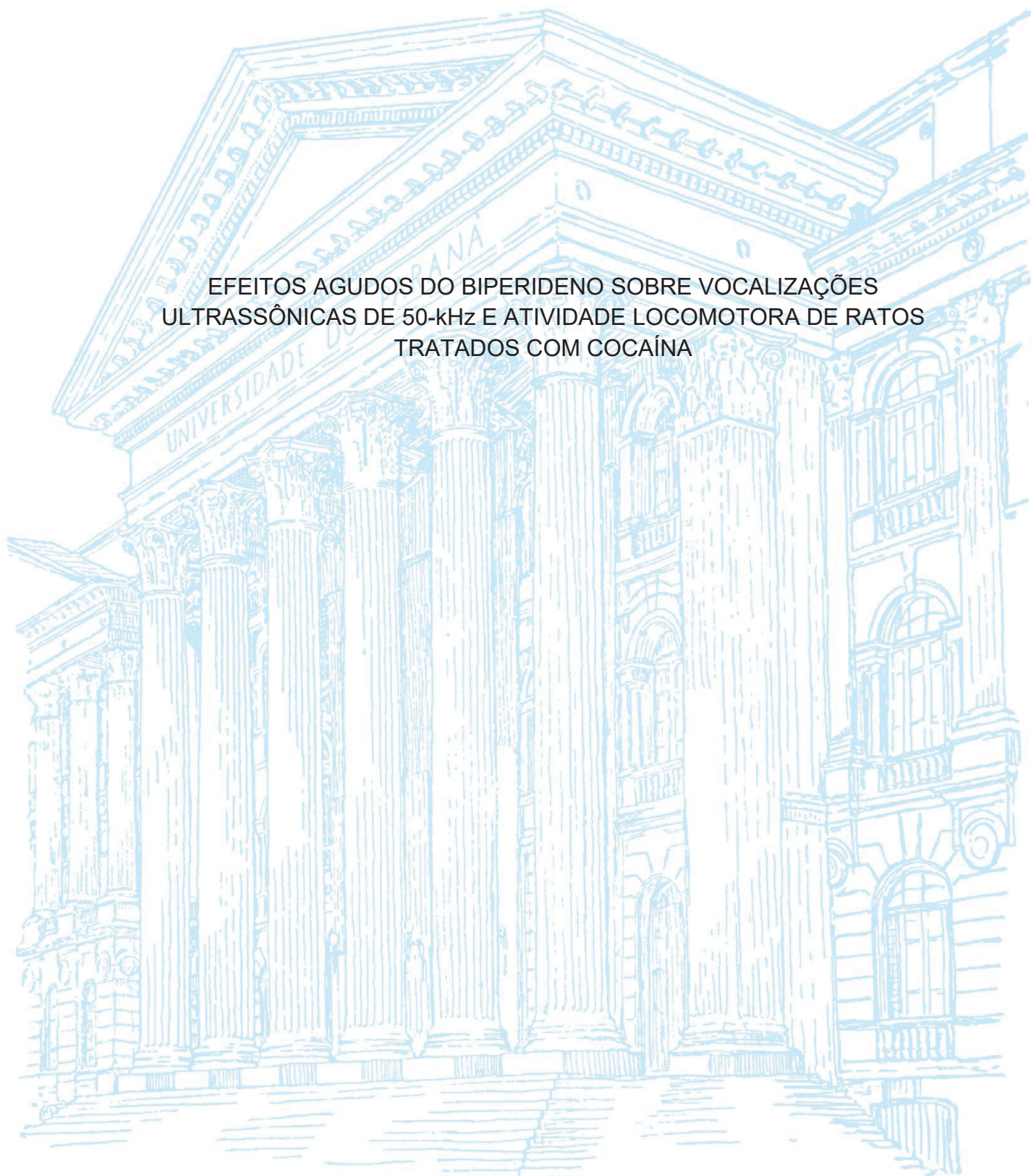


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
THAIS CAROLINE SCHWARTZ SALDANHA

EFEITOS AGUDOS DO BIPERIDENO SOBRE VOCALIZAÇÕES
ULTRASSÔNICAS DE 50-KHz E ATIVIDADE LOCOMOTORA DE RATOS
TRATADOS COM COCAÍNA



CURITIBA
2023

THAIS CAROLINE SCHWARTZ SALDANHA

EFEITOS AGUDOS DO BIPERIDENO SOBRE VOCALIZAÇÕES
ULTRASSÔNICAS DE 50-KHz E ATIVIDADE LOCOMOTORA DE RATOS
TRATADOS COM COCAÍNA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Claudio da Cunha
Coorientador: Dr. José Augusto Pochapski

CURITIBA
2023

Saldanha, Thais Caroline Schwartz

Efeitos do biperideno sobre vocalizações ultrassônicas de 50-kHz e atividade locomotora de ratos tratados com cocaína [recurso eletrônico] / Thais Caroline Schwartz Saldanha – Curitiba, 2023.

1 recurso online: PDF.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2023.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Cunha

Coorientador: Prof. Dr. José Augusto Pochapski

1. Cocaína. 2. Biperideno. 3. Drogas ilícitas. 4. Acetilcolina. I. Cunha, Claudio. II. Pochapski, José Augusto. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 616.8647

Maria da Conceição Kury da Silva CRB 9/1275



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -
40001016038P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **THAIS CAROLINE SCHWARTZ SALDANHA** intitulada: **Efeitos agudos do biperideno sobre vocalizações ultrassônicas de 50-kHz e atividade locomotora de ratos tratados com cocaína**, sob orientação do Prof. Dr. CLAUDIO DA CUNHA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Fevereiro de 2023.

Assinatura Eletrônica

25/04/2023 09:43:50.0

CLAUDIO DA CUNHA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

23/03/2023 11:23:40.0

BRUNO JACSON MARTYNHAK

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

19/04/2023 14:19:52.0

MARIA APARECIDA BARBATO FRAZÃO VITAL

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531990 - Tel: (0xx41)3361-1693 - E-mail: pgfarmacologia@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 266939

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 266939

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a minha família,
a Deus e,
a Nossa Senhora Aparecida.*

AGRADECIMENTO

Agradeço à **Deus** e a **Nossa Senhora** que me guiaram e me acolheram desde o início da minha trajetória.

Agradeço aos meus **pais Nilson e Nilcéia**, que me deram todo o suporte familiar e sempre priorizaram minha educação, e por todo amor incondicional.

Agradeço a minha **vó Azélia**, minha **tia Andréia** e meu **irmão Bruno**, que me apoiaram de todas as formas para que realizasse meus sonhos.

Ao meu **namorado Vinicius** que não deixou me abalar, me deu toda força e suporte, possível e impossível, durante esse período.

Ao meu **amigo Leonardo** que vibrou comigo a cada conquista durante esses anos, que ensaiava as apresentações comigo e me deu todo apoio emocional.

Ao meu **orientador Claudio** por todo conhecimento, dedicação e auxílio.

Ao meu **coorientador José**, que me ensinou tudo desde o início desse período, que esteve presente e que se tornou essencial para esse projeto.

Ao **William** que me ensinou os primeiros passos desse projeto e na Farmacologia.

Ao **Nicolas**, que se tornou um irmão, e que foi essencial durante todo esse período, com todo seu apoio emocional.

Ao **Gabriel** e a **Letícia**, colegas de laboratório, que me auxiliaram durante esse período.

As minhas **amigas Nátaly, Cristina e Isa** que me incentivaram e vibravam comigo.

A minha orientadora do TCC, **profª Rayana**, que apresentou oportunidades na minha carreira profissional até aqui.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro.

Ao **Programa de Pós-graduação em Farmacologia** da **Universidade Federal do Paraná - UFPR** pela oportunidade de realização do meu mestrado.

EPÍGRAFE

*“Você está vivo.
Esse é o seu espetáculo.
Só quem se mostra se encontra.
Por mais que se perca no caminho.”*

Cazuza

RESUMO

A dependência de cocaína é um problema de saúde pública mundial, gerando graves impactos psicossociais e econômicos. Atualmente, nenhum tratamento para transtorno do uso de cocaína é aprovado pelas agências estatais de controle de medicamentos brasileira (ANVISA) ou internacionais (FDA). O biperideno, um antagonista dos receptores muscarínicos M1 e M4, demonstrou em estudos clínicos e pré-clínicos um potencial efeito terapêutico para o tratamento de dependência química de cocaína, diminuindo o reforço e a busca pela droga. Entretanto, os efeitos do biperideno sobre o aumento das vocalizações ultrassônicas (USVs) de 50-kHz e hiperlocomoção induzidas pela cocaína ainda não estão totalmente esclarecidos. Neste estudo testamos os efeitos do biperideno sobre vocalizações ultrassônicas (USVs) de 50 kHz e atividade locomotora induzidos por cocaína em ratos Wistar machos adultos. Os ratos foram divididos em 4 grupos que receberam, respectivamente injeções i.p. de solução salina, biperideno (5 mg/kg), cocaína (10 mg/kg) ou biperideno + cocaína. A administração de cocaína aumentou significativamente o número das USVs de 50 kHz e a atividade locomotora dos animais. A administração de biperideno bloqueou o efeito da cocaína sobre as USVs, mas não bloqueou o efeito de hiperlocomoção induzido pela cocaína. O biperideno *per se* não afetou o número de USVs de 50 kHz, mas causou um aumento na atividade locomotora quando comparado ao grupo salina. Esses resultados sugerem que o biperideno pode atenuar o efeito gratificante, mas não o efeito hiperlocomotor induzido pela cocaína. Outros estudos pré-clínicos são necessários para melhor determinar a natureza dos efeitos da cocaína e outras drogas estimulantes do sistema nervoso central que podem ser bloqueados por drogas antimuscarínicas e seus mecanismos de ação.

Palavras-chave: cocaína; biperideno; drogas de abuso; acetilcolina; vocalização ultrassônica.

ABSTRACT

Cocaine use disorder is a worldwide public health problem, generating serious psychosocial and economic impacts. Currently, no treatment for cocaine use disorder has been approved by controlling agencies including ANVISA and FDA. Biperiden, a M1 and M4 muscarinic receptor antagonist, has been shown in clinical and preclinical studies to decrease the drug seeking and reward effects of cocaine. This results demonstrate the biperiden's potential for the treatment of cocaine use disorder. However, the effects of biperiden over cocaine induced increase of 50-kHz ultrasonic vocalizations (USVs) and hyperlocomotion are still unknown. On this study we tested the effects of biperiden on 50-kHz USVs and locomotor activity induced by cocaine in adult male Wistar rats. Rats were divided into 4 groups that received i.p. injections of saline, biperiden (5 mg/kg), cocaine (10 mg/kg), or biperiden + cocaine. Cocaine administration significantly increased the number of 50 kHz USVs and the animals locomotor activity. Administration of biperiden blocked the effect of cocaine on increasing 50-kHz USVs, but not on locomotor activity. Biperiden per se did not affect the number of 50 kHz USVs but caused an increase in locomotor activity when compared to the saline group. These results suggest that biperiden can attenuate the rewarding, but not the hipercomotor, effect of cocaine. Further preclinical studies are needed to better determine the nature of the effects of cocaine and other central nervous system stimulant drugs that can be blocked by antimuscarinic drugs and their mechanisms of action.

Key words: cocaine; biperiden; drug addiction; acetylcholine; ultrasonic vocalization;.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ESTRUTURA DA COCAÍNA.....	13
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DE UM CÉREBRO DE RATO INDICANDO AS VIAS DE PROJEÇÕES DA DOPAMINA.....	20
FIGURA 3 - MECANISMO DE AÇÃO DA COCAÍNA.....	21
FIGURA 4 - SUBCLASSIFICAÇÕES DAS USV.....	25
FIGURA 5 - DESENHO EXPERIMENTAL	31
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DA ANÁLISE DE POTENCIAIS USVs	32
FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO DE UM RUÍDO CAPTADO PELO SOFTWARE, NÃO CONSIDERADO NA QUANTIFICAÇÃO DAS USV's	32
FIGURA 8 - EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE BIPERIDENO EM USVs DE 50 kHz.....	34
FIGURA 9 - EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE BIPERIDENO NAS SUBCLASSIFICAÇÕES DAS USV's.....	35
FIGURA 10 - EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO BIPERIDENO NA ATIVIDADE LOCOMOTORA DURANTE A SESSÃO DE TESTE: BIPERIDENO NÃO DIMINUI A HIPERLOCOMOÇÃO INDUZIDA POR COCAÍNA.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BIP	-	Biperideno
Biperideno	-	3-piperidino-1-fenil-1-bicicloheptenil-1-propanol
CEP	-	Comitê de Ética em Pesquisa
CHI	-	Interneurônio colinérgico
COC	-	Cocaína
CPP	-	Preferência condicionada de lugar
DAT	-	Transportador de recaptção dopamina
FDA	-	<i>Food and Drug Administration</i>
HCl	-	Ácido clorídrico
MSNs	-	Neurônios espinhosos médios
NAc	-	Núcleo accumbens
NET	-	Transportador de Noradrenalina
SAL	-	Salina
SERT	-	Transportador de Serotonina
TUS	-	Transtornos por Uso de Substâncias
UNODC	-	United Nations Office on Drugs and Crime
USV	-	Vocalizações ultrassônicas
VTA	-	Área tegmental ventral

SUMÁRIO

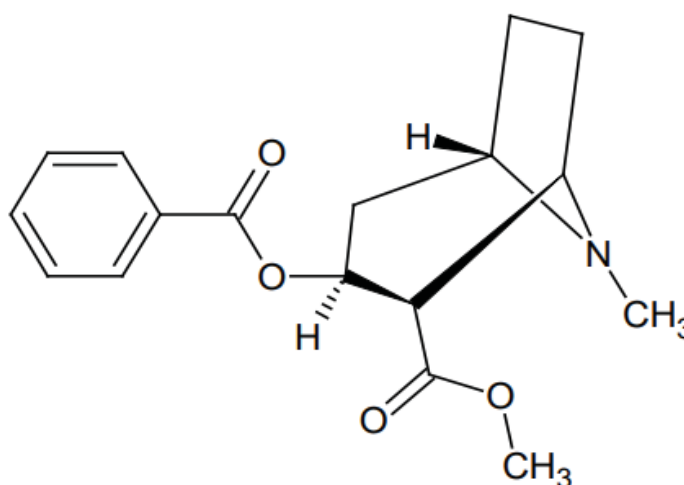
1	INTRODUÇÃO	13
1.1	COCAÍNA	13
1.2	TRANSTORNOS POR USO DE SUBSTÂNCIAS (TUS)	16
1.3	ESTRUTURAS E MECANISMO DE AÇÃO	17
1.4	VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS	23
1.5	BIPERIDENO	25
2	OBJETIVOS	29
2.1	OBJETIVO GERAL	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	ANIMAIS	30
3.2	DROGAS	30
3.3	VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS E ATIVIDADE LOCOMOTORA	31
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4	RESULTADOS	33
4.1	BIPERIDENO BLOQUEIA O AUMENTO DE USVs DE 50 kHz INDUZIDOS PELA COCAÍNA	33
4.2	O BIPERIDENO NÃO DIMINUIU A HIPERLOCOMOÇÃO INDUZIDA PELA COCAÍNA	35
5	DISCUSSÃO	37
5.1	BIPERIDENO E VOCALIZAÇÕES	37
5.2	O BIPERIDENO E LOCOMOÇÃO	40
6	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

1.1 COCAÍNA

O número de dependentes de psicoestimulantes como a cocaína vêm crescendo ao longo dos anos. Com isso, existe um grave problema de saúde pública, gerando grandes impactos econômicos e sociais (UNODC, 2022 KUZENKO *et al.*, 2011). A produção e o mercado ilícito de venda da cocaína também produzem graves impactos à sociedade, gerando custos sociais e econômicos. Acerca disso, há décadas políticas públicas visam a geração de novas abordagem para a possível redução deste fardo à sociedade. Porém, essas políticas têm apresentado efeitos nulos ou ineficientes, tanto no combate do mercado ilegal de produção e venda, quanto no tratamento dos usuários (THAVORNCHAROENSAP *et al.*, 2009; KAMPMAN, 2019). Os últimos relatórios disponibilizados pelo “United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), mostraram que no ano de 2019 cerca de 20 milhões de indivíduos eram usuários de cocaína ao redor do mundo e em 2020 esse número cresceu para cerca de 21 milhões de usuários. A pandemia do COVID 19, onde as restrições de contato e interações sociais foram impostas, deteve potencial de alterar o consumo da droga e o crescimento de usuários (UNODC, 2022).

