UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Envolvimento da metilecgonidina, produto de pirólise da
cocaína, na farmacodependência**

Raphael Caio Tamborelli Garcia

Tese para obtenção de grau de
DOUTOR

Orientador: Profa. Dra. Tania Marcourakis
Co-orientador: Dra. Maria Regina Lopes Sandoval

São Paulo
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Envolvimento da metilecgonidina, produto de pirólise da
cocaína, na farmacodependência**

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCFUSP

Raphael Caio Tamborelli Garcia

Tese para obtenção de grau de
DOUTOR

Orientador: Profa. Dra. Tania Marcourakis
Co-orientador: Dra. Maria Regina Lopes Sandoval

São Paulo
2014

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Garcia, Raphael Caio Tamborelli
G216e Envolvimento da metilecgonidina, produto de pirólise da
cocaína, na farmacodependência / Raphael Caio Tamborelli
Garcia. -- São Paulo, 2014.
154p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Marcourakis, Tania

Co-orientador: Sandoval, Maria Regina Lopes

1. Toxicologia experimental 2. Toxicologia social 3.
Droga de abuso : Medicina 4. Farmacodependência I. T.
II. Marcourakis, Tania, orientador. III. Sandoval, Maria
Regina Lopes, co-orientador.

615.90028 CDD

Raphael Caio Tamborelli Garcia

Envolvimento da metilecgonidina, produto de pirólise da cocaína, na
farmacodependência

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Tania Marcourakis
Orientador/presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, 25 de Fevereiro de 2014.

À minha família, em especial à minha mãe Claucineia, à minha irmã Roberta, ao meu avô Antônio, ao *meu pai Odair* e às *minhas avós Therezinha e Aurora (saudades)* pelo apoio incondicional, amor, carinho e educação. Vocês forneceram uma base sólida, fundamental para a minha formação humana e intelectual, e permitiram que eu fosse além. Sem o esforço e o empenho de vocês, certamente não chegaria até aqui. Meu eterno amor e gratidão.

“(…)

Por isso eu pergunto

A você no mundo

Se é mais inteligente

O livro ou a sabedoria

O mundo é uma escola

A vida é um circo

‘Amor, palavra que liberta’

Já dizia o profeta”

Marisa Monte (Gentileza)

Aprendi que devemos controlar nossos impulsos em determinadas situações; que é preciso ter perseverança para enfrentar certas dificuldades; que de ideias absurdas surgem grandes projetos; que o caminho tortuoso, por mais obstáculos que ofereça, gera um conhecimento e uma experiência inenarráveis; que a confiança é imprescindível para a continuidade de um trabalho; que “vale ressaltar”, “ainda” e “é importante mencionar” são expressões que marcam o brilhantismo do seu trabalho, o qual realiza com perfeição e faz questão de transmiti-lo. *Vale ressaltar* que, de uma grande orientação, nasce também uma grande amizade. *Tania*, você certamente contribuiu para o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Muito obrigado por esses ensinamentos e por permitir ser seu orientando durante toda a Pós-Graduação! Esses valores permanecerão por toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Regina Lopes Sandoval do Departamento de Farmacologia do Instituto Butantan, pelas grandes ideias, amizade e contribuição desde a época do meu mestrado.

À Larissa Helena Lobo Torres Pacheco, pelo grande apoio, amizade e sábias palavras, especialmente nos momentos difíceis da vida.

À Livia Mendonça Munhoz Dati, pela grande contribuição em diversos experimentos, amizade e os bons momentos que passamos.

À Ana Carolina e ao Wallace, “antigos” recém-alunos, pela valiosa amizade e companheirismo de vocês, e também por me aguentarem mesmo eu estando há muitos quilômetros de distância.

À Stephanie, pela amizade, colaboração e grande ajuda, tornando nossa vida no laboratório muito menos complicada.

Aos nossos alunos de iniciação científica, em especial à Thainá, às *Natálias* e à Michele, pela amizade e troca de conhecimento, fundamental para o aprimoramento intelectual de ambos os lados.

À Profa. Dra. Rosana Camarini do Departamento de Farmacologia do ICBUSP, pela colaboração e discussão de protocolos e resultados dos ensaios comportamentais.

Ao Dr. Jorge Camilo Flório do Departamento de Patologia da FMVZUSP, pelo auxílio na realização das determinações neuroquímicas.

À Dra. Tavane David Cambiaghi e à Profa. Dra. Beatriz Amaral de Castilho do Departamento de Microbiologia da Escola Paulista de Medicina (UNIFESP), pela grande contribuição na determinação da expressão de p-CREB e CREB.

Ao André Nakasato, à Dra. Carolina Dizioli Rodrigues de Oliveira e ao Prof. Dr. Mauricio Yonamine, pela amizade e ajuda na determinação das concentrações plasmáticas.

Ao Dr. Fernando Maurício Francis Abdalla, pela imensa colaboração nos ensaio de competição com radioligantes em tecido.

Aos alunos do programa de pós-graduação em Toxicologia, em especial ao Zeca, à Bel, à Lorena, à Sarah e ao Tiago, pelas risadas, desabafos e companhia nos cafés no decorrer dessa jornada.

À Samantha e à Nancy, pelo empenho, dedicação e ajuda durante esse percurso.

À dona Luzia, pelo carinho e por proporcionar um café delicioso que, muitas vezes, salvava nossos dias.

Aos alunos e ex-alunos do laboratório da Profa. Dra. Rosana, em especial à Mariana, às *Priscilas*, ao André, ao Rodolfo e ao Lucas, boas recordações e risadas, especialmente em território chileno.

Aos funcionários e ex-funcionários do LAT, especialmente ao Ângelo, à Beatriz e à Luma, pela amizade, carinho e suporte durante essa trajetória da minha vida.

À Fapesp (bolsa: 2009/51634-4; auxílio à pesquisa: 2011/02734-6) e à CAPES pelo apoio financeiro.

Special acknowledgments

To Jeff, Mike, Colleen, and Jeff's entire lab group for the generous and kind receipt and for sharing with me some of their knowledge, culture and experience. Certainly, I have spent a great time during my journey in the Vanderbilt University. I am also grateful to all the people that I have met in Nashville during this period. It was really amazing. Thank you so much!

“Don’t stop believin’

Hold on to that feelin’”

Journey (Don’t Stop Believin’)

Normalização

Esta tese está de acordo com o Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade de São Paulo (USP). **Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: Documento eletrônico e impresso. Parte I (ABNT).** Elaborado por Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, Maria Cláudia Pestana, Eliana Maria Garcia, Maria Alice de França Rangel Rebello, Maria Aparecida Bezerra Ayello, Maria José de Jesus Carvalho, Maria Marta Nascimento, Rosana Alvarez Paschoalino, Suely Campos Cardoso, Valéria de Vilhena Lombardi. 2. ed. rev. ampl. 102 p. (Cadernos de Estudos; 9). São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas da USP, 2009.

Resumo

Garcia, R. C. T. **Envolvimento da metilecgonidina, produto de pirólise da cocaína, na farmacodependência**. 2014. 154 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O *crack* é a forma fumada de administração da cocaína com o maior potencial para causar dependência. Até 80% da sua fumaça consiste no produto de pirólise da cocaína, a metilecgonidina (AEME). Apesar do vasto conhecimento acerca dos efeitos e prejuízos causados pela cocaína, nenhum trabalho avaliou os efeitos da AEME na farmacodependência, objetivo deste trabalho. Ratos adultos machos *Wistar* foram expostos à salina, à AEME 3 mg/kg, à cocaína 15 mg/kg e a associação entre cocaína e AEME, intraperitonealmente, em duas situações: 1) exposição prolongada (administração todos os dias, por 9 dias); 2) sensibilização comportamental dependente de contexto (administração em dias alternados, por 5 dias e 7 dias de abstinência, seguido do desafio). A dose de AEME foi definida pela avaliação da atividade locomotora em teste agudo. A AEME foi capaz de aumentar a atividade locomotora após exposição prolongada e potencializar a expressão da sensibilização comportamental dependente de contexto induzida pela cocaína. A concentração de dopamina e seus metabólitos aumentaram no caudado-putâmen em todos os grupos, sendo observado um sinergismo entre cocaína e AEME no grupo da associação. No núcleo *accumbens*, foi observado aumento de dopamina apenas nos grupos cocaína e associação. Paralelamente, houve aumento da relação p-CREB/CREB 60 minutos após a administração aguda de AEME 3 mg/kg e cocaína 15 mg/kg, tanto no caudado-putâmen quanto no núcleo *accumbens*, assim como nos grupos cocaína e associação após a sensibilização comportamental dependente de contexto. Com a finalidade de determinar o mecanismo de ação da AEME, foi realizado um estudo farmacológico detalhado dessa substância em células CHO-K1 de rato expressando heterologicamente os receptores colinérgicos muscarínicos subtipos 1 a 5, uma vez que estudos anteriores sugeriram uma interação entre a AEME e os receptores colinérgicos muscarínicos. O ensaio de competição com [³H]NMS mostrou uma pequena preferência da AEME para o subtipo M₂. Estudos funcionais (mobilização de cálcio) revelaram um efeito agonista parcial da AEME para os subtipos M₁ e M₃ e antagonista para os demais subtipos,

dando suporte à hipótese colinérgica de ação da AEME. Nossos resultados indicam que a AEME isoladamente não foi capaz de causar sensibilização, mas potencializou a ação da cocaína quando coadministrada. O efeito antagonista da AEME em receptores subtipo M_2 e M_4 no caudado-putâmen, e M_4 e M_5 no núcleo *accumbens* causaram aumento de dopamina nessas regiões encefálicas, onde a atividade colinérgica medeia sua liberação.

Palavras-chave: *metilecgonidina, anidroecgonina metil éster, AEME, crack, farmacodependência.*

Abstract

Garcia, R. C. T. **Involvement of methylecgonidine, a cocaine pyrolysis product, in addiction.** 2014. 154 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Crack cocaine is the smoked form of cocaine with the highest potential for addiction. Up to 80% of *crack* smoke consists of cocaine's pyrolysis product anhydroecgonine methyl ester (AEME). Despite of many studies regarding cocaine effects and its hazardousness, few reports have assessed AEME's role in addiction, the aim of this study. Adult male *Wistar* rats were i.p. dosed with either saline, 3 mg/kg AEME, cocaine 15 mg/kg, or cocaine-AEME combination in two situations: 1) prolonged exposure (drugs administered every day for 9 days); 2) behavioral sensitization context specific (drugs administered in alternating days for 5 days, followed by 7-days abstinence period and a challenge injection). AEME dose was chosen based on locomotor activity after an acute test. AEME increased locomotor activity in the prolonged exposure and it potentiated cocaine-induced behavioral sensitization. Dopamine level and its metabolites were elevated in the caudate-putamen in all non-saline groups with a synergic effect between cocaine and AEME in the cocaine-AEME group. In the nucleus *accumbens*, dopamine was elevated only in cocaine and cocaine-AEME groups. At the same time, p-CREB/CREB ratio, increased 60 minutes after an acute administration of 3 mg/kg AEME and 15 mg/kg cocaine in both caudate-putamen and nucleus *accumbens*, the same result observed in both cocaine and cocaine-AEME groups after behavioral sensitization. Once previous studies suggested AEME interacts with muscarinic acetylcholine receptors, a detailed pharmacological analysis of AEME at rat muscarinic acetylcholine receptors subtypes 1-5 heterologously expressed in CHO-K1 cells was performed to determine a mechanism for the novel effects of AEME. [³H]NMS competition binding showed a slight preference for M₂ subtype; functional studies (Ca²⁺ mobilization) revealed partial agonist effects at M₁ and M₃ and antagonist effects at the remaining subtypes, supporting the cholinergic hypothesis of AEME's effects. Our results indicate AEME alone does not elicit behavior sensitization but significantly potentiates cocaine sensitization when co-administered. AEME antagonism effects at M₂ and M₄ muscarinic acetylcholine receptors subtypes in the caudate-putamen, and M₄ and M₅

muscarinic acetylcholine receptors subtypes in the nucleus *accumbens* resulted in dopamine increase in these brain regions, where its release is mediated by cholinergic activity.

Keywords: *methylecgonidine, anhydroecgonine methyl ester, AEME, crack cocaine, addiction.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Consumo mundial de drogas por região até 2011	25
Figura 2.	Apreensão global de cocaína no período de 2000 a 2011	26
Figura 3.	Distribuição mundial do consumo de cocaína até 2011	27
Figura 4.	Reação de pirólise ou decomposição térmica da cocaína	29
Figura 5.	Produtos de biotransformação da cocaína	32
Figura 6.	Produtos de biotransformação da AEME	33
Figura 7.	Semelhança estrutural entre AEME, arecolina e anatoxina- <i>a</i>	34
Figura 8.	Mecanismo de ação geral de agonistas de receptores colinérgicos muscarínicos, associados a uma proteína G _q	36
Figura 9.	Estágios envolvidos na dependência a uma substância química	38
Figura 10.	Manifestações comportamentais da síndrome da inibição da resposta comprometida e atribuição de saliência	41
Figura 11.	Representação das projeções dopaminérgicas em regiões encefálicas em seres humanos	43
Figura 12.	Metabolização da dopamina no sistema nervoso central	45
Figura 13.	Esquema simplificado mostrando a regulação de dopamina liberada no estriado e no núcleo <i>accumbens</i> por meio dos cinco subtipos de receptores muscarínicos	48
Figura 14.	Regulação da expressão gênica pela dopamina e pelo glutamato	52
Figura 15.	Distância total percorrida (cm) após a administração aguda de diferentes doses de AEME	81
Figura 16.	Distância total percorrida (cm) após a administração prolongada de salina, AEME 3 mg/kg, cocaína 15 mg/kg e a associação (cocaína 15 mg/kg e AEME 3 mg/kg)	83
Figura 17.	Distância total percorrida (cm) após o protocolo de sensibilização comportamental dependente de contexto	85
Figura 18.	Filmes representativos de géis de <i>Western Blot</i> obtidos durante a análise da expressão de p-CREB e CREB	88
Figura 19.	Decurso temporal da expressão da p-CREB e CREB, e da relação p-CREB/CREB no caudado-putâmen de ratos <i>Wistar</i> adultos após a administração aguda de AEME 3 mg/kg	89

Figura 20.	Decurso temporal da expressão da p-CREB e CREB, e da relação p-CREB/CREB no núcleo <i>accumbens</i> de ratos <i>Wistar</i> adultos após a administração aguda de AEME 3 mg/kg	91
Figura 21.	Decurso temporal da expressão da p-CREB e CREB, e da relação p-CREB/CREB no caudado-putâmen de ratos <i>Wistar</i> adultos após a administração aguda de cocaína 15 mg/kg	92
Figura 22.	Decurso temporal da expressão da p-CREB e CREB, e da relação p-CREB/CREB no núcleo <i>accumbens</i> de ratos <i>Wistar</i> adultos após a administração aguda de cocaína 15 mg/kg	93
Figura 23.	Fosforilação da CREB e relação p-CREB/CREB no caudado-putâmen 60 minutos após o desafio da sensibilização comportamental dependente de contexto	94
Figura 24.	Fosforilação da CREB e relação p-CREB/CREB no núcleo <i>accumbens</i> 60 minutos após o desafio da sensibilização comportamental dependente de contexto	95
Figura 25.	Gráficos do estudo de linearidade da cocaína e da AEME em amostras de plasma	96
Figura 26.	Exemplos de cromatogramas obtidos na determinação da concentração plasmática de cocaína e AEME	97
Figura 27.	Curvas de deslocamento do [³ H]QNB (quinuclidinil benzilato triciado) ligado às membranas hipocâmpais induzidas pela AEME e o antagonista inespecífico de receptores colinérgicos muscarínicos, a atropina	99
Figura 28.	Curvas de saturação para todos os cinco subtipos de receptores muscarínicos	100
Figura 29.	Curvas de deslocamento do [³ H]NMS (N-metil-escopolamina triciada) obtidas pela acetilcolina e pela AEME para todos os cinco subtipos de receptores muscarínicos	101
Figura 30.	Curva concentração-resposta agonista da AEME normalizada pela resposta máxima obtida pela acetilcolina	102
Figura 31.	Ensaio de mobilização de cálcio intracelular em células CHO expressando todos os subtipos de receptores muscarínicos	103

Figura 32. Curvas concentração-resposta da acetilcolina na ausência ou presença de diferentes concentrações de AEME ($10^{-3.5}$ a 10^{-6} M) obtidas no ensaio de mobilização de cálcio em células CHO expressando rM ₅	104
Figura 33. Retas de regressão da análise de <i>Schild</i>	105
Figura 34. Esquema simplificado mostrando os prováveis mecanismos de ação da AEME sobre a regulação de dopamina liberada no estriado e núcleo <i>accumbens</i>	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Diferença entre os processos de homeostase e alostase	49
Tabela 2.	Delineamento experimental para a exposição prolongada	61
Tabela 3.	Delineamento experimental para a sensibilização comportamental dependente de contexto	62
Tabela 4.	Concentração de dopamina, ácido 3,4-dihidroxifenilacético e ácido homovanílico, expressos em ng/g de tecido, e <i>turnover</i> de dopamina no caudado-putâmen após nove dias de administração de salina, AEME 3 mg/kg, cocaína 15 mg/kg e a associação entre cocaína 15 mg/kg e AEME 3 mg/kg	86
Tabela 5.	Concentração de dopamina, ácido 3,4-dihidroxifenilacético e ácido homovanílico, expressos em ng/g de tecido, e <i>turnover</i> de dopamina no núcleo <i>accumbens</i> após nove dias de administração de salina, AEME 3 mg/kg, cocaína 15 mg/kg e a associação entre cocaína 15 mg/kg e AEME 3 mg/kg	87
Tabela 6.	Concentração plasmática de cocaína e AEME após a exposição prolongada	98
Tabela 7.	Concentração plasmática de cocaína e AEME após a sensibilização comportamental dependente de contexto	98
Tabela 8.	Valores de pK_i e K_i , entre parênteses, da AEME nos cinco subtipos de receptores muscarínicos	101

SUMÁRIO

1. Introdução	23
1.1. Análise epidemiológica do consumo de drogas	24
1.1.1. <i>Cenário mundial</i>	24
1.1.2. <i>Tráfico e consumo de cocaína no mundo</i>	25
1.2. Cocaína no Brasil	27
1.3. Crack	28
1.3.1. <i>Toxicocinética</i>	30
1.3.2. <i>Toxicodinâmica</i>	34
1.4. Receptores colinérgicos muscarínicos	36
1.5. Farmacodependência	38
1.5.1. <i>Comportamento e circuitaria neuronal envolvida</i>	40
1.5.2. <i>Mecanismos moleculares e vias envolvidas</i>	43
1.5.3. <i>Alostase e neuroadaptação</i>	48
1.5.4. <i>Sinalização intracelular</i>	50
2. Objetivo	54
2.1. Estratégias experimentais	55
3. Materiais e métodos	57
3.1. Experimentos <i>in vivo</i>	58
3.1.1. <i>Animais</i>	58
3.1.2. <i>AEME</i>	58
3.1.3. <i>Avaliação da atividade locomotora em campo aberto</i>	59
3.1.3.1. <i>Exposição aguda à AEME</i>	60
3.1.3.2. <i>Exposição prolongada</i>	60
3.1.3.3. <i>Sensibilização comportamental dependente de contexto</i>	61
3.1.4. <i>Determinação da concentração de dopamina e seus metabólitos</i>	62
3.1.4.1. <i>Coleta das estruturas encefálicas e preparo do homogenato</i>	62
3.1.4.2. <i>Condições cromatográficas e padrões analíticos</i>	63
3.1.5. <i>Expressão de p-CREB e CREB total</i>	64

3.1.5.1. Decurso temporal de fosforilação da CREB: experimento agudo com AEME 3 mg/kg e cocaína 15 mg/kg	68
3.1.5.2. Expressão das proteínas após a sensibilização comportamental dependente de contexto	68
3.1.6. Determinação da concentração de AEME e cocaína plasmática	69
3.1.6.1. Coleta da amostra	69
3.1.6.2. Extração em fase sólida	69
3.1.6.3. Condições cromatográficas	69
3.1.6.4. Validação do método	70
3.1.6.5. Preparo das amostras	70
3.2. Experimentos <i>in vitro</i>	71
3.2.1. Ligação aos receptores muscarínicos (<i>binding</i>) em hipocampo	71
3.2.1.1. Isolamento de hipocampo de ratos	71
3.2.1.2. Preparação das membranas semipurificadas	71
3.2.1.3. Ensaio de competição com radioligante	72
3.2.2. Experimentos em células CHO	73
3.2.2.1. Cultura de células CHO	73
3.2.2.2. Ligação aos receptores muscarínicos (<i>binding</i>)	74
3.2.2.3. Mobilização de cálcio intracelular	77
3.3. Determinação da concentração proteica	79
3.4. Análise estatística	79
4. Resultados	80
4.1. Experimentos <i>in vivo</i>	81
4.1.1. Avaliação da atividade locomotora em campo aberto	81
4.1.2. Determinação da concentração de dopamina e de seus metabólitos	85
4.1.3. Expressão de p-CREB e CREB total	87
4.1.4. Determinação da concentração de AEME e cocaína plasmática	95
4.2. Experimentos <i>in vitro</i>	98
4.2.1. Ligação aos receptores muscarínicos (<i>binding</i>) em hipocampo	98
4.2.2. Experimentos em células CHO	99
5. Discussão	106

6. Conclusões	120
7. Referências bibliográficas	122
Anexos	150

1. Introdução

1. Introdução

1.1. Análise epidemiológica do consumo de drogas

1.1.1. Cenário mundial

O relatório mundial sobre drogas, o *World Drug Report*, publicado em 2013 pela *United Nations Office on Drugs and Crime*, mostrou que a situação global do consumo de drogas se manteve estável quando comparado ao relatório anterior, o qual estimou que cerca de 153 a 300 milhões de pessoas com idade entre 15 e 64 anos, o que corresponde a 3,4-6,6% da população mundial desta faixa etária, utilizaram alguma droga ilícita em 2010 (*World Drug Report 2012, United Nations Office on Drugs and Crime*).

Apesar da extensão do uso de drogas ilícitas se manter estável, o número estimado de problemas desencadeados pelo seu uso, incluindo a dependência, a síndrome da imunodeficiência humana e as hepatites B e C, é preocupante e atinge cerca de 12% dos usuários. Conforme aponta o mesmo relatório, o número de mortes decorrentes do uso de drogas ilícitas foi estimado entre 99.000 e 253.000 em 2010, o que representa 0,5 a 1,3% de todas as causas de mortalidade de pessoas entre 15 e 64 anos de idade.

A figura 1 ilustra o consumo mundial de drogas quanto à demanda de tratamento, refletindo os principais problemas de cada continente. A *cannabis*, popularmente conhecida como maconha, apesar de ser um problema mundial, afeta mais a África e a Oceania. Na Europa e na Ásia, ocorre a predominância do uso de opioides, enquanto que na América do Norte há uma similaridade quanto ao uso de *cannabis*, opioides e cocaína. Vale ressaltar que os dois maiores mercados de cocaína, a América do Norte e a Europa (regiões central e oeste), registraram uma diminuição do seu uso entre 2010 e 2011: de 1,6 para 1,5% e de 1,3 para 1,2%,

respectivamente. O uso de anfetaminas e de seus derivados não é predominante em uma região específica, mas essas substâncias afetam, de forma significativa, os continentes asiático, oceânico, europeu e norteamericano. Na América Latina e Caribe, o principal problema quanto à utilização de substâncias ilícitas é a cocaína.

Figura 1. Consumo mundial de drogas por região até 2011, representado pela demanda de tratamento (traduzido e adaptado do relatório mundial sobre drogas, o *World Drug Report*, publicado em 2013 pela *United Nations Office on Drugs and Crime*).

1.1.2. Tráfico e consumo de cocaína no mundo

O continente sulamericano é conhecido pela produção e pelo tráfico em larga escala de cocaína. As apreensões de cocaína na Colômbia mostraram que as rotas marítimas via oceano Atlântico ganharam relativo destaque quando comparadas às rotas via oceano Pacífico (*World Drug Report 2013, United Nations Office on Drugs and Crime*). A língua parece ser um ponto favorável no que diz respeito ao tráfico da América do Sul, via Brasil, para a Europa, especialmente Portugal, e alguns países africanos de colonização portuguesa. É importante mencionar que o mercado de

cocaína tem atingido também economias emergentes do continente asiático. A figura 2 ilustra as principais regiões de apreensão de cocaína no período de 2000 a 2011.

Figura 2. Apreensão global de cocaína no período de 2000 a 2011, expressa em toneladas (traduzido e adaptado do relatório mundial sobre drogas, o *World Drug Report*, publicado em 2013 pela *United Nations Office on Drugs and Crime*).

Pela análise do mapa ilustrado na figura 3, pode-se observar um aumento do consumo de cocaína principalmente na Austrália e também em alguns países europeus. No entanto, a prevalência de uso dessa droga ilícita até 2011 parece ainda ser um problema relacionado aos continentes americanos.

