

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIE YOKO ESAKI MOTA

**O EFEITO DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA DO DIAZEPAM SOBRE A LIBERAÇÃO
DE DOPAMINA INDUZIDA POR ANFETAMINA EM RATOS**

CURITIBA

2017

JULIE YOKO ESAKI MOTA

**O EFEITO DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA DO DIAZEPAM SOBRE A LIBERAÇÃO DE
DOPAMINA INDUZIDA POR ANFETAMINA EM RATOS**

Monografia apresentada à
disciplina Estágio Supervisionado
em Biologia (BIO028), como
requisito parcial à conclusão da
modalidade de Bacharelado do
Curso de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná

Orientador: Prof. Dr. Claudio da
Cunha

CURITIBA

2017

"If I live a day and I don't know a little more than the day before, I think I've wasted that day [...]. You owe it to yourself and to everyone else to continue to stay curious, and by doing so; you will have created the meaning in life that others think is waiting under a rock for them."

Neil deGrasse Tyson

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
1.1 OBJETIVOS	12
2 METODOLOGIA.....	13
3 RESULTADOS PARCIAIS	18
4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	20
5 REFERÊNCIAS	22

AGRADECIMENTOS

À minha mãe e melhor amiga, Schirley. Devo tudo o que eu sou e que me tornarei a você. Sua bondade, humildade e sabedoria me inspiram a sempre tentar ser uma pessoa melhor. Se eu cheguei até aqui foi por seu amor incondicional e apoio constante! Eu te amo muito, e sou eternamente grata pelo privilégio de ser sua filha.

Ao meu pai, Daniel, que desde criança me ensinou que com esforço e dedicação os sonhos não permanecem apenas sonhos. Obrigada por acreditar em mim.

Ao meu orientador, Claudio da Cunha, por ter investido em minha educação científica durante todo esse tempo, pela atenção incondicional ao me ensinar e por me incentivar a ser uma pesquisadora melhor. Sou muito grata por ser vista como digna de uma ciência que amo por alguém que admiro tanto!

Aos meus colegas de laboratório, especialmente à Laura Pulido, que até o último momento me apoiou, me socorreu, incentivou e acreditou na minha capacidade! Também agradeço ao Cyrus, João Lucas, Suelen, Adam e Alexander por todo o apoio e companhia ao longo dos anos. É um prazer enorme trabalhar com pessoas como vocês, de mentes brilhantes e corações gigantes.

À Amanda Fiorenza, minha “mãe científica”, que dedicou seu tempo e paciência para me ensinar desde o início. Muito mais que técnicas e soluções, você me ensinou a enfrentar os problemas da vida de cabeça erguida e a me tornar uma pessoa mais forte.

Agradeço aos amigos maravilhosos que a graduação me trouxe, Nathalia, Maria Carolina, André e Letícia. Vocês tornaram essa jornada mais leve, e sou muito grata por ter a amizade de cada um de vocês.

RESUMO

As anfetaminas aumentam a liberação de dopamina no núcleo accumbens, e o tratamento agudo com diazepam bloqueia esse efeito. Esse trabalho visa estudar se o efeito do diazepam é mantido após um tratamento crônico ou se o diazepam apresenta tolerância para esse efeito. Se isso não ocorrer, espera-se que um tratamento crônico com diazepam possa ser utilizado como uma nova forma de tratar indivíduos com transtorno de abuso de substâncias. Para isso, vinte e um ratos Wistar machos adultos foram divididos em dois grupos: dez foram submetidos a uma exposição crônica de diazepam (2 mg/kg, diluído em propilenoglicol, álcool benzílico, álcool etílico e benzoato de sódio, i.p.) e outros onze receberam veículo (0,1ml/100g de peso corporal). Ambos tratamentos foram realizados durante 14 dias consecutivos. No décimo quinto dia os animais foram anestesiados com uretana e submetidos à cirurgia estereotáxica para registro da variação na concentração extracelular de dopamina no núcleo accumbens. Um eletrodo de registro de fibra de carbono foi implantado no núcleo accumbens direito, um eletrodo de estimulação de aço inoxidável foi implantado na área tegmentar ventral direita, e um eletrodo de referência (Ag/AgCl) foi implantado no hemisfério contralateral aos outros dois eletrodos. A liberação de dopamina foi registrada por voltametria cíclica de varredura rápida. Resultados preliminares sugerem que a administração i.p. de salina e ou veículo não alterou a liberação de dopamina no núcleo accumbens induzida pela estimulação elétrica da área tegmentar ventral. A administração i.p. de anfetamina (5 mg/kg) causou um aumento tempo-dependente na liberação de dopamina e a administração subsequente de diazepam (2 mg/kg, i.p.) fez com que a liberação de dopamina retornasse aos níveis basais. Esses resultados mostram que o efeito do diazepam sobre a liberação de dopamina na presença de anfetamina não sofreu tolerância. Essa conclusão é promissora para a perspectiva de que o diazepam possa ser usado no tratamento da dependência de drogas de abuso.

Palavras-chave: anfetamina, dopamina, dependência de drogas, crônico, diazepam

ABSTRACT

Dopamine levels rise in nucleus accumbens when under effect of amphetamines and an acute treatment using diazepam blocks this effect. This study aims to verify if either this effect is maintained after a chronic treatment or if a tolerance effect to diazepam is developed. If the later does not occur, it is expected that a chronic treatment could be used as a novel treatment option to substance abuse disorder. To check its efficiency, twenty-one adult male Wistar rats were split into two groups: ten were chronically exposed to diazepam (2 mg/kg, diluted in propylene glycol, benzyl alcohol and sodium benzoate, i.p.), then the remaining eleven animals received vehicle (0.1 ml/100 g mass weight). Both treatments were performed for 14 consecutive days. In the fifteenth, the animals were anesthetized using urethane and a stereotaxic surgery was performed to register the extracellular dopamine concentration variation in the nucleus accumbens. A carbon-fiber registering electrode was implanted in the right nucleus accumbens, a stainless steel electrode in the ventral tegmental area and a reference (Ag/AgCl) electrode in a contralateral hemisphere to both previous electrodes. Then, dopamine levels were registered using fast scan cyclic voltammetry. Preliminary results suggest that the i.p. administration of both saline solution and vehicle did not affect the ventral tegmental electric stimulation induced dopamine release in the nucleus accumbens. In contrast, the i.p. administration of amphetamine (5 mg/kg) caused time-dependent increase in dopamine level, which was reduced to a basal level when treated with diazepam (2 mg/kg, i.p.). These results show that no tolerance was developed to diazepam's effect in the presence of amphetamine, which presents a promising perspective to use diazepam in substance abuse disorder treatment.