FIGURA 1 - ESTRUTURA DA COCAÍNA



FONTE: Sanchez (2022).

A cocaína é derivada da planta *Erythroxylum coca*, a qual é uma planta nativa do altiplano andino e norte da Amazônia na América do Sul (CARROLL *et al.*, 1992). O consumo das suas folhas é tradicionalmente realizado por moradores originários dessas regiões devido ao seu efeito energizante. Além disso, pode ser utilizada para aliviar os sintomas de fadiga durante as atividades do dia a dia derivados da elevada altitude nas regiões onde se encontram. Em um contexto histórico, a primeira formulação da cocaína a partir das folhas da *E. coca* foi realizada em 1901, por Richard Martin Willstätter, o qual descobriu a estrutura química alcaloide desta droga (FIGURA 1) (WILLSTÄTTER; BODE, 1903).

A partir do início do século 20, a cocaína teve uma breve utilização clínica, ela foi usada como medicamento para o tratamento de dores de dente, distúrbios gastrointestinais, dores de cabeça e melancolia. A cocaína também era utilizada como anestésico durante procedimentos de cirurgias oftalmológicas. Curiosamente, nesse período foi também desenvolvida a Coca-Cola, bebida que, em seus primórdios, continha na sua formulação extrato de folhas da *E. coca* (PENDERGRAST, 2000).

Concomitantemente ao seu uso clínico, na primeira década do século 20 começaram a ser relatados os primeiros casos do uso recreativo da cocaína. Nos anos que se sucederam, um elevado número de mortes decorrentes de overdoses foi relatado, fato que levou nos Estados Unidos a proibição do uso da cocaína a partir do ano de 1914 (KARCH, 2005). Ademais, a partir do final da década de 1970 foi relatado um enorme crescimento do consumo e dos problemas de saúde pública associados ao uso da cocaína. Em 1980 foi descrito a existência de cerca de 5,8 milhões de usuários de cocaína somente nos Estados Unidos (CORNISH *et al.*, 1996)

Atualmente, o cultivo da *E. coca* e a produção de cocaína se concentram na América do Sul, tendo a Colômbia cerca de 60% da produção total. O maior mercado consumidor de cocaína no mundo está na América do Norte, principalmente nos Estados Unidos, levando a quase 20.000 mortes no país causadas por overdose da droga em 2020. Estudos epidemiológicos com dados coletados em 26 países, em sua grande maioria da Europa, mostram que em 2020, apesar da observação de um aumento na procura pelo tratamento da dependência de cocaína, este não acompanha o número crescente do número de usuários. Quanto ao perfil epidemiológico destes usuários, indivíduos do sexo masculino apresentam-se como a

grande maioria, sendo que 73% destes são homens e 27% são mulheres (UNODC, 2022).

Posteriormente à popularização do abuso da cocaína, houve também a criação de um derivado da cocaína, o crack, em meados do século XX nos EUA. O crack é a base livre obtida a partir da cocaína, possuindo baixo custo e elevado potencial abusivo. O consumo do crack se dá através da via inalatória, a partir do uso de um cachimbo ou objeto similar (BJERK, 2017). O baixo custo e elevado efeito psicoestimulante popularizaram o seu uso, em especial em classes com menor poder aquisitivo. A dependência do uso de crack é atualmente um dos principais desafios de saúde pública em diversas cidades de nosso país (CARROLL *et al.*, 1992; CHITWOOD; RIVERS; INCIARDI, 1996; BJERK, 2017). Apesar de muitos esforços nas pesquisas e de investimento econômico, não há atualmente um fármaco que apresente elevada eficiência no tratamento para dependência de cocaína pelas aprovado pelas agências de controle como o FDA e a ANVISA (BRINK; REE, 2003). Em relação à farmacocinética da cocaína, a forma mais comum do seu consumo ocorre a partir da sua aspiração pelas vias nasais, seguido pela administração intravenosa. Outras formas de consumo da cocaína são através do vapor da fumaça e pela via oral (CARROLL *et al.*, 1992). Após a administração da cocaína via inalação, ela atinge o pico de seu efeito entre 20 e 60 minutos e tem meia-vida de cerca de 75 minutos. O pico do efeito por via intravenosa é em média de 7 minutos e meia-vida de 54 minutos (WILKINSON *et al.*, 1980; BRAIN; COWARD, 1989; BOOTH; WATTERS; CHITWOOD, 1993; CONE, 1995). Em contrapartida, a administração através de mucosas, como intravaginal ou intrarretal, possui pico de ação mais tardio e efeito mais duradouro em comparação com outras vias de administração (LANGE; HILLS, 2001).

As manifestações clínicas do uso agudo da cocaína, são: euforia, aumento da sensação de energia e da socialização e diminuição do apetite e do sono. Já os sintomas de intoxicação aguda incluem o aumento da frequência cardíaca, pupilas dilatadas, tremores, convulsões, acidente vascular cerebral, hipertermia, náusea, vômito, sudorese, rabdomiólise e síndrome coronariana aguda (WILLIAMSON *et al.*, 1997; VOLKOW *et al.*, 2011). Os sintomas do uso crônico da cocaína em relação a comportamentos psicológicos incluem depressão, ansiedade, ataques de pânico,

irritabilidade, paranoia, alucinações, desejo pela droga, hipervigilância, e comportamentos físicos como agitação psicomotora, inquietação, tremores, comportamentos estereotipados, arritmia, infarto agudo do miocárdio (IAM) retardo psicomotor e comportamentos de risco (GAWIN; KLEBER, 1986; RYAN, 2019). Além disso, as alterações nos sistemas de neurotransmissores que estão ligados à recompensa, regulação do humor e à percepção de motivação também se alteram, o que leva a uma maior reatividade a estímulos naturais e redução na motivação (BAUMANN; ROTHMAN, 1998). Os sintomas mais comuns da abstinência da cocaína são sintomas desagradáveis que incluem sintomas de ansiedade, depressão e mania (GUZE, 1994; O'BRIEN, 2006). Além disso, os pacientes experimentam uma vontade, muitas vezes incontrolável de voltar a usar a droga (fissura) que pode levar o usuário a dependência química (WHO, 2016).

1.2 TRANSTORNOS POR USO DE SUBSTÂNCIAS (TUS)

A dependência química, denominada pela 5ª edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais da Sociedade Americana de Psiquiatria (DSM-5), como Transtornos por Uso de Substâncias (TUS), é uma patologia causada pelo consumo de uma substância repetidas vezes, levando o usuário ao desejo intenso pela droga, trazendo consequências comportamentais e físicas (APA, 2013; WHO, 2016). A nível mundial, estima-se que 284 milhões de pessoas utilizaram drogas de abuso em 2019 e que 13,6% desse número estão sofrendo de transtornos prejudiciais ao uso, como dependência e/ou necessitando de tratamento, representando 0,76% da população mundial entre 15 e 65 anos (UNODC, 2022). Indivíduos dependentes podem estar envolvidos em criminalidade, prostituição, violência e a estarem em situações de rua a fim de obter a droga (DUAILIBI; RIBEIRO; LARANJEIRA, 2008). Fatores familiares e ambientais como exposição à substância, ou baixo nível socioeconômico, estão relacionados ao uso mais precoce e fatores herdados estão relacionados com o uso mais tardio. Fatores multigênicos estão envolvidos entre 40-60% no risco de vulnerabilidade de desenvolver a dependência química (VOLKOW; LI, 2005). O início da patologia acontece em uso esporádico, progredindo para uso mais regular até o estágio crônico, trazendo comportamentos relacionados à

dependência (AGRAWAL *et al.*, 2012). A dependência ou adição é o estágio mais grave do TUS e é caracterizado pela perda de controle sobre o consumo. O dependente químico apresenta fissura pela droga e continua usando a droga mesmo que está lhe traga muitos efeitos deletérios (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

A dependência do uso de cocaína (DUC) é mais prevalente em jovens entre 23 e 25 anos de idade. Quanto mais jovem o usuário inicia a utilização da droga, mais provável é que se desenvolverá a dependência. A utilização conjunta com outras drogas ilícitas e transtornos psiquiátricos também favorecem o início ao TUS, sendo a cocaína e o crack de desenvolvimento mais rápido que álcool e maconha, por exemplo (ANTHONY; PETRONIS, 1995). A via de administração também parece afetar na dependência, sendo mais propenso para usuários que utilizam através da via pulmonar em relação à via intranasal (UNODC, 2022).

O potencial de dependência pode estar envolvido em relação ao tempo entre o consumo e a percepção do efeito no usuário, quanto menor for esse efeito, maior a chance de desenvolver a doença (VOLKOW *et al.*, 2000). Wise e Bozarth (1987) supõem que substâncias que levam ao TUS tem potencial de gerar euforia e motivação positiva em seus usuários. A literatura demonstra que as drogas capazes de desenvolver o TUS, ativam a via mesolímbica através de múltiplos mecanismos. Segundo Wise e Rompre (1989) o uso de cocaína e crack, por exemplo, está bastante relacionado ao aumento da concentração dopaminérgica no núcleo accumbens (NAc).

Em relação ao tratamento da dependência de cocaína, não existe nenhum fármaco aprovado pelo FDA ou ANVISA, sendo que as opções disponíveis atuam em sintomas que decorrem da doença, como depressão, ansiedade e transtorno de humor (BUCHHOLZ; SAXON, 2019). O tratamento para essa patologia complexa é um grande desafio para os pesquisadores.

1.3 ESTRUTURAS E MECANISMO DE AÇÃO

Os mecanismos do TUS em geral e do TUC em particular envolvem o NAc junto com os núcleos caudado e putâmen, que são as estruturas constituintes do corpo estriado, sendo o NAc denominado como a porção ventral do estriado. O NAc é

dividido em NAc *core* e NAc *shell*. Neurônios do córtex pré-límbico dorsal, substância negra *pars compacta*, córtex cingulado anterior e córtex perirrinal possuem mais projeções para o NAc *core*, enquanto neurônios do córtex frontal medial, infralímbico, aferentes da área tegmental ventral (VTA, do inglês *ventral tegmental area*), córtex piriforme e pedúnculo dorsal formam mais projeções para o NAc *shell* (DEFRANCE *et al.*, 1985; SESACK *et al.*, 1989; GROENEWEGEN *et al.*, 1999; BOSSERT, J. M. *et al.*, 2012). Em ambas as suas porções, o NAc é majoritariamente (cerca de 95%) composto por neurônios gabaérgicos denominados neurônios espinhosos médios (MSNs, do inglês *medium spiny neurons*). Os MSNs são classificados em duas populações a depender da expressão de receptores dopaminérgicos da família D1 (D1 e D5) ou da família D2 (D2, D3, D4): MSN-D1 e MSN-D2. Além dos MSNs, dentre os neurônios que compõem o NAc estão também interneurônios colinérgicos e interneurônios gabaérgicos (GERFEN; SURMEIER, 2011; TRITSCH; SABATINI, 2012).

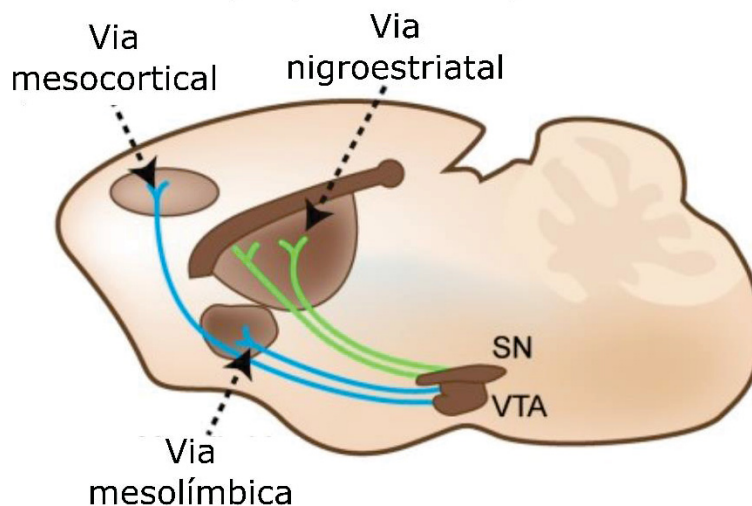
O NAc é responsável por processar estímulos motivacionais e recompensantes e pela expressão dos comportamentos que envolvem diferentes estados motivacionais. Nesse contexto ele têm também um papel importante na aprendizagem relacionada a condicionamento Pavloviano e operante. É através desses mecanismos que se estabelece a busca recreacional ou compulsiva e o consumo de drogas (VOLKOW; WISE; BALER, 2017).

Um dos principais moduladores da atividade do NAc é o neurotransmissor dopamina. A dopamina é uma catecolamina produzida majoritariamente pelos neurônios dopaminérgicos localizados na VTA e na substância negra *pars compacta* (WISE, 2008).

A liberação de dopamina no NAc causa um aumento na motivação para buscar recompensas, incluindo drogas de abuso. Ela está também envolvida na comparação entre o que se espera e o que se obtêm (erro de predição, EP), gerando um sinal de aprendizagem que resulta no aumento dos comportamentos que levaram a uma recompensa inesperada ou maior do que esperado e na extinção de comportamentos aprendidos que não resultaram na recompensa esperada. (SHINER *et al.*, 2012).

Uma das principais vias de projeção dos neurônios dopaminérgicos é a chamada de via mesolímbica que vai da VTA até o NAc e outras áreas do sistema límbico como amígdala e o hipocampo (WISE, 2008). Vários estudos mostraram uma correlação entre a atividade dos neurônios dopaminérgicos e o abuso de drogas. Em seres humanos o aumento da liberação de dopamina no NAc medida por tomografia de emissão de pósitrons (PET) foi associada à sensação de euforia, e de recompensa. Em estudos com ratos a liberação de dopamina foi monitorada através do método de microdiálise e se chegou à mesma conclusão (VOLKOW *et al.*, 1994; LARUELLE *et al.*, 1995; CHIARA; IMPERATO, 1988). Através desses resultados, houve o início de pesquisas com diversas drogas de abuso abordando a liberação de dopamina no NAc e estriado dorsal. Entre as drogas que liberam dopamina no NAc estão o álcool, a cetamina, os opióides e muitas drogas derivadas da cannabis, além das drogas estimulantes como a cocaína e anfetaminas (VOLKOW *et al.*, 1999; 2007; VOLLENWEIDER *et al.*, 2000; BOILEAU *et al.*, 2003; BOSSONG *et al.*, 2009). A dependência foi fortemente associada a dopamina quando um grupo de pesquisadores em 1988, utilizou a técnica de microdiálise para avaliar a liberação de dopamina no NAc de ratos ao entrarem em contato com drogas estimulantes, e perceberam que substâncias que não causam dependência não liberam dopamina no NAc, enquanto as drogas que causam dependência, promovem a liberação de dopamina no NAc (FIGURA 2) (CHIARA; IMPERATO, 1988).

FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DE UM CÉREBRO DE RATO INDICANDO AS VIAS DE PROJEÇÕES DA DOPAMINA



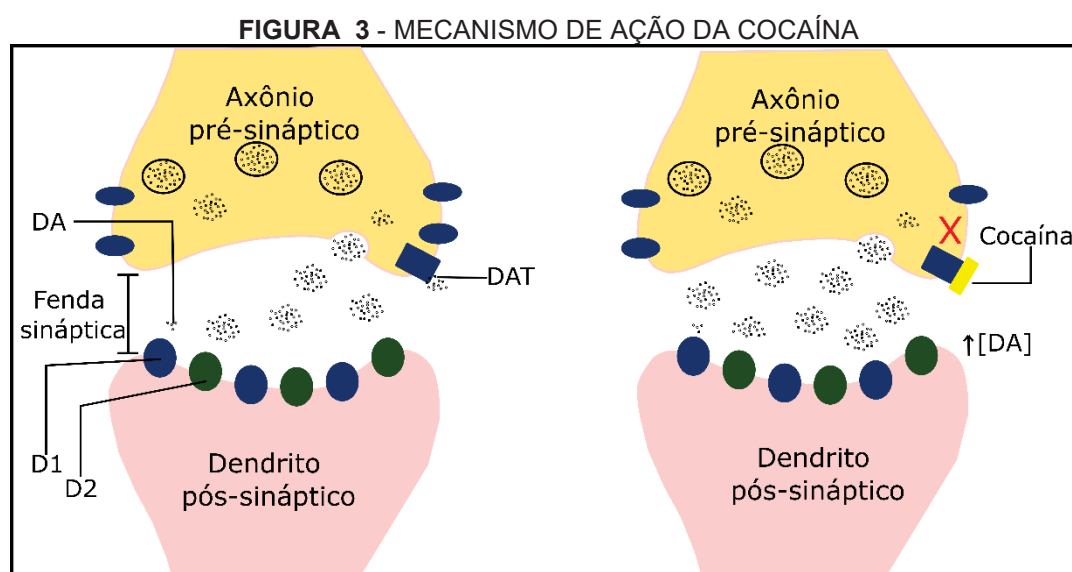
FONTE: Money e Stanwood (2013).

A substância negra pars compacta (SNpc) apresenta projeções para o estriado através de neurônios GABAérgicos. A VTA apresenta projeções para o córtex frontal medial e as áreas límbicas subcorticais.

Após a sua liberação no NAc, a dopamina pode realizar ligações com receptores dopaminérgicos das famílias D1 ou D2. No estriado os MSN que expressam receptores dopaminérgicos da família D1 (MSN-D1) tem papel de iniciar ações motoras através da chamada na via direta (que vai direto para os núcleos de saída dos núcleos da base). Já os MSN que expressa receptores da família D2 (MSN-D2) tem função inibitória sobre a expressão de ações motoras inadequadas através da chamada via indireta. Já os MSN que expressam tanto receptores da família D1 como da família D2 atuam através da via direta (MARCELLINO *et al.*, 2008; MARGOLIS *et al.*, 2014).

O NAc é considerado um dos principais centros do SNC relacionados ao abuso de drogas (NESTLER; CARLEZON JUNIOR, 2006). Em sua maioria as drogas de abuso, através de ações diretas e indiretas aumentam os níveis de dopamina no NAc, sendo a cocaína um exemplo clássico de uma droga de abuso que induz o aumento desses níveis. A cocaína age bloqueando os transportadores de recaptação das monoaminas: serotonina (SERT), noradrenalina (NET) e transportador de recaptação dopamina (DAT) (HAN; GU, 2006). O bloqueio do DAT leva a um aumento na concentração extracelular de dopamina em algumas áreas do cérebro, como no NAc, estriado dorsal e regiões do córtex pré-frontal, diminuindo a capacidade da

recaptação do neurotransmissor, elevando a concentração de dopamina de 3 a 5 vezes em relação a níveis basais (GARRIS; WIGHTMAN 1985; CHURCH; JUSTICE JUNIOR; BYRD, 1987; PETTIT; JUSTICE, 1989; WANG; PENMATSU; GOUAUX, 2015). Desta forma, após o consumo de cocaína os níveis extracelulares de dopamina no NAc são aumentados (FIGURA 3) (MATEO *et al.*, 2005). Além do DAT, a cocaína faz interação com receptores sigma-1, localizados em sua maioria no retículo endoplasmático de neurônios e de oligodendrócitos. Postula-se que os receptores sigma-1 também desempenham funções no abuso de drogas e em distúrbios cognitivos. A cocaína pode também se ligar aos receptores muscarínicos (M1 e M2) (ARAYANAN *et al.*, 2011; KOURRICH. *et al.*, 2012; CARRERA; MEIJLER; JANDA, 2004).



FONTE: Adaptado de Luna (2022).

NOTA: A cocaína gera o bloqueio do transportador de dopamina (DAT) gerando aumento dos níveis sinápticos de dopamina.

Com o uso crônico da cocaína, os MSN's no NAc tendem sofrer adaptações moleculares e funcionais. Estudos prévios descrevem um aumento na expressão de receptores D1 e uma redução na expressão de receptores D2 dependente do uso da cocaína. Foi também observada uma alteração de plasticidade no NAc (DACKIS; O'BRIEN, 2001). Essas mudanças sugerem aumento de sinapses excitatórias em MSN's, devido ao aumento de espinhas dendríticas nesses neurônios após o uso da droga (KIM *et al.*, 2011; RUSSO *et al.*, 2010. Em cenários de abstinência, estudos

relatam um aumento nos receptores D1 nos MSN do NAc, os níveis dopaminérgicos se mostram reduzidos em contextos de recompensa natural (GERFEN; SURMEIER, 2011; TRITSCH; SABATINI, 2012).

Além da importante modulação dopaminérgica sobre a atividade do NAc, estudos demonstram funções da acetilcolina na modulação da atividade do NAc (FLEMING *et al.*, 2022). A acetilcolina exerce importantes funções no sistema nervoso colinérgico e na modulação da liberação de dopamina no NAc. Nesse contexto, atua em efeitos recompensantes de drogas estimulantes, no processo de recompensa e com a aquisição de dependência de cocaína e na recaída (WILLIAMS; ADINOFF, 2008; YOU *et al.*, 2008). A acetilcolina também é responsável pelo aprendizado, controle do tônus muscular e pela formação de memórias, que está correlacionada a estímulos que ativam a memória do uso da droga. Os dois tipos de receptores em que a acetilcolina faz interação são os nicotínicos e muscarínicos (LESTER; ROGERS; BLAHA, 2010).

A modulação colinérgica sobre o sistema dopaminérgico pode ser gerada através de diversos mecanismos envolvendo um sistema complexo. Já é descrito na literatura que os neurônios dopaminérgicos da VTA expressam receptores muscarínicos (M1), podendo assim modular a liberação de dopamina no NAc. Receptores muscarínicos são também expressos nos axônios dos neurônios dopaminérgicos e interneurônios do NAc. Além disso, os receptores nicotínicos estão também expressos em terminais dopaminérgicos e glutamatérgicos no NAc (WILLIAMS; ADINOFF, 2008; YOU *et al.*, 2008; LESTER; ROGERS; BLAHA, 2010). Estudos mostraram que a acetilcolina pode modular a liberação de dopamina no corpo estriado ventral, através dos receptores muscarínicos e nicotínicos presentes em terminais neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo, acarretando a mudança do desejo por drogas de abuso (LESTER, 2008). Interneurônios colinérgicos (CHI's) também estão envolvidos na ativação de dopamina, podendo alterar sua concentração e modificar efeitos de motivação e reforço (LESTER, 2008). A ativação de receptores dopaminérgicos também atua na liberação de acetilcolina (BERTORELLI; CONSOLO, 1990).

Wise *et al* (2008) demonstrou utilizando a técnica de microdiálise que a acetilcolina na VTA possui picos de aumento, gerando um efeito recompensante. Esse

efeito ocorre de forma concomitante com o aumento no fluxo dopaminérgico nas projeções VTA-NAC quando o animal faz a busca pela cocaína, desencadeada pela visualização da alavanca que levaria a entrega de droga em ratos já treinados, e no momento da autoadministração da cocaína que percorreu até o final da sessão de condicionamento operante. Esse aumento de acetilcolina no momento da ingestão da cocaína também ocorre em ratos que não esperam a entrega da droga (YOU *et al.*, 2008). É também por esses mecanismos que a liberação de acetilcolina possa influenciar na liberação de dopamina.

O TUS pode estar envolvido com memórias contextuais, do local onde a droga é consumida ou obtida e essa formação de memória está relacionada com a ação da acetilcolina (YOU *et al.*, 2008). Estímulos condicionados relacionados ao uso da droga podem levar ao desejo incontrolado de consumo (EHRMAN *et al.*, 1992).

1.4 VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS

As vocalizações ultrassônicas (USV) são formas de comunicação entre os roedores e outras espécies animais, sendo emitidas em frequências inaudíveis ao ouvido humano. As USVs se mostram um método eficaz para avaliar estados emocionais relacionados a psicoestimulantes, doenças neurológicas, psiquiátricas e do desenvolvimento neurológico em modelos pré-clínicos utilizando roedores em (YAJIMA; HAYASHI, 1983). Através da composição das USVs em espectrogramas, é possível detectar subtipos de USVs relacionadas a estados motivacionais positivos e negativos. Em ratos adultos, as USVs de 50 kHz são conhecidas como USVs apetitivas e são emitidas quando roedores são expostos a contextos com novidade ou estímulos positivos tais como recompensas naturais como comida palatável, sexo, interações socioafetivas e após a administração de drogas de abuso, como os psicoestimulantes. Estímulos que adquiriram saliência de incentivo por ter sido pareadas com estímulos positivos também evocam a expressão de USVs (BURGDORF; KNUTSON; PANKSEPP, 2000; BURGDORF; PANKSEPP, 2006).

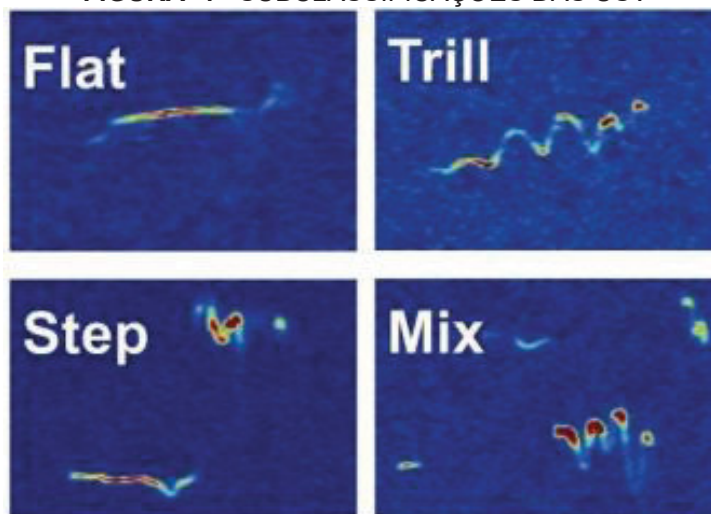
Vocalizações de 50 kHz estão associadas com situações recompensantes, levando a ativação de neurônios dopaminérgicos mediada pelos receptores D1, D2 e parcialmente de D3 no NAc (PEREIRA *et al.*, 2014). Além disso substâncias que

induzem o aumento da neurotransmissão dopaminérgica, como a anfetamina e a cocaína, resultam no aumento imediato do número de USV de 50 kHz (AHRENS *et al.*, 2009; WILLIAMS; UNDIH, 2010; WRIGHT; DOBOSIEWICZ; CLARKE, 2012; SANCHEZ *et al.*, 2022; GUAITA *et al.*, 2018). A acetilcolina recentemente, também mostrou estar envolvida com as USVs apetitivas, Rojas-Carvajás e colaboradores (2022) observaram a diminuição da indução USVs de 50 kHz em ratos machos que receberam escopolamina, um antagonista colinérgico.

Além das USVs de 50 kHz, os roedores emitem frequências na faixa 22 kHz, as quais são chamadas de USVs aversivas pois são emitidas em contextos negativos, como em situações de estresse, dor, presença do predador e abstinência de drogas de abuso (BARROS; MICZEK, 1996; KIM *et al.*, 2013; BERGER *et al.*, 2013). Os neurônios do hipotálamo que expressam receptores colinérgicos também estão envolvidos com a evocação dessas USVs de 22 kHz. A administração intracerebral no hipotálamo de carbacol, um agonista dos receptores muscarínicos da acetilcolina, induziu animais a emitir USVs de 22 kHz (BRUDZYNSKI *et al.*, 1993; BRUDZYNSKI; BARNABI, 1996). Por outro lado, Rojas-Carvajás *et al.* (2022) demonstraram que o antagonista colinérgico, escopolamina aumentou a emissão de chamadas de 22 kHz.

As USVs de 50 kHz possuem classificações de acordo com sua frequência, pico e forma (FIGURA 4). Elas são divididas em simples (*flat*) e de frequência modulada (*step*, *trill* e *mix*). As USVs *flat* estão na faixa de frequência de 50 kHz com variabilidade menor ou igual a 5 kHz. Elas expressam um estado emocional positivo relacionado a situações de contato e comunicação social. O espectrograma das vocalizações *trill* possuem uma aparência de zig-zag ou ondulada com dois ou mais picos com frequência média em torno de 50 kHz, mas que varia em mais de 5 kHz. Elas são emitidas quando os animais são submetidos a emoções intensas, as vocalizações do tipo *step*, de frequência modulada, demonstram estados de alta motivação e gratificação, representando uma vocalização *flat* com sobreposição, sendo está com mais de 5 kHz em frequência. A classificação do tipo *mix* não se enquadra na forma das categorias anteriores (PEREIRA *et al.*, 2014; WENDLER *et al.*, 2019).

FIGURA 4 - SUBCLASSIFICAÇÕES DAS USV



FONTE: Luna (2022).

NOTA: Espectrogramas típicos de USVs apetitivas que estão na faixa de 50 kHz.

1.5 BIPERIDENO

Com a grande necessidade de buscar tratamentos eficazes para dependência química, o fármaco biperideno vem sendo estudado e está apresentando resultados interessantes em relação ao tratamento de dependência de drogas de abuso, podendo assim ser um fármaco com potencial para o tratamento desta patologia (RAMOS *et al.*, 2012; ZACARIAS *et al.*, 2012).

O biperideno, comercialmente chamado de Cinetol® ou Akineton®, é um medicamento que foi previamente utilizado no tratamento da doença de Parkinson buscando a redução dos tremores apresentados por estes pacientes (KATAYAMA *et al.*, 1990). Essa doença é caracterizada pela morte de neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars* induzindo a redução dos níveis de dopamina no estriado. O uso do biperideno no tratamento controle dos sintomas extrapiramidais (OGINO *et al.*, 2011). Entretanto, a sua utilização está associada a alguns efeitos adversos, tais como: fraqueza, sonolência, visão turva, constipação, retenção urinária e boca seca. Pacientes idosos apresentam efeitos adversos de forma mais comum, e, além das condições citadas anteriormente, também mostram alterações cognitivas e de equilíbrio alterado. Estudos recentes também ressaltam o comprometimento de memória de trabalho, memória verbal, e atenção (CARNAHAN *et al.*, 2004; HORI *et al.*, 2005; BAKKER *et al.*, 2021). Medicamentos anticolinérgicos retirados de forma

abrupta podem levar ao aumento dos sintomas da doença de Parkinson (GOETZ *et al.*, 1981).