Em 2011, o relatório mundial sobre drogas (*World Drug Report 2011*, *United Nations Office on Drugs and Crime*) apontava que os três países do cone sulamericano (Brasil, Argentina e Chile) representavam cerca de dois terços de todos os usuários das Américas do Sul e Central e do Caribe, enquanto que os países centroamericanos e os caribenhos contabilizavam, respectivamente, 5 e 7%.

Figura 3. Distribuição mundial do consumo de cocaína até 2011 (traduzido e adaptado do relatório mundial sobre drogas, o *World Drug Report*, publicado em 2013 pela *United Nations Office on Drugs and Crime*).

1.2. Cocaína no Brasil

Considerada um princípio ativo natural, a cocaína é um alcaloide presente nas folhas provenientes de espécies do gênero *Erytroxylum*. Sua ação psicoestimulante faz com que ela apresente um alto potencial de abuso (SANCHEZ-RAMOS, 1990).

Apesar da diminuição do uso de cocaína por muitos países sulamericanos, houve um aumento substancial no Brasil, o qual, mesmo possuindo uma prevalência relativamente baixa devido à sua alta densidade populacional (0,7% da população entre 15 e 64 anos de idade), é o país que apresenta o maior número de usuários de cocaína, aproximadamente 900 mil, do continente sulamericano (*World Drug Report 2011*, *United Nations Office on Drugs and Crime*).

Uma pesquisa nacional realizada com estudantes universitários em 2009 mostrou que a prevalência anual do consumo de cocaína entre estudantes de 18 a 35 anos de idade foi de 3% (ANDRADE *et al.*, 2010). A mesma pesquisa revelou também que, além da utilização ser maior entre os estudantes do sexo masculino, o uso recente e recorrente de cocaína entre usuários com faixa etária entre 18-24 anos e 25-34 anos foi maior quando comparado aos relatos de estudantes de 18 ou 35 anos de idade.

De acordo com o *II Levantamento Domiciliar Sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil* (CARLINI *et al.*, 2005), o uso de cocaína varia de acordo com a via de administração e a região do país. A prevalência de utilização de cocaína atinge 3,8%, dos quais: 2,9% são referentes à administração pelas vias intranasal e intravenosa; 0,7 e 0,2% correspondem ao uso do *crack* e da merla¹, respectivamente. Quanto às regiões brasileiras, os maiores índices de uso de cocaína foram as regiões Sul e Sudeste, correspondendo a 3,1% e 3,7%, respectivamente, sendo que essas regiões apresentaram também as maiores prevalências em relação ao uso do *crack*, sendo 0,9% para a região Sudeste e 1,1% para a região Sul.

1.3. *Crack*

A forma mais comum de comercialização da cocaína base, isto é, não conjugada a uma molécula de cloridrato, é o *crack*, o qual é preparado pelo aquecimento de uma solução aquosa de cloridrato de cocaína com uma substância básica, geralmente o bicarbonato de sódio.

¹ Variação da pasta de coca, obtida nas primeiras etapas de separação da cocaína a partir do processamento das folhas da planta com solventes e cal virgem. Apresenta uma consistência pastosa, um odor forte e uma coloração entre amarelo e marrom. A composição de cocaína varia entre 40 e 70%. Sua insolubilidade em água e seu baixo ponto de fusão facilitam sua administração por via inalatória, assim como o *crack*.

O aquecimento é mantido até a obtenção de uma substância oleosa, que posteriormente é resfriada em banho de gelo para que a base livre precipite. Os cristais formados são irregulares, adquirindo o formato de *pedras*, nome pelo qual é conhecido.

O aquecimento das pedras durante o fumo de *crack* promove, além da rápida volatilização da cocaína base, a qual apresenta baixo ponto de fusão (96 a 98 °C), a formação da metilecgonidina, também conhecida como *anidroecgonina metil éster* (AEME), um composto proveniente da pirólise ou decomposição térmica da cocaína (Figura 4). A quantidade de cocaína convertida à AEME pode variar com a pureza das pedras de *crack* e a temperatura, podendo formar de 50 a 80% de AEME à 255-420°C; e acima de 89% à 650°C (PAUL *et al.*, 2005).

Figura 4. Reação de pirólise ou decomposição térmica da cocaína. AEME: metilecgonidina (GARCIA, 2009).

A presença de AEME e de seus metabólitos em fluidos biológicos diferencia facilmente o usuário de *crack* de outro que utiliza cocaína por outras vias (TOENNES *et al.*, 2003). Entretanto, os efeitos fisiológicos e psicoativos da cocaína são similares, quer ela seja administrada pela via intravenosa, quer pela via inalatória² (HATSUKAMI *et al.*, 1996). O uso de cocaína na forma inalatória oferece maior potencial de abuso da droga, maior propensão à dependência e consequências cardiovasculares, como isquemia ventricular, efeitos pró-trombóticos e aterosclerose coronariana acelerada, mais graves em comparação às demais vias de administração (AFONSO *et al.*, 2007).

² O termo inalatória foi utilizado ao longo de toda a tese e refere-se à forma fumada de administração de cocaína.

É importante mencionar que o *crack* não é, obrigatoriamente, a forma inalatória de administração de cocaína. O estudo de saúde pública conduzido por ROY *et al.* (2013) mostrou que alguns usuários injetam *crack*, dissolvendo-o com sucos ácidos, como o de limão, ou vinagre. Esta prática foi iniciada desde a década de 90 em alguns países norteamericanos. Dessa forma, as vias de administração do *crack* incluem, além da inalatória, a injetável, porém, a via inalatória ainda é a mais frequente.

1.3.1. Toxicocinética

Durante o fumo do *crack*, tanto a cocaína quanto a AEME são volatilizadas, inaladas e absorvidas instantaneamente pelos pulmões, os quais são extremamente vascularizados e com grande área superficial. Após a absorção, estas substâncias passam quase que imediatamente para a circulação cerebral e chegam rapidamente ao sistema nervoso central, justificando a rapidez dos efeitos estimulantes da cocaína. Essa característica faz do *crack* uma droga com “grande poder” do ponto de vista do usuário, uma vez que o prazer acontece rapidamente após seu uso.

De acordo com FANDIÑO *et al.* (2002), a absorção de AEME coincide com o aparecimento dos efeitos experimentados pelo usuário. TOENNES *et al.* (2003) mostraram que a concentração máxima de AEME encontrada em amostras de sangue *post-mortem* de usuários foi de 472 µg/L. Segundo estudo farmacocinético realizado em ovelhas, o tempo para atingir essa concentração de AEME é de, aproximadamente, 2 minutos (SCHEIDWEILER *et al.*, 2003).

A lipossolubilidade da cocaína contribui para sua rápida velocidade de distribuição, atravessando facilmente as barreiras hematoencefálica e placentária.

Apresenta também uma alta afinidade às proteínas plasmáticas, preferencialmente à α -1-glicoproteína ácida (CHASIN *et al.*, 2008).

O volume de distribuição encontrado por SCHEIDWEILER *et al.* (2003) após a administração de 4 mg/kg de cocaína em ovelhas foi de 3,11 L/kg, com meia-vida de 10,6 minutos. Neste mesmo estudo, o volume de distribuição médio para 3 mg/kg de AEME variou de 6,6 a 10,0 L/kg, com meia-vida entre 16,3 e 17,8 minutos. Ambas as substâncias apresentaram volume de distribuição aparente maior que o volume sanguíneo de uma ovelha, mostrando que as mesmas se distribuem do sangue para os demais tecidos.

Tanto a cocaína quanto a AEME apresentam vias de biotransformação semelhantes. As reações incluem hidrólise química e enzimática, reações oxidativas e, no caso de haver uso concomitante de álcool, a transesterificação dependente de etanol (FANDIÑO *et al.*, 2002; CHASIN *et al.*, 2008). A cocaína absorvida é rapidamente biotransformada a éster metilecgonina, produto da hidrólise do grupo benzoato por ação de colinesterases plasmáticas e hepáticas, constituindo cerca de 32 a 49% da excreção urinária da substância; e a benzoilecgonina (BE), formada pela hidrólise espontânea ou por reações catalisadas por carboxilesterases, que constitui cerca de 29 a 45% da excreção urinária (Figura 5). Outros produtos resultantes da biotransformação da cocaína são: a norcocaína, farmacologicamente ativa, resultado de uma N-desmetilação mediada pelo sistema enzimático do citocromo P-450, excretada pela urina em pequenas quantidades (2 a 6%); a N-hidroxinorcocaína, produto de biotransformação da norcocaína; e o cocaetileno, produto da etil transesterificação, indicando o consumo concomitante de cocaína e etanol. Em média, menos que 10% da cocaína é excretada inalterada na urina, justificado pela sua extensa biotransformação (CHASIN *et al.*, 2008).

Figura 5. Produtos de biotransformação da cocaína. As principais enzimas envolvidas em cada etapa são: 1) colinesterases; 2) carboxilesterases; 3) citocromo P-450; 4) etil transesterificação (GARCIA, 2009).

As informações acerca das vias de biotransformação da AEME são escassas. FANDIÑO *et al.* (2002) mostraram que a extensão da biotransformação desta molécula depende da atividade das enzimas envolvidas em cada órgão alvo e esta decresce na seguinte ordem: fígado, pulmões, rins e cérebro. A AEME é rapidamente biotransformada, tanto por hidrólise enzimática pela enzima butiril colinesterase quanto por processos não enzimáticos, à anidroecgonina, principal metabólito excretado na urina (FANDIÑO *et al.*, 2002). Esse mesmo estudo relatou que a maior produção deste metabólito ocorre no fígado e a menor no cérebro. A utilização de microssomas de fígado e de pulmão de ratos mostrou que a AEME também é biotransformada em anidronorecgonina metil éster e anidroecgonina metil éster N-óxido. Ainda, na presença de etanol, a AEME pode originar a

anidroecgonina etil éster e seu produto N-desmetilado, a anidronorecgonina etil éster (Figura 6).

Figura 6. Produtos de biotransformação da AEME. As setas 1 (hidrólise do grupo éster), 2 (etil transesterificação), 3 (N-desmetilação) e 4 (N-oxidação) correspondem às vias cientificamente comprovadas, enquanto que as setas 5 (hidrólise do grupo éster), 6 (N-desmetilação) e 7 (etil transesterificação) correspondem às postuladas. AEME: metilecgonidina (GARCIA, 2009).

A detecção da AEME na urina pode ser utilizada como bioindicador de uso recente de *crack* por via inalatória e sua detecção no cabelo, quando utilizado como matriz biológica, pode evidenciar exposições anteriores ou ainda um usuário crônico. Devido à sua rápida biotransformação à anidroecgonina, a AEME pode não ser detectada em algumas amostras de urina. Neste caso, por estar em maior concentração que a AEME na urina, a anidroecgonina passa a ser o bioindicador de exposição ao *crack* por via inalatória (CARVALHO, 2006).

1.3.2. Toxicodinâmica

Amplamente estudado e muito bem difundido pela literatura científica, o mecanismo de ação da cocaína envolve a inibição da recaptura de duas catecolaminas na fenda sináptica: a noradrenalina e a dopamina, promovendo o acúmulo desses neurotransmissores e o desencadeamento da euforia.

O uso de cocaína pode causar diversos efeitos tóxicos, sendo os mais comuns as arritmias cardíacas, a isquemia miocárdica, a miocardite, a vasoconstrição cerebral e os acidentes vasculares cerebrais, além de tontura e problemas respiratórios (O'BRIEN, 2006).

O mecanismo de ação da AEME não foi completamente desvendado. Como a AEME apresenta uma semelhança estrutural à arecolina, um agonista de receptores colinérgicos muscarínicos (XIE *et al.*, 2004), e à anatoxina-a, uma cianotoxina que atua como agonista de receptores nicotínicos (WOOD *et al.*, 2007) (Figura 7), postulou-se um possível efeito colinérgico para a AEME (JACOB *et al.*, 1990).

Figura 7. Semelhança estrutural entre AEME, arecolina e anatoxina-a. AEME: metilecgonidina (GARCIA, 2009).

Uma pesquisa realizada em cultura celular de miocárdio ventricular humano demonstrou um efeito inotrópico negativo da AEME, o qual poderia estar relacionado à diminuição da disponibilidade de cálcio durante o processo de contração muscular. A diminuição de cálcio pode ser decorrente da estimulação de receptores colinérgicos muscarínicos subtipo 2 (M₂) que ativa uma proteína G_i responsável pela inibição da adenililciclase, resultando em inibição dos canais para cálcio

dependentes de voltagem. Este estudo revelou ainda que a diminuição da força de contração cardíaca foi revertida pela ação da atropina, um antagonista inespecífico de receptores colinérgicos muscarínicos (WOOLF *et al.*, 1997).

Posteriormente, um estudo realizado por SCHEIDWEILER *et al.* (2003) conduzido em ovelhas demonstrou que a AEME produziu efeitos semelhantes aos agonistas muscarínicos, causando vasodilatação generalizada e hipotensão, acompanhada de taquicardia reflexa. Um dos mecanismos propostos para explicar a hipotensão causada pela AEME foi a estimulação de receptores colinérgicos muscarínicos subtipo 3 (M_3) no endotélio vascular. Essa estimulação faz com que o receptor altere sua conformação, ativando uma proteína G_q , a qual estimula a atividade da fosfolipase C, responsável pela quebra do bifosfato de fosfatidilinositol em diacilglicerol e 1,4,5-trifosfato de inositol (Figura 8). Este último promove a liberação de cálcio dos estoques intracelulares, ativando, por sua vez, a enzima óxido nítrico sintase a produzir óxido nítrico, levando ao relaxamento da musculatura adjacente. Os autores revelaram ainda que a rápida hipotensão induzida pela AEME foi também antagonizada competitivamente pela atropina, sustentando a hipótese do efeito muscarínico tanto *in vitro* como *in vivo*.

Figura 8. Mecanismo de ação geral de agonistas de receptores colinérgicos muscarínicos (mAChR), associados a uma proteína G_q , subtipo M_1 , M_3 ou M_5 (representado no esquema por M_{2n+1}). Uma substância agonista se liga ao receptor presente na membrana celular alterando sua conformação e promovendo a dissociação das subunidades α e β da proteína G. A subunidade catalítica (α) ativa a fosfolipase C (FLC), a qual é responsável pela conversão de bifosfato de fosfatidilinositol (PIP_2) presente na bicamada lipídica da membrana em diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP_3), sendo que este último é responsável pela abertura de canais para cálcio presentes em retículos endoplasmáticos. O cálcio liberado desempenha diversas funções como a ativação de diversas enzimas, como a ativação da proteína quinase C (PKC) ilustrada no esquema, proteínas e a abertura de canais iônicos.

1.4. Receptores colinérgicos muscarínicos

Os receptores colinérgicos muscarínicos estão envolvidos na regulação de diversas funções do sistema nervoso central, tais como: cognitivas, comportamentais, somestésicas, motoras e autonômicas (EGLEN *et al.*, 1999; FELDER *et al.*, 2000; WESS, 2004). A presença de RNA mensageiro para os cinco subtipos de receptores muscarínicos (M_1 , M_2 , M_3 , M_4 e M_5) foi demonstrada em hipocampo de ratos, sendo que alguns ensaios de imunoprecipitação indicaram uma maior população do subtipo M_1 (LEVEY, 1993). Ainda, alguns estudos utilizando

hipocampo de ratas mostraram que a expressão dos subtipos decresce na seguinte ordem: $M_1 > M_2 > M_3 = M_4 > M_5$ (CARDOSO *et al.*, 2010).

Os receptores colinérgicos muscarínicos pertencem à família dos receptores metabotrópicos, ou seja, estão acoplados a proteínas heterotriméricas regulatórias chamadas de proteína G (CAULFIELD, 1993; WESS *et al.*, 1997; HULME *et al.*, 2003; EGLIN, 2006). Cada subtipo de receptor colinérgico muscarínico pode ativar vias diferentes de sinalização intracelular (CAULFIELD, 1993; CAULFIELD & BIRDSALL, 1998; VAN KOPPEN & KAISER, 2003; EHLERT, 2003; LANZAFAME *et al.*, 2003). Conforme descrito anteriormente, os subtipos M_1 , M_3 e M_5 estão principalmente relacionados à hidrólise de fosfoinosítídeos de membrana pela ativação da fosfolipase C (FLC), gerando 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (Figura 8) (BONNER *et al.*, 1988; PERALTA *et al.*, 1988; LIAO *et al.*, 1989; ASHKENAZI *et al.*, 1989a; EHLERT, 2003; LANZAFAME *et al.*, 2003). Estes receptores participam da regulação de diversas funções como contração, secreção, proliferação e diferenciação celular, além de ativarem, em alguns tipos celulares, outros efetores, como as fosfolipases A_2 e D (FELDER, 1995; NAHORSKI *et al.*, 1997; RUMENAPP *et al.*, 2001; LANZAFAME *et al.*, 2003).

Os subtipos M_2 e M_4 estão envolvidos principalmente com a inibição de algumas isoformas de adenililciclase e, portanto, diminuem a formação de monofosfato de adenosina cíclico (AMP cíclico) e a ativação da proteína quinase A, responsável pela fosforilação de diversas proteínas, como canais para cálcio e proteínas nucleares, as quais regulam a expressão gênica (ASHKENAZI *et al.*, 1987, 1989a; PERALTA *et al.*, 1988; MIGEON *et al.*, 1995). A redução dos níveis de AMP cíclico pela ativação dos receptores muscarínicos M_2 pode também ocorrer por meio da ativação da fosfodiesterase (HAN *et al.*, 1998).

1.5. Farmacodependência

A farmacodependência é uma doença crônica que é caracterizada pela busca compulsiva e perda do controle de consumo de uma substância, apesar das consequências adversas de seu uso, ocasionando alterações comportamentais, cognitivas e fisiológicas, incluindo o aparecimento de comportamentos emocionais negativos, como disforia, irritabilidade e ansiedade, quando o acesso à droga é vetado (KOOB & LE MOAL, 1997; FELTENSTEIN & SEE, 2008). É uma doença complexa que afeta o sistema nervoso central, resultando em intoxicação recorrente pela droga e é modulada por fatores genéticos, ambientais e individuais (Figura 9) (GOLDSTEIN & VOLKOW, 2002).

Figura 9. Estágios envolvidos na dependência a uma substância química. Invariavelmente o início se dá pelo consumo social e pelo reforço agudo e, frequentemente, mas não exclusivamente, passa de um padrão de uso compulsivo à dependência. A interrupção do uso de uma substância pode levar à síndrome de abstinência e, durante o tratamento dos seus sintomas, a probabilidade de recaída é alta, retornando ao uso compulsivo. Fatores genéticos, ambientais, o estresse e o próprio condicionamento individual contribuem para a vulnerabilidade do ciclo compulsão, dependência e recaída (traduzido e adaptado de KOOB & LE MOAL, 2006).

A transição dos padrões de consumo social para o uso compulsivo de uma substância química está relacionada ao desenvolvimento da dependência (Figura 9).

As alterações na circuitaria neural, aliado às dificuldades pessoais e sociais, aumenta o risco de recaída de dependentes químicos, tornando a recuperação uma tarefa difícil (O'BRIEN & MCLELLAN, 1996).

Vale ressaltar que a tolerância, a perda de controle do uso da droga, apesar dos malefícios decorrentes do seu uso, e as altas taxas de recaída durante o período de abstinência são as principais características da dependência (THOMAS *et al.*, 2008). A tolerância pode ser definida como um processo que envolve o aumento do consumo da substância para atingir o efeito desejado, uma vez que há diminuição do efeito com o uso contínuo. Já a síndrome de abstinência caracteriza-se por um conjunto de sintomas, geralmente desagradáveis, experimentados pelos usuários que diminuíram ou cessaram o uso de uma substância. Nesse caso, os indivíduos podem voltar a consumir a substância para evitar a síndrome. Para ESTELLES *et al.* (2007), a adolescência e o início da fase adulta são períodos potencialmente críticos para o desenvolvimento da dependência, sendo que o início do uso de drogas comumente começa nesses períodos, correlacionando, portanto, à alta gravidade de dependência.

De acordo com ROBINSON & BERRIDGE (2003), muitas teorias explicam as alterações psicológicas desencadeadas nessa transição. A mais tradicional e intuitiva é a visão hedônica, onde os sintomas prazerosos e a síndrome de abstinência são as principais causas da dependência. Há também uma visão de que a dependência ocorra devido a um processo de aprendizado anormal, uma vez que as substâncias podem subverter os mecanismos neuronais normais envolvidos no aprendizado e na memória. Existe ainda uma teoria mais atual que sugere que a sensibilização neuronal induzida por uma substância que medeia uma função incentivo-motivacional (incentivo-saliência) causa um comportamento compulsivo e

reforça a “procura descontrolada” pela substância, independente do prazer, da abstinência, hábitos ou memórias.

Outros critérios importantes que caracterizam a dependência em humanos incluem: uso recorrente da substância, deixando as obrigações de lado, como o trabalho, a escola e o próprio lar onde se vive; uso recorrente em situações fisicamente perigosas; problemas legais resultantes do uso recorrente; uso contínuo apesar de problemas sociais e interpessoais (DALLEY & EVERITT, 2009).

1.5.1. Comportamento e circuitaria neuronal envolvida

GOLDSTEIN & VOLKOW (2002) definiram farmacodependência como uma “síndrome do comprometimento da inibição da resposta e atribuição de saliência” (do Inglês, *impaired response inhibition and salience attribution* ou *I-RISA*). A síndrome engloba quatro estágios de comportamento que estão interconectados por uma alça de retroalimentação positiva: intoxicação, desejo, compulsão e abstinência (Figura 10).

A intoxicação é um processo de administração da droga a curto prazo e está associada ao aumento da concentração de dopamina extracelular em regiões límbicas, como o núcleo *accumbens*, e também em regiões frontais (RITZ *et al.*, 1987; HURD & UNGERSTEDT, 1989; GOEDERS & SMITH, 1986).

O desejo está associado ao aprendizado e à memória, correlacionando a droga e o ambiente como uma experiência prazerosa ou muito intensificadora. A consolidação dessa memória envolve principalmente a amígdala (BROWN & FIBIGER, 1993; MEIL & SEE, 1997) e o hipocampo (FRANKLIN & DRUHAN, 2000).

No entanto, a autoadministração compulsiva de uma droga por indivíduos dependentes ocorre mesmo quando a droga não é percebida como prazerosa e

também na presença de reações adversas. A perda de controle de uso de uma droga está associado aos circuitos dopaminérgicos, serotoninérgicos e glutamatérgicos (LOH & ROBERTS, 1990; CORNISH *et al.*, 1999) e envolve a ativação da região tálamo-orbitofrontal e do giro cingulado anterior.

A administração recorrente e a subsequente retirada resultam em alteração da circuitaria comportamental, culminando com os sintomas da síndrome de abstinência, como disforia, anedonia e irritabilidade, contribuindo com a recaída (HODGINS *et al.*, 1995; JOHANSON & FISCHMAN, 1989). Essas alterações envolvem mudanças na circuitaria córtico-frontal e de neurotransmissores, principalmente de dopamina (KOOB & LE MOAL, 2001).

Figura 10. Manifestações comportamentais da síndrome do comprometimento da inibição da resposta e atribuição de saliência: intoxicação, administração da droga a curto prazo e associada à altas concentrações de dopamina extracelular; desejo, envolvimento do aprendizado e associação entre droga e ambiente; compulsão, comportamento que ocorre mesmo quando a droga não é percebida como agradável e na presença de efeitos adversos; e abstinência, decorrente da interrupção do uso de uma droga (traduzido e adaptado de GOLDSTEIN & VOLKOW, 2002).

Muitos modelos animais são utilizados para se verificar os efeitos comportamentais de uma determinada substância. Por exemplo, o aumento da atividade locomotora induzida por substâncias psicoestimulantes pode fornecer uma

medida indireta dos efeitos de recompensa, uma vez que ambos os processos envolvem a ativação do sistema mesocorticolímbico dopaminérgico (CASTER *et al.*, 2007).

O fenômeno conhecido como sensibilização comportamental, caracterizado pelo aumento progressivo e persistente da atividade locomotora com administração repetida e intermitente a substâncias psicoestimulantes, constitui uma ferramenta para a investigação da dependência (CHEN *et al.*, 2009; DIROCCO *et al.*, 2009). De acordo com ROBINSON & BERRIDGE (1993), essas substâncias promovem uma alteração duradoura na circuitaria neuronal do sistema mesocorticolímbico, a qual atribui uma “saliência do incentivo” aos estímulos associados à recompensa. Essa teoria da “saliência do incentivo” indica que a hipersensibilização (ou sensibilização) do sistema mesocorticolímbico cause uma motivação patológica para o consumo de drogas.

