando a uma melhor adaptação do animal frente a situações estressantes ao longo da vida (MEANEY et al., 1991). Em relação aos efeitos da ET na idade adulta, também reverte

comportamentos semelhantes à depressão (COSTA et al., 2020; ROVERSI et al., 2019) e aumenta os níveis de neurotrofinas no córtex pré-frontal (ROVERSI et al., 2019).

Em um estudo clínico sugeriu-se o envolvimento do sistema opioide endógeno na estimulação da coluna dorsal, pelo fato desse manuseio aumentar os níveis de beta endorfina, além de aliviar substancialmente a dor (TONELLI et al., 1988). Desta forma, considerando os inúmeros mecanismos associados a ET e os vários efeitos benéficos que são relacionados a essa terapia, estudos mais aprofundados sobre mais efeitos benéficos da ET se tornam interessantes, visto que ainda existem muitos tratamentos farmacológicos ineficientes para a drogadição e a recaída.

Figura 3. Demonstração em desenho da estimulação tátil em ratos adultos.



Figura 3. Created with BioRender.com

1.8 JUSTIFICATIVA

A alta taxa de recaída após um longo período de abstinência é um dos principais problemas clínicos entre os adictos, e continua a ser o maior desafio para o sucesso do tratamento da drogadição (EVERITT, 2014; LEE et al., 2018). A ET neonatal já mostrou prevenir a recaída a drogas psicoestimulantes, incluindo a anfetamina e a cocaína (ANTONIAZZI et al., 2014a; ANTONIAZZI et al., 2014b), também mostrando benefícios em outros distúrbios neuronais (FREITAS et al., 2015; GIBB et al., 2010), também exercendo ações benéficas no sistema nervoso central quando aplicada em animais adultos (COSTA et al., 2020; EFFENBERG et al., 2014; ROVERSI et al., 2019).

Nesse sentido, considerando o elevado índice de recaída a drogas aditivas e insucesso no tratamento dos indivíduos adictos, o presente estudo justifica-se devido a carência de tratamentos que possam prevenir o fenômeno de recaída ao uso de drogas aditivas psicoestimulantes como a anfetamina, fazendo da ET uma abordagem

promissora como um tratamento não-farmacológico, útil nesse período após a retirada da droga, já que a mesma é capaz de exercer influências benéficas em áreas cerebrais relacionadas ao circuito de recompensa cerebral e no sistema relacionado ao estresse, o qual é intimamente envolvido na recaída de drogas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a influência da estimulação tátil frente a redução da recaída por anfetamina em animais adultos após o condicionamento de preferência, considerando também as modificações comportamentais e moleculares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Condicionar animais adultos à preferência pela anfetamina e avaliar tal comportamento;
- Expor os mesmos animais ao protocolo de estimulação tátil durante o período de abstinência da droga;
- Avaliar as propriedades preventivas da estimulação tátil em ratos adultos sobre o comportamento de recaída à preferência pela droga, após reexposição de desafio;
- Após o protocolo de desafio, avaliar parâmetros de memória de trabalho e atividade locomotora nos animais;
- Analisar marcadores moleculares dopaminérgico (D1R; DAT e TH), fator de transcrição (Δ FosB) e receptor μ -opioide no NAc.

DESENVOLVIMENTO

3. MANUSCRITO CIENTÍFICO

Os resultados inseridos nessa dissertação, apresentam-se sob a forma de manuscrito científico, o qual se encontra aqui estruturado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se no mesmo formato em que o manuscrito foi submetido para publicação.

Tactile stimulation in adult rats modulates dopaminergic molecular parameters in the *Nucleus accumbens* preventing amphetamine relapse.

Rossato D.R.^b, Rosa H.Z.^a, Rosa J.L.O.^b, Milanesi L.H.^a, Metz V.G.^a, D'Ávila L.F.^a,
Burger M.E.^{ab}

^aPrograma de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^bDepartamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

Corresponding author

Marilise Escobar Bürger (Ph.D)

Pharmacology Graduation Program, UFSM

marilise.burger@ufsm.br

Abstract

Amphetamine (AMPH) is a psychostimulant drug frequently related to addiction, which is characterized by functional and molecular changes in the brain reward system, favoring relapse development and pharmacotherapies have shown low effectiveness. Considering the beneficial influences of tactile stimulation (TS) in different diseases that affect the central nervous system (CNS), here we evaluated if TS applied in adult rats could prevent or minimize the AMPH-relapse behavior also accessing molecular neuroadaptations in the *Nucleus accumbens* (NAc). Following AMPH conditioning in the conditioned place preference (CPP) paradigm, male rats were submitted to TS (15-min session, 3 times a day, for 8 days) during the drug abstinence period, which were re-exposed to the drug in the CPP paradigm for additional 3 days for relapse observation and molecular assessment. Our findings showed that besides AMPH relapse; TS prevented the DAT, D1R, TH, MOR increase and AMPH-induced Δ FosB. Based on these outcomes, we propose TS as a useful tool to treat psychostimulant addiction, which subsequent to clinical studies; it could be included in detoxification programs together with pharmacotherapies and psychological treatments already conventionally established.

Keywords: Addiction; Psychostimulant drugs, Dopaminergic system; Adjuvant therapy.

Highlights

- AMPH-exposed rats developed drug-preference and -relapse behavior;
- AMPH increased TH, D1R, DAT, Δ FosB and MOR in the *Nucleus accumbens*;
- Tactile stimulation (TS) in adult rats prevented these molecular changes;
- TS prevented AMPH relapse;

Introduction

The covid-19 pandemic has generated periods of social isolation worldwide. It is known that even a short period of social isolation can cause psychological distress, leading people to seek alcohol and psychoactive substances, thus aggravating the existing public health problem, increasing damages related to drug addiction [1].

Addiction is related to brain pathological neuroadaptations, which persist even after the drug withdrawal. In this sense, psychostimulant drugs such as amphetamine (AMPH) are strongly addictive, since this drug is known to stimulate the reward system, increasing the well-being sensation, pleasure and causing euphoria, which together promote dependence, tolerance and withdrawal syndrome [2]. Addiction also involves relapse, which is defined as a behavior of returning to the search / consumption of the drug after a period of self-imposed or enforced abstinence [3].

In this sense, drug users are often susceptible to drug relapse following days, months or even years of abstinence [4]. Therefore, preventing the recurrence of drug abuse behavior is considered the most difficult aspect when treating addiction. Behavioral and pharmacological evidences indicate the important role of the dopaminergic pathway in the *Nucleus accumbens* (NAc) in drug rewarding, being the dopamine (DA) the most important neurotransmitter in the initial drug action and addiction development [5].

It is well known that AMPH increases DA levels in the synaptic cleft, since it decreases monoamines degradation by partial inhibition of the monoamino oxidase (MAO), while preventing vesicular reuptake, consequently inverting the dopamine transporter (DAT) activity [6]. This DA levels increase was proposed as a sufficient condition to produce reward symptoms [7]. Besides, Tyrosine hydroxylase (TH) is the key enzyme in the DA synthesis process, whereas the dopamine receptor 1 (D1R) is responsible for its stimulus propagation [8]. Repeated exposed or chronic use of addictive drugs promotes a Δ FosB accumulation, which is a transcription factor closely involved in the reward and reinforcement symptoms [9, 10]. In addition, there is evidence that an interaction between the opioid and dopaminergic system mediates the reward system, since the activation of this μ - opioid receptor (MOR) in the mesolimbic brain area is responsible for DA release changes [11].

Despite advances in discoveries concerning neuroadaptive changes underlying addiction, there is no approved drug therapy to treat AMPH- and other psychostimulant-addicted individuals. Indeed, current pharmacotherapies only decrease withdrawal symptoms, being unable to prevent frequent relapse episodes [12]. As relapse is a growing concern, our research group has made efforts to search new non-pharmacological adjuvant therapies for drug addiction, especially to prevent relapse. Among them, we can highlight the physical exercise practice [13, 14], neonatal tactile

stimulation (TS) [15, 16]. Considering the different possibilities involving alternative therapies that can be applied together with drug addiction conventional treatments, neonatal TS caused beneficial changes in both AMPH-induced behavioral- and neurological- sensitization [19]. In fact, TS is a well-described procedure in the literature [20], which constitutes a craniosacral handling already demonstrated in preclinical studies involving neonates, since TS was able to prevent the preference for psychostimulant drugs [15, 16]. In this context, preclinical studies have shown that even when applied in the adulthood, TS improves neuropsychiatric disorders like depression [21]. In view of this, become of great importance to evaluate the possible beneficial influences of the adulthood TS on AMPH relapse, considering the AMPH-induced neurobiological and behavioral modifications.

Materials and Methods

Animals

Forty male *Wistar* rats (50 days old) from the breeding facility of the Federal University of Santa Maria (UFSM), RS, Brazil were used. This experimental protocol was approved by the Animal Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria under de number 3991221118, associated to the National Council for the Control of Animal Experimentations (CONCEA), following international norms of care and animal maintenance. The animals were distributed in groups of five animals per Plexiglas cages, with food and water *ad libitum*. They were kept in a room with controlled temperature (22 - 23 °C) on a 12 h-light/dark cycle with lights on at 7:00 a.m.

Drugs

For this study, d-l-AMPH (Merck®) (4.0 mg/kg/mL) was applied according to previous studies [13, 22].

Experimental protocol

Two experimental groups were conditioned with saline (NaCl 0.9%; n=20, i.p.) or AMPH (4.0 mg/Kg; n=20, i.p., for eighth consecutive days) in the conditioned place preference (CPP) paradigm. After 24h, animals were observed in the same apparatus without drug administration (1st CPP test). Sequentially, each experimental group were re-designated in either tactile stimulation (TS) (15-min sessions, 3 times a day for 8 consecutive days) or not (unhandled; UH), resulting in four experimental groups: i)

saline/UH (n=10); ii) saline/TS (n=10); iii) AMPH/UH (n=10); iv) AMPH/TS (n=10). One day after TS protocol, animals were re-exposed to AMPH or saline in the CPP paradigm, using 4.0 mg/Kg; i.p., for three consecutive days, [23] for relapse evaluation (2nd CPP test). Additional behavioral test was performed in the Y-maze apparatus. Sequentially, animals were anesthetized, euthanized and the *Nucleus accumbens* (NAc) dissected for further molecular analysis as shown in figure 1.