Key-words: amphetamine, dopamine, substance abuse disorder, chronic, diazepam

1 INTRODUÇÃO

Em 2017 o Escritório das Nações Unidas contra Drogas e Crime (UNODC) publicou no Relatório Mundial de Drogas que cerca de 250 milhões de pessoas fizeram uso de alguma droga de abuso. Destas, 29,5 milhões sofrem de transtorno de abuso de substâncias e, no entanto, apenas uma em cada seis está em tratamento (UNODC, 2017). Além disso, o UNODC destaca que 14 a 57 milhões de indivíduos consomem anfetaminas e 11 a 28 milhões consomem “ecstasy” (metilenodioximetanfetamina, ou MDMA) anualmente. Essas drogas, juntamente com as metanfetaminas e outras substâncias compostas por estimulantes sintéticos, constituem o grupo dos “Estimulantes do tipo Anfetamínico”, comumente chamado de ATS (do inglês, *amphetamine-type stimulants*). É importante ressaltar que os dados do consumo mundial dessas drogas estão subestimados, uma vez que países altamente populosos como a China e a Índia não realizam pesquisas nacionais para coletar dados de consumo de ATS (UNODC, 2011).

No Brasil, o consumo de ATS em 2011 se destacou como um dos mais altos da América do Sul, revelando os maiores números absolutos de usuários dessa classe de drogas. Além disso, 13,8% dos universitários brasileiros declararam ter usado anfetamina em algum momento da vida, sendo que 10,5% declarou fazer uso das substâncias uma vez por ano e 8,7% declarou usar anfetaminas mensalmente (UNODC, 2017).

O Relatório Global de Estimulantes do Tipo Anfetamínico publicado em 2011, também pelo UNODC, classifica os ATS como o segundo tipo de droga ilícita mais utilizado no mundo depois da *cannabis*. Os dados apresentados reforçam a importância de se estudar essas drogas e de buscar novos tratamentos para o transtorno de abuso de substâncias por anfetaminas, uma vez que, apesar da crescente demanda, ainda não há um tratamento farmacológico suficientemente eficaz para tal. (BRENSILVER, *et al.*, 2013; HARADA, *et al.*, 2014)

A grande popularidade das anfetaminas se dá pelos efeitos reforçadores particulares dessas drogas, além de seus efeitos gratificantes tais como a sensação exagerada de bem-estar, euforia, melhora na concentração, aumento do desejo sexual e desinibição, bem como a intensificação do estado de alerta. O consumo abusivo das anfetaminas também se deve ao seu efeito de perda do apetite (MOHS *et al.*, 1978; GREENE *et al.*, 2008). Alguns efeitos adversos

característicos do uso a curto-prazo envolvem boca seca, bruxismo, cefaleia, náusea, palpitação, dilatação das pupilas, hostilidade e disfunções cardiovasculares. Entretanto, o consumo em longo prazo leva a consequências bem mais graves, entre elas o surgimento de alterações comportamentais, alta impulsividade, déficits de memória, confusão mental, cansaço crônico, úlceras, perda da coordenação, ansiedade, transtornos de humor, psicose, convulsões, coma e até mesmo a morte (MONTROYA *et al.*, 2002; BAYLEN & ROSENBERG, 2006; BARR *et al.*, 2006).

As anfetaminas, assim como a maioria das drogas de abuso estimulantes, promovem a liberação do neurotransmissor dopamina (DA) em uma região do cérebro chamada de núcleo accumbens (NAc) (DI CHIARA & IMPERATO, 1988). Essa região recebe projeções dos neurônios dopaminérgicos da via mesolímbica. Os corpos celulares desses neurônios dopaminérgicos estão na área tegmentar ventral (VTA) e seus terminais sinápticos estão em estruturas do sistema límbico: além do NAc, o hipocampo, amígdala e o córtex pré-frontal (SESACK & GRACE, 2010). A via dopaminérgica que vai da VTA para o NAc é também chamada de via da recompensa e desempenha um papel crítico nos mecanismos de dependência de drogas (NESTLER, 2001).

A DA é uma amina biogênica do grupo das catecolaminas. Ela age como um neurotransmissor que modula a transmissão glutamatérgica e gabaérgica nos núcleos da base e o córtex frontal, modulando assim funções motoras e motivacionais. Além disso, a dopamina desempenha um importante papel nos processos de dependência de drogas de abuso (NESTLER, 2001; SIEGEL *et al.*, 2006; JACKOWSKA & KRYSINSKI, 2013).

A liberação deste neurotransmissor nos terminais sinápticos pode ocorrer de duas formas: 1) liberação tônica, em que a dopamina é liberada de forma lenta e constante em pequenas quantidades; e 2) liberação fásica, em que a dopamina é liberada em grande quantidade e de forma rápida (GRACE, 1995; REDGRAVE *et al.*, 2008). A liberação tônica ocorre constantemente e modula funções motoras e psíquicas. A liberação fásica ocorre frente a estímulos salientes, tendo importante papel na motivação necessária para realizar uma ação que resulta em recompensas imediatas, como por exemplo, consumir uma droga. (WIGHTMAN & ROBINSON, 2002).

O mecanismo de ação das anfetaminas consiste em bloquear competitivamente os transportadores de dopamina (DAT), noradrenalina (NET)

e, em altas concentrações, a anfetamina também inibe o transportador de serotonina (SERT). As anfetaminas também inibem a atividade da enzima monoamina oxidase. Portanto, o efeito das anfetaminas sobre essas proteínas transportadoras resulta na redução da recaptação e no aumento da disponibilidade dos neurotransmissores monoaminérgicos na fenda sináptica. (FLECKENSTEIN *et al.*, 2007).