O biperideno é um fármaco antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos M1 e M4. De maneira geral, esses receptores possuem papéis essenciais no sistema nervoso central em funções cognitivas de memória, atenção e aprendizado, explicando os efeitos adversos dos fármacos anticolinérgicos (CARNAHAN *et al.*, 2004; HORI *et al.*, 2005). Os receptores muscarínicos M1 e M4 são predominantemente expressos no estriado dorsal e NAc. Nestas estruturas, os receptores M1 estão presentes principalmente em MSN's e são acoplados a proteína G excitatória, levando, portanto, a um aumento de AMPc e ativação da proteína quinase A (PKA) (KATAYAMA *et al.*, 1990; HIKIDA *et al.*, 2003; WILLIAMS; ADINOFF, 2008). Já o receptor muscarínico M4 está acoplado a proteína G inibitória, causando um efeito oposto ao descrito acima para os receptores M1. O receptor M4 é expresso principalmente em interneurônios colinérgicos (CHIs que constituem de 2 a 5% de neurônios do estriado dorsal e NAc (TATENO; ROBINSON, 2011; HIKIDA *et al.*, 2003; WILLIAMS; ADINOFF, 2008).

Portanto a interação dos sistemas colinérgicos e dopaminérgico no NAc tem um papel importante nos TUS, aprendizado, formação de memória e comportamentos sociais. O biperideno mostra resultados promissores no tratamento da patologia, por possível ação nesses sistemas (BERTORELLI; CONSOLO, 1990; LESTER, 2008).

É descrito na literatura que a ativação dos receptores colinérgicos na VTA também pode interferir na liberação de dopamina no mesencéfalo, agindo diretamente no efeito motivacional gerado pelo consumo de drogas de abuso (HIKIDA *et al.*, 2003; MORRIS *et al.*, 2004).

Devido a dados que ressaltam que o sistema colinérgico é capaz de ter ação sobre o sistema dopaminérgico e interferir no seu mecanismo, e que assim, demonstram efeitos no abuso de drogas, conseqüentemente o biperideno foi iniciado em experimentos visando efeitos na dependência química (RAMOS *et al.*, 2012; ZACARIAS *et al.*, 2012). Através de um estudo clínico realizado em homens, foi observado que o biperideno reduziu a compulsão/fissura de usuários dependentes de cocaína e crack. Os participantes do experimento foram tratados com biperideno na dose de 6 mg/dia por 8 semanas e mostraram redução no consumo e maior adesão

ao tratamento (DIECKMANN *et al.*, 2014). Outro estudo concluiu que o biperideno na dose de 10 mg/kg foi capaz de bloquear a preferência de local condicionada de lugar (CPP) associado à cocaína ou ao etanol em camundongos. De acordo com os autores, o biperideno pode ter realizado uma desassociação da droga ao local ou prejudicado a associação da memória (RAMOS *et al.*, 2012; ZACARIAS *et al.*, 2012). Um trabalho mais recente concluiu que o biperideno nas doses de 1, 5 e 10 mg/Kg reduziu a preferência de local condicionada de lugar de etanol (PALOMBO, 2022). Em outro estudo com o modelo de autoadministração operante, observou que o biperideno foi capaz de reduzir comportamentos de busca pelo etanol em ratos (LIRA, 2020 *apud* PALOMBO, 2022). O biperideno também aumentou a sinalização de dopamina no NAc em camundongos que se submeteram a testes com álcool (PALOMBO *et al.*, 2021). Os autores sugerem que o biperideno pode ser eficaz na terapia de reposição do álcool, pois ele mantém a ativação neuronal do NAc, dessa forma, reduzindo o efeito recompensante do etanol, sendo o mesmo mecanismo de recompensa da cocaína e outras drogas de abuso, ao causar o aumento de dopamina no NAc (PALOMBO *et al.*, 2021). Outro estudo mostrou que a sensibilização do efeito da cocaína em ratos foi aumentada pelo biperideno (ITZHAK; MARTIN, 2000; RAMOS *et al.*, 2012; ROJAS-CARVAJAL; CHINCHILLA-ALVARADO; BRENES, 2022).

Apesar de relatos de casos de uso abusivo de biperideno em humanos, na dose de 10mg/kg ele não mostrou induziu CPP em ratos. Esse estudo sugere que o biperideno *per se* não causaria dependência (ALLAHVERDIYEV; NURTEN; ENGINAR, 2011; MARTINEZ, 2012).

Existem vários estudos que mostraram o efeito prejudicial do biperideno na memória, principalmente na memória de longo prazo. Dessa forma, o medicamento poderia afetar a memória associativa causada, por exemplo, pelo consumo do álcool, diminuindo a motivação pela busca do etanol e outras drogas de abuso (PALOMBO *et al.*, 2021). Outra possibilidade, seria uma modulação colinérgica sobre o sistema dopaminérgico que interfere no sistema operante, pois o condicionamento operante está envolvido com o abuso de drogas por atuar no reforço positivo e negativo (ROLDÁN *et al.*, 1997). Os efeitos já conhecidos de antagonistas de receptores M1 na consolidação da memória podem explicar esse resultado, levando a aquisição de aprendizagem e de memória reduzida (FORNARI; MOREIRA; OLIVEIRA, 2000;

MIRANDA; BERMÚDEZ-RATTONI, 2007). Por exemplo, aquisição e a expressão de memória aversiva já se mostrou prejudicada com uso de anticolinérgicos (FORNARI; MOREIRA; OLIVEIRA, 2000; SOARES; FORNARI; OLIVEIRA, 2006).

Além do biperideno, outros medicamentos anticolinérgicos já foram testados em estudos de dependência de cocaína. Os antagonistas dos receptores muscarínicos atropina e escopolamina foram administrados em macacos *Rhesus* que participaram de um experimento de auto-administração de cocaína. Após receberem os anticolinérgicos, os animais diminuíram o comportamento de autoadministração (ESMAEILI; BASSEDA; DEHPOUR, 2008).

Dackis e Gold (1985) descreveram que o tratamento com um antagonista colinérgico poderia atuar na regulação da acetilcolina e da dopamina, que provavelmente causaria redução da fissura por drogas de abuso. Isso se justificaria pelo fármaco atuar sobre a baixa concentração de dopamina que ocorre após uso crônico da droga e também por prejudicar a formação de memórias associadas à atribuição de saliência de incentivo a estímulos pareados com a droga.

Apesar da existência de todos esses estudos acima citados, nenhum estudo anterior avaliou o efeito do biperideno sobre as USV de ratos tratados com cocaína. Esse experimento é importante porque as USVs apetitivas são um modelo de um estado motivacional positivo. Estaremos, portanto, testando em ratos se o biperideno é capaz de bloquear o estado motivacional positivo associado às USVs de 50 kHz que é evocado pela cocaína. Como a cocaína também causa um aumento da atividade locomotora, estaremos também estudando esse efeito como um controle positivo. Assim sendo, hipotetizamos que a administração do biperideno levaria atenuação dos efeitos causados pelo uso agudo da cocaína em ratos, no caso, o aumento exacerbado da atividade locomotora e a emissão de USVs de 50 kHz.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo buscou avaliar em ratos os efeitos agudos da administração de biperideno sobre os efeitos da cocaína sobre a emissão de USVs de 50 kHz e na atividade locomotora.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os efeitos do biperideno na emissão de USVs de 50 kHz, em ratos tratados com cocaína;
- Analisar as subclassificações das USVs de 50 kHz em ratos que foram administrados com cocaína e tratados com biperideno;
- Analisar a atividade locomotora em animais que foram administrados com cocaína e tratados com biperideno.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 48 ratos *Wistar* machos adultos provenientes do biotério da Universidade Federal do Paraná. Eles foram alojados em grupos de até 4 em gaiolas de polipropileno (41 cm × 34 cm × 16 cm) com cama de serragem e sob um ciclo claro/escuro de 12 h/12 h (luzes acesas às 7h00) e temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Comida e água estavam disponíveis sem restrição. Ao final do experimento, os ratos foram eutanasiados com uma overdose de hidrato de cloral. Todos os testes foram realizados após 1 hora de habituação dos animais na sala teste. O projeto está de acordo com a legislação brasileira (Diretrizes para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR) pelo protocolo de número 1452.

3.2 DROGAS

A cocaína HCl foi doada pela Delegacia de Polícia Federal de Curitiba (processo nº 5016610-91.2019.4.04.7000/PR) e o biperideno HCl foi adquirido da Cristália - Indústria Farmacêutica. Todos os produtos e outros químicos utilizados foram adquiridos da Sigma Aldrich (St Louis, MO). Através da ressonância magnética nuclear, a cocaína HCl foi quantificada e possuía pureza de 98%. A droga foi dissolvida em solução salina (0,9% p/v) na concentração de 10 mg/mL e o biperideno foi dissolvido em solução salina na concentração de 5 mg/mL. Cada mL do biperideno contém 5mg de lactato de biperideno e 1mL de veículo estéril q,s,p, da marca Cristália. Os fármacos e o veículo (solução salina) foram administrados via i.p em sequência, a segunda injeção imediatamente após a primeira. A FIGURA 5 esquematiza o desenho experimental utilizado no desenvolvimento dos experimentos.

FIGURA 5 - DESENHO EXPERIMENTAL



FONTE: A autora (2022).

O experimento teve duração de 5 dias. Nos 3 primeiros dias foram realizados procedimentos de habituação aos animais, o quarto dia consistiu em realizar a baseline e finalizando no dia do teste. No dia do teste os animais receberam administrações via i.p seguidas imediatamente uma após a outra.

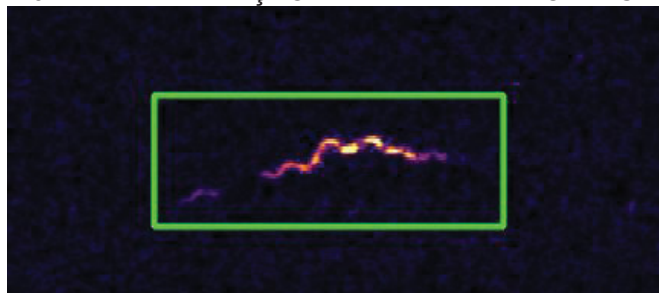
3.3 VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS E ATIVIDADE LOCOMOTORA

Foram realizados 3 dias de habituação e familiarização aos animais. Os registros das USVs e da atividade locomotora foram realizados em duas sessões de 40 min, aqui chamadas de sessão baseline e sessão teste com 24 h de intervalo entre elas. No dia de baseline os ratos passaram por uma triagem, onde os animais que vocalizaram pouco (menos de 20 vocalizações nos minutos iniciais) e, os que vocalizaram muito (mais de 70 vocalizações por minuto) foram excluídos do experimento.

As drogas foram administradas imediatamente antes da sessão de teste. Nesta sessão (tal como na sessão de baseline), cada rato foi colocado em uma caixa de acrílico (40 × 40 × 40 cm) com cama de serragem fresca no chão, com luminosidade controlada em 4 lux. As USVs foram registradas com um microfone (UltraSoundGate Condenser Microphone, CM16; Avisoft Bioacoustics, Berlim, Alemanha) colocado 25 cm acima do centro da caixa, controlado pelo *software* Avisoft Recorder 2.7. As USVs de 50 kHz foram identificadas utilizando o *software* DeepSqueak 2.6.1 (COFFEY; MARX; NEUMAIER, 2019) e foram aceitas ou rejeitadas manualmente. As USVs de 50 kHz foram classificadas em quatro subtipos: *flat*, *trill*, *step* e *mix*, de acordo com Pereira *et al.* (2014). Os vídeos foram gravados acima do aparato durante essas sessões para avaliar a atividade locomotora utilizando o

software Anymaze 2.0, e para a análise automatizada com o *software* EthoVision® XT (Noldus, Holanda). A FIGURA 6 e FIGURA 7 mostram um exemplo de uma vocalização classificada como uma USV de 50 kHz e de um ruído captados pelo *software*.

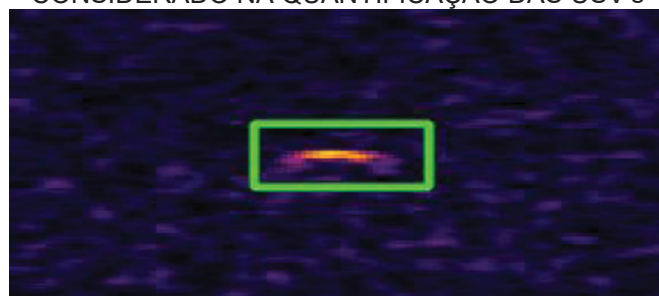
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DA ANÁLISE DE POTENCIAIS USVs



FONTE: A autora (2022).

As USVs consideradas neste estudo permaneceram na faixa de frequência de 50 kHz, e no mínimo de 0,5 milissegundos, analisadas pelo software DeepSqueak.

FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO DE UM RUÍDO CAPTADO PELO SOFTWARE, NÃO CONSIDERADO NA QUANTIFICAÇÃO DAS USV's



FONTE: A autora (2022).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente os dados foram analisados para a avaliação da normalidade dos mesmos a partir dos testes de D'Agostino & Pearson de distribuição normal e em seguida pelo teste de Barlett para a avaliação de homocedastia. Dados que não passaram pelos testes de normalidade e homocedastia foram transformados em $Y = \log(Y+2)$ e analisados por ANOVA de uma via ou de medidas repetidas (RM-ANOVA), seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey. Os dados que apresentaram distribuição normal, mas não passaram no teste de homocedastia foram analisados por Welsh ANOVA seguido do teste de Tamhane. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 BIPERIDENO BLOQUEIA O AUMENTO DE USVs DE 50 kHz INDUZIDOS PELA COCAÍNA

As USVs foram registradas durante as sessões teste e de baseline. Durante a sessão inicial, com ausência de tratamento medicamentoso, nenhuma diferença significativa entre os grupos foi observada no número total de USVs de 50 kHz (FIGURA 8A; $F(3, 44) = 1,80$; $P > 0,05$).

No entanto, durante a sessão de teste, os ratos que receberam administração de cocaína, aumentaram significativamente o número de USVs de 50 kHz quando comparados ao grupo salina, como esperado, e quando comparado ao grupo tratado com biperideno (FIGURA 8B; $W(3, 44) = 12,83$; $P < 0,001$ Welch ANOVA; teste post hoc de Tamhane, $P < 0,001$ e $P < 0,01$, respectivamente).

Curiosamente, a administração de biperideno bloqueou o aumento no número total de USVs de 50 kHz quando comparados aos grupos expostos à cocaína ($P < 0,05$; teste post hoc de Tamhane). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos biperideno e cocaína/biperideno quando comparados aos grupos expostos a solução salina ($P > 0,05$).