A sensibilização comportamental apresenta duas fases características: o desenvolvimento, caracterizado por uma série de alterações moleculares/celulares, promovendo mudanças prolongadas da função neuronal, as quais induzem a sensibilização; e a expressão, que surge como consequência do desenvolvimento, caracterizada pela neuroadaptação à exposição prolongada. Esse processo neuroadaptativo pode ser evidenciado com a administração da droga decorridos alguns dias da administração repetida à mesma, sendo denominado injeção “desafio” (do Inglês, *challenge*) (KALIVAS & DUFFY, 1987; VEZINA & STEWART, 1990). De acordo com vários autores (EPSTEIN & ALTSHULER, 1978; POST *et al.*, 1981; THOMAS *et al.*, 2008), a administração repetida de cocaína leva à sensibilização comportamental. Mais ainda, a sensibilização locomotora já foi demonstrada em ratos pré-adolescentes tratados com cocaína (CAMARINI *et al.*,

2008), uma vez que a adolescência e o início da fase adulta constituem períodos críticos para o desenvolvimento da dependência (CHAMBERS *et al.*, 2003). A administração aguda de cocaína aumenta a concentração de dopamina no núcleo *accumbens* e a sensibilização comportamental está relacionada à potencialização da liberação desse neurotransmissor nessa região encefálica (MARIN *et al.*, 2008).

1.5.2. Mecanismos moleculares e vias envolvidas

O sistema mesocorticolímbico dopaminérgico (Figura 11), que se origina na área ventral do tegmento mesencefálico e se projeta, principalmente, para o núcleo *accumbens*, amígdala e córtex pré-frontal, é extremamente importante para o desenvolvimento da dependência (HYMAN *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2009)

Figura 11. Representação das projeções dopaminérgicas em regiões encefálicas em seres humanos. Foram ilustradas as projeções da área ventral do tegmento mesencefálico para o núcleo *accumbens*, o córtex pré-frontal e o giro cingulado, e projeções da substância negra para o estriado (traduzido de HYMAN *et al.*, 2006).

De acordo com HYMAN *et al.* (2006), muitas investigações convergem para uma conclusão única que explica o mecanismo de dependência causado por diversas substâncias: o aumento de dopamina no núcleo *accumbens*. Há evidências da participação do estriado nesses processos, uma vez que sua região dorsal

parece estar envolvida no desenvolvimento da compulsão pela busca da droga (EVERITT & ROBBINS, 2005; EVERITT *et al.*, 2008).

A dopamina é um neurotransmissor do grupo das catecolaminas e é sintetizada a partir da tirosina, um aminoácido que está presente no corpo humano, pela ação de duas enzimas citosólicas: a tirosina hidroxilase, responsável pela conversão de tirosina em dihidroxifenilalanina (dopa); e a dopa descarboxilase, a qual catalisa a conversão de dopa à dopamina. Esta, por sua vez, é armazenada em vesículas por transportadores apropriados e liberada na fenda sináptica, a qual desempenhará sua função em outros neurônios.

A dopamina é metabolizada pelas enzimas monoaminoxidase e catecol-*o*-metiltransferase (Figura 12) e, portanto, removida da fenda sináptica. Além da sua metabolização, outro processo que promove a remoção de dopamina é a presença de transportadores específicos, os quais promovem sua recaptura. É importante ressaltar o papel das células da glia que, além de participarem da neuromodulação, neuroproteção, manutenção do pH e da homeostase, processos importantes que ocorrem no sistema nervoso central, estão envolvidas também na remoção de íons e neurotransmissores da fenda sináptica (ULLIAN *et al.*, 2001; FATTORE *et al.*, 2002).

Figura 12. Metabolização da dopamina no sistema nervoso central. A dopamina é metabolizada pela ação de duas enzimas: a monoaminoxidase (*MAO*), formando o ácido 3,4-dihidroxifenilacético (*DOPAC*), e a catecol-*o*-metiltransferase (*COMT*), cujo produto é a 3-metoxitiramina (*3-MT*). Tanto o *DOPAC* quanto a *3-MT* são biotransformados a ácido homovanílico (*HVA*) pela ação da *COMT* e da *MAO*, respectivamente.

Além da dopamina, um mecanismo celular dependente de glutamato também está envolvido no processo neuroadaptativo da dependência (CHEN *et al.*, 2009). Os neurônios glutamatérgicos, principalmente do córtex pré-frontal, enervam a área ventral do tegmento mesencefálico e o núcleo *accumbens*, onde o glutamato é responsável pela transmissão da atividade dopaminérgica e pela modulação da atividade de neurônios dopaminoceptivos, respectivamente.

É importante mencionar a influência do sistema colinérgico nos mecanismos de dependência. A nicotina, por exemplo, ativa os receptores nicotínicos, especialmente o subtipo $\alpha_4\beta_2$, aumentando a liberação de dopamina no núcleo *accumbens* (BENOWITZ, 2009). O sistema colinérgico muscarínico também desempenha um papel importante na regulação da liberação de dopamina nesse processo. SÁNCHEZ-LEMUS & ARIAS-MONTAÑO (2006) mostraram que todos os cinco subtipos de receptores muscarínicos (M_1 a M_5) estão expressos em neurônios estriatais, com a predominância dos subtipos M_1 e M_4 , perfazendo aproximadamente

80% da população de receptores nessa região encefálica em ratos. De acordo com esses autores, a acetilcolina estimula a formação de AMP cíclico por meio da ativação dos receptores muscarínicos subtipo M₁, enquanto que o subtipo M₄ possui uma ação inibitória nessa sinalização. Foi demonstrado, em cultura celular, que os receptores muscarínicos subtipo M₁ podem aumentar os níveis de AMP cíclico por meio da ativação da proteína Gq e da quebra de fosfoinosítídeos de membrana (JANSSON *et al.*, 1991; BAUMGOLD & FISHMAN, 1988). Há evidências de que um dos tipos de adenililcilase, o tipo V, a isoforma mais abundante no estriado, é ativado pela fosforilação promovida pela proteína quinase C (SUNAHARA *et al.*, 1996).

Os receptores colinérgicos muscarínicos estão densamente expressos no estriado, local onde exercem influência sobre a liberação de dopamina. Contudo, alguns estudos são contraditórios e os mecanismos muitas vezes não são esclarecidos. THRELFELL *et al.* (2010) mostraram que o controle da liberação de dopamina no estriado (especificamente no caudado-putâmen) envolve a ativação de interneurônios colinérgicos, os quais expressam receptores muscarínicos subtipos M₂ e M₄. Segundo os autores, esses receptores não inibem ou aumentam simplesmente a liberação de dopamina, mas podem realizar ambos os processos dependendo da frequência de despolarização. Tal regulação se dá pela redução do tônus de acetilcolina em receptores nicotínicos contendo a subunidade β_2 localizados em neurônios dopaminérgicos e, conseqüentemente, redução da liberação de dopamina. No núcleo *accumbens*, essa regulação é essencialmente realizada via M₄, sem a participação do subtipo M₂.

ZHANG *et al.* (2002) observaram que os receptores muscarínicos subtipo M₃ e M₄ estão presentes em interneurônios gabaérgicos no estriado, sendo que a ativação do primeiro reduz a liberação de dopamina, enquanto que a ativação do

segundo aumenta. No entanto, SCHMIDT *et al.* (2011) mostraram aumento da liberação de dopamina em animais nocaute para receptores muscarínicos subtipo M₄, os quais estão colocalizados com os receptores D₁ em projeções gabaérgicas no mesencéfalo. A inibição de receptores muscarínicos subtipo M₄ aumenta a liberação do neurotransmissor GABA, levando à inibição de interneurônios gabaérgicos presentes na substância negra e na área ventral do tegmento mesencefálico, os quais estabelecem sinapse diretamente com neurônios dopaminérgicos. Assim, a inibição desses interneurônios diminuiria a rede inibitória (gabaérgica) e aumentaria a atividade dopaminérgica no mesencéfalo (TZAVARA *et al.*, 2004).

Outro mecanismo que aumenta a liberação de dopamina, especialmente no núcleo *accumbens*, é a ativação de receptores colinérgicos muscarínicos subtipo M₅ na área ventral do tegmento mesencefálico (LANGMEAD *et al.*, 2008). FORSTER *et al.* (2001) mostraram que a administração intraencefálica de antagonistas colinérgicos muscarínicos, especificamente na área ventral do tegmento mesencefálico, diminuiu a liberação de dopamina no núcleo *accumbens*. Ainda, embora a cascata de sinalização intracelular dos subtipos M₃ e M₅ sejam as mesmas, esses receptores parecem mediar efeitos opostos quanto à liberação de dopamina, uma vez que estão expressos em neurônios distintos (ZHANG *et al.*, 2002). A figura 13 ilustra de modo simplificado a interação entre os diversos subtipos de receptores muscarínicos e a liberação de dopamina.

Figura 13. Esquema simplificado mostrando a regulação de dopamina (DA) liberada no estriado e no núcleo *accumbens* por meio dos cinco subtipos de receptores muscarínicos. A ativação de receptores muscarínicos subtipo M_1 aumenta os níveis de AMP cíclico, pela ativação da proteína quinase C, os quais estão acoplados à proteína G_s (A). A regulação do tônus de dopamina se dá pela liberação de acetilcolina (ACh) por interneurônios colinérgicos, os quais expressam, predominantemente, receptores colinérgicos muscarínicos subtipo M_2 e M_4 (B1). No entanto, a colocalização de receptores D_1 e M_4 em interneurônios gabaérgicos parece ambígua. Alguns autores afirmaram que a ativação desse último aumenta a liberação de dopamina, enquanto que estudos mostraram o contrário (B2). Já os receptores muscarínicos subtipo M_3 , quando ativados, diminuem a liberação de dopamina via ação do ácido γ -aminobutírico (GABA) (C). Situação oposta é observada para os receptores muscarínicos subtipo M_5 , os quais não estão presentes em interneurônios gabaérgicos (D). A coloração das setas corresponde à sinalização desencadeada pelos interneurônios envolvidos.

1.5.3. Alostase e neuroadaptação

Alostase é um processo fisiológico que fornece maiores subsídios para explicar as mudanças neuroadaptativas que ocorrem nos sistemas de recompensa e estresse que levam à condição patológica de dependência, visando esclarecer a vulnerabilidade à recaída mesmo depois de muito tempo após a interrupção da administração de uma droga (KOOB & LE MOAL, 2001). Diferente da homeostase,

que retorna ao “normal” um parâmetro fisiológico, a alostase pode ser definida como *estabilidade por intermédio de mudanças*. Além disso, um processo alostático pode antecipar algo que, por exemplo, é necessário e promover alterações no sistema. Já no processo homeostático, o excesso de algo que é necessário desencadeia uma sinalização de retroalimentação negativa para manter o equilíbrio fisiológico (Tabela 1) (STERLING & EYER, 1988).

Tabela 1. Diferença entre os processos de homeostase e alostase (traduzido e adaptado de KOOB & LE MOAL, 2006).

	Homeostase	Alostase
<i>É considerado um processo fisiológico?</i>	Sim	Sim
<i>O que ocorre com os parâmetros fisiológicos?</i>	Normaliza	Altera
<i>A manutenção do equilíbrio é:</i>	Fisiológica	Compensatória
<i>Antecipa a demanda?</i>	Não	Sim
<i>Pode levar a um quadro patológico?</i>	Não	Sim

Sabe-se que, em ratos adultos, o aumento do efeito locomotor causado pela cocaína pode durar até seis meses e isso é resultado de um processo de neuroadaptação das vias mesocorticolímbicas dopaminérgicas (MARIN *et al.*, 2008).

A teoria da neuroadaptação sugere que a exposição às drogas de abuso induz mudanças moleculares e celulares adaptativas do encéfalo (alostase), formando memórias relacionadas ao seu uso, mecanismo semelhante à consolidação de outras memórias (HYMAN & MALENKA, 2001; HYMAN *et al.*, 2006; LEE & DONG, 2011). Portanto, a dependência é considerada um tipo de memória. No entanto, seu desenvolvimento é mais rápido e sua duração é muito maior, sugerindo que a manutenção da plasticidade neural envolve alostase molecular e celular altamente eficiente (LEE & DONG, 2011).

A plasticidade sináptica pode ser definida como uma modificação da força de transmissão sináptica em sinapses pré-existentes, podendo diminuí-la (*depressão a longo prazo*) ou aumentá-la (*potenciação a longo prazo*) (THOMAS *et al.*, 2008). A metaplasticidade, uma forma de plasticidade sináptica indireta, aumenta a susceptibilidade sináptica, alterando a direção ou a magnitude da plasticidade em resposta a um estímulo subsequente (THOMAS *et al.*, 2008; LEE & DONG, 2011). HUANG *et al.* (2009) demonstraram que a cocaína foi capaz de aumentar o número de sinapses glutamatérgicas. Essas sinapses, muitas vezes definidas como “silenciosas”, são conexões sinápticas nas quais apenas respostas mediadas por receptores do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) são detectadas. Elas podem não afetar a força de transmissão sináptica excitatória, mas proporcionam um grande número de substratos passíveis de induzir uma potenciação a longo prazo no núcleo *accumbens*. Portanto, essas sinapses “silenciosas” nessa região encefálica, as quais constituem um processo de metaplasticidade, desencadeiam um processo plástico robusto e duradouro para o estabelecimento de memória relacionado à dependência (LEE & DONG, 2011).

1.5.4. Sinalização intracelular

A cocaína causa uma adaptação molecular complexa no sistema de recompensa encefálico, levando à dependência (CARLEZON *et al.*, 1998). O seu reforço é mediado por receptores de dopamina, os quais modulam a formação de AMP cíclico, localizados no núcleo *accumbens* (SELF *et al.*, 1998).

O uso crônico de cocaína aumenta a formação de AMP cíclico e a atividade da proteína quinase dependente de AMP cíclico, a proteína quinase A, no núcleo *accumbens*. Altas concentrações de AMP cíclico levam à dissociação das

subunidades catalítica e regulatória da proteína quinase A, sendo que a primeira transloca para o núcleo, fosforila e, subsequentemente, ativa a proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB) (SUN & QUAMINA, 2003). A CREB é um fator transcricional conhecido pelo seu importante papel na regulação gênica e pelo seu envolvimento na modulação das propriedades psicoestimulantes e de dependência à cocaína (SUN & QUAMINA, 2003; NAZARIAN *et al.*, 2009). Sua interação com o elemento de ligação ao AMP cíclico, o CRE, ocorre após a fosforilação da CREB na posição 133 da serina, ativando-a, sendo que a quantificação da expressão da CREB fosforilada fornece um indício dessa ativação (Figura 14).

Foi demonstrado que a administração repetida à cocaína ou outros psicoestimulantes induz a formação da CREB fosforilada, particularmente no núcleo *accumbens* e no estriado (GUERRIERO *et al.*, 2005). A CREB é responsável pela regulação de diversas neuroproteínas, como a expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), cuja principal função é a neuroproteção (TAO *et al.*, 1998; MATTSON, 2002). FOLL *et al.* (2005) mostraram que ocorre um aumento dos níveis de RNAm do BDNF no córtex pré-frontal de ratos após a administração de cocaína. Esse aumento da atividade do BDNF em regiões encefálicas relacionadas ao sistema de recompensa pode contribuir para o desenvolvimento da neuroadaptação causada pela administração de cocaína (COROMINAS *et al.*, 2007).

A CREB, bem como outros mensageiros intracelulares, pode ativar fatores de transcrição e alterar a expressão gênica, produzindo alterações da expressão proteica a longo prazo e, consequentemente, da função neural (KOOB & VOLKOW, 2009). Há, por exemplo, o aumento da taxa de transcrição de genes denominados *genes de transcrição imediata* os quais codificam proteínas que se ligam aos sítios

da cadeia de DNA chamado *elemento ativador da proteína-1* ou simplesmente AP-1, o qual é responsável pela modificação da transcrição gênica (SHENG & GREENBERG, 1990). A administração aguda de drogas de abuso pode levar a uma rápida ativação (horas) de proteínas da família da *Fos* (*c-fos*, *FosB*, *Fra-1* e *Fra-2*) no núcleo *accumbens*, enquanto que a administração repetida leva à ativação de isoformas da Δ *FosB*, a forma mais estável da *FosB*, as quais se acumulam por longos períodos de tempo (dias) (NESTLER, 2005). De acordo com MCCLUNG *et al.* (2004), animais que apresentavam Δ *FosB* ativa exibiam alta sensibilidade aos efeitos de recompensa às drogas de abuso, caracterizando uma alteração molecular de manutenção do estado de dependência.

Figura 14. Regulação da expressão gênica pela dopamina e pelo glutamato. A estimulação de receptores dopaminérgicos subtipo 1 (D₁R) e glutamatérgicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDAR) ativa uma cascata de segundos mensageiros que culmina com a alteração da expressão gênica. O aumento de dopamina induzido pela cocaína estimula os receptores D₁R os quais elevam os níveis de AMP cíclico (AMPc) via ativação da adenililciclase pela subunidade catalítica (α) da proteína G. O AMP cíclico promove a ativação da proteína quinase A (PKA) a qual transloca para o núcleo celular e fosforila a proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB) que, quando fosforilada, leva à expressão gênica mediada pelo elemento de ligação ao AMP cíclico (CRE), por exemplo, dos receptores para glutamato. A entrada de cálcio pela ativação de NMDAR ativa uma proteína quinase dependente do complexo cálcio-calmodulina (CaMK) a qual também fosforila a

CREB. Há também a indução de fatores de transcrição da família *Fos* com a administração de cocaína, como o $\Delta FosB$. A atividade ligante do elemento ativador da proteína-1 (AP-1) dura semanas mesmo após o término de administração de droga. Essa atividade persistente é causada pela expressão de diferentes isoformas de $\Delta FosB$ as quais apresentam alta estabilidade (HYMAN *et al.*, 2006 e HAILE *et al.*, 2007).

Com base nas informações apresentadas anteriormente, sabe-se que a cocaína causa dependência e diversos estudos utilizam a sensibilização comportamental como modelo de estudo, sendo que, a principal alteração neuroquímica envolvida é o aumento de dopamina principalmente no núcleo *accumbens* e no estriado. A dependência causada pelo uso de *crack* parece ser mais intensa quando comparada a outra via de administração de cocaína (PIRES *et al.*, 2012). Vale ressaltar que o *crack* é uma droga devastadora, causando irritabilidade, depressão, atos de violência e perda de peso, além de causar prejuízos cognitivos, culminando com a deterioração funcional geral do usuário (FATTORE *et al.*, 2002; JAYALAKSHMI *et al.*, 2005). Esses efeitos podem ser explicados, em parte, pela ação da cocaína. No entanto, nada se sabe sobre a ação da AEME nesses processos.

2. Objetivo

2. Objetivo

Avaliar se a AEME exerce alguma influência na neuroadaptação que medeia a farmacodependência, por meio da sensibilização comportamental.

2.1. Estratégias experimentais

O projeto foi dividido em dois grandes experimentos: 1) *in vivo* e 2) *in vitro*.

Nos experimentos *in vivo*, foram realizados ensaios comportamentais em campo aberto para se avaliar a atividade locomotora:

- de animais expostos agudamente à AEME (1, 3, 10 e 30 mg/kg, intraperitoneal), para se definir uma dose para os demais ensaios;

- de animais expostos à AEME, à cocaína e à associação entre cocaína e AEME por período prolongado. Ao término desse ensaio, foram avaliadas as concentrações de dopamina no núcleo *accumbens* e caudado-putâmen, bem como foi coletado o sangue dos animais para se verificar a concentração plasmática de cocaína e AEME. É importante mencionar que o tempo de eutanásia foi definido de acordo com o pico de atividade locomotora;

- de animais expostos à AEME, à cocaína e à associação entre cocaína e AEME na sensibilização comportamental dependente de contexto. Ao término desse ensaio, foram avaliadas a expressão de p-CREB e CREB total no núcleo *accumbens* e caudado-putâmen, bem como foi coletado o sangue dos animais para se verificar a concentração plasmática de cocaína e AEME. Vale ressaltar que o tempo de eutanásia foi escolhido tendo como base os decursos temporais dessas proteínas após a administração aguda de AEME e cocaína.

Os experimentos *in vitro* foram realizados para verificar se há interação entre os receptores muscarínicos e a AEME, sendo que parte desses foi conduzida na

Vanderbilt University (Nashville, Tennessee, Estados Unidos) sob a orientação dos professores doutores Peter J. Conn e Collen M. Niswender e do Dr. Michael T. Klein.

3. Materiais e métodos

3. Materiais e métodos

3.1. Experimentos *in vivo*

3.1.1. Animais

O projeto foi previamente aprovado pelas comissões de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Comissão de Ética em Experimentação Animal – CEEA – protocolo número 259) e do Instituto Butantan (Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan – CEUAB – protocolo número 641/09) (vide anexos). Ratos *Wistar* adultos machos, de aproximadamente 250g, foram utilizados em todos os procedimentos experimentais.

3.1.2. AEME

Para os ensaios *in vivo*, a AEME foi sintetizada utilizando-se cocaína como material de partida, a qual foi gentilmente cedida pelo Núcleo de Exames de Entorpecentes do Instituto de Criminalística de São Paulo, para fins de pesquisa do Laboratório de Análises Toxicológicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Uma solução de cloridrato de cocaína foi refluxada em ácido clorídrico concentrado por 24 horas. Após o resfriamento à temperatura ambiente, a mistura foi diluída com água e extraída com éter dietílico para remoção do ácido benzoico. A fase aquosa foi evaporada sob vácuo até a secura. O sólido branco obtido foi então secado sob vácuo a 100°C por 24 horas (ZHANG *et al.*, 1997). O resíduo seco foi dissolvido em metanol absoluto e adicionou-se ácido clorídrico concentrado. A mistura foi aquecida e refluxada por aproximadamente 24 horas. Após este período, removeu-se o álcool sob vácuo e dissolveu-se o resíduo em uma pequena quantidade de água. A solução aquosa foi saturada com carbonato de potássio,

filtrada e extraída com éter. As frações orgânicas foram combinadas, secadas com sulfato de magnésio, filtradas e evaporadas sob vácuo, resultando em um líquido amarelado. O produto foi purificado por destilação a pressão reduzida e identificado por ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN- ^1H) e por espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* (ESI-MS) (KLINE *et al.*, 1990). Na análise por RMN- ^1H , o equipamento foi ajustado a 300 MHz e o solvente utilizado foi o metanol deuterado (CD_3OD). Os deslocamentos químicos (δ), obtidos em ppm, foram registrados em relação ao padrão interno, o trimetilsilano (TMS; δ 0,00 ppm): δ_{H} 6,93 (1H, s) referente ao átomo de H da dupla ligação; 3,79 (3H, s) referente à metoxila; 2,75 (3H, s) referente à metila ligada ao nitrogênio; 1,93 a 2,78 referente aos demais átomos de H do anel. O ESI-MS foi realizado em dois modos: no modo *scan* para verificação do íon *quasi* molecular, que representa normalmente a massa molecular da substância de interesse; e no de fragmentação desse íon, também conhecido como MS2, que quebra a molécula em fragmentos de massa molecular previsíveis, caracterizando a estrutura química. O resultado obtido revelou as seguintes relações massa/carga (m/z): 182 [$\text{M} + \text{H}^+$] (íon *quasi* molecular); 150 [$\text{M} - \text{OCH}_3$]; 122 [$\text{M} - \text{COOCH}_3$] (fragmentos mais abundantes) (GARCIA *et al.*, 2012).

A AEME utilizada no ensaios *in vitro* foi comprada por meio da empresa *Lipomed* pelo departamento de Farmacologia da Universidade *Vanderbilt* (VCNDD). A pureza da substância foi determinada por cromatografia gasosa e o resultado encontrado foi de $98,04 \pm 0,05\%$ (vide anexo).

3.1.3. Avaliação da atividade locomotora em campo aberto

A atividade locomotora dos animais foi avaliada, com auxílio de uma câmera e do programa *Ethovision*[®], pela observação direta em um campo aberto (uma arena

circular de madeira com 116 cm de diâmetro e 70 cm de altura, forrada com fórmica preta). O fundo da arena foi dividido por meio de três círculos em três partes que, por sua vez, foram subdivididas por segmentos de retas em dezenove partes aproximadamente iguais. Esse aparelho foi construído baseado naquele sugerido por BROADHURST (1960).

Após a avaliação da locomoção total (cm) de cada animal, o campo aberto foi limpo com uma solução alcoólica 5% antes da introdução do próximo animal para evitar possíveis rastros de odor deixados pelo anterior. Para evitar efeitos circadianos no comportamento dos animais, as observações foram realizadas sempre no período da manhã.

3.1.3.1. Exposição aguda à AEME

Quarenta animais foram divididos em cinco grupos: controle (salina 0,9%) e AEME nas seguintes doses: 1, 3, 10 e 30 mg/kg, dissolvidos em salina 0,9% e administrados por via intraperitoneal. Todos os animais foram habituados no aparelho no dia anterior ao teste, por 15 minutos, recebendo, cada um, uma solução salina 0,9% (1 mL/kg). Após a habituação, os animais foram alocados em seus grupos e avaliados após uma única exposição por 40 minutos.

3.1.3.2. Exposição prolongada

Os animais foram alocados em quatro grupos: controle (salina 0,9%), AEME (3 mg/kg dissolvidos em salina 0,9%), cocaína (15 mg/kg dissolvidos em salina 0,9%) e associação (cocaína 15 mg/kg e AEME 3 mg/kg, ambos dissolvidos em salina 0,9%). Todos os animais foram habituados no campo aberto, no dia anterior ao início do protocolo de exposição prolongada, por 15 minutos recebendo, cada um, uma

solução salina 0,9%. Após a habituação, os animais receberam uma dose intraperitoneal diária de cocaína, AEME ou da associação por 9 dias, sendo avaliados, em dias alternados, por 15 minutos em campo aberto, conforme a tabela 2.