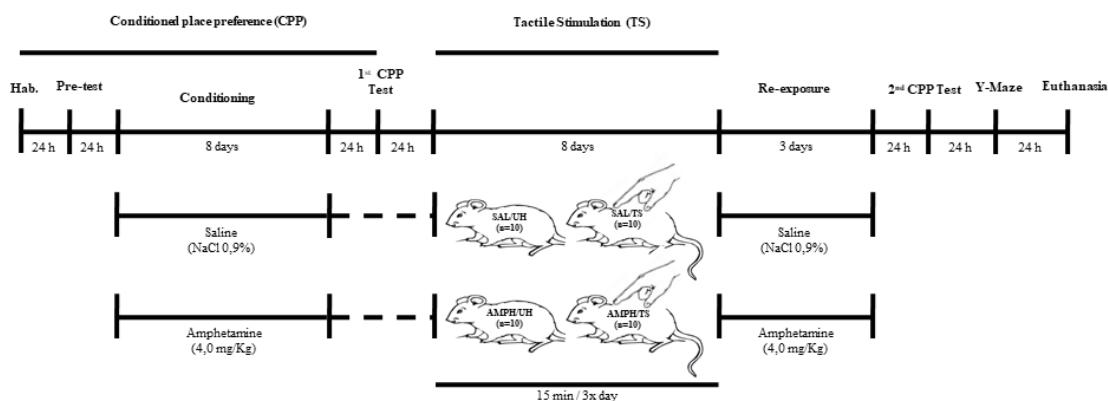


Figure 1. Experimental design: The animals were submitted to basal behavioral evaluation (CPP pre-test) 24h after the animals were conditioned with AMPH (4 mg/kg, i.p.) for 8 days and evaluated in the CPP paradigm (1st CPP test). Subsequently, the animals were submitted to TS protocol (15 min, 3 times a day, for 8 days), which was followed by three additional days of AMPH-CPP paradigm. Twenty-four hours after the last AMPH re-exposed (4 mg/kg, i.p.) for 3 days, animals were evaluated again in the CPP (2nd CPP test). At the sequence, locomotion and work-memory parameters were performed in Y-maze test. All animals were euthanized for molecular assessments in the *Nucleus accumbens*, as described below.

CPP protocol

CPP is an animal learning paradigm that mediates the types of learning and memory, and it is a well-described behavioral model to assess hedonic reinforcement effects of drugs [24]. The apparatus consists of two compartments of equal size (45 cm × 45 cm × 50 cm) but with different visual cues and a third neutral compartment with equivalent intensity of light in both. The apparatus was cleaned with alcohol 20% using a wet sponge and paper towel before the introduction of each animal. On the first day the animal is initially exposed without medication in an equal way to the chambers (habituation), on the following day without the door, the animal is allowed to freely

pass and have a round trip between the two compartments to evaluate a possible natural preference of the animal (pre-test). The next day, the door is inserted, blocking the passage between the compartments. The animal receives the drug (d,l-amphetamine, 4,0 mg/kg, i.p.) or saline (physiological solution 0,9%, i.p.) and sufficient time is given to allow a relapse until the peak of the drug's effect to be reached, in this case 25 min, with an interval of 4 h between each administration. This conditioning continues for 8 days. After this conditioning phase, on the testing day, rats were placed in the common compartment with free access to both compartments. The time spent in the drug-paired environment was interpreted as preference, while the time spent away from that environment was interpreted as aversion. After the tactile stimulation protocol (described below), the animals were submitted to more three days of AMPH re-exposition in CPP, which was followed by an additional test of drug preference as described above. Relapse symptoms were quantified by the highest time spent in the drug-paired environment in this second drug exposed [23, 25].

Tactile Stimulation

Tactile stimulation in adulthood consisted of removing the animals from home cage and petting them individually on the experimenter's lap with one hand for 15 min. The TS was applied 3 times per day between 09:00 a.m. and 05:00 p.m., for 8 days. After the procedures, the animals returned to their home cages. The procedure was based on TS protocols that were performed in adult rats [21].

Y-maze test

This test is used to assess working memory in rodents, using the assessment of spontaneous alternation, where the rat explores the three arms alternately driven by innate curiosity to explore new area, alternation is achieved when an animal visits all three arms clockwise or counterclockwise sequentially [26].

The Y-maze apparatus consists of three arms 32cm x 10cm x 26cm (length, width and height, respectively). The animal is placed in the center of the Y-labyrinth apparatus and allowed to freely explore it for 5 min. The sequence (alternation) and the total number of entries in the arms were quantified. The alternation percentage is calculate using the following formula: $(\text{Total alternation number} / \text{Total entries number} - 2) * 100$ [27].

Tissue preparations

Following 24 h of the last behavioral assessment, animals were anesthetized (isoflurane, the dose to the effect) and euthanized by exsanguination. Half of the animals in each group (n=5) had the brains removed and the regions of the NAc were dissected and stored in a freezer at -80°C for subsequent molecular analysis.

Molecular Assessments: Western Blotting

NAc tissue was homogenized in a lysis buffer [21] for determination of total protein concentration, according to Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit (Pierce, IL) using bovine serum albumin as standard. After, protein samples were separated by electrophoresis on a 10% polyacrylamide gel and electrotransferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore, MA, USA). Non-specific binding sites were blocked and membranes were rinsed in buffer and incubated with primary antibodies: anti- β -actin (1:50000; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), anti-DAT (1:500; Santa Cruz Biotechnology), anti-D1R (1:500, Santa Cruz Biotechnology), anti-TH (1:500, Santa Cruz Biotechnology), anti- Δ fosB (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), anti-MOR (1:500, Santa Cruz Biotechnology) followed by anti-goat (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) or anti-rabbit (1:20000; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) IgG horseradish peroxidase conjugate. Immunocomplexes were visualized using Luminata (Millipore, USA) according to the manufacturer's instructions. Film signals were digitally scanned (Chemidoc™ Imaging Systems) and then quantified using ImageJ software. β -actin was used as an internal control, so that data were standardized according to actin values.

Statistical analysis

CPP data before TS protocol were analyzed by Student's T-test. For other outcomes that were obtained from behavioral and molecular assays, they were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's *post hoc* test (software package Statistica 10.0), and expressed as the mean \pm standard error (S.E.M.). A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant for all comparisons made.

Results

Conditioned place preference (CPP) paradigm: AMPH-preference development and AMPH relapse after tactile stimulation (TS) is show in Figure 2:

Student's T-test showed that, as expected, animals injected with the drug showed AMPH-conditioned place preference (AMPH-CPP) in relation to saline injected group ($p < 0.000$) (Fig. 2A).

Two-way ANOVA revealed a significant main effect of the drug and handling [$F(1,36) = 23.35, p < 0.000$ and $10.37, p < 0.003$, respectively] on AMPH-CPP.

After AMPH withdrawal and re-exposed, Tukey's test showed that TS was able to prevent drug relapse in comparison to UH group ($p < 0.001$). In fact, CPP behavior observed in the AMPH/TS group was comparable to those observed in both saline-UH and -TS groups (Fig. 2B).

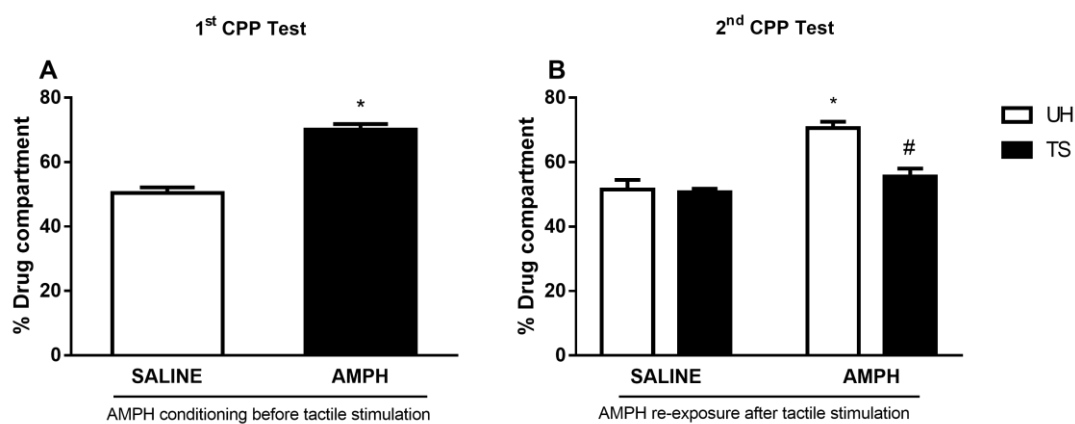


Figure 2. Amphetamine conditioned place preference (AMPH-CPP) (AMPH, 4 mg/kg, i.p. for 8 days) observed in CPP paradigm before 8 days of TS, (1st CPP test) (2A); AMPH-CPP after AMPH withdrawal, TS exposed (15 min, 3 times a day for 8 days) and AMPH re-exposed (4 mg/kg; i.p. for 3 days) (2nd CPP test) (2B). (Data are expressed as mean \pm S.E.M. *indicates significant difference from AMPH injection for saline ($p < 0.05$). # indicates significant difference from AMPH/UH group ($p < 0.05$).

Abbreviations: Compartment place preference (CPP); amphetamine (AMPH); unhandled (UH) and tactile stimulation (TS).

Y-maze task: Working memory and locomotor performance in animals exposed to AMPH and submitted to TS in adulthood is show in Figure 3:

No differences between the experimental groups in both total entries (Figure 3A) and % alternation (Figure 3B) in the Y-maze arms was observed, indicating that the AMPH-CPP observed in the UH group (Fig. 2B) was not consequent of an artifact, that is, the place preference was not related to memory disorder or motor damage.