Em seguida, análises das USVs durante o decorrer da sessão de teste usando ANOVA de duas vias de medidas repetidas, demonstraram um efeito principal significativo de tempo (FIGURA 8C, $F(3, 44) = 9,47$; $P < 0,001$), e também um efeito principal do tratamento ($P < 0,001$), porém não observamos uma interação significativa entre esses fatores ($P > 0,05$). Após análises de comparações múltiplas demonstramos que a administração de biperideno bloqueou o aumento da emissão de USVs de 50kHz induzido pela cocaína no decorrer da sessão de teste ($P < 0,05$, teste post hoc de Tukey).

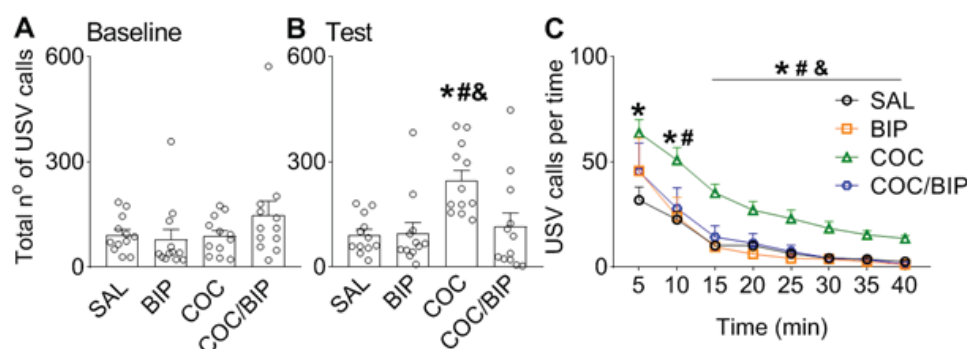


FIGURA 8 - EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE BIPERIDENO EM USVs DE 50 kHz. As chamadas de USV foram gravadas durante 40 minutos no dia baseline e sessão de teste. Os dados dos sujeitos individuais são representados por círculos abertos. **A.** Número total de USV de 50 kHz durante a sessão de baseline. **B.** Número total de USV de 50 kHz durante a sessão teste. **C.** Chamadas USV de 50 kHz no decorrer da sessão de teste. As barras representam a média \pm SEM. * $p < 0,05$ comparado os grupos salina e cocaína. # $p < 0,05$ comparado os grupos biperideno e cocaína. & $p < 0,05$ comparado os grupos cocaína/biperideno e cocaína no teste de Tamhane após Welch ANOVA (**A, B**) ou ANOVA de 2-vias de medidas repetidas (RM) seguida do teste de post hoc de Tukey (**C**). Salina (SAL) $n = 12$, biperideno (BIP) $n = 12$, cocaína (COC) $n = 12$, cocaína/biperideno (COC/BIP) $n = 12$ por grupo.

Depois de demonstrar o efeito do biperideno em bloquear as chamadas de 50 kHz induzido por cocaína, em seguida, testamos se esse efeito estava relacionado a uma subclassificação de USVs de 50 kHz. Após a classificação das USVs, as análises de Welch ANOVA não demonstraram efeitos da cocaína no número total de USVs *flat* e *step* (FIGURA 9A e 9B, respectivamente; $P > 0,05$). No entanto, uma diferença significativa foi observada no número total de USVs *trill* de 50 kHz (FIGURA 9C; $P < 0,05$ após ANOVA de uma via). O teste *post hoc* de Tukey demonstrou que a administração de cocaína aumentou o número de USVs *trill* quando comparado aos grupos salina e biperideno ($P < 0,05$) e, curiosamente, o biperideno bloqueou esse efeito induzido pela cocaína ($P < 0,05$). Da mesma forma, após a análise de Welch ANOVA, observamos uma diferença significativa nas chamadas USVs *mix* (FIGURA 9D, $P < 0,05$).

O teste *post hoc* de Tamhane demonstrou que a cocaína aumentou o número de mix USV 50kHz mix quando comparada aos grupos salina e biperideno, e esse efeito foi bloqueado em ratos que receberam cocaína juntamente ao biperideno ($P < 0,05$). Além disso, a administração de biperideno por se diminuiu o número de USVs *mix* quando comparado aos grupos de solução salina ($P < 0,05$).

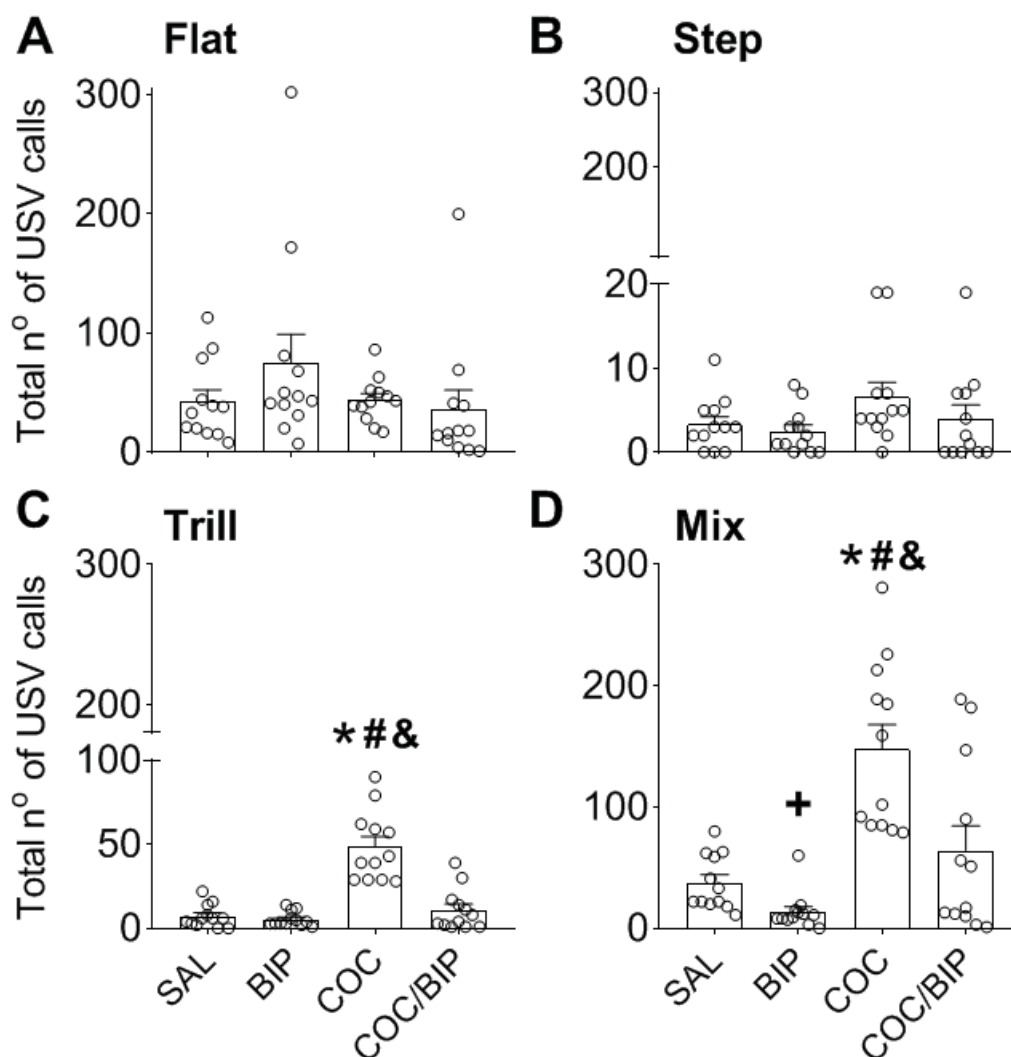


FIGURA 9 - EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE BIPERIDENO NAS SUBCLASSIFICAÇÕES DAS USV's. O biperideno bloqueou o aumento induzido pela cocaína de classificações trill e mix de USVs de 50 kHz. Chamadas USV gravadas durante a sessão de teste foram classificadas em 4 subgrupos. **A.** Chamadas de USV tipo flat. **B.** Chamadas de USV tipo step. **C.** Chamadas de USV tipo trill. **D.** Chamadas de USV tipo Mix. As barras representam a média \pm SEM. Os dados dos sujeitos individuais são representados por círculos abertos. * $p < 0,05$ comparado os grupos salina e cocaína. # $p < 0,05$ comparado os grupos biperideno e cocaína. & $p < 0,05$ comparado os grupos cocaína/biperideno e cocaína. + $p < 0,05$ comparado os grupos salina e biperideno. Teste de Tamhane após Welch ANOVA. Salina (SAL) $n = 12$, biperideno (BIP) $n = 12$, cocaína (COC) $n = 12$, cocaína/biperideno (COC/BIP) $n = 12$ por grupo.

4.2 O BIPERIDENO NÃO DIMINUIU A HIPERLOCOMOÇÃO INDUZIDA PELA COCAÍNA

Os efeitos do biperideno sobre a hiperlocomoção induzida por cocaína também foram avaliados (FIGURA 10). Como esperado, a administração de cocaína aumentou a distância total percorrida quando comparado ao grupo salina (FIGURA 10A, $W(3, 44) = 7,87$ $P < 0,05$,

Welch ANOVA. $P < 0,05$ após o teste post hoc de Tamhane). A administração de biperideno induziu um aumento na atividade locomotora quando comparado ao grupo salina (FIGURA 10A, $P < 0,05$, Welch ANOVA. $P < 0,05$ após o teste post hoc de Tamhane). Também como esperado, a administração de cocaína aumentou a distância total percorrida quando comparada ao grupo salina (FIGURA 10A., $P < 0,05$). Curiosamente, o biperideno não bloqueou a hiperlocomoção induzida pela cocaína ($P < 0,05$). Como o biperideno apresentou um aumento na atividade locomotora, poderia-se esperar que a administração de biperideno possa produzir um efeito sinérgico na hiperlocomoção induzida por cocaína. No entanto, não foi observada diferença significativa entre os grupos cocaína e biperideno/cocaína ($P > 0,05$). A atividade locomotora também foi analisada ao longo da sessão de teste (FIGURA 10B). A análise conduzida usando ANOVA de duas vias de medidas repetidas demonstrou um efeito principal significativo da sessão ($F(3, 44) = 34,68$; $P < 0,001$) e um efeito principal significativo do tratamento ($P < 0,001$), mas sem interação entre esses fatores ($P > 0,05$). Análises utilizando o teste de post hoc de Tukey demonstraram um aumento da atividade locomotora em diferentes momentos da sessão de teste promovidos pela administração de biperideno, cocaína ou pela co-administração de biperideno e cocaína ($P < 0,05$).

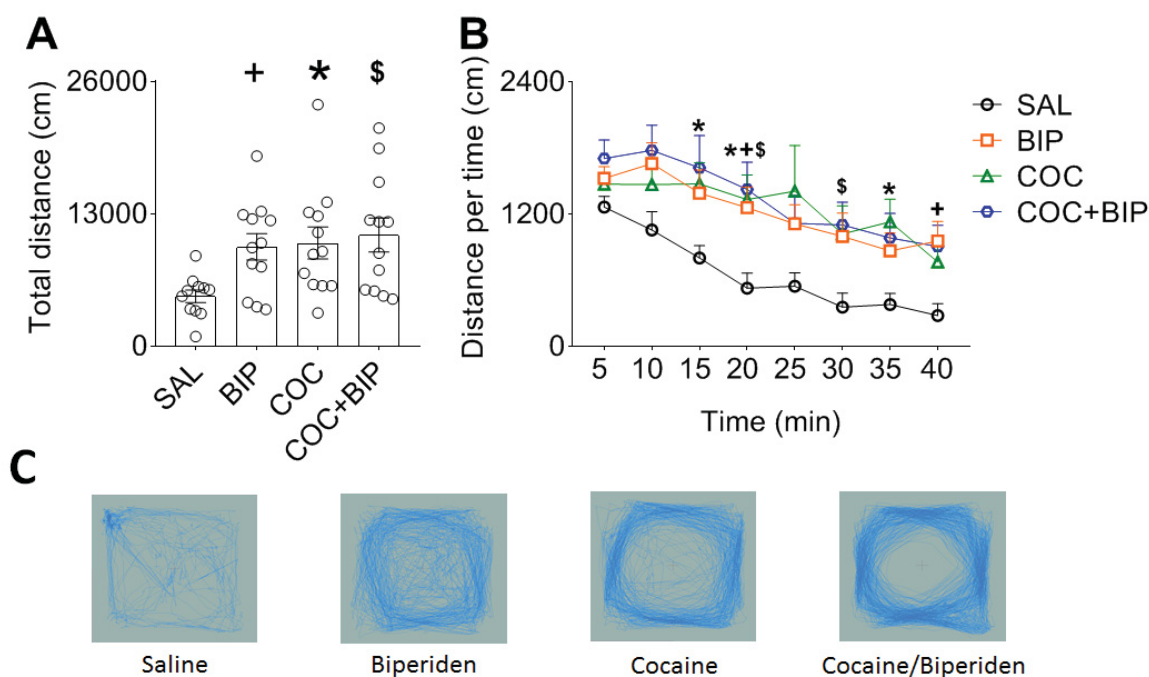


FIGURA 10 - EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO BIPERIDENO NA ATIVIDADE LOCOMOTORA DURANTE A SESSÃO DE TESTE: BIPERIDENO NÃO DIMINUI A HIPERLOCOMOÇÃO INDUZIDA POR COCAÍNA. Os dados dos sujeitos individuais são representados por círculos abertos. **A.** Distância total percorrida durante a sessão de teste. **B.** Distância percorrida durante a sessão de teste. Os dados da atividade locomotora foram analisados e apresentados em blocos de tempo de 5 minutos. **C.** Representação ilustrativa da distância total percorrida durante a sessão de teste. As barras representam a média \pm SEM. + $p < 0,05$ comparado os grupos salina e biperideno. * $p < 0,05$ comparado os grupos salina e cocaína. \$ $p < 0,05$ comparado os grupos salina e cocaína/biperideno. no teste de Tamhane após Welch ANOVA (**A**) ou ANOVA de 2-vias de medidas repetidas (RM) seguida do teste de posthoc de Tukey (**B**). Salina (SAL) $n = 12$, biperideno (BIP) $n = 12$, cocaína (COC) $n = 12$, cocaína/biperideno (COC/BIP) $n = 12$ por grupo.

5 DISCUSSÃO

5.1 BIPERIDENO E VOCALIZAÇÕES

Ainda não se sabe exatamente os mecanismos envolvidos para o biperideno realizar o bloqueio das USVs de 50 kHz quando administrado simultaneamente com cocaína em ratos, mas existem estudos que demonstram que a interação do sistema colinérgico sobre o sistema dopaminérgico realiza modulações dos níveis de dopamina no NAc e outras regiões do estriado, o que poderia explicar nossos resultados, devido emissão das vocalizações ultrassônicas também estarem relacionadas a esses sistemas (TZAVARA *et al.* 2004; YOU *et al.*, 2008; XU *et al.*,

1989; SOFUOGLU; MOONEY, 2009; PEREIRA *et al.*, 2014). É descrito na literatura que drogas que resultam em uma diminuição nos níveis de dopamina no NAc também foram capazes de diminuir USVs de 50 kHz induzidas por psicoestimulantes (GUAITA *et al.*, 2018; SANCHEZ *et al.*, 2022).