Tabela 2. Delineamento experimental para a exposição prolongada.

Grupo	Dias de exposição									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Controle	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AEME	S	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Cocaína	S	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Associação	S	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA
Campo aberto	x	x		x		x		x		x

S = salina 0,9%; A = AEME 3 mg/kg; C = cocaína 15 mg/kg; CA = associação entre cocaína 15 mg/kg e AEME 3 mg/kg. Os animais foram submetidos à avaliação comportamental em *campo aberto* nos dias assinalados por um “x”. O dia de exposição “0” representa o período de habituação.

Os animais foram eutanasiados por decapitação 15 minutos após a última injeção (10º dia) para a remoção de estruturas encefálicas (núcleo *accumbens* e caudado-putâmen), as quais foram utilizadas para a determinação da concentração de dopamina.

3.1.3.3. Sensibilização comportamental dependente de contexto

Os animais foram alocados em quatro grupos conforme descrito anteriormente. Todos os animais foram habituados no aparelho no dia anterior ao início do protocolo, por 15 minutos, recebendo, cada um, uma solução salina 0,9%. Após a habituação, os animais foram alocados em seus grupos e avaliados, conforme a tabela 3, por 15 minutos em campo aberto.

Tabela 3. Delineamento experimental para a sensibilização comportamental dependente de contexto (adaptado de MATTSON *et al.*, 2008).

Grupo	Dias de exposição											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10-16	17
Controle		S		S		S		S		S		S
AEME		A		A		A		A		A		A
Cocaína	S	C	-	C	-	C	-	C	-	C	ABS	C
Associação		CA		CA		CA		CA		CA		CA
Campo aberto	x	x		x		x		x		x		x

S = salina 0,9%; A = AEME 3 mg/kg; C = cocaína 15 mg/kg; CA = associação entre cocaína 15 mg/kg e AEME 3 mg/kg. Os animais foram submetidos à avaliação comportamental em *campo aberto* nos dias assinalados por um “x”. O dia de exposição “0” representa o período de habituação. Os animais foram mantidos em abstinência (ABS) entre os dias 10 e 16.

Os animais foram eutanasiados por decapitação 60 minutos após a última injeção (17º dia) para a remoção do núcleo *accumbens* e do caudado-putâmen, os quais foram utilizados para a análise da expressão de p-CREB e CREB total. Vale ressaltar que esse tempo de eutanásia foi definido de acordo com o resultado obtido no decurso temporal dessas proteínas após a administração aguda de AEME 3 mg/kg e cocaína 15 mg/kg.

3.1.4. Determinação da concentração de dopamina e seus metabólitos

Este ensaio foi realizado de acordo com FELICIO *et al.* (1996) e FERRAZ-DE-PAULA *et al.* (2011).

3.1.4.1. Coleta das estruturas encefálicas e preparo do homogenato

Decorridos 15 minutos após a última injeção na exposição prolongada, os animais foram eutanasiados por decapitação para a remoção do encéfalo, o qual foi lavado com solução salina gelada (4°C). Posteriormente, as duas estruturas de

interesse, o núcleo *accumbens* e o caudado-putâmen, foram dissecadas sobre placa de gelo picado. Cada estrutura retirada foi submetida à pesagem em balança analítica, acondicionada em microtubos de centrifuga e estocada em freezer a -80°C para posterior homogeneização num período máximo de 17 dias. Este procedimento de coleta nunca excedeu 3 minutos por animal.

O núcleo *accumbens* e o caudado-putâmen foram homogeneizados com o auxílio de uma caneta sonicadora de alta frequência, na proporção de 15 e 20 vezes o seu peso, respectivamente, em uma solução de ácido perclórico 0,1M contendo 0,02% de metabissulfito de sódio, 0,02% de ácido etilenodiaminotetracético (sal dissódico) e 25 ng/mL de 3,4-dihidroxibenzilamina (padrão interno). Os homogenatos foram mantidos em refrigerador (2-8°C), por 24 horas, para a precipitação das proteínas e dos ácidos nucleicos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 *rpm*, por 30 minutos. O sobrenadante foi retirado, acondicionado em microtubos de centrifuga e estocado em freezer a -80°C, por até 30 dias, para a quantificação de dopamina e de seus metabólitos por cromatografia líquida.

3.1.4.2. Condições cromatográficas e padrões analíticos

As dosagens neuroquímicas foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector eletroquímico. Além do detector e do integrador, o sistema era composto de duas bombas injetoras, um sistema controlador (monitoramento de fluxo, pressão e temperatura), uma válvula injetora de 20 µL e um forno para manutenção da temperatura da coluna, todos da marca SHIMADZU®. Foi utilizado um sistema de fase reversa com pareamento iônico, composto por uma coluna C18 (150 × 4,6 mm) acoplada a uma pré-coluna e a um filtro de linha. A fase

móvel era formada por um sistema isocrático, composta por ácido cítrico (4,20 g/L), fosfato de sódio dibásico (7,16 g/L), ácido heptanossulfônico (556,0 mg/L), ácido etilenodiaminotetracético (sal dissódico – 40,0 mg/L) e metanol (80,0 mL/L). O pH foi ajustado para 3,0 com auxílio do ácido ortofosfórico. Essa solução foi filtrada a vácuo e degaseificada, por 30 minutos, sob fluxo de hélio. Posteriormente, todo o sistema foi estabilizado por uma noite (*overnight*), com fluxo de fase móvel constante (1,2 mL/minuto) circulando em sistema fechado. O potencial aplicado ao eletrodo de trabalho do detector eletroquímico foi de 0,83V e o forno foi mantido a uma temperatura constante de 45°C.

Os padrões (dopamina, ácido 3,4-dihidroxifenilacético e ácido homovanílico) foram preparados em uma solução de ácido clorídrico 0,1M contendo 0,02% de metabissulfito de sódio, de modo a obter uma concentração final de 1,0 mg/mL. Essas soluções foram estocadas a -80°C por um período de até dois meses. No momento da análise, os padrões foram descongelados e diluídos 2.500 a 20.000 vezes em ácido perclórico 0,1M contendo 25 ng/mL de 3,4-dihidroxifenilbenzamina, e filtrados em membranas descartáveis de 0,25 µm antes de serem injetados no cromatógrafo.

3.1.5. Expressão de p-CREB e CREB total

A expressão das proteínas p-CREB e CREB total foi avaliada pela técnica de *Western blot*. Os tecidos foram homogeneizados com tampão de lise tris-HCl 50mM pH 8,0 contendo NaCl 150mM, NP-40 1%, deoxicolato de sódio 0,5%, EDTA 1mM, coquetel inibidor de protease (cloridrato de benzamidina 16 µg/mL, fenantrolina 10 µg/mL, aprotinina 10 µg/mL, pepstatina A 10 µg/mL, leupeptina 10 µg/mL e PMSF 1mM) e coquetel inibidor de fosfatase (NaF 10mM, ortovanadato de sódio 1mM, β-

glicerofosfato de sódio 17,5mM e pirofosfato de sódio 6mM). Após este processo, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a $1.000 \times g$ e 4°C para a coleta do sobrenadante.

As amostras foram, posteriormente, diluídas com tampão tris-HCl 50mM de modo a obter 20 μg de proteína e, em seguida, foi acrescentado tampão de Laemmli (tris-HCl 0,0625M pH 6,8 contendo: SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,001% e 2-mercaptoetanol 5%). As amostras foram aquecidas a 99°C por 5 minutos e centrifugadas a $10.000 \times g$ por 1 minuto. As proteínas foram então separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% contendo lauril sulfato de sódio a 0,1% (*SDS-PAGE*), conforme originalmente descrito por LAEMMLI (1970).

Para a separação eletroforética das proteínas, foi utilizado tampão composto por tris-HCl 25mM, glicina 192mM e SDS 0,1% pH 8,3 e voltagem de 120V. As bandas proteicas foram, posteriormente, transferidas para uma membrana de nitrocelulose por meio de um sistema eletroforético submerso (100V) durante 1 hora. O tampão empregado para a transferência eletroforética das proteínas para a membrana de nitrocelulose era composto por tris-HCl 25mM, glicina 192mM, SDS 0,1% e etanol absoluto 18% (v/v). As membranas foram coradas com solução de vermelho de *Ponceau* (0,1% em ácido acético 5%), para comprovar a eficiência da transferência, e lavadas rapidamente com tampão TBS-t (tris-HCl 20mM, NaCl 137mM pH 7,4, contendo Tween-20 0,1%) para remover o excesso de corante.

As membranas foram incubadas com leite desnatado Molico[®] (Nestlé) 5% em TBS-t por 40 minutos sob agitação, para bloquear os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana. Em seguida, as membranas foram incubadas *overnight*, a 4°C , com anticorpos primários específicos – p-CREB (monoclonal de coelho, Cell Signaling, EUA) 1:1000 – diluídos em BSA 5% em tampão TBS-t. Após

o término da incubação, as membranas foram lavadas com tampão TBS-t (3 vezes durante 7 minutos) e incubadas com anticorpos secundários conjugados a enzimas (anticorpo policlonal de coelho na diluição 1:2000) durante 1 hora em temperatura ambiente e sob agitação. As membranas foram submetidas novamente a uma nova série de lavagens com TBS-t e as bandas imunorreativas foram reveladas por incubação com substratos específicos para as enzimas conjugadas aos anticorpos secundários, cujas reações envolvem emissão de quimioluminescência. As bandas foram detectadas por reagente de detecção *ECL plus Western Blotting* (GE Healthcare Bio-Science UK Limited, Little Shalfont, Buckinghamshire, UK) e expostas em filme fotográfico. Os filmes foram digitalizados em impressora (HP Photosmart C4280) e as intensidades das bandas imunorreativas foram comparadas, por análise densitométrica, com o auxílio do programa *ImageJ*.

As membranas foram, posteriormente, lavadas com TBS-t e submetidas a um processo de remoção do anticorpo primário ligado (*stripping*) e incubadas, por 30 minutos a 55°C sob agitação, com uma solução contendo 6,25 mL de tris-HCl 1M pH 6,8, 20 mL SDS 10%, 698 µL de β-mercaptoetanol e água Milli-Q (q.s.p.). Em seguida, as membranas foram lavadas com água destilada (cerca de 10 vezes) e bloqueadas com leite desnatado Molico[®] (Nestlé) 5% em TBS-t por 40 minutos sob agitação.

As membranas foram incubadas *overnight*, a 4°C, com anticorpos primários específicos – CREB (monoclonal de coelho, Cell Signaling, EUA) 1:1000 – diluídos em BSA 5% em tampão TBS-t. Após o término da incubação, as membranas foram lavadas com tampão TBS-t (3 vezes durante 7 minutos) e incubadas com anticorpos secundários conjugados a enzimas (anticorpo policlonal de coelho na diluição 1:2000) durante 1 hora em temperatura ambiente e sob agitação. As membranas

foram submetidas novamente a uma nova série de lavagens com TBS-t e as bandas imunorreativas foram reveladas por incubação com substratos específicos para as enzimas conjugadas aos anticorpos secundários, cujas reações envolvem emissão de quimioluminescência. As bandas foram detectadas por reagente de detecção *ECL plus Western Blotting* (GE Healthcare Bio-Science UK Limited, Little Shalfont, Buckinghamshire, UK) e exposta em filme fotográfico. Os filmes foram digitalizados em impressora (HP Photosmart C4280) e as intensidades das bandas imunorreativas foram comparadas, por análise densitométrica, com o auxílio do programa *ImageJ*.

As membranas foram então lavadas com TBS-t e submetidas a um novo *stripping*, conforme descrito anteriormente, e lavadas com água destilada (cerca de 10 vezes) e bloqueadas com leite desnatado Molico® (Nestlé) 5% em TBS-t por 40 minutos sob agitação.

Por fim, as membranas foram incubadas *overnight*, a 4°C, com anticorpos primários específicos para uma proteína constitutiva que não altera com o tratamento – β -actina (monoclonal de camundongo, Cell Signaling, EUA) 1:5000 – diluídos em leite desnatado Molico® (Nestlé) 5% em TBS-t. Após o término da incubação, as membranas foram lavadas com tampão TBS-t (3 vezes durante 7 minutos) e incubadas com anticorpos secundários conjugados a enzimas (anticorpo policlonal de camundongo na diluição 1:2000) durante 1 hora em temperatura ambiente e sob agitação. As membranas foram submetidas novamente a uma nova série de lavagens com TBS-t e as bandas imunorreativas foram reveladas por incubação com substratos específicos para as enzimas conjugadas aos anticorpos secundários, cujas reações envolvem emissão de quimioluminescência. As bandas foram detectadas por reagente de detecção *ECL plus Western Blotting* (GE

Healthcare Bio-Science UK Limited, Little Shalfont, Buckinghamshire, UK) e expostas em filme fotográfico. Os filmes foram digitalizados em impressora (HP Photosmart C4280) e as intensidades das bandas imunorreativas foram comparadas, por análise densitométrica, com o auxílio do programa *ImageJ*.

O peso molecular das bandas foi calculado a partir das mobilidades relativas de proteínas marcadoras de peso molecular (faixa de 7 a 195 kDa; Bio Rad, EUA). Posteriormente, foram calculadas as relações p-CREB/ β -actina, CREB/ β -actina e p-CREB/CREB, todas expressas em porcentagem em relação ao controle.

3.1.5.1. Decurso temporal de fosforilação da CREB: experimento agudo com AEME 3 mg/kg e cocaína 15 mg/kg

Os animais (n=5) receberam agudamente AEME 3 mg/kg ou cocaína 15 mg/kg. Em seguida, foram eutanasiados após 15, 45, 60 e 90 minutos com a finalidade de se verificar a expressão de p-CREB e CREB total no núcleo *accumbens* e no caudado-putâmen.

3.1.5.2. Expressão das proteínas após a sensibilização comportamental dependente de contexto

No último dia do ensaio de sensibilização comportamental dependente de contexto (17º dia), os animais foram desafiados com suas respectivas substâncias (AEME 3 mg/kg, cocaína 15 mg/kg ou a associação entre cocaína e AEME) e eutanasiados após 60 minutos para verificar a expressão de p-CREB e CREB total no núcleo *accumbens* e caudado-putâmen.

3.1.6. Determinação da concentração de AEME e cocaína plasmática

3.1.6.1. Coleta da amostra

Após a eutanásia, o sangue dos animais, tanto da exposição prolongada quanto do ensaio de sensibilização dependente de contexto, foi coletado em tubos contendo heparina (2 U/mL de sangue) e submetido à centrifugação (10.000 *rpm* / 5 minutos) para a separação e posterior coleta do plasma, o qual foi armazenado com NaF 2%.

3.1.6.2. Extração em fase sólida

As amostras de plasma foram submetidas à extração em fase sólida com cartuchos *Bond ElutCertify* (Varian®) previamente condicionados com metanol e tampão fosfato 0,1M pH 6,0. Foram utilizados 6 mL de água MilliQ, 3 mL de ácido clorídrico 0,1M e 9 mL de metanol para retirada de impurezas e interferentes adsorvidos ao cartucho. Os analitos de interesse foram eluídos utilizando-se uma solução contendo diclorometano, isopropanol e hidróxido de amônio (12:3:0,3) recentemente preparada. Após a secagem do solvente sob fluxo de nitrogênio à temperatura de 40°C, o resíduo foi ressuspendido com 50 µL de acetonitrila (YONAMINE & SILVA, 2002).

3.1.6.3. Condições cromatográficas

Foi utilizado um equipamento de cromatografia em fase gasosa com detecção de nitrogênio e fósforo (CG-DNP) nas seguintes condições:

- ✓ Injetor: 250°C. Split 10:1. Fluxo total: 7,6 mL/minuto;
- ✓ Gás de arraste: nitrogênio;

- ✓ Forno: 148°C (1 minuto); 10°C/minuto até 200°C; 20°C/minuto até 270°C (7 minutos);
- ✓ Detector: 280°C. H₂ (3,0 mL/minuto) e ar (60 mL/minuto);
- ✓ Coluna: Ultra 2 (fenil metil siloxano). Dimensões: 25m x 200µm x 0,33µm. Fluxo: 0,5 mL/minuto;
- ✓ Volume de injeção: 1 µL.

3.1.6.4. Validação do método

Conforme o *Guia de Validação Analítica para Testes de Drogas Ilícitas* da UNODC (2009), foram estabelecidos os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) e a linearidade.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados por meio da análise de amostras contendo quantidades decrescentes do analito, até o menor nível detectável e com coeficiente de variação superior a 20% para o LD e 10% para o LQ. Para cada nível avaliado foram analisadas 6 replicatas.

A linearidade foi testada em uma faixa de 40 a 1.200 ng/mL, realizada em seis replicatas para cada analito.

3.1.6.5. Preparo das amostras

A 200 µL de amostra foi adicionado benzoilecgonina isopropil éster (padrão interno) (CERILLIANT[®]) de modo a obter uma concentração final de 400 ng/mL. Posteriormente, foi adicionada uma solução tampão fosfato 0,1 M pH 6,0 de modo a se obter 2 mL.

3.2. Experimentos *in vitro*

3.2.1. *Ligação aos receptores muscarínicos (binding) em hipocampo*

Este experimento foi realizado no Instituto Butantan com a colaboração do Dr. Fernando M. F. Abdalla, o qual apresenta autorização para manusear substâncias radioativas. Vale ressaltar que o hipocampo é uma estrutura encefálica que expressa os cinco subtipos de receptores muscarínicos (M_1 a M_5) e por isso foi utilizada nestes ensaios (LEVEY, 1993).

3.2.1.1. *Isolamento de hipocampo de ratos*

Seis animais de aproximadamente 90 dias foram decapitados para remoção do hipocampo. Após a abertura da caixa craniana, o hipocampo foi dissecado e lavado com tampão Tris-HCl 25mM pH 7,4 contendo sacarose 0,3M, $MgCl_2$ 5mM, EDTA 1mM e PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) 1mM a 4°C para a preparação de membranas semipurificadas.

3.2.1.2. *Preparação das membranas semipurificadas*

Os hipocampos foram homogeneizados em tampão Tris-HCl 25mM pH 7,4, como mencionado anteriormente, empregando-se o homogeneizador “*Ultra-Turrax*” a 9.500 *rpm*, durante 2 vezes, por 30 segundos. O homogenato foi centrifugado a 3.000 *rpm* por 10 minutos. O sobrenadante foi separado e filtrado em camada dupla de gaze. O precipitado foi ressuspensionado no mesmo tampão, novamente homogeneizado, centrifugado e filtrado nas mesmas condições anteriormente descritas. O conjunto dos sobrenadantes obtido foi centrifugado a 37.000 *rpm* durante 60 minutos (PORTO *et al.*, 1992). O precipitado foi ressuspensionado em tampão Tris-HCl 25mM (pH 7,4) contendo $MgCl_2$ 5mM, EDTA 1mM e PMSF 1mM,

com o auxílio de um homogeneizador “Dounce” (CARDOSO *et al.*, 2004). Todo o processo de obtenção da membrana foi realizado a 4°C e a estocagem da membrana foi realizada a -80°C.

A concentração de proteína foi determinada em alíquotas das suspensões de membranas do hipocampo (BRADFORD, 1976).

3.2.1.3. Ensaio de competição com radioligante

A preparação de membranas de hipocampo foi diluída em tampão Tris-HCl 25mM (pH 7,4) contendo MgCl₂ 5mM, EDTA 1mM e PMSF 1mM, de modo a obter uma concentração proteica de 1 µg/µL. O equivalente a 100 µg de proteína foi incubado com 1nM de [³H]QNB (quinuclidinil benzilato triciado), concentração próxima à constante de dissociação (K_d) previamente obtida (CARDOSO *et al.*, 2004), por 1 hora e à 30°C, na ausência (grupo controle) e na presença de concentrações crescentes de atropina, um antagonista não seletivo de receptores muscarínicos (grupo controle das preparações de membrana), e de AEME (grupo experimental). As concentrações de atropina variaram de 10⁻¹¹ a 10⁻³M, enquanto que as concentrações de AEME variaram de 10⁻⁹ a 10⁻²M. O volume final da reação foi de 500 µL. A reação foi interrompida pela adição de 1 mL de solução tampão fosfato em salina (PBS pH 7,2) gelado (4°C), seguida de rápida filtração sob vácuo utilizando filtros de microfibras de vidro *Whatman*[®] com 24 mm de diâmetro. Posteriormente, os filtros foram lavados 3 vezes com 1 mL de PBS gelado e transferidos para frascos contendo 5 mL de líquido de cintilação (*Optiphase HiSafe 3 PerkinElmer*[®]). A radioatividade, expressa em *dpm* (desintegração por minuto), foi determinada em contador β. O cálculo foi realizado expressando a porcentagem de [³H]QNB ligado em relação ao controle (ausência de ligante) (CARDOSO *et al.*,

2004; SHEFFLER *et al.*, 2009). Nos experimentos de competição, o valor da IC₅₀ (concentração do antagonista capaz de inibir em 50% a ligação do radioligante) foi determinado por meio da análise de regressão não linear (GraphPad Prism) para a obtenção da constante de inibição (K_i) pela equação de CHENG & PRUSOFF (1973):

$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + [R]/K_d}$	onde [R] corresponde à concentração do radioligante e K _d é a constante de dissociação.
-------------------------------------	--

A potência da ligação foi expressa através do valor de pK_i, isto é, do logaritmo negativo de K_i.

3.2.2. Experimentos em células CHO

Como o ensaio anterior não define a afinidade e tampouco o efeito da AEME, foram realizados experimentos envolvendo células de ovário de *hamster* chinês, ou células CHO (do Inglês, **Chinese Hamster Ovary**). Esses experimentos foram realizados no Centro para Descoberta de Fármacos para Neurociência (*Vanderbilt Center for Neuroscience Drug Discovery, VCNDD*), localizado no departamento de Farmacologia da *Vanderbilt University* (Nashville, Tennessee, Estados Unidos), sob a orientação dos Profs. Drs. Peter J. Conn e Collen M. Niswender e do Dr. Michael T. Klein.

3.2.2.1. Cultura de células CHO

Células CHO, expressando individualmente os cinco subtipos de receptores muscarínicos de ratos (rM₁ a rM₅, do Inglês, “*r*” de *rat*), foram adquiridas da ATCC (**American Type Culture Collection**; Manassas, Virginia, Estados Unidos) e cultivadas em placas de 150 mm de diâmetro, de acordo com as recomendações do fabricante.

Nos ensaios de mobilização de cálcio intracelular, as células expressando rM₂ e rM₄ foram transfectadas com uma proteína G quimérica (Gqi5) utilizando *Lipofectamine 2000*[®] (Invitrogen). Vale ressaltar que a transfecção tornou possível a realização de ensaios funcionais (mobilização de cálcio intracelular) nesses subtipos, uma vez que a transdução do sinal desses receptores não envolve a liberação de cálcio.

As células expressando rM₁, rM₃ e rM₅ foram mantidas em meio contendo:

Reagente	Volume	Concentração final
Meio F-12 <i>Ham</i> (1x)	500 mL	-
Soro fetal bovino	56 mL	10%
<i>Glutamax</i> [®] (100X)	2,5 mL	0,5X
HEPES (1 M)	10 mL	20mM
G418 sulfato (50 mg/mL)	5,6 mL	500 µg/mL
Antibiótico-antimicótico (100X)	5,6 mL	1X

O mesmo meio, acrescido de 2,24 mL de higromicina B 50 mg/mL (concentração final: 200 µg/mL), foi utilizado para as células expressando rM₂ e rM₄ (SHEFFLER *et al.*, 2009). As células foram mantidas em estufa (37°C e 5% de CO₂) até atingirem a confluência e utilizadas de acordo com os experimentos.

3.2.2.2. *Ligação aos receptores muscarínicos (binding)*

Preparo das membranas:

O meio de cultura foi removido da placa de 150 mm e as células foram lavadas com 5 mL de uma solução tampão fosfato salina (PBS, contendo HEPES 20mM). As células foram então removidas da placa, com o auxílio de um “rodinho” (*scraper*) e 10 mL de PBS, e transferidas para um tubo de centrífuga. Posteriormente, foram adicionados 5 mL de PBS na placa para a completa remoção das células e o conteúdo foi transferido para o tubo de centrífuga. As células foram centrifugadas a 2.000 × *g* por 5 minutos a 4°C. Delicadamente, o sobrenadante foi desprezado e

foram adicionados 10 mL de tampão para preparo de membrana gelado (composição: HBSS – *Hank's Balanced Salt Solution*, HEPES 20mM, NaHCO₃ 4,17mM e EDTA dissódico 0,5mM, pH 7,4) por placa. As células foram homogeneizadas, por 10 segundos, com o auxílio do homogeneizador *Polytron*[®], e submetidas à centrifugação (20.000 × *g* por 20 minutos a 4°C). A homogeneização foi repetida mais duas vezes, totalizando três homogeneizações. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente removido para a adição de 1 mL de tampão para preparo de membrana gelado por placa, seguida de nova homogeneização. Alíquotas de 1 mL foram armazenadas em microtubos de centrífuga e congeladas a -20°C. Foi separado também cerca de 100 µL de cada homogenato para a determinação da concentração de proteína.