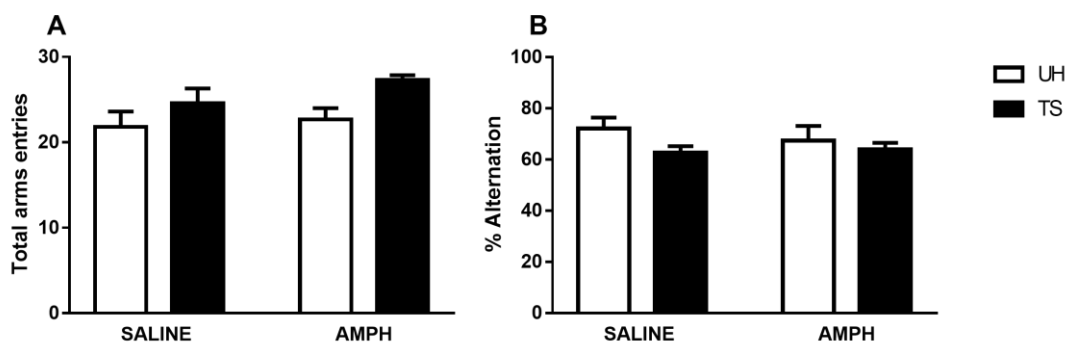


Figure 3. Quantification of both locomotor performance (A) and working memory (B) of adult animals exposed to AMPH and submitted to TS. Memory was assessed by correct alternation percentage. Total arm entries (Fig. 3a) and % alternation (Fig. 3b) were quantified. Data are expressed as mean \pm S.E.M.

Abbreviations: Compartment place preference (CPP); amphetamine (AMPH); unhandled (UH) and tactile stimulation (TS).

Influence of TS on dopaminergic molecular targets (D1R and DAT) and TH immunoreactivity in the *Nucleus accumbens* (NAc) of adult rats after AMPH relapse is show in Figure 4:

Two-way ANOVA revealed a significant main effect of handling [$F(1,16)=23.18$, $p<0.000$] on DAT and a significant main effect of the drug on D1R [$F(1,16)=4.56$, $p<0.05$] and TH [$F(1,16)=12.604$, $p<0.005$] immunoreactivity.

Tukey's test showed that the AMPH re-exposed increased D1R, DAT and TH levels in relation to saline injected group ($p<0.05$; $p<0.000$ and $p<0.01$, respectively). In addition, TS was able to prevent these AMPH-induced increase in D1R (Fig. 4A), DAT (Fig. 4B) and TH (Fig. 4C), in comparison to AMPH/UH group, making such levels comparable to saline/TS group.

Interestingly, D1R, DAT and TH levels showed positive correlation with AMPH-relapse behavior ($r^2=0.32$, $p<0.0007$; $r^2 = 0.37$, $p = 0.0002$; and $r^2= 0.57$, $p=0.0001$, respectively).

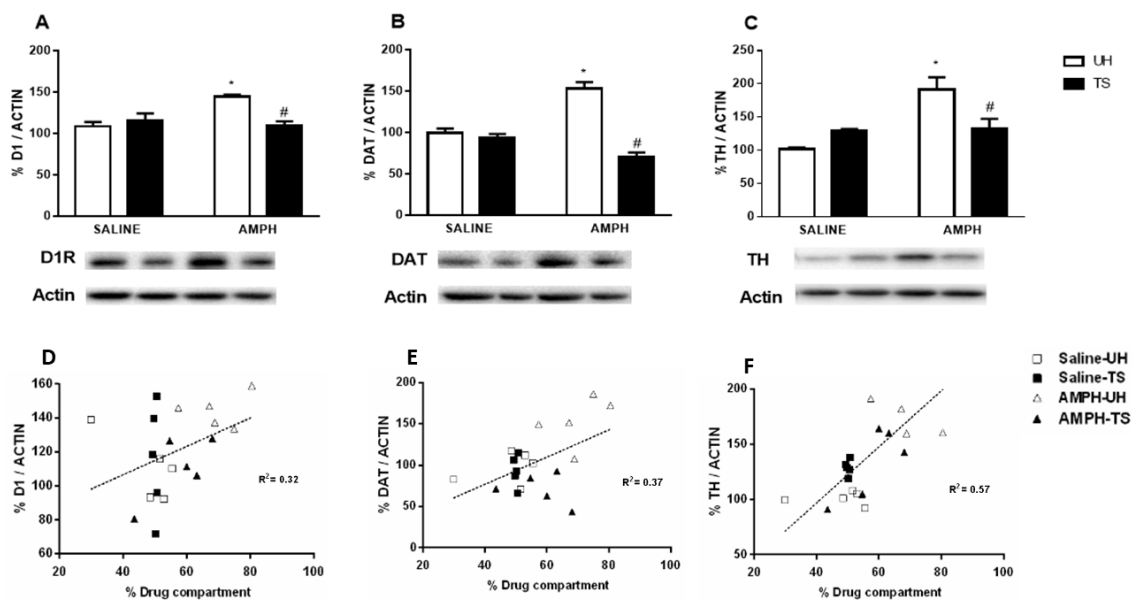


Figure 4. D1R (A), DAT (B) and TH (C) levels were quantified in the NAc of rats submitted to TS and re-exposed to AMPH. In the figure, each band correspond sequentially to one bar. Data are expressed as mean \pm S.E.M. *indicates significant difference from AMPH injection for saline ($p < 0.05$). # indicates significant difference from AMPH/UH group ($p < 0.05$).

Correlations between the percentage of the time spent in the AMPH-associated compartment in the CPP paradigm and D1R (A), DAT (B) and TH (C) in the animals that were exposed to tactile stimulation (TS) or unhandled (UH) during drug withdrawal.

Abbreviations: Amphetamine (AMPH); dopamine 1 receptor (D1R); dopamine transporter (DAT), amphetamine (AMPH), tyrosine hydroxylase (TH), unhandled (UH), tactile stimulation (TS) and compartment place preference (CPP).

Influence of TS on Δ FosB and μ -opioid receptor (MOR) immunoreactivity in the NAc of rats after AMPH relapse is show in Figure 5:

Two-way ANOVA revealed a significant main effect of handling [$F(1, 16) = 16,341$, $p < 0,001$] on Δ FosB levels and a significant main effect of the drug and handling [$F(1,16) = 31.5$, $p < 0.000$ and 14.88 , $p < 0.05$, respectively] on MOR immunoreactivity. *Post hoc* test showed that while AMPH re-exposed increased both Δ FosB ($p < 0.001$) and MOR ($p < 0.05$) levels in relation to saline group, TS attenuated

this AMPH-induced increase whose levels remaining higher than those observed in TS/saline group ($p < 0.05$ for both).

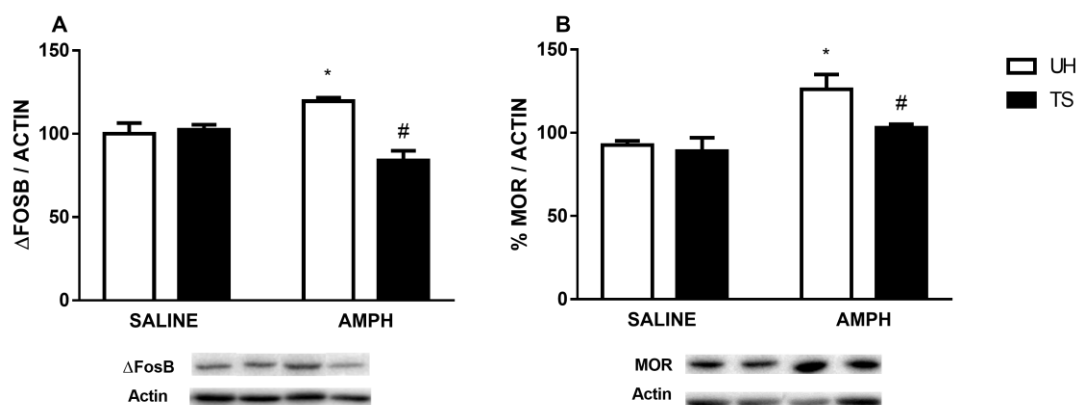


Figure 5. Δ FosB (A) and MOR (B) levels were quantified in the NAc of rats submitted to TS and re-exposed to AMPH. Each band in the sequence correspond to one bar in the figure. Data are expressed as mean \pm S.E.M. *indicates significant difference from AMPH injection for saline ($p < 0.05$). # indicates significant difference from AMPH/UH group ($p < 0.05$).

Abbreviations: DeltaFosB (Δ FosB); Mu opioid receptor (MOR); Amphetamine (AMPH); amphetamine (AMPH); unhandled (UH) and tactile stimulation (TS).

Discussion

Drug addiction causes irreparable damages to the individuals, their families and to the whole society, besides being related to a high cost for the health system. It is known that current pharmacological treatments are only palliative ones and unable to prevent dreaded relapse episodes [28]. This deficiency has stimulated studies in our laboratory, especially the current study, since the tactile stimulation (TS) is a non-invasive approach, which can be used together with conventional pharmacotherapy. To the best of our knowledge, this is the first study to show beneficial TS-induced neuroadaptations in adult rats following amphetamine (AMPH) addiction. We evaluated the TS influence when applied in adult rats on AMPH relapse, occurring together with the evaluation of molecular parameters that are closely related to drug addiction, which were quantified in the *Nucleus accumbens* (NAc). The evaluation happened as follows: i) animals showed relapse behavior subsequently to preference, withdrawal and re-exposed to drug; ii) during AMPH withdrawal, the TS protocol applied in adult animals

was able to prevent AMPH relapse following drug re-exposed; iii) experimental groups did not present memory- or locomotion-impairment in the Y-maze task; and, iv) while AMPH increased D1R, DAT, TH, Δ FosB and MOR immunocontent in the NAc, TS was able to decrease these molecular markers levels.

Previous studies from our laboratory have shown CPP paradigm in experimental protocols related to AMPH addiction [14, 29, 30], besides other addictive substances such as cocaine [16] and morphine [31-33]. Thus, following drug extinction, events such as stress or drug re-exposed can reestablish the addiction, what may be experimentally observed by restoring the drug preference in the CPP paradigm [34]. Our current findings show that subsequently to drug abstinence, AMPH-conditioned animals presented drug-relapse behavior, which was observed through AMPH-CPP, confirming that there is a relation between AMPH-induced hedonic effects and environmental cues, such as those present in the CPP paradigm. Inversely, animals that were submitted to adulthood TS protocol, during the abstinence period, did not show relapse after AMPH re-exposed. In fact, our previous studies have already shown beneficial influences of neonatal TS in the prevention of both AMPH- and cocaine-CPP [15, 16]. In addition, neonatal TS modifies juvenile behavior, attenuates drug-induced behavioral sensitization and reorganizes the brain regions involved in drug addiction [35]. However, our current outcomes show the TS procedure in the treatment form, that is, it was applied in adult animals that previously showed AMPH-CPP, whose behavior indicates addiction. During the abstinence period, these animals were submitted to adulthood TS, which prevented AMPH-relapse behavior after drug re-exposed. As far as we observed, this finding is innovative, since only neonatal TS has been experimentally studied [36] and clinically applied [37]; however, literature data are scarce when TS is applied in adult animals.

