UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Abstinência à cocaína e suas consequências no sistema colinérgico muscarínico

Yuli Yohana Serna Torres

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE
Orientadora: Profª Drª. Tania Marcourakis
Coorientador: Prof. Dr. Raphael Caio Tamborelli Garcia.

SÃO PAULO
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Abstinência à cocaína e suas consequências no sistema colinérgico muscarínico

Yuli Yohana Serna Torres

Versão corregida

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE
Orientadora: Profª Drª. Tania Marcourakis
Coorientador: Prof. Dr. Raphael Caio Tamborelli Garcia.

SÃO PAULO
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

T693a

TORRES, YULI YOHANA
Abstinência à cocaína e suas consequências no sistema colinérgico muscarínico / YULI YOHANA TORRES. - São Paulo, 2018.
130 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: MARCOURAKIS, TANIA
Coorientador: GARCIA, RAPHAEL

1. Farmacodependência. 2. Receptores colinérgicos muscarínicos. 3. Receptores dopaminérgicos. 4. Cocaína. 5. Abstinência. I. T. II. MARCOURAKIS, TANIA, orientador. III. GARCIA, RAPHAEL, coorientador.

Yuli Yohana Serna Torres

Abstinência à cocaína e suas consequências no sistema colinérgico muscarínico

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

_____
Professora Dra. Tania Marcourakis
Orientador/presidente

_____
1° Examinador

_____
2° Examinador

_____
3° Examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2019.

Mi querida madre **Antonia Torres Narbajo**, gracias por confiar en mí, por tus consejos y hacer que no me rinda ante los obstáculos presentes en la vida. Tu amor hace de mí una mejor persona, mi toñita linda.

A mi hija **Nayara Anaíssa Sandoval Serna Torres**, eres el amor de mi vida, cada día me enseñas el arte de la paciencia.

A mi amorcito **Diego Alfonso Sandoval Salazar**, gracias por el cariño y paciencia que me tienes cada día.

Son los amores de mi vida, los pilares de mi éxito profesional y personal. Los amo mucho mis amores.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meu caminho.

Aos meus pais, Antonia Torres Narbajo e Inocencio Serna Montes, pelo carinho, amor e apoio incondicional nestes 3 anos. A meu avô Fausto por cuidar de min quando era pequena e por ser como um pai. A minha tia Edna por ser uma segunda mãe e sempre confiar em mim, a meus amados tios Ronel, Hipifanio, Roberth, Manuel e a todas minhas primas.

Á minha querida orientadora Profa. Dra. Tania Marcourakis, por me receber como aluna de mestrado no seu laboratório e confiar a mim este trabalho. Pela amizade, orientação e paciência que me teve comigo. Agradeço-lhe aos finais de semana sacrificados por minha causa.

Ao Prof. Dr. Raphael Caio Tamborelli Garcia, sempre presente nos momentos fundamentais para me ajudar, ensinar e orientar. Pelo suporte no desenvolvimento deste trabalho e por todas as leituras no final de semana, obrigada por me ajudar.

Á Ms. Lidia Emmanuela Wiazowski Spelta, pela valiosa amizade, paciência e parceria. Muito obrigada pelo constante apoio nas grandes e pequenas coisas e por compartilharmos bons momentos.

Á Profa. Dra. Rosana Camarini, pela colaboração com as análises comportamentais, e a todos os seus alunos de seu laboratório.

Á Profa. Dra. Carolina Demarchi Munhoz, Dr. Nilton Barreto dos Santos e Dr. Leonardo Santana Novaes, pelo apoio da sala comportamental e auxílio com protocolos.

A todos meus colegas de laboratório pelo carinho e apoio nessa caminhada: Ana Carolina, Sayuri, Stephania, Vitor, Tatiana e Mariana. A simpatia e disponibilidade demonstrada foram fundamentais para a concretização deste trabalho.

Aos meus amigos da universidade Brayan, Marcela, Melissa, Mirla. Ainda lembro quando iniciamos este caminho, deixando tudo em nosso país, por um crescimento professional. A minha amiga Perla, foi muito bom te conhecer. Obrigada pela paciência e carinho.

Á banca examinadora, pelas contribuições e o tempo dedicado na avaliação deste trabalho.

A todos os alunos, funcionários e professores de pós-graduação do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Obrigada a todas as pessoas que contribuíram de alguma maneira, para a execução deste trabalho, tornando possível sua realização.

Á CAPES pelo auxílio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Prevalência anual do uso de drogas ilícitas de 2006-2016	21
Figura 2	Cultivo global da *Erytroxylum coca* e produção de cocaína, 1998-2015.	22
Figura 3	Tendências globais no número de usuários de cocaína	23
Figura 4	Fluxograma do método de obtenção do cloridrato de cocaína	27
Figura 5	Concentrações de cocaína no sangue nas diferentes vias de administração	28
Figura 6	Efeitos da cocaína no transportador de dopamina	30
Figura 7	Modelo de rede de quatro circuitos fundamental na dependência	35
Figura 8	Modelo integrando circuitos neurais e os comportamentos	37
Figura 9	Projeções dopaminérgicas em regiões encefálicas	42
Figura 10	Neurotransmissão dopaminérgica	44
Figura 11	Principais vias colinérgicas límbicas	47
Figura 12	Síntese, armazenamento, liberação e degradação da acetilcolina	49
Figura 13	Estrutura e vias de sinalização dos receptores muscarínicos	50
Figura 14	Delineamento experimental do tratamento agudo	59
Figura 15	Delineamento experimental do tratamento crônico	60
Figura 16	Atividade locomotora total, periférica, central e relação da área periférica e central do tratamento agudo	66
Figura 17	Atividade locomotora total na faixa de tempo de 5 minutos no escalonamento de dose	69
Figura 18	Sensibilização comportamental	71
Figura 19	Atividade locomotora na área periférica	73
Figura 20	Atividade locomotora na área central	75
Figura 21	Teste de labirinto em cruz elevado após 14 dias de abstinência	76
Figura 22	Quantificação de receptores dopaminérgicos por *Western Blotting* no córtex pré-frontal	77
Figura 23	Quantificação de receptores dopaminérgicos por *Western Blotting* no estriado	78
Figura 24	Quantificação de receptores dopaminérgicos por *Western Blotting* no hipocampo	79
Figura 25	Quantificação de receptores muscarínicos por *Western Blotting* no córtex pré-frontal	81

Figura 26	Quantificação de receptores muscarínicos por *Western Blotting* no estriado	82
Figura 27	Quantificação de receptores muscarínicos por *Western Blotting* no hipocampo	83
Figura 28	Quantificação da colina acetil-transferase por *Western Blotting* no córtex pré-frontal, estriado e hipocampo	84
Figura 29	Quantificação do transportador vesicular da acetilcolina por *Western Blotting* no córtex pré-frontal, estriado e hipocampo	85
Figura 30	Quantificação da acetilcolinesterase por *Western Blotting* no córtex pré-frontal, estriado e hipocampo	86

LISTA DE DIAGNÓSTICO DE ABSTINENCIA

Tabela 1: Critérios de diagnostico na abstinência de cocaína..... 39

LISTA DE SIGLAS

ACh	Acetilcolina
VTA	Área tegmental ventral
ChAT	Colina acetiltransferase
CTX	Córtex
OFC	Córtex órbito-frontal
CPF	Córtex pré-frontal
DLPFC	Córtex pré-frontal dorsolateral
mCPF	Córtex pré-frontal medial
AChE	Enzima acetilcolinesterase
CG	Giro cingulado
ACG	Giro cingulado anterior
NAc	Núcleo accumbens
VP	Pálido ventral
mAChRs	Receptores colinérgicos muscarínicos
SN	Substância negra
DAT	Transportadores de dopamina
VAChT	Transportador vesicular de acetilcolina

SUMÁRIO

1. Introdução.....21
2. Revisão da literatura.....25
2.1. Cocaína 26
2.2. Farmacodependência e sua base neurobiológica.....32
2.2.1. Síndrome do comprometimento da inibição da resposta e atribuição da saliência.....36
2.2.1.1. Síndrome de abstinência da cocaína.....38
2.2.2. O sistema dopaminérgico e a busca da recompensa.....41
2.2.3. Sistema colinérgico e suas implicações no processo de farmacodependência. 46
2.3 Alterações do sistema dopaminérgico e colinérgico na abstinência 52
3. Objetivo geral 56
4. Materiais e Métodos.....58
4.1. Animais 58
4.3. Delineamento experimental 58
4.4. Avaliação da atividade locomotora em campo aberto.....61
4.4.1. Equipamento de campo aberto.....61
4.4.2. Procedimento 61
4.5. Labirinto em cruz elevada após o período de abstinência 61
4.5.1. Equipamento do labirinto em cruz elevado.....61
4.5.2. Procedimento 61
4.6. Análise proteica por *Western Blotting* 62
4.7. Análises estatísticas 63
5. Resultados.....65
5.1. Atividade locomotora no tratamento agudo da cocaína.....65
5.2. Atividade locomotora no paradigma do escalonamento de dose de cocaína em padrão *binge* 67
5.2.1. Atividade locomotora total no campo aberto.....67
5.2.2. Atividade locomotora na área periférica do campo aberto.....72
5.2.3. Atividade locomotora na área central do campo aberto.....74
5.3. Avaliação da ansiedade por meio do labirinto em cruz elevado 76

5.4. Análise das proteínas por *Western Blotting* 77
5.4.1. Receptores dopaminérgicos 77
5.4.1.1. Córtex pré-frontal.....77
5.4.1.2. Estriado 78
5.4.1.3. Hipocampo 79
5.4.2. Receptores colinérgicos 80
5.4.2.1. Córtex pré-frontal.....80
5.4.2.2. Estriado 81
5.4.2.3. Hipocampo 82
5.4.3. Moléculas colinérgicas.....84
5.4.3.1. Colina Acetil-Transferase (ChAT) 84
5.4.3.2. Transportador vesicular de acetilcolina (VAChT).....85
5.4.3.3. Acetilcolinesterase (AChE) 86
6. Discussão 88
6.1. Alterações comportamentais.....88
6.2. Alterações nos receptores dopaminérgicos 93
6.3. Alterações no sistema colinérgico muscarínico 96
6.3.1. Moléculas colinérgicas.....96
6.3.2. Alterações nos mAChRs após os tratamentos agudo e crônico 97
7. Conclusões.....104
8 . Referências bibliográficas.....106
ANEXOS 124
Anexo A: Certificado do Comitê de Ética para uso de animais (CEUA) 124
Anexo B: Atividade locomotora total no campo aberto 125
Anexo C: Atividade locomotora na área periférica do campo aberto.....127
Anexo D: Atividade locomotora na área central do campo aberto.....129
Anexo E: Análises do primeiro e último dia de cada dose do tratamento crônico131
Anexo F: Resumo dos resultados obtidos nas análises de *Western Blotting*....132
Anexo G: Ficha do aluno 133
Anexo H: Informações para os membros de Bancas Julgadoras de mestrado .135

RESUMO

TORRES, Yuli Yohana Serna. **Abstinência à cocaína e suas consequências no sistema colinérgico muscarínico.** 2018. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2018.

Uma das principais dificuldades enfrentadas na dependência à cocaína está relacionada aos sintomas de abstinência, como ansiedade, desejo e irritabilidade. Estes efeitos podem durar meses ou anos após a interrupção do consumo prolongado, fazendo com que o indivíduo volte a procurá-la. Os efeitos recompensadores da cocaína levam a alterações neurobiológicas do sistema mesocorticolímbico dopaminérgico, que se origina na área tegmental ventral e se projeta para o núcleo *accumbens*, e córtex pré-frontal, áreas intimamente ligadas ao desenvolvimento da dependência. Esses neurônios dopaminérgicos recebem estímulos dos neurônios colinérgicos que contribuem para os aspectos cognitivos da dependência. Devido à complexidade neurobilógica envolvida durante a abstinência, pouco se sabe sobre as alterações no sistema colinérgico muscarínico durante este período no encéfalo, objetivo deste estudo. Para tal, camundongos machos adultos *Swiss-Webster* foram submetidos à cocaína em padrão agudo em *binge* (3×30 mg/kg/dia) e cronicamente por escalonamento de dose em *binge* por 14 dias (3×15 mg/kg/dia nos dias 1-4; 3×20 mg/kg/dia nos dias 5-8; 3×25 mg/kg/dia nos dias 9-12; e 3×30 mg/kg/dia nos dias 13 e 14). A atividade locomotora de cada animal foi avaliada em campo aberto (CA), onde permaneceram no aparato por 60 minutos entre cada administração. Após o período de exposição os animais permaneceram 14 dias em abstinência, a fim de avaliar a ansiedade no labirinto em cruz elevado (LCE). Em seguida os animais foram eutaniasiados, sendo o córtex pré-frontal (CPF), o estriado e o hipocampo dissecados e armazenados a -80ºC para a análise dos receptores dopaminérgicos D_1 e D_2, receptores colinérgicos muscarínicos M_1, M_2, M_3, M_4 e M_5 (mAChRs) e moléculas colinérgicas (acetilcolinesterase, AChE; colina acetiltransferase, ChAT e transportador vesicular de acetilcolina, VAChT) por *Western Blotting* (n=6). Os resultados comportamentais mostraram maior atividade locomotora nos animais tratados com cocaína no tratamento agudo ou crônico, quando comparado ao basal. Mais ainda, a sensibilização comportamental foi detectada a partir do segundo dia de administração de cocaína. No teste de LCE, realizado 14 dias após a interrupção da administração

de cocaína, não foi observada diferença estatística entre os animais previamente expostos à cocaína e grupo controle. No CPF observou-se diminuição de D_2R, M_1 mAChRs e aumento M_2 e M_4 mAChRs no tratamento agudo; no tratamento crônico houve diminuição de M_1 e M_5 mAChRs e ChAT. No estriado observou-se aumento de D_1R, M_1 e M_2 mAChRs, ChAT no tratamento agudo; e aumento D_1R, VAChT, ChAT e diminuição D_2R, M_1 e M_2 mAChRs no tratamento crônico. Já no hipocampo observou-se aumento de D_1R, D_2R, M_2 mAChRs, VAChT e diminuição M_1 mAChRs no tratamento agudo; e aumento de D_1R, VAChT e diminuição D_2R, M_1 mAChRs no tratamento crônico. Nossos resultados mostram envolvimento de processo de neuroplasticidade, tanto no sistema dopaminérgico quanto no colinérgico muscarínico, em ambos os protocolos utilizados, mesmo após 14 dias de abstinência.

Palavras chaves: farmacodependência, receptores colinérgicos muscarínicos, receptores dopaminérgicos, abstinência, cocaína, ansiedade.

RESUMEN

TORRES, Yuli Yohana Serna. **Abstinencia a la cocaína y sus consecuencias en el sistema colinérgico muscarínico.** 2018. 130f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2018.

Una de las dificultades enfrentadas en la dependencia de cocaína son los síntomas de abstinencia, como ansiedad, deseo y irritabilidad. Estos efectos pueden durar meses o años después de la interrupción del consumo prolongado, haciendo que el individuo vuelva a consumirlo. Los efectos recompensadores de la cocaína causa alteraciones neurobiológicas del sistema mesocorticolímbico dopaminérgico, que se origina en el área tegmental ventral y se proyecta hacia el núcleo *accumbens* y córtex pré-frontal, áreas íntimamente ligadas al desenvolvimiento de la dependencia. Esas neuronas dopaminérgicas reciben estímulos de neuronas colinérgicas la cual contribuyen para los aspectos cognitivos de la dependencia. Debido a la complejidad neurobiológica involucrada durante la abstinencia, poco se sabe sobre las alteraciones del sistema colinérgico muscarínico durante este periodo en el encéfalo, objetivo de este estudio. Por tanto, ratones adultos macho *Swiss-Webster* fueron sometidos a cocaína en dosis padrón agudo en *binge* (3×30 mg/kg/día) y crónicamente por escalonamiento de dosis en *binge* por 14 días (3×15 mg/kg/día en los días 1-4; 3×20 mg/kg/día en los días 5-8; 3×25 mg/kg/día en los días 9-12; y 3×30 mg/kg/día en los días 13 e 14). La actividad locomotora de cada animal fue evaluada en el test de campo abierto (CA), donde permanecieron por 60 minutos entre cada administración. Después del periodo de exposición los animales permanecieron 14 días de abstinencia, a fin de evaluar la ansiedad en el labirinto de cruz elevado (LCE). En seguida los animales fueron eutanasiados, donde el córtex pré-frontal (CPF), estriado y hipocampo fueron disecados y almacenados a -80ºC para analizar los receptores dopaminérgicos D_1 e D_2, receptores colinérgicos muscarínicos M_1, M_2, M_3, M_4 y M_5 (mAChRs) y moléculas colinérgicas (acetilcolinesterasa, AChE; colina acetiltransferasa, ChAT y transportador vesicular de acetilcolina, VAChT) por *Western Blotting* (n=6). Los resultados comportamentales mostraron mayor actividad locomotora en los animales tratados con cocaína en tratamiento agudo y crónico, comparado al control. Por otra parte, la sensibilización comportamental fue detectado a partir de segundo día de administración de cocaína. En la prueba de LCE, realizado después de 14 días de interrupción de la administración de cocaína, no fue observado

diferencia estadística entre los animales previamente expuestos a la cocaína y el grupo control. En CPF se observó disminución de D_2R, M_1 mAChRs y aumento de M_2 y M_4 mAChRs en tratamiento agudo; en el tratamiento crónico mostro disminución de M_1 y M_5 mAChRs y ChAT. En el estriado se observó aumento de D_1R, M_1 y M_2 mAChRs, ChAT en el tratamiento agudo; aumento D_1R, VAChT, ChAT y disminución de D_2R, M_1 y M_2 mAChRs en el tratamiento crónico. Por último, en el hipocampo se observó aumento de D_1R, D_2R, M_2 mAChRs, VAChT y disminución M_1 mAChRs en el tratamiento agudo; aumento de D_1R, VAChT y disminución D_2R, M_1 mAChRs en el tratamiento crónico. Nuestros resultados muestran envolvimiento de procesos de neuroplasticidad, tanto en el sistema dopaminérgico como el sistema colinérgico muscarínico, en ambos protocolos utilizados, después de 14 días de abstinencia.

Palabras claves: farmacodependencia, receptores colinérgicos muscarínicos, receptores dopaminérgicos, abstinencia, cocaína, ansiedad.

ABSTRACT

TORRES, Yuli Yohana Serna. **Cocaine abstinence and its consequences in the cholinergic muscarinic system.** 2018. 130f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2018.

One of the major difficulties faced in cocaine addiction is related to withdrawal symptoms, such as anxiety, *craving* and irritability. These effects can last for months or years after the interruption of prolonged consumption, causing the individual to return to seek it. The rewarding effects of cocaine lead to neurobiological alterations of the dopaminergic mesocorticolimbic system, which originates in the ventral tegmental area and projects to the nucleus *accumbens*, and prefrontal cortex, areas closely linked to the development of addiction. These dopaminergic neurons receive stimuli from cholinergic neurons that contribute to the cognitive aspects of addiction. Due to the neurobiological complexity involved during withdrawal, there are not many studies about the alterations in the muscarinic cholinergic system during this period in the brain, objective of this study. For this, *Swiss-Webster* adult male mice were submitted to cocaine in an acute pattern in binge (3×30 mg/kg/day) and chronically by dose escalation in binge for 14 days (3×15 mg/kg/day on days 1-4, 3×20 mg/kg/day on days 5-8, 3×25 mg/kg/day on days 9-12, and 3×30 mg/kg/day on days 13 and 14). The locomotor activity of each animal was evaluated in the open field (OF), where they remained in the apparatus for 60 minutes between each administration. After the exposure period, the animals remained in abstinence for 14 days in order to assess anxiety in the elevated plus maze (EPM). Immediatley after the EPM, the animals were euthanized, the CPF, striatum and hippocampus were dissected and stored in -80ºC until the analysis of dopaminergic D_1 and D_2 receptors, muscarinic cholinergic receptors M_1, M_2, M_3, M_4 and M_5 (mAChRs) and cholinergic molecules (acetylcholinesterase, AChE, choline acetyltransferase, ChAT and acetylcholine vesicular transporter, VAChT) by *Western Blotting* (n=6). Behavioral results showed greater locomotor activity in cocaine treated animals in acute or chronic treatment, when compared to baseline. Furthermore, behavioral sensitization was detected from the second day of cocaine administration. In the EPM test, performed 14 days after cocaine withdrawal, no statistical difference was observed between the animals previously exposed to cocaine and control group. In the CPF, it was observed

decrease D_2R, M_1 mAChRs and increase M_2 and M_4 mAChRs in acute treatment; in the chronic treatment there was decrease of M_1 and M_5 mAChRs and ChAT. In the striatum, it was observed increase of D_1R, M_1 and M_2 mAChRs, ChAT in the acute treatment; and increase D_1R, VAChT, ChAT and decrease D_2R, M_1 and M_2 mAChRs in chronic treatment. In the hippocampus, there was an increase in D_1R, D_2R, M_2 mAChRs, VAChT and decrease M_1 mAChRs in the acute treatment; and increase of D_1R, VAChT and decrease D_2R, M_1 mAChRs in chronic treatment. Our results show that neuroplasticity is involved in both the dopaminergic and muscarinic cholinergic systems, in both protocols used, even after 14 days of abstinence.

Keywords: drug addiction, muscarinic cholinergic receptors, dopaminergic receptors, abstinence, cocaine, anxiety.

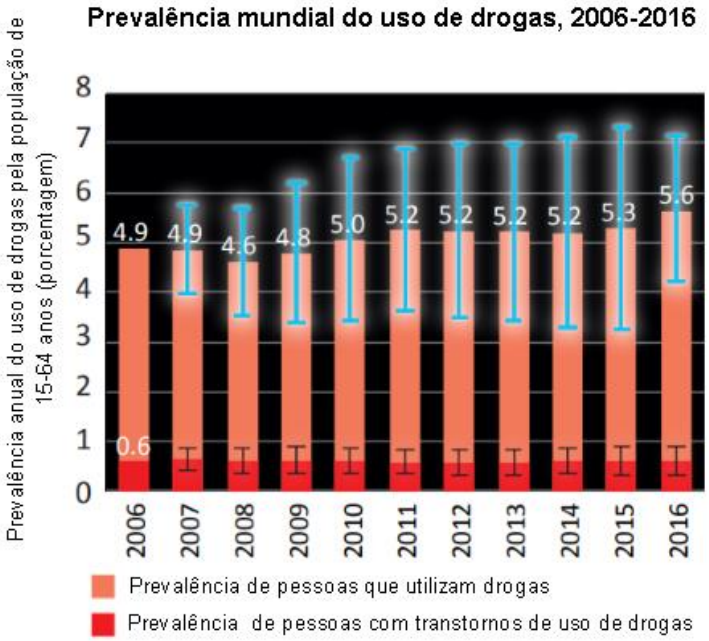
1. *Introdução*

1. Introdução

O consumo das drogas ilícitas deixou de ser um problema individual para tornar-se num problema social, familiar e de saúde pública.

Em 2016, aproximadamente 5,6% da população adulta, o que corresponde a 275 milhões de pessoas, consumiram alguma droga ilícita pelo menos uma vez. Ainda mais preocupante é que 30,5 milhões dos consumidores, ou seja, 0,62% da população adulta mundial, sofrem algum tipo de transtorno gerados pelo consumo de alguma droga ilícita (Figura 1). Destas, 11 milhões são consumidores de drogas injetáveis, sendo que 1,3 milhões vivem com HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), 5,5 milhões com vírus da hepatite C e 1 milhão com as duas doenças concomitantemente (*World Drug Report 2018, United Nations Office on Drugs and Crime* - UNODC). Em 2014, o número de mortes relacionadas ao consumo de alguma droga ilícitas foi aproximadamente de 207.400. Isso corresponde a, 43,5 mortes por milhão de pessoas entre a faixa etária de 15 e 64 anos (*World Drug Report 2016, United Nations Office on Drugs and Crime* - UNODC). Mas ainda, as mortes por *overdose*, a maioria por opiáceos, representaram entre um terço e a metade de todas as mortes relacionadas ao consumo das drogas ilícitas (UNODC, 2016).

Figura 1: Prevalência anual do uso de drogas ilícitas de 2006-2016 e de problemas associados ao mesmo em indivíduos de 15 a 64 anos.

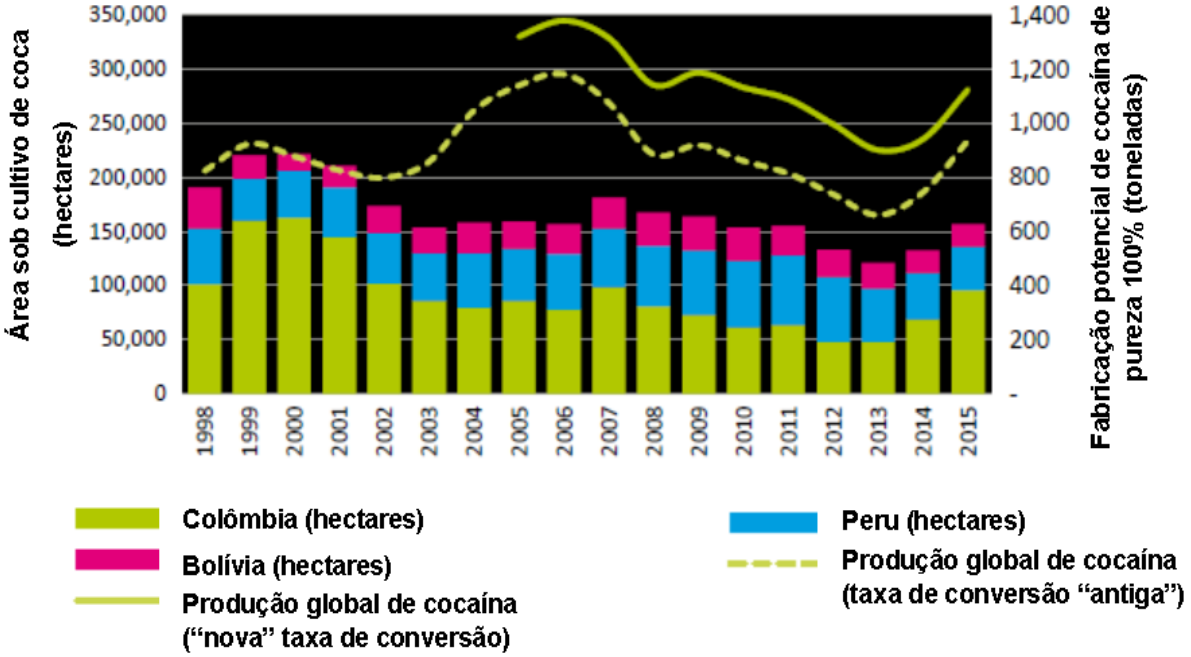


Fonte: Adaptado do UNODC, 2018.

O crescente número de usuários de drogas que afetam o sistema nervoso central (SNC) como a anfetamina, a cocaína e o *crack*, transformou-se em um grave problema de saúde pública em praticamente todos os países do mundo (DEGENHARDT *et al*., 2011; FANG ZHENG & CHANG-GUO ZHAN, 2012). O uso desta substância está associado a uma variedade de condições psiquiátricas e a consequências físicas e psicossociais negativas, distúrbios cardiovasculares e neurológicos, sintomas psicóticos, infecções transmitidas pelo sangue (por exemplo, vírus da hepatite B e C), comportamentos violentos e morte prematura (DÜRSTELER *et al*., 2015). Além disso, as drogas são um fator de risco para o aumento da violência na sociedade (GOLDSTEIN *et al.,* 2009).

Em 2017, o Relatório Mundial sobre Drogas (*World Drug Report 2017, United Nations Office on Drugs and Crime* - UNODC), indicou que o cultivo da planta *Erytroxylum coca* aumentou 30 % no período de 2013-2015 (Figura 2).

Figura 2: Cultivo global de coca e produção de cocaína, 1998-2015. A produção de cocaína, foi calculada em 937 toneladas (com base na "antiga" taxa de conversão) ou em 1,125 toneladas (com base na "nova" taxa de conversão) de cloridrato de cocaína pura em 2015.



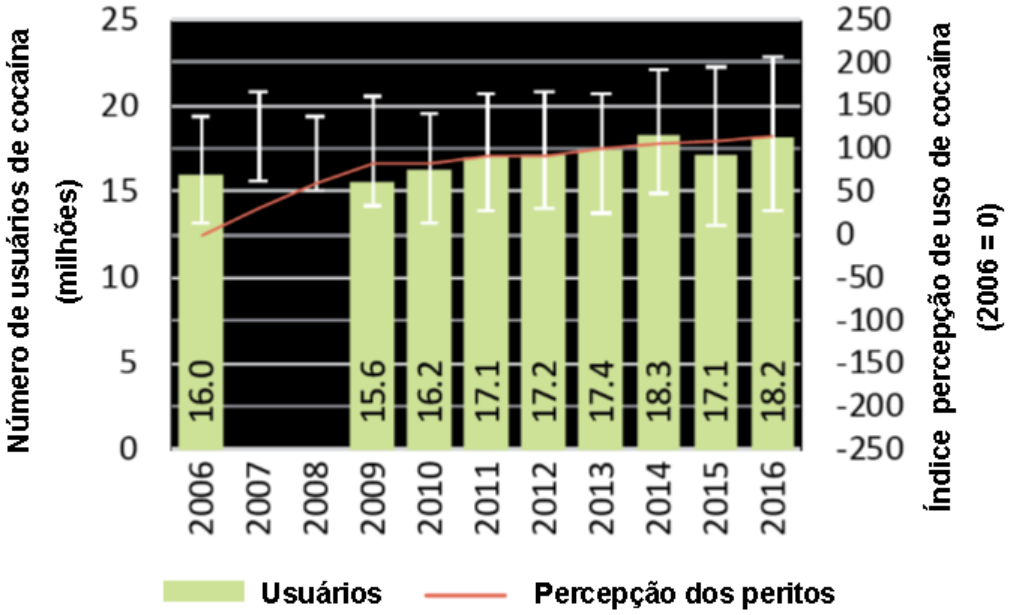
Fonte: Adaptado do UNODC, 2017.

Esse aumento pode ser explicado, em parte, pelo aumento da área de cultivo na Colômbia em 44% e 39% nos anos de 2014 e 2015, respectivamente. Isso pode ter sido numa consequência de que em outubro do 2015 o governo colombiano

abandonou completamente a política de erradicação aérea do cultivo da planta da coca. Em outros países houve diminuição de seu cultivo, como no Peru, que durante o período de 2011 a 2014 o cultivo da coca diminuiu 31% (UNODC, 2016) e na Bolívia que caiu 35% no período de 2010-2015 (UNODC, 2017). Em 2015 a produção de cloridrato de cocaína (expressa em 100% de pureza) para Colômbia, Peru e Bolívia, aumentou em 1.125 toneladas o que representa um aumento global de 25% em relação a 2013 (UNODC, 2017).

Segundo o relatório mundial sobre drogas, *World Drug Report,* publicado em 2018 pelo *United Nations Office on Drugs and Crime*, estima-se que em 2016 o número global de usuários de cocaína da população de 15 a 64 anos aumentou quase 7% (18,2 milhões) em relação ao ano anterior (Figura 3). Mais da metade dos usuários de cocaína residem nas Américas, principalmente na América do Norte (34% do total), quase um quarto reside na Europa e em menor escala a África, Ásia e Oceania. No entanto, percepções de especialistas sugerem uma tendência ascendente no uso de cocaína em todo o mundo durante o período 2006-2016 (UNODC, 2018).

Figura 3: Tendências globais no número de usuários de cocaína e o índice de percepção do uso de cocaína, 2006-2016.



Fonte: Adaptado do UNODC, 2018.

Na Europa, a cocaína é a droga psicoestimulante mais usada. Estima-se que aproximadamente 2,2 milhões de pessoas de 15 a 34 anos utilizaram cocaína no último ano (DÜRSTELER *et al*., 2015). Já nos Estado Unidos a cocaína é a segunda droga ilícita mais consumida, perdendo apenas para *Cannabis* (DESAI *et al*., 2017).

As maiores apreensões em 2015, depois da *Cannabis*, foram de substâncias relacionadas com a cocaína. Em torno de 90% das apreensões foram de cloridrato de cocaína e a cocaína base, conhecida como "*crack*", representando menos de 1% (UNODC, 2017).

O Relatório Brasileiro Sobre Drogas publicado em 2009 (SENAD, 2009), realizado entre 2001 e 2005, mostrou que a prevalência de uso de cocaína, nas 108 maiores cidades brasileiras, foi de 2,9%, sendo próxima à da Alemanha (3,2%), porém bem inferior à dos EUA (14,2%), e Chile (5,3%). A prevalência do consumo de cocaína pelos entrevistados destas cidades brasileiras em 2005, na faixa etária de 25 a 34 anos, foi maior para o gênero masculino (5,4%) do que para o gênero feminino (1,2%). A região Sudeste foi aquela onde se verificou a maior porcentagem de uso (3,7%), sendo a menor observada no Norte (1,3 %) e no Nordeste (1,2%) (SENAD, 2009).

Em 2012, o II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD, 2014) apontou que a prevalência de uso da cocaína pela população adulta (18 anos ou mais) foi de 3,8%, representando aproximadamente 5 milhões de brasileiros. Já entre os adolescentes (14 a 17 anos) a prevalência foi de 317 mil indivíduos (2,3%) dentre quase 14 milhões de adolescentes brasileiros.

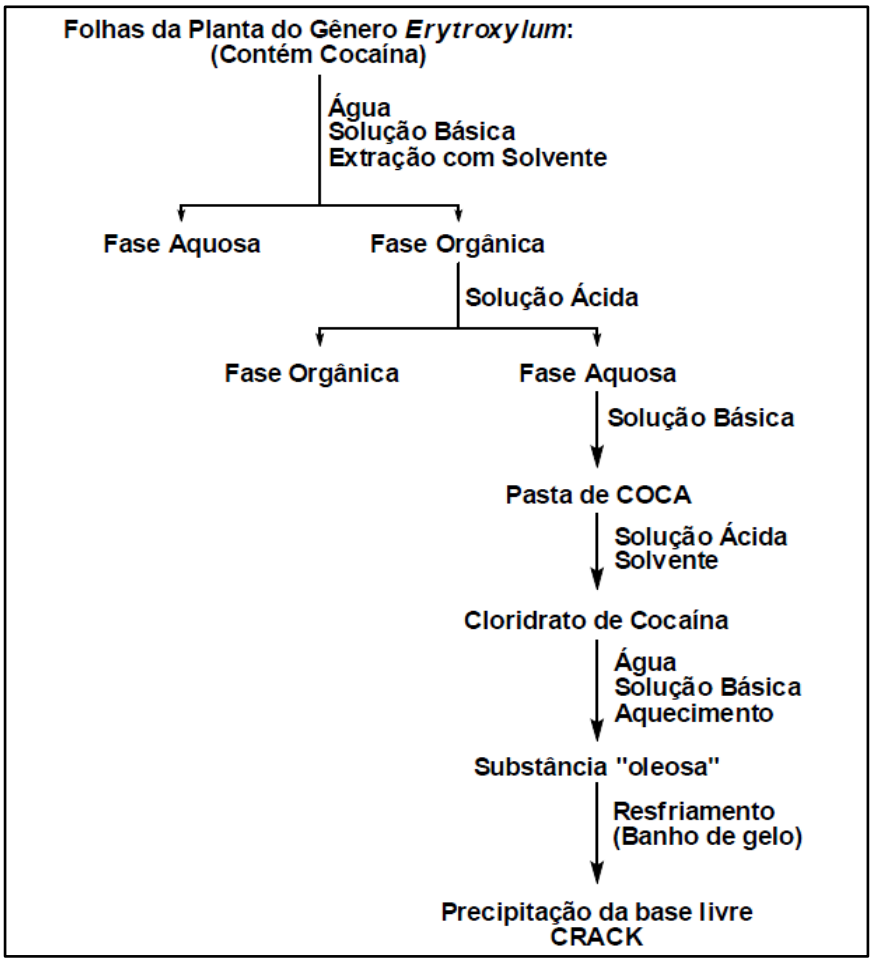
2. Revisão da literatura

2.1 Cocaína

A cocaína (benzoilmetilecgonina) é um alcaloide psicoativo encontrado em todas as partes da *Erytroxylum coca,* porém as folhas apresentam as maiores concentrações, correspondendo a aproximadamente 2% em peso (DINIS-OLIVEIRA, 2015; RIVERA *et al*., 2005).

A extração da cocaína a partir das folhas da *Erytroxylum coca* requer solventes orgânicos (querosene ou gasolina), bases inorgânicas (óxido de cálcio) e carbonato de sódio (MALLETTEA *et al.,* 2018). O produto desta extração é a pasta de coca a qual é tratada com ácido clorídrico para formação de cloridrato de cocaína (sal de cocaína). Este é caracterizado como um pó branco, cristalino e solúvel em água, permitindo sua administração pelas vias oral, intravenosa e intranasal; porém, não pode ser fumado, pois não é volátil (ponto de fusão: 197 °C) e grande parte de sua forma ativa é degradada em altas temperaturas. Para ser administrada pela via fumada, a cocaína precisa estar na forma de base, cuja obtenção se dá pelo tratamento da pasta de coca com amônia ou bicarbonato de sódio e água, procedido por aquecimento até que se forme uma pedra. Este produto resultante será o *crack* ou base livre, possuindo baixo ponto de fusão (96- 98 °C), o qual pode ser inalado após o aquecimento das pedras (MALLETTEA *et al.,* 2018; GOLDSTEIN *et al.,* 2009). Na Figura 4 observa-se o modo de obtenção do cloridrato de cocaína e o *crack*.

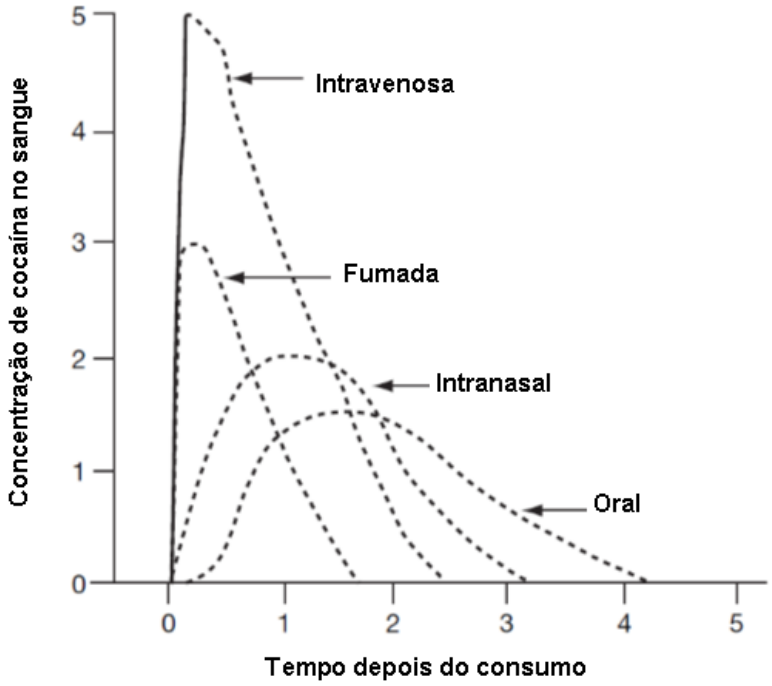
Figura 1: Fluxograma do método de obtenção do cloridrato de cocaína a partir da planta de coca do gênero *Erytroxylum.*



Fonte: GARCIA, 2009.

As diferentes vias de administração também determinam a rapidez e a duração dos efeitos, bem como o pico de concentração plasmática de cocaína (CARRERA *et al.,* 2004; GOLDSTEIN *et al.,* 2009). Ao analisar a velocidade de absorção, o pico de concentração e a duração/intensidade dos efeitos, a via intravenosa e a fumada (*crack*) apresentam as concentrações plasmáticas máximas, mais rápidas e mais altas em comparação à via intranasal (DINIS-OLIVEIRA, 2015). Na Figura 5 observa-se as diferentes vias de administração utilizados pelos usuários.

Figura 5: Concentração de cocaína no sangue nas diferentes vias de administração



Fonte: Adaptado FLORES, 2008.

A cocaína é rapidamente biotransformada por hidrólise das suas duas ligações éster. Os principais produtos de biotransformação são os metabólitos inativos éster metilecgonina (EME), produzido pela hidrólise do grupo benzoato por ação de colinesterases plasmáticas e hepáticas, e benzoilecgonina (BE) formada pela hidrólise espontânea ou pelas reações catalisadas por carboxilesterases. Ambos EME e BE são biotransformados em ecgonina. A hidrólise para ecgonina ocorre provavelmente de forma espontânea. Outra via de biotransformação é a N-desmetilação da cocaína pelo sistema do citocromo P-450 produzindo a norcocaína, um metabólito ativo. Além disso, a coadministração de cocaína e álcool leva, via transesterificação hepática, à formação de cocaetileno, um produto com atividade farmacológica semelhante à cocaína. Alguns estudos relatam que o cocaetileno pode ser mais potente em termos de letalidade, em parte devido à hepato e cardiotoxicidade quando comparado à cocaína. A administração do *crack* leva também à formação de um produto de pirólise da cocaína, a anidroecgonina metil éster (AEME), que é posteriormente biotransformada em ecgonidina, via atividade de esterases (BORTOLOTTI *et al*., 2012; GARCIA *et al*., 2009).