Outra forma com que as anfetaminas podem afetar a liberação de dopamina é revertendo a direção do fluxo de dopamina pelo DAT, como pode ser observado na Figura 1. Em uma situação normal, o DAT transporta DA da fenda sináptica para o interior do terminal pré-sináptico. O transportador vesicular de monoaminas (VMAT), por sua vez, transporta a dopamina do citoplasma para dentro das vesículas sinápticas. As anfetaminas atuam sobre o DAT e o VMAT por mecanismos que envolvem a ativação de receptores associados a traços de amina (TAAR1), levando ao aumento da produção de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc). O AMPc ativa a proteína cinase do tipo A (PKA) que, por sua vez, fosforila os transportadores de monoaminas. Como resultado esses transportadores passam a atuar de forma reversa, transportando as monoaminas das vesículas sinápticas para o citoplasma dos terminais sinápticos e daí para a fenda sináptica. Esses mecanismos resultam em um aumento da disponibilidade de DA na fenda sináptica (MILLER, 2011).

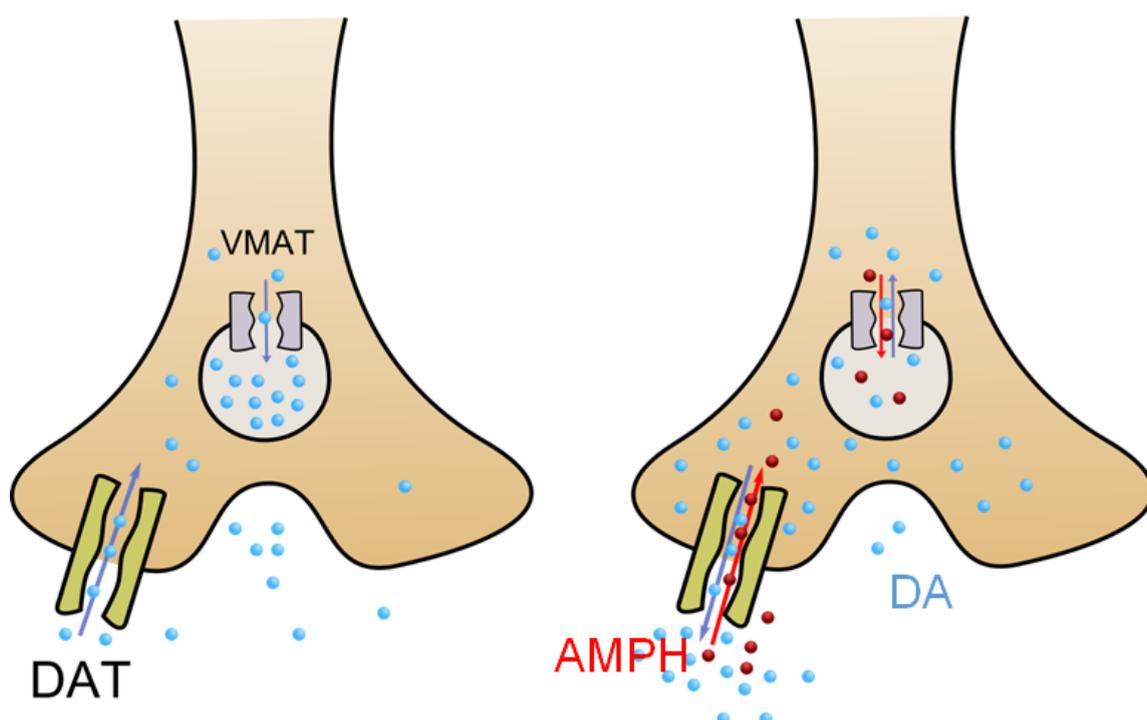


Figura 1. Mecanismos de ação do efeito das anfetaminas sobre a liberação de dopamina. O

terminal sináptico dopaminérgico à esquerda ilustra o seu funcionamento normal e o da direita está alterado devido à presença de anfetamina (AMPH) que atua invertendo o fluxo de dopamina no transportador da dopamina (DAT) e no transportador vesicular de dopamina (VMAT). Adaptado de https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Amphetamine_mechanism_of_action.svg (Acesso em 19/10/2017 às 13:20).

Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que a administração aguda de diazepam previne esse aumento na liberação de dopamina frente a anfetaminas (GOMEZ-A *et al.*, 2017). O diazepam é um fármaco ansiolítico da família dos benzodiazepínicos, comumente utilizado no tratamento de transtornos de ansiedade. (CALCATERRA & BARROW, 2014). O diazepam promove um aumento na afinidade do ácido gama-aminobutírico (GABA) pelo subtipo de receptor A (GABA-A), aumentando a permeabilidade da membrana aos íons Cl⁻ o que resulta na inibição do neurônio pós-sináptico (OLSEN & BETZ, 2006). Não se sabe, no entanto, como esse mecanismo promove a redução da liberação de dopamina no núcleo accumbens. Schelp *et al.* (2017) propõem que essa redução ocorre no terminal axônico, já que os neurônios da VTA são desinibidos pelo diazepam e a frequência de liberações de DA aumenta; porém, mais estudos são necessários para esclarecer esse mecanismo.

É importante ressaltar que os benzodiazepínicos possuem potencial de causar dependência, mas os efeitos colaterais da dependência por anfetaminas são consideravelmente mais graves que os da dependência por benzodiazepínicos (LADER, 1983; MONTOYA *et al.*, 2002; BAYLEN & ROSENBERG, 2006; BARR *et al.*, 2006). O tratamento com benzodiazepínicos não é a cura para o transtorno de abuso de substâncias, mas uma forma de atenuar o sofrimento de pacientes acometidos por esse transtorno. A descoberta de que o diazepam bloqueia o aumento da liberação de DA induzido por anfetaminas, sua ampla utilização clínica como ansiolítico e baixa toxicidade são algumas características que podem classificar o diazepam como um candidato promissor para o tratamento do transtorno de abuso de substâncias.

Apesar do tratamento agudo por diazepam reduzir liberação de DA induzida por anfetamina no NAc (GOMEZ-A *et al.*, 2017), não se sabe se esse efeito persiste com um tratamento crônico com diazepam ou se esse tratamento crônico desenvolve tolerância. O presente estudo tem como objetivo testar essa hipótese. Ou seja, testar se um tratamento crônico com diazepam em sua dose

ansiolítica é capaz de reduzir a liberação de dopamina fásica causada por anfetamina.

1.1 OBJETIVOS

- Objetivo Geral

- Avaliar o potencial do uso de benzodiazepínicos para tratar a dependência de drogas de abuso.