Ensaio de saturação com radioligante:

Primeiramente, todos os compostos foram preparados em tampão HBSS (semelhante ao tampão para preparo de membrana descrito anteriormente, sem a adição de EDTA), a saber: veículo (DMSO 0,05%), atropina 5µM e [³H]NMS (N-metil-escopolamina triciada) em diversas concentrações (as concentrações variaram de 10⁻¹² a 10⁻⁸M). Posteriormente, as membranas foram descongeladas, centrifugadas a 14.000-20.000 × *g* por 10 minutos a 4°C e homogeneizadas em tampão HBSS. Uma alíquota do homogenato foi separada para a determinação da concentração proteica.

O equivalente a 12,5 µg de proteína foi incubado da seguinte maneira, na ordem indicada, em placa de 96 poços (capacidade máxima: 2 mL/poço):

Reagente	Volume (μL)/poço
Veículo ou atropina	100
Membrana	300
[³ H]NMS (10 ⁻¹² a 10 ⁻⁸ M)	100

A placa foi devidamente selada e foi feita a incubação, sob agitação, a temperatura ambiente por 3 horas. Decorrido esse período, a reação foi interrompida com a adição de tampão Tris-HCl 50mM pH 7,4 (contendo NaCl 0,9%) gelado e o conteúdo foi filtrado em placa de 96 poços contendo filtros de microfibras de vidro (*PerkinElmer*®), previamente umedecidos com o tampão (placa amostra). A placa foi lavada três vezes com o mesmo tampão para remover o excesso de radioligante não ligado. Todo esse procedimento foi realizado em um equipamento que utiliza um sistema a vácuo para essa filtração (*Brandel Harvester*®). Em outra placa de microfibras de vidro de 96 poços (placa padrão), foram adicionados, após a selagem do fundo da mesma, 50 μL de cada solução de radioligante em triplicata. As placas foram mantidas em uma capela, durante pelo menos uma noite, para completa secagem dos filtros. Decorrido o período de secagem, o fundo da placa amostra foi devidamente selado, da mesma maneira que a placa padrão. Foram adicionados 45 μL de fluido de cintilação (*Microscint*TM 20) e, finalmente, as placas foram seladas por cima e deixadas em equilíbrio por, aproximadamente, 3 horas. A radioatividade, expressa em *cpm* (contagem por minuto), foi determinada em contador β (*TopCount NXT – PerkinElmer*®).

Ensaio de competição com radioligante:

Primeiramente, a atropina e a AEME foram preparadas em tampão HBSS contendo DMSO 0,25% em diversas concentrações, que variaram de 10⁻¹² a 10⁻⁸ M para ambos. As demais etapas, tais como preparação da membrana, interrupção da

reação, filtração e contagem, foram realizadas de maneira semelhante ao item anterior. A incubação também foi realizada da mesma maneira, entretanto, os reagentes foram adicionados em placa de 96 poços (capacidade máxima: 2 mL/poço) na seguinte ordem:

Reagente	Volume (μ L)/poço
Acetilcolina, AEME ou atropina	200
Membrana	200
[3 H]NMS	100

O cálculo foi realizado de maneira semelhante ao estudo feito com membranas de hipocampo, desta vez expressando a porcentagem de [3 H]NMS ligado em relação ao controle. Da mesma forma, o valor da IC₅₀ foi determinado por meio da análise de regressão não linear (GraphPad Prism) para a obtenção do K_i (equação de CHENG & PRUSOFF, 1973) e do pK_i.

3.2.2.3. Mobilização de cálcio intracelular

No dia anterior ao experimento, as células foram removidas da placa de 150 mm de diâmetro com uma solução de PBS contendo EDTA 0,53mM. As células foram mantidas nessa solução em estufa por 10 minutos para garantir a remoção das mesmas. Posteriormente, o conteúdo foi centrifugado (1.500 $\times$ g por 3 minutos) para a remoção do sobrenadante e adição de 10 mL de meio de cultura, descrito anteriormente.

Após a contagem em câmara de *Neubauer*, foram plaqueadas 60.000 células/100 μ L de meio/poço em placas de cultura de 96 poços, pretas, de fundo incolor e previamente tratadas com poli-D-lisina (*Greiner*[®]). As placas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ durante uma noite (período máximo: 24 horas).

No dia do experimento, o meio foi removido dos poços vertendo-se a placa. As células foram lavadas com tampão de ensaio (100 mL de HBSS 10X, 20 mL de HEPES 1M, 350 mg de NaHCO_3 , 712 mg de probenecida solubilizada em 5 mL de NaOH 1M e água Milli-Q q.s.p. 1L, pH 7,4) e incubadas em estufa, a 37°C e 5% de CO_2 por 45-60 minutos, com 40 μL de uma solução de corante Fluo-4 (*Invitrogen*) 2,3 μM , misturado na proporção 1:1 com 10% de ácido plurônico. Decorrido esse período, o corante foi removido da placa, as células foram lavadas e mantidas em tampão de ensaio (60 μL) a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, a adição das substâncias de interesse e a medida da fluorescência ($\lambda_{\text{excitação}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emissão}} = 525 \text{ nm}$) foi realizada no equipamento *FlexStation II* (*Molecular Devices*). A velocidade de adição dos compostos e a temperatura utilizada foram 52 $\mu\text{L}/\text{segundo}$ e 25°C, respectivamente.

Para verificar se a AEME apresenta atividade agonista nos diferentes subtipos de receptores muscarínicos, foram realizadas curvas concentração-resposta de AEME (as concentrações variaram entre 10^{-9} e $10^{-3,5}\text{M}$) e, como controle positivo, acetilcolina (10^{-9} e 10^{-3}M). As substâncias foram preparadas em uma concentração três vezes maior, sendo que 30 μL de cada uma foi adicionada às células 30 segundos após o início da coleta de dados. A aferição da fluorescência foi mantida por, pelo menos, 120 segundos para se detectar a resposta máxima.

Para verificar a influência da AEME sobre a resposta da acetilcolina nos diferentes subtipos de receptores muscarínicos (adição dupla), as células foram incubadas com uma solução de AEME 100 μM (concentração final) 20 segundos após o início da coleta de dados. Decorridos 100 segundos após a adição de AEME, as células foram incubadas com diferentes concentrações de acetilcolina (curva

concentração-resposta: 10^{-9} e 10^{-3} M). A aferição da fluorescência foi realizada por, pelo menos, 200 segundos a fim de se detectar a resposta máxima.

Todos os picos de resposta ao cálcio foram normalizados pela concentração máxima efetiva ($EC_{máx}$) obtida pela acetilcolina (SHEFFLER *et al.*, 2009).

3.3. Determinação da concentração proteica

A determinação da concentração de proteínas foi realizada utilizando-se o método de BRADFORD (1976), cujo princípio consiste na adição de um corante ácido a uma solução de proteínas e subsequente aferição da absorbância do complexo formado em 595 nm. A concentração foi determinada pela comparação com uma curva padrão de albumina de soro bovino.

3.4. Análise estatística

Os resultados da administração prolongada e da sensibilização comportamental dependente de contexto foram comparados pela análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni. Para a análise dos demais ensaios comportamentais e também na determinação da expressão de p-CREB e CREB após a sensibilização comportamental dependente de contexto foi realizada ANOVA de uma via, seguida do teste *post hoc* de Newman-Keuls. O decurso temporal de fosforilação da CREB e a determinação da concentração plasmática de AEME e cocaína foram analisados por meio do teste *U* de Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas significativas para o valor $p < 0,05$. Os resultados dos ensaios *in vitro* foram plotados e analisados por meio do *software* GraphPad Prism 6.0. Os valores numéricos foram colocados sob a forma *média ± erro padrão da média*.

4. Resultados

4. Resultados

4.1. Experimentos *in vivo*

4.1.1. Avaliação da atividade locomotora em campo aberto

Os gráficos da figura 15 representam a distância total percorrida (cm) de diferentes concentrações de AEME administradas agudamente. Embora todas as doses testadas tenham aumentado discretamente a atividade locomotora dos animais ($F_{4, 35}=3,14$; $p=0,026$), não foi observada uma correlação entre o aumento da locomoção com doses crescentes da substância. Esse teste agudo foi realizado com a finalidade de se escolher uma dose de AEME (baixa a intermediária) para os demais ensaios comportamentais.

Figura 15. Distância total percorrida (cm) após a administração aguda de diferentes doses de AEME: 1, 3, 10 e 30 mg/kg ($n=8$). (A) Os animais foram avaliados no campo aberto em intervalos de 5 minutos durante 40 minutos. (B) Gráfico representativo do efeito da AEME na atividade locomotora 5 minutos após a administração intraperitoneal e analisada por 10 minutos. AEME: metilecgonidina. * $p<0,05$ comparado ao grupo salina (ANOVA e comparação múltipla de Newman-Keuls).

Na figura 16, pode-se observar o efeito dos quatro grupos experimentais, a saber: salina, AEME 3 mg/kg, cocaína 15 mg/kg e a associação (cocaína 15 mg/kg e AEME 3 mg/kg), na atividade locomotora durante o teste prolongado. Os primeiros cinco minutos foram desprezados, uma vez que não se mostraram estatisticamente

relevantes (Figura 16A). Com exceção do terceiro dia de avaliação ($F_{3, 44}=12,93$; $p<0,001$), os animais tratados com AEME foram estatisticamente distintos dos animais do grupo salina a partir do primeiro dia ($F_{3, 44}=21,56$; $p<0,001$), enquanto que os animais que receberam cocaína ou a associação apresentaram diferença a partir do primeiro dia (Figura 16B). Utilizando a análise de medidas repetidas seguida do teste de comparação múltipla de Bonferroni, foram observadas apenas efeito entre os grupos ($F_{3, 44}=99,74$; $p<0,001$) mas não interação entre os grupos e os dias ($F_{4, 176}=0,862$; $p=0,488$).

Figura 16. Distância total percorrida (cm) após a administração prolongada de salina, AEME 3 mg/kg, cocaína 15 mg/kg e a associação (cocaína 15 mg/kg e AEME 3 mg/kg) no período de 0 a 5 (A) e de 5 a 15 minutos (B) de avaliação em campo aberto (n=12). A linha pontilhada separa o “dia 0”, representando a habituação “H”, no qual os animais receberam apenas salina, dos dias testes. (C) Representação do gráfico de barras (B) em pontos e linhas conectoras. Para facilitar a visualização, a estatística foi representada apenas nos gráficos de barras (A e B). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

e *** $p < 0,001$ comparado ao grupo salina. AEME: metilecgonidina (ANOVA e comparação múltipla de Newman-Keuls).

A figura 17 mostra a distância total percorrida (cm) após o ensaio de sensibilização comportamental dependente de contexto. Foi observado efeito entre os grupos ($F_{3, 44}=61,10$; $p < 0,001$) e interação entre os grupos e os dias ($F_{5, 220}=2,894$; $p=0,015$). Foi observado um aumento da atividade locomotora desde o primeiro dia de avaliação em campo aberto para os animais que receberam cocaína e associação entre cocaína e AEME. Porém, não foi observada alteração significativa para o grupo da AEME.

Tanto a cocaína quanto a associação entre cocaína e AEME exibiram um aumento maior da atividade locomotora no desafio (dia 17) quando comparado ao primeiro dia (dia 1) de avaliação. Mais ainda, o grupo da associação no dia 17 foi estatisticamente diferente do grupo da cocaína no dia 1 e 17.

Figura 17. Distância total percorrida (cm) após o protocolo de sensibilização comportamental dependente de contexto. (A) Os animais receberam as drogas em dias alternados, as quais foram pareadas com a avaliação em campo aberto ($n=12$). A linha pontilhada separa o “dia 0”, representando a habituação “H”, no qual os animais receberam apenas salina, dos dias testes. O “dia 17” representa o desafio, onde as drogas foram administradas 7 dias após o período de abstinência. (B) Representação do gráfico de barras (A) em pontos e linhas conectoras. Para facilitar a visualização, a estatística foi representada apenas no gráfico de barras (A) * $p<0,05$; ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ comparado ao grupo salina; ^a $p<0,01$ para o grupo cocaína dia 17 em comparação ao grupo cocaína dia 1; e ^b $p<0,001$ para o grupo associação dia 17 em comparação ao grupo associação dia 1 e $p<0,05$ para o grupo associação dia 17 em comparação ao grupo cocaína dia 17. AEME: metilecgonidina (ANOVA medidas repetidas, seguida do teste de Bonferroni).

4.1.2. Determinação da concentração de dopamina e de seus metabólitos

As concentrações de dopamina, ácido 3,4-dihidroxifenilacético e ácido homovanílico foram determinadas no caudado-putâmen e núcleo accumbens 15 minutos após o último dia de administração das drogas no teste prolongado.

No caudado-putâmen (Tabela 4), foi observado um aumento na concentração de dopamina em todos os grupos quando comparados ao grupo salina ($F_{3, 44}=12,25$; $p<0,001$), sendo que o grupo da associação obteve uma concentração superior ao grupo da cocaína e da AEME ($p<0,05$). Foi observado ainda um aumento nas concentrações de ácido 3,4-dihidroxifenilacético ($F_{3, 44}=22,18$; $p<0,001$) e ácido homovanílico ($F_{3, 44}=6,66$; $p<0,001$) em todos os grupos quando comparados ao grupo salina, sem alterar os respectivos *turnovers* (ácido 3,4-dihidroxifenilacético/dopamina: $F_{3, 44}=2,21$; $p=0,101$; e ácido homovanílico/dopamina: $F_{3, 44}=1,56$; $p=0,212$).

Tabela 4. Concentração de dopamina, ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA), expressos em ng/g de tecido, e *turnover* de dopamina, expresso pelas relações DOPAC/dopamina e HVA/dopamina, no caudado-putâmen após nove dias de administração de salina, AEME 3 mg/kg, cocaína 15 mg/kg e a associação entre cocaína 15 mg/kg e AEME 3 mg/kg (n=12).

Concentração de dopamina, DOPAC e HVA, expresso em ng/g de tecido (média $\pm$ erro)				
	Salina	AEME 3 mg/kg	Cocaína 15 mg/kg	Associação
Dopamina	5497,3 $\pm$ 432,9	7317,7 $\pm$ 841,4* [#]	8196,5 $\pm$ 284,7*** [#]	9530,4 $\pm$ 297,9*** [#]
DOPAC	569,6 $\pm$ 32,6	815,8 $\pm$ 77,8**	909,3 $\pm$ 64,0***	738,3 $\pm$ 17,4*
HVA	379,2 $\pm$ 20,4	451,8 $\pm$ 29,0*	492,2 $\pm$ 20,1***	496,1 $\pm$ 11,6**
Turnover, expresso como DOPAC/dopamina e HVA/dopamina				
DOPAC/dopamina	0,104 $\pm$ 0,010	0,112 $\pm$ 0,017	0,111 $\pm$ 0,009	0,077 $\pm$ 0,003
HVA/dopamina	0,069 $\pm$ 0,007	0,062 $\pm$ 0,008	0,060 $\pm$ 0,003	0,052 $\pm$ 0,002
* $p<0,05$; ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ comparado ao grupo salina. [#] Os grupos AEME e cocaína foram estatisticamente diferentes do grupo associação ($p<0,05$). AEME: metilecgonidina (ANOVA e comparação múltipla de Newman-Keuls).				

No núcleo *accumbens* (Tabela 5), houve aumento da concentração de dopamina apenas nos grupos cocaína e associação ($F_{3, 44}=8,42$; $p<0,001$), os quais foram estatisticamente diferentes do grupo AEME ($p<0,05$ e $p<0,01$, respectivamente). Foi observado um aumento da concentração de ácido 3,4-dihidroxifenilacético apenas no grupo AEME ($F_{3, 44}=7,41$; $p<0,001$), a qual foi

estatisticamente diferente do grupo cocaína ($p<0,01$) e associação ($p<0,001$). Já o ácido homovanílico aumentou apenas no grupo cocaína ($F_{3, 44}=11,56$; $p<0,001$), sendo estatisticamente diferente do grupo associação ($p<0,01$). A relação ácido 3,4-dihidroxifenilacético/dopamina aumentou no grupo AEME e diminuiu no grupo associação ($F_{3, 44}=8,18$; $p<0,001$). Ainda, o grupo AEME foi estatisticamente diferente dos grupos cocaína ($p<0,01$) e associação ($p<0,001$). A relação ácido homovanílico/dopamina diminuiu apenas no grupo associação ($F_{3, 44}=5,40$; $p=0,003$), a qual foi estatisticamente diferente dos grupos cocaína ($p<0,05$) e AEME ($p<0,01$).

Tabela 5. Concentração de dopamina, ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA), expressos em ng/g de tecido, e *turnover* de dopamina, expresso pelas relações DOPAC/dopamina e HVA/dopamina, no núcleo *accumbens* após nove dias de administração de salina, AEME 3 mg/kg, cocaína 15 mg/kg e a associação entre cocaína 15 mg/kg e AEME 3 mg/kg ($n=12$).

Concentração de dopamina, DOPAC e HVA, expresso em ng/g de tecido (média $\pm$ erro)				
	Salina	AEME 3 mg/kg	Cocaína 15 mg/kg	Associação
Dopamina	1237,2 $\pm$ 132,3	1540,6 $\pm$ 208,0 ^{a, b}	2463,1 $\pm$ 309,2 ^{**a}	2868,2 $\pm$ 231,6 ^{***b}
DOPAC	413,7 $\pm$ 42,4	822,7 $\pm$ 135,6 ^{**b, c}	474,4 $\pm$ 81,9 ^b	295,9 $\pm$ 27,7 ^c
HVA	130,6 $\pm$ 13,8	190,6 $\pm$ 25,8 ^{*b}	236,1 $\pm$ 13,5 ^{***c}	110,3 $\pm$ 7,4 ^{b, c}
Turnover, expresso como DOPAC/dopamina e HVA/dopamina				
DOPAC/dopamina	0,334 $\pm$ 0,050	0,534 $\pm$ 0,114 ^{*b, c}	0,193 $\pm$ 0,041 ^b	0,103 $\pm$ 0,013 ^{*c}
HVA/dopamina	0,106 $\pm$ 0,016	0,124 $\pm$ 0,024 ^b	0,096 $\pm$ 0,013 ^a	0,038 $\pm$ 0,004 ^{*a, b}
* $p<0,05$; ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ comparado ao grupo salina. Os grupos foram estatisticamente diferentes entre si com valores p menor que: 0,05 (^a); 0,01 (^b); e 0,001 (^c). AEME: metilecgonidina (ANOVA e comparação múltipla de Newman-Keuls)				

4.1.3. Expressão de p-CREB e CREB total

A figura 18 mostra filmes representativos da análise da expressão das proteínas p-CREB, CREB e β -actina indicados por seus respectivos pesos moleculares.

Figura 18. Filmes representativos de géis de *Western Blot* obtidos durante a análise da expressão de: (A) p-CREB (banda destacada pela seta: 43 kDa); (B) CREB (43 kDa) e (C) β -actina (45 kDa).

Os gráficos a seguir referem-se ao decurso temporal de fosforilação da CREB após a injeção aguda de AEME 3 mg/kg, sendo que as figuras 19 e 20 correspondem ao resultado obtido no caudado-putâmen e no núcleo *accumbens*, respectivamente.

Após 15 e 45 minutos, não foram observadas alterações significativas na expressão das proteínas no caudado-putâmen com a administração de AEME. Decorridos 60 minutos após a administração de AEME, foi observado um decréscimo na expressão de CREB e um aumento da relação p-CREB/CREB (Figura 19A), evidenciando um desequilíbrio entre as formas fosforilada e total. Noventa minutos após a administração de AEME, foi constatado um aumento na expressão da forma fosforilada, mantendo o desequilíbrio entre p-CREB/CREB (Figura 19B).

Figura 19. Decurso temporal da expressão da p-CREB e CREB, e da relação p-CREB/CREB no caudado-putâmen de ratos *Wistar* adultos após a administração aguda de AEME 3 mg/kg (n=5). AEME diminuiu a expressão de CREB após 60 minutos (A) e induziu sua fosforilação após 90 minutos (B). Houve um aumento da relação p-CREB/CREB após 60 (A) e 90 minutos (B). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado ao grupo salina. AEME: metilecgonidina (teste *U* de Mann-Whitney).

De maneira semelhante ao caudado-putâmen, não foram observadas alterações significativas na expressão de p-CREB e CREB no núcleo *accumbens* 15 minutos após a administração de AEME. Quarenta e cinco minutos após a administração de AEME, houve um aumento na expressão de CREB, porém não houve alteração na relação p-CREB/CREB (Figura 20A). Após 60 minutos, foi observado um aumento na expressão de p-CREB e um aumento da relação entre as formas fosforilada e total no núcleo *accumbens* (Figura 20B). Diferente do observado no caudado-putâmen, 90 minutos após a administração de AEME, verificou-se que a expressão dessas proteínas no núcleo *accumbens* atingiu um padrão similar ao grupo salina. Esse parece ser um mecanismo compensatório dessa região frente ao aumento observado 60 minutos após a administração de AEME.

Figura 20. Decurso temporal da expressão da p-CREB e CREB, e da relação p-CREB/CREB no núcleo *accumbens* de ratos *Wistar* adultos após a administração aguda de AEME 3 mg/kg (n=5). AEME aumentou a expressão de CREB após 45 minutos (A) e induziu sua fosforilação após 60 minutos (B). Houve um aumento da relação p-CREB/CREB após 60 minutos (B). * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina. AEME: metilecgonidina (teste *U* de Mann-Whitney).

Os gráficos das figuras 21 e 22 referem-se ao decurso temporal de fosforilação da CREB no caudado-putâmen e núcleo *accumbens*, respectivamente, após a injeção aguda de cocaína 15 mg/kg. Não houve alteração significativa no caudado-putâmen (Figura 21).

Figura 21. Decurso temporal da expressão da p-CREB e CREB, e da relação p-CREB/CREB no caudado-putâmen de ratos *Wistar* adultos após a administração aguda de cocaína 15 mg/kg (n=5). Não houve alteração da expressão dessas proteínas na região estudada (teste *U* de Mann-Whitney).

No núcleo *accumbens*, a cocaína induziu a fosforilação da CREB após 45 minutos, sem alterar a relação p-CREB/CREB (Figura 22A). O efeito foi observado após 60 minutos, no entanto, houve aumento da relação p-CREB/CREB (Figura 22B).

Figura 22. Decurso temporal da expressão da p-CREB e CREB, e da relação p-CREB/CREB no núcleo *accumbens* de ratos *Wistar* adultos após a administração aguda de cocaína 15 mg/kg (n=5). A cocaína aumentou a fosforilação da CREB após 45 (A) e 60 minutos (B). No entanto, houve um aumento da relação p-CREB/CREB somente após 60 minutos (B). * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina (teste *U* de Mann-Whitney).

As figuras 23 e 24 mostram os resultados obtidos no caudado-putâmen e no núcleo *accumbens*, respectivamente, após a sensibilização comportamental dependente de contexto. Pode-se observar uma diminuição da expressão da CREB ($F_{3, 16}=5,30$; $p=0,010$) e um aumento na relação p-CREB/CREB ($F_{3, 16}=6,64$; $p=0,004$) no caudado-putâmen dos animais que receberam cocaína 15 mg/kg e a associação das substâncias (Figura 23).

Figura 23. Fosforilação da CREB e relação p-CREB/CREB no caudado-putâmen 60 minutos após o desafio da sensibilização comportamental dependente de contexto. * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ comparado ao grupo salina. AEME: metilecgonidina (ANOVA e comparação múltipla de Newman-Keuls).

No núcleo *accumbens*, pode-se observar um aumento na relação p-CREB/CREB ($F_{3, 16}=6,28$; $p=0,005$) apenas nos animais que receberam cocaína 15 mg/kg e a associação das substâncias (Figura 24).

Figura 24. Fosforilação da CREB e relação p-CREB/CREB no núcleo *accumbens* 60 minutos após o desafio da sensibilização comportamental dependente de contexto. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado ao grupo salina. AEME: metilecgonidina (ANOVA e comparação múltipla de Newman-Keuls).

4.1.4. Determinação da concentração de AEME e cocaína plasmática

Os limites de detecção e quantificação para a cocaína e AEME foram 5 e 10 ng/mL, respectivamente. O coeficiente de correlação linear (R^2) foi superior a 0,99 para ambos os analitos (Figura 25).

Figura 25. Gráficos do estudo de linearidade da cocaína (A) e da AEME (B) em amostras de plasma, contendo a equação de reta e o coeficiente de correlação linear (R^2). O eixo das abscissas corresponde à concentração, em ng/mL, e o eixo das ordenadas corresponde à área relativa. AEME: metilecgonidina.

A análise e a separação dos analitos ocorreu de forma adequada, sem a necessidade de utilizar a etapa de derivatização, muito comum em análises por cromatografia gasosa (Figura 26).