A cocaína atravessa a barreira hematoencefálica, sendo que alcança o encéfalo após 5 segundos quando é fumada; 30 - 45 segundos quando administrada por via intravenosa e 120-180 segundos pela via intranasal (FLORES, 2008). Após administração da cocaína pela via intravenosa a concentração plasmática da droga no encéfalo é de 10 a 20 vezes maior do que no plasma e a biodisponibilidade é de 100% (FLORES, 2008). Quando, a cocaína é fumada (*crack*) os efeitos da droga aparecem rapidamente, isto é, entre 8-10 segundos para que o usuário experimente os efeitos. As concentrações máximas no encéfalo também ocorrem muito mais rápido quando é fumada, resultando em maiores efeitos comportamentais por um curto período de tempo, já que os efeitos da droga podem durar aproximadamente de 8-10 minutos (CARRERA *et al.,* 2004).

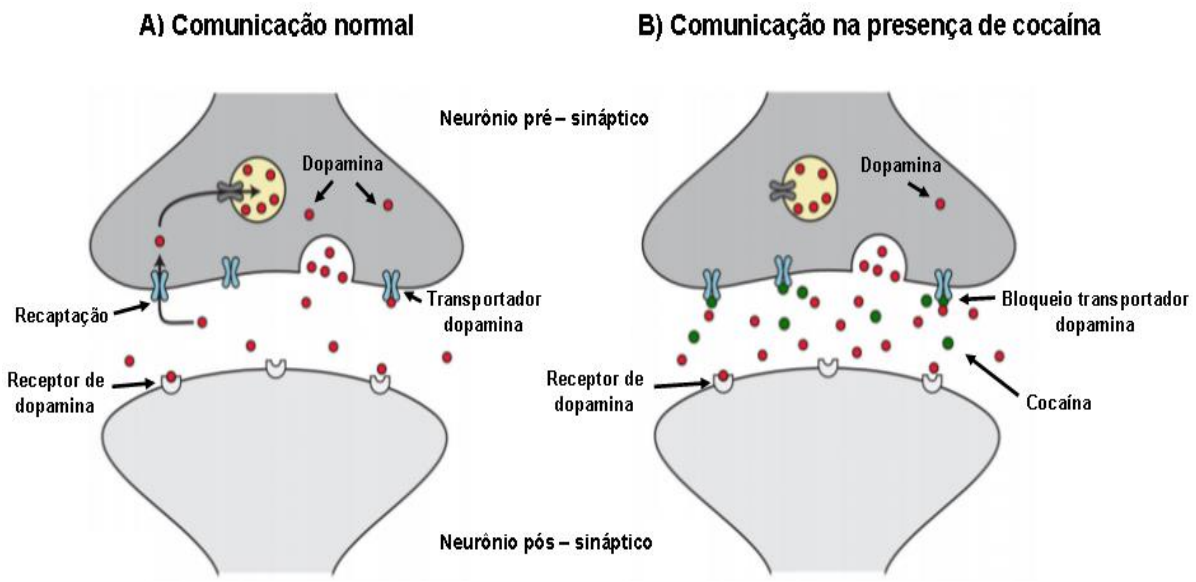
Bortolotti *et al*. (2012) conduziram um estudo de administração da cocaína, pelas vias intravenosa (25 mg), intranasal (32 mg) e fumada (42 mg; *crack*) no mesmo indivíduo. As concentrações plasmáticas máximas foram alcançadas em 5 minutos pelas vias intravenosa e fumada, e cerca de 50 minutos pela via intranasal. As concentrações máximas variaram, respectivamente de 98 a 349 ng/mL e de 154 a 345 ng/mL nas vias intravenosa e fumada e de 40 a 88 ng/mL na via intranasal (BORTOLOTTI *et al*., 2012).

Após a absorção, a cocaína atravessa as membranas celulares, inclusive a barreira hematoencefálica, com muita facilidade (CARRERA *et al.,* 2004; GOLDSTEIN *et al.,* 2009). Os órgãos com maiores concentrações da cocaína são encéfalo, baço, rim e pulmão, seguido de coração e músculo. A meia-vida de eliminação é de 244 minutos após a administração intravenosa, 272 minutos após a administração pela via inalatória e 299 minutos após da administração intranasal (BORTOLOTTI *et al*., 2012).

A cocaína é um vasoconstritor e um estimulante do SNC com propriedades psicomiméticas que pode causar distorções na percepção com alucinações e comportamentos psicóticos quando administrada em altas doses (CARLINÍ *et al.,*2001). Esta substância também exerce efeitos simpatomiméticos que parecem ser mediados por sua atividade noradrenérgica nos terminais pós-ganglionares do sistema nervoso autônomo simpático. Os efeitos incluem aumento da frequência cardíaca, midríase, vasoconstrição, secreção gástrica e pancreática. O aumento da atividade noradrenérgica no *locus coeruleus* também medeia o aumento do estado de alerta e da pressão arterial (HIGUERA-MATAS *et al.,* 2011).

A cocaína bloqueia canais de sódio dependentes de voltagem, os quais medeiam seus efeitos analgésicos, além de inibir a recaptação de dopamina, noradrenalina e serotonina aumentando a disponibilidade desses transmissores na fenda sináptica (HIGUERA-MATAS *et al.,* 2011; CARRERA *et al.,* 2004). A cocaína, eleva as concentrações de dopamina na fenda sináptica pela inibição dos transportadores de dopamina (DAT), impedindo a recaptação da mesma do espaço extracelular e, desta forma, aumentando sua concentração e o tempo com que ela interage com seus receptores (CARLINÍ *et al.,*2001; O`BRIEN, 2006; SICILIANO *et al.,* 2014). Na Figura 6 observa-se o mecanismo de bloqueio dos transportadores dopaminérgicos.

Figura 6: Efeitos da cocaína no transportador de dopamina. A) em condições normais, acontece a liberação de dopamina pelas vesículas sinápticas para se difundirem pela membrana pré-sináptica e subsequentemente, a dopamina é liberada na fenda sináptica. A dopamina pode-se ligar aos receptores de dopamina pós-sinápticos além de ser removida do espaço extracelular pelo transportador de dopamina (DAT) no terminar pré-sináptico. B) a cocaína aumenta as concentrações de dopamina na fenda sináptica, ligando-se ao DAT e, assim, inibindo a recaptação de dopamina. A medida que a recaptação de dopamina é reduzida, sua concentração aumenta na fenda sináptica e a dopamina tem maior oportunidade de se ligar aos receptores pós-sinápticos.



Fonte: Adaptado ESPAÑA & JONES, 2014

O uso agudo da cocaína aumenta a expressão do DAT na superfície da membrana neuronal e esta alteração pode persistir por aproximadamente um mês após a exposição do indivíduo, uma vez que a normalização das funções

dopaminérgicas geralmente é um processo de plasticidade lento (FANG ZHENG & CHANG-GUO ZHAN, 2012). Estudos com humanos dependentes de cocaína mostram aumento, diminuição ou nenhuma mudança nos níveis de DAT. No entanto, é possível que a função e afinidade do DAT possam ser alteradas independentemente das alterações nos níveis absolutos dos transportadores (SICILIANO *et al.,* 2014).

Usando técnicas de voltametria, uma variedade de estudos *in vivo* e *in vitro* investigou os efeitos da cocaína na sinalização dopaminérgica. Observou-se que doses baixas a moderadas de cocaína aumentam as concentrações de dopamina na fenda sináptica, indicando uma redução na recaptação pelo DAT, a qual reflete uma competição entre a cocaína e a dopamina para a ligação no transportador (ESPAÑA & JONES, 2014). A capacidade da cocaína de inibir os DAT é essencial para seus efeitos recompensadores. Camundongos transgênicos que não expressam DAT não desenvolvem a preferência condicionada pela droga, mostrando insensibilidade a seus efeitos recompensadores (CALIPARI *et al.,* 2014).

A probabilidade de que uma pessoa possa ficar dependente de cocaína depende, dentre outras características, da via de administração, da frequência e da duração do uso da substância. Em um estudo realizado pelos Centros de Recuperação Ambulatorial nos Estados Unidos da América, descobriu-se que os fumantes de *crack* apresentavam mais chances de falhar ou completar seus programas de tratamentos em comparação aos usuários pela via intranasal (CARRERA *et al.,* 2004).

Embora, muitos usuários de cocaína utilizem a cocaína de maneira ocasional, apenas alguns desenvolvem um padrão de uso compulsivo e tornam-se dependentes (DÜRSTELER *et al*., 2015). Estes perdem o controle do consumo da droga e adquirem comportamentos destrutivos direcionados à sua aquisição (DACKIS & O'BRIEN, 2001). O padrão de consumo intenso, contínuo, repetitivo durante um curto período de tempo seguido por um período de abstinência é denominado *binge*. O padrão *binge* é provocado pela fissura (forte impulso para utilizar a substância), e consiste em um fator crítico para o desenvolvimento do uso compulsivo, da dependência e das recaídas durante o período de abstinência (TSUKADA *et al.,* 1996; CHAVES *et al.*, 2011).

O uso contínuo de cocaína produz tolerância, resultado de neuroadaptações, onde doses cada vez maiores são utilizadas com a finalidade de se obter os efeitos

desejados, como a euforia, que desaparecem com o uso de quantidades regulares, ou para evitar sintomas de abstinência (BENOWITZ *et al.,* 1993; BRUST *et al*., 1999). Por outro lado, alguns dependentes de cocaína desenvolvem sensibilização ("tolerância reversa"), caracterizada pelo aumento do efeito da substância em decorrência de sua administração, onde uma dose pequena da droga é suficiente para o aparecimento dos efeitos após o uso repetido (BRUST *et al*., 1999; O'BRIEN *et al.,* 2006).

Segundo muitos pacientes dependentes de cocaína, dentre as muitas razões pelas quais utilizam a droga, estão os sentimentos de desejo e euforia, os principais reforços da dependência. A euforia induzida pela cocaína pode ser vista como um reforço positivo, resultante da ação da cocaína nos neurônios dopaminérgicos. Já o desejo resultante da abstinência, é um estado desagradável que pode ser melhorado após a administração da droga, podendo ser visto como um reforçador negativo na dependência (DACKIS & O'BRIEN, 2001).

2.2 Farmacodependência e sua base neurobiológica

A farmacodependência é uma doença crônica caracterizada pela reincidência e busca da droga, gerando comportamentos compulsivos, apesar dos profundos efeitos negativos, tais como disforia, irritabilidade e ansiedade. Estes efeitos podem durar meses ou anos após a interrupção do consumo prolongado de drogas, como a morfina, cocaína, metanfetamina, canabinoides ou álcool (FELTENSTEIN & SEE, 2008; CHEN *et al.,* 2008). Entre as características mais insidiosas na farmacodependência, destacam-se o desejo recorrente pela droga e a vulnerabilidade às recaídas, que persistem mesmo após muitos anos de abstinência, evidenciando que a dependência é causada por mudanças de longa duração na função encefálica (KALIVAS & VOLKOW, 2005).

As drogas que causam dependência, da mesma forma que as recompensas naturais, estimulam o sistema da recompensa a produzir sensações de prazer. No entanto, a utilização repetida dessas substâncias faz com que os comportamentos relacionados à droga suprimam progressivamente comportamentos relacionados à sobrevivência, como alimentar-se e dormir (EVERITT & WOLF, 2002; HYMAN *et al.,* 2006). Originam-se associações e hábitos que persistem mesmo na presença de consequências negativas, fator integrante do comportamento compulsivo (KOOB &

SIMON, 2009). A cocaína aumenta a concentração de dopamina no estriado dorsal, sendo a magnitude deste aumento relacionada com a sensação de desejo. Como o estriado dorsal participa da aprendizagem de hábitos, essa associação provavelmente reflete o aumento dos hábitos na dependência (VOLKOW *et al.,* 2010a).

Assim as diferentes drogas de abuso possuem diferentes alvos na circuitaria encefálica. A maioria destas drogas ativa os neurônios dopaminérgicos do sistema mesocorticolímbico, que se origina na área tegmental ventral (VTA) e se projeta para o núcleo *accumbens* (NAc), amigdala e CPF, áreas intimamente ligadas ao desenvolvimento da dependência (HYMAN *et al*., 2006; CHEN *et al*., 2008). Dentre estas regiões, o aumento das concentrações de dopamina no NAc é particularmente importante para o sistema de recompensa. Os neurônios dopaminérgicos da substância negra, que se projetam para o estriado dorsal (caudado-putâmen), são também muito importantes, principalmente no aprendizado e na execução dos comportamentos associados à dependência (WISE, 2004).

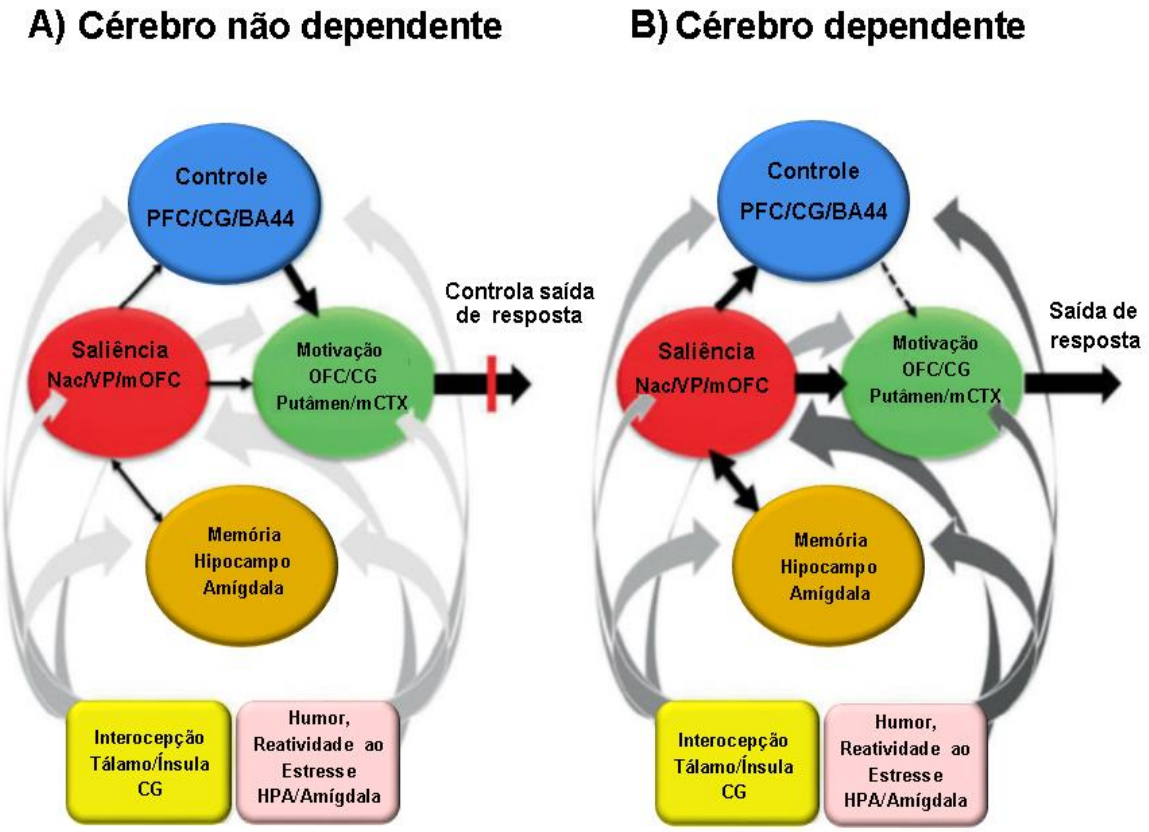
Acreditava-se que a dependência envolvia apenas processos de recompensa mediados pelos circuitos límbicos, mas estudos de neuroimagem mostraram que áreas adicionais, especialmente o córtex frontal, também participam deste processo (GOLDSTEIN *et al.,* 2002). O mesmo estudo demonstrou que a administração de cocaína resulta em alterações morfológicas nos dendritos e espinhos dendríticos no CPF e no NAc (GOLDSTEIN *et al.,* 2002).

Assim, o consumo crônico da cocaína está associado com atividade elevada no córtex pré-frontal medial (mCPF) e estriado ventral ou atividade diminuída no córtex pré-frontal dorsolateral (DLPFC) e estriado dorsal, áreas que se encontram envolvidas com o controle executivo e excitação límbica (impulsividade, tomada de decisão, percepção de risco, avaliação cognitiva de consequências e erros, identificação de metas) (FADY RACHID, 2018). A diminuição na transmissão dopaminérgica mesolímbica mantém o consumo pela droga e também provoca danos no CPF, o qual desempenha um papel critico na dependência, incluindo aprendizagem do reforço, *craving* (desejo intenso, fissura) e perda de controle inibitório que perece ser crucial nos comportamentos compulsivos na procura pela droga (KALIVAS & BRADY, 2012; JASINSKA *et al.*, 2014; FADY RACHID, 2018). Já o córtex órbito-frontal (OFC), giro cingulado (CG) e DLPFC se encontram envolvidos com a atribuição de saliência, controle inibitório/regulação emocional e tomada de decisão. A modulação

prejudicada da dopamina em indivíduos dependentes poderia ser a base do aumento do valor motivacional das drogas em seu comportamento e a perda de controle sobre o consumo (VOLKOW *et al.,* 2000). Além disso, como as deficiências na OFC e no giro cingulado anterior (ACG) estão associadas aos comportamentos compulsivos e impulsividade, pode-se dizer que a modulação prejudicada da dopamina nessas regiões poderia estar por trás do consumo impulsivo e compulsivo de drogas visto na dependência (VOLKOW *et al*., 1996; GOLDSTEIN *et al*., 2002; VOLKOW *et al.,* 2010a).

Volkow e colaboradores (2003) sugerem um modelo de dependência para explicar a natureza multidimensional desta doença. Esse modelo baseia-se em uma rede de quatro circuitos inter-relacionados, cujo resultado disfuncional pode explicar as características comportamentais estereotipados da dependência. Conforme apresentado na Figura 7, estes circuitos envolvem os mecanismos de recompensa; motivação e impulso; aprendizado e memória; e controle inibitório e planejamento (VOLKOW *et al*., 2010b).

Figura 7: Modelo propondo uma rede de quatro circuitos fundamental na dependência: recompensa (vermelho: NAc e pálido ventral (VP)); motivação (verde: OFC, córtex subcaloso, estriado dorsal e córtex motor); memória (ouro: Amígdala e hipocampo); e controle executivo (azul: DLPFC, ACG e córtex frontal inferior). Esses circuitos funcionam juntos e mudam com a experiência. Cada um está ligado a um conceito importante: saliência (recompensa), estado interno (motivação), associações aprendidas (memória) e resolução de conflitos (controle). A) Quando esses circuitos atuam de forma integrada e equilibrada, o resultado se manifesta com execução de comportamentos apropriados (controle inibitório adequado e tomada de decisão) numa variedade de circunstâncias. B) Durante a dependência, o aumento da atividade nos circuitos de recompensa, motivação e memória supera o controle inibitório exercido pelo CPF, favorecendo, desta maneira, o consumo da droga, perpetuado pela ativação dos circuitos de motivação e memória. Além disso, esses circuitos também interagem com circuitos envolvidos na regulação do humor (rosa: reatividade ao estresse) e interocepção (amarelo: contribui para a conscientização do *craving* pela droga e humor), que também se altera durante o processo de dependência (representado por um tom mais escuro de cinza nas setas ascendentes) favorecendo ainda mais a balança do controle inibitório para o *craving*.



Fonte: Adaptado VOLKOW *et al*, 2010b.

Estes quatro circuitos recebem inervações diretas dos neurônios dopaminérgicos, mas também são conectados uns com os outros pelas projeções diretas ou indiretas, principalmente glutamatérgicas (VOLKOW *et al*., 2010b).

A resposta a um estímulo é afetada por sua saliência momentânea, ou seja, sua recompensa esperada. Por sua vez, a expectativa de recompensa é processada por neurônios dopaminérgicos projetados no estriado ventral e influenciados pelas projeções glutamatérgicas do OFC, o qual atribui valor de saliência em função do

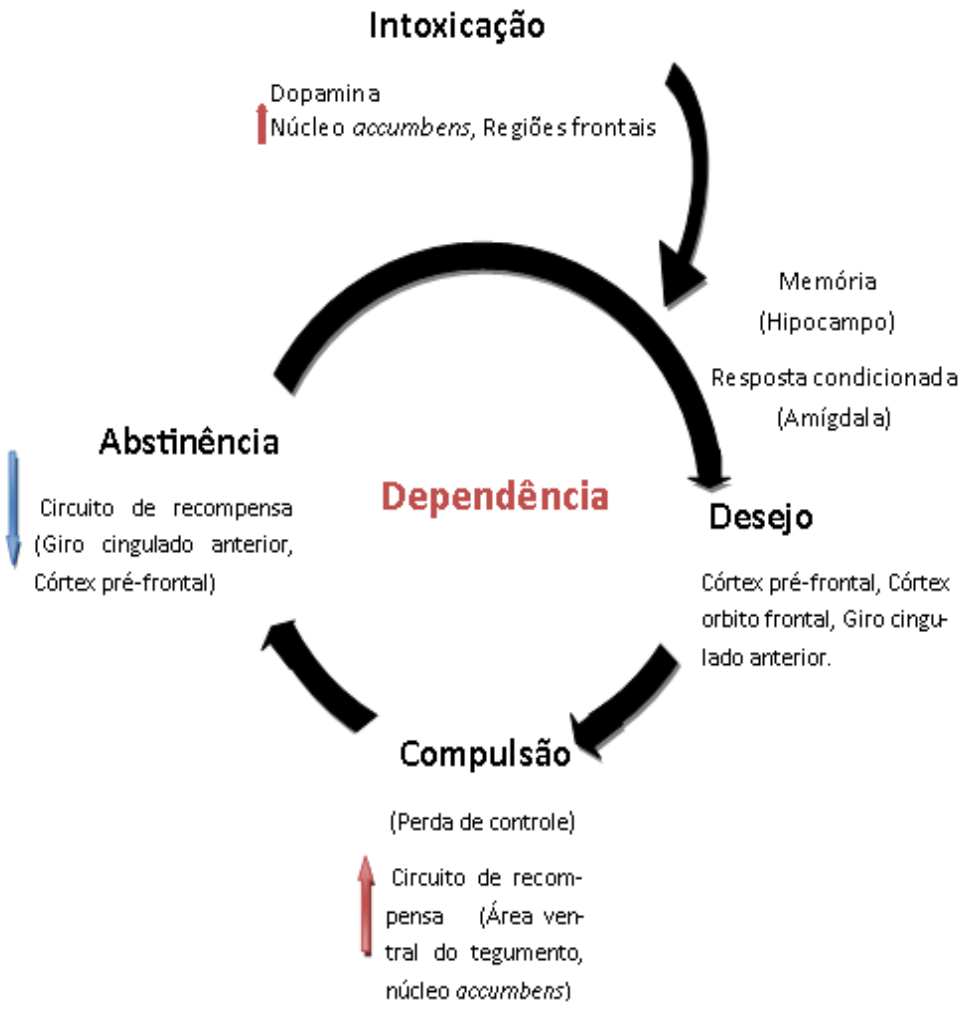
contexto e das regiões amígdala/hipocampo, que medeiam respostas condicionadas e lembranças de memória (GRACE, 2006). O valor do estímulo é comparado contra outros estímulos alternativos, mas também muda em função das necessidades internas do indivíduo, que são moduladas pelo humor e pela percepção interoceptiva. Em particular, a exposição ao estresse aumenta o valor da saliência das drogas e, ao mesmo tempo, diminui a regulação pré-frontal da amígdala (VOLKOW *et al*., 2010a; VOLKOW *et al*., 2010b).

Quanto mais forte é o valor de saliência do estímulo, maior será a ativação do circuito motivacional e mais forte será o impulso para obtê-lo. A decisão cognitiva de atuar ou não para obter o estímulo é processado em parte pelo CPF e CG, que pesa o equilíbrio entre o resultado positivo imediato *versus* os resultados negativos posteriores, e pelo córtex frontal inferior (área de Broadmann 44), que trabalha para inibir a resposta predominante (VOLKOW *et al.,* 2010b). Assim, após o consumo de drogas, os sinais de dopamina resultam em uma superativação dos circuitos motivacional e memória, que desativam o PFC (a inibição pré-frontal ocorre com intensa ativação da amígdala), bloqueando o poder do PFC para controlar o circuito motivacional. Sem esse controle inibitório, um ciclo de *feedback positivo* é estabelecido, o que resulta no consumo compulsivo da droga. Isso porque as interações entre os circuitos são bidirecionais, a ativação da rede durante a intoxicação serve para reforçar ainda mais o valor da saliência da droga e o condicionamento de sinais que foi dado no consumo das drogas (KENNY *et al*., 2005; GRACE, 2006; VOLKOW *et al.,* 2010b).

2.2.1 Síndrome do comprometimento da inibição da resposta e atribuição da saliência

GOLDSTEIN & VOLKOW (2002) definiram farmacodependência como uma síndrome do comprometimento da inibição da resposta e atribuição da saliência "I-RISA" *(impaired response inhibition and salience attribution*). Esta síndrome abrange quatro estágios de comportamento (intoxicação, desejo, compulsão e abstinência) que estão interconectados por uma alça de retroalimentação positiva, conforme a Figura 8.

Figura 8: Modelo integrando circuitos neurais e os comportamentos: na síndrome I-RISA (inibição da resposta e atribuição da saliência). Os estágios incluem: intoxicação, processo de administração da droga a curto prazo e associada às altas concentrações de dopamina extracelular; desejo, relacionado entre a droga e o ambiente; compulsão, processo na qual a droga não é percebida como agradável; e abstinência, que é decorrente da interrupção de uso de uma droga. ↑ Aumenta a estimulação de dopamina. ↓ Diminui a estimulação de dopamina.



Fonte: Adaptado de GOLDSTEIN & VOLKOW, 2002.

A intoxicação é um processo de administração da droga em curto prazo e está associada a concentrações mais elevadas de dopamina extracelular nas regiões límbicas do encéfalo, particularmente o NAc. Há também evidências de aumento de concentrações de dopamina nas regiões frontais (RITZ *et al*., 1987; HUD & UNDERSTEDT, 1989; GOEDERS & SMITH, 1986). O desejo, por sua vez, 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).

A compulsão pode ser caracterizada como uma necessidade incontrolável de consumir a droga e obter seu efeito psíquico e evitar o desconforto provocado por sua ausência (FISCHMAN *et al.,* 1985). Essa perda de controle e o consumo compulsivo estão associados aos circuitos dopaminérgicos, serotoninérgicos e glutamatérgicos e provavelmente envolve a ativação do CG anterior (LOH *et al*., 1990; CORNISH *et al*., 1999).

A administração recorrente e a subsequente retirada da droga resultam na interrupção dos circuitos comportamentais, culminando com os sintomas de abstinência, como disforia, anedonia e irritabilidade, possivelmente contribuindo com a recaída (HODGINS *et al.,* 1995; JOHANSON *et al*., 1989). Muitos trabalhos demostraram que um dos principais sintomas presentes durante a abstinência de diversos tipos de drogas de abuso é o alto nível de ansiedade (KOOB, 2001). A ansiedade é um dos maiores sintomas de retirada da cocaína e inclui os componentes cognitivos, emocional e comportamental (KOOB & MOAL, 2008).

A ansiedade inclui sintomas psicológicos como agitação, alterações de humor e insônia, além de sintomas físicos como náuseas, tremores e espasmos musculares (KOOB & MOAL, 2008). Assim, a ansiedade é um dos principais sintomas da retirada abrupta da cocaína, juntamente com o desejo incontrolável de consumir a droga mesmo após de anos de abstinência.

2.2.1.1 Síndrome de abstinência da cocaína

Os efeitos da cocaína surgem após a administração e desaparecem em minutos ou horas (ELLENHORN, 1997). Após a administração, inicia-se a sensação de aumento de energia, bem-estar, euforia (*"high"),* aumento do estado de alerta, da libido e do prazer sexual (*"rush"*), insônia, diminuição do apetite (LIZASOAIN *et al*., 2002; KOOB & MOAL *et al.,* 2006).

A síndrome de abstinência é definida como um conjunto de sinais e sintomas de desconforto físico e psíquico que aparecem quando a substância não é consumida (AHMADI *et al*., 2006; WALSH *et al*., 2009). A abstinência da cocaína se desenvolve

no prazo de algumas horas a vários dias após a interrupção ou diminuição do consumo (ESTELLES *et al.,* 2007).

Esta síndrome pode ser observada em muitos usuários crônicos ou naqueles que utilizam a droga por poucos dias, mas em forma de *binge*. As principais características incluem a presença de humor disfórico acompanhado por duas ou mais das seguintes alterações fisiológicas: fadiga, sonhos vívidos e desagradáveis, insônia ou hipersonia, aumento do apetite e retardo ou agitação psicomotora. Um dos maiores problemas que os pacientes apresentam durante a abstinência é o período de desejo intenso de consumir a droga de abuso (GAWIN, 1991; AHMADI *et al*., 2006; WALSH *et al*., 2009). O Quadro 1 apresenta os critérios de diagnóstico no período de abstinência.

Quadro 1: Critérios diagnósticos da abstinência à cocaína e a presença de alterações comportamentais ou psicológicas após seu uso, segundo o Manual de Diagnóstico e Estatística de Sociedade Americana de Psiquiatria (DSM-V).

Critérios diagnósticos da abstinência à cocaína (DSM – V, 2014).

A) Cessação (ou diminuição) do uso prolongado da cocaína.

B) Humor disfórico e duas (ou mais) das seguintes alterações fisiológicas, desenvolvidos em algumas horas a vários dias após do Critério A:

1. Fadiga.
2. Sonhos vívidos e desagradáveis.
3. Insônia ou hipersonia.
4. Aumento do apetite.
5. Retardo ou agitação psicomotora.

C) Os sintomas do Critério B causam desconforto ou prejuízo social, profissional ou outras áreas que são importantes na vida do indivíduo.

D) Os sinais ou sintomas não são atribuíveis a outra condição médica nem são melhor explicados por outro transtorno mental.

Após o uso crônico de cocaína, a fissura pode estar presente em qualquer momento da abstinência. O aparecimento e a intensidade dependem das respostas condicionadas aos estímulos ambientais, do humor, e das lembranças das experiências pessoais obtidas durante o uso da droga (GAWIN *et al.,* 1991).

Gawin & Kleber (1986) propuseram o primeiro modelo de apresentação e evolução clínica da síndrome de abstinência à cocaína. Dividiram-na tipicamente em três fases: *crash*, abstinência e extinção. Estas fases representam a progressão de sinais e sintomas após a cessação do uso de cocaína (EPSETEIN *et al*., 2010). A primeira fase ou *crash*, com duração média de quatro dias, é inicialmente composta por um quadro de agitação, depressão, anorexia e fissura, que ao longo dos dias vai sendo substituída por outro, no qual predominam o aumento do sono e do apetite (GAWIN *et al*., 1991; EPSETEIN *et al*., 2010). A segunda fase ou síndrome de abstinência propriamente dita pode durar até 10 semanas. A anedonia é um sintoma marcante durante esse período, além da irritabilidade e apatia, com presença de fissura que pode variar de um indivíduo para outro (GAWIN *et al.,* 1991). Neste período, ocorrem recaídas frequentes na tentativa de aliviar os sintomas disfóricos (GAWIN *et al*., 1991; EPSETEIN *et al*., 2010). A terceira fase ou fase de extinção é marcada por fissuras cada vez mais episódicas e possui duração indefinida. A evolução da síndrome de abstinência em fases não é observada em pacientes internados, cujos sintomas costumam desaparecer progressivamente e sem oscilações, sugerindo que a mesma é fortemente influenciada por fatores ambientais (EPSETEIN *et al*., 2010).

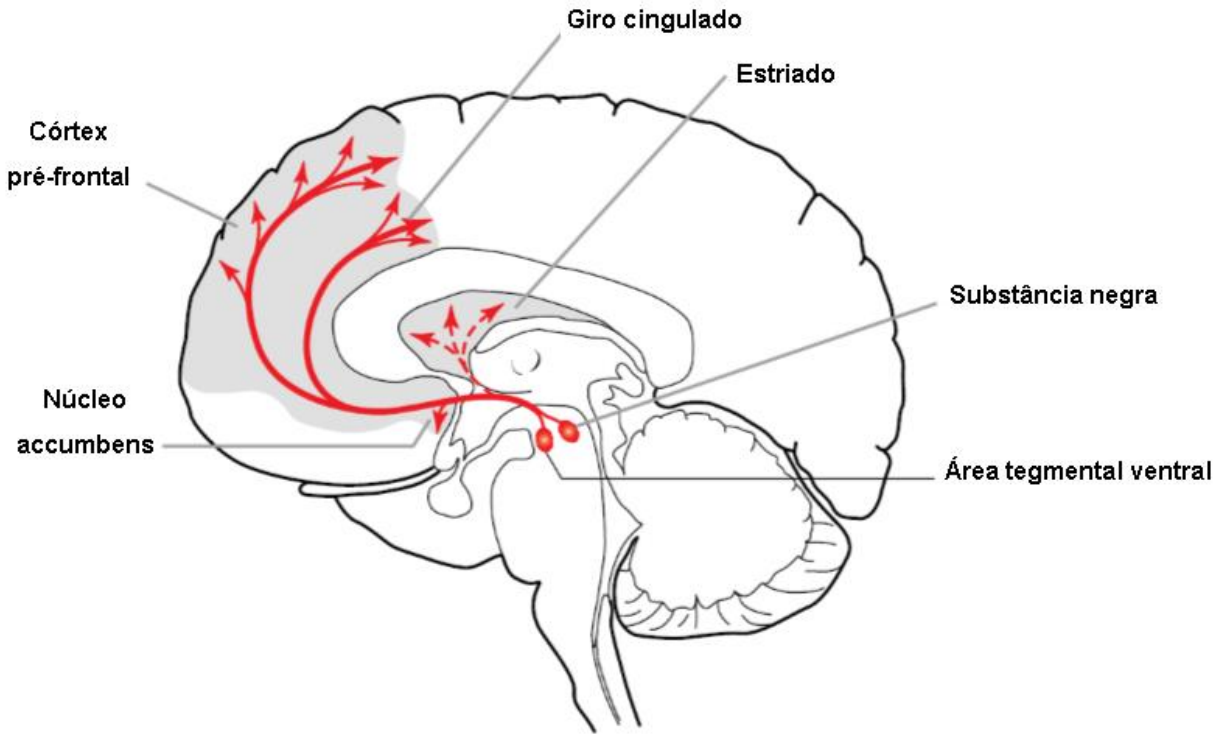
A recaída é um dos maiores problemas para o tratamento da dependência de drogas. Duas teorias opostas surgiram para explicar a recaída. A primeira sugere que a recaída ocorre após a ativação dos circuitos de recompensa (ROBINSON *et al*., 2008; BERRIDGE *et al*., 2003). A outra, por sua vez, sugere a hipofuncionalidade dos circuitos de recompensa, a qual se traduz em estados disfóricos durante o período de abstinência (EDWARDS *et al.,* 2010). No entanto, ambas as teorias sugerem que o consumo de drogas produz adaptações neuronais específicas que medeiam o desejo intenso e o comportamento de busca pela droga (KOOB *et al.,* 2008). Assim, também por meio do condicionamento, estímulos associados ao uso de cocaína podem produzir intenso desejo em indivíduos dependentes. Os estudos de tomografia por emissão de pósitrons (PET) em humanos dependentes de cocaína mostram ativação límbica pronunciada (envolvendo a amígdala e o córtex cingulado) durante o desejo condicionado, demonstrando sua base biológica (CHILDRESS *et al.,* 1999).

2.2.2 O sistema dopaminérgico e a busca da recompensa

O sistema dopaminérgico está presente em quase todo o SNC e apresenta quatro vias neuronais: mesolímbica, mesocortical, nigroestriatal e túbero-infundibular (JONES & PILOWSKY, 2002).

No sistema dopaminérgico mesolímbico, os neurônios dopaminérgicos originam-se na VTA e se projetam para o NAc, os quais são via é cruciais para a recompensa das drogas. Na via mesocortical, os neurônios dopaminérgicos oriundos da VTA projetam-se ao CPF (VOLKOW *et al,* 2010a). Alguns autores consideram que estas duas vias se comportariam como uma única via dopaminérgica: mesocorticolímbica ou mesolimbocortical. Ela desempenha um papel importante na motivação, no pensamento orientado para metas, na regulação do afeto e no reforço positivo (TZSCHENTKE, 2001; COOPER, 2003) (Figura 9). Já na via nigroestriatal os neurônios originam-se na substância negra *pars* compacta e se projetam para o estriado dorsal e outras estruturas subcorticais (COOPER, 2003; STANDAERT & GALANTER, 2009). Esta via também é reconhecida por contribuir para a recompensa e dependência de drogas (VOLKOW *et al,* 2010a). Por fim, a via túbero-infundibular, é formada por neurônios dopaminérgicos hipotalâmicos que se projetam para a glândula pituitária, cuja função é inibir a liberação de prolactina pelos lactótrofos da hipófise (JUCAITE, 2002; STANDAERT & GALANTER, 2009).

Figura 9: Representação das projeções dopaminérgicas em regiões encefálicas em seres humanos. Os neurônios dopaminérgicos que se projetam da VTA do tegmento mesencefálico para o NAc, o CPF e o CG desempenham papéis na regulação do humor e do comportamento. Já os neurônios dopaminérgicos da substância negra para o estriado dorsal (caudado e putâmen e estruturas relacionadas) regulam o movimento.



Fonte: Adaptado HYMAN *et al*., 2006.

Devido à importância do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico na recompensa, reforços positivos, e formação de associações entre recompensa e comportamentos motivados, as mudanças neste sistema podem ter consequências comportamentais. É possível que a redução da dopamina no NAc possa ter efeitos inibitórios nos comportamentos direcionados aos objetos na ausência da cocaína, enquanto aumenta os comportamentos relacionados à cocaína, tais como a procura e o consumo da substância (CALIPARI *et al*., 2014). O NAc pode ser anatomicamente dividido em dois componentes distintos, mas funcionalmente relacionados, o *core* e o *shell.* Embora estas regiões tenham padrões únicos de conexões aferentes e eferentes, ambas recebem aferências densas de células dopaminérgicas provindas da VTA (ESPAÑA & JONES, 2014). Assim, o *core* do NAc está envolvido no direcionamento do comportamento orientado por metas e objetivos, enquanto o *shell* está envolvido na codificação dos aspectos hedônicos ou emocionais dos estímulos (IKEMOTO *et al.,* 2007).

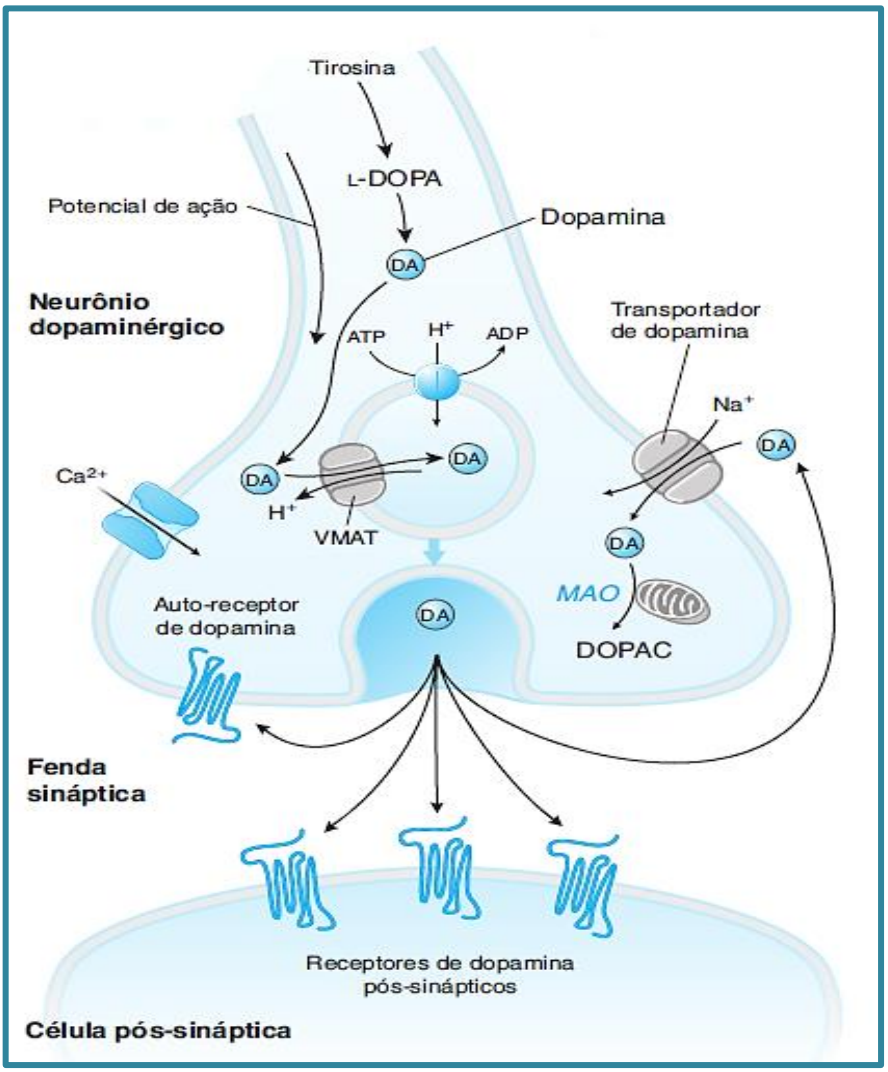
Experimentos em animais que receberam cocaína, porém com lesão no NAc ou na VTA mostraram uma diminuição na busca pela substância (LONDON *et al.,* 1990). Estudos realizados com microdiálise *in vivo* mostram que a administração de cocaína leva ao aumento das concentrações de dopamina extracelular no NAc. Portanto, o maior efeito comportamental da cocaína em animais de experimentação tem sido associado à ativação do sistema dopaminérgico, particularmente do NAc (CARRERA *et al.,* 2004). É importante salientar que o papel da dopamina nos mecanismos de reforço é mais complexo que apenas codificar recompensa. Estímulos que desencadeiam aumento rápido de dopamina também desencadeiam respostas condicionadas, o que provoca a motivação do incentivo para obtê-las. Por meio deste condicionamento, um estimulo neutro associado a um reforçador adquire a capacidade de, por si só, aumentar a concentração de dopamina no estriado ventral, antecipando a recompensa (VOLKOW *et al,* 2010a).