- Objetivos Específicos

- Verificar se um tratamento crônico de diazepam em uma dose ansiolítica pode prevenir a liberação de dopamina causada pela exposição a anfetaminas, ou mesmo reduzir a quantidade de dopamina liberada.

2 METODOLOGIA

Os animais utilizados neste experimento até o momento foram 21 ratos Wistar machos adultos (estima-se que até o final do experimento sejam utilizados 60 animais no total, com a representação de 10 animais por grupo) com peso inicial de 220 a 250 g, mantidos em condições controladas de temperatura (22°C, ciclo claro/escuro de 12h iniciando a fase clara às 7 horas da manhã) e com a disponibilidade de água e comida à vontade. Os ratos foram submetidos a um tratamento crônico de diazepam (2 mg/kg, diluído em propilenoglicol 2%, álcool benzílico 2%, álcool etílico 8% e benzoato de sódio 1nM, i.p.) ou de seu veículo (mesma dose calculada para o diazepam, i.p.) por 14 dias consecutivos.

No décimo quinto dia os animais foram anestesiados com uretana (1.45 g/kg, i.p.) e submetidos à cirurgia estereotáxica para o implante no NAc de um eletrodo de registro de fibra de carbono, um eletrodo de estimulação de aço inoxidável implantado na VTA, e um eletrodo de referência (Ag/AgCl⁻), implantado no hemisfério contralateral aos outros dois eletrodos. Esses procedimentos são necessários para a realização da técnica de Voltametria Cíclica de Varredura Rápida (FSCV, do inglês *fast-scan cyclic voltammetry*), que permite observar e quantificar a liberação de dopamina no NAc em tempo real. É importante ressaltar que nessa técnica o anestésico uretana não pode ser substituído por nenhum outro. Isso porque estudos anteriores mostraram a interferência de outros anestésicos na sinalização dopaminérgica, de forma a inviabilizar o registro de voltametria cíclica. (SABETI *et al.*, 2003; ADACHI *et al.*, 2005).

A técnica de FSCV consiste na aplicação de ciclos de variação de potencial elétrico na forma de uma rampa triangular à fibra de carbono do eletrodo de registro (Figura 2A). Esta variação varia de um valor de potencial em que a dopamina não se oxida (-0.4V até um valor superior ao necessário para a sua oxidação (+1.3V), e então volta ao potencial inicial (-0.4V). A DA se oxida em aproximadamente +0.7V, e durante a fase ascendente dessa rampa de potencial elétrico ela doa seus elétrons para a superfície da fibra de carbono do eletrodo, transformando-se em dopamina orto-quinona. Na fase descendente da rampa a DA recebe elétrons adsorvidos na superfície da fibra de carbono e volta para a sua forma original (Figura 2B).

A cada ciclo essas alterações de potencial elétrico geram correntes elétricas que são representadas na forma de voltamogramas: um gráfico da variação de corrente *versus* tempo (Figura 2C). O formato do voltamograma é usado para identificar a DA e a amplitude da corrente no pico de oxidação da dopamina é usada para quantificar a sua concentração. Após a realização dos registros de FSCV os eletrodos de carbono utilizados nos experimentos são calibrados com concentrações conhecidas de DA para que os valores de corrente obtidos nas estimulações possam ser extrapolados para concentrações de DA (ROBINSON *et al.*, 2003; WIGHTMAN, 2006; ROBERTS *et al.*, 2013). A calibração se faz necessária pois o comprimento da fibra de carbono nem sempre é o mesmo para todos os eletrodos em todos os animais, podendo variar entre 30-100 micrômetros de comprimento, o que pode justificar a diferença na detecção da dopamina ao utilizar eletrodos de diferentes comprimentos no mesmo animal. Essa diferença, no entanto, não altera a qualidade do experimento, vez que uma linha de base (estimulações feitas antes de administrar qualquer droga no experimento agudo) é obtida justamente para servir como um controle interno da capacidade daquele eletrodo e do animal em questão.

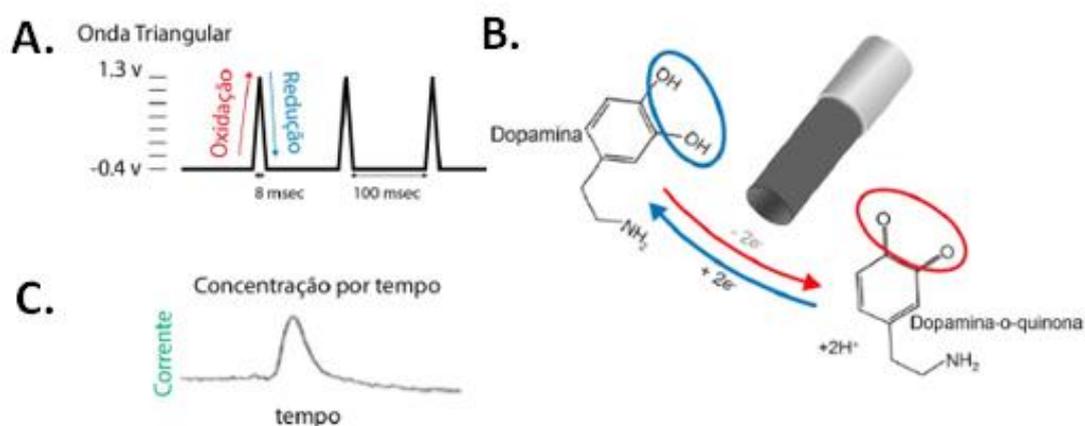


Figura 2. Voltametria Cíclica de Varredura Rápida (FSCV). A) Ondas triangulares cíclicas de variação do potencial elétrico são aplicadas ao eletrodo de registro. B) No eletrodo de registro de fibra de carbono ocorre a oxidação da dopamina a dopamina-o-quinona e a redução da dopamina-o-quinona a dopamina. As cores das flechas indicam se essas reações ocorrem na fase ascendente ou descendente da rampa de potencial elétrico. C) A corrente no pico da oxidação da dopamina ao longo do tempo permite o cálculo das variações na concentração de dopamina próximas ao eletrodo. Adaptado de Robinson & Wightman (2007)

Ao longo do registro de FSCV foram feitas duas administrações por via intraperitoneal: anfetamina (5 mg/kg, diluída em salina) ou salina; e diazepam (2 mg/kg) ou veículo. A combinação dessas administrações foi dada conforme os grupos experimentais a seguir:

Grupos do pré-tratamento crônico com veículo:

- 1) Salina + Diazepam (n = 3)
- 2) Salina + Veículo (n = 3)
- 3) Anfetamina + Diazepam (n = 3)
- 4) Anfetamina + Veículo (n = 2)

Grupos do pré-tratamento crônico com diazepam:

- 5) Salina + Diazepam (n = 4)
- 6) Anfetamina + Diazepam (n = 6)

Antes de aplicar qualquer injeção foram aplicadas 10 estimulações elétricas bifásicas com intervalos de 2 min. Cada estimulação consistiu em 20 pulsos elétricos bifásicos catódicos, 0,5 s por pulso, 400 μ A, 60 Hz. Essa série serviu como a linha de base do experimento, determinando qual a liberação de dopamina normal daquele animal que o eletrodo consegue captar. Com essa linha de base foi possível comparar o aumento ou redução na liberação de dopamina que as drogas aplicadas no experimento causaram em relação ao valor basal. Após a coleta dessa linha de base, outras séries de 10 estimulações foram aplicadas após a injeção de diazepam, anfetamina, salina ou veículo, conforme os grupos acima. A linha do tempo do experimento está retratada na Fig. 3 abaixo.

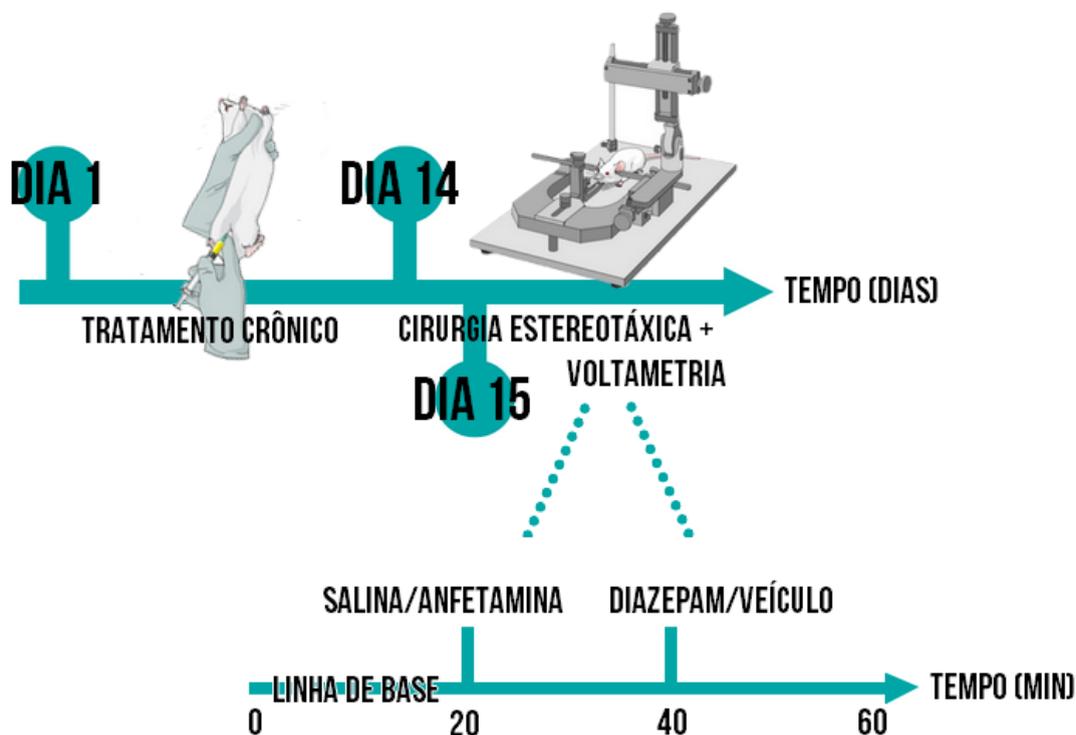


Figura 3. Linha do tempo dos dias do experimento e linha do tempo durante o experimento em minutos com as administrações realizadas. As imagens científicas foram adaptadas do projeto Mind the Graph.

Para a aplicação dos pulsos de estimulação elétrica foi usado o sistema MINCS (*Mayo Investigational Neuromodulation Control System*) e para a voltametria cíclica foi usado o sistema WINCS (*Wireless Instantaneous Neurochemical Concentration Sensing System*) ambos fabricados como protótipos e cedidos pela Mayo Clinic (Rochester, MN, EUA). Esse sistema transmite e recebe dados por *bluetooth* para um computador que é gerenciado pelo software WINCSware. Assim, pode-se acompanhar em tempo real as variações na concentração de DA. Esses dados são salvos conforme o experimento é realizado, e são posteriormente analisados para quantificar a liberação de DA.

As coordenadas antero-posterior (AP), médio-lateral (ML) e dorso-ventral (DV) da área tegmentar ventral (VTA) e do núcleo accumbens (NAc) que serão utilizadas neste experimento são referentes ao bregma e foram calculadas com o auxílio do atlas “The Rat Brain” (PAXINOS & WATSON, 1998).

Coordenadas utilizadas:

NAc – AP +0,19cm; ML +0,14cm; DV -0,70cm

VTA – AP -0,52cm; ML +0,10cm; DV -0,84cm

Durante a realização do experimento foi observado que o efeito da anfetamina só inicia por volta da 5ª ou 6ª estimulação (cerca de 10-12 minutos após a administração intraperitoneal), o que exigiu um aumento para 15 estimulações após a injeção de anfetamina nos grupos que recebiam essa droga para obtermos resultados suficientes para comparar com os controles. Os grupos que receberam salina, porém, já haviam sido feitos com 10 estimulações. Posteriormente iremos replicar os experimentos para o grupo salina com 15 estimulações. Isso se faz necessário para que os dados possam ser analisados por ANOVA de duas vias.