Figura 26. Exemplos de cromatogramas obtidos na determinação da concentração plasmática de cocaína e AEME. (A) Solução padrão contendo AEME (5,403), cocaína (12,898) e benzoilecgonina isopropil éster (13,721). (B) Análise de cocaína plasmática (12,868) com a adição de benzoilecgonina isopropil éster (13,687). (C) Análise de AEME plasmática (5,406) com a adição de benzoilecgonina isopropil éster (13,691). O eixo das abscissas dos cromatogramas corresponde ao tempo de retenção dos analitos em minutos. A benzoilecgonina isopropil éster foi utilizada nas análises como padrão interno. AEME: metilecgonidina.

A tabela 6 mostra os resultados das dosagens plasmáticas de AEME e de cocaína de animais que foram submetidos ao teste prolongado (9 dias de administração) com AEME 3 mg/kg, cocaína 15 mg/kg e a associação entre essas duas substâncias e eutanasiados 15 minutos após a última injeção.

Tabela 6. Concentração plasmática de cocaína e AEME após a exposição prolongada. Os animais foram eutanasiados 15 minutos após a última injeção.

Concentração plasmática, expressa em ng/mL (média±epm)		
	Cocaína	AEME
Salina	Não detectado	
AEME 3 mg/kg	Não detectado	57,6±4,7
Cocaína 15 mg/kg	480,7±64,3	Não detectado
Associação	426,9±48,7	144,1±13,1 ^{***}
^{***} p<0,001 comparado com AEME 3 mg/kg. AEME: metilecgonidina; epm: erro padrão da média (teste <i>t student</i>).		

Os valores obtidos mostraram que, apesar de receberem a mesma dose, os animais do grupo da associação apresentaram uma concentração plasmática de AEME 2,5 vezes maior que os animais que receberam a substância isoladamente.

O mesmo foi observado com os animais da sensibilização comportamental dependente de contexto (Tabela 7), os quais foram eutanasiados 60 minutos após a última injeção (desafio).

Tabela 7. Concentração plasmática de cocaína e AEME após a sensibilização comportamental dependente de contexto. Os animais foram eutanasiados 60 minutos após a última injeção.

Concentração plasmática, expressa em ng/mL (média±epm)		
	Cocaína	AEME
Salina	Não detectado	
AEME 3 mg/kg	Não detectado	Detectado [#]
Cocaína 15 mg/kg	99,3±18,3	Não detectado
Associação	112,3±18,1	31,9±7,0
[#] A concentração de AEME no grupo que recebeu apenas essa substância na dose de 3 mg/kg foi inferior ao limite de quantificação, ou seja, menor que 10 ng/mL. AEME: metilecgonidina; epm: erro padrão da média.		

4.2. Experimentos *in vitro*

4.2.1. Ligação aos receptores muscarínicos (*binding*) em hipocampo

O gráfico da figura 27 mostra a curva de deslocamento da ligação do [³H]QNB (concentração próxima ao valor de K_D) após incubação com atropina ou AEME, ambas em diversas concentrações.

Figura 27. Curvas de deslocamento do [^3H]QNB (quinuclidinil benzilato triciado) ligado às membranas hipocâmpais induzidas pela AEME e o antagonista inespecífico de receptores colinérgicos muscarínicos, a atropina. Resultado expresso como média $\pm$ erro padrão da média ($n=4$). AEME: metilecgonidina (GARCIA *et al.*, 2012).

O valor de pK_i da atropina foi de $8,51 \pm 0,11$, condizente com os valores encontrados na literatura, mostrando que a membrana estava adequada para o ensaio (DONG *et al.*, 1995). O valor de pK_i da AEME foi de $4,15 \pm 0,15$. Ambas as curvas de deslocamento da ligação do [^3H]QNB pela atropina e pela AEME foram monofásicas, indicando uma ação da AEME em receptores muscarínicos.

4.2.2. Experimentos em células CHO

Os ensaios de saturação foram realizados para se determinar as constantes de dissociação (K_d) e o $B_{\text{máx}}$ (número máximo de sítios ligantes de um receptor em uma preparação de células ou tecidos) de cada subtipo de receptor muscarínico, as quais foram utilizadas nos cálculos dos ensaios de competição (Figura 28). Todos os cálculos foram realizados utilizando o *software* GraphPad Prism.

Figura 28. Curvas de saturação para todos os cinco subtipos de receptores muscarínicos: rM₁ a rM₅ (n=3). Os valores de B_{máx} (fmol/mg) e K_d (nM) foram determinados para os ensaios de competição com radioligante. A) rM₁ (B_{máx}= 1087±165 fmol/mg; K_d=0,085 nM); B) rM₂ (B_{máx}= 1470±53 fmol/mg; K_d=0,159 nM); C) rM₃ (B_{máx}= 1132±33 fmol/mg; K_d=0,063 nM); D) rM₄ (B_{máx}= 1835±127 fmol/mg; K_d=0,038 nM) e E) rM₅ (B_{máx}= 1564±27 fmol/mg; K_d=0,224 nM).

O gráfico da figura 29 ilustra as curvas de deslocamento do [^3H]NMS obtidas pela acetilcolina e pela AEME nos ensaios de competição com radioligantes.

Figura 29. Curvas de deslocamento do [^3H]NMS (N-metil-escopolamina triciada) obtidas pela acetilcolina (ACh) (A) e pela AEME (B) para todos os cinco subtipos de receptores muscarínicos: rM₁ a rM₅ (n=4). Os valores de pK_i (logaritmo negativo da constante de inibição, K_i) obtidos foram: A) $5,09 \pm 0,02$ para rM₁ ($\circ$), $6,49 \pm 0,04$ para rM₂ (Δ), $5,07 \pm 0,02$ para rM₃ ($\bullet$), $5,74 \pm 0,03$ para rM₄ ($\blacktriangle$) e $5,19 \pm 0,03$ para rM₅ ($\square$); B) $4,59 \pm 0,02$ para rM₁ ($\circ$), $4,71 \pm 0,03$ para rM₂ (Δ), $4,47 \pm 0,02$ para rM₃ ($\bullet$), $4,61 \pm 0,03$ para rM₄ ($\blacktriangle$) e $4,53 \pm 0,03$ para rM₅ ($\square$). Resultados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. AEME: metilecgonidina.

A tabela 8 apresenta os valores de pK_i e K_i da AEME nos diversos subtipos de receptores muscarínicos, conforme a figura 29.

Tabela 8. Valores de pK_i e K_i , entre parênteses, da AEME nos cinco subtipos de receptores muscarínicos (rM₁ a rM₅).

Subtipo de receptor muscarínico	pK_i (K_i μM)
rM ₁	$4,59 \pm 0,02$ (25,7)
rM ₂	$4,71 \pm 0,03$ (19,5)
rM ₃	$4,47 \pm 0,02$ (33,9)
rM ₄	$4,61 \pm 0,03$ (24,5)
rM ₅	$4,53 \pm 0,03$ (29,5)

A figura 30 mostra a curva concentração-resposta da AEME no ensaio de mobilização de cálcio intracelular, normalizada pela resposta máxima obtida pela acetilcolina.

Figura 30. Curva concentração-resposta agonista da AEME normalizada pela resposta máxima obtida pela acetilcolina para os seguintes subtipos de receptores muscarínicos: rM₁, rM₃ e rM₅ (n=2-3). AEME: metilecgonidina.

Pode-se observar que a AEME apresenta uma atividade agonista para os subtipos M₁ e M₃ em concentrações acima de $10^{-4,5}$ M (31,6 μ M), uma vez que houve aumento na concentração de cálcio intracelular. Os valores das concentrações efetivas que aumentam em 50% a liberação de cálcio (EC₅₀) e os valores máximos obtidos no ensaio foram, respectivamente: 138,0 (rM₁) e 575,4 μ M (rM₃); 38,3 (rM₁) e 27,2% (rM₃). No entanto, não foi observada atividade em M₅, sugerindo uma ação antagonista nesse subtipo de receptor. Tal experimento não foi realizado em células CHO expressando rM₂-Gqi5 e rM₄-Gqi5 uma vez que não houve aumento de cálcio após a adição de AEME nos ensaios de adição dupla (figuras 31B e 31D).

A figura 31 ilustra os efeitos da adição dupla, ou seja, os efeitos da AEME sobre a curva concentração-resposta da acetilcolina.

Figura 31. Ensaio de mobilização de cálcio intracelular (n=3-4) em células CHO expressando todos os subtipos de receptores muscarínicos: rM₁ (A), rM₂ (B), rM₃ (C), rM₄ (D) e rM₅ (E). ACh: acetilcolina; AEME: metilecgonidina.

No ensaio de mobilização de cálcio após a adição dupla (AEME e acetilcolina), pode-se observar que a AEME age como agonista parcial de receptores subtipo M_1 e agonista parcial fraco de receptores subtipo M_3 , pois houve aumento de cálcio em concentrações baixas de acetilcolina. O deslocamento da curva concentração-resposta da acetilcolina para a direita mostra um efeito antagonista da AEME em receptores subtipo M_2 , M_4 e, em maior escala, M_5 . Como o efeito antagonista foi maior para este último, foi realizado um ensaio de cálcio, semelhante à adição dupla, mas com diversas concentrações de AEME (Figura 32). Neste ensaio, pode-se determinar a potência antagônica da AEME em receptores muscarínicos subtipo rM_5 por meio da análise de *Schild* (GraphPad Prism).

Figura 32. Curvas concentração-resposta da acetilcolina (ACh) na ausência ou presença de diferentes concentrações de AEME ($10^{-3.5}$ a 10^{-6} M) obtidas no ensaio de mobilização de cálcio em células CHO expressando rM_5 ($n=3$). A regressão de *Schild*, realizada por meio da razão das concentrações efetivas 50% (R_{EC50}) derivada do antagonismo da AEME sobre a acetilcolina, foi apresentada e seu coeficiente de regressão linear foi $0,95 \pm 0,07$. A R_{EC50} foi obtida dividindo-se as concentrações efetivas 50% (EC_{50}) obtidas de cada curva concentração-resposta da acetilcolina pela EC_{50} da curva sem adição de AEME (veículo). Resultados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. AEME: metilecgonidina.

O gráfico da figura 33 mostra as retas obtidas na análise de *Schild* com os receptores colinérgicos muscarínicos subtipo M_5 , considerando todas as

concentrações de AEME (reta vermelha) e concentrações acima de 10^{-5} M (reta cinza), sendo esta última utilizada para nos cálculos.

Figura 33. Retas de regressão da análise de *Schild*, realizada por meio da razão das concentrações efetivas 50% (R_{EC50}) derivada do antagonismo da AEME sobre a acetilcolina em receptores colinérgicos muscarínicos subtipo M_5 . A reta vermelha considera todas concentrações de AEME, enquanto que a cinza considera apenas concentrações acima de 10^{-5} M. O cálculo do coeficiente de regressão e da potência antagônica (pA_2) foi realizando considerando-se a reta cinza. AEME: metilecgonidina.

Utilizando o *software* GraphPad Prism, foram calculados o coeficiente de regressão linear e a potência antagônica (pA_2 , logaritmo negativo da concentração molar de antagonista capaz de promover o desvio de duas vezes a curva concentração-resposta). Os valores obtidos de regressão linear e pA_2 foram, respectivamente, $0,95 \pm 0,07$ e $4,87 \pm 0,10$.

5. Discussão

5. Discussão

O uso de drogas ilícitas é um problema de saúde pública e acomete cerca de 5% da população mundial adulta, contribuindo com o crime, a miséria, a insegurança e a disseminação de doenças infectocontagiosas como o vírus da imunodeficiência humana. As duas drogas mais utilizadas no mundo são a *cannabis* e derivados de anfetamina, com uma prevalência anual em torno de 2,6 a 5,0% e 0,3 a 1,2%, respectivamente. Já o consumo de cocaína e opiáceos se manteve estável durante os últimos anos, com uma prevalência ao redor de 0,3 a 0,4% e 0,3 a 0,5%, respectivamente (MÉGARBANE & CHEVILLARD, 2013).

Apesar de se manter estável mundialmente, o consumo de cocaína e seu potencial em causar dependência se tornou um problema legal de saúde pública não resolvido e que atinge proporções epidemiológicas alarmantes em países ocidentais (PIRES *et al.*, 2012). Mais ainda, nos últimos 30 anos, o consumo de *crack* cresceu na América do Norte, tendo surgido nos Estados Unidos na década de 80 e introduzido no Canadá na década de 90 (ROY *et al.*, 2013).

O consumo de cocaína no Brasil vem apresentando um aumento, principalmente das formas mais acessíveis, como o *crack*, o qual é seis vezes mais potente e com maior potencial em causar dependência que a cocaína em pó (PIRES *et al.*, 2012). Dados recentes mostraram que o uso de *crack* aumentou nos últimos anos, principalmente entre os estudantes do ensino médio e fundamental, além de ser a droga de abuso com mais procura por atendimento médico em clínicas especializadas (DUNN *et al.*, 1996; FILHO *et al.*, 2003; CUNHA *et al.*, 2004). É importante mencionar que os usuários adultos geralmente são homens que apresentam baixa escolaridade, estão desempregados, na maioria das vezes, ou sem vínculo formal com o trabalho (JORGE *et al.*, 2013).

Estudos apontam que o início dos efeitos após o consumo de *crack* por via inalatória é quase imediato, alcançando sua intensidade máxima em cerca de cinco minutos, com duração aproximada de 30 minutos (JULIEN, 1995). De acordo com CHASIN & MÍDIO (1997), há equivalência entre a administração inalatória e a intravenosa em relação à rapidez e à intensidade dos efeitos farmacológicos.

DIAS *et al.* (2011) observaram que a longevidade do consumo de *crack* se deve, principalmente, à sua alta disponibilidade, associada à sua lucratividade, à sua facilidade de acesso e à possibilidade de desenvolvimento de estratégias de manutenção de consumo contínuo. RAUPP & ADORNO (2011) relataram que, apesar de a utilização de substâncias ser uma prática presente há séculos na humanidade, o seu abuso adquiriu proporções preocupantes, tornando-se um problema de saúde pública. Ainda, os autores atribuem o agravamento desse quadro ao *crack*, uma vez que esse promoveu o aumento dos danos sociais e da saúde dos usuários.

Dentre as vias de administração de cocaína, o *crack* é considerado a droga mais devastadora, pois, além de causar prejuízos pessoais e um grande impacto econômico para o país, a dependência causada pelo seu uso parece ser mais intensa (PIRES *et al.*, 2012).

A administração repetida e intermitente de cocaína em roedores (doses acima de 10 mg/kg) aumenta a concentração de dopamina, o que estimula a via mesocorticolímbica, promovendo alterações comportamentais, tais como o aumento da atividade locomotora, conhecida como sensibilização comportamental (CASTER *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2009; DIROCCO *et al.*, 2009). Esse aumento da resposta locomotora é resultado de processos neuroadaptativos (VANDERSCHUREN & KALIVAS, 2000). COVINGTON III & MICZEK (2001) sustentam a hipótese de que a

sensibilização pode facilitar a transição para o uso compulsivo de drogas, sendo, portanto, um modelo adequado para o estudo da dependência.

O principal mecanismo envolvido na recompensa e no processo fisiopatológico da dependência é o aumento de dopamina, principalmente no núcleo *accumbens* e no estriado, mais especificamente no caudado-putâmen (HYMAN *et al.*, 2006; EVERITT & ROBBINS, 2005; EVERITT *et al.*, 2008). ZHANG *et al.* (2001) mostraram que a administração de cocaína 10 mg/kg (durante sete dias, uma vez por dia) em ratos foi capaz de aumentar a concentração extracelular de dopamina nas estruturas encefálicas mencionadas. Aumento de dopamina extracelular também foi observado após uma administração intravenosa de cocaína 1,5 mg/kg por MATEO *et al.* (2005).

Vale ressaltar que as doses de cocaína encontradas na literatura variam entre 10 e 40 mg/kg, sendo a de 15 mg/kg descrita com maior frequência nos últimos tempos (CASTER *et al.*, 2005; STANSFIELD & KIRSTEIN, 2007; NARENDHAN & MARTINEZ, 2008; XIE & STEKETEE, 2008; MÜLLER *et al.*, 2008).

Como pode ser observado, diversos estudos mostram o envolvimento da cocaína nas alterações comportamentais e na dependência. Contudo, nenhum estudo avaliou se a AEME contribui com esses processos. É importante mencionar que este é o primeiro estudo a avaliar os efeitos comportamentais da AEME e seu possível envolvimento na farmacodependência, além de investigar o mecanismo de ação deste composto no sistema colinérgico muscarínico.

Como não há dados disponíveis a respeito dos efeitos comportamentais da AEME, o primeiro passo foi a realização de um teste agudo em campo aberto com diferentes doses para estabelecer, além da dose, o tempo que o animal deve ser exposto à análise comportamental durante os ensaios prolongados e de

sensibilização. Para tal, os animais foram observados durante um período de 40 minutos para verificar a existência de qualquer alteração da atividade locomotora e, caso houvesse, determinar o período em que apresentaram a atividade máxima. Os resultados obtidos mostraram que a atividade máxima após a exposição à AEME situa-se nos primeiros 15 minutos após a sua administração. Pode-se observar que a menor dose de AEME utilizada (1 mg/kg) promoveu a mesma alteração comportamental que as demais doses. Entretanto, a dose de 3 mg/kg foi escolhida para os demais testes pois foi a mesma utilizada no estudo farmacocinético realizado em ovelhas por SCHEIDWEILER *et al.* (2003).

Os resultados do teste prolongado mostraram que a AEME não foi capaz de alterar drasticamente a atividade locomotora dos animais quando comparada à cocaína, mantendo um padrão intermediário entre esta e o controle. Entretanto, a associação entre cocaína e AEME foi capaz de promover alterações ainda maiores que o grupo da cocaína isoladamente, evidenciado no 3º dia de avaliação no campo aberto, onde a atividade locomotora dos animais foi maior. É importante mencionar que, como não houve aumento da atividade locomotora entre os dias com a administração repetida das substâncias, foi realizado um teste de sensibilização comportamental dependente de contexto.

Na sensibilização comportamental dependente de contexto, não foi observada alteração da atividade locomotora apenas para os animais que receberam AEME. Embora não se observe o desenvolvimento da sensibilização, ou seja, o aumento da atividade locomotora durante os dias de administração, tanto para a cocaína quanto para a associação entre cocaína e AEME, foi possível observar a expressão da resposta. Esta última pode ser comprovada pela comparação do aumento da atividade locomotora após o período de abstinência, ou seja, no desafio (dia 17),

com o primeiro dia de avaliação. Os resultados mostraram que os animais do grupo cocaína e da associação apresentaram um maior aumento da atividade locomotora no desafio quando comparado ao primeiro dia. Ainda, o grupo da associação no dia 17 foi estatisticamente diferente do grupo da cocaína no dia 1 e 17, mostrando que, apesar de não sensibilizar isoladamente os animais, a AEME potencializou a ação da cocaína.

MATTSON *et al.* (2005) mostraram que a atividade locomotora de ratos Sprague-Dawley aumentou com a administração repetida (7 dias) de cocaína 15 mg/kg. Mais ainda, MATTSON *et al.* (2008) demonstraram que o ambiente onde os animais são tratados é muito importante para a sensibilização à cocaína, pois ativa um número específico de neurônios estriatais. Isso justifica o pareamento da administração das drogas com a observação em campo aberto no protocolo empregado na sensibilização comportamental dependente de contexto.

As alterações da atividade locomotora descritas anteriormente estão associadas ao aumento de dopamina em regiões mesocorticolímbicas. De fato, foi possível observar um aumento da concentração de dopamina (e metabólitos) no caudado-putâmen após a administração de AEME. ZAPATA *et al.* (2003) mostraram que camundongos com experiência prévia de autoadministração de cocaína apresentaram um aumento da resposta comportamental e também da concentração extracelular de dopamina no núcleo *accumbens* após a exposição intraperitoneal à cocaína 20 mg/kg. Interessante mencionar que, apesar do aumento da concentração de dopamina com a administração de cocaína, a associação entre cocaína e AEME elevou ainda mais a concentração desse neurotransmissor, mostrando um efeito sinérgico entre a AEME e a cocaína. Ainda, o aumento de dopamina e de seus metabólitos nos grupos estudados, não promoveu alteração significativa no *turnover*,

provavelmente pelo aumento da eficiência de metabolização da dopamina. HORNE *et al.* (2008) observaram que, animais que receberam cocaína por 16 semanas, apresentaram diminuição da densidade de terminais dopaminérgicos, resultando em uma diminuição da concentração basal e da liberação de dopamina no estriado. Fazendo um paralelo com outras substâncias estimulantes, FERRAZ-DE-PAULA *et al.* (2011) mostraram aumento da concentração de dopamina e de seus metabólitos (ácido 3,4-dihidroxifenilacético e ácido homovanílico) no estriado de camundongos submetidos à administração intraperitoneal de 3,4-metilenodioximetanfetamina 10 mg/kg, popularmente conhecido como MDMA ou *ecstasy*.

Já no núcleo *accumbens*, foi observado aumento discreto de dopamina, porém, não significativo estatisticamente, com a administração de AEME. Contudo, houve apenas aumento do ácido 3,4-dihidroxifenilacético, um dos principais metabólitos da dopamina. A administração de cocaína e da associação entre as substâncias aumentou a concentração de dopamina, mas não foi observada diferença significativa entre esses grupos nessa estrutura encefálica. CAMARINI *et al.* (2008) também mostraram aumento da concentração de dopamina extracelular no núcleo *accumbens*, por meio da técnica de microdiálise, após a administração prolongada de cocaína 10 mg/kg.

Com relação aos metabólitos da dopamina, a única alteração encontrada foi aumento da concentração de ácido homovanílico nos animais que receberam cocaína. O aumento do *turnover* encontrado no grupo AEME pode estar relacionado à ativação do metabolismo de dopamina, enquanto que sua redução, encontrada na associação, indica uma possível inativação do sistema enzimático que metaboliza esse neurotransmissor.

Sabendo que o aumento de dopamina promovido pela cocaína leva à fosforilação da CREB, especialmente no núcleo *accumbens* e no estriado (GUERRIERO *et al.*, 2005), foi realizado um decurso temporal da expressão de p-CREB e CREB total nas estruturas mencionadas após a administração aguda tanto de cocaína (15 mg/kg) quanto de AEME (3 mg/kg). Houve aumento da relação p-CREB/CREB 60 minutos após a administração aguda de cocaína ou AEME em ambas as estruturas analisadas, com exceção do caudado-putâmen para a cocaína, a qual não apresentou alteração alguma. Esse tempo, portanto, foi utilizado como o tempo de eutanásia dos animais após o ensaio de sensibilização comportamental dependente de contexto. Vale ressaltar que o resultado obtido para a cocaína no caudado-putâmen foi semelhante ao encontrado por MATTSON *et al.* (2005).

Fazendo uma análise comparativa dos resultados da expressão de p-CREB e CREB total obtidos com os encontrados na literatura para a cocaína, NAZARIAN *et al.* (2009) mostraram que a administração aguda de cocaína na dose de 30 mg/kg em ratos *Fischer* de 60 dias aumentou os níveis de p-CREB no núcleo *accumbens* decorridos 5, 15 e 30 minutos de sua administração. TROPEA *et al.* (2008) concluíram que houve aumento de p-CREB 48 horas após a administração de cocaína 10 mg/kg, realizada por 3 dias, no núcleo *accumbens* de camundongos. Já os resultados de MATTSON *et al.* (2005) mostraram que a relação p-CREB/CREB aumentou no núcleo *accumbens* de ratos *Sprague-Dawley* 10 e 20 minutos após a administração repetida (7 dias) de cocaína 15 mg/kg. No presente estudo, após o ensaio de sensibilização comportamental dependente de contexto, foi observado aumento da relação p-CREB/CREB em ambas as estruturas estudadas nos grupos cocaína e associação. A AEME, apesar de promover o aumento dessa relação no caudado-putâmen, não foi estatisticamente diferente do grupo salina.

As concentrações plasmáticas de cocaína e de AEME, além de constituírem parâmetros importantes de exposição, mostraram uma concentração de AEME maior no grupo da associação quando comparado ao grupo AEME isoladamente. Nossa hipótese é que possa haver uma competição pelas mesmas vias de biotransformação, sendo que a cocaína passaria a inibir as reações de degradação da AEME, aumentando assim sua concentração plasmática. Este é um importante assunto para futuros estudos toxicocinéticos.

PAUL *et al.* (2005) relataram que a concentração de cocaína e AEME *post-mortem* variaram de 1 a 8.340 ng/mL e de 10 a 638 ng/mL, respectivamente. As matrizes utilizadas foram sangue e urina. LIBERTY *et al.* (2003) avaliaram a concentração de cocaína e AEME em suor por meio de adesivos (*fastpatches*). As concentrações médias encontradas foram 1.623 ng/mL para cocaína e 106 ng/mL para AEME. Como essas concentrações variam devido à frequência de exposição, pureza da droga, modo de aquecimento das pedras de *crack* e biotransformação das substâncias inaladas, torna-se difícil a correlação entre o efeito observado e a concentração obtida.