A dopamina é um neurotransmissor catecolaminérgico conhecido por regular muitas atividades neuronais e fisiológicas. Este neurotransmissor é crítico para a motivação, recompensa e aprendizado (WISE, 2004). Sua síntese se inicia com a conversão da tirosina em L-DOPA (1-3, 4- diidroxifenilalanina) pela ação da enzima tirosina hidroxilase (BEAR *et al*., 2006). A enzima L-Dopa descarboxilase converte a L-Dopa à dopamina, a qual é armazenada em vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de monoaminas (VMAT2). A liberação de dopamina na fenda sináptica ocorre quando o potencial de ação atinge os terminais nervosos, promove a abertura de canais para Ca^{2+} voltagem-dependente, levando ao influxo de íons Ca^{2+} para o interior do terminal pré-sináptico, produzindo o sinal para a exocitose das vesículas contendo dopamina (BEAR *et al*., 2006; STANDAERT & GALANTER, 2009).

As concentrações de dopamina na fenda sináptica são reguladas pela ação do DAT na membrana plasmática, por meio da recaptação na terminação nervosa pré-sináptica. Uma vez dentro da terminação nervosa, a dopamina pode ser novamente armazenada em vesículas sinápticas pelo VMAT2 (LARHMMAR *et a*l., 2015; OHARA *et al*., 2013; WILSON & STEPHEN, 1996). A dopamina liberada pode se ligar tanto aos receptores dopaminérgicos pós-sinápticos quanto aos autorreceptores pré-sinápticos (COOPER, 2003). A dopamina é metabolizada por duas vias: a intraneuronal, pela enzima monoaminooxidase (MAO), originando o ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), e a extraneuronal pela ação sequencial da catecol-O-

metil transferase (COMT) e da MAO, formando o ácido homovanílico (HVA) (COOPER, 2003; STANDAERT & GALANTER, 2009). Na Figura 10 observa-se a sínteses, liberação e armazenamento da dopamina.

Figura 10: Neurotransmissão dopaminérgica. A síntese de dopamina ocorre a partir do aminoácido tirosina nos terminais nervosos, o qual é transformado em L-Dopa pela ação da enzima tirosina hidroxilase (TH). A conversão da L-Dopa à dopamina se dá pela enzima L-Dopa descarboxilase. A dopamina é armazenada nas vesículas sinápticas pelo VMAT2. Com a estimulação da célula nervosa, a dopamina é liberada na fenda sináptica, onde o neurotransmissor pode estimular receptores dopaminérgicos pós-sinápticos e autorreceptores pré-sinápticos. Sua recaptação é realizada pelo DAT. A dopamina citoplasmática é transportada para dentro das vesículas secretoras pelo VMAT2 ou degradada pela enzima MAO.



Fonte: Adaptado STANDAERT & GALANTER, 2009.

Os receptores dopaminérgicos são classificados quanto à sua localização, propriedades bioquímicas e farmacológicas. Dividem-se em duas classes: D1-like, que contém dois subtipos (D_1 e D_5) e D2-like que apresentam três subtipos (D_2, D_3 e

D_4) (COOPER *et al*., 2003). As ações biológicas das famílias dos receptores D_1 e D_2 se diferenciam, principalmente, pelo tipo de proteína G ao qual estão acoplados nos domínios intracelulares. Os receptores D_1 estão acoplados a proteína Gs, que estimula a adenilciclase a produzir uma molécula de segundo mensageiro, o AMP-cíclico (cAMP). Já os receptores D_2, acoplados à proteína inibitória (Gi), inibem a ação da adenilciclase e consequentemente a produção de cAMP (TARAZI *et al.,* 2002).

A distribuição dos receptores dopaminérgicos é distinta no encéfalo. Ambas as classes são expressas em altos níveis no estriado, onde desempenham um papel no controle motor dos núcleos basais (CHEMEL *et al.,* 2012). Os receptores D_2 estão presentes numa densidade 20 vezes menor do que o receptor D_1 no CPF. Apesar de apresentar uma menor densidade, os receptores D_2 parecem contribuir em algumas funções do CPF tais como no controle de aprendizagem motora relacionada às tarefas de reforço (WANG & PICKEL, 2002).

Os receptores D_3 estão presentes principalmente no tubérculo olfatório, NAc e no hipotálamo (ANANTH *et al.,* 2001; JONES & PILOWSKY, 2002). O receptor D_4 apresenta níveis elevados no CPF (ANATH *et al*., 2001) e o D_5 no hipotálamo e hipocampo (JONES & PILOWSKY, 2002). É interessante notar que a dopamina possui uma baixa afinidade pelos receptores D_1, assim a ativação destes receptores ocorre quando são expostos a grande aumento de dopamina, como ocorre durante a intoxicação. Por outro lado, a dopamina possui uma alta afinidade pelos receptores D_2, já que são ativados por concentrações relativamente baixas (níveis tônicos) da mesma (VOLKOW *et al*, 2013).

Os receptores D_1 e D_2 parecem estar intimamente envolvidos na dependência à cocaína (LESHNER.,1996). Além disso, enquanto os agonistas dos receptores D_1, D_2, e D_3 podem aumentar os efeitos estimulante da cocaína (CALLAHAN *et al*., 1997), os antagonistas de D_1 e D_2 podem eliminar estes efeitos (FELDMAN *et al*., 1997), sugerindo que estes tipos de receptores estão fortemente relacionados aos efeitos reforçadores (MACÊDO *et al.,* 2004). Existem evidências de que os níveis dos receptores D_2 diminuem em várias regiões do prosencéfalo após a autoadministração da cocaína, os quais permanecem diminuídos durante o período de abstinência. Por outro lado, a administração crônica de cocaína em macacos leva a uma diminuição de ligações dos receptores D_2 no núcleo caudado, putâmen, tubérculo olfatório e core do NAc (MOORE *et al*., 1998). Além disso, estudos em animais mostram que aumento

na sinalização do receptor D_1 estão associados à resposta de sensibilização da droga e à diminuição do receptor D_2 com o consumo compulsivo da droga (VOLKOW *et al*., 2012).

2.2.3 Sistema colinérgico e suas implicações no processo de farmacodependência.

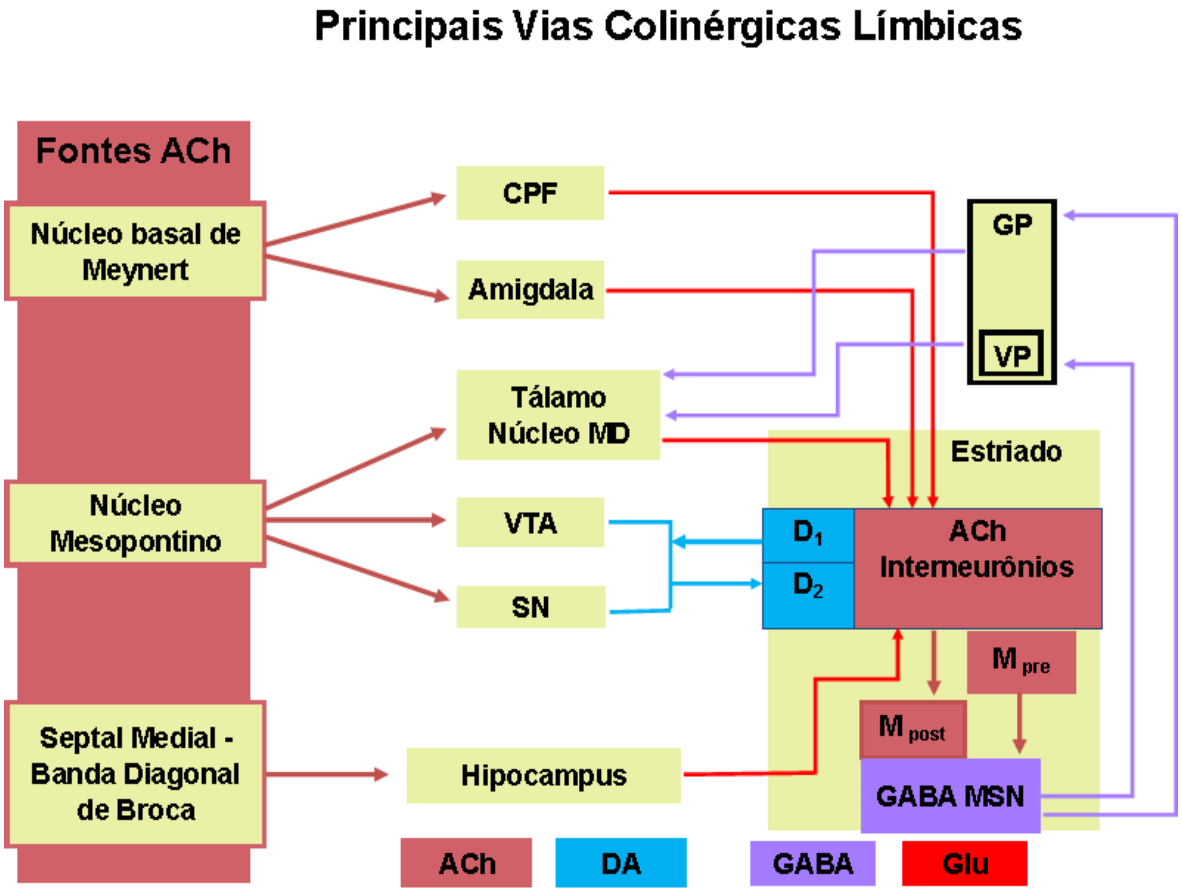
A dependência de drogas tem sido descrita como uma doença do sistema de recompensa do encéfalo, em que as drogas ativam os circuitos neuronais envolvidos na recompensa e na memória (DACKIS & O'BRIEN, 2001). Devido ao efeito do sistema colinérgico na recompensa e na autoadministração de drogas, à presença de acetilcolina (ACh) no estriado (PISANI *et al*, 2001) e ao envolvimento da ACh nos processos cognitivos (PEPEU & GIOVANNINI, 2004), acredita-se que a ACh possa desempenhar um papel importante nos processos de dependência, principalmente no caso da dependência à cocaína (WILLIAMS & ADINOFF, 2008).

A localização das vias colinérgicas no encéfalo foi obtida por estudos histoquímicos, com a utilização de anticorpos anti-colina acetiltransferase, que possibilitam o mapeamento da distribuição dos neurônios colinérgicos (PERRY *et al.,* 1999). Estes neurônios estão distribuídos em todo o SNC de mamíferos e compreendem neurônios de projeções e interneurônios (SOUSA *et al.,* 2001). As regiões límbicas e paralímbicas do SNC, consideradas as mais relevantes para o processo de dependência, contêm a maior densidade de inervação colinérgica no encéfalo. Estas regiões incluem o estriado ventral, estriado dorsal, VTA, SN, amígdala, hipocampo e CPF (WILLIAMS & ADINOFF, 2008).

Os interneurônios são neurônios que possuem axônios curtos e são extremadamente abundantes, estabelecendo uma estreita relação com os neurônios dopaminérgicos (DÍAZ *et al.,* 2000). Os interneurônios colinérgicos são a principal fonte de ACh para o estriado dorsal e ventral (PISANI *et al*., 2001; ZHOU *et al*., 2002; WILLIAMS & ADINOFF, 2008). Esses interneurônios integram uma variedade de informações cognitivas, límbicas e motoras e sofrem plasticidade e aprendizado, que, por sua vez, influencia a sinalização de saída do estriado (TISCH *et al.,* 2004). Além dos interneurônios estriatais, existem outas três fontes principais de entrada colinérgicas: 1) os núcleos mesopontinos (constituídos pelos núcleos pedunculopontino e tegmental laterodorsal) do tronco encefálico rostral, que abastece

com inervação de ACh a VTA, SN e tálamo; 2) o núcleo basal de Meynert (NBM), que abastece a principal entrada de ACh no córtex cerebral e na amígdala e 3) septal medial - banda diagonal de Broca, que abastece a entrada primária de ACh ao hipocampo (WILLIAMS & ADINOFF, 2008). As vias da acetilcolina descritas anteriormente estão ilustradas na Figura 11.

Figura 11: Principais vias colinérgicas límbicas. 1) os núcleos mesopontinos (tegmentar pedunculopontino e laterodorsal), abastecem a inervação de ACh para a ATV, SN e tálamo, 2) o NBM, para o córtex cerebral e na amígdala e (3) septal medial - banda diagonal de Broca, para hipocampo. Os interneurônios do estriado são influenciados pelos receptores D_1 e D_2. Os interneurônios colinérgicos muscarínicos do estriado consistem principalmente de M_1, M_2 e M_4. Os receptores colinérgicos muscarínicos M_1 são pós-sináptico (Mpost) e excitatórios, enquanto M_2 e M_4 são pré-sinápticos e inibitórios (Mpre). Esses interneurônios fazem sinapse com neurônios de saída espinhosos médios do ácido γ-aminobutírico (GABA) (MSNs). O estriado ventral importante nas motivações e comportamentos de recompensa fundamentais na dependência de drogas, projeta neurônios de saída para o VP do globo pálido (GP) e núcleo mediodorsal (MD) do tálamo. O estriado dorsal, envolvido nos processos motores e na aprendizagem condicionada da dependência de drogas, envia projeções direta ou indiretamente (por meio do GP externo e do núcleo subtalâmico) para o segmento interno do GP e *pars* reticula da SN. O GP também projeta, por meio dos neurônios GABAérgicos, ao núcleo MD do tálamo. Neurônios glutaminérgicos do MD projeta para CPF. A comunicação sináptica dentro do circuito de recompensa é conduzida via dopamina (modulatório), ACh (modulatório), glutamato (GLU, excitatório) e GABA (neurotransmissão inibitória).



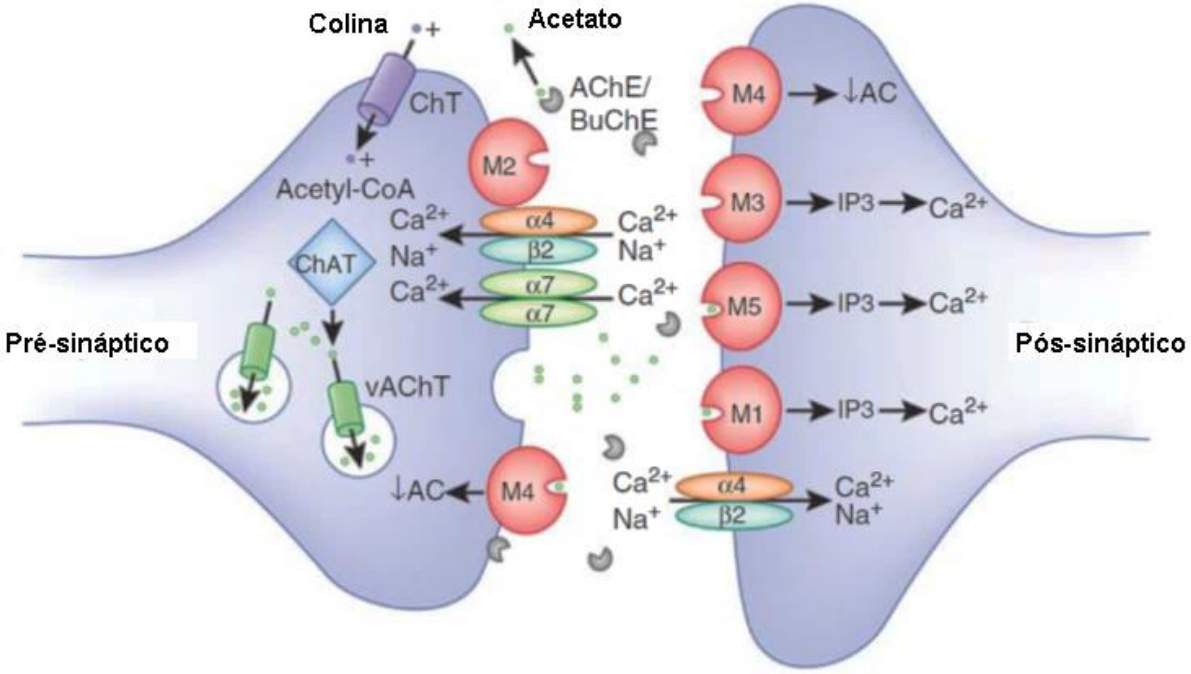
Fonte: Adaptado WILLIAMS & ADINOFF, 2008.

A ACh e seus receptores são proeminentes nas estruturas subcorticais e corticais, importante para a recompensa da droga, a autoadministração e a dependência destas substâncias (ADINOFF *et al.,* 2010). A alta concentração de receptores colinérgicos no sistema límbico, particularmente na amígdala e no hipocampo, enfatiza a importância desse sistema para os comportamentos de recompensa na dependência (ADINOFF *et al.,* 2010; HIGUERA-MATAS *et al.,* 2011).

A ACh é um neurotransmissor responsável pela transferência de impulsos nos neurônios colinérgicos (TUCEK *et al.,* 1993). Este neurotransmissor modula processos fisiológicos nos sistemas nervoso central e periférico. Centralmente, a ACh regula a função motora, percepção sensorial, processamento cognitivo, ciclo de sono/vigília e a nocicepção, já no periférico controla a frequência cardíaca, motilidade do trato gastrointestinal e atividade muscular lisa (ABRAMS *et al.,* 2006; JONES *et al*, 2012). Assim, substâncias que bloqueiam a ação da ACh podem produzir déficit na cognição (TAYLOR & BROWN, 1999).

A ACh é sintetizada no citoplasma a partir de acetil-CoA e colina pela ação de uma enzima especifica, a colina acetiltransferase (ChAT) (SOFUOGLU & MOONEY, 2009). A acetil-CoA é sintetizada nas mitocôndrias, que estão presentes nas terminações nervosas, enquanto que a colina é transportada do líquido extracelular para o terminal neuronal por um transportador dependente de sódio (BEAR *et al.,* 2006). Uma vez sintetizado, o neurotransmissor é transportado para dentro de vesículas sinápticas mediante um transportador vesicular de acetilcolina (VAChT) (FUJII *et al*., 2008). A ACh pode ser encontrada nos terminais pré-sinápticos principalmente de três formas diferentes: associada à membrana, livre no citoplasma ou, de forma mais abundante, armazenado dentro das vesículas sinápticas (BELLIER & KIMURA, 2011). A ação da ACh termina quando é hidrolisada em acetato e colina pela enzima acetilcolinesterase (AChE), presente na fenda sináptica (VENTURA *et al*, 2010). A Figura 12 apresenta a síntese, o armazenamento, a liberação e o metabolismo da ACh.

Figura 12: Síntese, armazenamento, liberação e degradação da acetilcolina (ACh). A ACh é sintetizada no citoplasma a partir de acetil-CoA e colina pela ação da enzima ChAT. Uma vez sintetizada, parte da ACh é transportada e armazenada em vesículas sinápticas pela VAChT. Após ser liberada por exocitose, a ACh interage especificamente com os receptores colinérgicos presentes nas membranas pré-sinápticas e pós-sinápticas. A ação da ACh cessa quando é hidrolisada em acetato e colina pela enzima AChE, presente na fenda sináptica. A ACh medeia seus efeitos pela ativação dos receptores colinérgicos muscarínicos (M_1, M_2, M_3, M_4, M_5) e receptor colinérgico nicotínico.



Fonte: Adaptado JONES *et al*, 2012.

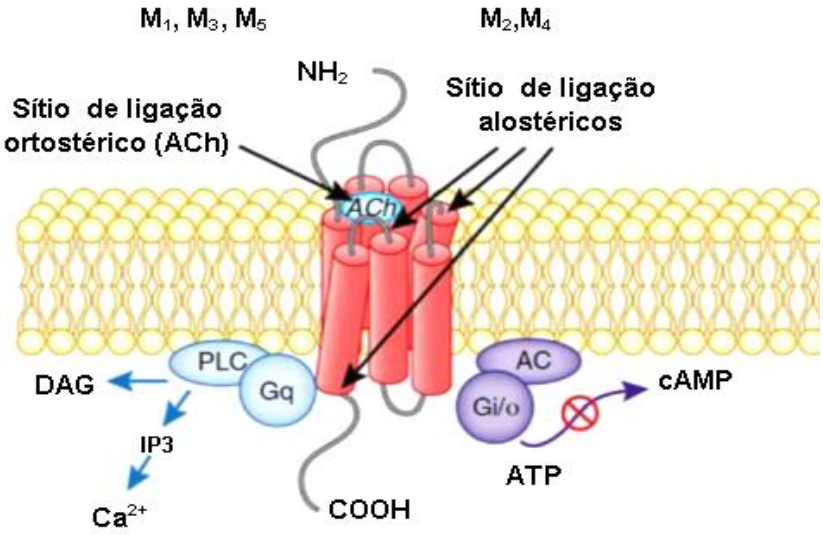
A ACh medeia seus efeitos pela ativação dos receptores colinérgicos muscarínicos (mAChRs) e receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) (JONES *et al*, 2012).

Os nAChRs são uma família diversificada de proteínas transmembranares pentâmeras que permitem entradas de cátion, como Na^+ e Ca^{2+}. A partir da clonagem molecular identificou-se nove subunidades α (α_2-α_{10}) e três β (β_2-β_4). Os subtipos heteroméricos ($\alpha_4\beta_2$ e $\alpha_3\beta_4$) e o subtipo homomérico α_7 são os subtipos mais abundantes no ser humano (SOFUOGLU & MOONEY, 2009; VENTURA *et al.*, 2010).

Os mAChRs estão amplamente distribuídos por todo o organismo, exercendo funções fisiológicas diferentes de acordo com a localização e o subtipo de receptor. Cinco diferentes subtipos de receptores muscarínicos (M_1-M_5) são conhecidos, embora a localização exata e o papel funcional de todos não esteja completamente esclarecida (ABRAMS *et al.,* 2006). Os cinco subtipos de receptores são metabotrópicos, ou seja, acoplados à proteína G, sendo que os subtipos M_2 e M_4 estão

acoplados a Gi/Go e os subtipos M_1, M_3 e M_5 estão acoplados a Gq/G11 (LANZAFAME *et al.,* 2003; SOFUOGLU & MOONEY*,* 2009). A transdução de sinal decorrente da ativação dos subtipos M_2 e M_4 envolve a inibição da atividade da adenilciclase, prolongamento da abertura dos canais de potássio e redução das concentrações intracelulares de cAMP cíclico (BEN-CHAIM *et al.,* 2003; VENTURA *et al.,* 2010). Já a ativação dos subtipos M_1, M_3 e M_5 envolve a hidrólise de fosfoinositídeos presentes na membrana plasmática pela ativação da fosfolipase C, gerando diacilgliecerol e trifosfato de inositol, sendo este último o responsável pelo aumento de cálcio intracelular (EGLEN *et al*., 2005; JONES *et al*, 2012) (Figura 13). Estes receptores desencadeiam, no encéfalo, uma multiplicidade de vias de sinalização importantes para a modulação da excitabilidade neuronal, plasticidade sináptica e regulação por retroalimentação da liberação de ACh. Todos os cinco subtipos de receptores muscarínicos são expressos no encéfalo (VOLPICELLI & LEVEY, 2004).

Figura 13: Estrutura e vias de sinalização dos mAChRs. Cada subtipo mAChRs é uma proteína de heptamérica transmembranar, que pertence a duas classes funcionais principais baseadas no acoplamento da proteína G. Os M_1, M_3 e M_5 mAChRs acoplam-se às proteínas G do tipo Gq/G11, resultando na geração de inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) e 1,2-diacilglicerol (DAG) por meio da ativação da fosfolipase C, aumentando a concentração intracelular de cálcio. Os M_2 e M_4 mAChRs ativam preferencialmente as proteínas G do tipo Gi/Go, inibindo assim a adenilciclase, reduzindo a concentração intracelular de cAMP e prolongando a abertura do canal de potássio.



Fonte: Adaptado JONES *et al*, 2012.

Os M_1 mAChRs são expressos no estriado, ao longo de todas as camadas do córtex e também nos neurônios piramidais hipocampais e células granulares. Estudos recentes mostraram que a ativação dos M_1 mAChRs aumentam a atividade sináptica nas células piramidais no mCPF e melhora as funções cognitivas (ABRAMS *et al*., 2006; JONES *et al.*, 2012). Os M_2 mAChRs são expressos pré-sinapticamente em terminais colinérgicos, particularmente no córtex, prosencéfalo basal, hipocampo e estriado, e funcionam como autorreceptores para inibir a liberação da ACh. Estes receptores também estão localizados em terminais axônicos de neurônios não-colinérgicos (ZHANG *et al*., 2002; TZAVARA *et al*., 2003; JONES *et al.*, 2012). Camundongos *knockout* para receptores M_2 são deficientes em flexibilidade comportamental, memória de trabalho, aprendizagem de esquiva passiva e potenciação hipocampal de curto e longo prazo. Esses resultados são consistentes com a interpretação de que o bloqueio dos M_2 mAChRs em terminais colinérgicos e não-colinérgicos pode ter efeitos prejudiciais sobre a cognição (TZAVARA *et al*., 2003; SEEGER *et al*., 2004).

Já os M_3 mAChRs estão presentes no estriado, hipocampo, núcleo talâmico anterior, núcleo pontiforme, região límbica cortical e nas camadas superficiais do neocortex (VENTURA *et al.,* 2010). Existem evidências de que esses receptores medeiam processos colinérgicos no cérebro que incluem a formação de memória, aprendizado, controle de função motora e comportamento social (POULIN *et al*., 2010). Os M_4 mAChRs estão localizados no córtex e no hipocampo, mas são mais abundantes no estriado, já que são enriquecidos com interneurônios colinérgicos e neurônios de projeção estriatal, particularmente aqueles projetados diretamente para a SN (ZHANG *et al.,* 2002; TZAVARA *et al.,* 2003). Estes receptores podem funcionar como autorreceptores no estriado e no mesencéfalo e como receptores moduladores pós-sinápticos no estriado, neocórtex e hipocampo (JONES *et al.*, 2012). Por fim, os M_5 mAChRs foram encontrados pós-sinapticamente nos neurônios dopaminérgicos da substância negra, *pars* compacta e VTA (ABRAMS *et al*., 2006), duas regiões que abastecem inervação ao estriado dorsal, NAc e mCPF (VILARO *et al*., 1990; WEINER *et al*., 1990). Camundongos *knockout* para receptores M_5 mostram sensibilidade reduzida aos efeitos locomotor e recompensador da cocaína e opiáceos, dois fortes ativadores da sinalização mesolímbica (FINK-JENSEN *et al*., 2003; THOMSEN *et al.,* 2005).

2.3 Alterações do sistema dopaminérgico e colinérgico na abstinência

Os sistemas de neurotransmissores não desempenham suas funções de maneira independente. Eles se encontram integrados anatomicamente e funcionalmente como uma rede de maneira direita ou indireta (NORONHA *et al*, 2005). Estudos pré-clínicos e clínicos apoiam a existência de interação entre os sistemas dopaminérgico e colinérgico muscarínico em diversas funções e doenças do SNC, incluindo a doença de Parkinson, esquizofrenia e farmacodependência (TANDA *et al.,* 2007).

O sistema colinérgico interage com o sistema de recompensa dopaminérgico na VTA (os receptores nAChR e mAChR estimulam o sistema dopaminérgico), NAc (interneurônios colinérgicos integram informações relacionadas com recompensa) e no CPF (o sistema colinérgico contribui em processos cognitivos da dependência) (SOFUOGLU & MOONEY, 2009). Além disso, a ativação de receptores muscarínicos e nicotínicos de acetilcolina no NAc é necessária para a aquisição de reforço de drogas (HIGUERA-MATAS *et al*., 2011).

Projeções ACh do núcleo tegmentar laterodorsal da ponte ativa neurônios dopaminérgicos da VTA (WEINER *et al.,* 1990). Assim, o efeito da ACh em processos relevantes para a recompensa é devido, pelo menos em parte, às projeções de ACh na VTA, área de efluxo dopaminérgico, e o efeito subsequente é a liberação de dopamina pelos interneurônios de ACh no estriado (CONSOLO *et al.*, 1999; BERLANGA *et al.,* 2005). Ambos receptores, muscarínicos (particularmente M_5) e nicotínicos abastecem as aferências dos neurónios dopaminérgicos da VTA (WEINER *et al.,* 1990). Estas projeções dopaminérgicas aferentes da VTA enervam a porção *shell* do NAc e ativam os interneurônios colinérgicos no estriado, iniciando a liberação de ACh (KOOS *et al.,* 2002; WILLIAMS & ADINOFF, 2008). Os interneurônios colinérgicos no estriado são neurônios tonicamente ativos (TANs), altamente sensíveis à detecção de estímulos, controle de movimentos e reconhecimento de contexto (APICELLA *et al*., 2007). Assim, os TANs são responsáveis pelas respostas contextuais associados à recompensa. Estes neurônios fazem, ainda, sinapse com neurônios GABAérgicos do estriado conhecidos como neurônios espinhosos médios (MSNs) (KIMURA *et al.,* 2003; MORRIS *et al*., 2004).

Existem hipóteses que os neurotransmissores ACh e dopamina interagem entre si e atuam de forma antagônica no NAc (CRAGG *et al*., 2006). Assim, a ativação

do receptor dopaminérgico D_1 aumenta a liberação de ACh no NAc, enquanto que a ativação do receptor D_2 promove o efeito oposto (BERTORELLI *et al.,* 1990; SOFUOGLU & MOONEY *et al.,* 2009).

A atividade dos MSNs é modulada por estímulos colinérgicos e dopaminérgicos, que podem ser excitatórios ou inibitórios dependendo dos subtipos de receptores que são estimulados. Os receptores dopaminérgicos D_1 e M_1 mAChRs são excitatórios, enquanto os receptores dopaminérgicos D_2 e M_4 mAChRs são inibitórios (CALABRESI *et al*., 2006). Os interneurônios colinérgicos recebem estímulo dopaminérgico da VTA e entrada glutamatérgica principalmente do CPF, hipocampo e da amígdala (BERLANGA *et al.,* 2003). Esta convergência de dopamina e glutamato em interneurônios colinérgicos pode abastecer um mecanismo para que a recompensa mediada pela dopamina seja associada à aprendizagem mediada pelo glutamato e informações contextuais (BERLANGA *et al.,* 2003; CRAGG *et al*., 2006; SOFUOGLU & MOONEY *et al.,* 2009). Assim, há estudos que mostram que os interneurônios colinérgicos no estriado são regulados diretamente pelos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais. Agonistas do receptor D_2 inibem a liberação da ACh, em quanto que a estimulação dos receptores D_1 no estriado induz um aumento na liberação da ACh (WANG, 1993).

Existem evidências de que indivíduos dependentes de cocaína apresentam diferença com respeito aos controles na resposta neural a sondas colinérgicas em regiões límbicas distintas, incluindo hipocampo amigdala e ínsula (HIGUERA-MATAS *et al*., 20011). Outras regiões importantes incluíram o mesencéfalo, DLPCF, OFC, giro cingulado anterior e posterior. Estas descobertas sugerem uma ruptura nos receptores colinérgicos, particularmente mAChRs, em indivíduos dependentes de cocaína em abstinência, em comparação com indivíduos saudáveis (ADINOFF *et al*., 2010).

Camundongos *knockout* para receptores M_1 apresentam aumento da atividade locomotora espontânea e hiperatividade induzida por anfetamina, bem como aumento de dopamina extracelular no estriado, indicando a importância dos M_1 mAChRs na regulação do sistema dopaminérgico (GERBER *et al.*, 2001; MIYAKAWA *et al.*, 2001; JONES *et al.,* 2012). Por outro lado, camundongos *knockout* para M_5 mostraram controle sensoriomotor anormal e sensibilidade reduzida aos efeitos locomotores e recompensadores de cocaína e opiáceos (FINK-JENSEN *et al*, 2003; THOMSEN *et al.*, 2005; THOMSEN *et al.,* 2007; JONES *et al*, 2012). No hipocampo, antagonistas

dos mAChRs prejudicam a codificação de novas informações (HASSELMO, 1995). Considerando a influência dopaminérgica na sinalização colinérgica hipocampal pode-se supor, que o uso crônico de cocaína possa alterar os receptores colinérgicos do hipocampo (ADINOFF *et al.,* 2010).

O foco das pesquisas relacionadas à cocaína tem sido principalmente seu efeito no sistema dopaminérgico. Entretanto, como apresentado acima, a cocaína também afeita o sistema colinérgico. Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar se há alterações no sistema colinérgico muscarínico durante a abstinência em camundongos expostos a um modelo que mimetiza o consumo em *binge* tanto no tratamento agudo quanto cronicamente. Por tanto, foram avaliados todos os receptores muscarínicos e as enzimas responsáveis pelo controle da ACh. A compreensão dos mecanismos subjacentes à abstinência pode trazer novos alvos para o desenvolvimento de tratamentos farmacológicos em especial durante o período de abstinência em que o indivíduo fica mais vulnerável para possíveis recaídas.

3. Objetivo

3. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi estudar as alterações do sistema colinérgico muscarínico e dopaminérgico durante o período de abstinência decorrente da administração aguda em *binge* e crônica em um paradigma de escalonamento de dose em *binge* de cocaína, no estriado, hipocampo e CPF.

3.2. Estratégias experimentais

- Analisar a atividade locomotora no teste de campo aberto após a administração aguda e após cada administração do escalonamento de dose;

- Analisar os efeitos ansiogênicos da cocaína no teste de labirinto em cruz elevado após 14 dias de abstinência nos tratamentos agudo de cocaína em *binge* e no escalonamento de dose em *binge*;

- Avaliar, por Western *Blotting*, os receptores dopaminérgicos (D_1-*like* e D_2-*like*), muscarínicos (M_1, M_2, M_3, M_4, M_5 mAChRs) e as moléculas colinérgicas (ChAT, VAChT e AChE), após 14 dias de abstinência de tratamento com cocaína de forma aguda em *binge* ou de escalonamento de dose em *binge* no CPF, estriado e hipocampo.

4. Materiais e Métodos

4. Materiais e Métodos

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos *Swiss-Webster*, adultos (20 a 40 gramas) provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal CEEA – protocolo número 503). Os animais foram mantidos em caixas de polietileno (13 cm de altura, 20 cm de largura e 30 cm de comprimento) em ambiente com temperatura (21±2ºC) e umidade controladas, sob um ciclo claro/escuro de 12 horas (luz ligada às 07h) e livre acesso à água e alimentos (ração para roedores Nuvilab CR1®). Todos os experimentos foram realizados no período claro (7h00 – 12h00).

4.2. Drogas

A cocaína utilizada foi cedida pela Polícia Científica do Estado de São Paulo para fins de pesquisa do Laboratório de Análises Toxicológicas do Departamento Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. O teor da cocaína (95%) foi determinado por meio de técnicas cromatográficas (GC-NPD e UPLC-MS/MS), conforme descrito por Yonamine e Silva (2002). A cocaína foi diluída em solução salina (0,9% m/v de cloreto de sódio) para experimentação animal.

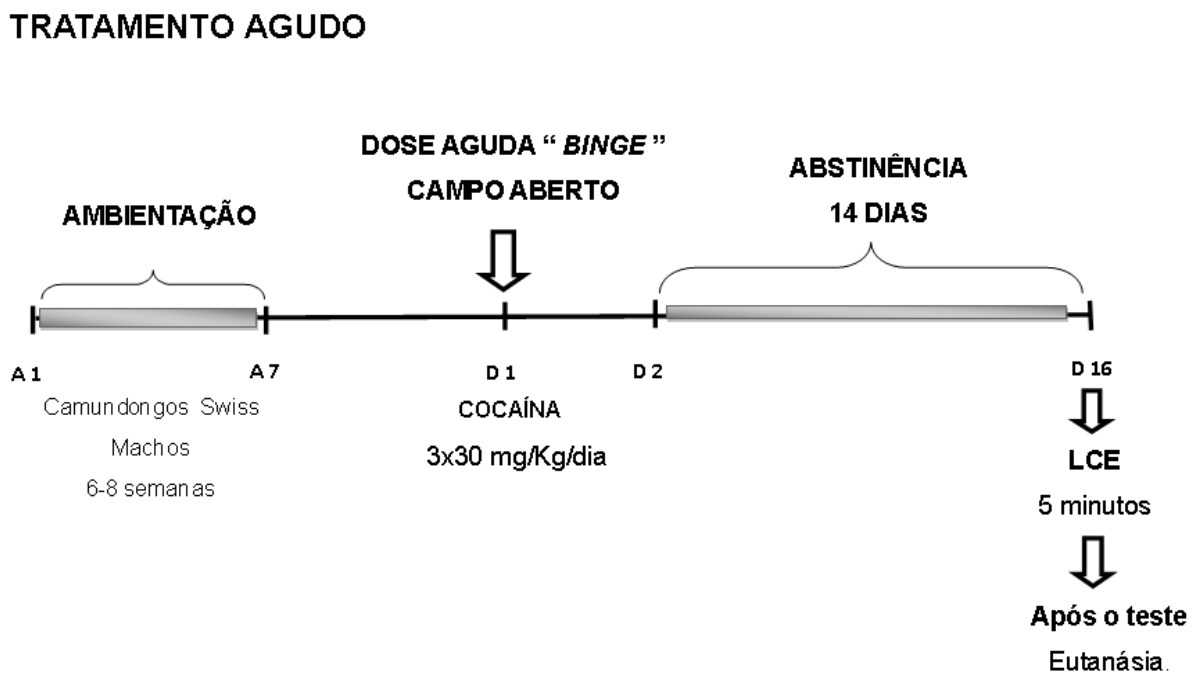
4.3. Delineamento experimental

4.3.1. Tratamento agudo de cocaína em *binge*

Após sete dias de ambientação (A1-A7) no biotério experimental, os animais foram expostos agudamente à cocaína em padrão *binge* (D1), recebendo três injeções por via intraperitoneal (i.p) de solução salina 0,9% ou cocaína 3x30 mg/kg, com intervalo de 60 minutos entre as administrações. Após cada injeção, os animais foram colocados no centro do aparato de campo aberto, onde permaneceram por 60 minutos, a fim de avaliar a atividade locomotora. Durante 1h anteriormente ao início das administrações, os animais foram habituados no campo aberto, na ausência de substâncias, a fim de avaliar a atividade locomotora basal (BAILEY *et al.,* 2007; 2008; FRAGOU *et al.,* 2013). Após o teste comportamental de campo aberto os animais permaneceram 14 dias em abstinência (D2 – D16), acomodados em suas gaiolas no

biotério. No último dia de abstinência foi realizado o teste em labirinto em cruz elevado (D16) para avaliação dos níveis de ansiedade. Posteriormente, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Na figura 14 pode-se observar o delineamento experimental da exposição aguda de cocaína em *binge*.

Figura 14: Delineamento experimental do tratamento agudo de cocaína em *binge.* Após os sete dias de ambientação dos camundongos machos *Swiss-Webster*, foi realizada a administração aguda de cocaína em *binge*, no qual os animais receberam três injeções por via intraperitoneal (i.p) de solução salina ou cocaína 30mg/kg por um dia (D1). Após a administração de cada dose aguda, os animais foram colocados no centro do campo aberto onde permaneceram por 60 minutos a fim de avaliar a atividade locomotora. Posteriormente, os animais passaram por um período de 14 dias em abstinência (D2-D16) e, em D16, foi realizado o teste de labirinto em cruz elevado com duração de 5 minutos. A eutanásia foi realizada imediatamente após do teste de labirinto em cruz elevado.