3 RESULTADOS PARCIAIS

Os resultados apresentados na Figura 4 mostram que: (i) o tratamento agudo com anfetamina causou um aumento na liberação de dopamina quando comparado ao grupo que recebeu salina (Fig. 4B, etapa 2); (ii) o tratamento crônico com diazepam bloqueou esse efeito (Fig. 4B, etapa 3); (iii) a administração aguda de diazepam reduziu a liberação de dopamina, tanto nos animais que receberam tratamento crônico com veículo, como nos que receberam tratamento crônico com diazepam (Fig. 4A, etapa 3); (iv) a administração aguda de diazepam reverteu o efeito da administração aguda de anfetamina, tanto nos ratos tratados cronicamente com diazepam como nos tratados cronicamente com veículo (Fig. 4B, etapa 3); (v) Nos animais que receberam tratamento crônico com diazepam, a injeção aguda de diazepam no dia seguinte causou uma reversão do efeito da anfetamina que foi mais rápida e mais intensa que nos animais tratados cronicamente com o veículo e que receberam uma injeção de diazepam apenas no 15º dia (Fig. 4B, etapa 3).

É importante observar que no tratamento crônico com veículo, a administração aguda de veículo e a administração aguda de salina não alteraram a liberação de dopamina. Uma ANOVA de duas vias com medidas repetidas dos dados dos animais tratados com salina (Fig. 4A) mostrou um efeito significativo do fator tempo ($F(29, 203) = 1,78, P < 0.05$), não houve efeito significativo do fator tratamento ($F(2, 7) = 1,52, P = 0.28$), mas a interação entre os fatores tratamento e tempo foi significativa ($F(58, 203) = 1,50, P < 0.05$). O teste pos-hoc de Sidak mostrou diferenças significantes após a última administração entre o grupo que recebeu diazepam tanto de forma crônica quanto de forma aguda durante o experimento e o grupo que recebeu veículo crônico e também recebeu veículo durante o experimento, conforme demonstrado na Fig. 4A.

Foi realizada também uma ANOVA de duas vias com medidas repetidas dos dados dos animais tratados com anfetamina (Fig. 4B), que mostrou um efeito significativo do fator tempo ($F(34, 272) = 6,33, P < 0.05$), não houve efeito significativo do fator tratamento ($F(2, 8) = 0,141, P = 0.87$), mas a interação entre os fatores tratamento e tempo foi significativa ($F(68, 272) = 1,86, P < 0.05$). O teste pos-hoc de Sidak mostrou que existem diferenças significantes entre o grupo que recebeu veículo crônico e também receberam veículo de forma aguda durante o experimento e o grupo que recebeu diazepam de forma

crônica e também de forma aguda durante o experimento. Essa diferença pode ser observada nos dados coletados após a última etapa da administração, conforme demonstrado na Fig. 4B.

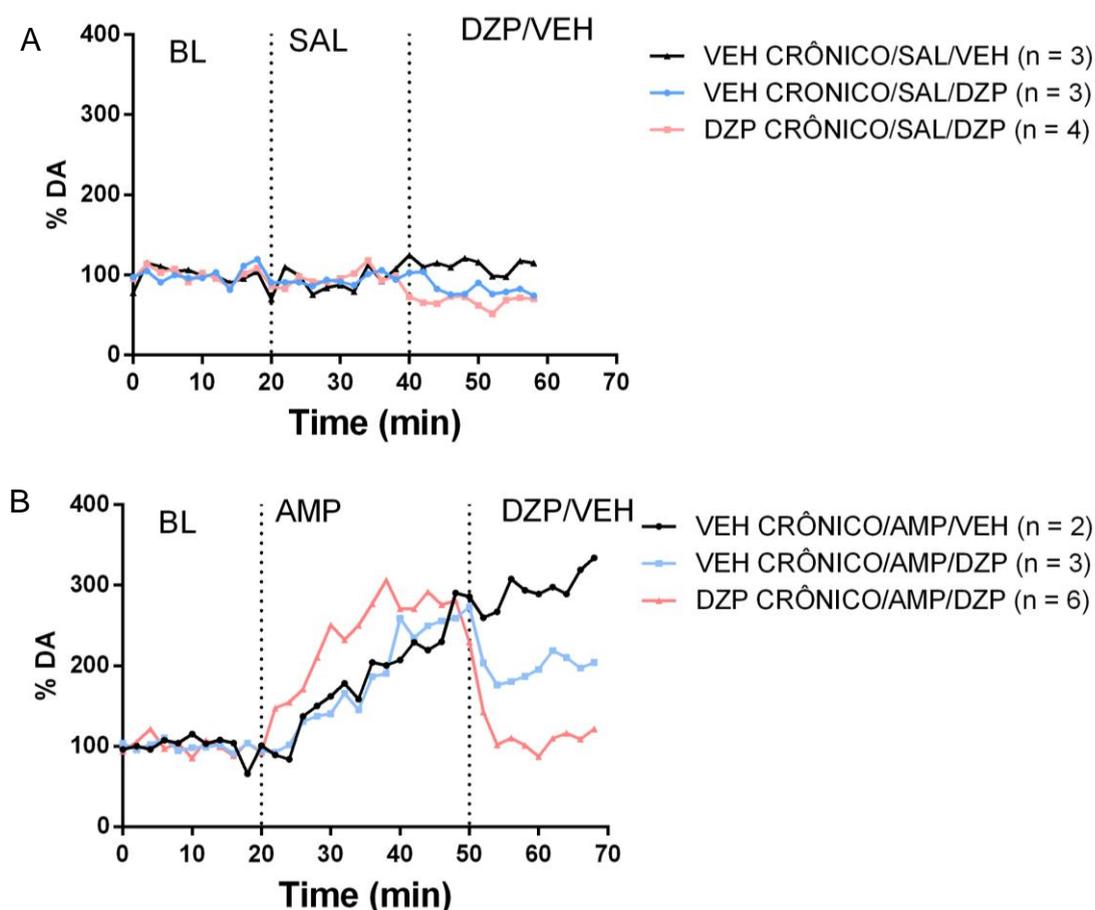


Figura 4. Efeito dos tratamentos crônico e agudo de diazepam sobre a liberação de dopamina induzida por anfetamina. Dois grupos de ratos receberam um tratamento crônico de 14 dias com uma administração diária de diazepam (2 mg/kg, i.p.); outros quatro grupos de ratos receberam veículo ao invés de diazepam. No dia seguinte (15^o dia) os animais foram anestesiados e as variações na concentração extracelular de dopamina no núcleo accumbens evocadas pela estimulação elétrica da área tegmentar ventral foram registradas em 10 ou 15 momentos das seguintes etapas: (1) antes da administração de qualquer droga (condição basal, BL); (2) após a administração de anfetamina ou de seu veículo (salina, SAL); (3) após a administração de diazepam (DZP) ou do seu veículo (VEH). Para os dados de cada animal, a média de todas as medidas sob a condição basal foi considerada como 100% e os demais valores foram normalizados como porcentagem em relação ao valor basal. (A) Grupos que receberam salina durante a etapa 2. (B) Grupos que receberam anfetamina durante a etapa 2.