In this context, memory impairments could lead to false outcomes, since animals do not keep information connecting environmental clues and hedonic effects [38, 39], making the memory evaluation essential. Similarly, Y-maze task is also able to show locomotor performance in rodents, whose disturbances could cause interpretation mistakes. In this sense, our outcomes did not show any significant difference in the memory and locomotion among the experimental groups, as already described in the literature [40, 41]. These data allow us to propose that the place preference observed in

the animals following AMPH re-exposed in the CPP paradigm was directly related to the AMPH-induced hedonic effects, but not to locomotor or memory impairments.

Although AMPH exerts behavioral and cognitive effects by modulating the activity of monoaminergic neurotransmitters, it is known that its reinforcing and euphoric effects are mediated mainly by the dopaminergic system [42]. AMPH are substrates for monoamine vesicular transporters and are absorbed by the neuron cells to increase the non-vesicular dopamine release (DA), this is enhanced by the inhibitory AMPH effect on monoamine oxidase [43]. This DA increase, which ends up reversing the DA transport in presynaptic neurons by the DA transporter (DAT) [44]. DA synthesis and availability are dependent on the enzyme tyrosine hydroxylase activity (TH) [45]. It is known that behavioral changes induced by psychostimulants are mediated by D1 receptor [46].

Connecting these data with our current findings, animals that were conditioned and re-exposed to AMPH, showed increased D1R, DAT and TH immunoreactivity in the NAc, while these events in cascade were inhibited by TS exposed during drug abstinence. Indeed, the increase DA release in the synaptic cleft [43], recruits an increase of the DAT [47], allowing us to propose that the increased level of this transporter in the NAc, as also observed in our findings, was due to increased levels of DA induced by AMPH [48]. Furthermore, DAT exerts influences on the expression and phosphorylation of TH in terminals of the NAc, where decreased levels of DAT were related to a smaller content of TH-protein and DA in the synaptic cleft, indicating that DAT participates in the regulation of DA homeostasis in dopaminergic terminals [49]. Of particular importance for our molecular findings, increased levels of DA in the synaptic cleft has been recognized to increase the D1R density [50] especially in the NAc, as demonstrated in methamphetamine (METH) chronic users [51]. These outcomes allow us propose that adulthood TS modulated DA release in the synaptic cleft, so preventing the activation of the dopaminergic cascade through increasing D1R, DAT and TH immunocentent in the NAc, as observed here.

In fact, TS exposed has promoted an increased DA release in both NAc and tegmental ventral area (VTA) [52]. Until now, the action mechanism involved in the increased DA levels in the synaptic cleft is unknown, but is possible that this increasing evokes the adaptive response preventing AMPH effects on the dopaminergic signaling because TS was able to modulate such releasing. A possible hypothesis would be an

increased DAT pre-synaptic activity, thus decreasing DA levels and consequently minimizing reward behaviors linked to AMPH-CPP, as observed here. Unfortunately, at this time, it was not possible to quantify the functionality of the transporter, and it was possible to quantify its levels, allowing us to only give hypothesis, which deserves to be clarified. In fact, we can claim that environmental or behavioral changes could mediate information for the central nervous system neurons (CNS). Besides, the environmental enrichment can be considered a stimulus comparable to TS, demonstrating that environmental manipulations are able to modulate mechanisms underlying the brain plasticity, thus regulating TH amount and increasing neurons generation [53, 54].

In the sequence of these molecular events, AMPH abstinence, following its chronic exposure, has been described as to favor the return of DA basal levels in the NAc [55], while the TS showed itself to be able to increase DA levels in the same brain circuit [52]. These evidences allow us to propose that the exposure of adult rats to TS modulated the mesolimbic dopaminergic system. Supposedly, to keep the baseline DA levels moderately increased, while there was an abrupt drop in these levels in abstinent animals that were not re-exposed to TS, since TS was able to keep both D1R and DAT of this pathway in the same levels that were observed in animals that were not exposed to AMPH. These outcomes may be interpreted as an adaptive response to drug abstinence with consequent AMPH relapse what supports our findings obtained in the behavioral evaluations.

The transcription factor Δ FosB (35-37 kDa) was investigated because it is involved in the effects of natural and drug rewards, whose effects supposedly contribute to neuroadaptations in DA-regulated signaling [56, 57]. Besides that consequent binding of dopamine to D1 receptors, signals the activation of the cell-signaling cascade to increase the phosphorylation of factors and transcription in response to cAMP, such as the expression of immediate and long-lasting genes, such as Δ FosB [58]. Here we observe that AMPH increased Δ FosB in the NAc, as already described [59, 60], while TS decreased this chronic transcriptional factor. Besides this, little is known about the specific molecular mechanisms that mediate the TS, especially how it acts on Δ FosB in the Nac. In addition, environmental enrichment has already been shown to reduce Δ FosB in other brain areas related to anxiety, reducing C-Fos expression in the Nac in response to cocaine [61]. This shows that different alternatives related to both

environmental and body stimulation can reduce a transcription factor closely linked to drug addiction.

Studies have related the dopaminergic- to opioid-system, suggesting that reward and motivation are closely modulated by these pathways [62-64]. In this sense, μ -opioid receptor (MOR) is an important mediator of rewarding properties and addictive behavior [65, 66] and they are located in the GABAergic interneurons [67] NAc is a brain area with considerable MOR density [68]. Increased MOR resulting from psychostimulant drug administration is related to increased vulnerability to relapse [69], what was also observed in our AMPH-exposed animals. Based on this, our findings show that TS is able to reduce MOR immunoreactivity in AMPH-exposed animals, indicating a possible decrease in impulsivity and vulnerability to AMPH relapse, which was confirmed in our behavioral outcomes. Similar opioid regulation response is shared by physical exercise and it has been seen that it can prevent relapse in rats addicted to amphetamine [14]. This way, we propose that the two treatment methods produce a similar regulation response. It seems that massage treatment induces the release of endogenous opioid peptides, given that results in humans indicate that a massage session is followed by an increase in plasma β -endorphins [70].

Considering the TS protocol effectiveness, which was applied in adult animals, and that the behavioral changes in the CPP and the molecular markers that involve DA generation and signaling, we may infer that TS could be stimulating the release of DA regular basis, while the drastic changes caused by the AMPH withdrawal happened. The neural modifications on the AMPH-induced mesolimbic dopaminergic pathway in the NAc may be modulated by TS, as observed in this study.

Conclusion

From these findings, we showed that adulthood TS was able to prevent drug-seeking behavior after the abstinence period, modulating molecular parameters in the brain. In the sense, it is of great importance to point out that our study differs from other previous ones related to TS. To the best of our knowledge, this is the first study to show that this non-invasive and safe procedure applied in adulthood may favorably contribute to addiction situations. We suggest its use after clinical studies, in the treatment associated with already used conventional medicines to prevent the relapse to psychostimulant drugs, such as AMPH.

Acknowledgements

This study was financially supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Finance Code 001. The funding had no further role in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the paper for publication. Authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brazil) and Universidade Federal de Santa Maria (UFSM/PRPGP/PROAP).

References

1. Palamar, J.J., et al., *Shifts in drug seizures in the United States during the COVID-19 pandemic*. Drug Alcohol Depend, 2021. **221**: p. 108580.
2. Everitt, B.J. and T.W. Robbins, *Drug Addiction: Updating Actions to Habits to Compulsions Ten Years On*. Annu Rev Psychol, 2016. **67**: p. 23-50.
3. Koob, G.F. and M. Le Moal, *Drug Addiction, Dysregulation of Reward, and Allostasis*. Neuropsychopharmacology, 2001. **24**(2): p. 97-129.
4. Ndasauka, Y., Z. Wei, and X. Zhang, *Revealed View of Addiction, Relapse and Treatment*. Adv Exp Med Biol, 2017. **1010**: p. 3-19.
5. Uhl, G.R., G.F. Koob, and J. Cable, *The neurobiology of addiction*. Ann N Y Acad Sci, 2019. **1451**(1): p. 5-28.
6. Luscher, C., *The Emergence of a Circuit Model for Addiction*. Annu Rev Neurosci, 2016. **39**: p. 257-76.
7. Pascoli, V., et al., *Sufficiency of Mesolimbic Dopamine Neuron Stimulation for the Progression to Addiction*. Neuron, 2015. **88**(5): p. 1054-1066.
8. Luscher, C. and R.C. Malenka, *Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling*. Neuron, 2011. **69**(4): p. 650-63.
9. Chen, J., et al., *Chronic Fos-related antigens: stable variants of deltaFosB induced in brain by chronic treatments*. J Neurosci, 1997. **17**(13): p. 4933-41.
10. McClung, C.A., et al., *DeltaFosB: a molecular switch for long-term adaptation in the brain*. Brain Res Mol Brain Res, 2004. **132**(2): p. 146-54.
11. Buchel, C., S. Miedl, and C. Sprenger, *Hedonic processing in humans is mediated by an opioidergic mechanism in a mesocorticolimbic system*. Elife, 2018. **7**: p. e39648.
12. Lee, N.K., et al., *Pharmacotherapy for amphetamine dependence: A systematic review*. Drug Alcohol Depend, 2018. **191**: p. 309-337.
13. Segat, H.J., et al., *Influence of physical activity on addiction parameters of rats exposed to amphetamine which were previously supplemented with hydrogenated vegetable fat*. Brain Res Bull, 2017. **135**: p. 69-76.
14. Rosa, H.Z., et al., *Involvement of the endogenous opioid system in the beneficial influence of physical exercise on amphetamine-induced addiction parameters*. Pharmacol Biochem Behav, 2020. **197**: p. 173000.