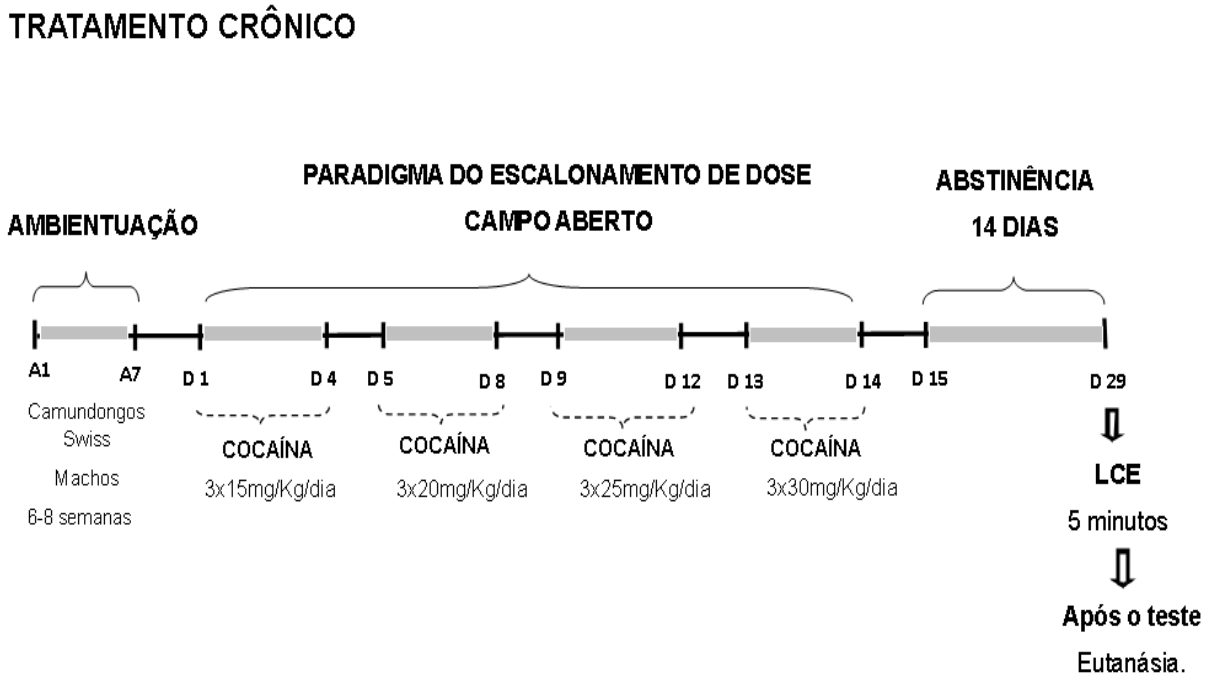
4.3.2. Paradigma do escalonamento da dose de cocaína em *binge*

Os camundongos foram submetidos a sete dias de ambientação (A1- A7), no biotério. Todos os animais foram pesados diariamente, ao longo da habituação e dos tratamentos. Após o período de ambientação, os animais expostos ao escalonamento de dose de cocaína em *binge* receberam três injeções por via intraperitoneal (i.p) de solução salina ou cocaína, com intervalo de 60 minutos. A cocaína foi utilizada em doses escalonadas, a saber: 3×15 mg/kg/dia nos dias 1-4; 3×20 mg/kg/dia nos dias 5-8; 3×25 mg/kg/dia nos dias 9-12; e 3×30 mg/kg/dia nos dias 13 e 14, perfazendo um total de 14 dias (D1 – D14) (BAILEY *et al*., 2007; 2008; FRAGOU *et al.,* 2013).

Após cada injeção, os animais foram colocados no centro do campo aberto, onde permaneceram por 60 minutos, a fim de avaliar a atividade locomotora. Importante destacar que os animais foram habituados por 60 minutos no campo aberto, todos os dias antes da administração de cocaína a fim de avaliar a atividade locomotora basal (BAILEY *et al.,* 2007; 2008; FRAGOU *et al.,* 2013). Após o teste comportamental de campo aberto, os animais permaneceram 14 dias em abstinência (D15 – D29), mantidos em suas gaiolas no biotério. O teste do labirinto em cruz elevado (D29) foi realizado 14 dias após a última administração por escalonamento de dose para avaliação dos níveis de ansiedade. Após o teste de labirinto em cruz elevado, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

O delineamento experimental do escalonamento de dose de cocaína em *binge* pode ser observado na Figura 15.

Figura 15: Delineamento experimental do escalonamento de dose de cocaína em *binge*. Após os sete dias de ambientação (A1-A7) dos camundongos machos adultos *Swiss-Webster* a administração de cocaína foi realizada por escalonamento de dose em *binge*, no qual os animais receberam três injeções por via intraperitoneal (i.p) de solução salina ou cocaína: D1-D4 (3×15 mg/kg/dia), D5-D8 (3×20 mg/kg/dia), D9-D12 (3×25 mg/kg/dia) e D13-D14 (3×30 mg/kg/dia) perfazendo um total de 14 dias de administração de cocaína (D1-D14). Após a administração de cada dose por escalonamento, os animais foram colocados no centro do campo aberto onde permaneceram por 60 minutos a fim de avaliar a atividade locomotora. Os animais foram habituados previamente por 60 minutos na ausência de droga. Em seguida, os animais passaram por um período de 14 dias de abstinência (D15-D29). Após o período de abstinência, foi realizado o teste de labirinto em cruz elevado com duração de 5 minutos (D29). A eutanásia foi realizada imediatamente após do teste de labirinto em cruz elevado.



4.4. Avaliação da atividade locomotora em campo aberto

4.4.1. Equipamento de campo aberto

O campo aberto utilizado consistiu em uma arena circular de acrílico azul, com 40 cm de diâmetro e 50 cm de altura. O registro da atividade locomotora foi realizado pelo programa *Pinnacle Studio (Pinnacle Systems, Mountain View)* por meio de uma câmera de vídeo instalada acima das arenas, no teto da sala de comportamento. A atividade locomotora total dos animais foi quantificada por meio do programa de monitoramento de imagens de vídeo *Etho Vision XT version 11.5 (Noldus Information Technology b.v.)* (EILAM, 2003; PRUT & BELZUUNG, 2003).

4.4.2. Procedimento

Os animais foram colocados individualmente no centro do campo aberto, imediatamente após terem recebido uma injeção de solução salina ou cocaína, sendo avaliado durante 60 minutos após de cada administração. Após a avaliação da locomoção total (cm), o campo aberto foi limpo com uma solução de álcool 5% antes da introdução do animal para evitar rastros de odor deixados. Para evitar efeitos de variação circadiana no comportamento dos camundongos, as observações foram realizadas sempre no mesmo período (7h00 – 12h00).

4.5. Labirinto em cruz elevada após o período de abstinência

4.5.1. Equipamento do labirinto em cruz elevado

Um dos modelos mais amplamente utilizados na pesquisa da ansiedade em ratos e camundongos é o teste de labirinto em cruz elevado.

O modelo de labirinto em cruz elevado utilizado consiste de dois braços abertos opostos (30 x 5 cm) e dois fechados (30 x 5 x 15cm), também opostos, em forma de cruz (LISTER, 1987). Os braços abertos e fechados estão conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm), elevada a uma altura 40 cm do solo (HANDLEY & MITHANI,1984; PELLOW *et al*., 1985; LISTER *et al*., 1990).

4.5.2. Procedimento

Os animais foram colocados individualmente na área central do labirinto em cruz elevado, com a cabeça direcionada para um dos braços fechados. Em seguida, o animal foi avaliado no labirinto por 5 minutos. A entrada em um dos braços foi

considerada válida somente após o animal ter colocado as quatro patas dentro do braço. Entre um animal e outro, o labirinto foi cuidadosamente limpo com uma solução de álcool 5% para eliminar rastros de odor deixados pelo anterior. As medidas comportamentais registradas no labirinto em cruz elevado foram: números de entradas nos braços abertos e fechados; bem como o tempo de permanência em ambos os braços. Para evitar efeitos de variação circadiana nos comportamentos dos camundongos, a observação de todos os animais foi realizada sempre no mesmo período (7h00 – 12h00).

4.6. Análise proteica por *Western Blotting*

Após a eutanásia dos animais, as regiões encefálicas de estriado, hipocampo, e CPF foram dissecadas e devidamente armazenadas a -80°C. Para cada estrutura foi realizado um homogenato em tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,4 contendo 1,0mM de PMSF e coquetel inibidor de protease 1:1000 (Sigma) na diluição 1:2. A concentração proteica de cada amostra foi determinada pelo método de Bradford (1976). Em seguida, 22 µL da amostra foram diluídos com 78 µL de tampão de Laemmli (0,0625M de Tris-HCl, pH 6,8 contendo 2% de SDS, 10% de glicerol, 0,001% de azul de bromofenol e 5% de 2-mercaptoetanol) de modo a obter um volume final de 100 µL. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio 0,1% (SDS-PAGE), conforme originalmente descrito por Laemmli (1970). Para a separação eletroforética das proteínas, foi utilizado gel de poliacrilamida de 15%, tampão composto por Tris-HCl 25mM (pH 8,3), glicina 192mM e SDS 0,1%, e intensidade de voltagem de 90V nos primeiros 10 minutos e 100 V por aproximadamente 2 horas. Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Millipore, 0,2 µm), previamente ativada em metanol P.A., durante 90 minutos a 0,4 A. A composição do tampão empregado para a transferência eletroforética foi Tris-HCl 25 mM, glicina 192mM, SDS 0,1% e de etanol 18% (v/v). Para comprovar a eficiência da transferência, as membranas foram coradas com solução de vermelho de Ponceau (0,1% em mistura de ácido acético 30% e ácido sulfossalicílico 30%). Após lavagem rápida das membranas com água destilada para retirada do excesso de corante, os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação da mesma com solução de caseína 5,0% em tampão TBS-t (Tris-

HCl 20mM pH 7,4, NaCl 137mM e Tween-20 0,1%), sob agitação constante durante 90 minutos. Após lavagem com tampão TBS-t, as membranas foram incubadas durante 15 a 18 horas, de 2 a 8 ºC, com os anticorpos primários específicos, a saber: rabbit policlonal anti D_1R (Abcam®), anti D_2R (Santa Cruz *BioTechnology*), anti-M_1 mAChR (Abcam®), anti-M_3 mAChR (Santa Cruz *BioTechnology*), anti-M_4 mAChR (Santa Cruz *BioTechnology*), anti-M_5 mAChR da (Abcam®), anti-AChE (Santa Cruz *BioTechnology*), anti-ChAT (Abcam®) e anti-VAChT (Abcam®); e rabbit monoclonal anti-M_2 mAChR (Abcam®), diluídos em tampão TBS-t. Após o término da incubação, as membranas foram lavadas com tampão TBS-t (6 vezes/5 minutos cada) e incubadas com anticorpos secundários conjugados a enzimas – anticorpo policlonal *anti-rabbit* (1:3000) durante 2 horas. As membranas foram submetidas a uma nova série de lavagens com TBS-t (6 vezes/5 minutos cada), e as bandas imunorreativas foram reveladas por quimioluminescência, utilizando o software *ImageQuant* AI600 *RGB.GE Healthcare* e as intensidades das barras imunorreativas foram comparadas pelo programa *ImageQuant* TL 1D v8.1 e expressas em unidades arbitrárias. A β-actina (1:1000) foi utilizada como fator normalizador.

4.7. Análises estatísticas

Nos ensaios comportamentais de campo aberto foi utilizada análise de variância (ANOVA) de duas vias (tempo x tratamento) com medidas repetidas, seguida do pós-teste de Bonferroni. Para o labirinto em cruz elevado e as análises de *Western Blotting* foi utilizado o teste "*t*" de Student. Os valores foram expressos como "média ± erro padrão da média" e as diferenças foram consideradas significativas para o valor $p<0,05$.

5. Resultados

5. Resultados

5.1. Atividade locomotora no tratamento agudo da cocaína em padão *binge*

Na Figura 16 pode-se observar a atividade locomotora: total (cm), periférica (cm), central (cm) e relação entre periférica e central (cm) dos animais submetidos ao campo aberto, realizado após cada administração de cocaína ou solução salina no tratamento agudo de cocaína em *binge*.

Não houve diferença estatisticamente significativa na atividade locomotora no período da habituação entre os grupos tratados agudamente com cocaína em *binge* e o grupo controle.

A Figura 16A mostra a atividade locomotora total do grupo tratado com cocaína e solução salina. A ANOVA de 2 vias (tempo x tratamento) mostrou efeito significativo dos fatores tempo ($F_{47,1034}$=7,91; p<0,0001) e tratamento ($F_{1, 22}$ = 39,17; p<0,0001), assim como interação entre ambos ($F_{47, 1034}$=11,47; p<0,0001). As análises *post-hoc* do fator tempo e tratamento indicam que os animais tratados agudamente com cocaína em *binge* apresentaram maior atividade locomotora total nos primeiros 30 minutos após cada administração (p<0,0001) em relação aos animais tratados com solução salina.

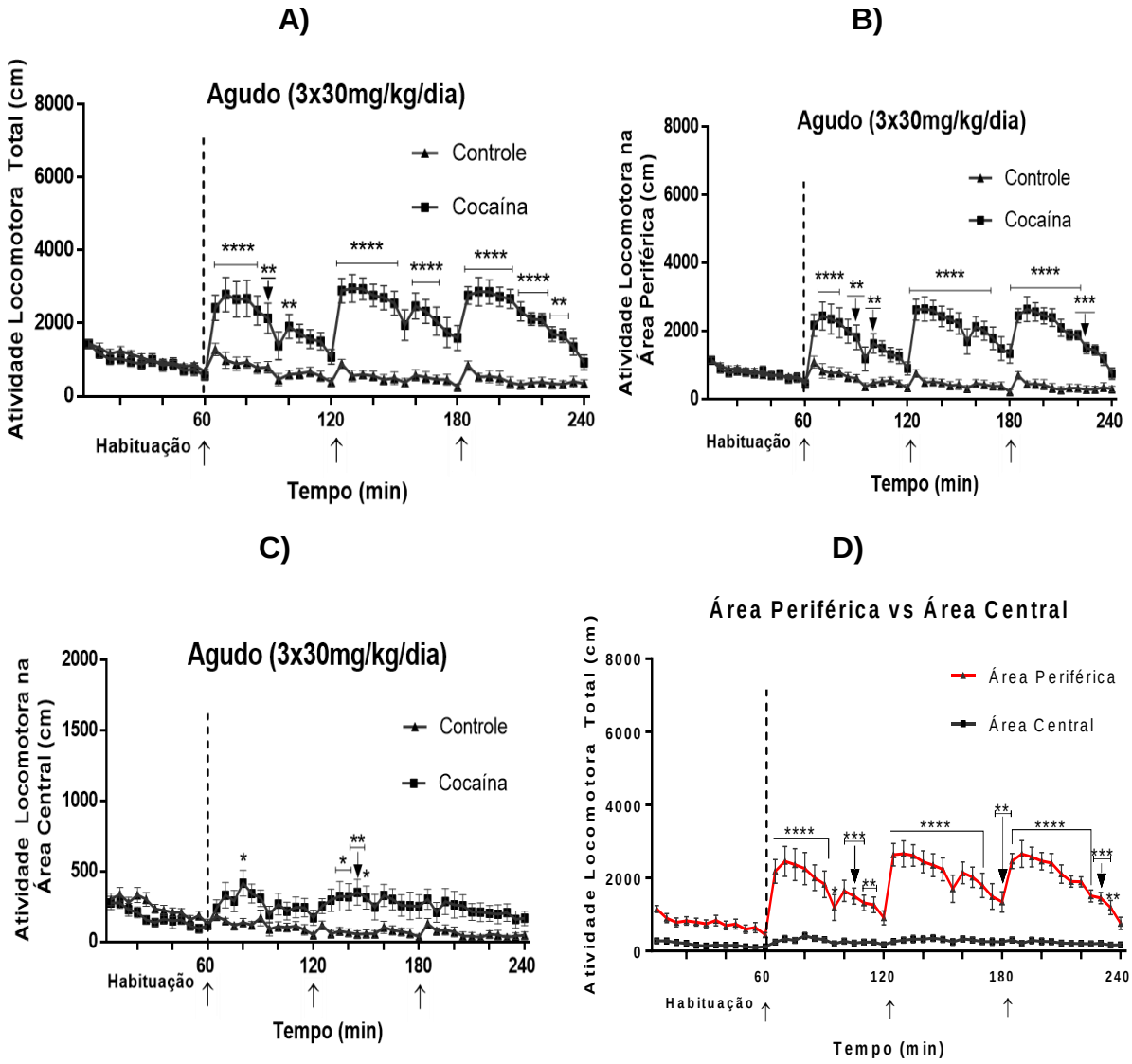
Na Figura 16B observa-se a atividade locomotora na área periférica. A ANOVA de 2 vias (tempo x tratamento) mostrou efeito estatisticamente significativo dos fatores tempo ($F_{47,1034}$ = 9,02; p<0,0001) e tratamento ($F_{1, 22}$ = 41,04; p<0,0001); e interação entre ambos ($F_{47, 1034}$=11,36; p<0,0001). As análises *post-hoc* dos fatores tempo e tratamento indicam que os animais que receberam agudamente cocaína em *binge* apresentaram maior atividade locomotora na área periférica em relação aos animais tratados com solução salina.

A Figura 16C mostra os resultados da atividade locomotora na área central e a ANOVA de 2 vias (tempo x tratamento) mostrou efeito estatisticamente significativo dos fatores tempo ($F_{47,1034}$=2,65; p<0,0001) e tratamento ($F_{1, 22}$=7,03; p<0,0001), assim como interação entre ambos ($F_{47, 1034}$)=3,84; p<0,0001).

Já na Figura 16D observa-se a relação da atividade locomotora da área periférica e central dos animais tratados com cocaína. A ANOVA de 2 vias (tempo x tratamento) mostrou efeitos estadisticamente significativo dos fatores tempo ($F_{47,1034}$=12,16; p<0,0001) e tratamento ($F_{1,22}$=72,96; p<0,0001); e interação entre ambas ($F_{47,1034}$=8,99; p<0,0001). As análises *post-hoc* dos fatores tempo e tratamento

indicam que os animais que receberam agudamente cocaína em *binge* apresentaram maior atividade locomotora na área periférica em relação ao central.

Figura 16: Atividade locomotora total na faixa de tempo de 5 minutos, após a administração de solução salina ou cocaína no tratamento agudo de cocaína em *binge* (3x30 mg/kg/1dia) (n=12). Os gráficos referem-se à atividade locomotora total (A), periférica (B), central (C) e relação entre a área periférico e central (D). Os primeiros 60 minutos correspondem ao período de habituação. Após a habituação, os animais foram submetidos a 3 injeções (i.p) de cocaína (3x30 mg/kg/1dia) ou solução salina nos tempos de 60, 120 e 180 minutos (setas, eixo x). Despois de cada aplicação, os animais ficaram 60 minutos no campo aberto. Os valores estão apresentados como média ± EPM. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida do teste *post hoc* de Bonferroni. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 em relação ao controle.



5.2. Atividade locomotora no paradigma do escalonamento de dose de cocaína em padrão *binge*

Os resultados serão apresentados em relação à atividade locomotora total, periférica e central no campo aberto nos dias 1, 5, 9 e 13 pós a administração de cocaína, os quais correspondem ao primeiro dia de alteração de dose. Os gráficos referentes aos demais dias encontram-se no ANEXO B.

5.2.1. Atividade locomotora total no campo aberto

Na Figura 17 pode-se observar a atividade locomotora total (cm) dos animais submetidos ao campo aberto do escalonamento de dose de cocaína em *binge*. A ANOVA de 2 vias (tempo e tratamento) não mostrou diferença significativa da atividade locomotora nos grupos com escalonamento de dose de cocaína em *binge vs* grupo controle durante a habituação.

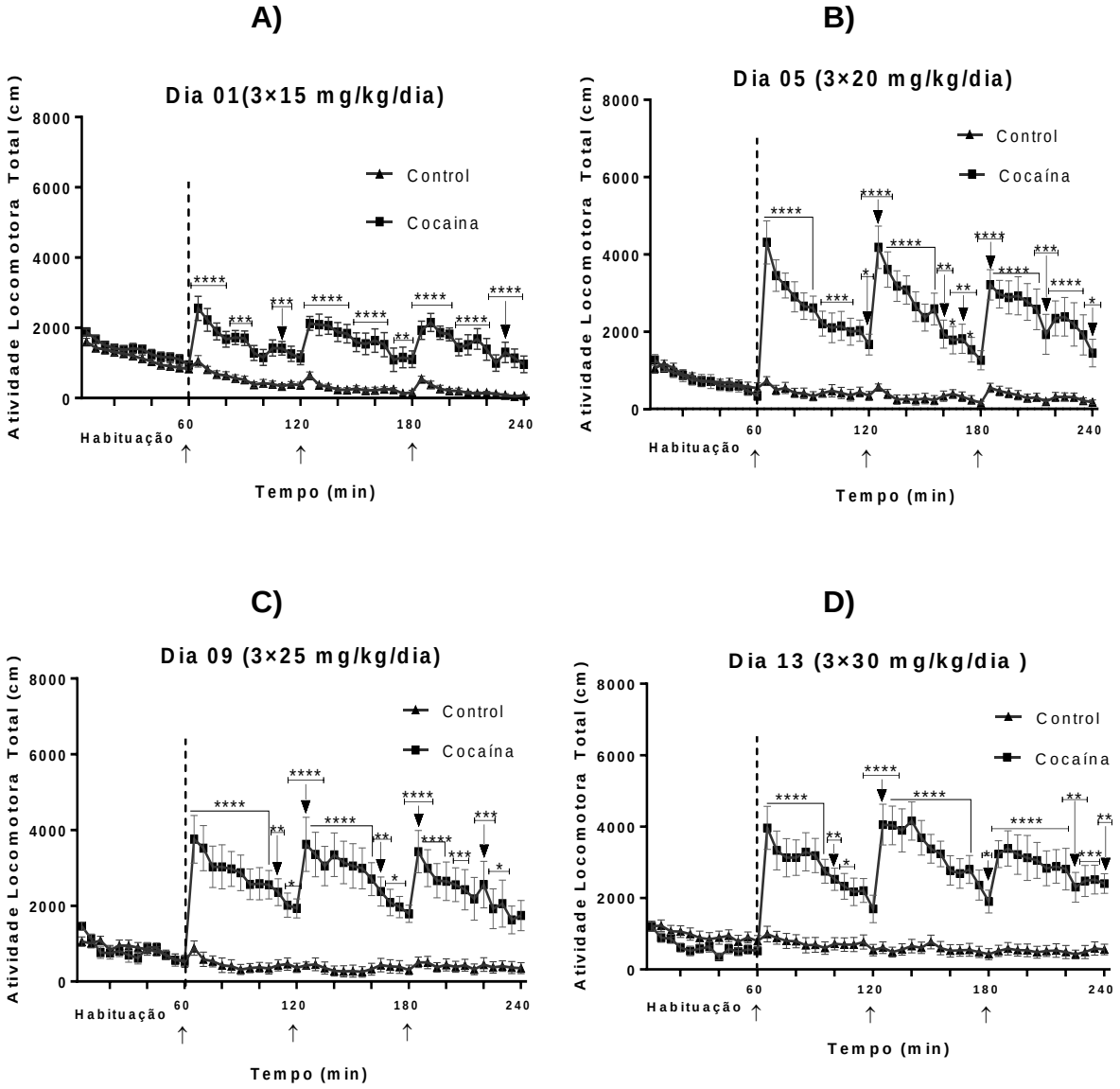
A Figura 17A apresenta os resultados no dia 01 de escalonamento de dose de cocaína em *binge*. A ANOVA de 2 vias (tempo x tratamento) mostrou efeito estatisticamente significativo dos fatores tempo ($F_{47,1034}$=9,95; p<0,0001) e tratamento ($F_{1,22}$=37,89; p<0,0001), assim como interação entre ambos ($F_{47,1034}$=7,67; p<0,0001). As análises *post hoc* dos fatores tempo e tratamento indicam que o grupo tratado com cocaína apresentou maior atividade locomotora do que o grupo salina nos primeiros 30 minutos após a administração de cocaína (p<0,0001).

Na Figura 17B observa-se os resultados obtidos no dia 05 de escalonamento de dose de cocaína em *binge*. A ANOVA de 2 vias (tempo x tratamento) mostrou efeito estatisticamente significativo dos fatores tempo ($F_{47,1034}$=4,89; p<0,0001) e tratamento ($F_{1,22}$=53,29; p<0,0001), assim como interação entre ambos ($F_{47,1034}$=13,55; p<0,0001). As análises *post hoc* dos fatores tempo e tratamento também mostraram maior atividade locomotora do grupo tratado com cocaína nos primeiros 30 minutos (p<0,0001) em relação ao grupo salina.

Já no dia 09 de escalonamento de dose de cocaína em *binge* (Figura 17C), a ANOVA de 2 vias (tempo x tratamento) mostrou efeito estatisticamente significativo dos fatores tempo ($F_{47,1034}$=7,37; p<0,0001) e tratamento ($F_{1,\ 22}$=24,07; p<0,0001), assim como interação entre ambos ($F_{47,1034}$ = 13,01; p<0,0001). Da mesma forma, as análises *post hoc* dos fatores tempo e tratamento mostraram maior atividade locomotora do grupo exposto a cocaína em relação ao controle.

Também no dia 13 (Figura 17D) a ANOVA de 2 vias (tempo x tratamento) mostrou efeito estatisticamente significativo dos fatores tempo ($F_{47,1034}$=11,77; p<0,0001) e tratamento ($F_{1,22}$=27,48; p<0,0001), assim como interação entre ambos ($F_{47,1034}$=17,56; p<0,0001). Da mesma forma que as análises anteriores, o grupo tratado com cocaína apresentou maior ativade locomotora nos primeiros 30 minutos em relação aos animais tratados com solução salina.

Figura 17: Atividade locomotora total na faixa de tempo de 5 minutos, após a administração de solução salina ou cocaína no escalonamento de dose (n=12). Os animais receberam três injeções por via intraperitoneal (i.p) de solução salina ou cocaína: D1-D4 (3×15 mg/kg/dia), D5-D8 (3×20 mg/kg/dia), D9-D12 (3×25 mg/kg/dia) e D13-D14 (3×30 mg/kg/dia), perfazendo um total de 14 dias (D1-D14). Os primeiros 60 minutos correspondem ao período de habituação. Após a administração de cocaína ou solução salina nos tempos de 60, 120 e 180 minutos (setas, eixo x), os animais foram colocados no centro do campo aberto onde permaneceram por 60 minutos a fim de avaliar a atividade locomotora. Os gráficos apresentados referem-se aos dias D1 (A), D5 (B), D9 (C), D13 (D). Os valores estão apresentados como média ± EPM. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida do teste *post hoc* de Bonferroni. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 em relação ao controle.

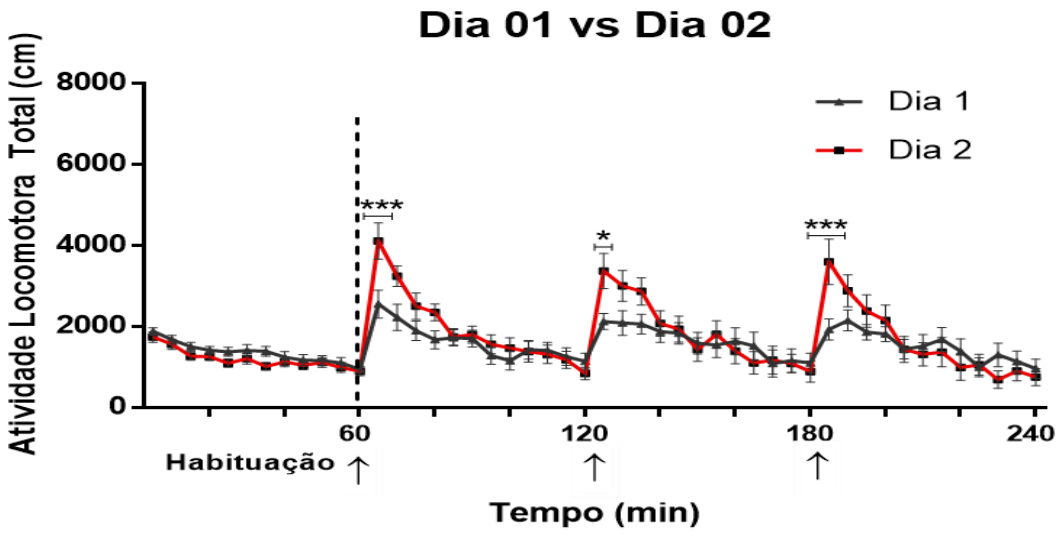


A Figura 18A faz a comparação entre a atividade locomotora observada no dia 02 em relação ao dia 01. A ANOVA de 2 vias (dia x tratamento) com medidas repetidas revelou efeito significativo no fator dia ($F_{47,1034}$=3,17; p<0,0001), assim como uma interação entre o fator dia e tratamento ($F_{47,1034}$=17,69; p<0,0001), indicando maior atividade locomotora no segundo dia. A maior atividade locomotora foi observada nos primeiros 5 minutos de cada aplicação de cocaína, evidenciando-se assim o inicio do fenômeno de sensibilização comportamental.

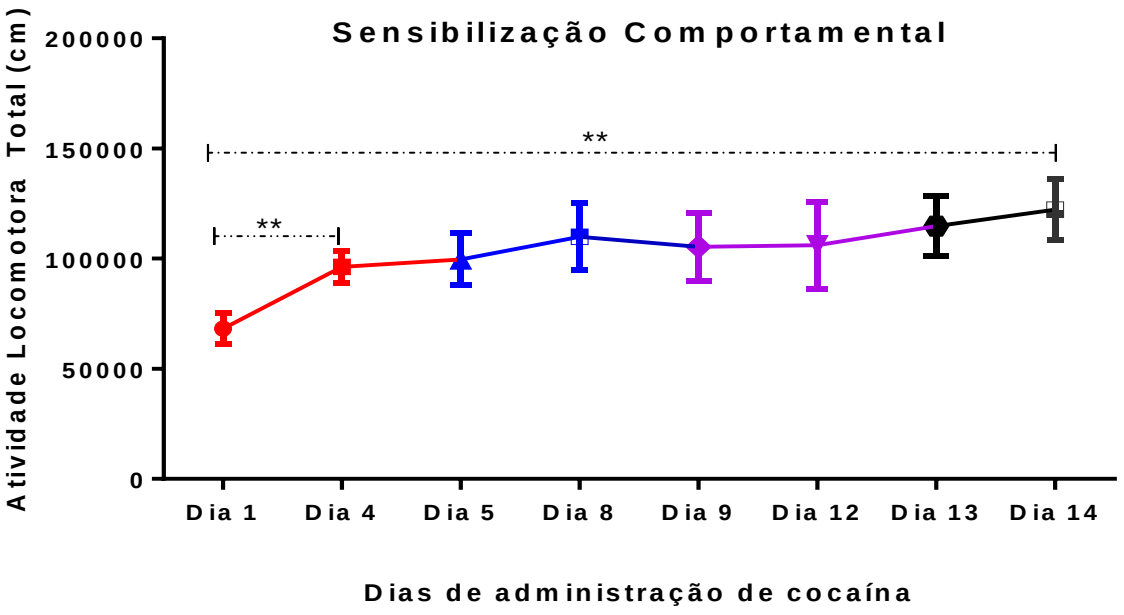
Na Figura 18B observa-se os resultados obtidos nos dias 01 e 04, 05 e 08, 09 e 12, 13 e 14 dos animais de escalonamento de dose de cocaína em *binge*. O teste "*t*" de Student para amostras não pareadas mostrou diferença estatisticamente significativa (p<0,01) entre os dias 01 e 04, já entre os outros dias não revelou diferença estatística significativa. Mas quando se realizó um analises estatístico entre os dias 01 e 14 dos animais de escalonamento de dose de cocaína em *binge* mostrou diferença estatisticamente significativa (p<0,002). Evidenciandose desta forma que a sensibilização comportamental permaneceu durante todos os dias de tratamento.

Figura 18: A) Início da Sensibilização comportamental representada pela comparação entre as atividades locomotoras dos dias 1 e 2 de administração de cocaína (n=12). Os valores estão apresentados como média ± EPM. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida do teste *post hoc* de Bonferroni. *p<0,05; ***p<0,001**.** B) Sensibilização comportamental entre os dias de tratamento. Os valores estão apresentados como média ± EPM. Para análise estatística foi utilizado teste "t" de *Student* para amostras não pareadas. **p<0,01.

A)



B)



5.2.2. Atividade locomotora na área periférica do campo aberto

Na Figura 19 pode-se observar a atividade locomotora na área periférica (cm) dos animais submetidos ao campo aberto realizado após cada administração por escalonamento de dose de cocaína em *binge* durante 14 dias de tratamento.

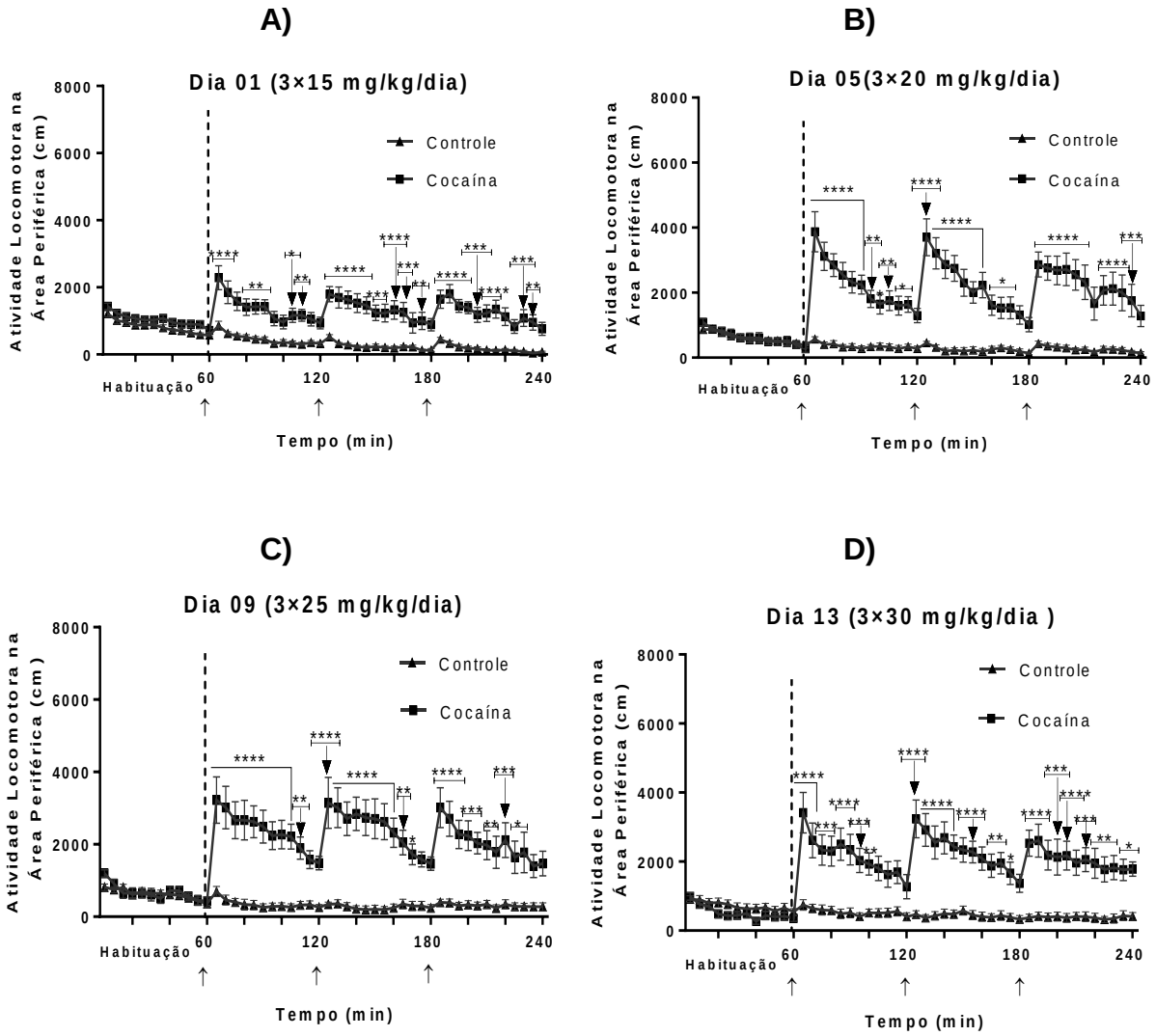
No dia 01 (Figura 19A) a ANOVA de 2 vias (tempo x tratamento) mostrou efeito estatisticamente significativo dos fatores tempo ($F_{47,1034}$=8,09; p<0,0001) e tratamento ($F_{1,22}$=25,30; p<0,0001), assim como interação entre ambos ($F_{47,1034}$=6,46; p<0,0001). As análises *post hoc* do fator tempo e tratamento mostraram que os animais tratados com escalonamento de dose de cocaína em *binge* apresentam maior atividade locomotora na área periférica em comparação aos animais tratados com solução salina.

A ANOVA de 2 vias (tempo x tratamento) no dia 05 (Figura 19B) mostrou efeito estatisticamente significativo dos fatores tempo ($F_{47,1034}$=11,36; p<0,0001) e tratamento ($F_{1,22}$=31,61; p<0,0001), assim como interação entre ambos ($F_{47,1034}$=14,64; p<0,0001). As análises *post hoc* do fator tempo e tratamento também mostraram aumento da atividade locomotora do grupo exposto à cocaína em relação ao controle.

Já no dia 09 (Figura 19C), a ANOVA de 2 vias (tempo x tratamento) mostrou efeito significativo dos fatores tempo ($F_{47,1034}$=8,14; p<0,0001) e tratamento ($F_{1,22}$=24,31; p<0,0001), assim como interação entre ambos ($F_{47,1034}$=12,36; p<0,0001). Da mesma forma que nos dias anteriores foi observado aumento da atividade locomotora do grupo exposto à cocaína em relação ao controle.

Também no dia 13 (Figura 19D), a ANOVA de 2 vias (tempo x tratamento) mostrou efeito estatisticamente significativo dos fatores tempo ($F_{47,1034}$=10,15; p < 0.0001) e tratamento ($F_{1,22}$=18,97; p<0,0001), assim como interação entre ambos ($F_{47,1034}$=14,39; p<0,0001). Mais uma vez o grupo tratado com cocaína apresentou atividade locomotora maior que o grupo controle.

Figura 19: Atividade locomotora na área periférica na faixa de tempo de 5 minutos, após a administração de solução salina ou cocaína no escalonamento de dose (n=12). Os animais receberam três injeções por via intraperitoneal (i.p) de solução salina ou cocaína: D1-D4 (3×15 mg/kg/dia), D5-D8 (3×20 mg/kg/dia), D9-D12 (3×25 mg/kg/dia) e D13-D14 (3×30 mg/kg/dia), perfazendo um total de 14 dias (D1-D14). Os primeiros 60 minutos correspondem ao período de habituação. Após a administração de cocaína ou solução salina nos tempos de 60, 120 e 180 minutos (setas, eixo x), os animais foram colocados no centro do campo aberto onde permaneceram por 60 minutos a fim de avaliar a atividade locomotora. Os gráficos apresentados referem-se aos dias D1 (A), D5 (B), D9 (C), D13 (D). Os valores estão apresentados como média ± EPM. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida do teste *post hoc* de Bonferroni. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 em relação ao controle.