É importante também ressaltar que, devido ao experimento ainda estar em andamento, o N experimental não está completo e, portanto, as estatísticas e os gráficos aqui dispostos são apenas uma demonstração da tendência que os nossos dados estão seguindo até o momento, ou seja, resultados parciais.

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O presente estudo investigou o efeito do tratamento crônico do diazepam sobre a liberação de dopamina induzida por anfetaminas. Nosso principal objetivo foi verificar se haveria um efeito de tolerância pelo diazepam em um tratamento crônico e se esse tratamento demonstraria um efeito positivo na redução da liberação de dopamina, trazendo à tona uma possibilidade de estudar um novo tratamento para a dependência por anfetaminas.

Os resultados deste trabalho até o momento se mostraram interessantes, uma vez que os grupos de animais que receberam tratamento crônico com diazepam exibiram uma redução da liberação de dopamina e que mesmo após esse tratamento crônico o diazepam bloqueia o efeito da anfetamina. Isso mostra que não ocorre tolerância desses efeitos do diazepam após um tratamento crônico.

Como na etapa 2 do experimento (Fig. 4) coletamos 10 amostras de amostras da liberação de dopamina nos 3 grupos de animais tratados agudamente com salina e 15 amostras nos que receberam anfetamina, não foi possível fazer uma comparação estatística de todos os 6 grupos ao mesmo tempo. Vamos dar continuidade a esse trabalho repetindo as medidas dos 3 grupos que receberam salina com a coleta de 15 amostras. Embora os resultados atuais demostrem de forma bastante robusta as interações entre os tratamentos agudo e crônico com diazepam e o tratamento agudo com anfetamina, ao analisar todos dos grupos de forma conjunta poderemos apresentar uma evidência melhor fundamentada para as conclusões acima.

Nossos resultados são um importante complemento para algumas descobertas recentes pelo nosso grupo de pesquisa em um estudo publicado por Gomez-A *et al.* no início de 2017. Este estudo foi o primeiro a demonstrar por voltametria cíclica que a administração aguda de um benzodiazepínico (diazepam) causa uma redução da liberação de dopamina no núcleo accumbens e que esse benzodiazepínico bloqueia o aumento na liberação de dopamina observado após uma injeção de anfetamina. Foi esse estudo que impulsionou nosso interesse para investigar qual seria a resposta dopaminérgica frente a um tratamento crônico com diazepam.

Um estudo publicado por Augier *et al.* (2012) demonstrou que o diazepam promove a abstinência em ratos que podem autoadministrar cocaína, ou seja, escolhem outra recompensa ao invés da droga. Uma vez que a

cocaína - assim como a anfetamina - é uma droga de abuso que promove a liberação de dopamina fásica no núcleo accumbens (GOEDDERS & SMITH, 1983), é possível que esses ratos tenham optado pela abstinência porque o diazepam bloqueia a liberação de dopamina induzida por cocaína. Isso porque a motivação para consumir uma droga de abuso decorre da liberação de dopamina fásica (WIGHTMAN & ROBINSON, 2002).

Goeders e Guerin (2008) realizaram um estudo associando a administração do benzodiazepínico oxazepam e da metirapona – um bloqueador da síntese de glicocorticóides – e observaram que essa combinação foi eficaz para reduzir a autoadministração de cocaína em ratos. Kablinger *et al.* (2012) utilizaram essa mesma associação de fármacos e observaram que também ocorre uma eficácia na diminuição da “fissura” (*craving* – desejo intenso de consumir a droga) em pessoas.

Finalmente, a conclusão deste trabalho é a de que o diazepam parece ser um bom candidato para o tratamento da dependência por anfetaminas. Como próximo passo, após finalizar os experimentos para este projeto, podemos explorar a possibilidade de investigar quais são os mecanismos de ação dos benzodiazepínicos na modulação da neurotransmissão dopaminérgica e projetar um experimento para verificar se o tratamento crônico é eficaz para tratar os sintomas da dependência em si usando um modelo de dependência por autoadministração, com uma visão mais ampla dos aspectos comportamentais e fisiológicos da dependência.

Outro passo futuro seria avaliar se os efeitos da administração crônica de diazepam na liberação de dopamina são duradouros ao longo do tempo após a retirada do diazepam, vez que, para constatar seu potencial terapêutico, seria necessário demonstrar que os efeitos de abstinência por anfetaminas permanecem reduzidos mesmo após a retirada do diazepam.

5 REFERÊNCIAS

- ADACHI, Y.U.; YAMADA, S.; SATOMOTO, M.; HIGUCHI, H.; WATANABE, K.; KAZAMA, T. Isoflurane anesthesia induces biphasic effect on dopamine release in the rat striatum. **Brain Research Bulletin**, v. 67, n. 3, p.176-181, out. 2005.
- AUGIER, E.; VOUILLAC, C.; AHMED, S. H. Diazepam promotes choice of abstinence in cocaine self-administering rats. **Addiction Biology**, v. 17, n. 2, p.378-391, 28 set. 2012
- BARR, A.M.; PANENKA, W.J.; MACEWAN, G.W.; THORNTON, A.E.; LANG, D.J.; HONER, W.G.; LECOMTE; T. The need for speed: an update on methamphetamine addiction. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v. 31, n. 5, p. 301-313, set. 2006.
- BAYLEN, C.A.; ROSENBERG, H. A review of the acute subjective effects of MDMA/ecstasy. **Addiction**, v. 101, n. 7, p.933-947, jul. 2006.
- BRENSILVER, M.; HEINZERLING, K.G.; SHOPTAW, S. Pharmacotherapy of amphetamine-type stimulant dependence: An update. **Drug And Alcohol Review**, v. 32, n. 5, p.449-460, 25 abr. 2013
- CALCATERRA, N.E.; BARROW, J.C. Classics in Chemical Neuroscience: Diazepam (Valium). **Acs Chemical Neuroscience**, v. 5, n. 4, p.253-260, 16 abr. 2014.
- DI CHIARA, G.; IMPERATO, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 85, n. 14, p. 5274-5278. 1988.
- FLECKENSTEIN, A. E.; VOLTZ, T. J.; RIDDLE, E. L.; GIBB, J. W.; HANSON, G. R. New Insights into the Mechanism of Action of Amphetamines. **Annual Review Of Pharmacology And Toxicology**, v. 47, n. 1, p.681-698, fev. 2007. Annual Reviews.
- GOEDDERS, N. E.; SMITH, J. E. Cortical dopaminergic involvement in cocaine reinforcement. **Science** v. 221, p. 773–775, 1983.