A fim de melhorar a compreensão do mecanismo de ação da AEME, foi realizado o ensaio de ligação aos receptores muscarínicos (*binding*) utilizando membranas de hipocampo. A atropina, por ser um antagonista clássico de receptores colinérgicos muscarínicos, foi utilizada como um controle positivo, mostrando sua eficiência na ligação, da ordem de 10^{-8} M (10nM). Já a AEME apresentou uma eficiência inferior à atropina, da ordem de 10^{-4} , já que 10^{-4} M (100μM) foi a concentração capaz de deslocar cerca de 50% do radioligante. DONG *et al.* (1995) mostraram que a arecolina, um agonista clássico de receptores colinérgicos muscarínicos, a qual possui estrutura similar à AEME, apresenta valores

próximos de pK_i para cada subtipo de receptor colinérgico muscarínico. Os valores encontrados foram: $4,55 \pm 0,15$ (M_1); $4,75 \pm 0,18$ (M_2); $4,11 \pm 0,14$ (M_3); $4,14 \pm 0,11$ (M_4) e $4,83 \pm 0,12$ (M_5). Os cinco subtipos de receptores colinérgicos muscarínicos foram expressos em células de insetos (Sf9) que foram transfectadas pelo sistema *baculovírus*. Como os valores de pK_i da AEME e da arecolina são próximos, isso sugere uma possível ação agonista de receptores colinérgicos muscarínicos. Estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa mostrou que a AEME foi capaz de aumentar tanto os níveis de cálcio intracelular quanto a formação de 1,4,5-trifosfato de inositol em cultura neuronal primária de hipocampo (DATI, 2012), corroborando com a hipótese agonista de receptores muscarínicos, especialmente os subtipos M_1 , M_3 e M_5 , os quais estão acoplados a proteína Gq.

Para confirmar a hipótese agonista mencionada anteriormente, foram realizados estudos de ligação aos cinco subtipos de receptores muscarínicos (rM_1 – rM_5), para se determinar a afinidade da AEME, e estudos funcionais (liberação de cálcio intracelular), para determinar sua potência. Observando os valores de pK_i (ou K_i), pode-se inferir a afinidade de um composto pelo receptor estudado. Assim sendo, quanto maior o pK_i (menor o K_i), maior a afinidade da substância pelo receptor. Neste caso, a AEME apresentou maior afinidade pelo receptor rM_2 e, praticamente, a mesma afinidade nos demais subtipos.

O deslocamento da curva concentração-resposta da acetilcolina para a direita sugere uma ação antagonista competitiva da AEME, observada para os subtipos rM_2 , rM_4 e rM_5 , sendo esse último confirmado pela análise de regressão de *Schild*. Assim, a AEME atua como agonista parcial do subtipos rM_1 e rM_3 , sendo mais fraca para esse último.

Apesar de a literatura apontar que a inativação dos receptores muscarínicos subtipo M₅ poderia ser uma ferramenta importante no tratamento da dependência de diversas substâncias (LANGMEAD *et al.*, 2008), alguns estudos de eletroencefalografia com moduladores alostéricos negativos (substâncias que diminuem a atividade da acetilcolina, semelhante ao que ocorre com antagonistas) para receptores muscarínicos subtipo M₅ realizados no laboratório do Dr. Conn mostraram um aumento da liberação de dopamina no estriado, semelhante aos resultados encontrados pelo nosso grupo. Postula-se que esses receptores colinérgicos muscarínicos estejam localizados em interneurônios gabaérgicos (Figura 33D), aumentando a liberação de dopamina. No entanto, esses dados ainda não foram publicados.

Além disso, há relatos na literatura de que agonistas ou agonistas parciais de receptores muscarínicos subtipos M₂ e M₄ reduziram a autoadministração de cocaína (RASMUSSEN *et al.*, 2000). Dessa maneira, antagonistas desses receptores poderiam promover um efeito contrário, como o caso da AEME. THRELFELL *et al.* (2010) mostraram que a regulação da liberação de dopamina no estriado pode envolver a ativação de interneurônios colinérgicos, os quais expressam receptores muscarínicos subtipos M₂ e M₄. Tal regulação se dá pela redução do tônus de acetilcolina em receptores nicotínicos ($\beta 2$ nAChR) localizados em neurônios dopaminérgicos e, conseqüentemente, redução da liberação de dopamina. Ainda, BRADY *et al.* (2008) mostraram que moduladores alostéricos positivos de receptores colinérgicos muscarínicos subtipo M₄ reverteram a hiperlocomoção em ratos induzida pela anfetamina, ressaltando a importância regulatória desse receptor na atividade dopaminérgica do mesencéfalo. Há relatos ainda de que a administração de antagonistas (inespecíficos) de receptores

colinérgicos muscarínicos aumentaram os efeitos estimulantes locomotores da cocaína (SHANNON & PETERS, 1990; BYMASTER *et al.*, 1993), semelhante ao observado após a administração concomitante entre cocaína e AEME.

A figura 34 a seguir ilustra os principais mecanismos de ação da AEME. A maior afinidade da AEME pelos subtipos M_2 e M_4 pode explicar muitos dos resultados obtidos, sem descartar, porém, a participação dos demais subtipos. Vale ressaltar que os receptores colinérgicos muscarínicos subtipo M_1 , M_2 e M_4 são os que predominam no estriado, enquanto que as inervações para o núcleo *accumbens* incluem a presença dos subtipos M_4 e M_5 (SÁNCHEZ-LEMUS & ARIAS-MONTAÑO, 2006; LANGMEAD *et al.*, 2008; THRELFELL *et al.*, 2010; SCHMIDT *et al.*, 2011). O aumento de dopamina no caudado-putâmen provocado pela AEME pode ser justificado pela ação agonista parcial em receptores colinérgicos muscarínicos subtipo M_1 e antagonista subtipos M_2 e M_4 (Figura 34A e 34B). Ainda, o efeito sinérgico observado após a administração concomitante com a cocaína, pode ser explicado pelos mecanismos distintos de liberação de dopamina. Já no núcleo *accumbens*, o aumento se deve apenas pela ação da cocaína, uma vez que há um efeito compensatório da AEME após inibição dos subtipos M_4 e M_5 (Figura 34B e 34D).

Figura 34. Esquema simplificado mostrando os prováveis mecanismos de ação da AEME sobre a regulação de dopamina (DA) liberada no estriado e núcleo *accumbens*. O símbolo “+” indica efeito agonista, enquanto que o “-” mostra o efeito antagonista. A ativação de M_1 (A) e a inibição de M_2 e M_4 (B) aumentam os níveis de dopamina. O efeito antagonista da AEME sobre M_2/M_4 promovem um aumento da liberação de acetilcolina (ACh) no estriado, aumentando a concentração de dopamina (B1). A ativação de interneurônios gabaérgicos via inibição de M_4 promove, a longo prazo, inibição do sistema gabaérgico, reduzindo a concentração de ácido γ -aminobutírico (GABA) e aumentando da concentração de dopamina (B2). Já a ativação dos receptores muscarínicos subtipo M_3 , diminuem a liberação de dopamina via ácido γ -aminobutírico (C). A mesma situação pode ser observada com a inibição dos receptores muscarínicos subtipo M_5 , embora alguns estudos recentes mostrem um aumento de dopamina com a administração de moduladores alostéricos negativo para M_5 (D). A coloração das setas corresponde à sinalização desencadeada pelos interneurônios envolvidos, os quais são da mesma cor. AEME: metilecgonidina.

Os resultados deste trabalho mostram que a AEME não é meramente um coadjuvante durante o fumo de *crack* e nem apenas um biomarcador de exposição do mesmo, ela pode contribuir na dependência de cocaína por meio da modulação do sistema colinérgico. Este trabalho mostra que não existe apenas um componente toxicocinético que justifique o “maior potencial de abuso” do *crack*, há também uma

explicação toxicodinâmica. Ainda, este estudo visa abrir novos caminhos para estabelecer novas estratégias terapêuticas no tratamento de dependentes. No entanto, é necessária uma compreensão mais detalhada do envolvimento do sistema colinérgico muscarínico na farmacodependência.

O presente trabalho demonstrou que a AEME, apesar de não promover a sensibilização comportamental, potencializou a ação da cocaína quando administrada concomitantemente, resultando em alterações na concentração de dopamina e da relação p-CREB/CREB no caudado-putâmen e no núcleo *accumbens*, regiões encefálicas onde a liberação de dopamina é regulada pelo sistema colinérgico.

6. Conclusões

6. Conclusões

Pelo presente trabalho, pode-se concluir que:

- a AEME aumentou a atividade locomotora, porém não houve curva dose e resposta com as doses utilizadas;

- a AEME aumentou a concentração de dopamina no caudado-putâmen. Ainda, houve um sinergismo entre AEME e cocaína evidenciado no grupo da associação. O mesmo efeito não foi observado no núcleo *accumbens*;

- a AEME aumentou a relação p-CREB/CREB após 60 minutos de administração, tanto no caudado-putâmen quanto no núcleo *accumbens*, enquanto que a cocaína aumentou apenas na última estrutura mencionada no mesmo período;

- a AEME isoladamente não foi capaz de causar sensibilização comportamental, mas potencializou a ação da cocaína na expressão da mesma. Após este ensaio, a relação p-CREB/CREB aumentou apenas nos grupos cocaína e associação entre as substâncias, tanto no caudado-putâmen quanto no núcleo *accumbens*;

- a AEME apresentou uma concentração plasmática maior quando associada à cocaína, sugerindo que há uma competição pelas mesmas vias de biotransformação dessas substâncias;

- a AEME se liga aos receptores colinérgicos muscarínicos, com ação agonista parcial para os subtipos M₁ e M₃ e antagonista para os demais subtipos.

7. Referências bibliográficas

7. Referências bibliográficas

AFONSO, L.; MOHAMMAD, T.; THATAI, D. *Crack* whips the heart: a review of the cardiovascular toxicity of cocaine. **American Journal of Cardiology**, v. 100, 1040-1043, 2007.

ANDRADE, A. G.; DUARTE, P. C. A. V.; OLIVEIRA, L. G. I Levantamento nacional sobre o uso de álcool, tabaco e outras drogas entre os universitários das 27 capitais brasileiras. **Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas (SENAD)**, 284 p., 2010.

ASHKENAZI, A.; WINSLOW, J. W.; PERALTA, E. G.; PETERSON, G. L.; SCHIMERLIK, M. I.; CAPON, D. J.; RAMACHANDRAN, J. An M2 muscarinic receptor subtype coupled to both adenylyl cyclase and phosphoinositide turnover. **Science**, v. 238:672-675, 1987.

ASHKENAZI, A.; PERALTA, E. G.; WINSLOW, J. W.; RAMACHANDRAN, J.; CAPON, D. J. Functionally distinct G proteins selectively couple different receptors to PI hydrolysis in the same cells. **Cell**, v. 56, 487-493, 1989a.

BAUMGOLD, J.; FISHMAN, P. H. Muscarinic receptor-mediated increase in cAMP levels in SK-N-SH human neuroblastoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 154, 1137-1143, 1988.

BENOWITZ, N. L. Pharmacology of nicotine: addiction, smoking-induced disease, and therapeutics. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 49, 57-71, 2009.

BONNER, T. I.; YOUNG, A. C.; BRANN, M. R.; BUCKLEY, N. J. Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. **Neuron**, v. 1, 403-410, 1988.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, 248-254, 1976.

BRADY, A. E.; JONES, C. K.; BRIDGES, T. M.; KENNEDY, J. P.; THOMPSON, A. D.; HEIMAN, J. U.; BREININGER, M. L.; GENTRY, P. R.; YIN, H.; JADHAV, S. B.; SHIREY, J. K.; CONN, P. J.; LINDSLEY, C. W. Centrally Active Allosteric Potentiators of the M4 Muscarinic Acetylcholine Receptor Reverse Amphetamine-Induced Hyperlocomotor Activity in Rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 327, 941-953, 2008.

BROADHURST, P. L. The place of animal psychology in the development of psychosomatic research. **Fortschritte der Psychosomatischen Medizin.**, v. 1, 63-69, 1960.

BROWN, E. E.; FIBIGER, H. C. Differential effects of excitotoxic lesions of the amygdala on cocaine-induced conditioned locomotion and conditioned place preference. **Psychopharmacology**, v. 113, 123-130, 1993.

BYMASTER, F. P.; HEATH, I.; HENDRIX, J. C.; SHANNON, H. E. Comparative behavioral and neurochemical activities of cholinergic antagonists in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 267, n. 1, 16-24, 1993.

CAMARINI, R.; GRIFFIN III, W. C.; YANKE, A. B.; DOS SANTOS, B. R.; OLIVE, M. F. Effects of adolescent exposure to cocaine on locomotor activity and extracellular dopamine and glutamate levels in nucleus accumbens of DBA/2J mice. **Brain Research**, v. 1193, 34-42, 2008.

CARDOSO, C. C.; PEREIRA, R. T. S.; KOYAMA, C. A.; PORTO, C. S.; ABDALLA, F. M. F. Effects of estrogen on muscarinic acetylcholine receptors in the rat hippocampus. **Neuroendocrinology**, v. 80, 379-386, 2004.

CARDOSO, C. C.; RICARDO, V. P.; FRUSSA-FILHO, R.; PORTO, C. S.; ABDALLA, F. M. F. Effects of 17 β -estradiol on expression of muscarinic acetylcholine receptor subtypes and estrogen receptor α in rat hippocampus. **European Journal of Pharmacology**, v. 634, 192-200, 2010.

CARLEZON Jr., W. A.; THOME, J.; OLSON, V. G.; LANE-LADD, S. B.; BRODKIN, E. S.; HIROI, N.; DUMAN, R. S.; NEVE, R. L.; NESTLER, E. J. Regulation of cocaine reward by CREB. **Science**, v. 282, 2272-2275, 1998.

CARLINI, E. A.; GALDURÓZ, J. C. F.; NOTO, A. R.; NAPO, S. A. II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil. São Paulo: **Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID)**, Departamento de Psicobiologia, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal Paulista, 2005.

CARVALHO, V. M. Pesquisa dos indicadores de uso do *crack* em amostras de urina de indivíduos submetidos a exame médico-legal. **Dissertação para obtenção do grau de MESTRE**, 2006.

CASTER, J. M.; WALKER, Q. D.; KUHN, C. M. Enhanced behavioral response to repeated-dose cocaine in adolescent rats. **Psychopharmacology**, v. 183, 218-225, 2005.

CASTER, J. M.; WALKER, Q. D.; KUHN, C. M. A single high dose of cocaine induces differential sensitization to specific behaviors across adolescence. **Psychopharmacology**, v. 193, 247-260, 2007.

CAULFIELD, M. P. Muscarinic receptors-characterization, coupling and function. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 58, 319-379, 1993.

CAULFIELD, M. P.; BIRDSALL, N. J. M. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 50, 279-290, 1998.

CHAMBERS, R. A.; TAYLOR, J. R.; POTENZA, M. N. Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability. **American Journal of Psychiatry**, v. 160, 1041-1052, 2003.

CHASIN, A. A. M.; MIDIO, A. F. Cocaína como agente de *causa mortis*. **Revista Saúde, Ética e Justiça**, v. 2, n. 1, 47-59, 1997.

CHASIN, A. A. M.; SILVA, E. S.; CARVALHO, V. M. Estimulantes do Sistema Nervoso Central. In: S. OGA; M. M. A. CAMARGO; J. A. O. BATISTUZZO (Eds.). **Fundamentos de Toxicologia**, 3 ed., Atheneu (SP), 353-374, 2008.

CHEN, J-C; CHEN, P-C; CHIANG, Y-C. Molecular mechanisms of psychostimulant addiction. **Chang Gung Medical Journal**, v. 32, n. 2, 148-154, 2009.

CHENG, Y. C.; PRUSOFF, W. H. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction. **Biochemistry Pharmacology**, v. 22, 3099-3108, 1973.

CORNISH, J. L.; DUFFY, P.; KALIVAS, P. W. A role for nucleus accumbens glutamate transmission in the relapse to cocaine-seeking behavior. **Neuroscience**, v. 93, 1359-1367, 1999.

COROMINAS, M.; RONCERO, C.; RIBASES, M.; CASTELLS, X.; CASAS, M. Brain-derived neurotrophic factor and its intracellular signaling pathways in cocaine addiction. **Neuropsychobiology**, v. 55, n. 1, 2-13, 2007.

COVINGTON III, H. E.; MICZEK, K. A. Repeated social-defeat stress, cocaine or morphine. Effects on behavioral sensitization and intravenous cocaine self-administration “binges”. **Psychopharmacology**, v. 158, 388-398, 2001.

CUNHA, P. J.; NICASTRI, S.; GOMES, L. P.; MOINO, R. M.; PELUSO, M. A. Neuropsychological impairments in *crack* cocaine-dependent inpatients: preliminary findings. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, n. 2, 103-106, 2004.

DALLEY, J. W.; EVERITT, B. J. Dopamine receptors in the learning, memory and drug reward circuitry. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, 403-410, 2009.

DATI, L. M. M. Caracterização das vias de morte celular induzida pela metilecgonidina, produto de pirólise da cocaína. **Dissertação para obtenção do grau de MESTRE**, 2012.

DIAS, A. C.; ARAÚJO, M. R.; LARANJEIRA, R. Evolução do consumo de *crack* em coorte com histórico de tratamento. **Revista de Saúde Pública**, 2011.

DIROCCO, D. P.; SCHEINER, Z. S.; SINDREU, C. B.; CHAN, G. C. K.; STORM, D. R. A role for calmodulin-stimulated adenylyl cyclases in cocaine sensitization. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 8, 2393-2403, 2009.

DONG, G. Z.; KAMEYAMA, K.; RINKEN, A.; HAGA, T. Ligand binding properties of muscarinic acetylcholine receptor subtypes (m1-m5) expressed in baculovirus-infected insect cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 274, n. 1, 378-384, 1995.

DUNN, J.; LARANJEIRA, R. R.; DA SILVEIRA, D. X.; FORMIGONI, M. L.; FERRI, C. P. Crack cocaine: an increase in use among patients attending clinics in São Paulo: 1990 – 1993. **Substance Use & Misuse**, v. 31, 519-527, 1996.

EGLIN, R. M.; CHOPPIN, A.; DILLON, M. P.; HEGDE, S. Muscarinic receptor ligands and their therapeutic potential. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 3, n. 4, 426-432, 1999.

EGLIN, R. M. Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. **Autonomic & Autacoid Pharmacology**, v. 26, n. 3, 219-233, 2006.

EHLERT, F. J. Pharmacological analysis of the contractile role of M2 and M3 muscarinic receptors in smooth muscle. **Receptors Channels**, v. 9, 261-277, 2003.

EPSTEIN, P. N.; ALTSHULER, H. L. Changes in the effects of cocaine during chronic treatment. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, v. 22, n. 1, 93-105, 1978.

ESTELLES, J.; LLUCH, J.; RODRÍGUEZ-ARIAS, M.; AGUILAR, M. A.; MIÑARRO, J. Cocaine exposure during adolescence affects anxiety in adult mice. **Brain Research Bulletin**, v. 71, 393-403, 2007.

EVERITT, B. J.; ROBBINS, T. W. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. **Nature Neuroscience**, v. 8, 1481-1489 (erratum: v. 9, n. 7: 979), 2005.

EVERITT, B. J.; BELIN, D.; ECONOMIDOU, D.; PELLOUX, Y.; DALLEY, J. W.; ROBBINS, T. W. Neural mechanisms underlying the vulnerability to develop compulsive drug-seeking habits and addiction. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences**, v. 363:3125–3135, 2008.

FANDIÑO, A. S.; TOENNES, S. W.; KAUERT, G. F. Studies on hydrolytic and oxidative metabolic pathways of anhydroecgonine methyl ester (methylecgonidine) using microsomal preparations from rat organs. **Chemical Research Toxicology**, v. 15, 1543-1548, 2002.

FATTORE, L.; PUDDU, M. C.; PICCIAU, S.; CAPPAL, A.; FRATTA, W.; SERRA, G. P.; SPIGA, S. Astroglial in vivo response to cocaine in mouse dentate gyrus: a

quantitative and qualitative analysis by confocal microscopy. **Neuroscience**, v. 110, n. 1, 1-6, 2002.

FELDER, C. C. Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. **Faseb Journal**, v. 9, 619-625, 1995.

FELDER, C. C.; BYMASTER, F. P.; WARD, J.; DELAPP, N. Therapeutic opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, 4333-4353, 2000.

FELICIO, L. F.; FLORIO, J. C.; SIDER, L. H.; CRUZ-CASALLAS, P. E.; BRIDGES, R. S. Reproductive experience increases striatal and hypothalamic dopamine levels in pregnant rats. **Brain Research Bulletin**, v. 4, 253-256, 1996.

FELTENSTEIN, M. W.; SEE, R. E. The neurocircuitry of addiction: an overview. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, 261-274, 2008.

FERRAZ-DE-PAULA, V.; STANKEVICIUS, D.; RIBEIRO, A.; PINHEIRO, M. L.; RODRIGUES-COSTA, E. C.; FLORIO, J. C.; LAPACHINSKE, S. F.; MOREAU, R. L. M.; PALERMO-NETO, J. Differential behavioral outcomes of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA-ecstasy) in anxiety-like responses in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, 428-437, 2011.

FILHO, O. F. F.; TURCHI, M. D.; LARANJEIRA, R.; CASTELO, A. Perfil sociodemográfico e de padrões de uso entre dependentes de cocaína hospitalizados. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 6, 751-759, 2003.

FOOL, B. L.; DIAZ, J.; SOLOKOFF, P. A single cocaine exposure increases BDNF and D3 receptor expression: implication for drug-conditioning. **Neuroreport**, v. 16, n. 2, 175-178, 2005.

FORSTER, G. L.; YEOMANS, J. S.; TAKEUCHI, J.; BLAHA, C. D. M5 muscarinic receptors are required for prolonged accumbal dopamine release after electrical stimulation of the pons in mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 21(RC190), 1-6, 2001.

FRANKLIN, T. R.; DRUHAN, J. P. Expression of Fos-related antigens in the nucleus accumbens and associated regions following exposure to a cocaine-paired environment. **European Journal of Neuroscience**, v. 12, 2097-2106, 2000.

GARCIA, R. C. T. Efeitos neurodegenerativos da metilecgonidina e da cocaína em cultura celular primária de hipocampo. **Dissertação para obtenção do grau de MESTRE**, 2009.

GARCIA, R. C. T.; DATI, L. M. M.; FUKUDA, S.; TORRES, L. H. L.; MOURA, S.; CARVALHO, N. D.; CARRETTIERO, D. C.; CAMARINI, R.; LEVADA-PIRES, A. C.; YONAMINE, M.; NETO, O. N.; ABDALLA, F. M. F.; SANDOVAL, M. R. L.; AFECHE,

S. C.; MARCOURAKIS, T. Neurotoxicity of anhydroecgonine methyl ester, a crack cocaine pyrolysis product. **Toxicological Sciences**, v. 128, 223-234, 2012.

GOEDERS, N. E.; SMITH, J. E. Reinforcing properties of cocaine in the medial prefrontal cortex: primary action on presynaptic dopaminergic terminals. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 25, 191-199, 1986.

GOLDSTEIN, R. Z.; VOLKOW, N. D. Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. **American Journal of Psychiatry**, v. 159, n. 10, 1642-1652, 2002.

GUERRIERO, R. M.; RAJADHYAKSHA, A.; CROZATIER, C.; GIROS, B.; NOSTEN-BERTRAND, M.; KOSOFSKY, B. E. Augmented constitutive CREB expression in the Nucleus Accumbens and Striatum may contribute to the altered behavioral response to cocaine of adult mice exposed to cocaine in utero. **Developmental Neuroscience**, v. 27, 235-248, 2005.

HAILE, C. N.; KOSTEN, T. R.; KOSTEN, T. A. Genetics of dopamine and its contribution to cocaine addiction. **Behavioral Genetics**, v. 37, 119-145, 2007.

HAN, X.; KOBZIK, L.; SEVERSON, D.; SHIMONI, Y. Characteristics of nitric oxide-mediated cholinergic modulation of calcium current in rabbit sino atrial node. **Journal of Physiology**, v. 509, 741-754, 1998.

HATSUKAMI, D. K.; FISCHMAN, M. W. *Crack* cocaine and cocaine hydrochloride. Are the differences myth or reality? **Journal of the American Medical Association**, v. 276, n. 19, 1580-1588, 1996.

HODGINS, D. C.; EL-GUEBALY, N.; ARMSTRONG, S. Prospective and retrospective reports of mood states before relapse to substance use. **Journal of Consulting and Clinical Psychology**, v. 63, 400-407, 1995.

HORNE, M. K.; LEE, J.; CHEN, F.; LANNING, K.; TOMAS, D.; LAWRENCE, A. J. Long-term administration of cocaine or serotonin reuptake inhibitors results in anatomical and neurochemical changes in noradrenergic, dopaminergic and serotonin pathways. **Journal of Neurochemistry**, v. 106, 1731-1744, 2008.

HUANG, Y. H.; LIN, Y.; MU, P.; LEE, B. R.; BROWN, T. E.; WAYMAN, G.; MARIE, H.; LIU, W.; YAN, Z.; SORG, B. A.; SCHLUTER, O. M.; ZUKIN, R. S.; DONG, Y. In vivo cocaine experience generates silent synapses. **Neuron**, v. 63, 40-47, 2009.