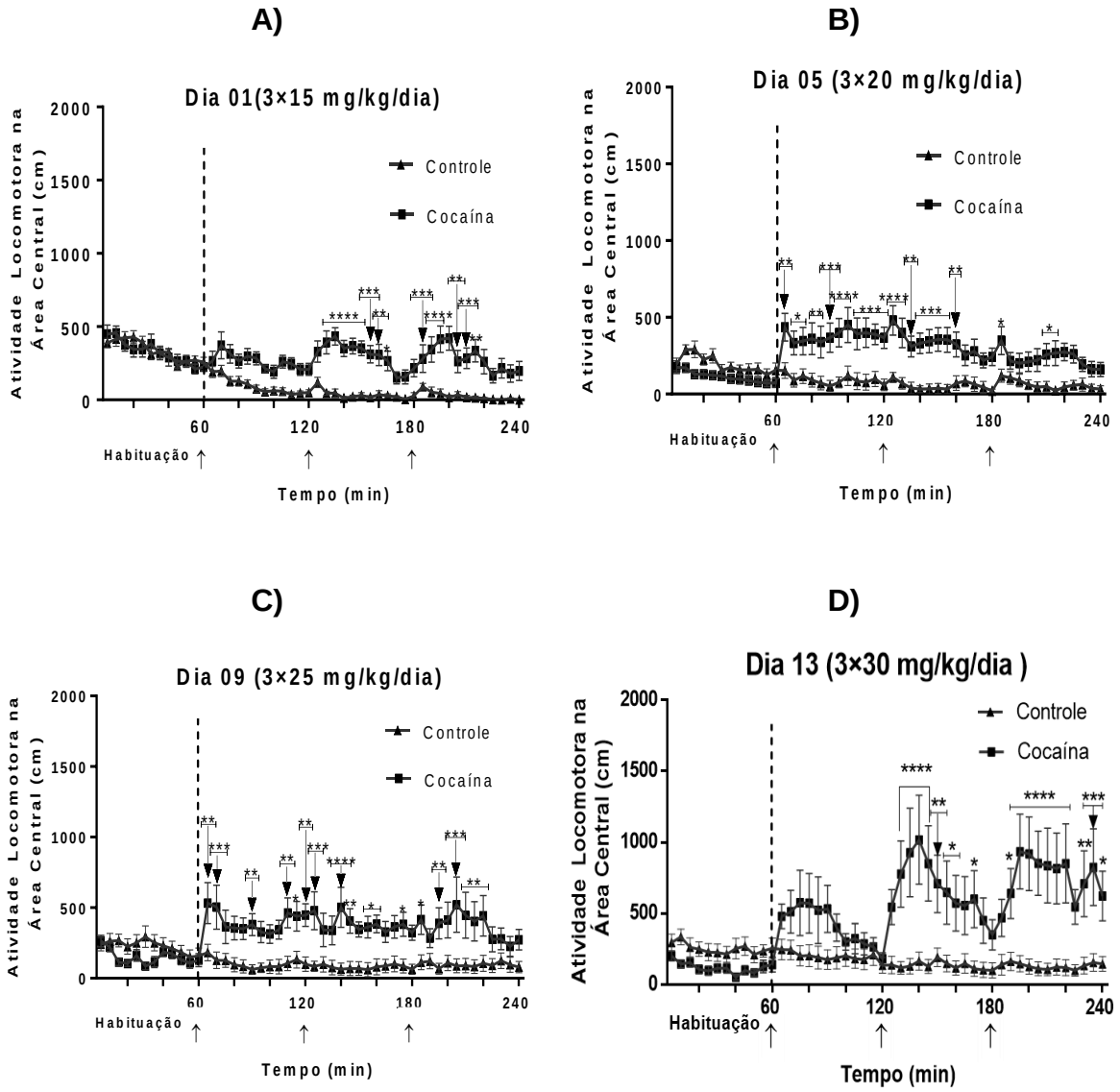


5.2.3. Atividade locomotora na área central do campo aberto

Na Figura 20 pode-se observar a atividade locomotora na área central (cm) dos animais submetidos ao campo aberto realizado após de cada administração do escalonamento de dose de cocaína em *binge* durante 14 dias de tratamento.

A ANOVA de 2 vias (tempo x tratamento) realizada com os resultados obtidos no dia 01 (Figura 20A) mostrou efeito estatisticamente significativo dos fatores tempo ($F_{47,1034}$=8,96; p<0,0001) e tratamento ($F_{1,22}$=40,99; p<0,0001), assim como interação entre ambos ($F_{47,1034}$=4,48; p<0,0001). A mesma análise realizada no dia 05 (Figura 20B) mostrou efeito estatisticamente significativo dos fatores tempo ($F_{47,1034}$=2,32; p<0,0001) e tratamento ($F_{1,22}$=13,83; p<0,0001), assim como interação entre ambos ($F_{47,1034}$=5,43; p<00001). Já no dia 09 (Figura 20C), a ANOVA de 2 vias (tempo x tratamento) mostrou efeito estatisticamente significativo dos fatores tempo ($F_{47,1034}$=1,14; p<0,0001) e tratamento ($F_{1,22}$=10,11; p<0,0001), assim como interação entre ambos ($F_{47, 1034}$=4,07; p<0,0001). Também do dia 13 (Figura 20D) a ANOVA de 2 vias (tempo x tratamento) mostrou efeito estatisticamente significativo dos fatores tempo ($F_{47,1034}$=3,29; p<0,0001) e tratamento ($F_{1,22}$=6,07; p<0,0001), assim como interação entre ambos ($F_{47,1034}$=5,75; p<0,0001). Em todos os dias avaliados, as análises *post hoc* do fator tempo e tratamento mostraram que os animais tratados com escalonamento de dose de cocaína em *binge* apresentaram maior atividade locomotora na área central que o grupo controle.

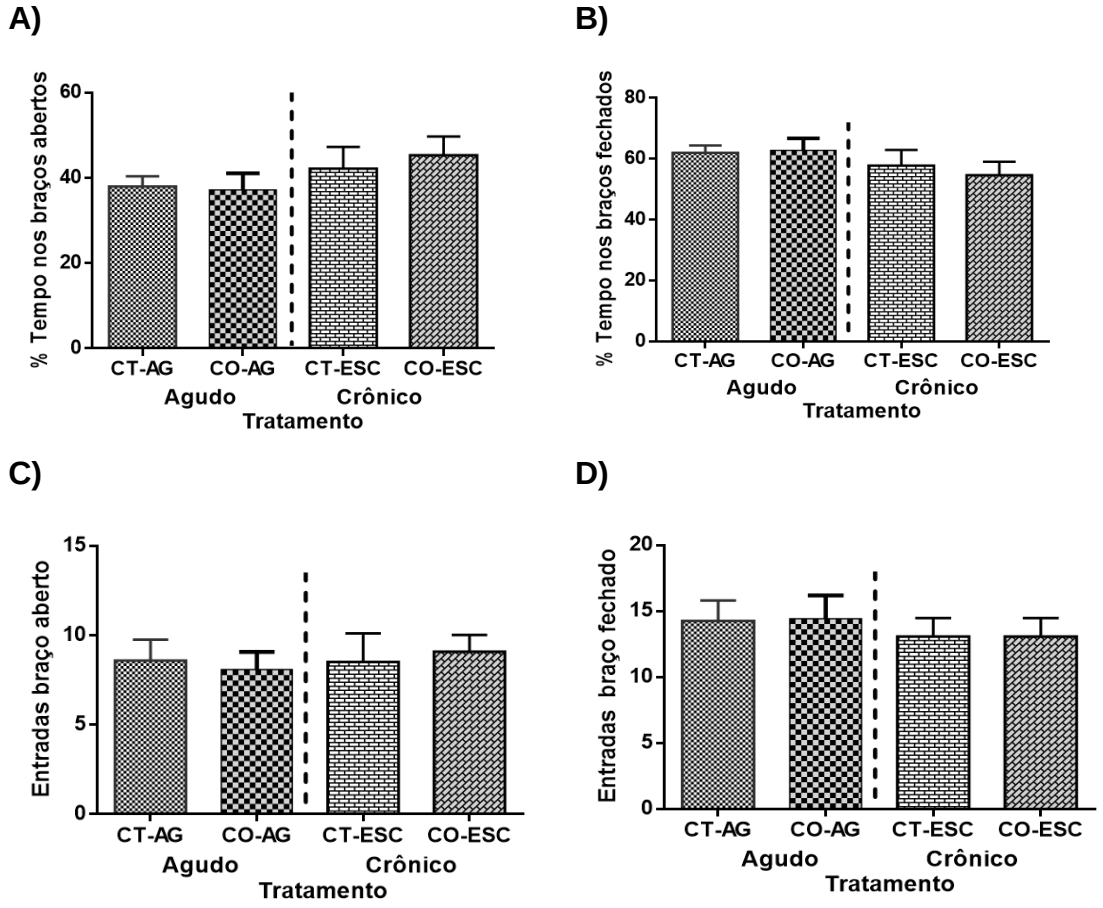
Figura 20: Atividade locomotora área central na faixa de tempo de 5 minutos, após a administração de solução salina ou cocaína no escalonamento de dose (n=12). Os animais receberam três injeções por via intraperitoneal (i.p) de solução salina ou cocaína: D1-D4 (3×15 mg/kg/dia), D5-D8 (3×20 mg/kg/dia), D9-D12 (3×25 mg/kg/dia) e D13-D14 (3×30 mg/kg/dia), perfazendo um total de 14 dias (D1-D14). Os primeiros 60 minutos correspondem ao período de habituação. Após a administração de cocaína ou solução salina nos tempos de 60, 120 e 180 minutos (setas, eixo x), os animais foram colocados no centro do campo aberto onde permaneceram por 60 minutos a fim de avaliar a atividade locomotora. Os gráficos apresentados referem-se aos dias D1 (A), D5 (B), D9 (C), D13 (D). Os valores estão apresentados como média ± EPM. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida do teste *post hoc* de Bonferroni. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 em relação ao controle.



5.3. Avaliação da ansiedade por meio do labirinto em cruz elevado

Após os 14 dias de abstinência, os animais foram avaliados por 5 minutos no labirinto de cruz elevado. O teste "*t*" de Student não mostrou diferença estatística entre os tratamentos em porcentagem de tempo nos braços abertos (A), porcentagem de tempo nos braços fechados (B), número de entradas nos braços abertos (C) e número de entradas nos braços fechados (D), conforme se observa na Figura 21.

Figura 21: Avaliação da ansiedade por meio do labirinto em cruz elevado após 14 dias de abstinência. Porcentagem de tempo nos braços abertos (A), e fechados (B), número de entradas nos braços abertos (C) e fechados (D). Os valores estão apresentados como média ± EPM. A comparação entre animais tratados com cocaína e controles no teste agudo em *binge* ou nos animais submetidos ao protocolo de escalonamento de dose de cocaína em *binge* foi realizada pelo teste *t* de Student.



CT-AG= controle agudo, CO-AG= administração aguda de cocaína em *binge* (n=12). CT-ESC= controle de escalonamento de dose, CO-ESC= escalonamento de dose de cocaína em *binge* (n=12).

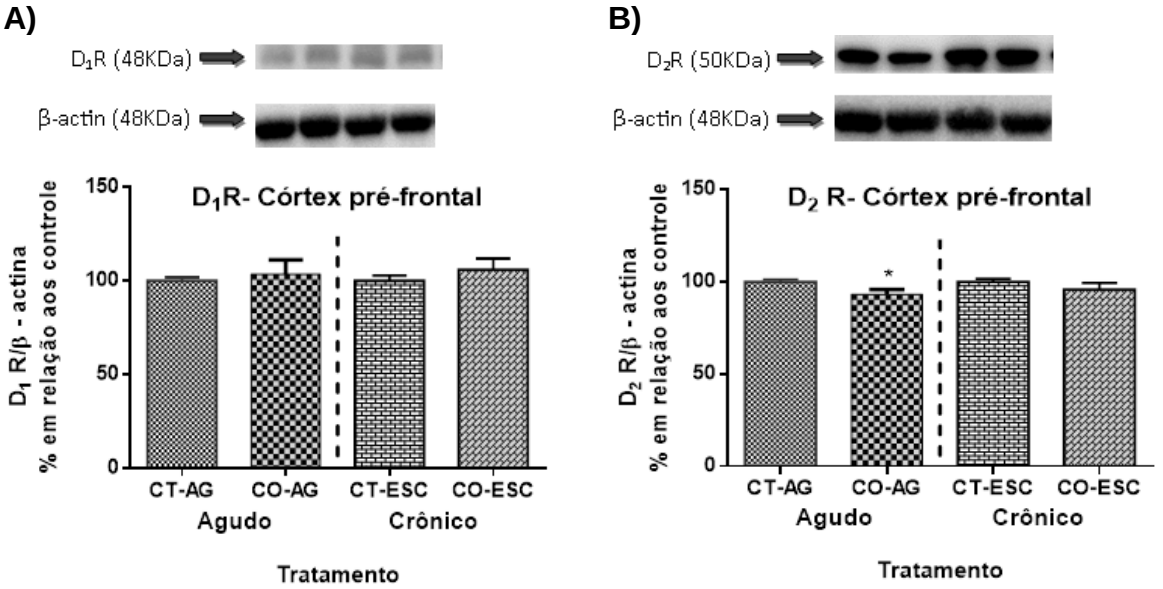
5.4. Análise das proteínas por *Western Blotting*

5.4.1. Receptores dopaminérgicos

5.4.1.1. Córtex pré-frontal

A Figura 22 mostra os resultados da quantificação dos receptores dopaminérgicos por *Western Blotting* no CPF de camundongos *Swiss-Webster* tratamento tratados com cocaína de forma aguda em *binge* e no escalonamento de dose de cocaína em *binge*. Conforme pode ser observado na Figura 22A, não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) em D_1R em nenhum dos tratamentos realizados. Já na Figura 22B observamos diminuição estatisticamente significativa em D_2R (100,0±1,13 *vs* 93,37±2,45; $p<0,05$) somente no tratamento agudo à cocaína em relação ao controle.

Figura 22: Receptores D_1R (A) e D_2R (B) por *Western Blotting* no córtex pré-frontal de camundongos *Swiss-Webster* expostos ao protocolo agudo de cocaína em *binge* e de escalonamento de dose de cocaína em *binge.* Os dados foram expressos como % em relação ao controle (média ± EPM). Para análise estatística foi utilizado teste "t" de *Student* para amostras não pareadas (n=6). *p<0,05; **p<0,01 em relação ao controle.

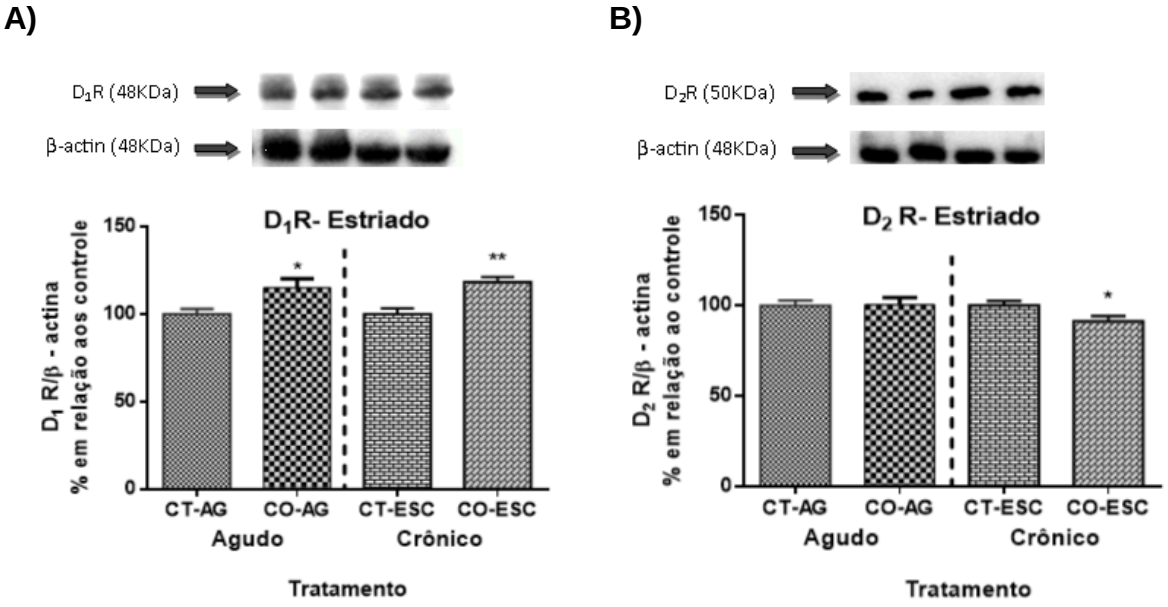


CT-AG= controle agudo, **CO-AG=** administração aguda de cocaína em *binge,* **CT-ESC=** controle de escalonamento de dose, **CO-ESC=** escalonamento de dose de cocaína em *binge*.

5.4.1.2. Estriado

A Figura 23 apresenta os resultados da quantificação dos receptores dopaminérgicos por *Western Blotting* no estriado de camundongos *Swiss-Webster* no tratamento agudo de cocaína em *binge* e no escalonamento de dose de cocaína em *binge*. A Figura 23A mostra aumento de D_1R em relação ao controle no tratamento agudo (100,0±3,12 *vs* 115,20±4,97; $p<0,05$) e no escalonamento de dose de cocaína em *binge* (100,0±3,43 *vs* 118,2±3,04; $p<0,01$). Já em relação aos D_2R, não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) no tratamento agudo de cocaína em *binge*, porém no tratamento crônico do escalonamento de dose foi observada diminuição de D_2R em relação ao controle (100,0±2,52 *vs* 91,47±2,76; $p<0,05$ – Figura 23B).

Figura 23: Receptores D_1R (A) e D_2R (B) por *Western Blotting* no estriado de camundongos *Swiss-Webster* expostos ao protocolo agudo de cocaína em *binge* e de escalonamento de dose de cocaína em *binge*. Os dados foram expressos como % em relação ao controle (média ± EPM). Para análise estatística foi utilizado teste "t" de *Student* para amostras não pareadas (n=6). *p<0,05; **p<0,01.

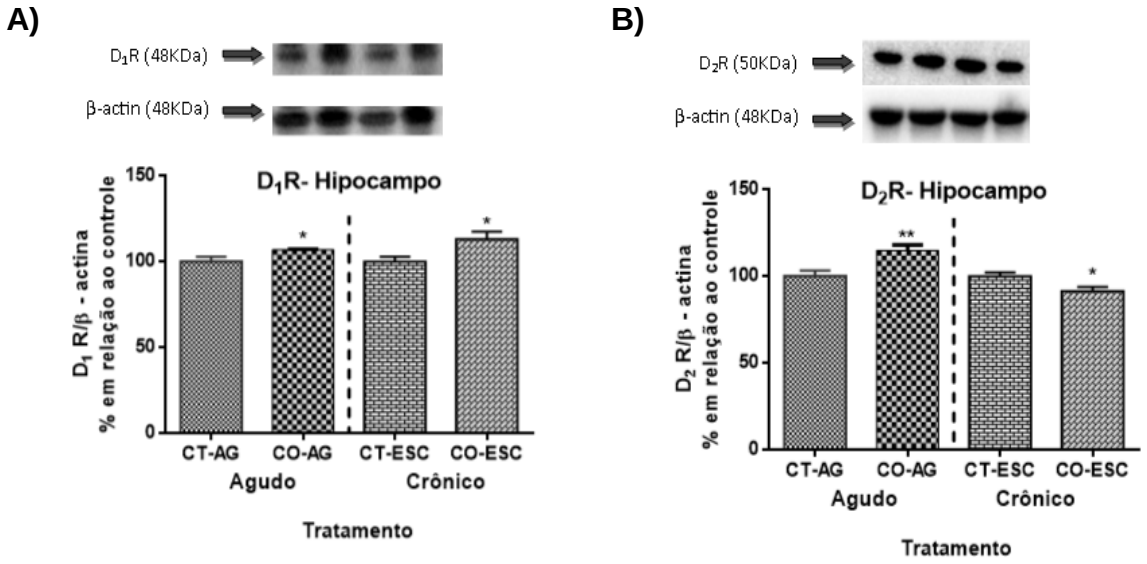


CT-AG= controle agudo, **CO-AG=** administração aguda de cocaína em *binge,* **CT-ESC=** controle de escalonamento de dose, **CO-ESC=** escalonamento de dose de cocaína em *binge*.

5.4.1.3. Hipocampo

A Figura 24 apresenta os resultados da quantificação dos receptores dopaminérgicos por *Western Blotting* no hipocampo dos camundongos *Swiss-Webster* no tratamento agudo de cocaína em *binge* e no escalonamento de dose de cocaína em *binge*. Na Figura 24A pode ser observado aumento de D_1R no tratamento agudo (100,0±2,81 *vs* 107,0±0,21; $p<0,05$) e escalonamento de dose à cocaína (100,0±2,83 *vs* 113,1±4,31; $p<0,05$). Em relação aos D_2R, conforme pode ser observado na Figura 24B, houve aumento no tratamento agudo (100,0±3,34 *vs* 114,9±3,16; $p<0,01$), mas no tratamento crônico do escalonamento de dose foi observada diminuição (100,0±2,31 *vs* 91,38±2,41; $p<0,05$).

Figura 24: Receptores D_1R (A) e D_2R (B) por *Western Blotting* no hipocampo de camundongos *Swiss-Webster* expostos ao protocolo agudo de cocaína em *binge* e de escalonamento de dose de cocaína em *binge*. Os dados foram expressos como % em relação ao controle (média ± EPM). Para análise estatística foi utilizado teste "t" de *Student* para amostras não pareadas (n=6). *p<0,05; **p<0,01.



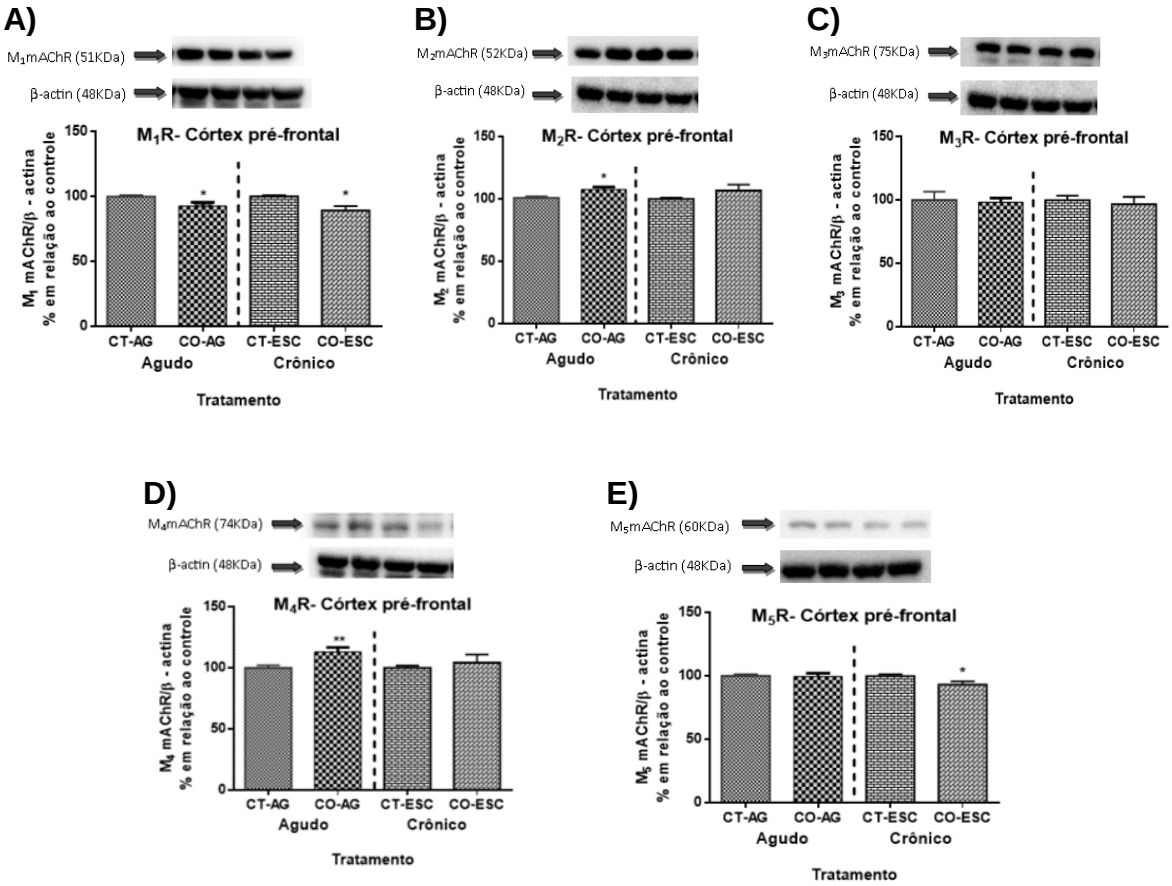
CT-AG= controle agudo, **CO-AG=** administração aguda de cocaína em *binge,* **CT-ESC=** controle de escalonamento de dose, **CO-ESC=** escalonamento de dose de cocaína em *binge.*

5.4.2. Receptores colinérgicos

5.4.2.1. Córtex pré-frontal

A Figura 25 mostra os resultados da quantificação dos mAChRs por *Western Blotting* no CPF de camundongos *Swiss-Webster* no tratamento agudo de cocaína em *binge* e no escalonamento de dose de cocaína em *binge*. Na Figura 25A observa-se diminuição de M_1 mAChRs em relação ao controle no tratamento agudo (100,0±1,05 *vs* 92,80±2,77; $p<0,05$) e no escalonamento de dose (100,0±0,95 *vs* 89,36±3,23; $p<0,05$) em relação ao controle. Nas Figuras 25B e 25D pode-se observar aumento de M_2 mAChRs (100,0±0,57 *vs* 107,80±1,93; $p<0,05$) e M_4 mAChRs (100,0±2,15 *vs* 113,1±3,61; $p<0,05$) no tratamento agudo em relação ao controle. Em relação aos M_5 mAChRs, observamos diminuição (100,0±1,31 *vs* 93,26±2,59; $p<0,05$) nos animais submetidos ao escalonamento de dose de cocaína em *binge* (Figura 25E). Não foram observadas alterações estatisticamente significativas nos receptores M_3 mAChRs nesta região.

Figura 25: Quantificação de mAChRs por *Western Blotting* no córtex pré-frontal (n=6) de camundongos *Swiss-Webster* expostos ao protocolo agudo de cocaína em *binge* e de escalonamento de dose de cocaína em *binge*. A) M_1 mAChRs, B) M_2 mAChRs, C) M_3 mAChRs, D) M_4 mAChRs, E) M_5 mAChRs. Os dados foram expressos como % em relação ao controle (média ± EPM). Para análise estatística foi utilizado teste "t" de *Student* para amostras não pareadas. *p<0,05; **p<0,01.



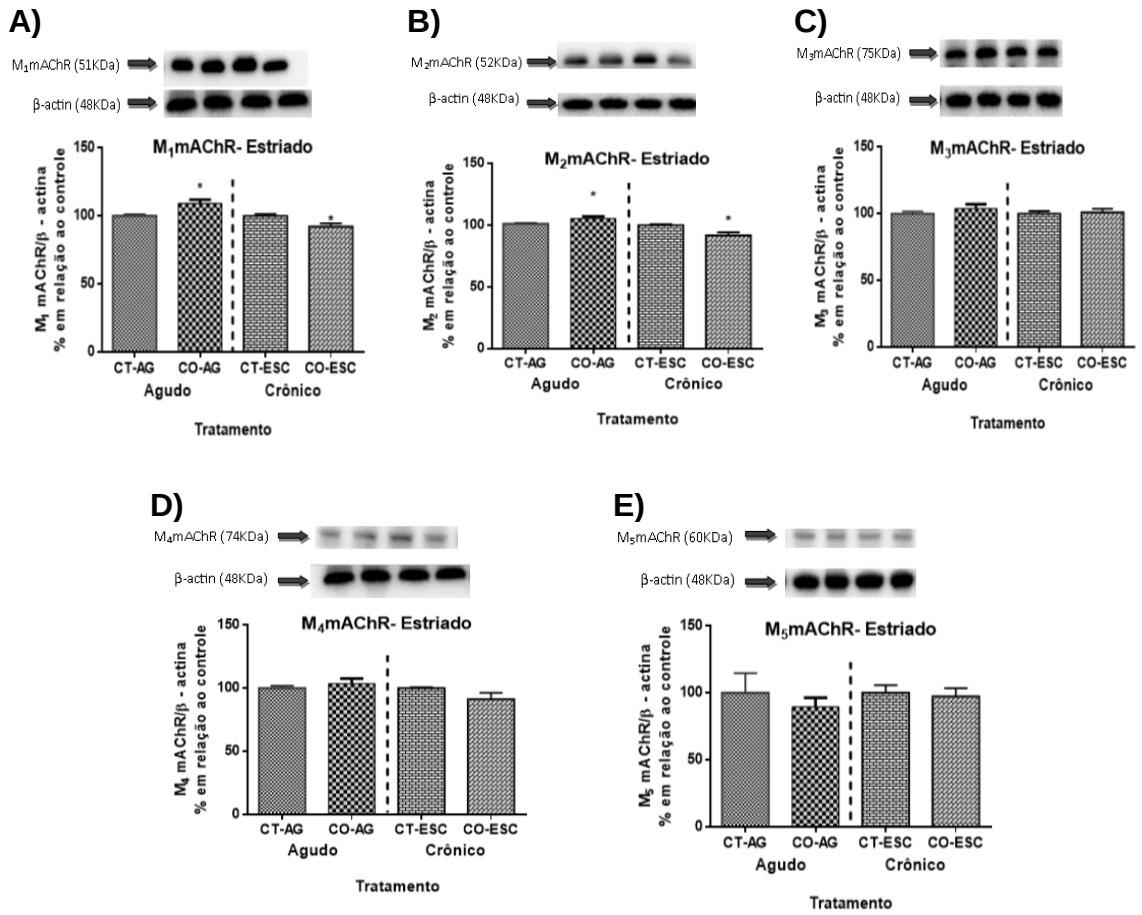
CT-AG= controle agudo, **CO-AG=** administração aguda de cocaína em *binge,* **CT-ESC=** controle de escalonamento de dose, **CO-ESC=** escalonamento de dose de cocaína em *binge*.

5.4.2.2. Estriado

A Figura 26 mostra os resultados da quantificação dos mAChRs por *Western Blotting* no estriado de camundongos *Swiss-Webster* no tratamento agudo de cocaína em *binge* e no escalonamento de dose de cocaína em *binge*. Nas Figuras 26A e 26B pode-se observar aumento de M_1 mAChRs (100,0±1,2 *vs* 109,2±2,65; p<0,05) e M_2 mAChR (100,0±0,26 *vs* 105,4±1,66; p<0,05) no tratamento agudo de cocaína em *binge* em relação ao controle. Mias ainda, foi observada diminuição de M_1 mAChRs (100,0±1,3 *vs* 92, 13±2,39; p<0,05) e M_2 mAChR (100,0±0,8786 *vs* 91,81±2,534;

p<0,05) no escalonamento de dose de cocaína em *binge*. Os demais receptores não sofreram alterações nesta região.

Figura 26: Quantificação de mAChRs por *Western Blotting* no estriado (n=6) de camundongos *Swiss-Webster* expostos ao protocolo agudo de cocaína em *binge* e de escalonamento de dose de cocaína em *binge*. A) M_1 mAChRs, B) M_2 mAChRs, C) M_3 mAChRs, D) M_4 mAChRs, E) M_5 mAChRs. Os dados foram expressos como % em relação ao controle (média ± EPM). Para análise estatística foi utilizado teste "t" de *Student* para amostras não pareadas. *p<0,05; **p<0,01.



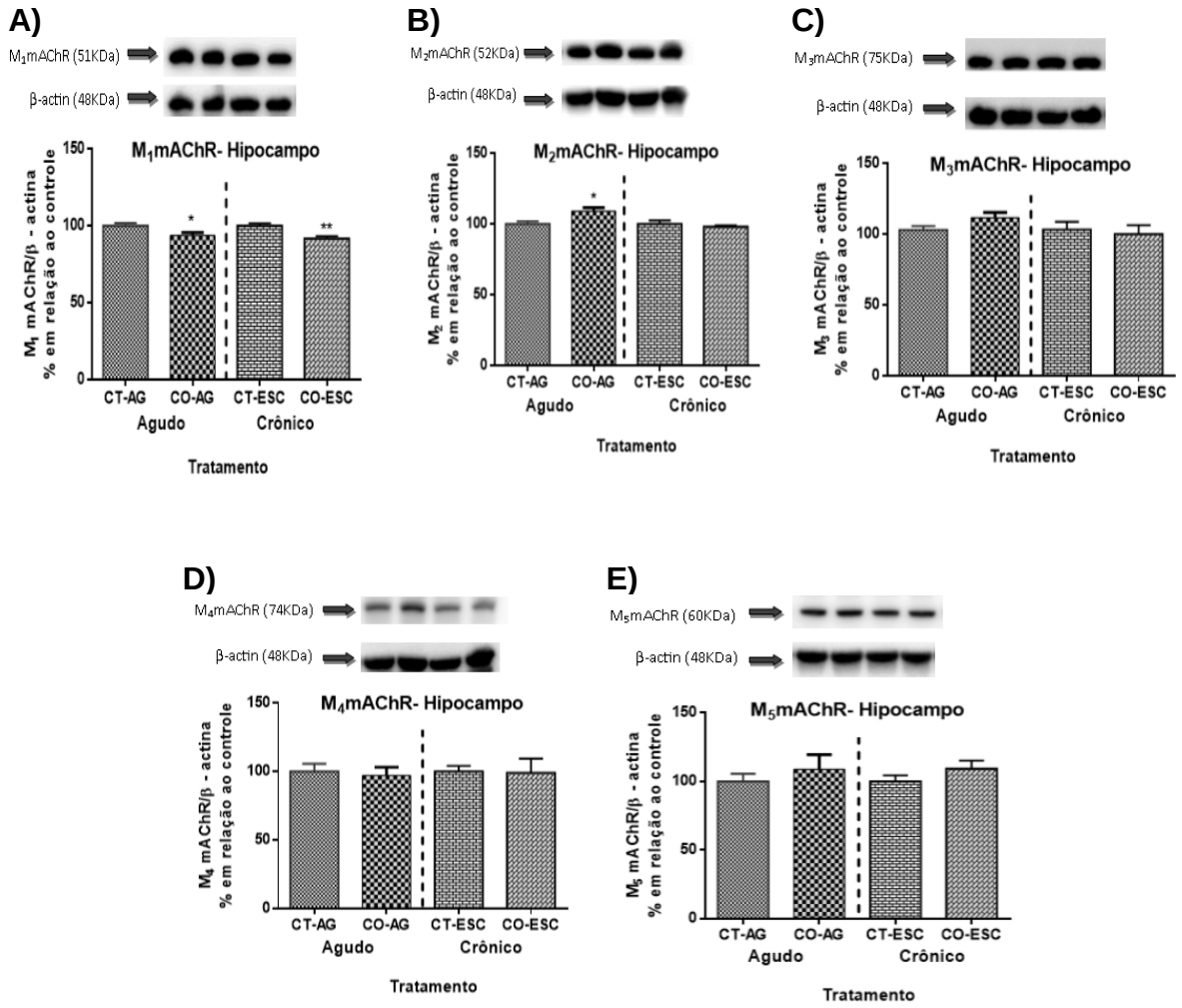
CT-AG= controle agudo, **CO-AG=** administração aguda de cocaína em *binge,* **CT-ESC=** controle de escalonamento de dose, **CO-ESC=** escalonamento de dose de cocaína em *binge*.

5.4.2.3. Hipocampo

A Figura 27 apresenta os resultados da quantificação dos mAChRs por *Western Blotting* no hipocampo de camundongos *Swiss-Webster* no tratamento agudo de cocaína em *binge* e no escalonamento de dose de cocaína em *binge*. Nas Figuras 27A e 27B observa-se diminuição de M_1 mAChRs (100,0±1,8 *vs* 93,71±1,99; p<0,05) e aumento de M_2 mAChR (100,0±2 *vs* 109,2±2,52; p<0,05) em relação ao controle no

tratamento agudo. Conforme observado na Figura 27A, o tratamento de escalonamento de dose de cocaína em *binge* mostrou diminuição de M_1 mAChR em relação ao controle (100,0 ± 1,65 *vs* 91,85 ± 1,52; $p<0,05$). Os demais receptores não sofreram alterações nesta região.

Figura 27: Quantificação de mAChRs por *Western Blotting* no hipocampo (n=6) de camundongos *Swiss-Webster* expostos ao protocolo agudo de cocaína em *binge* e de escalonamento de dose de cocaína em *binge*. A) M_1 mAChRs, B) M_2 mAChRs, C) M_3 mAChRs, D) M_4 mAChRs, E) M_5 mAChRs. Os dados foram expressos como % em relação ao controle (média ± EPM). Para análise estatística foi utilizado teste "t" de *Student* para amostras não pareadas. *p<0,05; **p<0,01.



CT-AG= controle agudo, **CO-AG=** administração aguda de cocaína em *binge,* **CT-ESC=** controle de escalonamento de dose, **CO-ESC=** escalonamento de dose de cocaína em *binge.*

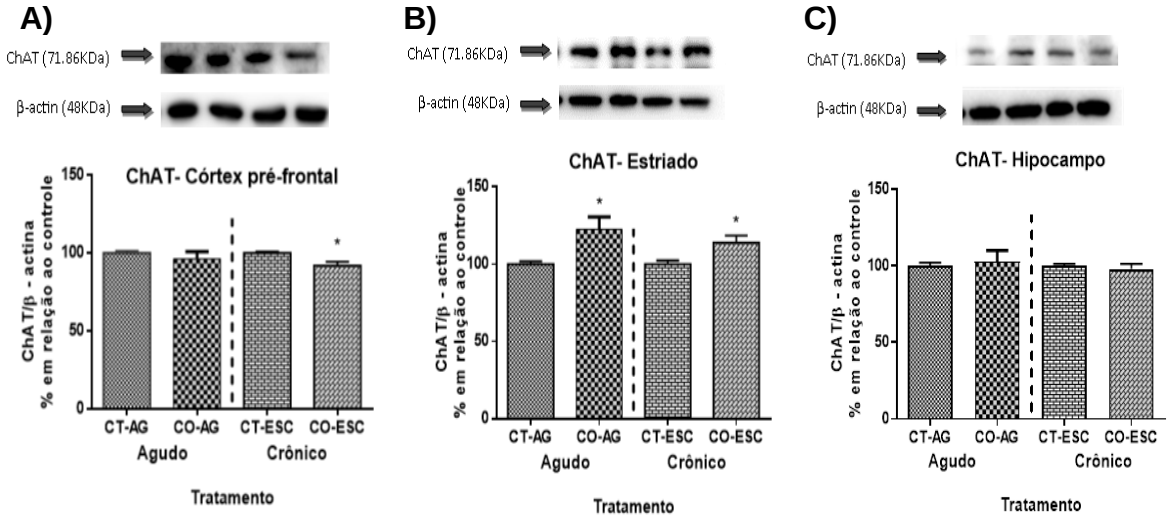
5.4.3. . Moléculas colinérgicas

5.4.3.1. Colina Acetil-Transferase (ChAT)

A Figura 28 apresenta os resultados da quantificação da ChAT por *Western Blotting* no CPF (Figura 28A), estriado (Figura 28B) e hipocampo (Figura 28C) de camundongos *Swiss-Webster* no tratamento agudo de cocaína em *binge* e no escalonamento de dose de cocaína em *binge*.

No tratamento agudo houve aumento da ChAT no estriado em relação ao controle (100,0±1,82 *vs* 122,6±8,15; p<0,05) nos animais submetidos ao protocolo agudo de cocaína em *binge,* porém, não foi observada diferença estatisticamente significativa (p>0,05) no CPF e no hipocampo. Já nos animais submetidos ao protocolo de escalonamento de dose de cocaína em *binge*, houve diminuição da ChAT no CPF (100,0±0,96 *vs* 92,02±2,39; p<0,05) e no estriado em relação ao controle (100,0±2,45 *vs* 113,9±4,65; p<0,05). Entretanto, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas (p>0,05) da ChATno hipocampo em nenhum dos protocolos utilizados.

Figura 28: Quantificação da colina acetil-transferase (ChAT) por *Western Blotting* no córtex pré-frontal (A), estriado (B) e hipocampo (C) no tratamento agudo de cocaína em *binge* e escalonamento de dose de cocaína em *binge*. Os dados foram expressos como % em relação ao controle (média ± EPM). Para análise estatística foi utilizado teste "t" de *Student* para amostras não pareadas (n=6). *p<0,05; **p<0,01.



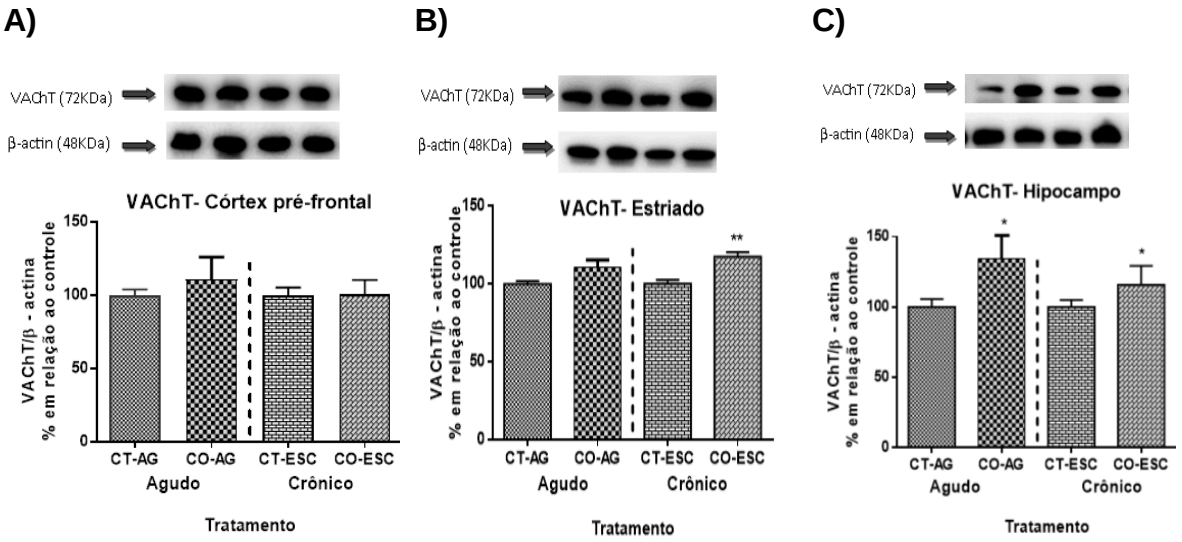
CT-AG= controle agudo, **CO-AG=** administração aguda de cocaína em *binge,* **CT-ESC=** controle de escalonamento de dose, **CO-ESC=** escalonamento de dose de cocaína em *binge*.