15. Antoniazzi, C.T., et al., *Influence of neonatal tactile stimulation on amphetamine preference in young rats: parameters of addiction and oxidative stress*. *Pharmacol Biochem Behav*, 2014. **124**: p. 341-9.
16. Antoniazzi, C.T., et al., *Tactile stimulation and neonatal isolation affect behavior and oxidative status linked to cocaine administration in young rats*. *Behav Processes*, 2014. **103**: p. 297-305.
17. Metz, V.G., et al., *Omega-3 decreases D1 and D2 receptors expression in the prefrontal cortex and prevents amphetamine-induced conditioned place preference in rats*. *J Nutr Biochem*, 2019. **67**: p. 182-189.
18. Segat, H.J., et al., *Substitution therapy with amphetamine-isotherapeutic attenuates amphetamine toxicological aspects of addiction*. *Neurosci Lett*, 2019. **690**: p. 138-144.
19. Lovic, V., A.S. Fleming, and P.J. Fletcher, *Early life tactile stimulation changes adult rat responsiveness to amphetamine*. *Pharmacol Biochem Behav*, 2006. **84**(3): p. 497-503.
20. Horiquini-Barbosa, E. and J.J. Lachat, *Tactile stimulation during development alters the neuroanatomical organization of the optic nerve in normal rats*. *Exp Brain Res*, 2016. **234**(6): p. 1737-46.
21. Roversi, K., et al., *Tactile Stimulation on Adulthood Modifies the HPA Axis, Neurotrophic Factors, and GFAP Signaling Reverting Depression-Like Behavior in Female Rats*. *Mol Neurobiol*, 2019. **56**(9): p. 6239-6250.
22. Kuhn, F.T., et al., *Influence of trans fat and omega-3 on the preference of psychostimulant drugs in the first generation of young rats*. *Pharmacol Biochem Behav*, 2013. **110**: p. 58-65.
23. Segat, H.J., et al., *Exercise modifies amphetamine relapse: behavioral and oxidative markers in rats*. *Behav Brain Res*, 2014. **262**: p. 94-100.
24. Kuhn, B.N., P.W. Kalivas, and A.C. Bobadilla, *Understanding Addiction Using Animal Models*. *Front Behav Neurosci*, 2019. **13**: p. 262.
25. Cruz, F.C., M.T. Marin, and C.S. Planeta, *The reinstatement of amphetamine-induced place preference is long-lasting and related to decreased expression of AMPA receptors in the nucleus accumbens*. *Neuroscience*, 2008. **151**(2): p. 313-9.
26. Morellini, F., *Spatial memory tasks in rodents: what do they model?* *Cell Tissue Res*, 2013. **354**(1): p. 273-86.
27. Chu, J., et al., *Adeno-associated virus-mediated brain delivery of 5-lipoxygenase modulates the AD-like phenotype of APP mice*. *Mol Neurodegener*, 2012. **7**(1): p. 1.
28. Paulus, M.P. and J.L. Stewart, *Neurobiology, Clinical Presentation, and Treatment of Methamphetamine Use Disorder: A Review*. *JAMA Psychiatry*, 2020. **77**(9): p. 959-966.
29. Dias, V.T., et al., *Modafinil reduces amphetamine preference and prevents anxiety-like symptoms during drug withdrawal in young rats: Involvement of dopaminergic targets in VTA and striatum*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2019. **92**: p. 199-206.
30. Kuhn, F.T., et al., *Toxicological aspects of trans fat consumption over two sequential generations of rats: Oxidative damage and preference for amphetamine*. *Toxicol Lett*, 2015. **232**(1): p. 58-67.
31. Milanese, L.H., et al., *Mediterranean X Western based diets: Opposite influences on opioid reinstatement*. *Toxicol Lett*, 2019. **308**: p. 7-16.

32. Vey, L.T., et al., *Stress during the gestational period modifies pups' emotionality parameters and favors preference for morphine in adolescent rats*. Behav Brain Res, 2016. **296**: p. 408-417.
33. Rosa, H.Z., et al., *Physical exercise modifies behavioral and molecular parameters related to opioid addiction regardless of training time*. Eur Neuropsychopharmacol, 2020. **32**: p. 25-35.
34. Taslimi, Z., et al., *Effects of Acute and Chronic Restraint Stress on Reinstatement of Extinguished Methamphetamine-induced Conditioned Place Preference in Rats*. Basic Clin Neurosci, 2018. **9**(3): p. 157-166.
35. Muhammad, A. and B. Kolb, *Prenatal tactile stimulation attenuates drug-induced behavioral sensitization, modifies behavior, and alters brain architecture*. Brain Res, 2011. **1400**: p. 53-65.
36. Roversi, K., et al., *Neonatal Tactile Stimulation Alters Behaviors in Heterozygous Serotonin Transporter Male Rats: Role of the Amygdala*. Front Behav Neurosci, 2020. **14**: p. 142.
37. Alvarez, M.J., et al., *The effects of massage therapy in hospitalized preterm neonates: A systematic review*. Int J Nurs Stud, 2017. **69**: p. 119-136.
38. Haghparast, A., et al., *Changes in phosphorylation of CREB, ERK, and c-fos induction in rat ventral tegmental area, hippocampus and prefrontal cortex after conditioned place preference induced by chemical stimulation of lateral hypothalamus*. Behav Brain Res, 2011. **220**(1): p. 112-8.
39. Zhou, L.F. and Y.P. Zhu, *Changes of CREB in rat hippocampus, prefrontal cortex and nucleus accumbens during three phases of morphine induced conditioned place preference in rats*. J Zhejiang Univ Sci B, 2006. **7**(2): p. 107-13.
40. Segat, H.J., et al., *m-Trifluoromethyl-diphenyldiselenide as a pharmacological tool to treat preference symptoms related to AMPH-induced dependence in rats*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2016. **66**: p. 1-7.
41. Takamatsu, Y., et al., *The Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Paroxetine, but not Fluvoxamine, Decreases Methamphetamine Conditioned Place Preference in Mice*. Curr Neuropharmacol, 2011. **9**(1): p. 68-72.
42. Baker, A., et al., *Brief cognitive behavioural interventions for regular amphetamine users: a step in the right direction*. Addiction, 2005. **100**(3): p. 367-78.
43. Sulzer, D., et al., *Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review*. Prog Neurobiol, 2005. **75**(6): p. 406-33.
44. Robertson, S.D., H.J. Matthies, and A. Galli, *A closer look at amphetamine-induced reverse transport and trafficking of the dopamine and norepinephrine transporters*. Mol Neurobiol, 2009. **39**(2): p. 73-80.
45. Dunkley, P.R. and P.W. Dickson, *Tyrosine hydroxylase phosphorylation in vivo*. J Neurochem, 2019. **149**(6): p. 706-728.
46. Kai, N., et al., *Differential roles of dopamine D1 and D2 receptor-containing neurons of the nucleus accumbens shell in behavioral sensitization*. J Neurochem, 2015. **135**(6): p. 1232-41.
47. Wang, K.H., A. Penmatsa, and E. Gouaux, *Neurotransmitter and psychostimulant recognition by the dopamine transporter*. Nature, 2015. **521**(7552): p. 322-7.
48. Rothman, R.B. and M.H. Baumann, *Monoamine transporters and psychostimulant drugs*. Eur J Pharmacol, 2003. **479**(1-3): p. 23-40.

49. Salvatore, M.F., E.S. Calipari, and S.R. Jones, *Regulation of Tyrosine Hydroxylase Expression and Phosphorylation in Dopamine Transporter-Deficient Mice*. ACS Chem Neurosci, 2016. **7**(7): p. 941-51.
50. Zack, M.H., et al., *Parallel role for the dopamine D1 receptor in gambling and amphetamine reinforcement in healthy volunteers*. J Psychopharmacol, 2017. **31**(1): p. 31-42.
51. Worsley, J.N., et al., *Dopamine D1 receptor protein is elevated in nucleus accumbens of human, chronic methamphetamine users*. Mol Psychiatry, 2000. **5**(6): p. 664-72.
52. Maruyama, K., et al., *Tactile skin stimulation increases dopamine release in the nucleus accumbens in rats*. J Physiol Sci, 2012. **62**(3): p. 259-66.
53. Tomas, D., et al., *Environmental modulations of the number of midbrain dopamine neurons in adult mice*. J Vis Exp, 2015(95): p. 52329.
54. Li, R., et al., *Mapping accumulative whole-brain activities during environmental enrichment with manganese-enhanced magnetic resonance imaging*. Neuroimage, 2020. **210**: p. 116588.
55. Rossetti, Z.L., Y. Hmaidan, and G.L. Gessa, *Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats*. Eur J Pharmacol, 1992. **221**(2-3): p. 227-34.
56. Nestler, E.J., *Is there a common molecular pathway for addiction?* Nat Neurosci, 2005. **8**(11): p. 1445-9.
57. Werme, M., et al., *Delta FosB regulates wheel running*. J Neurosci, 2002. **22**(18): p. 8133-8.
58. Nestler, E.J., *Common molecular and cellular substrates of addiction and memory*. Neurobiol Learn Mem, 2002. **78**(3): p. 637-47.
59. Shen, H.Y., et al., *Additive effects of histone deacetylase inhibitors and amphetamine on histone H4 acetylation, cAMP responsive element binding protein phosphorylation and DeltaFosB expression in the striatum and locomotor sensitization in mice*. Neuroscience, 2008. **157**(3): p. 644-55.
60. Perrotti, L.I., et al., *Distinct patterns of DeltaFosB induction in brain by drugs of abuse*. Synapse, 2008. **62**(5): p. 358-69.
61. Lopes, D.A., et al., *Environmental enrichment decreases avoidance responses in the elevated T-maze and delta FosB immunoreactivity in anxiety-related brain regions*. Behav Brain Res, 2018. **344**: p. 65-72.
62. Achterberg, E.J.M., et al., *Opioid modulation of social play reward in juvenile rats*. Neuropharmacology, 2019. **159**: p. 107332.
63. Berridge, K.C. and M.L. Kringelbach, *Pleasure systems in the brain*. Neuron, 2015. **86**(3): p. 646-64.
64. Laurent, V., A.K. Morse, and B.W. Balleine, *The role of opioid processes in reward and decision-making*. Br J Pharmacol, 2015. **172**(2): p. 449-59.
65. Di Chiara, G. and A. Imperato, *Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats*. J Pharmacol Exp Ther, 1988. **244**(3): p. 1067-80.
66. Johnson, S.W. and R.A. North, *Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons*. J Neurosci, 1992. **12**(2): p. 483-8.
67. Vaughan, C.W., et al., *How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission*. Nature, 1997. **390**(6660): p. 611-4.
68. Saigusa, T., Y. Aono, and J.L. Waddington, *Mechanisms underlying delta- and mu-opioid receptor agonist-induced increases in extracellular dopamine level in*