HULME, E. C.; LU, Z. L.; SALDANHA, J. W.; BEE, M. S. Structure and activation of muscarinic acetylcholine receptors. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, 29-34, 2003.

HURD, Y. L.; UNGERSTEDT, U. Cocaine: an in vivo microdialysis evaluation of its acute action on dopamine transmission in rat striatum. **Synapse**, v. 3, 48-54, 1989.

HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C. Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. **Nature Review Neuroscience**, v. 2, 695-703, 2001.

HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C.; NESTLER, E. J. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. **Annual Review of Neuroscience**, v. 29, 565-598, 2006.

JACOB, P. III., LEWIS, E. R., ELIAS-BAKER, B. A., JONES, R. T. A pyrolysis product, anhydroecgonine methyl ester (methylecgonidine), is in the urine of cocaine smokers. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 14, 353-357, 1990.

JAYALAKSHMI, K.; SAIRAM, M.; SINGH, S. B.; SHARM, S. K.; ILAVAZHAGAN, G.; BANERJEE, P. K. Neuroprotective effect of N-acetyl cysteine on hypoxia-induced oxidative stress in primary hippocampal culture. **Brain Research**, v. 1046, 97-104, 2005.

JANSSON, C. C.; KUKKONEN, J.; AKERMAN, K. E. Muscarinic receptor-linked elevation of cAMP in SH-SY5Y neuroblastoma cells is mediated by Ca^{2+} and protein kinase C. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1095, 255–260, 1991.

JOHANSON, C. E.; FISCHMAN, M. W. The pharmacology of cocaine related to its abuse. **Pharmacological Reviews**, v. 41, 3-52, 1989.

JORGE, M. S. B.; QUINDERÉ, P. H. D.; YASUI, S.; ALBUQUERQUE, R. A. The ritual of crack consumption: socio-anthropological aspects and impacts on the health of users. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 10, 2909-2918, 2013.

JULIEN, R. M. A primer of drug action: a concise, nontechnical guide to the actions, uses and side effects of psychoactive drugs. 7ed. New York: W. H. Freeman, 125-143, 1995.

KALIVAS, P. W.; DUFFY, P. Sensitization to repeated morphine injection in the rat: possible involvement of A10 dopamine neurons. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 241, 201-212, 1987.

KLINE, R. H.; WRIGTH, J.; FOX, K. M.; ELDEFRAWI, M. E. Synthesis of 3-arylecgonine analogues as inhibitors of cocaine binding and dopamine uptake. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 33, 2024-2027, 1990.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. **Science**, v. 278, 52-58, 1997.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, 97-129, 2001.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. "What is addiction?" (Capítulo 1) e "Drug addiction: transition from neuroadaptation to pathophysiology" (Capítulo 10). **Neurobiology of addiction**, Academic Press (UK), 2006.

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurocircuitry of addiction. **Neuropsychopharmacology Reviews**, 1-22, 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, 680-685, 1970.

LANGMEAD, C. J.; WATSON, J.; REAVILL, C. Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 117, 232-243, 2008.

LANZAFAME, A. A.; CHRISTOPOULOS, A.; MITCHELSON, F. Cellular signaling mechanisms for muscarinic acetylcholine receptors. **Receptors Channels**, v. 9, 241-260, 2003.

LEE, B. R.; DONG, Y. Cocaine-induced metaplasticity in the nucleus accumbens: silent synapse and beyond. **Neuropharmacology**, v. 61, n.7, 1060-1069, 2011.

LEVEY, A. I. Immunological localization of M1-M5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. **Life Sciences**, v. 52, 441-448, 1993.

LIAO, C. F.; THEMME, A. P.; JOHO, R.; BARBERIS, C.; BIRNBAUMER, L. Molecular cloning and expression of a fifth muscarinic acetylcholine receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, 7328-7337, 1989.

LIBERTY, H. J.; JOHNSON, B. D.; FORTNER, N.; RANDOLPH, D. Detecting crack and other cocaine use with fastpatches. **Addiction Biology**, v. 8, 191-200, 2003.

LOH, E. A.; ROBERTS, D. C. Break-points on a progressive ratio schedule reinforced by intravenous cocaine increase following depletion of forebrain serotonin. **Psychopharmacology**, v. 101, 262-266, 1990.

MARIN, M. T.; CRUZ, F. C.; PLANETA, C. S. Cocaine-induced behavioral sensitization in adolescent rats endures until adulthood: lack of association with GluR1 and NR1 glutamate receptor subunits and tyrosine hydroxylase. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 91, 109-114, 2008.

MATTSON, M. P. Contributions of mitochondrial alterations resulting from bad genes and a hostile environment to the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Int. Review of Neurobiology**, v. 53, 387-409, 2002.

MATTSON, B. J.; BOSSERT, J. M.; SIMMONS, D. E.; NOZAKI, N.; NAGARKAR, D.; KREUTER, J. D.; HOPE, B. T. Cocaine-induced CREB phosphorylation in nucleus accumbens of cocaine-sensitized rats is enabled by enhanced activation of extracellular signal-related kinase, but not protein kinase A. **Journal of Neurochemistry**, v. 95, 1481-1494, 2005.

MATTSON, B. J.; KOYA, E.; SIMMONS, D. E.; MITCHELL, T. B.; BERKOW, A.; CROMBAG, H. S.; HOPE, B. T. Context-specific sensitization of cocaine-induced

locomotor activity and associated neuronal ensembles in rat nucleus accumbens
European Journal of Neuroscience, v. 27, 202-212, 2008.

MCCLUNG, C. A.; ULERY, P. G.; PERROTTI, L. I.; ZACHARIOU, V.; BERTON, O.;
 NESTLER, E. J. DeltaFosB: a molecular switch for long-term adaptation in the brain.
Molecular Brain Research, v. 132, 146-154, 2004.

MATEO, Y.; LACK, C. M.; MORGAN, D.; ROBERTS, D. C. S.; JONES, S. R.
 Reduced dopamine terminal function and insensitivity to cocaine following cocaine
 binge self-administration and deprivation. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, 1455-
 1463, 2005.

MÉGARBANE, B.; CHEVILLARD, L. The large spectrum of pulmonary complications
 following illicit drug use: features and mechanisms. **Chemico-Biological
 Interactions**, *in press*, 2013.

MEIL, W. M.; SEE, R. E. Lesions of the basolateral amygdala abolish the ability of
 drug associated cues to reinstate responding during withdrawal from self-
 administered cocaine. **Behavior Brain Research**, v. 87, 139-148, 1997.

MIGEON, J. C.; GOLDMAN, P. S.; HABECKER, B. A.; NATHANSON, N. M.
 Regulation of muscarinic acetylcholine receptor expression and function. **Annals
 New York Academy of Sciences**, v. 757, 180-185, 1995.

MÜLLER, C.P.; CAREY, R. J.; WILKISZ, M.; SCHWENZNER, S.; JOCHAM, G.; HUSTON, J. P.; DE SOUZA SILVA, M. A. Acute anxiolytic effects of cocaine: The role of test latency and activity phase. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 89, 218-226, 2008.

NAHORSKI, S. R.; TOBIN, A. B.; WILLARS, G. B. Muscarinic M3 receptor coupling and regulation. **Life Sciences**, v. 60, 1039-1045, 1997.

NARENDHAN, R.; MARTINEZ, D. Cocaine abuse and sensitization of striatal dopamine transmission: a critical review of the preclinical and clinical imaging literature. **Synapse**, v. 62, 851-869, 2008.

NAZARIAN, A.; SUN, W-L; ZHOU, L.; KEMEN, L. M.; JENAB, S.; QUINONES-JENAB, V. Sex differences in basal and cocaine-induced alterations in PKA and CREB proteins in the nucleus accumbens. **Psychopharmacology**, v. 203, n. 3, 641-650, 2009.

NESTLER, E. J. Is there a common molecular pathway for addiction? **Nature Neuroscience**, v. 8, 1445-1449, 2005.

O'BRIEN, C. P.; MCLELLAN, A. T. Myths about the treatment of addiction. **Lancet**, v. 347, 237-240, 1996.

O'BRIEN, C. P. Drogagem e Uso Abusivo de Drogas. In: L. L. BRUNTON; J. S. LAZO; K. L. PARKER (Eds.). **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 11 ed., McGraw-Hill Interamericana do Brasil (RJ), 543-562, 2006.

PAUL, B. D.; LALANI, S.; BOSY, T.; JACOBS, A. J.; HUESTIS, M. A. Concentrations profiles of cocaine, pyrolytic methyl ecgonidine and thirteen metabolites in human blood and urine: determination by gas chromatography-mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 19, 677-688, 2005.

PERALTA, E. G.; ASHKENAZI, A.; WINSLOW, J. W.; RAMACHANDRAN, J.; CAPON, D. J. Differential regulation of PI hydrolysis and adenylyl cyclase by muscarinic receptor subtypes. **Nature**, v. 334, 434-437, 1988.

PIRES, A.; PIERI, P.; HAGE, M.; SANTOS, A. B. G.; MEDEIROS, M. C. R.; GARCIA, R. C. T.; YONAMINE, M.; HALLAK, J.; SALDIVA, P. H. N.; ZORZETTO, J. C.; BUENO, H. M. S. Repeated inhalation of crack-cocaine affects spermatogenesis in young and adult mice. **Inhalation Toxicology**, v. 24, n. 7, 439-446, 2012.

PORTO, C. S.; ABREU, L. C.; GUNSALUS, G. L.; BARDIN, C. W. Binding of sex-hormone-binding globulin (SHBG) to testicular membranes and solubilized receptors. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 89, n. 1-2, 33-38, 1992.

POST, R. M.; LOCKFELD, A.; SQUILLACE, K. M.; CONTEL, N. R. Drug-environment interaction: context dependency of cocaine-induced behavioral sensitization. **Life Sciences**, v. 28, n. 7, 755-60, 1981.

RASMUSSEN, T.; SAUERBERG, P.; NIELSEN, E. B.; SWEDBERG, M. D. B.; THOMSEN, C.; SHEARDOWN, M. J.; JEPPESEN, L.; CALLIGARO, D. O.; DELAPP, N. W.; WHITESITT, C.; WARD, J. S.; SHANNON, H. E.; BYMASTER, F. P.; FINK-JENSEN, A. Muscarinic receptor agonists decrease cocaine self-administration rates in drug-naïve mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 402, 241-246, 2000.

RAUPP, L.; ADORNO, R. C. F. Circuitos de uso de crack na região central da cidade de São Paulo (SP, Brasil). **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 5, 2613-2622, 2011.

RITZ, M. C.; LAMB, R. J.; GOLDBERG, S. R.; KUCHAR, M. J. Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. **Science**, v. 237, 1219-1223, 1987.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. **Brain Research Reviews**, v. 18, n. 3, 247-291, 1993.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. Addiction. **Annual Review of Psychology**, v. 54, 25-53, 2003.

ROY, E.; LECLERC, P.; MORISSETTE, C.; ARRUDA, N.; BLANCHETTE, C.; BLOUIN, K.; ALARY, M. Prevalence and temporal trends of crack injection among injection drug users in eastern central Canada. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 133, 275-278, 2013.

RUMENAPP, U.; ASMUS, M.; SCHABLOWSKI, H.; WOZNICKI, M.; HAN, L., JAKOBS, K. H.; FAHIMI-VAHID, M.; MICHALEK, C.; WIELAND, T.; SCHMIDT, M. The M3 muscarinic acetylcholine receptor expressed in HEK-293 cells signals to phospholipase D via G12 but not Gq-type G proteins: regulators of G proteins as tools to dissect pertussis toxin-resistant G proteins in receptor-effector coupling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, 2474-2479, 2001.

SÁNCHEZ-LEMUS, E.; ARIAS-MONTAÑO, J-A. M₁ muscarinic receptors contribute to, whereas M₄ receptors inhibit, dopamine D₁ receptor-induced [³H]-cyclic AMP accumulation in rat striatal slices. **Neurochemical Research**, v. 31, 555-561, 2006.

SANCHEZ-RAMOS, J. R. Neurological complications of cocaine abuse include seizure and strokes. **The Psychiatric Times**, 20-22, 1990.

SCHEIDWEILER, K. B.; PLESSINGER, M. A.; SHOJAIE, J.; WOOD, R. W.; KWONG, T. C. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methylecgonidine, a *crack* cocaine pyrolyzate. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 307, 1179-1187, 2003.

SCHMIDT, L. S.; THOMSEN. M.; WEIKOP, P.; DENCKER, D.; WESS, J.; WOLDBYE, D. P. D.; WORTWEIN, G.; FINK-JENSEN, A. Increased cocaine self-administration in M₄ muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. **Psychopharmacology**, v. 216, 367-378, 2011.

SELF, D. W.; GENOVA, L. M.; HOPE, B. T.; BARNHART, W. J.; SPENCER, J. J.; NESTLER, E. J. Involvement of cAMP-dependent protein kinase in the Nucleus Accumbens in cocaine self-administration and relapse of cocaine-seeking behavior. **The Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 5, 1848-1859, 1998.

SHANNON, H. E.; PETERS, S. C. A comparison of the effects of cholinergic and dopaminergic agents on scopolamine-induced hyperactivity in mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 255, n. 2, 549-553, 1990.

SHEFFLER, D. J.; WILLIAMS, R.; BRIDGES, T. M.; XIANG, Z.; KANE, A. S.; BYUN, N. E.; JADHAV, S.; MOCK, M. M.; ZHENG, F.; LEWIS, L. M.; JONES, C. K.; NISWENDER, C. M.; WEAVER, C. D.; LINDSLEY, C. W.; CONN, P. J. A Novel Selective Muscarinic Acetylcholine Receptor Subtype 1 Antagonist Reduces Seizures without Impairing Hippocampus-Dependent Learning. **Molecular Pharmacology**, v. 76, 356-368, 2009.

SHENG, M.; GREENBERG, M.E. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. **Neuron**, v. 4, n. 4, 477-485, 1990.

STANSFIELD, K. H.; KIRSTEIN, C. L. Chronic cocaine or ethanol exposure during adolescence alters novelty-related behaviors in adulthood. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 86, 637-642, 2007.

STERLING, P.; EYER, J. Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. In **Handbook of Life Stress, Cognition and Health** (S. Fischer, J. Reason, Eds.), 629-649, 1988.

SUN, L. S.; QUAMINA, A. Perinatal cocaine exposure stimulates the expression and activation of CREB in the neonatal rat heart. **Pediatric Research**, v. 53, n. 3, 500-506, 2003.

SUNAHARA, R. K.; DESSAUER, C. W.; GILMAN, A. G. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 36, 461-480, 1996.

TAO, X.; FINKBEINER, S.; ARNOLD, D. B.; SHAYWITZ, A. J.; GREENBERG, M. E. Ca^{2+} influx regulates BDNF transcription by a family CREB transcription factor-dependent mechanism. **Neuron**, v. 20, n. 4, 709-726, 1998.

THOMAS, M. J.; KALIVAS, P. W.; SHAHAM, Y. Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, 327-342, 2008.

THRELFELL, S.; CLEMENTS, M. A.; KHODAI, T.; PIENAAR, I. S.; EXLEY, R.; WESS, J.; CRAGG, S. J. Striatal muscarinic receptors promote activity-dependence of dopamine transmission via distinct receptor subtypes on cholinergic interneurons in ventral versus dorsal striatum. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 9, 3398-3408, 2010.

TOENNES, S. W.; FANDIÑO, A. S.; HESSE, F. J.; KAUERT, G. F. Artifact production in the assay of anhydroecgonine methyl ester in serum using gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B, Analytical Technologies In the Biomedical and Life Sciences**, v. 792, 345-351, 2003.

TROPEA, T. F.; KOSOFSKY, B. E.; RAJADHYAKSHA, A. M. Enhanced CREB and DARPP-32 phosphorylation in the nucleus accumbens and CREB, ERK, and GluR1 phosphorylation in the dorsal hippocampus is associated with cocaine-conditioned place preference behavior. **Journal of Neurochemistry**, v. 106, n. 4, 1780-1790, 2008.

TZAVARA, E. T.; BYMASTER, F. P.; DAVIS, R. J.; WADE, M. R.; PERRY, K. W.; WESS, J., MCKINZIE, D. L.; FELDER, C.; NOMIKOS, G. G. M₄ muscarinic receptors regulate the dynamics of cholinergic and dopaminergic neurotransmission: relevance to the pathophysiology and treatment of related CNS pathologies. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 12, 1410-1412, 2004.

ULLIAN, E. M.; SAPPERSTEIN, S. K.; CHRISTOPHERSON, K. S.; BARRES, B. A. Control of synapse number by glia. **Science**, v. 291, 657-661, 2001.

UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime). Guidance for the validation of analytical methodology and calibration of equipment used for testing of illicit drugs in seized materials and biological specimens. **United Nations Publication**, 2009.

UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime). **World Drug Report**, 2011.

UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime). **World Drug Report**, 2012.

UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime). **World Drug Report**, 2013.

VAN KOPPEN, C. J.; KAISER, B. Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 98, 197-220, 2003.

VANDERSCHUREN, L. J. M. J.; KALIVAS, P. W. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. **Psychopharmacology**, v. 151, 99-120, 2000.

VEZINA, P.; STEWART, J. Amphetamine administered to the ventral tegmental area but not to the nucleus accumbens sensitizes rats to systemic morphine: lack of conditioned effects. **Brain research**, v. 516, 99-106, 1990.

WESS, J.; LIU, J.; BLIN, N.; YUN, J.; LERCHE, C.; KOSTENIS, E. Structural basis of receptor/G protein coupling selectivity studied with muscarinic receptors as model systems. **Life Sciences**, v. 60, 1007-1014, 1997.

WESS, J. Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, 423-450, 2004.

WOOD, S. A.; RASMUSSEN, J. P.; HOLLAND, P. T.; CAMPBELL, R.; CROWE, A. L. M. First Report of the Cyanotoxin Anatoxin-A from *Aphanizomenon issatschenkoi* (cyanobacteria), **Journal of Phycology**, v. 43, 356-365, 2007.

WOOLF, J. H.; HUANG, L.; ISHIGURO, Y.; MORGAN, J. P. Negative Inotropic Effect of Methylecgonidine, a Major Product of Cocaine Base Pyrolysis, on Ferret and Human Myocardium. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.30, n. 3, 352-359, 1997.

XIE, D. P.; CHEN, L. B.; LIU, C. Y.; ZHANG, C. L.; LIU, K. J.; WANG, P. S. Arecoline excites the colonic smooth muscle motility via M3 receptor in rabbits, **Chinese Journal of Physiology**, v. 47, n. 2, 89-94, 2004.

XIE, X.; STEKETEE, J. D. Repeated exposure to cocaine alters the modulation of mesocorticolimbic glutamate transmission by medial prefrontal cortex Group II metabotropic glutamate receptors. **Journal of Neurochemistry**, v. 107, 186-196, 2008

YONAMINE, M.; SILVA, O. A. Confirmation of cocaine exposure by gas chromatography-mass spectrometry of urine extracts after methylation of benzoylecgonine. **Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 773, n. 1, 83-87, 2002.

ZAPATA, A.; CHEFER, V. I.; ATOR, R.; SHIPPENBERG, T. S.; ROCHA, B. A. Behavioural sensitization and enhanced dopamine response in the nucleus accumbens after intravenous cocaine self-administration in mice. **European Journal of Neuroscience**, v. 17, 590-596, 2003.

ZHANG, C.; LOMENZO, S. A.; BALLAY II, C. J.; TRUDELL, M. L. An improved synthesis of (+)-2-tropanone. **Journal of Organic Chemistry**, v. 62, 7888-7889, 1997.

ZHANG, Y.; LOONAM, T. M.; NOAILLES, P. A. H.; ANGULO, J. A. Comparison of cocaine- and methamphetamine-evoked dopamine and glutamate overflow in somatodendritic and terminal field regions of the rat brain during acute, chronic, and early withdrawal conditions. **Annals New York Academy of Sciences**, 93-120, 2001.

ZHANG, W.; YAMADA, M.; GOMEZA, J.; BASILE, A. S.; WESS, J. 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, 6347-6352, 2002.

Anexos

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA/FCF/03/2010

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **“Exposição ao crack: participação da metilecgonidina na dependência, no comportamento e no estresse oxidativo do SNC”** (Protocolo nº 259), de responsabilidade do pesquisador **Raphael Caio Tamborelli Garcia** sob a orientação da Profa. Dra. Tânia Marcourakis, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório – SBCAL/COBEA e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal – CEEA, desta Faculdade, em 8 de fevereiro de 2010.

São Paulo, 09 de fevereiro de 2010.

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEEA/FCF/USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Exposição ao Crack: Participação da metilecgonidina, produto de pirólise da cocaína, na dependência, no comportamento e no estresse oxidativo do SNC", protocolo nº 641/09, sob a responsabilidade de Maria Regina Lopes Sandoval e Raphael Caio Tamborelli Garcia, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 08/09/2009.

"We certify that the Research entitled "Crak cocaine exposure: role of methylecgonidine, cocaine pyrolysis product, on addiction, behavior and oxidative stress of CNS", protocol nº 641/09, under the responsibility of Maria Regina Lopes Sandoval and Raphael Caio Tamborelli Garcia, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 09/08/2009".

Vigência do Projeto: 09/2009 – 09/2013	Nº de animais/espécie
	300 /rato – Wistar/Macho

São Paulo, 11 de setembro de 2009.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

SPECIFICATIONS AND CERTIFICATE OF ANALYSIS

Lipomed Document QC-CA-267
Version 003-11.Nov.2008

Supersedes: 002-02.May.2006

Chemical name:	Anhydroecgoninemethylester.HBr methyl (1S,5R)-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-ene-4-carboxylate.hydrobromide	
CAS Registry Nr:	43021-26-7 (FB)	
Chemical formula:	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂ Hydrobromide	Molwt: 181.24 262.15
Lot No: 267.2B9.2 Art. Nr. COC-267-HB	Retested: 22.12.2008 Retest date: 12/2013	

TEST	SPECIFICATIONS	RESULTS
1. Appearance	white to off-white crystalline powder	conforms
2. Identity	IR UV: No maxima Melting point: 142 ± 3 °C	IR corresponds UV: No maxima 140.5 – 141.8 °C
3. Purity <small>The purity is calculated from the distribution of 6 GC analyses with a 95% level of confidence.</small>	GC > 97.5 %	98.040 ± 0.050 %
4. Optical rotation	$[\alpha]_D^{25} = -42 \pm 2^\circ$ (c = 1.0 in nanopure water)	$[\alpha]_D^{25} = -42.1^\circ$ (c = 1.0 in nanopure water)
5. Free base content <small>(Corrected from purity and water)</small>	> 66.4 %	67.5%
6. Water content	Karl Fischer < 1 %	0.25 %
7. Calculated hydrobromide content		30.8 %

FOR ANALYTICAL PURPOSES ONLY: NOT FOR HUMAN USE!

The material should be stored at +2 to +8 °C in a dry and cool area in a closed container. Lipomed certifies that the identity and chemical purity of this reference standard is based on exhaustive analytical tests. Gravimetric preparation of this bulk standard is ensured by using balances calibrated with ilac-MRA traceable weights.

QC - Officer: Deputy: Dr. L. Prévot

Date sign: Arlesheim,

22. DEZ. 2008

VANDERBILT UNIVERSITY

MEDICAL CENTER

*P. Jeffrey Conn, Ph.D.**Lee E. Limbird Professor of Pharmacology**Director, Vanderbilt Center for Neuroscience Drug Discovery*

December 26, 2013

To Whom it may concern:

It is a pleasure to write in enthusiastic support of Raphael Garcia's final research report. Raphael spent 6 months in my laboratory working as a research intern. He did an outstanding job in every way. Rapha was dedicated, hardworking, and highly engaged intellectually in his research in our lab.

Prior to Rapha's joining my lab, previous studies had suggested that a compound called AEME interacts with muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs). AEME is a generated as a byproduct of the use of free base "crack" cocaine and Rapha postulated that the actions of this compound on mAChRs may contribute to its in vivo effects. To test the hypothesis that AEME acts on mAChRs to elicits its behavioral and neurochemical effects, Rapha conducted a detailed pharmacological analysis of AEME at each of the 5 rat mAChR subtypes M1-M5 heterologously expressed in CHO-K1 cells. Both saturation and competition binding studies were performed to assess AEME binding to each mAChR subtype. In addition, effects on function of mAChRs were assessed by measuring coupling of each mAChR subtype to intracellular Ca²⁺ mobilization. Measures of effects of AEME on [3H]NMS competition binding showed that AEME binds to each mAChR subtype with a slight preference for M2 mAChR. Functional studies (Ca²⁺ mobilization) revealed that AEME acts as a partial agonist at M1 and M3 and as an antagonist at the remaining subtypes. These studies support the cholinergic hypothesis of AEME's effects.

Rapha did an outstanding job of learning the methods required for completion of these studies and performing using these techniques to generate an excellent set of data that allowed clear interpretations of his results. I was very happy with Rapha's work. It was a pleasure to have him as an intern in our lab,

Sincerely,

P. Jeffrey Conn, Ph.D.

2220 Pierce Avenue
1215D Light Hall
Nashville, TN 37232-6600

tel 615.936.2478
fax 615.343.3088
www.connlab.com