5.4.3.2. Transportador vesicular de acetilcolina (VAChT)

A Figura 29 apresenta os resultados da quantificação de VAChT por *Western Blotting* no CPF (Figura 29A), estriado (Figura 29B) e hipocampo (Figura 29C) de camundongos *Swiss-Webster* no tratamento agudo de cocaína em *binge* e no escalonamento de dose de cocaína em *binge*.

No tratamento agudo houve aumento de VAChT apenas no hipocampo em relação ao controle (100,0±2,32 *vs* 134,4±12,67; p<0,05). Entretanto, nos animais submetidos ao protocolo de escalonamento de dose, houve aumento de VAChT no estriado (100,0±2,54 *vs* 117,4±2,83; p<0,01) e no hipocampo em relação ao controle (100,0±2,07 *vs* 115,9±5.48; p<0,05). Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) da VAChT no CPF em nenhum dos protocolos utilizados.

Figura 29: Quantificação do transportador vesicular da acetilcolina (VAChT) por *Western Blotting* no córtex pré-frontal (A), estriado (B) e hipocampo (C) no tratamento agudo de cocaína em *binge* e escalonamento de dose de cocaína em *binge*. Os dados foram expressos como % em relação ao controle (média ± EPM). Para análise estatística foi utilizado teste "t" de *Student* para amostras não pareadas (n=6). *p<0,05; **p<0,01.

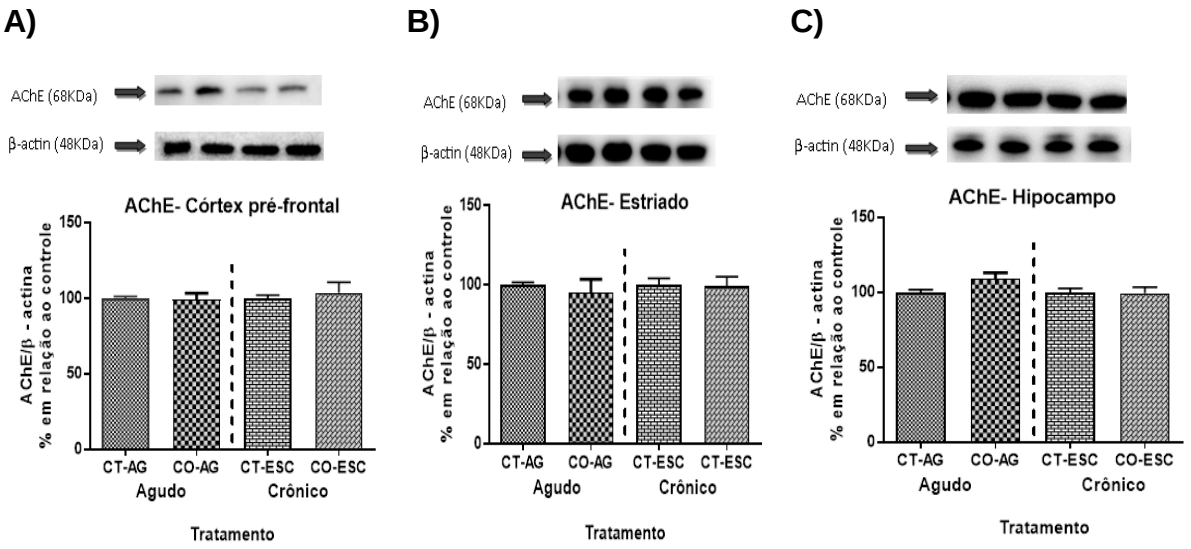


CT-AG= controle agudo, **CO-AG=** administração aguda de cocaína em *binge,* **CT-ESC=** controle de escalonamento de dose, **CO-ESC=** escalonamento de dose de cocaína em *binge*.

5.4.3.3. Acetilcolinesterase (AChE)

A Figura 30 apresenta os resultados da quantificação da AChE por *Western Blotting* no CPF (Figura 30A), estriado (Figura 30B) e hipocampo (Figura 30C) de camundongos *Swiss-Webster* no tratamento agudo de cocaína em *binge* e no escalonamento de dose de cocaína em *binge*. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas (p>0,05) da AChE em nenhuma das regiões estudadas e em nenhum dos protocolos utilizados.

Figura 30: Quantificação da acetilcolinesterase (AChE) por *Western Blotting* no córtex pré-frontal (A), estriado (B) e hipocampo (C) no tratamento agudo decocaína em *binge* e escalonamento de dose de cocaína em *binge*. Os dados foram expressos como % em relação ao controle (média ± EPM). Para análise estatística foi utilizado teste "t" de *Student* para amostras não pareadas (n=6). *p<0,05; **p<0,01.



CT-AG= controle agudo, **CO-AG=** administração aguda de cocaína em *binge,* **CT-ESC=** controle de escalonamento de dose, **CO-ESC=** escalonamento de dose de cocaína em *binge*.

6. Discussão

6. Discussão

Atualmente, o consumo de drogas de abuso é uma preocupação mundial, em função da sua alta incidência e dos riscos à saúde provenientes deste uso (RATTO & CORDEIRO, 2004). Segundo o *World Drug Report* publicado em 2018 pelo *United Nations Office on Drugs and Crime*, o número atual de pessoas que usam drogas aumentou em 20 milhões de 2015 a 2016. Ainda mais preocupante é o fato de que um a cada 9 usuários sofre algum tipo de distúrbio devido ao uso de drogas, como a dependência (UNODC, 2018).

A farmacodependência é uma doença crônica com distúrbio de recaída, caracterizado pela compulsão de procurar e voltar a consumir a droga (perda de controle pelo consumo) seguido de período de abstinência, com a presença de estados emocionais negativos, como, disforia, ansiedade e irritabilidade (KOOB & VOLKOW, 2010). Os dependentes de cocaína apresentam dificuldades em se manter no tratamento devido aos sintomas de depressão e ansiedade, prevalentes no período de abstinência (ALVES *et al*., 2004). A maioria dos indivíduos que se encontram neste período apresentam um desejo incontrolável pelo uso da droga, conhecido como fissura (DSM-V, 2014). Verifica-se na literatura que a maioria da população de dependentes químicos não tem acesso ao tratamento adequado, conforme apontado por Carliní e colaboradores (2001).

Diversos estudos apontam a relação entre os sistemas dopaminérgico e colinérgico na farmacodependência (WILLIAMS & ADINOFF, 2008; ADINOFF *et al.,* 2010). É conhecido também que os receptores D_1R e M_4 mAChRs exercem efeitos opostos diretamente na síntese de cAMP, enquanto os receptores M_1 mAChRs se opõem aos efeitos dos receptores D_2R (ONALI & OLIANAS, 2002). Assim, é importante compreender as alterações envolvidas no sistema colinérgico muscarínico decorrentes do uso prolongado de cocaína. Mais ainda, como esse sistema pode ser afetado durante o período abstinência, uma vez que as mudanças desencadeadas pelo uso continuo da droga podem ser duradouras.

6.1. Alterações comportamentais

Em modelos animais, a exposição a um ambiente novo pode induzir aumento na exploração do ambiente e um comportamento ansioso, impactando nos resultados

da atividade locomotora (ALLAN *et al.,* 2007). Para evitar a influência dos efeitos exploratórios durantes a avaliação em campo aberto, no presente estudo, os animais foram diariamente habituados imediatamente antes do início dos tratamentos. Assim, certificou-se que as alterações na atividade locomotora observada nos animais que recebem cocaína foram consequentes da presença da droga.

Em nosso protocolo experimental, os camundongos foram submetidos aos modelos comportamentais que são normalmente utilizados para avaliar a atividade locomotora total e exploratória (campo aberto) e ansiedade (labirinto em cruz elevado). Além da atividade locomotora total, a organização espacial da locomoção é um parâmetro de grande importância no estudo dos efeitos de psicoestimulantes. Já está bem estabelecido o fato de roedores mostrarem maior locomoção na área periférica, próxima às paredes do campo-aberto, efeito denominado tigmotaxia, evitando a área central (WANG *et al*., 2003). Os resultados do presente estudo corroboram estes resultados, uma vez que maior atividade locomotora foi observada na área periférica tanto no tratamento, agudo de cocaína em *binge* quanto no escalonamento de dose. O labirinto em cruz elevado consiste em um procedimento rápido e simples para detectar ambos os efeitos ansiolítico e ansiogênico de drogas em roedores. A teoria é baseada na aversão natural dos mesmos pelos braços abertos em comparação aos fechados (PELLOW *et al.,* 1985).

Conforme o esperado, os camundongos dos tratamentos agudo e crônico mostraram maior atividade locomotora, em comparação aos animais tratados com solução salina. No tratamento agudo de cocaína em binge mostrou maior atividade locomotora na área periférica com respeito ao central, evidenciando-se assim, um comportamento asioso dos camundongos tratados com cocaína. Tem sido propuesto o emprego deste teste de campo aberto na avaliação da ansiedade, onde a maior atividade locomotora na área periférica pode ser considerada um parâmetro indicativo relacionados à ansiedade (CHOLERIS *et al*., 2001; LISTER *et al*., 1990; RAMOS & MORMEDE, 1998). Tal como é mostrado em nossos resultados, onde maior atividade locomotora na área periférica pode ser um indicativo da presencia da ansiedade. Entretanto, esta propuesta é criticada por alguns autores, já que estas avaliaçãoes podem ser influenciadas além da propia ansiedade, como a atividade locomotora, exploração e a novidade que pode generar extrema exploração na área periférica (FILE, 2001; SCHMITT & HIEMKE, 1998).

Com relação ao paradigma de escalonamento de dose de cocaína em *binge*, a sensibilização locomotora foi evidenciada no segundo dia de tratamento por aumento da magnitude, pela distância percorrida nos primeiros 5 minutos após cada administração e também pelo aumento de duração do efeito locomotor, o qual foi evidenciado no dia 13. Além de isso, em nossos resultados também mostrou que a sensibilização comportamental permaceu até o último dia de tratamento, evidenciando-se maior ativadade locomotora no dia 14 com respeito ao primer dia de tratamento. Estes resultados estão de acordo com Bailey *et al.* (2008), os quais observaram sensibilização locomotora no dia 3 em camundongos C57BL/6J enquanto outros autores mostram a presença da sensibilização locomotora somente no dia 13 (ELLEM *et al.,* 1994). A demora para o aparecimento deste efeito poderia ser explicado pelo fato de que os animais foram testados em suas gaiolas por 14 dias em vez de serem removidos para um campo aberto para monitorar sua atividade locomotora (ELLEM *et al.,* 1994). Por outro lado, alguns autores não evidenciaram sensibilização comportamental decorrente da administração de cocaína. Assim, camundongos C57BL/6J tratados também com escalonamento de dose, não apresentaram sensibilização comportamental (YONG ZHANG *et al*., 2013). Em outro estudo com a mesma linhagem, porém com dose constante de cocaína, os animais também não desenvolvem tolerância ou sensibilização de comportamentos estereotipados durante os 14 dias de administração (SCHLUSSMAN *et al*., 2005). As diferenças destes resultados comportamentais podem estar relacionadas nas diferenças metodológicas referente à habituação, monitoramento da atividade locomotora e dose. Schlussman *et al.* (2005), observaram sensibilização comportamental após administraram de 3x15mg/kg de cocaína por 14 dias em ratos F344, mas não a expressão de comportamentos estereotipados.

Os resultados do paradigma de escalonamento de dose de cocaína em *binge* apresentaram maior duração dos efeitos da cocaína a partir do dia 5, já que a atividade locomotora permaneceu elevada entre as injeções subsequentes da droga, ou seja, os animais não retornaram ao nível basal de atividade. Esse fenômeno pode ser consequência da sensibilização comportamental, uma vez que não acontece com os animais do tratamento agudo.

Acredita-se que os efeitos estimulantes e recompensadores da cocaína dependem em grande parte do tônus dopaminérgico mesolímbico enquanto a elevação do tônus dopaminérgico no caudado putâmen está envolvida com o desenvolvimento dos comportamentos estereotipados (SCHLUSSMAN *et al*., 2005).

De acordo com Robinson e Berridge (2001; 2008), a sensibilização comportamental reflete alterações no SNC, resultantes de adaptações neuroquímicas e moleculares do sistema dopaminérgico, que aumentariam a vulnerabilidade ao desenvolvimento da dependência e favoreceriam o aumento da motivação para o uso de drogas. Assim, nosso resultado sugere que a exposição à cocaína no modelo de escalonamento de dose de cocaína em *binge* pode gerar vulnerabilidade ao desenvolvimento da dependência.

O desenvolvimento da sensibilização comportamental pode ser dividido em duas fases: 1) iniciação, comumente ligada à VTA, 2) expressão, associada ao NAc (KALIVAS & STEWART, 1991; PIERCE & KALIVAS, 1997; VANDERSCHUREN & KALIVAS, 2000; PASTOR *et al*., 2008; PHILLIPS *et al.,* 2010; STEKETEE & KALIVAS, 2011). Entretanto, há estudos mostrando a atuação do mCPF no desenvolvimento da sensibilização comportamental (CADOR *et al*., 1999; LI *et al*., 1999; CADOR & KALIVAS, 2011).

Estudos comportamentais demostraram uma correlação significativa da atividade locomotora e os receptores dopaminérgicos D_1 e D_2 no estriado. Assim, antagonistas seletivos do D_1R bloqueiam a sensibilização comportamental pela cocaína, enquanto antagonistas dos D_2R bloqueiam o desenvolvimento mas não a expressão da sensibilização comportamental induzida pela cocaína (BURGER & MARTIN-IVERSON, 1994; SCHLUSSMAN *et al*., 2005; SELF *et al*., 1996; TSUKADA *et al*., 1996; UNTERWALD *et al*., 1994).

Durante os períodos de abstinência, a exposição à cocaína ou fatores associados, como a lembrança ou a experiência do usuário, assim como o estresse ou a ansiedade, podem desencadear o desejo e a recaída. A ansiedade é um sintoma proeminente do estado afetivo negativo experimentado pelo indivíduo durante a abstinência à cocaína (CRAIGE, 2014). A retirada da administração crônica de cocaína e outras drogas como anfetaminas e morfina, resultou em redução da concentração de dopamina extracelular no estriado ventral de ratos, sendo esta uma característica geral da abstinência de drogas, conforme sugerido por alguns autores

Rossetti *et al.,* 1992; Weiss & Porrino, 2002; Yong Zhang *et al*., 2003. Foi sugerida uma associação entre a diminuição de dopamina nos estados disfóricos de longa duração aos desejos após da retirada de cocaína (YONG ZHANG *et al*., 2003). É possível, ainda, que estas reduções de dopamina, principalmente no NAc, estejam relacionadas ao comportamento de busca e consumo da droga (CALAPIRI *et al*., 2014; DACKIS & O'BRIEN, 2001). Um estudo realizado com voltametria mostrou o retorno das concentrações de dopamina após 3 dias de abstinência, sugerindo que as mudanças nas concentrações basais de dopamina podem-se normalizar enquanto a tolerância comportamental e neuroquímica permanece (CALAPIRI *et al*., 2014). Assim, estudos pré-clínicos têm contribuído para o estudo de ansiedade durante a abstinência à cocaína.

O labirinto em cruz elevado foi utilizado para avaliar o efeito causado pela abstinência à cocaína. Os resultados obtidos demonstram que após 14 dias de abstinência não foi detectada ansiedade nos animais de ambos os tratamentos. A literatura relata que, neste teste, compostos ansiolíticos aumentam seletivamente o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos, enquanto compostos ansiogênicos reduzem seletivamente estes parâmetros (BACELLER, 1999).

Nossos resultados podem ser corroborados por Cleck *et al*. (2008) que observaram que a administração de cocaína em padrão *binge* (3 x 15mg/kg) por 14 dias e com período de abstinência de 24horas ou 14 dias não alterou o tempo gasto nos braços abertos em camundongos C57BL/6 quando comparado aos controles. Ainda, após 14 dias de abstinência, os camundongos expostos à cocaína apresentaram um tempo maior nos braços abertos, o que pode indicar uma diminuição da ansiedade (CLECK *et al.,* 2008). Outros estudos não encontraram alteração significativa entre o tratamento crônico com cocaína (14 dias) e o grupo controle no labirinto em cruz elevado 30 minutos após a administração da última dose. Porém, 48 horas após a última administração, observou-se que a porcentagem de tempo, bem como o número de entradas nos braços abertos foi significativamente menor em relação à salina, ou seja, a retirada de cocaína causou um comportamento de ansiedade (SARNYAI *et al*., 1995; BASSO *et al.,* 1999; PERRINE *et al.,* 2008). Por outro lado, Erhardt *et al.* (2006) relataram que o uso agudo de cocaína nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg causou redução no número de entradas e no tempo de permanência

nos braços fechados e aumento no tempo de permanência nos braços abertos, sugestivo de um efeito ansiolítico.

Portanto, pode-se concluir que a cocaína pode causar efeitos diferentes no padrão de ansiedade dependendo da dose administrada, duração do tratamento e do período de abstinência. Assim, os estudos são controversos não somente com relação a ocorrência de efeitos ansiogênicos ou ansiolíticos, mas também em questões relacionadas ao número de dias de abstinência e sua duração, após os quais começam a aparecer os sintomas.

6.2. Alterações nos receptores dopaminérgicos

Além das manifestações comportamentais, a cocaína também promove alterações neuroquímicas. Muitos estudos indicam que a atividade neuronal no sistema dopaminérgico mesocorticolímbico está relacionada ao efeito de recompensa da cocaína e contribui para a recaída (PIERCE *et al.,* 2006; KALIVAS *et al.,* 2003). Grande parte das propriedades reforçadoras da cocaína está na ativação deste sistema, em especial nas regiões NAc e VTA, as quais parecem modular o estímulo à recompensa induzido por estimulantes, como cocaína e anfetamina (GRAEFF *et al*., 2000).

As concentrações aumentadas de dopamina no NAc, induzidas pela cocaína, exercem um papel importante na regulação da sua autoadministração, tanto em animais quanto em seres humanos (AHMED *et al*., 2003). A dopamina é um neurotransmissor que desempenha um importante papel nos processos de aprendizado, memória, recompensa, medo e atenção, controle de impulso, tomada de decisão, aprendizagem motora e regulação do consumo de alimentos (DI CHIARA & BASSAREO, 2007; GRANON *et al.,* 2000; IVERSEN & IVERSEN, 2007; KOOB & VOLKOW, 2010; RONDOU *et al*., 2010). Os D_1R e D_2R parecem ser críticos nos mecanismos de aprendizagem e memória de trabalho, o qual pode ser mediada principalmente pelo CPF (GOLDMAN-RAKIC *et al*.,2004; XU *et al.,* 2009).

Alguns autores afirmam que os D_1R e D_2R estão envolvidos na locomoção e nos comportamentos estereotipados. A locomoção depende da ativação dos D_1R (STARR *et al.,* 1989), enquanto que os comportamentos estereotipados tais como “lamber” e “morder” dependem da ativação do D_2R, resultado observado utilizando antagonistas dos D_1R e D_2R (USHIJIMA *et al*., 1995). Além disso, tem sido relatado

que a redução da atividade locomotora é causada pela diminuição da dopamina especialmente no corpo estriado (HSHIEH *et al.,* 1994).

Os D_2R também possuem importância nos efeitos de reforço da cocaína e nos comportamentos motores envolvidos na dependência uma vez que agonistas D_2R induzem procura pela droga (LESHNER, 1996). No entanto, os dados da literatura a respeito da participação deste receptor na neurobiologia da dependência à cocaína são controversos. Existem estudos sugerindo que o comportamento de busca pela droga se deve a um aumento na quantidade dos D_2R no corpo estriado (KOOB, 1997). Já estudos pré-clínicos e clínicos mostram que a diminuição dos D_2R no estriado está associada à impulsividade, sendo que, em roedores, a impulsividade prediz o consumo compulsivo da cocaína (VOLKOW *et al*., 2012).

Alguns trabalhos mostram que a administração crônica de cocaína pode aumentar, reduzir ou não causar nenhum efeito na densidade dos receptores dopaminérgicos (PIERSON, 2005). No presente estudo, houve alteração na densidade dos D_1R e D_2R no hipocampo nos tratamentos agudo e crônico. O hipocampo é uma região do cérebro conhecida por participar da memória declarativa e da memória espacial (LIPTON *et al*., 2008). Notavelmente, o comportamento de busca pela cocaína induzida pelo contexto pode ser um resultado de interação recíproca entre as regiões do hipocampo e a VTA (CHAO & NESTLER, 2004; FELTENSTEIN & SEE, 2008). A plasticidade na via de sinalização mediada por D_1R no hipocampo parece estar envolvida nos mecanismos de aprendizagem e a memória relacionadas à busca pela droga e pode contribuir para o desenvolvimento de comportamentos compulsivos de procura de cocaína. Consistente com isso, níveis aumentados de RNAm de D_1R no giro denteado do hipocampo dorsal estão associados ao desenvolvimento de preferência condicionada por lugar (STRAMIELLO & WAGNER, 2010; TANAKA *et al*., 2011; XIE *et al.,* 2014), enquanto o antagonista de D_1R no hipocampo dorsal, inibe o comportamento de busca de cocaína, induzido pelo contexto de droga (XIE *et al.,* 2014). A exposição à cocaína pode, ainda, aumentar a potenciação de longo prazo na região CA1, o que pode indicar adaptações neurais como resultado da administração de cocaína, e essa ação pode ser evitada por um antagonista do D_2R (THOMPSON *et al*., 2005).

Em relação ao estriado, nossos resultados mostraram que após 14 dias de abstinência houve aumento de D_1R do tratamento agudo e aumento e diminuição de

D_1R e D_2R, respectivamente, após o tratamento crônico. Há estudos sugerindo que durante a abstinência à cocaína ocorre diminuição de D_1R no NAc (HENRY & WHITE, 1991; KLEVEN *et al.,* 1990; LAURIER *et al*., 1994; NEISEWANDER *et al.,* 1994). Entretanto outros estudos demonstram que, no período de abstinência à cocaína, houve aumento D_1R e DAT mas diminuição de D_2R no estriado (LETCHWORTH *et al,* 2001; MOORE et al., 1998; NADER *et al*, 2002).

Tsukada e colaboradores (1996), por meio autorradiografia, observaram os efeitos da administração crônica de cocaína num padrão *binge* nos receptores dopaminérgicos no NAc e no caudado-putâmen. Foi relatado aumento transitório de D_2R no NAc e no caudado putâmen após 7 dias de tratamento, e retorno aos níveis basais após 7 dias de abstinência. Um estudo de autoadministração de cocaína conduzido em macacos Rhesus, seguido por 30 e 90 dias de abstinência, produziu alterações importantes na regulação do sistema dopaminérgico no estriado, como aumento dos D_1R, as quais persistem durante as fases iniciais (primeiros 30 dias de abstinência). Em contraste, não houve alterações após 90 dias de abstinência nos receptores D_1R e D_2R (BEVERIDGE *et al.,* 2009). A autoadministração de cocaína por 10 dias (120 infusões ~60mg/kg/dia) em ratos aumentou D_1R no *shell* do NAc, no primeiro dia de abstinência, tendo sido normalizado no 45º dia. Em ambos os períodos de ausência da droga houve diminuição de D_2R, na mesma estrutura encefálica. Estas alterações poderiam contribuir com comportamentos relacionados à busca da droga associada a uma pista (CONRAD *et al.,* 2010).

Já no CPF observamos diminuição dos D_2R após abstinência do tratamento agudo de cocaína em *binge*. Estudo realizado em ratos com administração diária de cocaína (10mg/kg ou 20mg/kg i.p) durante 15 dias mostrou aumento de D_1R no CPF após 20 minutos da administração. Mias ainda, houve redução deste receptor 2 semanas após a última administração de cocaína. Em relação a D_2R, houve apenas diminuição após 20 minutos de administração da droga (KLEVEN *et al*., 1990). Estudos de PET mostraram que indivíduos em abstinência apresentam reduções em D_2R no estriado, e estas reduções se encontram correlacionadas com uma diminuição no metabolismo da glicose no OFC, CCA e DLPFC (VOLKOW *et al*, 2010a). Segundo Volkow e colaboradores (1991) indivíduos dependentes de cocaína possuem metabolismo cerebral no CPF elevado na primeira semana de abstinência, contudo, após este período e até 6 semanas sem uso da droga as taxas metabólicas cerebrais

diminuem e persistem após 3 meses de abstinência. Esses dados sugerem que as anormalidades neurofuncionais persistem mesmo após períodos prolongados de abstinência (HANLON *et al.,* 2013; VOLKOW *et al.,* 1991). As reduções de D_2R indicam uma hipofunção do sistema dopaminérgico, principalmente no CPF, que podem estar relacionadas com a perda de controle dos usuários no consumo da droga.

6.3. Alterações no sistema colinérgico muscarínico

6.3.1. Moléculas colinérgicas

A ACh é um neurotransmissor envolvido em diferentes aspectos cognitivos fundamentais para a neurobiologia da dependência, incluindo aprendizado, memória, atenção e função executiva (WILLIAMS & ADINOFF, 2008). Aumentos nas concentrações de ACh no estriado estão associadas aos comportamentos de procura pela droga. Portanto, este neurotransmissor seria um mediador para o reforço, a saciedade, a aquisição de associações condicionadas à fissura e sensibilização pela droga (WILLIAMS & ADINOFF, 2008; ADINOFF *et al.,* 2010). Evidências indiretas também sugerem a importância da ACh nos processos de atenção e tomada de decisões, os quais podem estar comprometidos em indivíduos dependentes à cocaína (ADINOFF *et al.,* 2010).

A regulação da concentração de ACh se da pelas moléculas ChAT (controle da síntese), VAChT (transporte para o interior das vesículas sinápticas) e AChE (hidrólise na fenda sináptica). Em nossos resultados evidenciou-se aumento da ChAT após 14 dias de abstinência em ambos tratamentos realizados com cocaína no estriado, o que sugere um aumento da síntese de ACh, refletindo em aumento na comunicação entre neurônios colinérgicos e tecidos alvos. Entretanto, no CPF após a abstinência do escalonamento de dose de cocaína em *binge*, foi encontrada uma redução desta enzima, o que sugere uma possível diminuição da atividade colinérgica.

Em um estudo realizado em cérebros necropsiados de usuários de drogas estimulantes e heroína não foram encontradas alterações na atividade da ChAT, com exceção dos usuários de anfetaminas expostos a doses muitos altas da droga, nos quais a atividade estava diminuída (KISH *et al*., 1999). Em outro estudo *post mortem*, não foram observadas alterações da atividade da ChAT no tecido cerebral de usuários de anfetaminas, exceto em dois indivíduos, cuja atividade estava diminuída (SIEGAL

et al., 2004; KISH *et al*., 1999). Redução da atividade da ChAT no NAc foi descrita em estudos em roedores, após 3 semanas de abstinência de tratamento com cocaína (aproximadamente 90 mg/kg/dia), indicando uma regulação negativa da atividade colinérgica nesta estrutura (SMITH *et al*., 2004a, WILSON *et al*., 1994).

No hipocampo, a abstinência dos tratamentos agudo e de escalonamento de dose de cocaína em *binge* mostrou aumento na atividade de VAChT, enquanto que, no estriado, revelou aumento da atividade desta enzima apenas na abstinência do tratamento crônico. Em um estudo realizado em amostras *post-mortem* de núcleo caudado de usuários dependentes de anfetaminas, evidenciou-se um aumento da atividade de VAChT, sugerindo que os seres humanos expostos a drogas de abuso podem ter uma liberação aumentada de ACh (BICKERDIKE & ABERCROMBIE, 1997; CRITTENDEN *et al*., 2014; KUCZENSKI & SEGAL, 2001). Contudo, Siegal e colaboradores (2004) não evidenciaram alterações na atividade da VAChT em usuários de cocaína e heroína.

Em relação à AChE, por sua vez, nossos resultados não mostraram alterações na atividade no CPF, no estriado e hipocampo. Mas é sabido que inibidores desta enzima são utilizados para tratar diversos tipos de doenças, como a Doença de Alzheimer, miastenia grave e a farmacodependência (CRITTENDEN *et al*., 2014; NAIR & HUNTER, 2004). A administração de donepezila, um inibidor da AChE, 20 minutos antes da injeção intraperitoneal de cocaína em camundongos bloqueou completamente a hiperlocomoção induzida pela droga (HIKIDA *et al*., 2003). Camundongos tratados repetidamente com cocaína durante 5 dias na ausência de donepezila desenvolveram sensibilização comportamental. Porém, quando pré-tratados com este inibidor da AChE no sexto dia, a sensibilização foi bloqueada (HIKIDA *et al.,* 2003). Estudo realizado em usuários voluntários de anfetamina, a administração de rivastigmina, também inibidor de AChE, reduziu a fissura induzida pela anfetamina, diminuindo a administração da droga (GARZA *et al*., 2012). Mas ainda, outro inibidor de AChE, fisostigmina, diminuiu a auto-administração de cocaína em primatas não humanos (ADINOFF *et al.,* 2010).

6.3.2. Alterações nos mAChRs após os tratamentos agudo e crônico

Existem evidências de que os mAChRs podem modular a função dopaminérgica nas vias cerebrais mediadoras dos efeitos relacionados ao consumo

de cocaína (HIGUERA-MATAS *et al*., 2011). Apesar, dos principais efeitos desta droga estarem diretamente associados à inibição do DAT, ela também possui efeito antagonista competitivo em M_1 e M_2 mAChRs (ADINOFF *et al*., 2010, SHARKEY *et al*., 1988). Assim, esses receptores podem sofrer adaptação neuronal durante a auto-administração e a retirada de cocaína (THOMSEN *et al*., 2010; HIGUERA-MATAS *et al*., 2011). De fato, atenuação dos efeitos reforçadores e estímulos discriminativos da cocaína foram relatados mediante a estimulação de M_1 mAChRs. Ao contrário, infusões de agonistas M_2 mAChRs na VTA reduziram a recompensa por meio da autoadministração de cocaína (SHABANI *et al.,* 2010; HIGUERA-MATAS *et al*., 2011). Os receptores M_1 e M_4 mAChRs estão envolvidos na modulação das respostas dopaminérgicas centrais. Estudos em camundongos *knockout* para M_4 mAChRs mostraram aumento na atividade locomotora basal (GOMEZA *et al.,* 1999b). De fato, a ativação de M_4 mAChRs, por estarem ligados à proteína Gi, diminuem a atividade de neurônios dopaminérgicos na VTA, reduzindo a libertação de dopamina no NAc (SOFUOGLU & MOONEY *et al*., 2009). Os receptores M_5 mAChRs, por sua vez, facilitam a liberação de dopamina no corpo estriado e modulam os processos de recompensa (BASILE *et al.,* 2002; LANGMEAD *et al*., 2008). Estes receptores encontram-se expressos nos neurônios dopaminérgicos da VTA e da SN, onde podem modular a atividade neuronal e mediar as propriedades reforçadoras da droga (YASUDA *et al.,* 1993). A autoadministração de cocaína realizada em camundongos com deleção seletiva dos receptores M_5 mAChRs demonstrou a importância deste subtipo de receptor nos efeitos reforçadores da cocaína, incluindo a abstinência (BASILE *et al*.,2002; FINK-JENSEN *et al*., 2003). Mias ainda, existem evidências de que M_5 mAChRs podem modular os efeitos reforçadores de diferentes drogas de abuso, incluindo no período da abstinência (SCHMIDT *et al.,* 2010). Estudos avaliando os efeitos recompensadores da cocaína mostraram atenuação da resposta ao condicionamento de preferência de lugar em ratos deficientes de M_5 mAChRs na VTA (FINK-JENSEN *et al*., 2003; THOMSEN *et al.,* 2005; YEOMANS *et al.,* 2001).

O CPF é responsável pela tomada de decisão pelo indivíduo frente a uma determinada situação que pode ser de risco ou de benefício. O uso crônico de drogas afeta esta estrutura, tornando o indivíduo vulnerável, pois é incapaz de discernir as consequências dos seus atos (GOMES, 2017; LEHRMANN *et al*., 2003). Em nossos resultados no CPF foi observada diminuição de M_1 mAChRs e aumento de M_2 e M_4

mAChRs após 14 dias de abstinência do tratamento agudo de cocaína em *binge*, enquanto que no tratamento crônico houve diminuição dos M_1 e M_5 mAChR. Uma possível hipótese para explicar a diminuição de M_1 mAChRs (estimulatório) e aumento de M_2 e M_4 mAChRs (inibitórios) observada no CPF no tratamento agudo de cocaína em *binge*, seria que estas adaptações ocorrem em função da diminuição dos D_2R, aumentando a liberação de ACh com consequente modulação dos receptores muscarínicos. Sabe-se que a anfetamina e cocaína aumentam a liberação de ACh no CPF (ICHIKAWA *et al*., 2002; ZMAROWSKI *et al*., 2007), o qual acompanha o desenvolvimento de sensibilização psicomotora às anfetaminas, sugerindo a participação do sistema colinérgico pré-frontal nas adaptações neuronais que levam à dependência de estimulantes (SOFUOGLU & MOONEY *et al*., 2009). Entretanto, pouco se sabe a respeito da contribuição desses receptores na sensibilização comportamental. De fato, a aplicação de antagonistas muscarínicos não seletivos, como a escopolamina, no CPF aumentou a resposta à autoadministração intravenosa de cocaína em ratos (IKEMOTO *et al*., 2000; SOFUOGLU & MOONEY *et al.,* 2009).

O hipocampo é uma região conhecida por participar na memória declarativa e da memória espacial e compreende-se de duas partes distintas, o hipocampo dorsal e o ventral. A parte dorsal recebe uma via dopaminérgica da SN e desempenha um papel no comportamento exploratório e na consolidação da memória, enquanto a parte ventral recebe, principalmente, sinalização dopaminérgica da VTA (CHAO & NESTLER, 2004). Assim, o hipocampo ventral envolve discretas associações de estímulo-recompensa, enquanto o hipocampo dorsal medeia as associações estímulo-estímulo que podem ser particularmente importantes para o aprendizado contextual (FELTENSTEIN & SEE, 2008).

Estudos demonstraram um papel significativo para o hipocampo dorsal no restabelecimento contextual do comportamento de busca por drogas. As descobertas sugerem que o hipocampo dorsal é importante tanto para a aquisição quanto para a evocação, mas não para a consolidação, do contexto-associações de cocaína (MEYERS *et al*, 2006; ADINOFF *et al*., 2010). Crombag *et al.* (2008) postularam uma relação serial entre o hipocampo dorsal, amígdala basolateral, estriado dorsal e CPF dorsal medial na recaída às drogas induzida pelo contexto. Assim, os processos de aprendizagem contextual são mediados, pelo menos em parte, por receptores colinérgicos no hipocampo, região que possui uma das maiores concentrações de

ACh no SNC. Os receptores de ACh no hipocampo são principalmente $M_1 \gg M_2 > M_3 = M_4 > M_5$ mAChRs em relação a ordem de abundância (CARDOSO *et al*., 210; GARCIA *et al*., 2015).

Nossos resultados no hipocampo mostraram diminuição de M_1 mAChRs e aumento de M_2 mAChRs no tratamento agudo, enquanto no tratamento crônico ocorreu diminuição de M_1 mAChRs após 14 dias de abstinência. Estudos demonstraram que na exposição crônica à cocaína em camundongos, após 73 dias de abstinência, apresentaram maior atividade basal de *c-fos* no hipocampo, localizado especificamente em giro denteado. Isso mostra um processo de neuroplasticidade persistente, aumentando o tônus excitatório basal desta região durante o período de abstinência (GUEVARA-MIRANDA *et al.,* 2017). Assim, a exposição e abstinência à cocaína pode modular a atividade e neuroplasticidade hipocampal, já que esta estrutura recebe projeções dopaminérgicas, principalmente da VTA (CASTILLA-ORTEGA *et al*., 2016; GUEVARA-MIRANDA *et al.,* 2017). Sabe-se que M_1 e M_2 mAChRs estão expressos no hipocampo, tanto pré quanto pos-sinapticamente, bem como na maioria de outras regiões cerebrais relacionadas aos em processos de aprendizagem e memória (SEEGER *et al*, 2004). Antagonistas inespecíficos dos mAChRs, como a escopolamina, prejudicam a codificação de novas informações (SEEGER *et al*, 2004). As toxinas muscarínicas (MTs) do veneno da serpente *Dendroaspis*, especialmente a fração MT2, atua como agonista seletivo para M_1 mAChRs. Quando administrada no hipocampo dorsal em ratos, mostrou melhora na consolidação da memória de tarefa, enquanto o antagonista de M_1 mAChRs, a pirenzepina, teve efeito amnéstico (Ferreira *et al*., 2003). Por outro lado, estudos em camundongos *knockout* para M_2 mAChRs no hipocampo mostraram uma diminuição na potenciação de longa duração (SEEGER *et al*, 2004).

O estriado é a principal região dos gânglios da base, que recebe aporte sináptico de aferências corticais e subcorticais, como a via cortical motora e as projeções dopaminérgicas da SN e da ATV. O estriado dorsal, composto principalmente pelos núcleos caudado e putâmen, recebe projeções dopaminérgicas da SN, enquanto o estriado ventral, composto principalmente pelo NAc, recebe projeções dopaminérgicas da VTA (FELTENSTEIN & SEE, 2008). Embora os neurônios colinérgicos compreendam apenas 2% da população neuronal total do estriado, estas células desempenham um papel proeminente na modulação da

atividade dos neurônios espinhosos médios (MSNs) GABAérgicos, que compreendem 90-95% da população desta região cerebral (ZHOU *et al*., 2002). As fibras dopaminérgicas da VTA fazem sinapses diretamente nos interneurônios colinérgicos e também em MSNs, sendo que a dopamina modula a atividade desses neurônios por meio de ações sinápticas excitatórias e inibitórias (NICOLA *et al.,* 2000). Assim, a diminuição da liberação de ACh por interneurônios colinérgicos tem sido demonstrada pela ativação de D_2R, inibitórios, enquanto que o aumento da liberação deste neurotransmissor ocorre por meio do bloqueio dos D_1R, excitatórios (Smith *et al.,* 2004a; Zhou *et al*., 2002). Vale ressaltar que oestriado contém predominantemente os subtipos M_1, M_4 e M_2 mAChRs, sendo estes dois últimos autorreceptores inibitórios pré-sinápticos (MARK *et al*., 2006; SMITH *et al*., 2004a; THOMSEN *et al*., 2012). Estudos de microdiálise *in vivo* mostraram que camundongos deficientes para receptores M_1 têm concentrações significativamente elevadas de dopamina extracelular no estriado. De acordo com este resultado é possível que este receptor module a liberação de dopamina no estriado (GERBER *et al.,* 2001).

Nossos resultados no estriado mostraram aumento de M_1 e M_2 mAChRs no tratamento agudo de cocaína em *binge,* enquanto no tratamento crônico houve uma diminuição destes receptores após 14 dias de abstinência. Macêdo *et al.* (2004) relataram que o tratamento subcrônico com cocaína (20 e 30 mg/kg/dia, i.p., 7 dias) reduziu a expressão dos receptores colinérgicos muscarínicos M_1 e M_2- *like* no estriado a curto e a longo prazo. Interessante observar que este efeito persiste até 30 dias após a descontinuação da droga, de forma semelhante ao observado em nosso estudo, já que relatamos redução de ambos receptores no tratamento crônico. Por outo lado, Sousa *et al*. (1999) mostraram aumento dos receptores M_1 e M_2- *like* em doses de 5 e 10mg/kg após 24 horas de abstinência. A controvérsia destes resultados pode ser devido à dose utilizada e ao curto período de abstinência. Thomsem *et al*. (2012) descreveram que os agonistas seletivos M_1 e agonistas M_1/M_4 poderiam atenuar os efeitos estimulantes da cocaína e, essencialmente, suprimir o comportamento de auto-administração da droga por camundongos. Estudos em ratos, onde se realizou a destruição imunotóxica de neurônios colinérgicos no NAc foi observado aumento da auto-administração de cocaína. Já a infusão no NAc de oxotremorina, um agonista não-seletivo muscarínico, reduziu a auto-administração de cocaína (MARK *et al*., 2006). Carrigan & Dykstra (2007) mostraram redução da

preferência condicionada por lugar à cocaína e morfina em camundongos *knockout* para M_1 e em camundongos C57BL/6 após a administração de antagonistas M_1. Isso pode ser resultante de alterações nos mecanismos de recompensa ou, prejuízo no aprendizado associativo ao contexto.

Assim, nosso estudo revelou que após 14 dias de abstinência tanto no tratamento agudo quanto o crônico realizado em escalonamento de dose de cocaína num padrão *binge*, foi observada neuroplasticidade nos sistemas dopaminérgico e colinérgico. A persistência destas alterações durante a abstinência pode ser crucial ou decisiva para a recuperação do indivíduo. O sistema dopaminérgico participa nos mecanismos de recompensa de drogas de abuso e a alteração deste sistema pode levar a adaptações do sistema colinérgico, já que estes sistemas interagem principalmente no estriado, onde acontece a regulação de ACh mediante os receptores dopaminérgicos. Estas modificações de ACh também podem alterar os receptores e as moléculas colinérgicas a fim de regular este neurotransmissor.