- the nucleus accumbens of freely moving rats.* J Oral Sci, 2017. **59**(2): p. 195-200.
69. Wiskerke, J., et al., *mu-Opioid receptors in the nucleus accumbens shell region mediate the effects of amphetamine on inhibitory control but not impulsive choice.* J Neurosci, 2011. **31**(1): p. 262-72.
70. Kaada, B. and O. Torsteinbø, *Increase of plasma beta-endorphins in connective tissue massage.* General Pharmacology, 1989. **20**(4): p. 487-489.
71. Hart, S., et al., *Anorexia nervosa symptoms are reduced by massage therapy.* Eat Disord, 2001. **9**(4): p. 289-99.
72. Field, T., et al., *Cortisol decreases and serotonin and dopamine increase following massage therapy.* Int J Neurosci, 2005. **115**(10): p. 1397-413.
73. Koob, G.F., *Dynamics of neuronal circuits in addiction: reward, antireward, and emotional memory.* Pharmacopsychiatry, 2009. **42 Suppl 1**: p. S32-41.
74. Ambroggi, F., et al., *Stress and addiction: glucocorticoid receptor in dopaminergic neurons facilitates cocaine seeking.* Nat Neurosci, 2009. **12**(3): p. 247-9.
75. Sinha, R., *Chronic stress, drug use, and vulnerability to addiction.* Ann N Y Acad Sci, 2008. **1141**: p. 105-30.
76. Daubner, S., *Le T., and Wang S.(2011).* Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. Arch. Biochem. Biophys. **508**: p. 1-12.
77. Wheeler, D.S., et al., *Corticosterone regulates both naturally occurring and cocaine-induced dopamine signaling by selectively decreasing dopamine uptake.* Eur J Neurosci, 2017. **46**(10): p. 2638-2646.
78. Boufleur, N., et al., *Neonatal tactile stimulation changes anxiety-like behavior and improves responsiveness of rats to diazepam.* Brain Res, 2012. **1474**: p. 50-9.
79. Freitas, D., et al., *Neonatal tactile stimulation decreases depression-like and anxiety-like behaviors and potentiates sertraline action in young rats.* Int J Dev Neurosci, 2015. **47**(Pt B): p. 192-7.

Molecular Neurobiology

Tactile stimulation in adult rats modulates dopaminergic molecular parameters in the Nucleus accumbens preventing amphetamine relapse.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Original Article
Keywords:	Addiction; Psychostimulant drugs, Dopaminergic system; Adjuvant therapy.
Corresponding Author:	Burger Escobar ME, Ph.D. Universidade Federal de Santa Maria Santa Maria, RS BRAZIL
First Author:	Domênika Rubert Rossato, M.Sc.
Order of Authors:	Domênika Rubert Rossato, M.Sc. Higor Zuchetto Rosa, Ph.D.

CONCLUSÃO

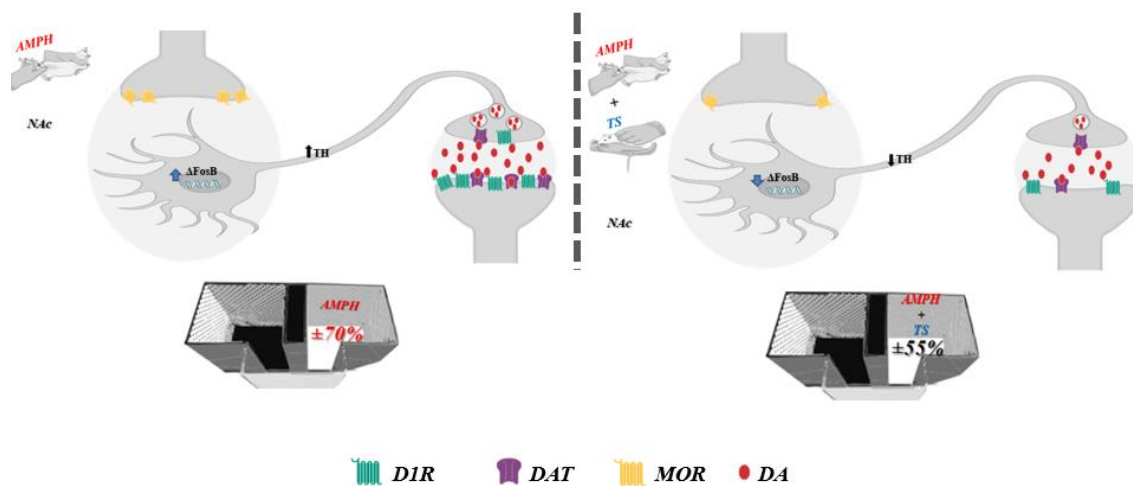
A partir dos resultados apresentados no manuscrito científico que compõem a atual dissertação demonstramos a influência benéfica da estimulação tátil na vida adulta sobre os parâmetros de recaída por anfetamina, exercendo também alterações positivas nos marcadores moleculares, fatores de transcrição e receptor μ -opioide do sistema mesolímbico dopaminérgico avaliados, mais especificamente no *Nucleus accumbens* (NAc).

Através dos resultados experimentais obtidos, podemos chegar as seguintes conclusões:

- Ratos machos adultos mostraram preferência de lugar condicionada pela ANF;
- Ratos adultos expostos à ET durante o período de abstinência da droga não apresentaram comportamento de busca, após sua reexposição à droga;
- A ET adulta não exerceu interferências nos parâmetros de locomoção e memória;
- Enquanto a exposição à ANF aumentou a imunoreatividade dos marcadores dopaminérgicos no Nac, a ET restabeleceu ao nível normal do D1R e da TH, reduzindo a imunoreatividade do DAT no NAc;
- A ET reverteu a imunoreatividade do Δ FOSB e do MOR, as quais foram aumentadas pela ANF.

A partir do presente estudo pode-se concluir que quando aplicada em ratos adultos, a ET desenvolve modificações significativas persistentes mesmo após a sua interrupção, podendo modificar a resposta frente à anfetamina e, a resposta de busca pela droga após sua retirada.

Figura. 4 Resumo dos efeitos observados nesse trabalho pela estimulação tátil em parâmetros moleculares e comportamentais em ratos adultos após reexposição à anfetamina.



ANEXO I – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA 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 "ESTUDO DE ALVOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA DROGADIÇÃO POR ANFETAMINA: POSSÍVEIS TRATAMENTOS", protocolada sob o CEUA nº 3991221118 (ID 002292), sob a responsabilidade de **Marilise Escobar Bürger** e equipe; *Higor Zuquetto da Rosa; Domenika Rubert Rossato; Jessica Leandra Oliveira da Rosa; Karine Roversi; Laura Hautruive Milanesi; 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 "STUDY OF MOLECULAR TARGETS INVOLVED IN AMPHETAMINE DROGADATION: POSSIBLE TREATMENTS", utilizing 160 Heterogenics rats (160 males), protocol number CEUA 3991221118 (ID 002292), under the responsibility of **Marilise Escobar Bürger and team; Higor Zuquetto da Rosa; Domenika Rubert Rossato; Jessica Leandra Oliveira da Rosa; Karine Roversi; Laura Hautruive Milanesi; 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 **12/2021** Área: **Farmacologia**

Origem: **Biotério Central UFSM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **21 a 60 dias**

N: **160**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **80 a 250 g**

Local do experimento: Departamento de Fisiologia e Farmacologia - Universidade Federal de Santa Maria - Prédio 21 - Sala 5222.

Santa Maria, 21 de janeiro de 2022

Dra. Patrícia Bräunig
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Vania Lucia Loro
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

REFERÊNCIAS

Uncategorized References

AGGARWAL, S.; MORTENSEN, O. V. Overview of Monoamine Transporters. **Curr Protoc Pharmacol**, v. 79, p. 12.16.1-12.16.17, Dec 20 2017.

AGUILAR, M. A. et al. Neurobiological mechanisms of the reinstatement of drug-conditioned place preference. **Brain Res Rev**, v. 59, n. 2, p. 253-77, Mar 2009.

ANTONIAZZI, C. T. et al. Influence of neonatal tactile stimulation on amphetamine preference in young rats: parameters of addiction and oxidative stress. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 124, p. 341-9, Sep 2014a.

ANTONIAZZI, C. T. et al. Tactile stimulation and neonatal isolation affect behavior and oxidative status linked to cocaine administration in young rats. **Behav Processes**, v. 103, p. 297-305, Mar 2014b.

ANTONIAZZI, C. T. et al. Tactile stimulation during different developmental periods modifies hippocampal BDNF and GR, affecting memory and behavior in adult rats. **Hippocampus**, v. 27, n. 2, p. 210-220, Feb 2017.

ARGENTO, E. et al. Violence, trauma and living with HIV: Longitudinal predictors of initiating crystal methamphetamine injection among sex workers. **Drug Alcohol Depend**, v. 175, p. 198-204, Jun 1 2017.

BAIMEL, C.; BORGLAND, S. L. Orexin Signaling in the VTA Gates Morphine-Induced Synaptic Plasticity. **J Neurosci**, v. 35, n. 18, p. 7295-303, May 6 2015.

BALL, K. T. et al. Chronic restraint stress during withdrawal increases vulnerability to drug priming-induced cocaine seeking via a dopamine D1-like receptor-mediated mechanism. **Drug Alcohol Depend**, v. 187, p. 327-334, Jun 1 2018.

BECHARA, A. Neurobiology of decision-making: risk and reward. **Semin Clin Neuropsychiatry**, v. 6, n. 3, p. 205-16, Jul 2001.