A escopolamina, um antagonista dos receptores muscarínicos não seletivo, também mostrou diminuir as vocalizações de 50 kHz em protocolo de campo aberto (ROJAS-CARVAJAL; CHINCHILLA-ALVARADO; BRENES, 2022). Wang e colaboradores (2008) buscaram entender quais receptores muscarínicos dentre M2, M4 e M5, seriam dependentes para indução de USVs apetitivas de 50 kHz em um contexto socioafetivo. Em ratos machos observaram que essas vocalizações eram dependentes dos receptores M2 e M5, e não de receptores M4 (WANG *et al.*, 2008), nesse contexto, nossos resultados com o biperideno em bloquear o efeito da quantidade de vocalizações, quando administrado juntamente com a cocaína, pode estar mais relacionado ao seu efeito antagonista no receptor M1 do que seu efeito em M4. O receptor M1 está expresso na VTA, e este, pode mediar a liberação de dopamina no NAc através da sua ligação com a acetilcolina (WILLIAMS; ADINOFF, 2008; YOU *et al.*, 2008; LESTER; ROGERS; BLAHA, 2010). Estudos anteriores demonstram que antagonistas dos receptores muscarínicos podem induzir uma diminuição na liberação de dopamina no NAc, e uma diminuição na atividade geral dos neurônios NAc (CRESPO *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2002). Hikida e colaboradores (2001), utilizaram uma toxina para lesionar neurônios colinérgicos no NAc em camundongos, observaram um aumento da sensibilização e preferência condicionada de lugar para cocaína. Nos núcleos laterodorsal e pedunculopontino tegmental, os neurônios colinérgicos de projeção também realizam modulação de neurônios dopaminérgicos na VTA (LESTER *et al.*, 2010)

Xu e colaboradores (1989) realizaram um experimento em ratos onde demonstraram que o antagonismo ou a diminuição dos receptores M1 poderia reduzir a liberação de dopamina no estriado, nesse mesmo contexto, foi visto que o antagonismo dos receptores M1 diminuíram a atividade de MSNs (CARRILLO-REID *et al.*, 2009). Carrigan e Dykstra (2007) utilizaram ratos *knockout* para o gene dos receptores M1, onde os animais apresentaram a preferência de lugar condicionada reduzida para cocaína e morfina.

Entretanto, estudos anteriores observaram que o uso de agonistas M1 levam a redução da autoadministração de cocaína, além de induzir o aumento dos efeitos da mesma (THOMSEN *et al.*, 2010). A modulação colinérgica sobre o sistema dopaminérgico é complexa, sendo que existem receptores e atividades modulatórias diretas e indiretas envolvidas nesses processos (EBIHARA *et al.*, 2013; THRELFELL *et al.*, 2012).

Estudos prévios onde o gene M4 foi deletado em ratos observou-se o aumento da liberação de dopamina no NAc (TZAVARA *et al.* 2004). Pesquisadores demonstram que ativação do receptor M4 causa uma diminuição na liberação de dopamina no NAc (SOFUOGLU; MOONEY, 2009). É visto que os CHI's, onde receptores M4 são expressos, realizam atividade modulatória na concentração de dopamina no NAc (LESTER *et al.*, 2008). Foi relatado que os CHI's no NAc também respondem à autoadministração de cocaína (MARK *et al.*, 1999; HIKIDA *et al.*, 2003; QUARTA *et al.*, 2007; ADROVER *et al.*, 2020).

A investigação relacionada a modulação colinérgica muscarínica sobre o sistema dopaminérgico mostra possibilidades de mecanismos que envolvem essa ação. A expressão dos receptores muscarínicos nos MSNs D1 e D2 também pode agir modulando a concentração dopaminérgica (IKEMOTO *et al.*, 2003; GRASING, 2016), nesse contexto, é visto na literatura que a ativação do receptor D1 pode aumentar a liberação de acetilcolina no NAc, enquanto a ativação do receptor D2 reduz este efeito (YEOMANS; BAPTISTA, 1997; IKEMOTO, 2003; YOU *et al.*, 2008). Lobo e colaboradores (2010) realizaram um estudo onde mostraram que a ativação optogenética de MSN no NAc que expressam receptores D1 aumentou a preferência condicionada de lugar (CPP) induzida por cocaína, enquanto a ativação dos MSNs que expressam receptores D2 suprimiu. Outro trabalho mostrou que a inibição de MSNs que expressam receptores D2 aumentou a busca por cocaína (HEINSBROEK *et al.*, 2017).

Os subtipos de vocalização de 50-KHz *trill* e *mix* se enquadram em frequências moduladas, onde são caracterizadas por expressar motivação intensa (PEREIRA *et al.*, 2014; WENDLER *et al.*, 2019). A cocaína 10 mg/kg aumentou o nível de ambos e o biperideno ao ser administrado juntamente com a cocaína, bloqueou o aumento de USVs desses subtipos e curiosamente diminuiu as classificações do tipo

mix em relação ao grupo salina. Nossos resultados corroboram os de Wright e colaboradores, que avaliaram os subtipos das vocalizações de um psicoestimulante, a anfetamina, e observaram aumento das chamadas do tipo *trill* e redução das chamadas *flat*. Estudos prévios em nosso laboratório analisaram os subtipos de vocalizações na dose de 20 mg de cocaína e os resultados mostraram aumento de todas as classificações (SANCHEZ *et al.*, 2022).

O efeito dos psicoestimulantes está relacionado ao aumento da motivação, que por sua vez está correlacionado com os efeitos das classificações de frequência modulada. Nesse caso, o biperideno também pode estar atenuando esses subtipos por ação na modulação do sistema colinérgico ao dopaminérgico, fazendo um controle da liberação de altas frequências de dopamina no sistema mesolímbico. (MARK *et al.*, 1999; HIKIDA *et al.*, 2003; QUARTA *et al.*, 2007; ADROVER *et al.*, 2020).

Dieckmann e colaboradores (2014), alertaram sobre uma possibilidade de ação do biperideno em seu estudo, onde o desejo e consumo por cocaína e crack foi reduzido em usuários do sexo masculino. Os autores teorizam que a redução do desejo pela droga esteja relacionado ao efeito colinérgico do medicamento, em que a acetilcolina pode realizar regulação da liberação de dopamina no NAc, onde o uso do biperideno poderia realizar o controle basal dopaminérgico em usuários dependentes, em situações de não-uso da droga, pois seus níveis dopaminérgicos estão mais baixos em relação a um indivíduo não dependente de drogas de abuso. Em nosso estudo, não foi induzida dependência nos animais, mas hipotetizamos que o biperideno poderia estar realizando o controle motivacional agudo por diminuição da liberação de dopamina no NAc causado pelo antagonismo muscarínico.

Em relação ao tempo da durabilidade das vocalizações de 50 kHz durante a sessão teste, visualizamos em todos os grupos que a quantidade das USVs foi reduzida ao longo dos 40 minutos do experimento. Estudos prévios do nosso laboratório utilizaram a dose de cocaína de 20 mg/kg e mostraram que as grupo perduraram ao longo de toda sessão (SANCHEZ *et al.*, 2022). Em nossos resultados a dose de 10 mg/kg não manteve a constância que a dose de 20 mg/kg.

5.2 O BIPERIDENO E LOCOMOÇÃO

A atividade locomotora em roedores também é um método de avaliação dos efeitos de psicoestimulantes, como a cocaína. Aumento da locomoção em ratos gerada pela administração da cocaína já é descrita na literatura (SANCHEZ *et al.*, 2022). Nossos dados mostram que o biperideno aumentou a locomoção em ratos, assim como a administração da cocaína *per se*, e em ratos que receberam cocaína e foram tratados com biperideno. Os efeitos do biperideno na atividade locomotora não estavam de acordo com nossa hipótese inicial onde hipotetizamos uma redução da mesma após o tratamento com o biperideno, apostando em um fármaco que já mostrou diminuir o consumo da droga, porém não reduziu um efeito gerado pela utilização da cocaína. Portanto, nossos resultados estão de acordo com o estudo de Carlsson, Svensson e Carlsson (1991), onde realizaram a administração do biperideno e da atropina (antagonistas muscarínicos) associados a agonistas adrenérgicos (clonidina ou L-alfa-metil-dopa) em camundongos e observaram a atividade locomotora aumentada. Sipos, Burchnell e Galbicka (1999) também avaliaram o efeito *per se* do biperideno e de outros antimuscarínicos, a administração do medicamento mostrou o aumento da locomoção, assim como a escopolamina e atropina. Um estudo recente observou que a administração da escopolamina aumentou a locomoção em ratos (ROJAS-CARVAJAL; CHINCHILLA-ALVARADO; BRENES, 2022). Outro achado na literatura relata que a escopolamina aumentou a sensibilização da atividade locomotora ao ser administrada com a cocaína (ITZHAK, Y.; MARTIN, 2000). O carbacol, agonista muscarínico diminuiu a locomoção em ratos, seus efeitos foram revertidos pelo pré-tratamento com o antagonista muscarínico atropina (antagonista específico M2). A pirenzepina (antagonista específico M1) também foi utilizada no pré-tratamento desse experimento, porém não reverteu a redução da locomoção, mostrando que o receptor M1 não possui, nesse estudo, relação com o aumento na atividade locomotora (BRUDZYNSKI; McLACHLAN; GIRVIN, 1991). Witkin e colaboradores (2014) relataram que ratos *knockout* para o receptor M4 apresentavam uma alta locomoção. Nesse mesmo experimento, observaram que esses animais geneticamente modificados apresentaram aumento na locomoção quando receptores D1 foram ativados, mostrando que o receptor M4 pode ser um controle para a atividade locomotora (WITKIN *et al.*, 2014).

Em resumo, nossos resultados demonstram que o biperideno, através da ação do sistema colinérgico sobre o sistema dopaminérgico pode estar modulando os níveis de dopamina no estriado, e resultando nos efeitos da emissão das USVs de 50 kHz, e que o aumento da atividade locomotora em nosso estudo pode estar relacionado com o efeito antagonista em receptores muscarínicos específicos, frente a uma droga anticolinérgica. Porém, mais estudos são necessários para confirmar o potencial efeito do biperideno sobre o aumento induzido por cocaína dos níveis de dopamina no NAc e seus efeitos na atividade locomotora. Estudos futuros também devem ser conduzidos em fêmeas, pois diferenças entre os sexos podem ser observadas nos efeitos da cocaína (ALGALLAL *et al.*, 2020; CALIPARI *et al.*, 2014). Futuros estudos devem também avaliar o efeito de diferentes doses de biperideno sobre os efeitos da cocaína. Além disso, experimentos utilizando a exposição crônica à cocaína, assim como a administração de antagonistas específicos M1 e também de M4 nesse contexto também devem ser realizados.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo observamos o efeito da administração do biperideno em bloquear o aumento de vocalizações de 50-kHz induzidas pela administração aguda de cocaína. Entretanto, a administração de biperideno foi incapaz de reduzir o efeito hiperlocomotor induzido pela cocaína.

Estes resultados nos fazem atentar ao mecanismo de ação do biperideno, atuando como um antimuscarínico específico dos receptores M1 e M4. O biperideno age diminuindo a ação de colinérgica via receptores M1 e aumentando os efeitos colinérgicos via ação em M4. Baseando-se em nossos resultados nós hipotetizamos que a ação antagonista do receptor M1 levou ao bloqueio de vocalizações de 50 kHz induzidas pelo uso da cocaína, isto podendo ocorrer via ação em receptores M1 expressos na VTA e, tal como por ações diretas no NAc e como consequência alterando a liberação de dopamina no NAc. Além disso, hipotetizamos baseando-se em nossos resultados que o efeito antagonista gerado via ação no receptor M4 pode ter induzido a aumento *per se* do biperideno sobre locomoção. Futuros estudos devem ser realizados para clarificar estas hipóteses.

REFERÊNCIAS

ADROVER, M. F. *et al.* Prefrontal Cortex Driven Dopamine Signals in the Striatum Show Unique Spatial and Pharmacological Properties. **The Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 39, p. 7510-7522, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1327-20.2020>. Acesso em: 20 jan. 2023.

AGRAWAL, A. *et al.* The genetics of addiction-a translational perspective. **Translational Psychiatry**, v.2, n. 11, p. 1-14, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/tp.2012.54>. Acesso em: 10 jan. 2023.

AHRENS, A. M. *et al.* Repeated intravenous amphetamine exposure: rapid and persistent sensitization of 50-kHz ultrasonic trill calls in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 197, n. 1, p. 205–209, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.08.037>. Acesso em: 25 nov. 2022.

ALGALLAL, H. *et al.* Sex differences in cocaine self-administration behaviour under long access versus intermittent access conditions. **Addiction Biology**, v. 25, n. 5, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/adb.12809>. Acesso em: 10 jan. 2023.

ALLAHVERDIYEV, O.; NURTEN, A.; ENGINAR, N. Assessment of rewarding and reinforcing properties of biperiden in conditioned place preference in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 225, n. 2, p. 642–645, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.07.050>. Acesso em: 24 jan. 2023.

ANTHONY, J. C.; PETRONIS, K. R. Early-onset drug use and risk of later drug problems. **Drug Alcohol Dependence**, v. 40, n. 1, p. 9–15, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0376-8716\(95\)01194-3](https://doi.org/10.1016/0376-8716(95)01194-3). Acesso em: 10 jan. 2023.

APA. AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. 5 ed. Washington DC: American Psychiatric Publishing, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>. Acesso em: 10 jan. 2023.

BAKKER, C. *et al.* Biperiden Challenge Model in Healthy Elderly as Proof-of-Pharmacology Tool: A Randomized, Placebo-Controlled Trial. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 61, n. 11, p. 1466-1478, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcph.1913>. Acesso em: 29 nov. 2022.

BARROS, H. M.; MICZEK, K. A. Withdrawal from oral cocaine in rats: ultrasonic vocalizations and tactile startle. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 125, n. 4, p. 379-384, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02246021>. Acesso em: 10 jan. 2023.

BAUMANN, M. H.; ROTHMAN, R. B. Alterations in serotonergic responsiveness

during cocaine withdrawal in rats: Similarities to major depression in humans. **Biological Psychiatry**, v. 44, n. 7, p. 578 – 591, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(98\)00123-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(98)00123-1). Acesso em: 10 dez. 2022.

BERGER, A. L. *et al.* Affective cue-induced escalation of alcohol self-administration and increased 22-kHz ultrasonic vocalizations during alcohol withdrawal: role of kappa-opioid receptors. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 4, p. 647-654, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/npp.2012.229>. Acesso em: 29 nov. 2022.

BERTORELLI, R.; CONSOLO, S. D₁ and D₂ Dopaminergic Regulation of Acetylcholine Release from Striata of Freely Moving Rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 54, n. 6, p. 2145–2148, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1990.tb04922.x>. Acesso em: 16 dez. 2022.

BJERK, D. Mandatory Minimum Policy Reform and the Sentencing of Crack Cocaine Defendants: An Analysis of the Fair Sentencing Act. **Journal of Empirical Legal Studies**, v. 14, n. 2, p. 370-396, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jels.12150>. Acesso em: 04 dez. 2022.

BOILEAU, I. *et al.* Alcohol promotes dopamine release in the human nucleus accumbens. **Synapse**, v. 49, n. 4, p. 226-231, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/syn.10226>. Acesso em: 12 jan. 2023.

BOOTH, R. E.; WATTERS, J. K.; CHITWOOD, D. D. HIV risk-related sex behaviors among injection drug users, crack smokers, and injection drug users who smoke crack. **American Journal of Public Health**, v. 83: 1144-48, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.2105/ajph.83.8.1144>. Acesso em: 10 jan. 2023.

BOSSERT, J. M. *et al.* Role of projections from ventral medial prefrontal cortex to nucleus accumbens shell in context-induced reinstatement of heroin seeking. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 14, p. 4982-4991, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0005-12.2012>. Acesso em: 10 jan. 2023.