- GOEDERS, N. E.; GUERIN, G. F. Effects of the combination of metyrapone and oxazepam on cocaine and food self-administration in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 91, p. 181-189. 2008.
- GOMEZ-A, A.; FIORENZA, A. M.; BOSCHEN, S.L.; SUGI, A.H.; BECKMAN, D.; FERREIRA S.T.; LEE, K.; BLAHA, C.H.; DA CUNHA, C. Diazepam Inhibits Electrically Evoked and Tonic Dopamine Release in the Nucleus Accumbens and Reverses the Effect of Amphetamine. **Acs Chemical Neuroscience**, v. 8, n. 2, p.300-309, 26 jan. 2017.
- GRACE, A. A. The tonic/phasic model of dopamine system regulation: its relevance for understanding how stimulant abuse can alter basal ganglia function. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 37, n. 2, p. 111–129, 1995.
- GREENE, S.L.; KERR, F.; BRAITBERG, G. Review article: Amphetamines and related drugs of abuse. **Emergency Medicine Australasia**, v. 20, n. 5, p.391-402, out. 2008.
- HARADA, T.; TSUTOMI, H.; MORI, R.; WILSON, D.B. Cognitive-behavioural treatment for amphetamine-type stimulants (ATS) use disorders. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 7 out. 2014.
- JACKOWSKA, K.; KRYSINSKI, P. New trends in the electrochemical sensing of dopamine. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 11, p. 3753, 2013
- KABLINGER, A. S.; LINDNER, M. A.; CASSO, S.; HEFTI, F.; DEMUTH, G.; FOX, B. S.; MCNAIR, L. A.; MCCARTHY, B. G.; GOEDERS, N. E. Effects of the combination of metyrapone and oxazepam on cocaine craving and cocaine taking: a double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study. *Journal of Psychopharmacology* 26:973-981. 2012.
- LADER, M. Dependence on benzodiazepines. **J Clin Psychiatry**. v. 44, p. 121–127. 1983.
- MILLER, G. M. The emerging role of trace amine-associated receptor 1 in the functional regulation of monoamine transporters and dopaminergic activity. **Journal Of Neurochemistry**, v. 116, n. 2, p.164-176, 2001.

- MOHS, R. C.; TINKLENBERG, J. R.; ROTH, W. T.; KOPELL, B. S. Methamphetamine and diphenhydramine effects on the rate of cognitive processing. **Psychopharmacology**, v. 59, p.13-19. 1978.
- MONTOYA, A. G.; SORRENTINO, R.; LUKAS, S. E.; PRICE, B. H. Long-term neuropsychiatric consequences of 'ecstasy' (MDMA): a review. **Harvard Review of Psychiatry**, v. 10, n. 4, p. 212-220. 2002.
- NESTLER, E. J. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 2, p. 119, 2001.
- NESTLER, E. J. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 2, p. 119, 2001.
- OLSEN R. W.; BETZ, H. GABA and glycine. **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects (7th ed.)**. Elsevier, 291–302, 2006.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. **Academic Press**, San Diego. 1998.
- REDGRAVE, P.; GURNEY, K.; REYNOLDS, J. What is reinforced by phasic dopamine signals? **Brain Research Reviews**, v. 58, n. 2, p.322-339, ago. 2008.
- ROBERTS, J. G.; LUGO-MORALES, L.Z.; LOZIUK, P.L.; SOMBERS, L.A. Real-time chemical measurements of dopamine release in the brain. **Methods in Molecular Biology**, v. 964, p. 275, 2013.
- ROBINSON, D. L.; VENTON, B. J.; HEIEN, M. L.; WIGHTMAN, R. M. Detecting subsecond dopamine release with fast-scan cyclic voltammetry in vivo. **Clinical chemistry**, v. 49, n. 10, p. 1763, 2003.
- ROBINSON, D. L.; WIGHTMAN, R. M. Rapid Dopamine Release in Freely Moving European Journal of Neuroscience Rats. In: Michael, A.C.; Borland, L.M., editors. **Electrochemical Methods for Neuroscience**. Chapter 2. 2007.
- SABETI, J.; GERHARDT, G. A.; ZAHNISER, N.R. Chloral hydrate and ethanol, but not urethane, alter the clearance of exogenous dopamine recorded by

chronoamperometry in striatum of unrestrained rats. **Neuroscience Letters**, v. 343, n. 1, p.9-12, may 2003.

SCHELP, S. A.; BRODNIK, Z. D.; RAKOWSKI, D. R.; PULTORAK, K. J.; SAMBELLS, A. T.; ESPANA, R. A.; OLESON, E. B. Diazepam concurrently increases the frequency and decreases the amplitude of dopamine transient release events in the nucleus accumbens. **Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, 20 out. 2017.

SESACK, S. R.; GRACE, A. A. Cortico-basal ganglia reward network: microcircuitry. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, p. 27, 2010.

SIEGEL, G. et al. Basic Neurochemistry. 7. London: Elsevier, 2006.

UNODC – "Amphetamines and Ecstasy: 2011 ATS Global Assessment", **United Nations Office on Drugs and Crime**, Vienna. 2011.

UNODC – "Market Analysis of Synthetic Drugs: Amphetamine-type stimulants, new psychoactive substances - World Drug Report 2017", **United Nations Office on Drugs and Crime**, Vienna. 2017.

WIGHTMAN, R. M. Detection technologies. Probing cellular chemistry in biological systems with microelectrodes. **Science**, v. 311, n. 5767, p. 1570, 2006.

WIGHTMAN, R. M.; ROBINSON, D. L. Transient changes in mesolimbic dopamine and their association with 'reward'. **Journal Of Neurochemistry**, v. 82, n. 4, p.721-735, 7 ago. 2002.