7. Conclusões

7. Conclusões

- Os animais submetidos ao tratamento crônico com escalonamento de dose de cocaína em *binge* desenvolvem sensibilização comportamental no segundo dia de tratamento;
- Os animais tratados cronicamente mantiveram atividade locomotora acima do basal entre as doses do escalonamento, efeito não observado no tratamento agudo em *binge*.
- Não foi observado alteração na ansiedade após 14 dias de abstinência tanto nos animais tratados agudamente quando cronicamente;
- As alterações encontradas tanto nas moléculas quanto nos receptores colinérgicos muscarínicos no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado indicam envolvimento de processos de neuroplasticidade nos dois tratamentos, mesmo após 14 dias de abstinência;
- As alterações observadas de D_1R e D_2R, nos tratamentos agudo e crônico sugerem um efeito compensatório na abstinência decorrente da administração de cocaína.

8. Referências bibliográficas

8. Referências bibliográficas

ABRAMS, P. *et al.* Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder: their distribution and function in body. **British Journal of Pharmacology**, v.148, p. 565–578, 2006.

ADINOFF, B. *et al.* Altered Neural Cholinergic Receptor Systems in Cocaine-Addicted Subjects. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, p. 1485–1499, 2010.

AHMED, S.; LIN, D; KOOB, G.F.; PARSONS, L.H. Escalation of cocaine self-administration does not depend on altered cocaine-induced nucleus accumbens dopamine levels. **Journal of Neurochemistry**, v.86, p.102–113, 2003.

AHMADI, J.; KAMPMAN, K.; DACKIS, C. Outcome Predictors in Cocaine Dependence Treatment Trials. **Am. J. Addiction**, v. 15, p. 434-439, 2006.

ANATH, J.; BURGOYNE, K. S.; GADASALLI, R.; AQUINO, S. How do the atypical antipsychotics work. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v. 26, p. 385-394, 2001.

APICELLA, P. Leading tonically active neurons of the striatum from reward detection to contexto recognition. **Trends Neurosci**, v. 30, p. 299–306, 2007.

BAILEY, A.; GIANOTTI, R.; HO, A.; KREEK, M. J. Downregulation of kappa-opioid receptors in basolateral amygdala and septum of rats withdrawn for 14 days from an escalating dose "binge" cocaine administration paradigm. **Synapse**, v. 61, p. 820-826, 2007.

BAILEY, A. *et al.* Decrease of D2 receptor binding but increase in D2-stimulated G-protein activation, dopamine transporter binding and behavioural sensitization in brains of mice treated with a chronic escalating dose 'binge' cocaine administration paradigm. **European Journal of Neuroscience**, v. 28, p. 759-770, 2008.

BASILE, A. S. *et al.* Deletion of the M5 muscarinic acetylcholine receptor attenuates morphine reinforcement and withdrawal but not morphine analgesia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, p. 11452–11457, 2002.

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, p. 248-254, 1976.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. Neuroscience: exploring the brain. 3. ed. **United Stated of America**, 2006

BEN-CHAIM, Y. *et al*. The M2 muscarinic G-protein-coupled receptor is voltage-sensitive. **Journal Biological Chemistry**, v. 278, p. 22482–22491. 2003.

BENOWITZ, N. L. Clinical pharmacology and toxicology of cocaine**. Pharamacology and Toxicology**, v. 72, p. 3-12,1993.

BELLIER, J. P.; KIMURA, H. Peripheral type of choline acetyltransferase: biological and evolutionary implications for novel mechanisms in cholinergic system. **J. Chem. Neuroanat**, v. 42, p. 225-235, 2011.

BERTORELLI, R.; CONSOLO, S. D1 and D2 dopaminergic regulation of acetylcholine release from striata of freely moving rats. **J. Neurochem**, v. 54(6), p. 2145–8, 1990.

BERLANGA, M. L. *et al.* Cholinergic interneurons of the nucleus accumbens and dorsal striatum are activated by the self-administration of cocaine. **Neuroscience**, v. 120(4), p. 1149–56, 2003.

BERLANGA, M. L.; SIMPSON, T. K.; ALCANTARA, A. A. Dopamine D5 receptor localization on cholinergic neurons of the rat forebrain and diencephalon: a potential neuroanatomical substrate involved in mediating dopaminergic influences on acetylcholine release. **J. Comp. Neurol**, v. 492, p. 34–49, 2005.

BERRIDGE, K.C.; ROBINSON, T.E. Parsing reward. **Trends Neurosci**, v.26, p. 507-513, 2003.

BICKERDIKE, M. J., ABERCROMBIE, E. D. Striatal acetylcholine reléase correlates with behavioral sensitization in rats withdrawn from chronic amphetamine. **J. Pharmacol. Exp. Ther**, v. 282, p. 818–826, 1997.

BONSON, K. R. *et al*. Neural systems and cue-induced cocaine craving. **Neuropsychopharmacology**, v. 26, p. 376–386, 2002.

BORTOLOTTI, F; GOTTARDO, R; PASCALI, J; TAGLIARO, F. Toxicokinetics of Cocaine and Metabolites: The Forensic Toxicological. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, p. 5658-5663, 2012.

BRICHTA, L.; GREENGARD, P.; FLAJOLET, M. Advances in the pharmacological treatment of Parkinson's disease: targeting neurotransmitter systems. **Trends Neurosci**, v. 23, 2013.

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

BRUST, J. C. Substance Abuse, Neurobiology, and Ideology. **Neurology and Public Health**, v.56,1999.

BURGER, L. Y.; MARTIN-IVERSON, M. T. Increased occupation of D1 and D2 dopamine receptors accompanies cocaine-induced behavioral sensitization. **Brain Res**, v. 639, p. 228 –232, 1994.

CADOR, M.; BJIJOU, Y.; CAILHOL, S.; STINUS, L. D-amphetamine-induced behavioral sensitization: Implication of a glutamatergic medial prefrontal cortex-ventral tegmental area innervation. **Neuroscience**, v. 94, p. 705–721, 1999.

CALABRESI, P. *et al.* A convergent model for cognitive dysfunctions in inson's disease: the critical dopamine-acetylcholine synaptic balance. **Lancet Neurol**, v. 5(11), p. 974–83, 2006.

CALIPARI, E. S; FERRIS, M. J; JONES, S. R. Extended Access of cocaine self-administration results in tolerance to the dopamine-elevating and locomotor-stimulating effects of cocaine. **Journal of Neurochemistry**, v. 128, p. 224–232, 2014.

CALLAHAN, P. M.; DE LA GARZA, R.; CUNNINGHAM, K. A. Mediation of the discriminative stimulus properties of cocaine by mesocorticolimbic dopamine systems. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 57, p. 601- 607, 1997.

CARDOSO, C. C. *et al.* Effects of 17β-estradiol on expression of muscarinic acetylcholine receptor subtypes and estrogen receptor α in rat hippocampus. **Eur J. Pharmacol**, v. 634, p. 192-200, 2010.

CARLINÍ, E. A. *et al.* Drogas psicotrópicas-o que são e como agem. **Revista IMESC**, v.3, 2001.

CARRERA, M.R.; MEIJLER, M. M.; JANDA, K. D.. Cocaine pharmacology and current pharmacotherapies for its abuse. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.12(19), p. 5019-5030, 2004.

CARRIGAN, K. A.; DYKSTRA, L. A. Behavioral effects of morphine and cocaine in M1 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. **Psychopharmacology**, v. 191, p. 985–993, 2007.

CASTILLA-ORTEGA, E. *et al.* A place for the hippocampus in the cocaine addiction circuit: potential roles for adult hippocampal neurogenesis. **Neurosci. Biobehav**, v. 66, p. 15-32, 2016.

CASTRO, BRÁULIO MARCONE. **Determinação da participação do transportador vesicular de acetilcolina em funções cognitivas através do uso de camundongos geneticamente modificados.** Tese de doutorado – Programa de pós-graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

CLECK, J. N.; ECKE, L.; BLENDY, J. A. Endocrine and gene expression changes following forced swim stress exposure during cocaine abstinence in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 201(1), p. 15–28, 2008.

CONRAD, K. L. *et al.* Dopamine receptor expression and distribution dynamically change in the rat nucleus accumbens after withdrawal from cocaine self-administration. **Neuroscience**, v. 169(1), p. 182–194, 2010.

CONSOLO, S. *et al.* Different sensitivity of in vivo acetylcholine transmission to D1 receptor stimulation in shell and core of nucleus accumbens. **Neuroscience**, v. 89, p. 1209–1217, 1999.

COOPER, J.R.; BLOOM, F.E.; ROTH, R.H. Dopamine. The biochemical basis of Neuropharmacology: 8 ed. Oxford, Inc., New York, USA, pp 233 – 235, 2003.

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, p. 1359–1367, 1999.

CRAGG, S. J. Meaningful silences: how dopamine listens to the ACh pause. **Trends Neurosci**, v. 29(3), p. 125–31, 2006.

CRAIG, A. D. Interoception: the sense of the physiological condition of the body. **Curr Opin Neurobiol**, v. 13, p. 500–505, 2003.

CRITTENDEN, J. R. *et al.* Severe drug-induced repetitive behaviors and striatal overexpression of VAChT in ChAT-ChR2-EYFP BAC transgenic mice. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 28, p. 8-57, 2014.

CROMBAG, H. S. *et al.* Review. Context-induced relapse to drug seeking: a review. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 363, p. 3233–3243, 2008.

CHAO, J.; NESTLER, E. J. Molecular neurobiology of drug addiction. **Annual Review of Medicine**, v. 55, p. 113-132, 2004.

CHAVES, T. V. *et al.* Crack cocaine craving: behaviors and coping strategies among current and former users. **Rev Saúde Pública,** v. 45(6), p. 1168-75, 2011.

CHEN, J-C.; CHIANG, Y-C. Molecular Mechanisms of Psychostimulant Addiction. **Medical Journal**, v.32(2), p. 148-154, 2009.

CHOLERIS, E. ***et al.*** A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 235-260, 2001.

CRUSIO, W. E.; SCHWEGLER, H.; VAN ABEELEN, J. H. Behavioral response to novelty and structural variation of the hippocampus in mice. I. Quantitative-genetic analysis of behavior in the open-field. **Behavioural Brain research***,* v. 32 (1), p. 75-80, 1989.

DACKIS, C. A; O'BRIEN, C. P. Cocaine dependence: a disease of the brain's reward centers. **Journal of Substance Abuse Treatment**, v. 21, p. 111 – 117, 2001.

DÍAZ, H. M. *et al.* Receptores nicotínicos neurales: interacción con receptores purinérgicos. **Anal Real Acad Farm**, v. 66, p. 1-21, 2000.

DINIS-OLIVEIRA, R. J. Metabolomics of cocaine: implications in toxicity, Toxicology Mechanisms and Methods, v. 25(6), p. 494-500, 2015.

DI CHIARA, G. *et al.* Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. **Neuropharmacology,** v. 47, p. 227 – 241, 2004.

DESAI, K. *et al.* Impact of Cocaine Use on Acute Ischemic Stroke Patients: Insights from Nationwide Inpatient Sample in the United States. **Cureus**, v. 9(8); 2017.

DÜRSTELER, K.M. *et al.* Clinical potential of methylphenidate in the treatment of cocaine addiction: a review of the current evidence. **Substance Abuse and Rehabilitation**, v. 6, p. 61–74, 2015.

EDWARDS, S.; KOOB, G.F. Neurobiology of dysregulated motivational systems in drug addiction. **Future Neurol**, v. 5, p. 393-401, 2010.

EILAM, D. Open- field behavior withstands drastic changes in arena size. Behavioural Brain Research, v. 142, p. 53-62, 2003.

ELWAN, M. S.; SAKURAGAWA, N. Characterization of [3H] mazindol binding sites in cultured monkey amniotic epitelial cells. **Neurosci Lett**. v. 279, p. 37-40, 2000.

ELLENHORN, M. J. Ellenhorn's medical toxicology: diagnosis and treatment of human poisoning. 2nd ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1997.

EGLEN, R. M. Muscarinic receptor subtype pharmacology and physiology. **Progress in Medicinal Chemistry,** v.43, p. 105–136. 2005.

ESPAÑA, R.A; JONES, S. R. Presynaptic dopamine modulation by stimulant self administration. **Front Biosci**, v. 5, p. 261–276, 2014.

EPSETEIN, D. H.; WILLNER-REID, J.; PRESTON, K. L. Addiction and emotion: theories, assessment techniques, and treatment In: Kassel JD (ed). Substance Abuse and Emotion. APA Washington DC (p 259-280), 2010.

ESTELLES, J. *et al.* Cocaine exposure during adolescence affects anxiety in adult mice. **Brain Research Bulletin**, v. 71, p. 393-403, 2007.

EVERITT, B. J.; WOLF, M. E. Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 3312–3320, 2002.

FADY RACHID, F. Neurostimulation techniques in the treatment of cocaine dependence: A review of the literatura. **Addictive Behaviors**, v. 76, p. 145–155, 2018.

FELDMAN, D. J. *et al.* Mixed D2/5-HT2 antagonism differentially affects apomorphine and amphetamine-induced stereotyped behavior. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 58, p. 565–572, 1997.

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

FERREIRA, A. R. *et al.* Role of hippocampal M_1 and M_4 muscarinic receptor subtypes in memory consolidation in the rat**. Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 74, p. 411-415, 2003.

FILE, S. E. Factors controling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. **Behavioural Brain Research**, v. 125, p. 151- 157, 2001.

FISCHMAN, M. W. *et al.* Acute tolerance development to the cardiovascular and subjective effects of cocaine. **Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 235, p. 677–682, 1985.

FINK-JENSEN, A. *et al.* Role for M5 Muscarinic Acetylcholine Receptors in Cocaine Addiction. **Journal of Neuroscience Research**, v. 74, p. 91–96, 2003.

FUJII, T.; TAKADA-TAKATORI, Y.; KAWASHIMA, K. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: expression of an independent, non-neuronal cholinergic system in lymphocytes and its clinical significance in immunotherapy. **J Pharmacol Sci**, v.106(2), p.186-92, 2008.

FLORES, E. A. Efectos de la cocaína en el ser humano. **Trastornos Adictivos**, v.10(3), p.151-65, 2008.

FRAGOU, D. Effect of chronic heroin and cocaine administration on global DNA methylation in brain and liver. **Toxicology Letters**, v. 218, p. 260-265, 2013.

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 Neuroscience**, v. 12, p. 2097–2106. 2000.

FRANK, H. *et al.* Evolving conceptualizations of cocaine dependence. **The Yale Journal of Biology and Medicine** v. 61, p. 123-136, 1988.

GARCIA, R.C.T. **Efeitos neurodegenerativos da metilecgonidina e da cocaína em cultura celular primária de hipocampo**. 2009. 140f. Dissertação (Mestrado). Toxicologia e Análise Toxicológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.

GARCIA, R. C. T. *et al.* M1 and M3 muscarinic receptors may play a role in the neurotoxicity of anhydroecgonine methyl ester, a cocaine pyrolysis producto. **Scientific Reports**, 2015.

GARZA, R. *et al.* Rivastigmine Reduces “Likely to Use Methamphetamine” in Methamphetamine-Dependent Volunteers. **Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 37(1), p. 141-6, 2012

GARAVAN, H. *et al.* Cue-induced cocaine craving: neuroanatomical specificity for drug users and drug stimuli. **Am J Psychiatry**, v. 157, p. 1789–1798, 2000.

GAWIN, F. H., KLEBER, H. D. Abstinence symptomatology and psychiatric diagnosis in chronic cocaine abusers. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 43, p. 107-13, 1986

GAWIN, F. H. Cocaine addiction: psychology and neurophysiology. **Science**, v. 25, p. 1580-86, 1991.

GERBER, D. J. *et al*. Hyperactivity, elevated dopaminergic transmission, and response to amphetamine in Ml muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci USA,** v. 98 (26), p. 15312–15317, 2001.

GIL, H. L. B. *et al.* Perceptions of adolescents students on the consumption of drgs: a case study in lima, Peru. **Ver Lat Am Enfermagem,** v. 16, p. 551-557, 2008.

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

GOLAN, D. E.; TASHJIAN, A. H.; ARMSTRONG, A. W. Princípios de Farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia, p. 166-185, 2009.

GOLDSTEIN, R.A. et al. Cocaine: history, social implications, and toxicity - A review. Disease-a-Month, v.55, n.1, p.6-38, 2009.

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.

GOMES, Elisa Fraga. **Efeitos comportamentais e neurotóxicos do produto da pirólise da cocaína, anidroecgonina metil éster (AEME).** Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, 2017.

GRANT, S. *et al.* Activation of memory circuits during cue-elicited cocaine craving. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93(21), p. 12040–12045, 1996.

GRAEFF, F. G..; GUIMARÂES, F. S. ZAURDI, A. W. Fundamentos de Psicofarmacologia. São Paulo: **Editorial Atheneu**, p. 69-91, 2000.

GRACE, A.A. Disruption of cortical-limbic interaction as a substrate for comorbidity. **Neurotox Res**, v. 10 (2), p. 93–101, 2006.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of ¨fear¨ motivated behavior. **Naunyn-Schmiedeberg´s Archives in Pharmacology**, v. 327, p. 1-5, 1984.

HANLON, C. A.; BEVERIDGE, T. J. R.; PORRINO, L. J. Recovering from Cocaine: Insights from Clinical and Preclinical Investigations. **Neurosci Biobehav**, v. 37, p. 2037–2046, 2013.

HASSELMO, M. E. Neuromodulation and cortical function: modeling the physiological basis of behavior. **Behav Brain**, v. 67, p. 1–27, 1995.

HIGUERA-MATAS, A. *et al*. Neural Changes Developed during the Extinction of Cocaine Self-Administration Behavior. **Pharmaceuticals***,* v. *4*, p. 1315-1327, 2011.

HIKIDA, T. *et al.* Acetylcholine enhancement in the nucleus accumbens prevents addictive behaviors of cocaine and morphine. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100(10), p. 6169-73, 2003.

HYMAN, S. E; MALENKA, R. C; NESTLER, E. J. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. **Annual Review of Neuroroscience**, v. 29, p. 565–98, 2006.

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

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

ICHIKAWA. J. *et al.* Cholinergic modulation of basal and amphetamineinduced dopamine release in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens. **Brain Res**, v. 958(1), p. 176–84, 2002.

IKEMOTO, S.; GOEDERS, N. E. Intra-medial prefrontal cortex injections of scopolamine increase instrumental responses for cocaine: an intravenous self-administration study in rats. **Brain Res Bull**, v. 51(2), p. 151–8, 2000.

IKEMOTO S. Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. **Brain Res**, v. 56, p. 27–78, 2007.

IMPERATO, A. *et al.* Strain-dependent effects of dopamine agonists on acetylcholine release in the hippocampus: an in vivo study in mice. **Neuroscience**, v. 70, p. 653–660, 1996.

JASINSKA, A. J. *et al.* Dorsal medial prefrontal cortex (MPFC) circuitry in rodent models of cocaine use: Implications for drug addiction therapies. **Addiction Biology**, v. 20, p. 215–226, 2014.

JONES, C. K.; BYUN, N.; BUBSER, M. Muscarinic and Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists and Allosteric Modulators for the Treatment of Schizophrenia. **Neuropsychopharmacology,** v. 37, p. 16–42, 2012.

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

JONES, H. M.; PILOWSKY, L. S. Dopamine and antipsychotic drug action revisited. **The Royal College of Psychiatrists**, v. 181, p. 271-275, 2002.

JUCAITE, A. Dopaminergic modulation of cerebral activity and cognitive functions. **Medicina**, v. 38, p. 357 – 362, 2002.

KALIVAS, P. W.; BRADY, K. Getting to the core of addiction: Hatching the addiction egg. **Natural Medicine**, v.18, p. 502–503, 2012.

KALIVAS, P. W.; VOLKOW, N. D. The Neural Basis of Addiction: A Pathology of Motivation and Choice. **American Journal of Psychiatry**, v.162(3), p. 1403-1413, 2005.

KENNY, P. J.; MARKOU, A. Conditioned nicotine withdrawal profoundly decreases the activity of brain reward systems. **J Neurosci**, v. 25, p. 6208–12, 2005.

KLEVEN, M. S. *et al.* Effects of repeated injections of cocaine on D1 and D2 e dopamine receptors in rat brain. **Brain Research**, v. 532, p. 265-270, 1990.

KILTS, C. D. *et al.* Neural activity related to drug craving in cocaine addiction. **Arch Gen Psychiatry**, v. 58, p. 334–341, 2001.

KIMURA, M.; YAMADA, H.; MATSUMOTO, N. Tonically active neurons in the striatum encode motivational contexts of action. **Brain Dev**, v. 25, p. 20–23, 2003.

KISH, S. J. *et al.* Brain choline acetyltransferase activity in chronic, human users of cocaine, methamphetamine, and heroin. **Molecular Psychiatry**, v. 4, p. 26–32, 1999.

KOFF, J. M.; SHUSTER, L.; MILLER, L. G. Chronic cocaine administration is associated with behavioral sensitization and time-dependent changes in striatal dopamine transporter binding. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 268, p. 277–282, 1994.

KOOB, G. F.; NESTLER, E. J. The neurobiology of drug addiction. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 9, p. 482-497, 1997.

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

KOOB, G. F.; MOAL, M. L. Neurobiology of Addiction. **London: Academic Press**; 2006.

KOOB, G. F.; SIMON, E. J. The Neurobiology of Addiction: Where We Have Been and Where We Are Going. **The Journal of Drug Issues**, v. 39, p. 115-132, 2009.

KOOB, G.F.; Le MOAL, M. Addiction and the Brain Antireward System. **Ann Ver Psychol**, v. 59, p. 29-53, 2008.

KOOS, T.; TEPPER, J. M. Dual cholinergic control of fast-spiking interneurons in the neostriatum. **J Neurosci**, v. 22, p. 529–535, 2002.

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurocircuitry of Addiction. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, p. 217–238, 2010.

KOTANI, S. *et al.* Donepezil, na acetylcholinesterase inhibitor, enhances adult hippocampal neurogenesis. **Chem Biol Interact**, v. 175, p. 227–230, 2008.

KUCZENSKI, R., SEGAL, D. S. Caudate-putamen and nucleus accumbens

extracellular acetylcholine responses to methamphetamine binges. **Brain Res**, v. 923, p. 32–38, 2001.

KUZMIN, A. *et al.* Genetic evidence that cocaine and caffeine stimulate locomotion in mice via different mechanisms. **Life Sci**, v. 66, p. 113–118, 2000.

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

LARANJEIRAS, R. *et al.* Usuários de substâncias psicoativas: abordagem, diagnóstico e tratamento. 2ª Ed. São Paulo: Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo/ Associação Médica Brasileira, p. 120, 2003.

LAMPREA, M. R. *et al.* Thigmotactic responses in an open-field. **Brazilian Journal of Medical and Biological Reserarch**, v. 41 (2), p. 135-140, 2008.

LANGMEAD, C. J.; WATSON, J.; REAVILL, C. Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. **Pharmacol Ther**, v. 117(2), p. 232–43, 2008.

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

LEHRMANN, E. *et al*. Transcriptional profiling in the human pré-frontal cortex: evidence for two activational states associated with cocaine abuse. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 3, p. 27–40, 2003.

LENAD. II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD). LARANJEIRA, R. *et al*. São Paulo: Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia pra Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD), UNIFESP. 2014. 85p

LESHNER, A. I. Molecular mechanisms of cocaine addiction. **N. Engl. J. Med**, v. 335, p. 128–129, 1996.

LI, Y. *et al.* Both glutamate receptor antagonists and prefrontal cortex lesions prevent induction of cocaine sensitization and associated neuroadaptations. **Synapse**, v. 34, p.169–180, 1999.

LIPTON, P. A.; EICHENBAUM, H. Complementary roles of hippocampus and medial entorhinal cortex in episodic memory. **Neural Plasticity**, v. 2008, p. 1 - 8, 2008.

LISTER, R. G. The use of a plus-mase to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92(2), p. 180-5, 1987.

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. Pharmacological Therapy, v. 46, p. 321-340, 1990.

LIZASOAIN, I.; MORO, M. A.; LORENZO, P. A. Cocaína: aspectos farmacológicos. **Adicciones**, v. 14, p. 57 – 64, 2002.

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

LONDON, E. D. *et al.* Cocaine-induced reduction od glucose utilization in human brain. **Arch Gen Psychiatry**, v. 47, p. 567-574, 1990.

Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5 [American Psychiatric Association; tradução: Maria Inês Corrêa Nascimento *et al*.]; revisão técnica: Aristides Volpato Cordioli *et al*. 5. ed., 2014.

MACÊDO, D. C. *et al.* Cocaine Treatment Causes Early and Long-Lasting Changes in Muscarinic and Dopaminergic Receptors. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 24, p. 129-36, 2004.

MAAS, L. C. *et al.* Functional magnetic resonance imaging of human brain activation during cue-induced cocaine craving. **Am J Psychiatry**, v. 155, p. 124–126, 1998.

MALLETTEA, J. R. *et al.* Changes in illicit cocaine hydrochloride processing identified and revealed through multivariate analysis of cocaine signature data. **Science & Justice**, v.58, p. 90–97, 2018.

MARK, G. P. *et al.* Injection of oxotremorine in nucleus accumbens shell reduces cocaine but not food self-administration in rats. **Brain Res**, v. 1123, p. 51–9, 2006.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behaviour. **Journal of Comparative & Physiological Psychology**, v. 48, p. 254-260, 1955.

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, p. 139–148, 1997.

MEYERS, R. A. *et al.* Dorsal hippocampus inhibition disrupts acquisition and expression, but not consolidation, of cocaine conditioned place preference. **Behav Neurosci**, v. 120, p.401–412, 2006.

MESULAM, M. The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: pivotal factor or side show?. **Learn Mem**, v. 11, p. 43-49, 2004.

MIYAKAWA, T. *et al.* Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M1 muscarinic acetylcholine receptor. **J Neurosci**, v. 21, p. 5239–5250, 2001.

MOORE, R.J. *et al*. Effect of cocaine selfadministration on dopamine d2 receptors in rhesus monkeys. Synapse, v. 30, p. 88-96, 1998.

MORRIS, G. *et al.* Coincident but distinct messages of midbrain dopamine and striatal tonically active neurons. **Neuron**, v. 43, p, 133–143, 2004.

MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience and Biobehavioural**, v. 28, p. 285 – 305, 2004.

NAIR, V. P., HUNTER, J. M. Anticholinesterases and anticholinergic drugs. **Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain**, v. 4, p. 164–168, 2004.

NICOLA, S.M.; SURMEIER, J.; MALENKA, R. C. Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. **Annu Rev Neurosci**, v. 23, p. 185–215, 2000.

NEWMAN, E. L. *et al.* Cholinergic modulation of cognitive processing: insights drawn from computational models. **Front Behav Neurosci**, v. 6, p. 24, 2012.

O'BRIEN, C. P. Drug addiction and abuse. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (Ed). Googman and Gilman`s the pharmacological basis of therapeutics. 11th ed. New York: Pergamon, p. 621-642, 2006.

OHARA, A. *et al*. Exclusive expression of VMAT2 in noradrenergic neurons increases viability of homozygous VMAT2 knockout mice. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 432(3), p. 526-32, 2013

PASTOR, R. *et al.* Corticotropin-releasing factor 1 receptor involvement in behavioral neuroadaptation to ethanol: a urocortin1- independent mechanism. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 105, p. 9070–9075, 2008

PELLOW, S. *et al.* Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14(3), p. 149-167, 1985.

PEPEU, G.; GIOVANNINI, M. G. Changes in acetylcholine extracellular levels during cognitive processes**. Learn Mem**, v. 11, p. 21–27, 2004.

PERALTA, E.G. *et al.* Differential regulation of PI hydrolysis and adenylyl cyclase by muscarinic receptor subtypes. **Nature**, v. 334, p. 434–437, 1988.

PERRY, E. *et al*. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness?. **Trends neurosci**, v. 22, p. 273-80, 1999.

PIERCE, R. C.; KALIVAS, P. W. A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants**. Brain Res Rev**, v. 25, p. 192–216, 1997.

PHILLIPS, T. J. *et al.* Behavioral Sensitization to Addictive Drugs: Clinical Relevance and Methodological Aspects. **Neuromethods**, v. 50, p. 267-305, 2010.

PISANI, A. *et al.* Role of tonically-active neurons in the control of striatal function: cellular mechanisms and behavioral correlates. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 25, p. 211–230, 2001.

POULIN, B. *et al.* The M3-muscarinic receptor regulates learning and memory in a receptor phosphorylation/arrestin-dependent manner. **Proc Natl Acad Sci USA**, p. 107, v. 9440–9445, 2010.

PRUT. L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review**.** **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 3-33, 2003.

RAMOS, A; MORMEDE, O. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 22:33, p. 57, 1998.

REIMAN, E. M. *et al.* Neuroanatomical correlates of externally and internally generated human emotion. **Am J Psychiatry**, v. 154, p. 918–928, 1997.

ROBINSON, T.E.; BERRIDGE, K.C. The incentive sensitization theory of addiction: Some current issues. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 363, p. 3137-3146, 2008.

ROSSETTI, Z. L.; HMAIDAN, Y.; GESSA, G. L. Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 221, p. 227–234, 1992.

SALUM, C.; ROQUE DA SILVA, A. C.; MORATO, S. Conflict as a determinant of rat behavior in three types of elevated plus-maze. **Behavioural Processes**, v. 63, p. 87-93, 2003.

SHARKEY, J. *et al.* Cocaine Inhibits Muscarinic Cholinergic Receptors in Heart and Brain. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 1988.

SCHLUSSMAN, S. D. *et al.* Locomotion, stereotypy, and dopamine D1 receptors after chronic “binge” cocaine in C57BL/6J and 129/J mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 75, p. 123–131, 2003.

SCHLUSSMAN, S. D. *et al.* Steady-dose and escalating-dose “binge” administration of cocaine alter expression of behavioral stereotypy and striatal preprodynorphin mRNA levels in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 67, p. 169–175, 2005.

SCHMITT, U.; HIEMKE, C. Combination of open feld and elevated plusmaze: a suitable test battery to assess strain as well as treatment differences in rat behavior. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatr**, v. 22, p. 1197, 1998.

SCHROEDER, J. P.; PACKARD, M. G. Facilitation of memory for extinction of drug-induced conditioned reward: role of amígdala and acetylcholine. **Learn Mem**, v. 11, p. 641–647, 2004.

SEE, R. E.; MCLAUGHLIN, J.; FUCHS, R. A. Muscarinic receptor antagonism in the basolateral amygdala blocks acquisition of cocaine-stimulus association in a model of relapse to cocaineseeking behavior in rats. **Neuroscience**, v. 117, p. 477–483, 2003.

SEEGER, T. *et al.* M2 muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice show deficits in behavioral flexibility, working memory, and hippocampal plasticity. **J Neurosci**, v. 24, p. 10117–10127, 2004.

SELF, D. W. *et al*. Opposite modulation of cocaine-seeking behavior by D1- and D2-like dopamine receptor agonist. **Science**, v. 271, p. 1586 –1589, 1996.

SENAD - Secretaria Nacional de Política sobre Drogas. Relatório Brasilleiro Sobre Drogas. Brasília: SENAD, 2009.

SICILIANO, C. A. *et al.* Adaptations of Presynaptic Dopamine Terminals Induced by Psychostimulant Self-Administration. **American Chemical Society Neurosci**, v. 6(1), p. 27–36, 2015.

SIEGAL, D. *et al.* Brain Vesicular Acetylcholine Transporter in Human Users of Drugs of Abuse. **Synapse**, v. 52, p. 223–232, 2004.

SMITH, J. E. *et al.* Involvement of cholinergic neuronal systems in intravenous cocaine self-administration. **Neuroscience and Biobehavioral**, v. 27, p. 841–850, 2004a.

SMITH, J. E.; VAUGHN, T. C, CO, C. Acetylcholine turnover rates in rat brain regions during cocaine self-administration. **J Neurochem**, v. 88, p. 502–512, 2004b.

SOFUOGLU, M.; MOONEY, M. Cholinergic Functioning in Stimulant Addiction: Implications for Medications Development. **CNS Drugs**, v. 23(11), p. 939–952, 2009.

SOUSA, F. C. *et al.* Early withdrawal from repeated cocaine administration upregulates muscarinic and dopaminergic D2-like receptor in rat neostriatum. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 62(1), p. 15-20, 1999.

SOUSA, F. C. *et al.* Effects of dopaminergic and cholineergic interactions on rat behavior. **Life Sci**, v. 69, p. 2419-2428, 2001.

STANDAERT, D. G.; GALANTER, J. M. Farmacologia da Neurotransmissão Dopaminérgica. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

STEKETEE, J. D.; KALIVAS, P. W. Drug Wanting: Behavioral Sensitization and Relapse to Drug-Seeking Behavior. Pharmacological Reviews, v. 63, No. 2. Copyright © 2011 by The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics **Pharmacol Rev**, v. 63, p. 348–365, 2011.

STRAMIELLO, M.; WAGNER, J. J. Cocaine enhancement of long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampus: lamina-specific mechanisms of action. **Synapse**, v. 64, p. 644–648, 2010.

RITZ, M.C. *et al.* Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. **Science**, v.237, 1219–1223, 1987.

RIVERA, M. A. Antiquity of coca leaf chewing in the South central Andes: a 3000 year archaeological recordo f coca leaf chewing from northern Chile. **Journal of Psychoative Drugs**, v. 37, p. 455 – 8, 2005.

RODGERS, R. J. *et al.* Animal models of anxiety:na ethological perspective. **Bazilian Journal of Medicine and Biological Research**, v. 30, p. 289-304, 1997.

SHABANI, S. *et al.* Muscarinic type 2 receptors in the lateral dorsal tegmental area modulate cocaine and food seeking behavior in rats**. Neuroscience**, v. 170, p. 559-569, 2010.

TANAKA, T. *et al.* Up-regulation of dopamine D1 receptor in the hippocampus after establishment of conditioned place preference by cocaine. **Neuropharmacology**, v. 61, p. 842–848, 2011.

TARAZI, F. R. Neuropharmacology of dopamine receptors: implications in neuropsychiatric diseases**. Medical sciences**, v.3, p. 93-104, 2012.

TAYLOR, P. *et al.* **Basic neurochemistry. Molecular cellular and medical aspects**, Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins, 6ª ed., p. 213-242, 1999.

TISCH, S. *et al*. The basal ganglia: anatomy, physiology, and pharmacology. **Psychiatr Clin North Am**, v. 27 (4), p. 757–799, 2004.

THOMSEN, M. *et al.* Reduced cocaine self-administration in muscarinic M5 acetylcholine receptor deficient mice**. Neuropsychopharmacology**, v. 25, p. 8141–8149, 2005.

THOMPSON, A. M.; SWANT, J.; WAGNER, J. J. Cocaine-induced modulation of longterm potentiation in the CA1 region of rat hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 49 (2), p. 185-194, 2005.

THOMSEN, M. *et al.* Decreased prepulse inhibition and increased sensitivity to muscarinic, but not dopaminergic drugs in M5 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 192, p. 97–110, 2007.

THOMSEN, M. *et al.* Attenuation of cocaine's reinforcing and discriminative stimulus effects via muscarinic m1 acetylcholine receptor stimulation. **J. Pharmacol. Exp. Ther**, v. 332, p. 959-969, 2010.

THOMSEN, M. *et al.* Contribution of both M1 and M4 receptors to muscarinic agonistmediated attenuation of the cocaine discriminative stimulus in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 220(4), p. 673–685, 2012.

TOLLIVER, B. K.; CARNEY, J. M. Comparison of cocaine and GBR 12935: effects on locomotor activity and stereotypy in two inbred mouse strains. **Pharmacol Biochem Behav,** v. 48, p. 733–739, 1994.

TUCEK, S. Short-term controlo f the synthesis of acetylcholine. **Prog. Biophys. Molec.Biol.** v. 60. P. 59-69, 1993.

TSUKADA, H. *et al.* Effects of binge pattern cocaine administration on dopamine D1 and D2 receptors in the rat brain: an in vivo study using positron emission tomography. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, p. 7670-7677, 1996.

TZSCHENTKE, T.M. Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamine system. **Progress in Neurobiology**, v. 63, p. 241-320, 2001.

TZAVARA, E. T. *et al.* Dysregulated hippocampal acetylcholine neurotransmission and impaired cognition in M2, M4 and M2/M4 muscarinic receptor knockout mice. **Mol Psychiatry**, v. 8, p. 673–679, 2003.

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

VENTURA, A. L. M. *et al.* Colinergic system: revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking. **Rev Psiq Clín**, v. 7(2), p. 66-72, 2010.

VILARO, M. T.; PALACIOS, J. M.; MENGOD, G. Localization of m5 muscarinic receptor mRNA in rat brain examined by in situ hybridization histochemistry**. Neurosci Lett**, v. 114, p. 154–159, 1990.

VOLKOW, N. D. *et al.* Addiction Circuitry in the Human Brain. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 52, p. 321–336, 2012.

VOLKOW, N. D. *et al.* Addiction: Beyond dopamine reward circuitry. **PNAS**, v. 108, p. 15037-15042, 2010a.

VOLKOW, N. D. *et al*. Addiction: Decreased reward sensitivity and increased expectation sensitivity conspire to overwhelm the brain's control circuit. **Bioessays**, v. 32(9), p. 748–755, 2010b.

VOLKOW, N. D.; FOWLER, J. S.; WANG, G. J. The addicted human brain: insights from imaging studies. **J Clin Invest**, v. 111 (10), p. 1444–51, 2003.

VOLKOW, N.D.; FOWLER, J. S. Addiction, a disease of compulsion and drive: Involvement of the orbitofrontal cortex. **Cereb Cortex**, v. 10(3), p. 318–325, 2000.

VOLKOW, N.D. *et al.* Cocaine addiction: Hypothesis derived from imaging studies with PET. **J Addict Dis**, v. 15(4), p. 55–71, 1996.

VOLKOW, N.D. *et al.* Changes in brain glucose metabolism in cocaine dependence and withdrawal. **Am J Psychiatry**, v. 148, p. 621–626, 1991.

VOLPICELLI, L.A. & LEVEY, A.I. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in cerebral cortex and hippocampus. **Progress in Brain Research**, v. 145, p. 59–66, 2004.

UNTERWALD, E. M. *et al.* Time course of the development of behavioral sensitization and dopamine receptor up-regulation during “binge” cocaine administration. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 270, p. 1387–1397, 1994.

UNODC - United Nations Office on Drugs and Crime. World Drug Report. **United Nations publication**. 2016.

UNODC - United Nations Office on Drugs and Crime. World Drug Report. **United Nations publication**. 2017.

UNODC - United Nations Office on Drugs and Crime. World Drug Report. **United Nations publication**. 2018.

UTENA, H. Behavioral aberrations in methamphetamine intoxicated animals and chemical correlates in the brain. **Prog. Brain Res**, v. 21, p. 1902, 1966.

WANG, H.; PINCKEL, V. M. Dopamine D2 receptors are presente in pré-frontal cortical afferents and their targets in patches of the rat caudate-putamen nucleus. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 442(4), p. 392-404, 2002.

WALSH, S. L. *et al.* Repeated dosing with oral cocaine in humans: assessment of direct effects, withdrawal, and pharmacokinetics. **Exp Clin Psychopharmacol**, v. 17(4), p. 205-16, 2009.

WEINER, D. M.; LEVEY, A. I.; BRANN, M. R. Expression of muscarinic acetylcholine and dopamine receptor mRNAs in rat basal ganglia. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 87, p. 7050–7054, 1990.

WEISS, F.; PORRINO, L. J. Behavioral neurobiology of alcohol addiction: recent advances and challenges. **J Neurosci**, v. 22, p. 3332–3337, 2002.

WISE, R. Dopamine, learning and motivation. Nature reviews. **Neuroscience**, v. 5, p. 483-494, 2004.

WILLIAMS, M. J.; ADINOFF, B. The Role of Acetylcholine in Cocaine Addiction. **Neuropsychopharmacology**, v. 33(8), p. 1779–1797, 2008.

WILSON, J. M. *et al.* Choline acetyltransferase activity is reduced in rat nucleus accumbens after unlimited access to self-administration of cocaine. **Neurosci Lett**, v. 180, p. 29–32, 1994.

WILSON, J. M.; STEPHEN, J.; SIEGAL, S. J. The Vesicular Monoamine Transporter, in Contrast to the Dopamine Transporter, Is Not Altered by Chronic Cocaine Self-Administration in the Rat. **The Journal of Neuroscience**, v. 76, p. 3507-3510, 1996.

WHIMBEY, A. E.; DENENBERG, V. H. Two independente behavioral dimensions in open-field performance. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 63 (3), p. 500-504, 1967.

WILSON, J. H.; MCKINLEY, S. A.; YOUNG, B. L. Prolactin levels in juvenile and adult rats following acute restraint and the open-field. **Physiology & Behavior***, v. 68 (3), p. 500-504, 2000.*

XIE, X.; WELLS, A. M.; FUCHS, R. A. Cocaine Seeking and Taking: Role of Hippocampal Dopamine D1-like Receptors. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 17(9), p. 1533–1538, 2014.

YASUDA, R. P. *et al*. Development of antisera selective for M4 and M5 muscarinic cholinergic receptors: distribution of M4 and M5 receptors in rat brain. **Mol Pharmacol**, v. 43, p. 149 –157, 1993.