BOSSONG, M.G. *et al.* Delta 9-tetrahydrocannabinol induces dopamine release in the human striatum. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 3, p. 759-766, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/npp.2008.138>. Acesso em: 12 jan. 2023.

BRAIN, P. F.; COWARD, G. A. A review of the history, actions, and legitimate uses of cocaine. **Journal of Substance Abuse**, v.1, n. 4, p. 431-451, 1989. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0899-3289\(20\)30007-9](https://doi.org/10.1016/S0899-3289(20)30007-9). Acesso em: 10 jan. 2023.

BRINK, W. van der; REE, J. M. van. Pharmacological treatments for heroin and cocaine addiction. **European Neuropsychopharmacology**, v. 13, n. 6, p. 476-487, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2003.08.008>. Acesso em: 10 jan. 2023.

BRUDZYNSKI, S. M. ; McLACHLAN, R. S. ; GIRVIN, J. P. Involvement of M1 and M2 muscarinic receptors of the basal forebrain in cholinergically mediated changes in the rat locomotion. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.15, n. 2, p. 279-

284, 1991. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0278-5846\(91\)90093-g](https://doi.org/10.1016/0278-5846(91)90093-g). Acesso em: 11 jan. 2023.

BRUDZYNSKI, S. M. *et al.* Analysis of 22 kHz ultrasonic vocalization in laboratory rats: long and short calls. **Physiology & Behavior**, v. 54, n. 2, p. 215 -221, 1993. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(93\)90102-l](https://doi.org/10.1016/0031-9384(93)90102-l). Acesso em: 29 nov. 2022.

BRUDZYNSKI, S. M.; BARNABI, F. Contribution of the ascending cholinergic pathways in the production of ultrasonic vocalization in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 80, n. 1, 2, p. 145-152, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(96\)00029-0](https://doi.org/10.1016/0166-4328(96)00029-0). Acesso em: 29 nov. 2022.

BUCHHOLZ, J.; SAXON, A. J. Medications to treat cocaine use disorders: current options. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 32, n. 4, p. 275-281, 2019 Disponível em: <https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000518>. Acesso em: 30 nov. 2022.

BURGDORF, J.; KNUTSON, B.; PANKSEPP, J. Anticipation of rewarding electrical brain stimulation evokes ultrasonic vocalization in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 114, n. 2, p. 320–327, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1037/0735-7044.114.2.320>. Acesso em: 15 dez. 2022.
BURGDORF, J.; PANKSEPP, J. The neurobiology of positive emotions. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 30, n. 2, p. 173–187, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.06.001>. Acesso em: 10 jan. 2023.

CALIPARI, E. S. *et al.* Intermittent Cocaine Self-Administration Produces Sensitization of Stimulant Effects at the Dopamine Transporter. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 349, n. 2, p. 192-198, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/jpet.114.212993>. Acesso em: 10 jan. 2023.

CARRILLO-REID, L. *et al.* Muscarinic enhancement of persistent sodium current synchronizes striatal medium spiny neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 102, n. 2, p. 682-90, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/jn.00134.2009>. Acesso em: 03 jan. 2023.

CARLSSON, M.; SVENSSON, A.; CARLSSON, A. Synergistic interactions between muscarinic antagonists, adrenergic agonists and NMDA antagonists with respect to locomotor stimulatory effects in monoamine-depleted mice. **Naunyn Schmiedeberg's Archives Pharmacology**, v. 343, n. 6, p. 568-573, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00184286>. Acesso em: 16 dez. 2022.

CARNAHAN, R. M. *et al.* The concurrent use of anticholinergics and cholinesterase inhibitors: rare event or common practice? **Jornal of the American Geriatrics Society**, v. 52, n. 12, p. 2082-2087, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2004.52563.x>. Acesso em: 29 nov. 2022.

CARRERA, M. R.; MEIJLER, M. M.; JANDA, K. D. Cocaine pharmacology and current pharmacotherapies for its abuse. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 19, p.

5019-5030, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.06.018>. Acesso em: 06 dez. 2022.

CARRIGAN, K. A.; DYKSTRA, L. A. Behavioral effects of morphine and cocaine in M1 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. **Psychopharmacology**, v. 191, n. 4, p. 985–993, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0671-1>. Acesso em: 06 out. 2022.

CARROLL, F. I. *et al.* Cocaine receptor: biochemical characterization and structure-activity relationships of cocaine analogues at the dopamine transporter. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 6, p. 969–981, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm00084a001>. Acesso em: 06 out. 2022.

CHIARA, G. D.; 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. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.85.14.5274>. Acesso em: 02 jan. 2023.

CHITWOOD, D. D.; RIVERS, J. E.; INCIARDI, J. A. **The American Pipe Dream: Crack Cocaine and the Inner City**. 1 ed. Austin, TX: Harcourt Brace College Publishers, 1996.

CHURCH, W. H.; JUSTICE JUNIOR, J. B.; BYRD, L. D. Extracellular dopamine in rat striatum following uptake inhibition by cocaine, nomifensine and benztropine. **European Journal of Pharmacology**, v. 139, n. 3, p. 345–348, 1987. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(87\)90592-9](https://doi.org/10.1016/0014-2999(87)90592-9). Acesso em: 10 jan. 2023.

COFFEY, K. R.; MARX, R. E.; NEUMAIER, J. F. DeepSqueak: a deep learning-based system for detection and analysis of ultrasonic vocalizations. **Neuropsychopharmacology**, v. 44, n. 5, p. 859-868, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0303-6>.

CONE, E. J. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cocaine. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 19, n. 6, p. 459–478, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jat/19.6.459>. Acesso em: 15 dez. 2022.

CORNISH, J. W.; O'BRIEN, C. P. Crack Cocaine Abuse: An Epidemic with Many Public Health Consequences. **Annual Review of Public Health**, v. 17, n. 1, p. 259–273, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.pu.17.050196.001355>. Acesso em: 05 dez. 2022.

CRESPO, J. A. *et al.* Activation of Muscarinic and Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Nucleus Accumbens Core Is Necessary for the Acquisition of Drug Reinforcement. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 22, p. 6004-6010, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4494-05.2006>. Acesso em: 10 jan. 2023.

DACKIS, C. A.; GOLD, M. S. New concepts in cocaine addiction: the dopamine depletion hypothesis. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 9, n. 3, p. 469–477, 1985. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(85\)90022-3](https://doi.org/10.1016/0149-7634(85)90022-3). Acesso em: 08 jan. 2023.

DACKIS, C. A.; O'BRIEN, C. P. Cocaine dependence: a disease of the brain's reward centers. **Journal of Substance Abuse Treatment**, v. 21, n. 3, p. 111-117, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0740-5472\(01\)00192-1](https://doi.org/10.1016/s0740-5472(01)00192-1). Acesso em: 10 jan. 2023.

DEFRANCE, J. F. *et al.* Characterization of fimbria input to nucleus accumbens. **Journal of Neurophysiology**, v. 54, n. 6, p. 1553-1567, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/jn.1985.54.6.1553>. Acesso em: 10 jan. 2023.

DIECKMANN, L. H. J. *et al.* Effects of biperiden on the treatment of cocaine/crack addiction: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **European Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 8, p. 1196-1202, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2014.06.001>. Acesso em: 10 jan. 2023.

DUALIBI, L. B.; RIBEIRO, M.; LARANJEIRA, R. Profile of cocaine and crack users in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, s. 4, p. 545–557, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2008001600007>. Acesso em: 10 jan. 2023.

EBIHARA, K. *et al.* Cholinergic interneurons suppress action potential initiation of medium spiny neurons in rat nucleus accumbens shell. **Neuroscience**, v. 236, p. 332–344, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.01.012>. Acesso em: 02 jan. 2023.

EHRMAN, R. N. *et al.* Conditioned responses to cocaine-related stimuli in cocaine abuse patients. **Psychopharmacology (Berl.)**, v.107, n. 4, p. 523–529, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02245266>. Acesso em: 21 dez. 2022.

ESMAEILI, B.; BASSEDA, Z.; DEHPOUR, A. R. Antagonism of muscarinic M1 receptors by dicyclomine inhibits the consolidation of morphine-associated contextual memory. **Brain Research Bulletin**, v. 76, n. 4, p. 380–387, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2008.02.003>. Acesso em: 13 jan. 2023.

FLEMING, W. *et al.* Cholinergic interneurons mediate cocaine extinction in male mice through plasticity across medium spiny neuron subtypes. **Cell Reports**, v. 39, n. 9, p. 1-39, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110874>. Acesso em: 04 dez. 2022.

FORNARI, R. V.; MOREIRA, K.M.; OLIVEIRA, M.G. Effects of the selective M1 muscarinic receptor antagonist dicyclomine on emotional memory. **Learning & Memory**, v. 7, n. 5, p. 287–292, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/lm.34900>. Acesso em: 10 jan. 2023.

GARRIS, P. A.; WIGHTMAN, R. M. Distinct pharmacological regulation of evoked dopamine efflux in the amygdala and striatum of the rat in vivo. **Synapse**, v. 20, n. 3, p. 269–279, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/syn.890200311>. Acesso em: 20 jan. 2023.

GAWIN, F. H.; KLEBER, H. D. Abstinence symptomatology and psychiatric diagnosis in cocaine abusers. Clinical observations. **Archives of General Psychiatry**, v. 43, n. 2, p. 107 – 113, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1986.01800020013003>. Acesso em: 30 jan. 2023.

GERFEN, C. R.; SURMEIER, D. J. Modulation of striatal projection systems by dopamine. **Annual Review of Neuroscience**, v. 34, p. 441–466, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113641>. Acesso em: 10 jan. 2023.

GOETZ, C. G. *et al.* Practical guidelines for drug holidays in parkinsonian patients. **Neurology**, v. 31, n. 5, p. 641–642, 1981. Disponível em: <https://doi.org/10.1212/wnl.31.5.641-b>. Acesso em: 11 out. 2022.

GRASING, K. A threshold model for opposing actions of acetylcholine on reward behavior: Molecular mechanisms and implications for treatment of substance abuse disorders. **Behavioural Brain Research**, v. 312, p. 148–162, 2016. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.06.022>. Acesso em: 02 dez. 2022

GROENEWEGEN, H. J. *et al.* Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 877, p. 49-63, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb09260.x>. Acesso em: 02 jan. 2023.

GUAITA, G. de O. *et al.* Diazepam blocks 50 kHz ultrasonic vocalizations and stereotypies but not the increase in locomotor activity induced in rats by amphetamine. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 235, n. 7, p. 1887–1896, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00213-018-4878-8>. Acesso em: 14 jan. 2023.

GUZE, S. B. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV**. 4 ed. Washington: American Psychiatric Association, 1994.

HAILWOOD, J. M. *et al.* Blockade of muscarinic acetylcholine receptors facilitates motivated behaviour and rescues a model of antipsychotic-induced amotivation. **Neuropsychopharmacology**, v. 44, n. 6, p. 1068-1075, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0281-8>. Acesso em: 06 set. 2022.

HAN, D. D.; GU, H. H. Comparison of the monoamine transporters from human and mouse in their sensitivities to psychostimulant drugs. **BMC Pharmacology**, v. 6, p. 1-7, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2210-6-6>. Acesso em: 10 jan. 2023.

HEINSBROEK, J. A. *et al.* Loss of plasticity in the D2-accumbens pallidal pathway promotes cocaine seeking. **The Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 4, p. 757–767, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2659-16.2016>. Acesso em: 01 dez. 2022.

HIKIDA, T. *et al.* Acetylcholine enhancement in the nucleus accumbens prevents addictive behaviors of cocaine and morphine. **Proceedings of the National Academy**

of Sciences, v. 100, n. 10, p. 6169–6173, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0631749100>. Acesso em: 01 dez. 2022.

HIKIDA, T. *et al.* Increased sensitivity to cocaine by cholinergic cell ablation in nucleus accumbens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 23, p. 13351-13354, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.231488998>. Acesso em: 01 dez. 2022.

HORI, K. *et al.* Assessment of pharmacological toxicity using serum anticholinergic activity in a patient with dementia. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 59, n. 4, p. 508-510, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1819.2005.01406.x>. Acesso em: 10 jan. 2023.

IKEMOTO S. Involvement of the olfactory tubercle in cocaine reward: intracranial self-administration studies. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 28, p. 9305–9311, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-28-09305.2003>. Acesso em: 05 dez. 2022.

ITZHAK, Y.; MARTIN, J. L. Scopolamine inhibits cocaine-conditioned but not unconditioned stimulant effects in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 152, n. 2, p. 216–23, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s002130000537>. Acesso em: 05 dez. 2022.

KAMPMAN, K. M. The treatment of cocaine use disorder. **Science Advances**, v. 5, n. 10, p. 1-8, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax1532>. Acesso em: 02 nov. 2022.

KARCH, S. A. **Brief History of Cocaine**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2005.

KATAYAMA, S. *et al.* Effects of anticholinergic antiparkinsonian drugs on binding of muscarinic receptor subtypes in rat brain. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 261–270, 1990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2236897/>. Acesso em: 02 nov. 2022.

KIM, E. J. *et al.* Dorsal periaqueductal gray -amygdala pathway conveys both innate and learned fear responses in rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**, v. 110, n. 36, p. 14795 -14800, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1310845110>. Acesso em: 16 jan. 2023.

KIM, J. *et al.* Cell type-specific alterations in the nucleus accumbens by repeated exposures to cocaine. **Biological Psychiatry**, v. 69, n. 11, p. 1026–1034, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.01.013>. Acesso em: 10 jan. 2023.

KOURRICH, S. *et al.* The sigma-1 receptor: roles in neuronal plasticity and disease. **Trends in Neurosciences**, v. 35, n. 12, p. 762–771, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.09.007>. Acesso em: 05 dez. 2022.

KUZENKO, N. *et al.* Associations between use of cocaine, amphetamines, or psychedelics and psychotic symptoms in a community sample. **Acta Psychiatrica**

Scandinavica, v. 123, n. 6, p. 466-474, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.2010.01633.x>. Acesso em: 02 nov. 2022.

LANGE, R. A.; HILLIS, L. D. Cardiovascular complications of cocaine use. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 5, p. 351–358, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJM200108023450507>. Acesso em: 02 nov. 2022.

LARUELLE, M. *et al.* SPECT imaging of striatal dopamine release after amphetamine challenge. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 36, n. 7, p. 1182-90, 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7790942/>. Acesso em: 05 dez. 2022.

LESTER, D. B. Midbrain acetylcholine and glutamate receptors modulate accumbal dopamine release. **Neuroreport**, v. 19, n. 9, p. 991–995, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e3283036e5e>. Acesso em: 05 dez. 2022.

LESTER, D. B.; ROGERS, T. D.; BLAHA, C. D. Acetylcholine-dopamine interactions in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 16, n. 3, p. 137–162, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2010.00142.x>. Acesso em: 02 nov. 2022.

LOBO, M. K. *et al.* Cell type-specific loss of BDNF signaling mimics optogenetic control of cocaine reward. **Science**, v. 330, n. 6002, p. 385–390, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1188472>. Acesso em: 02 nov. 2022.

LUNA, W. N. S. **Efeito de moduladores positivos gabaérgicos sobre a liberação de dopamina no núcleo accumbens induzida por cocaína**. 2022. 90 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Curitiba, 2022.