BECHARA, A. et al. A Neurobehavioral Approach to Addiction: Implications for the Opioid Epidemic and the Psychology of Addiction. **Psychol Sci Public Interest**, v. 20, n. 2, p. 96-127, Oct 2019.

BELL, J. et al. Supervised Injectable Opioid Treatment for the Management of Opioid Dependence. **Drugs**, v. 78, n. 13, p. 1339-1352, Sep 2018.

BERLIN, G. S.; HOLLANDER, E. Compulsivity, impulsivity, and the DSM-5 process. **CNS Spectr**, v. 19, n. 1, p. 62-8, Feb 2014.

BERRIDGE, K. C.; KRINGELBACH, M. L. Pleasure systems in the brain. **Neuron**, v. 86, n. 3, p. 646-64, May 6 2015.

BOUFLEUR, N. et al. Neonatal tactile stimulation changes anxiety-like behavior and improves responsiveness of rats to diazepam. **Brain Res**, v. 1474, p. 50-9, Sep 20 2012.

BOUTON, M. E. Extinction of instrumental (operant) learning: interference, varieties of context, and mechanisms of contextual control. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 236, n. 1, p. 7-19, Jan 2019.

BRENHOUSE, H. C.; STELLAR, J. R. c-Fos and deltaFosB expression are differentially altered in distinct subregions of the nucleus accumbens shell in cocaine-sensitized rats. **Neuroscience**, v. 137, n. 3, p. 773-80, Feb 2006.

CHAN, B. et al. Pharmacotherapy for methamphetamine/amphetamine use disorder-a systematic review and meta-analysis. **Addiction**, v. 114, n. 12, p. 2122-2136, Dec 2019.

COOPER, S. et al. Reward Circuitry in Addiction. **Neurotherapeutics**, v. 14, n. 3, p. 687-697, Jul 2017.

COSTA, R. et al. Tactile stimulation of adult rats modulates hormonal responses, depression-like behaviors, and memory impairment induced by chronic mild stress: Role of angiotensin II. **Behav Brain Res**, v. 379, p. 112250, Feb 3 2020.

CREWS, F. et al. Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 86, n. 2, p. 189-99, Feb 2007.

CRUZ, F. C. et al. Stress-induced reinstatement of amphetamine-conditioned place preference and changes in tyrosine hydroxylase in the nucleus accumbens in adolescent rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 96, n. 2, p. 160-5, Aug 2010.

DALLEY, J. W. et al. Impulsivity, compulsivity, and top-down cognitive control. **Neuron**, v. 69, n. 4, p. 680-94, Feb 24 2011.

DASKALAKIS, N. P. et al. Environmental and tactile stimulation modulates the neonatal handling effect on adult rat spatial memory. **Int J Dev Neurosci**, v. 27, n. 8, p. 747-55, Dec 2009.

DE LOS ANGELES, G. A. et al. Tactile stimulation effects on hippocampal neurogenesis and spatial learning and memory in prenatally stressed rats. **Brain Res Bull**, v. 124, p. 1-11, Jun 2016.

DENENBERG, V. H. CRITICAL PERIODS, STIMULUS INPUT, AND EMOTIONAL REACTIVITY: A THEORY OF INFANTILE STIMULATION. **Psychol Rev**, v. 71, p. 335-51, Sep 1964.

DIAS, V. T. et al. Could Modafinil Prevent Psychostimulant Addiction? An Experimental Study in Rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 121, n. 5, p. 400-408, Nov 2017.

EFFENBERG, A. et al. Adult hemiparkinsonian rats do not benefit from tactile stimulation. **Behav Brain Res**, v. 261, p. 97-105, Mar 15 2014.

EHRlich, M. E. et al. Periadolescent mice show enhanced DeltaFosB upregulation in response to cocaine and amphetamine. **J Neurosci**, v. 22, n. 21, p. 9155-9, Nov 1 2002.

EPSTEIN, D. H. et al. Toward a model of drug relapse: an assessment of the validity of the reinstatement procedure. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 189, n. 1, p. 1-16, Nov 2006.

EVERITT, B. J. Neural and psychological mechanisms underlying compulsive drug seeking habits and drug memories--indications for novel treatments of addiction. **Eur J Neurosci**, v. 40, n. 1, p. 2163-82, Jul 2014.

FREITAS, D. et al. Neonatal tactile stimulation decreases depression-like and anxiety-like behaviors and potentiates sertraline action in young rats. **Int J Dev Neurosci**, v. 47, n. Pt B, p. 192-7, Dec 2015.

GALLOWAY, G. P. et al. A randomized, placebo-controlled trial of sustained-release dextroamphetamine for treatment of methamphetamine addiction. **Clin Pharmacol Ther**, v. 89, n. 2, p. 276-82, Feb 2011.

GARCÍA PARDO, M. P. et al. Animal models of drug addiction. **Adicciones**, v. 29, n. 4, p. 278-292, Sep 29 2017.

GARDNER, E. L. Addiction and brain reward and antireward pathways. **Adv Psychosom Med**, v. 30, p. 22-60, 2011.

GIBB, R. L. et al. Tactile stimulation promotes motor recovery following cortical injury in adult rats. **Behav Brain Res**, v. 214, n. 1, p. 102-7, Dec 6 2010.

GOLDEN, S. A. et al. Animal Models of (or for) Aggression Reward, Addiction, and Relapse: Behavior and Circuits. **J Neurosci**, v. 39, n. 21, p. 3996-4008, May 22 2019.

GOLMIRZAEI, J. et al. Psychopharmacology of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder: Effects and Side Effects. **Curr Pharm Des**, v. 22, n. 5, p. 590-4, 2016.

GORELICK, D. A. et al. Imaging brain mu-opioid receptors in abstinent cocaine users: time course and relation to cocaine craving. **Biol Psychiatry**, v. 57, n. 12, p. 1573-82, Jun 15 2005.

GUST, S. W.; MCCORMALLY, J. National Institute on Drug Abuse International Program: improving opioid use disorder treatment through international research training. **Curr Opin Psychiatry**, v. 31, n. 4, p. 287-293, Jul 2018.

HAKON, J. et al. Multisensory stimulation improves functional recovery and resting-state functional connectivity in the mouse brain after stroke. **Neuroimage Clin**, v. 17, p. 717-730, 2018.

HEAL, D. J. et al. Amphetamine, past and present--a pharmacological and clinical perspective. **J Psychopharmacol**, v. 27, n. 6, p. 479-96, Jun 2013.

HERMAN, J. P. et al. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 2, p. 603-621, 2016.

HORQUINI-BARBOSA, E. et al. Neonatal tactile stimulation reverses alterations in fine structure of small, but not large myelinated fibers, from the optic nerve of iron-deficient rats: A size-based selectivity. **Behav Brain Res**, v. 379, p. 112357, Feb 3 2020.

HUBBARD, R. L. et al. Overview of 5-year followup outcomes in the drug abuse treatment outcome studies (DATOS). **J Subst Abuse Treat**, v. 25, n. 3, p. 125-34, Oct 2003.

HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C. Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 10, p. 695-703, Oct 2001.

HYMAN, S. E. et al. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. **Annu Rev Neurosci**, v. 29, p. 565-98, 2006.

IMANAKA, A. et al. Neonatal tactile stimulation reverses the effect of neonatal isolation on open-field and anxiety-like behavior, and pain sensitivity in male and female adult Sprague-Dawley rats. **Behav Brain Res**, v. 186, n. 1, p. 91-7, Jan 10 2008.

KATZ, J. L.; HIGGINS, S. T. The validity of the reinstatement model of craving and relapse to drug use. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 168, n. 1-2, p. 21-30, Jul 2003.

KHOURY, L. et al. Substance use, childhood traumatic experience, and Posttraumatic Stress Disorder in an urban civilian population. **Depression and anxiety**, v. 27, n. 12, p. 1077-1086, 2010.

KLEIN, J. W. Pharmacotherapy for Substance Use Disorders. **Med Clin North Am**, v. 100, n. 4, p. 891-910, Jul 2016.

KOOB, G. F. Hedonic Homeostatic Dysregulation as a Driver of Drug-Seeking Behavior. **Drug Discov Today Dis Models**, v. 5, n. 4, p. 207-215, Winter 2008.

KOOB, G. F. The dark side of emotion: the addiction perspective. **Eur J Pharmacol**, v. 753, p. 73-87, Apr 15 2015.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Drug Addiction, Dysregulation of Reward, and Allostasis. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 2, p. 97-129, 2001/02/01 2001.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Plasticity of reward neurocircuitry and the 'dark side' of drug addiction. **Nat Neurosci**, v. 8, n. 11, p. 1442-4, Nov 2005.

KOOB, G. F. Addiction and the brain antireward system. **Annu Rev Psychol**, v. 59, p. 29-53, 2008.

KOOB, G. F.; SCHULKIN, J. Addiction and stress: An allostatic view. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 106, p. 245-262, Nov 2019.

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. **The lancet. Psychiatry**, v. 3, n. 8, p. 760-773, 2016.

KUHN, F. T. 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, n. 4, p. 319-31, Nov 2015.

LAPPIN, J. M.; SARA, G. E. Psychostimulant use and the brain. **Addiction**, v. 114, n. 11, p. 2065-2077, Nov 2019.

LE MERRER, J. et al. Reward processing by the opioid system in the brain. **Physiol Rev**, v. 89, n. 4, p. 1379-412, Oct 2009.

LEE, N. K. et al. Pharmacotherapy for amphetamine dependence: A systematic review. **Drug Alcohol Depend**, v. 191, p. 309-337, Oct 1 2018.

LERNER, A.; KLEIN, M. Dependence, withdrawal and rebound of CNS drugs: an update and regulatory considerations for new drugs development. **Brain Commun**, v. 1, n. 1, p. fc2025, 2019.

LINDGREN, L. et al. Pleasant human touch is represented in pregenual anterior cingulate cortex. **Neuroimage**, v. 59, n. 4, p. 3427-32, Feb 15 2012.

LOBO, M. K. et al. Δ FosB induction in striatal medium spiny neuron subtypes in response to chronic pharmacological, emotional, and optogenetic stimuli. **J Neurosci**, v. 33, n. 47, p. 18381-95, Nov 20 2013.