YEOMANS, J.; FORSTER, G.; BLAHA, C. M5 muscarinic receptors are needed for slow activation of dopamine neurons and for rewarding brain stimulation. **Life Sci**, v. 68, p. 2449–2456, 2001.

YONG ZHANG, Y. *et al.* Effect of Chronic “Binge Cocaine” on Basal Levels and Cocaine-Induced Increases of Dopamine in the Caudate Putamen and Nucleus Accumbens of C57BL/6J and 129/J Mice. **SYNAPSE**, v. 50, p. 191–199, 2003.

YONG ZHANG. *et al.* Chronic escalating cocaine exposure, abstinence/withdrawal, and chronic re-exposure: Effects on striatal dopamine and opioid systems in C57BL/6J mice. **Neuropharmacology**, v. 67, p. 259–266, 2013.

ZHANG, W. *et al.* Characterization of central inhibitory muscarinic autoreceptors by the use of muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. **J Neurosci**, v. 22, p. 1709–1717, 2002.

ZHENG, F; ZHAN, C.G. Modeling of Pharmacokinetics of Cocaine in Human Reveals the Feasibility for Development of Enzyme Therapies for Drugs of Abuse. **PLoS Comput Biol**, v. 8(7), 2012.

ZHOU, F. M.; WILSON, C.J.; DANI, J. A. Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. **J Neurobiol**, v. 53, p. 590–605, 2002.

ZMAROWSKI, A.; SARTER, M.; BRUNO, J. P. Glutamate receptors in nucleus accumbens mediate regionally selective increases in cortical acetylcholine release. **Synapse**, v. 61(3), p. 115–23, 2007.

ANEXOS

Anexo A: Certificado do Comitê de Ética para uso de animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo - USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Oficio CEUA/FCF **72.2015-P503**

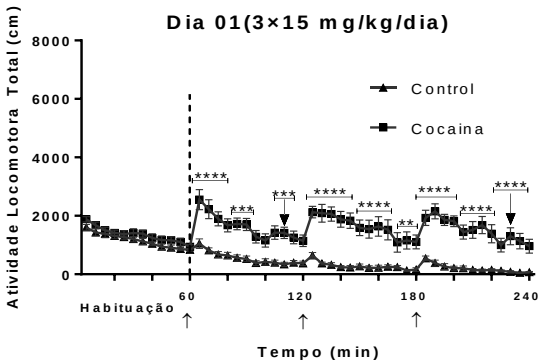
CERTIFICADO

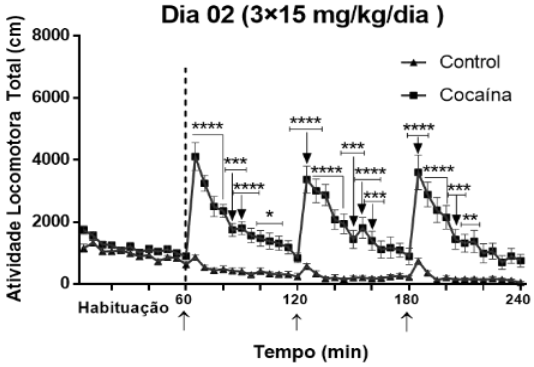
A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa "**Abstinência à cocaína e suas consequências no sistema colinérgico muscarínico**" (Protocolo CEUA/FCF/503), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Yuli Yohana Serna Torres**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de **18 de setembro de 2015**. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

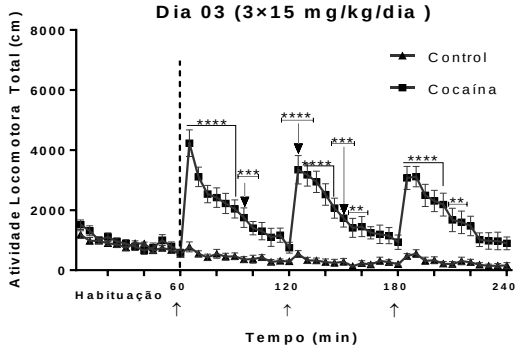
São Paulo, 21 de setembro de 2015.

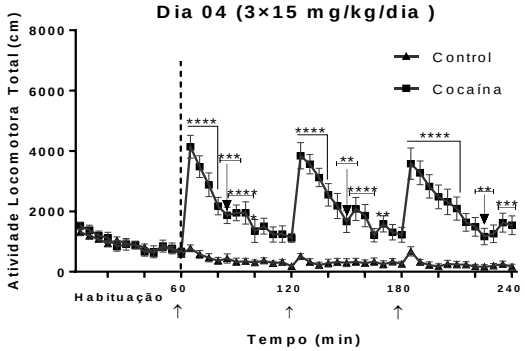
Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

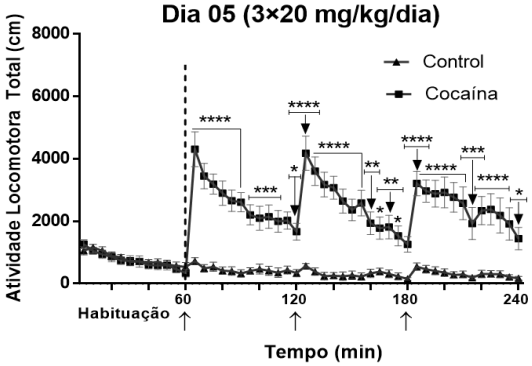
Anexo B: Atividade locomotora total no campo aberto

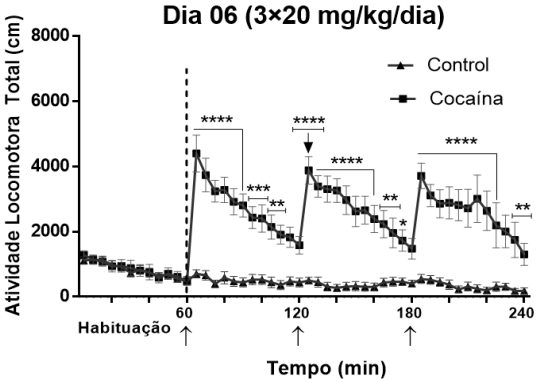


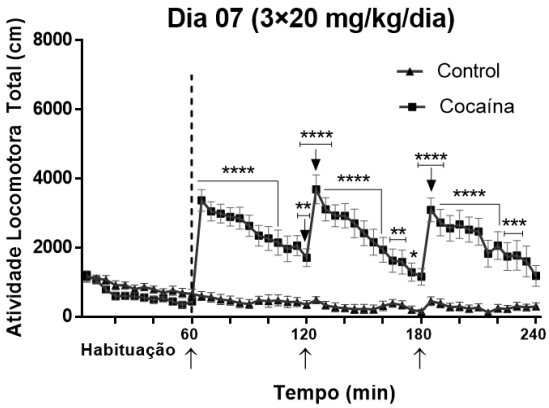


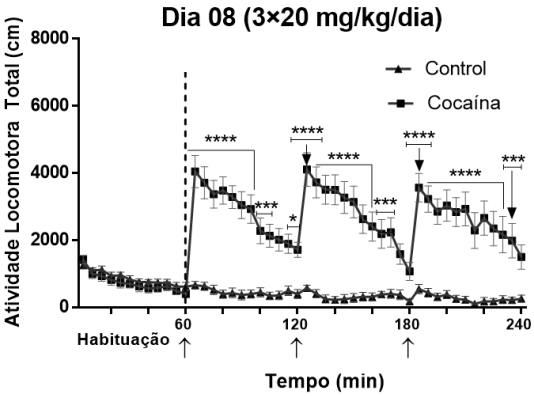


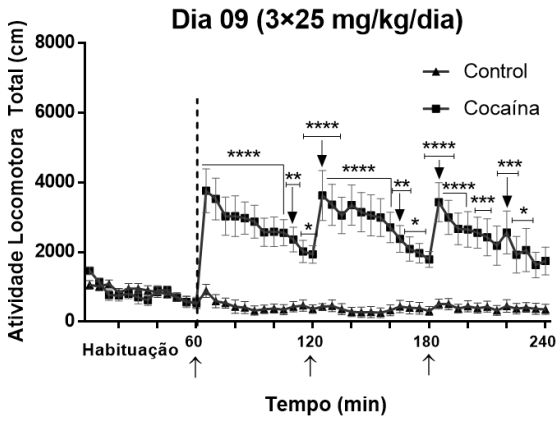


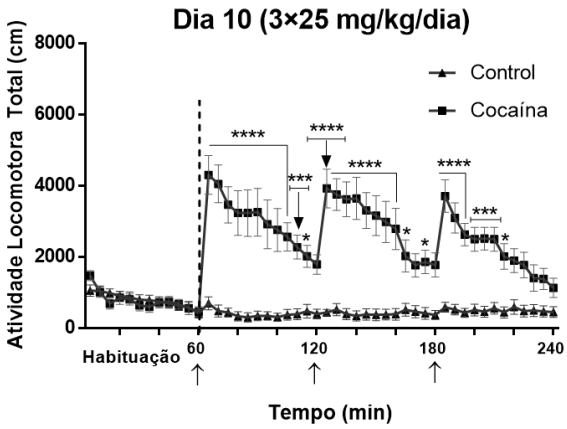


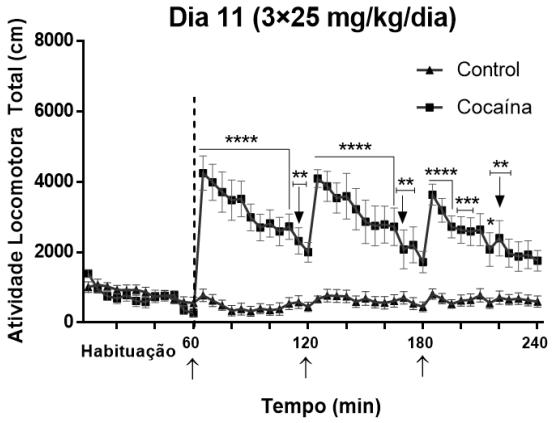


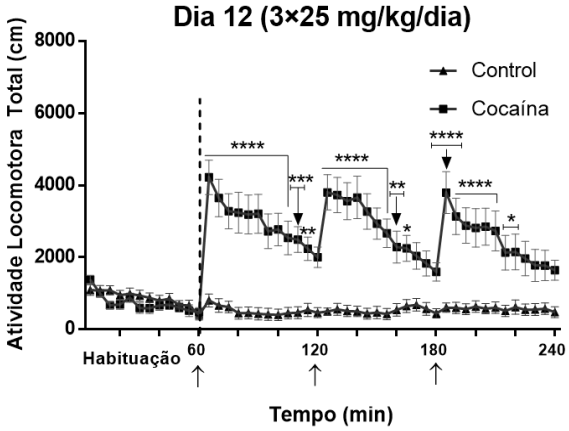


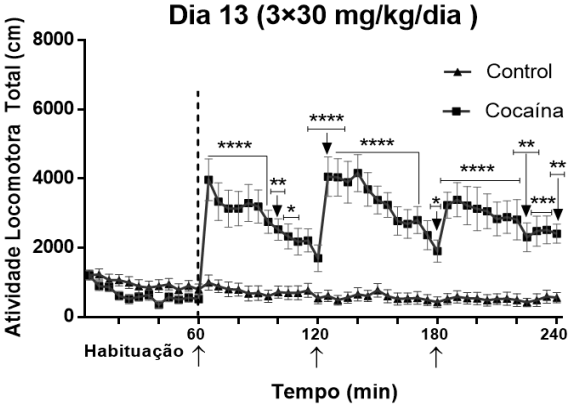


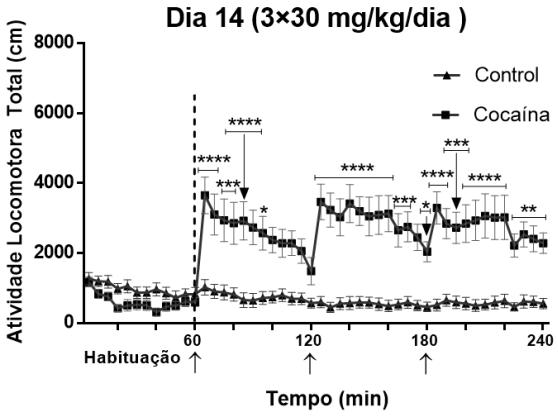

Dia 09 (3×25 mg/kg/dia)
Atividade Locomotora Total (cm)
Control
Cocaína
Habituação
Tempo (min)


Dia 10 (3×25 mg/kg/dia)
Atividade Locomotora Total (cm)
Control
Cocaína
Habituação
Tempo (min)

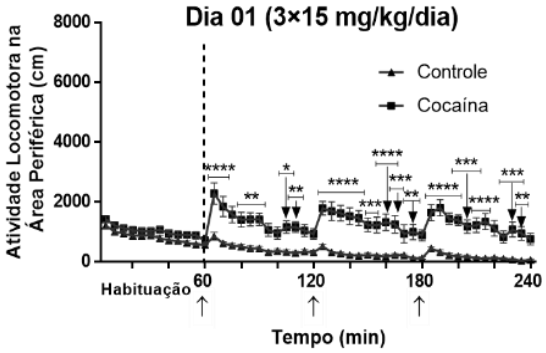

Dia 11 (3×25 mg/kg/dia)
Atividade Locomotora Total (cm)
Control
Cocaína
Habituação
Tempo (min)

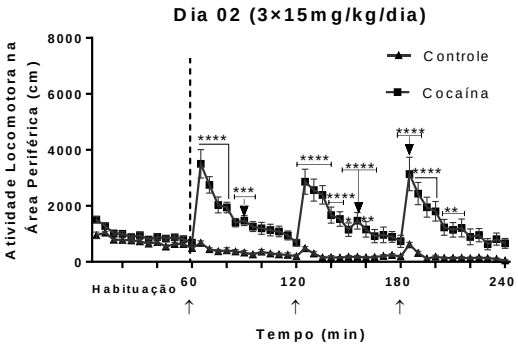

Dia 12 (3×25 mg/kg/dia)
Atividade Locomotora Total (cm)
Control
Cocaína
Habituação
Tempo (min)

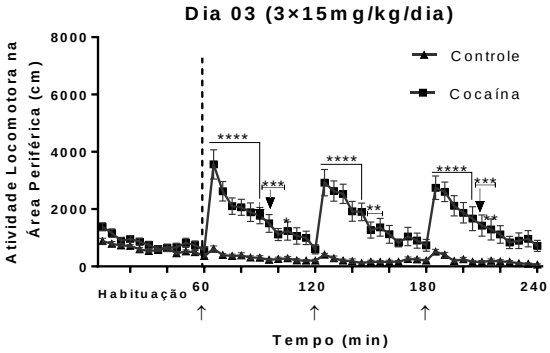

Dia 13 (3×30 mg/kg/dia)
Atividade Locomotora Total (cm)
Control
Cocaína
Habituação
Tempo (min)

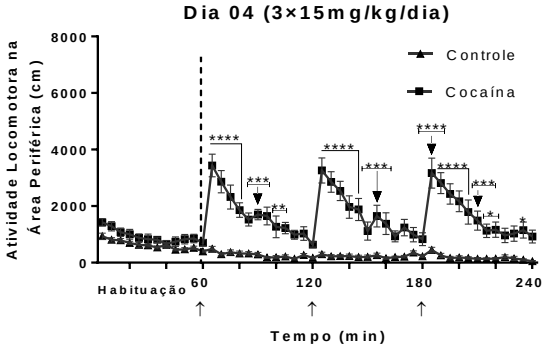

Dia 14 (3×30 mg/kg/dia)
Atividade Locomotora Total (cm)
Control
Cocaína
Habituação
Tempo (min)

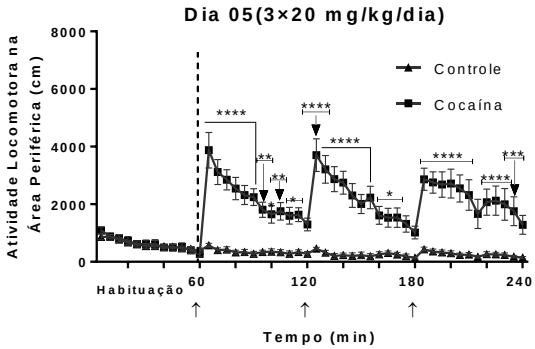
Anexo C: Atividade locomotora na área periférica do campo aberto

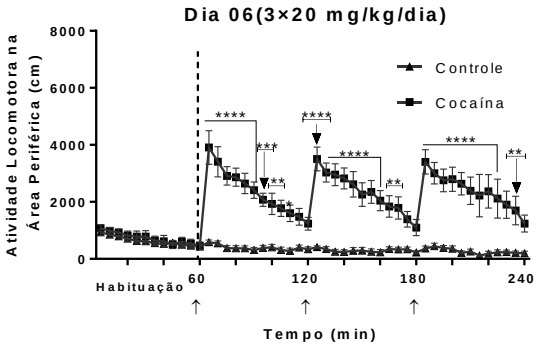


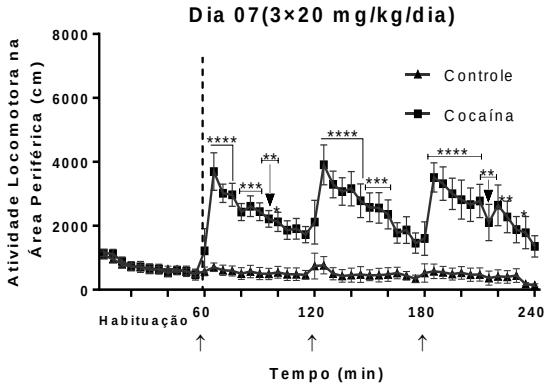


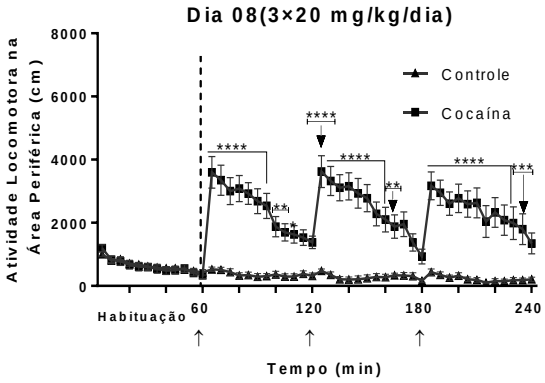


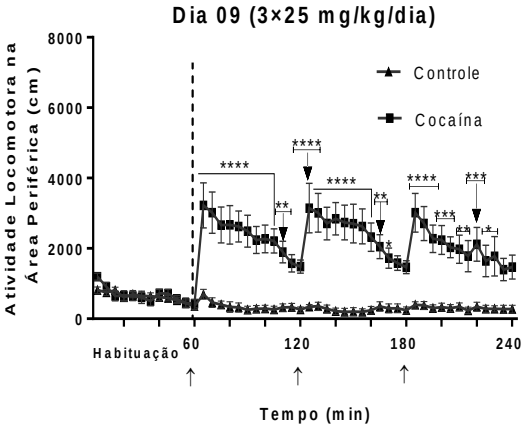


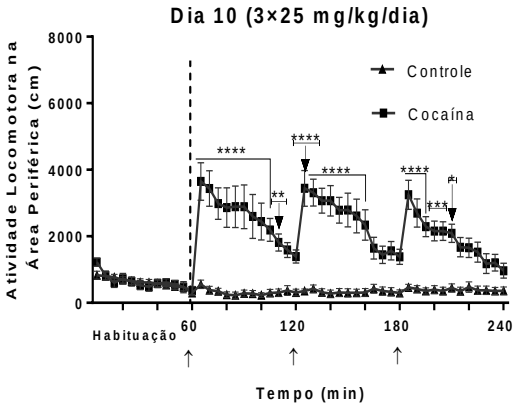


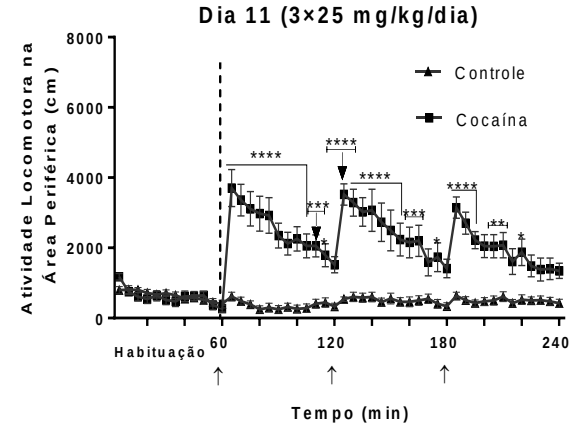


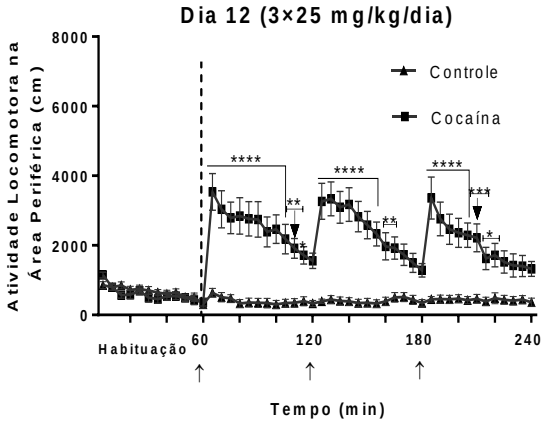


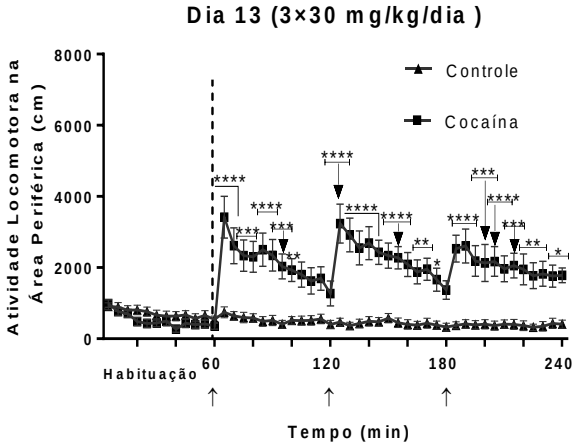


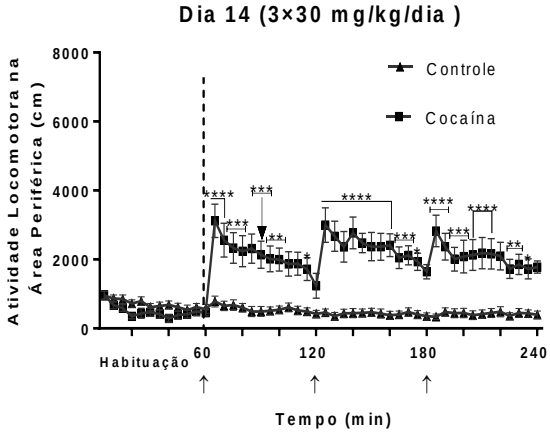

Dia 09 (3×25 mg/kg/dia)
Atividade Locomotora na Área Periférica (cm)
8000
6000
4000
2000
0
Controle
Cocaína
Habituação
60
120
180
240
Tempo (min)


Dia 10 (3×25 mg/kg/dia)
Atividade Locomotora na Área Periférica (cm)
8000
6000
4000
2000
0
Controle
Cocaína
Habituação
60
120
180
240
Tempo (min)

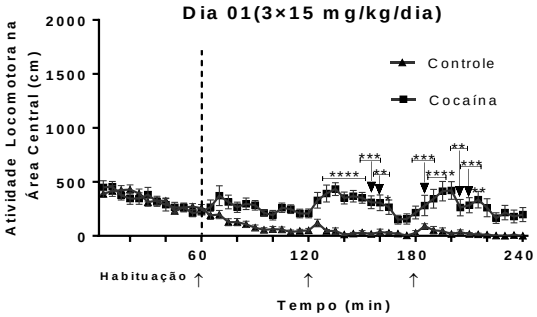

Dia 11 (3×25 mg/kg/dia)
Atividade Locomotora na Área Periférica (cm)
8000
6000
4000
2000
0
Controle
Cocaína
Habituação
60
120
180
240
Tempo (min)

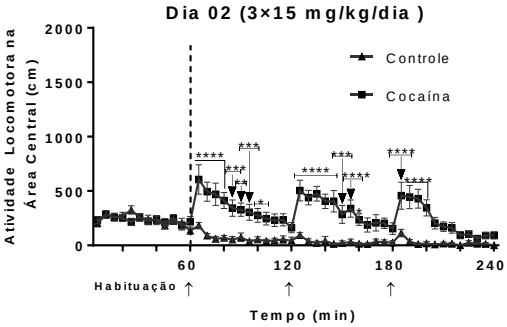

Dia 12 (3×25 mg/kg/dia)
Atividade Locomotora na Área Periférica (cm)
8000
6000
4000
2000
0
Controle
Cocaína
Habituação
60
120
180
240
Tempo (min)

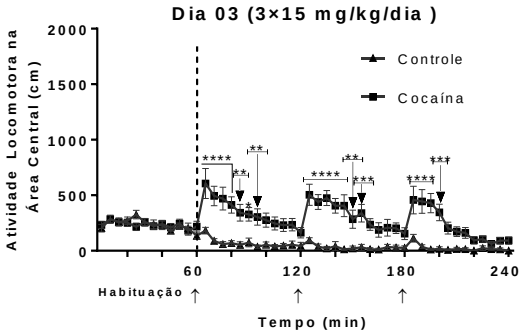

Dia 13 (3×30 mg/kg/dia)
Atividade Locomotora na Área Periférica (cm)
8000
6000
4000
2000
0
Controle
Cocaína
Habituação
60
120
180
240
Tempo (min)

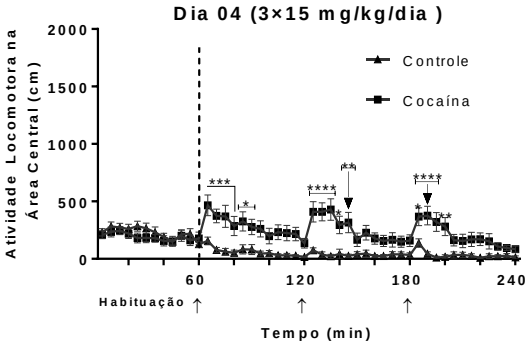

Dia 14 (3×30 mg/kg/dia)
Atividade Locomotora na Área Periférica (cm)
8000
6000
4000
2000
0
Controle
Cocaína
Habituação
60
120
180
240
Tempo (min)

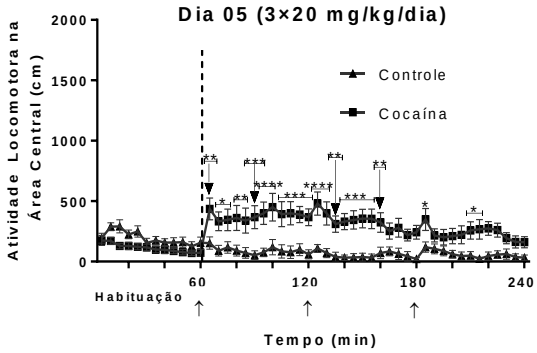
Anexo D: Atividade locomotora na área central do campo aberto

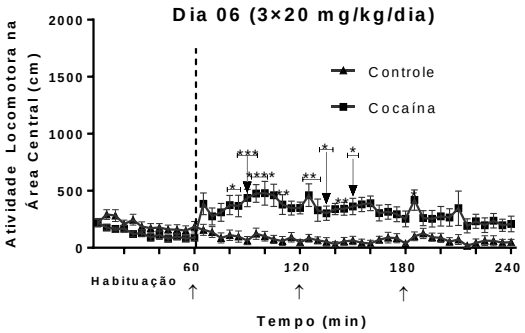


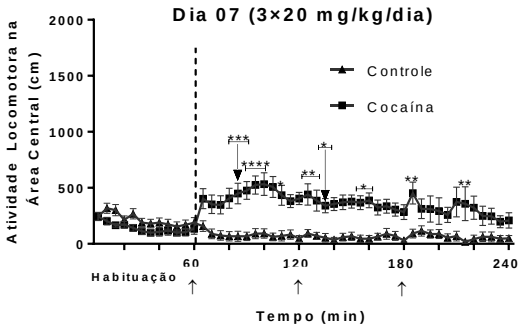


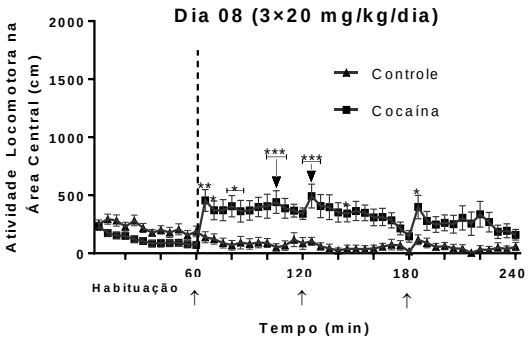


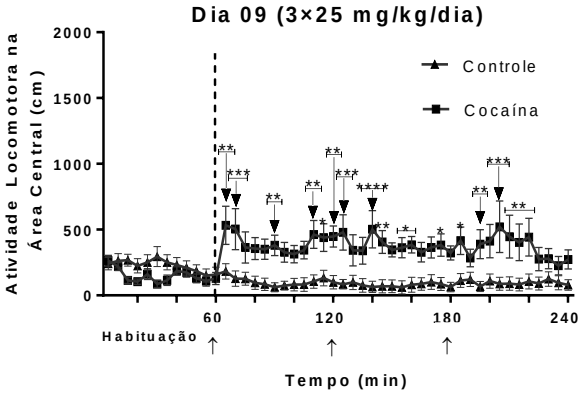


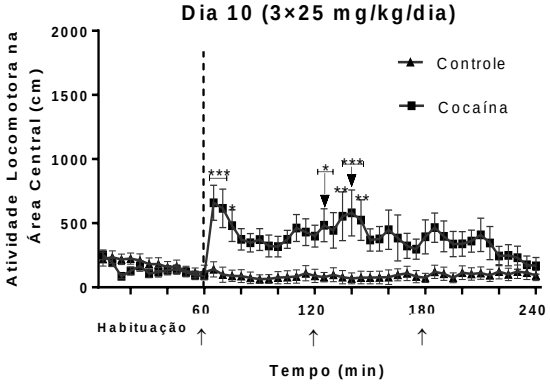


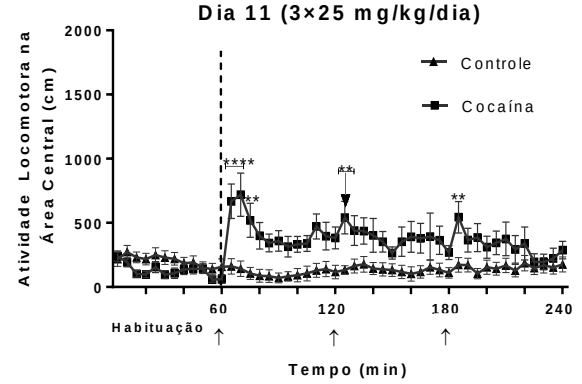


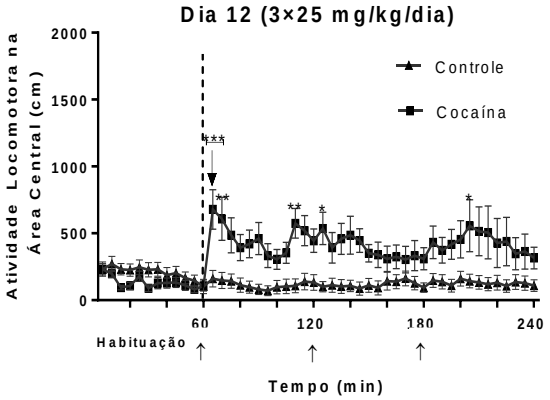


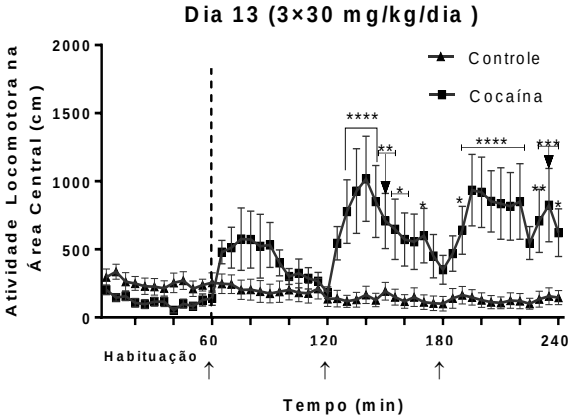


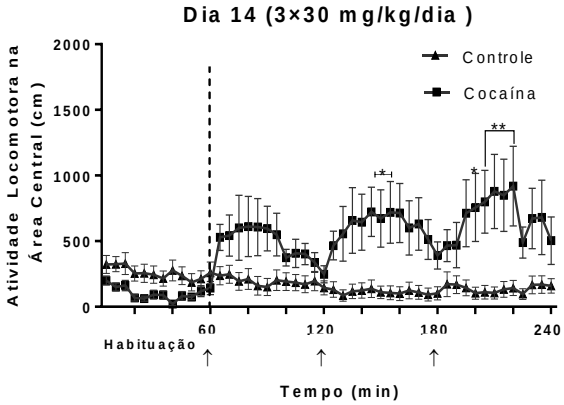

Dia 09 (3×25 mg/kg/dia)
Atividade Locomotora na Área Central (cm)
Controle
Cocaína
Habituação
Tempo (min)


Dia 10 (3×25 mg/kg/dia)
Atividade Locomotora na Área Central (cm)
Controle
Cocaína
Habituação
Tempo (min)

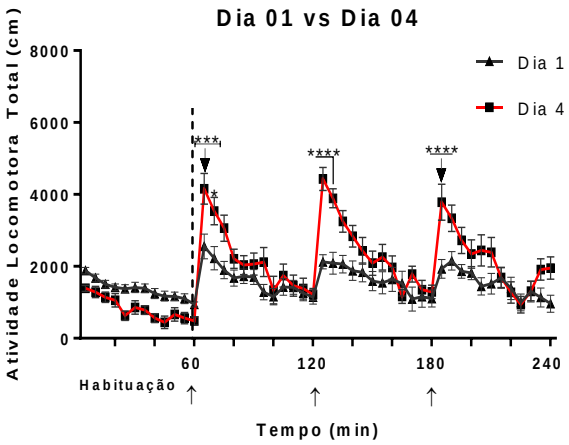

Dia 11 (3×25 mg/kg/dia)
Atividade Locomotora na Área Central (cm)
Controle
Cocaína
Habituação
Tempo (min)

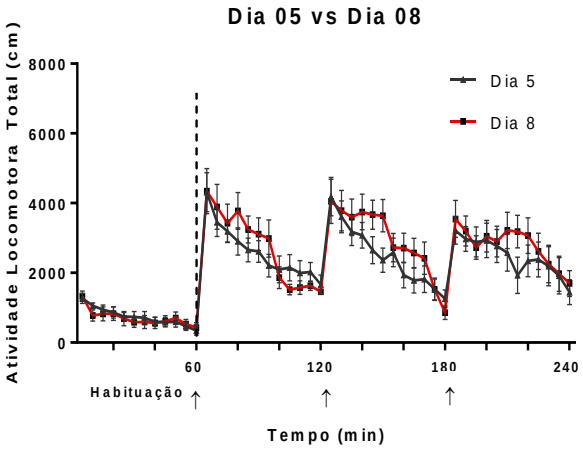

Dia 12 (3×25 mg/kg/dia)
Atividade Locomotora na Área Central (cm)
Controle
Cocaína
Habituação
Tempo (min)

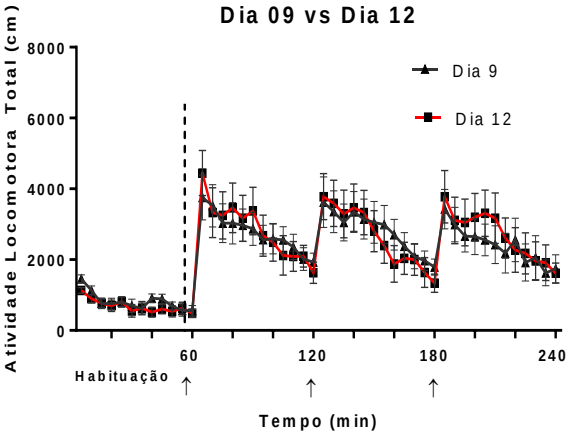

Dia 13 (3×30 mg/kg/dia)
Atividade Locomotora na Área Central (cm)
Controle
Cocaína
Habituação
Tempo (min)

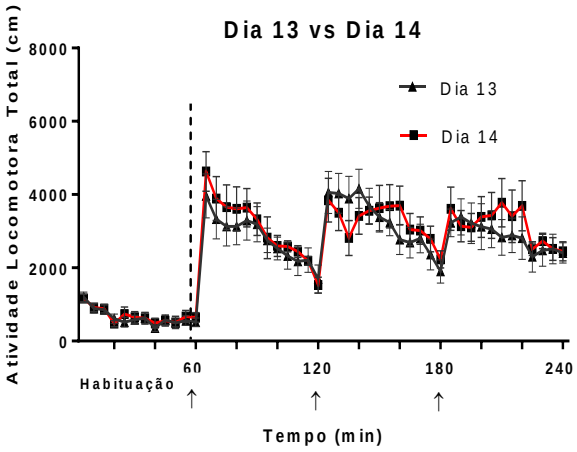

Dia 14 (3×30 mg/kg/dia)
Atividade Locomotora na Área Central (cm)
Controle
Cocaína
Habituação
Tempo (min)

Anexo E: Análises do primeiro e último dia de cada dose do tratamento crônico









Anexo F: Resumo dos resultados obtidos nas análises de *Western Blotting*.

Proteínas	Tratamento agudo			Tratamento crônico		
	Córtex pré-frontal	Estriado	Hipocampo	Córtex pré-frontal	Estriado	Hipocampo
M_1 mAChRs	↓	↑	↓	↓	↓	↓
M_2 mAChRs	↑	↑	↑	-	↓	-
M_3 mAChRs	-	-	-	-	-	-
M_4 mAChRs	↑	-	-	-	-	-
M_5 mAChRs	-	-	-	↓	-	-
ChAT	↓	↑	-	-	↑	-
VAChT	-	-	↑	-	↑	↑
AChE	-	-	-	-	-	-

As setas representam as diminuições e os aumentos em relação aos controles, os traços representam diferenças não significativas.

Anexo G: Ficha do aluno

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 8873746/1 - Yuli Yohana Serna Torres

Email:	johana2716@usp.br
Cédula de Identidade:	RNE - G054960-R - DF
Local de Nascimento:	Peru
Nacionalidade:	Peruana
Graduação:	Farmacia y Bioquimica - Universidad Nacional Mayor de San Marcos - Peru - 2015

Curso:	Mestrado
Programa:	Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula:	08/07/2015
Início da Contagem de Prazo:	08/07/2015
Data Limite para o Depósito:	05/11/2018
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Tania Marcourakis - 08/07/2015 até o presente. Email: tmarcour@usp.br
Co-orientador:	Prof(a). Dr(a). Raphael Caio Tamborelli Garcia - 03/02/2016 até o presente. Email: raphael.garcia@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 08/07/2015 Português, Aprovado em 04/04/2016
Licença(s) Maternidade:	180 dias Período de 18/05/2017 até 13/11/2017
Prorrogação(ões):	120 dias Período de 07/07/2018 até 04/11/2018
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 30/08/2016
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 08/07/2015 Licença Maternidade em 18/05/2017 Prorrogação em 26/06/2018

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 16/07/2018
Impresso em: 25/10/2018 01:09:13

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 8873746/1 - Yuli Yohana Serna Torres

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5734-3/1	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	03/08/2015	09/08/2015	30	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBC5802-3/7	Tópicos Avançados em Toxicologia I	04/08/2015	16/11/2015	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5780-2/3	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	10/08/2015	21/09/2015	90	6	94	B	N	Concluída
FBC5803-3/6	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	18/08/2015	31/08/2015	30	2	100	A	N	Concluída
BMB5759-7/3	Progressos no Estudo das Bases Estruturais, Fisiológicas e Farmacológicas de Sistemas de Neurotransmissores (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	07/03/2016	27/06/2016	45	3	80	A	N	Concluída
BMB5795-4/5	Neurociência Básica (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	14/04/2016	30/06/2016	120	8	100	C	N	Concluída
FBA5728-4/2	Aprimoramento Pedagógico	31/05/2016	27/06/2016	60	4	100	A	N	Concluída
VPT5727-7/3	Toxicologia do Sistema Nervoso Central: Aspectos Comportamentais (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo)	02/08/2016	12/09/2016	90	6	75	C	N	Concluída
FBC5818-3/1	Neurotoxicidade Provocada por Xenobióticos e sua Relação com Doenças Neurodegenerativas	17/10/2016	21/11/2016	45	0	-	-	N	Turma cancelada
FBC5818-3/3	Neurotoxicidade Provocada por Xenobióticos e sua Relação com Doenças Neurodegenerativas	07/05/2018	10/06/2018	45	3	90	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	33
Estágios:			
Total:	0	25	33

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 16/07/2018
Impresso em: 25/10/2018 01:09:13

Anexo H: Informações para os membros de Bancas Julgadoras de mestrado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1. Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1. Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2. Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 05 de maio de 2017.

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento
Presidente da CPG/FCF/USP