MARCELLINO, D. *et al.* Identification of dopamine D1- D3 receptor heteromers. Indications for a role of synergistic D1-D3 receptor interactions in the striatum. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 38, p. 26016–26025, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M710349200>. Acesso em: 05 dez. 2022.

MARK, G. P. *et al.* Self-administration of cocaine increases the release of acetylcholine to a greater extent than response-independent cocaine in the nucleus accumbens of rats. **Psychopharmacology**, v. 143, n. 1, p. 47-53, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s002130050918>. Acesso em: 10 jan. 2023.

MARTINEZ, F. E. *et al.* Biperiden dependence: case report and literature review. **Case Reports in Psychiatry**, v. 2012, p. 1-3, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2012/949256/>. Acesso em: 06 nov. 2022.

MARGOLIS, E. B. *et al.* Direct bidirectional m-opioid control of midbrain dopamine neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 44, p. 14707–14716, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2144-14.2014>. Acesso em: 06 nov. 2022.

MATEO, Y. *et al.* Reduced dopamine terminal function and insensitivity to cocaine following cocaine binge self-administration and deprivation. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 8, p. 1455–1463, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300687>. Acesso em: 10 jan. 2023.

MIRANDA, M.I.; BERMÚDEZ-RATTONI, F. Cholinergic activity in the insular cortex is necessary for acquisition and consolidation of contextual memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 87, n. 3, p. 343–351, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2006.09.010>. Acesso em: 05 dez. 2022.

MONEY, K. M.; STANWOOD, G. D. Developmental origins of brain disorders: roles for dopamine. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 7, p. 1-14, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00260>. Acesso em: 9 nov. 2022.

MORRIS, G. *et al.* Coincident but Distinct Messages of Midbrain Dopamine and Striatal Tonically Active Neurons. **Neuron**, v. 43, n. 1, p. 133–143, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.06.012>. Acesso em: 10 jan. 2023.

NARAYANAN, S. *et al.* Sigma receptors and cocaine abuse. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 9, p. 1128–1150, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/156802611795371323>. Acesso em: 10 jan. 2023.

NESTLER, E. J.; CARLEZON JUNIOR, W. A. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1151-1159, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.09.018>. Acesso em: 05 dez. 2022.

O'BRIEN, C. P. Drug Addiction and Abuse. *In*: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PSRKER, K. L. **Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11 ed. New York: Pregamon, 2006. p. 607-627.

OGINO, S. *et al.* Effects of discontinuation of long-term biperiden use on cognitive function and quality of life in schizophrenia. **Progress in NeuroPsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 1, p. 78-83, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.08.030>. Acesso em: 23 jan. 2023.

PALOMBO, P. *et al.* Effects of biperiden (cholinergic muscarinic m1/m4 receptor antagonist) on ethanol conditioned place preference in mice. **Neuroscience Letters**. v. 745, p. 1-3, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135551>. Acesso em: 16 jan. 2023.

PALOMBO, P. **Análises farmacogenômica e funcional do efeito do biperideno nas interações das vias colinérgicas e dopaminérgicas nos transtornos por uso de etanol e cocaína**. 2022. 198 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, Programa de Pós-graduação em Farmacologia, São Paulo, 2022.

PENDERGRAST, M. **For God, Country, and Coca-Cola: The Definitive History of the Great American Soft Drink and the Company That Makes It**. 3 ed. New York: Basic Books, 2000.

PEREIRA, M. *et al.* Amphetamine-induced appetitive 50-kHz calls in rats: a marker of affect in mania? **Psychopharmacology (Berl)**, v. 231, n. 13, p. 2567-2577, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3413-1>. Acesso em: 15 dez. 2022.

PETTIT, H. O.; JUSTICE, J. B. Dopamine in the nucleus accumbens during cocaine self-administration as studied by in vivo microdialysis. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**; v. 34, n. 4, p. 899-904, 1989. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(89\)90291-8](https://doi.org/10.1016/0091-3057(89)90291-8). Acesso em: 19 jan. 2023.

QUARTA, D. *et al.* Heteromeric nicotinic acetylcholine-dopamine autoreceptor complexes modulate striatal dopamine release. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 1, p. 35-42, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301103>. Acesso em: 10 jan. 2023.

RAMOS, A. C. *et al.* Biperiden (M1 antagonist) impairs the expression of cocaine conditioned place preference but potentiates the expression of cocaine-induced behavioral sensitization. **Behavioural Brain Research**, v. 231, n.1, p. 213-216, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.03.030>. Acesso em: 16 dez. 2022.

ROJAS-CARVAJAL, M.; CHINCHILLA-ALVARADO, J.; BRENES, J. C. Muscarinic regulation of self-grooming behavior and ultrasonic vocalizations in the context of open-field habituation in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 418, p. 1-10, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113641>. Acesso em: 05 dez. 2022.

ROLDÁN, G. *et al.* Selective M1 muscarinic receptor antagonists disrupt memory consolidation of inhibitory avoidance in rats. **Neuroscience Letters**, v. 230, n. 2, p. 93-96, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(97\)00489-8](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(97)00489-8). Acesso em: 05 dez. 2022.

RUSSO, S. J. *et al.* The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. **Trends in Neurosciences**, v. 33, n. 6, p. 267-276, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.02.002>. Acesso em: 10 jan. 2023.

RYAN, S. A. Cocaine Use in Adolescents and Young Adults. **Pediatric Clinics of North America**, v. 66, n. 6, p. 1135-1147, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2019.08.014>. Acesso em: 05 dez. 2022.

SANCHEZ, W. N. *et al.* Diazepam attenuates the effects of cocaine on locomotion, 50-kHz ultrasonic vocalizations and phasic dopamine in the nucleus accumbens of rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 179, n. 8, p. 1565-1577, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/bph.15658>. Acesso em: 07 dez. 2022.

SESACK, S. R. *et al.* Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 290, n. 2, p. 213-242, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cne.902900205>. Acesso em: 05 dez. 2022.

SHINER, T. *et al.* Dopamine and performance in a reinforcement learning task: evidence from Parkinsons disease. **Brain: a Journal of neurology**, v. 135, n. 6, p. 1871-1883, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/brain/aws083>. Acesso em: 10 jan. 2023.

SIPOS, M. L., BURCHNELL, V.; GALBICKA, G. Dose-response curves and time-course effects of selected anticholinergics on locomotor activity in rats. **Psychopharmacology**, v. 147, p. 250-256, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s002130051164>. Acesso em: 05 dez. 2022.

SOARES, J. C. K.; FORNARI, R. V.; OLIVEIRA, M. G. M. Role of muscarinic M1 receptors in inhibitory avoidance and contextual fear conditioning. **Neurobiology of learning and memory**, v. 86, n. 2, p. 188-196, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2006.02.006>. Acesso em: 31 out. 2022.

SOFUOGLU, M.; MOONEY, M. Cholinergic Functioning in Stimulant Addiction. **CNS Drugs**, v. 23, n. 11, p. 939-952, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.2165/11310920-000000000-00000>. Acesso em: 02 set. 2022.

TATENO, T.; ROBINSON, H. P. C. The mechanism of ethanol action on midbrain dopaminergic neuron firing: a dynamic-clamp study of the role of I_h and GABAergic synaptic integration. **Journal of Neurophysiology**, v. 106, n. 4, p. 1901-1922, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/jn.00162.2011>. Acesso em: 02 dez. 2022.

THAVORNCHAROENSAP, M. *et al.* The economic impact of alcohol 183 consumption: a systematic review. **Substance Abuse Treatment, Prevention, and Policy**, v. 4, p. 1-11, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1747-597X-4-20>. Acesso em: 05 set. 2022.

THOMSEN, M. *et al.* Attenuation of Cocaine's Reinforcing and Discriminative Stimulus Effects via Muscarinic M1 Acetylcholine Receptor Stimulation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 332, n. 3, p. 959-969, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/jpet.109.162057>. Acesso em: 02 jan. 2023.

THRELFELL, S. *et al.* Striatal Dopamine Release Is Triggered by Synchronized Activity in Cholinergic Interneurons. **Neuron**, v. 75, n. 1, p. 58-64, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.038>. Acesso em: 02 jan. 2023.

TRITSCH, N. X.; SABATINI, B.L. Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. **Neuron**, v. 76, n. 1, p.33-50, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.023>. Acesso em: 21 dez. 2022.

TZAVARA, E. T. *et al.* M4 muscarinic receptors regulate the dynamics of cholinergic and dopaminergic neurotransmission: relevance to the pathophysiology and treatment of related central nervous system pathologies. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 12, p. 1-18, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1096/fj.04-1575fje>. Acesso em: 10 jan. 2023.

UNODC. UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **World Drug Report: executive summary, policy, implications**. ed. 22. Sales: United Nations publication, 2022. Disponível em: https://www.unodc.org/res/wdr2022/MS/WDR22_Booklet_1.pdf. Acesso em: 21 set. 2022.

VOLKOW, N. D. *et al.* Addiction: beyond dopamine reward circuitry. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 108, n. 37, p. 15037–15042, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1010654108>. Acesso em: 10 jan. 2023.

VOLKOW, N. D. *et al.* Dopamine in drug abuse and addiction: results of imaging studies and treatment implications. **Archives Neurology**, v. 64, n. 11, p. 1575-1579, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/archneur.64.11.1575>. Acesso em: 10 jan. 2023.

VOLKOW, N. D. *et al.* Effects of route of administration on cocaine induced dopamine transporter blockade in the human brain. **Life Sciences**, v. 67, n. 12, p. 1507-1515, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(00\)00731-1](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(00)00731-1). Acesso em: 13 dez. 2022.

VOLKOW, N. D. *et al.* Imaging endogenous dopamine competition with [¹¹C]raclopride in the human brain. **Synapse**, v. 16, n. 4, p. 255-262, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/syn.890160402>. Acesso em: 10 jan. 2023.

VOLKOW, N. D. *et al.* Reinforcing effects of psychostimulants in humans are associated with increases in brain dopamine and occupancy of D(2) receptors. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 291, n. 1, p. 409-415, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10490931/>. Acesso em: 10 jan. 2023.

VOLKOW, N. D.; WISE, R. A.; BALER, R. The dopamine motive system: Implications for drug and food addiction. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 12, p. 741–752, 2017 Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.130>. Acesso em: 10 jan. 2023.

VOLKOW, N.D; LI, T. The neuroscience of addiction. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 11, p. 1429-1430, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nn1105-1429>. Acesso em: 10 jan. 2023.

VOLLENWEIDER, F.X. *et al.* Effects of (S)-ketamine on striatal dopamine: a [¹¹C]raclopride PET study of a model psychosis in humans. **Journal of Psychiatric Research**, v. 34, n. 1, p. 35-43, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0022-3956\(99\)00031-x](https://doi.org/10.1016/s0022-3956(99)00031-x). Acesso em: 10 jan. 2023.

WANG, H. *et al.* Ultrasonic Vocalizations Induced by Sex and Amphetamine in M2, M4, M5 Muscarinic and D2 Dopamine Receptor Knockout Mice. **PLoS ONE**, v. 3, n. 4, p. 1-12, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001893>. Acesso em: 10 jan. 2023.

WANG, K. H.; PENMATSA, A.; GOUAUX, E. Neurotransmitter and psychostimulant recognition by the dopamine transporter. **Nature**, v. 521, n. 7552, p. 322–327, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature14431>. Acesso em: 12 jan. 2023.

WENDLER E. *et al.* Mania-like elevated mood in rats: Enhanced 50-kHz ultrasonic vocalizations after sleep deprivation. **Progress in Neuropsychopharmacol and Biological Psychiatry**, v. 88, n. 10, p. 142-150, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.07.002>. Acesso em: 06 jan. 2023.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. International statistical classification of diseases and related health problems. v. 3, 15 ed., Sweden: World Health Organization, 2016.

WILKINSON, P. *et al.* Intranasal and oral cocaine kinetics. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, n. 3, p. 386-394, 1980. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/clpt.1980.52>. Acesso em: 10 jan. 2023.

WILLIAMS, M. J.; ADINOFF, B. The role of acetylcholine in cocaine addiction, **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 8, p. 1779–1797, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301585>. Acesso em: 20 nov. 2022.

WILLIAMS, S. N.; UNDIH, A. S. Brain-derived neurotrophic factor signaling modulates cocaine induction of reward-associated ultrasonic vocalization in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 332, n. 2, p. 463-468, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/jpet.109.158535>. Acesso em: 10 jan. 2023.

WILLIAMSON S. *et al.* Adverse effects of stimulant drugs in a community sample of drug users. **Drug Alcohol Dependence**, v. 44, p. 87–94, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0376-8716\(96\)01324-5](https://doi.org/10.1016/s0376-8716(96)01324-5). Acesso em: 10 jan. 2023.

WILLSTÄTTER, R.; BODE, A. Synthese von r-Cocain. **Chemistry Europe**, V. 326, N. 1-2, P. 42-78, 1903. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jlac.19033260104>. Acesso em: 01 fev. 2023.

WISE, R. A.; BOZARTH, M. A. A psychomotor stimulant theory of addiction. **Psychological Review**, v. 94, n. 4, p. 469-492, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1037/0033-295X.94.4.469>. Acesso em: 3 jan. 2023.

WISE, R.A. Dopamine and reward: the anhedonia hypothesis 30 years on. **Neurotoxicity research**, v. 14, n. 2-3, p. 169–183, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF03033808>. Acesso em: 10 jan. 2023.

WISE, R. A.; ROMPRE, P. P. Brain Dopamine and Reward. **Annual Review of Psychology**, v. 40, n. 1, p. 191-225, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.ps.40.020189.001203>. Acesso em: 12 dez. 2022.

WITKIN, J. M. *et al.* M1 and M2 Muscarinic Receptor Subtypes Regulate Antidepressant-Like Effects of the Rapidly Acting Antidepressant Scopolamine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 351, n. 2, p. 448–456, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/jpet.114.216804>. Acesso em: 01 fev. 2023.

WRIGHT, J. M.; DOBOSIEWICZ, M. R. S.; CLARKE, P. B. S. α - and β -Adrenergic receptors differentially modulate the emission of spontaneous and amphetamine-induced 50-kHz ultrasonic vocalizations in adult rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 3, p. 808–821, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/npp.2011.258>. Acesso em: 01 fev. 2023.

XU, M. *et al.* Differential effects of M1- and M2- muscarinic drugs on striatal dopamine release and metabolism in freely moving rats. **Brain Research**, v. 495, n. 2, p. 232–242, 1989. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90217-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90217-5). Acesso em: 8 jan. 2023.

YEOMANS, J.; BAPTISTA, M. Both nicotinic and muscarinic receptors in ventral tegmental area contribute to brain-stimulation reward. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 57, n. 4, p. 915–921, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(96\)00467-4](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(96)00467-4). Acesso em: 10 jan. 2023.

YOU, Z. B. *et al.* Acetylcholine release in the mesocorticolimbic dopamine system during cocaine seeking: conditioned and unconditioned contributions to reward and motivation. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 36, p. 9021–9029, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0694-08.2008>. Acesso em: 19 jan. 2023.

ZACARIAS, M. S. *et al.* Biperiden (an M1 antagonist) reduces memory consolidation of cocaine-conditioned place preference. **Neuroscience Letters**, v. 513, n. 2, p. 129–131, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.01.073>. Acesso em: 01 fev. 2023.

ZHANG, W. *et al.* Multiple muscarinic acetylcholine receptor subtypes modulate striatal dopamine release, as studied with M1-M5 muscarinic receptor knock-out mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 15, p. 6347-6352, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-15-06347.2002>. Acesso em: 01 fev. 2023.