LOREE, A. M. et al. Impulsivity as a predictor of treatment outcome in substance use disorders: review and synthesis. **Drug Alcohol Rev**, v. 34, n. 2, p. 119-34, Mar 2015.

LUIGJES, J. et al. Efficacy of Invasive and Non-Invasive Brain Modulation Interventions for Addiction. **Neuropsychol Rev**, v. 29, n. 1, p. 116-138, Mar 2019.

MACNICOL, B. The biology of addiction. **Can J Anaesth**, v. 64, n. 2, p. 141-148, Feb 2017.

MAHONEY, J. J., 3RD et al. Transcranial magnetic stimulation, deep brain stimulation, and other forms of neuromodulation for substance use disorders: Review of modalities and implications for treatment. **J Neurol Sci**, v. 418, p. 117149, Nov 15 2020.

MEANEY, M. J. et al. The effects of neonatal handling on the development of the adrenocortical response to stress: implications for neuropathology and cognitive deficits in later life. **Psychoneuroendocrinology**, v. 16, n. 1-3, p. 85-103, 1991.

METZ, V. G. et al. Cannabidiol prevents amphetamine relapse and modulates D1- and D2-receptor levels in mesocorticolimbic brain areas of rats. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 50, p. 23-33, Sep 2021.

METZ, V. G. et al. Omega-3 decreases D1 and D2 receptors expression in the prefrontal cortex and prevents amphetamine-induced conditioned place preference in rats. **J Nutr Biochem**, v. 67, p. 182-189, May 2019.

MILANESI, L. H. et al. Topiramate-chitosan nanoparticles prevent morphine reinstatement with no memory impairment: Dopaminergic and glutamatergic molecular aspects in rats. **Neurochem Int**, v. 150, p. 105157, Nov 2021.

MILLER, M. E. et al. Associations between sensation seeking and d-amphetamine reinforcement. **Am J Addict**, v. 24, n. 5, p. 435-42, Aug 2015.

NEGRETE, J. C. et al. The Centre for Addiction and Mental Health concurrent disorders screener. **The Canadian Journal of Psychiatry**, v. 49, n. 12, p. 843-850, 2004.

NESTLER, E. J. Is there a common molecular pathway for addiction? **Nat Neurosci**, v. 8, n. 11, p. 1445-9, Nov 2005.

NIKMANESH, Z. et al. Study role of different dimensions of emotional self-regulation on addiction potential. **J Family Reprod Health**, v. 8, n. 2, p. 69-72, Jun 2014.

O'DONNELL, A. et al. Which individual, social and environmental influences shape key phases in the amphetamine type stimulant use trajectory? A systematic narrative

review and thematic synthesis of the qualitative literature. **Addiction**, v. 114, n. 1, p. 24-47, Jan 2019.

OLMSTEAD, M. C. et al. Mu and delta opioid receptors oppositely regulate motor impulsivity in the signaled nose poke task. **PLoS One**, v. 4, n. 2, p. e4410, 2009.

OSWALD, L. M. et al. Impulsivity and chronic stress are associated with amphetamine-induced striatal dopamine release. **Neuroimage**, v. 36, n. 1, p. 153-66, May 15 2007.

PANAGIOTAROPOULOS, T. et al. Effect of neonatal handling and sex on basal and chronic stress-induced corticosterone and leptin secretion. **Neuroendocrinology**, v. 79, n. 2, p. 109-18, Feb 2004.

PERROTTI, L. I. et al. Distinct patterns of DeltaFosB induction in brain by drugs of abuse. **Synapse**, v. 62, n. 5, p. 358-69, May 2008.

POKHREL, P. et al. Adolescent neurocognitive development, self-regulation, and school-based drug use prevention. **Prev Sci**, v. 14, n. 3, p. 218-28, Jun 2013.

RICHARDS, S. et al. Tactile stimulation during development alters behaviour and neuroanatomical organization of normal rats. **Behav Brain Res**, v. 231, n. 1, p. 86-91, May 16 2012.

RÍO-ÁLAMOS, C. et al. Neonatal handling decreases unconditioned anxiety, conditioned fear, and improves two-way avoidance acquisition: a study with the inbred Roman high (RHA-I)- and low-avoidance (RLA-I) rats of both sexes. **Front Behav Neurosci**, v. 9, p. 174, 2015.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. Review. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 363, n. 1507, p. 3137-46, Oct 12 2008.

ROSA, H. Z. et al. Physical exercise modifies behavioral and molecular parameters related to opioid addiction regardless of training time. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 32, p. 25-35, Mar 2020a.

ROSA, H. Z. et al. Involvement of the endogenous opioid system in the beneficial influence of physical exercise on amphetamine-induced addiction parameters. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 197, p. 173000, Oct 2020b.

ROTHMAN, R. B.; BAUMANN, M. H. Monoamine transporters and psychostimulant drugs. **Eur J Pharmacol**, v. 479, n. 1-3, p. 23-40, Oct 31 2003.

ROVERSI, K. et al. Neonatal Tactile Stimulation Alters Behaviors in Heterozygous Serotonin Transporter Male Rats: Role of the Amygdala. **Front Behav Neurosci**, v. 14, p. 142, 2020.

ROVERSI, K. et al. Tactile Stimulation on Adulthood Modifies the HPA Axis, Neurotrophic Factors, and GFAP Signaling Reverting Depression-Like Behavior in Female Rats. **Mol Neurobiol**, v. 56, n. 9, p. 6239-6250, Sep 2019.

SANCHIS-SEGURA, C.; SPANAGEL, R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. **Addict Biol**, v. 11, n. 1, p. 2-38, Mar 2006.

SEGAT, H. J. et al. Influence of physical activity on addiction parameters of rats exposed to amphetamine which were previously supplemented with hydrogenated vegetable fat. **Brain Res Bull**, v. 135, p. 69-76, Oct 2017.

SEGAT, H. J. et al. Exercise modifies amphetamine relapse: behavioral and oxidative markers in rats. **Behav Brain Res**, v. 262, p. 94-100, Apr 1 2014.

SEGAT, H. J. et al. Substitution therapy with amphetamine-isotherapeutic attenuates amphetamine toxicological aspects of addiction. **Neurosci Lett**, v. 690, p. 138-144, Jan 18 2019.

SINHA, R. Chronic stress, drug use, and vulnerability to addiction. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1141, p. 105-30, Oct 2008.

SMITH, T. E. et al. Subjective Report of Side Effects of Prescribed and Nonprescribed Psychostimulant Use in Young Adults. **Subst Use Misuse**, v. 52, n. 4, p. 548-552, Mar 21 2017.

STAMATAKIS, A. et al. Effect of neonatal handling on adult rat spatial learning and memory following acute stress. **Stress**, v. 11, n. 2, p. 148-59, Mar 2008.

STEINBERG, E. E. et al. Positive reinforcement mediated by midbrain dopamine neurons requires D1 and D2 receptor activation in the nucleus accumbens. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e94771, 2014.

STEPHAN, M. et al. Postnatally induced differences in adult pain sensitivity depend on genetics, gender and specific experiences: reversal of maternal deprivation effects by additional postnatal tactile stimulation or chronic imipramine treatment. **Behavioural brain research**, v. 133, n. 2, p. 149-158, 2002.

TONELLI, L. et al. Investigation on cerebrospinal fluid opioids and neurotransmitters related to spinal cord stimulation. **Appl Neurophysiol**, v. 51, n. 6, p. 324-32, 1988.

VEZINA, P. Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity and the self-administration of psychomotor stimulant drugs. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 27, n. 8, p. 827-39, Jan 2004.

VOLKOW, N. D.; BOYLE, M. Neuroscience of Addiction: Relevance to Prevention and Treatment. **Am J Psychiatry**, v. 175, n. 8, p. 729-740, Aug 1 2018.

VOLKOW, N. D. et al. Neurobiologic Advances from the Brain Disease Model of Addiction. **N Engl J Med**, v. 374, n. 4, p. 363-71, Jan 28 2016.

VOLKOW, N. D.; MORALES, M. The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. **Cell**, v. 162, n. 4, p. 712-25, Aug 13 2015.

WEIS, S.; BUTTNER, A. Neurotoxicology and drug-related disorders. **Handb Clin Neurol**, v. 145, p. 181-192, 2017.

WESTOVER, A. N. et al. Stroke in young adults who abuse amphetamines or cocaine: a population-based study of hospitalized patients. **Arch Gen Psychiatry**, v. 64, n. 4, p. 495-502, Apr 2007.

WEZE, C. et al. Healing by gentle touch ameliorates stress and other symptoms in people suffering with mental health disorders or psychological stress. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 4, n. 1, p. 115-23, Mar 2007.

WILLIAMS, T. M. et al. Brain opioid receptor binding in early abstinence from opioid dependence: positron emission tomography study. **The British Journal of Psychiatry**, v. 191, n. 1, p. 63-69, 2007.

WILLIAMS, T. M. et al. Brain opioid receptor binding in early abstinence from alcohol dependence and relationship to craving: an [11C] diprenorphine PET study. **European Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 10, p. 740-748, 2009.

WISE, R. A.; KOOB, G. F. The development and maintenance of drug addiction. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 2, p. 254-62, Jan 2014.

WOOD, S. et al. Psychostimulants and cognition: a continuum of behavioral and cognitive activation. **Pharmacol Rev**, v. 66, n. 1, p. 193-221, 2014.

WU, S. L. et al. Acupuncture for Detoxification in Treatment of Opioid Addiction. **East Asian Arch Psychiatry**, v. 26, n. 2, p. 70-6, Jun 2016.

WYPYCH, M.; POTENZA, M. N. Impaired Learning From Errors and Punishments and Maladaptive Avoidance-General Mechanisms Underlying Self-Regulation Disorders? **Front Psychiatry**, v. 11, p. 609874, 2020.

XIA, Y. et al. Nucleus accumbens medium spiny neurons target non-dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. **J Neurosci**, v. 31, n. 21, p. 7811-6, May 25 2011.

YAHYAVI-FIROUZ-ABADI, N.; SEE, R. E. Anti-relapse medications: preclinical models for drug addiction treatment. **Pharmacol Ther**, v. 124, n. 2, p. 235-47, Nov 2009.