

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA

LORENA BIANCHINE AREAL DE AZEVEDO

**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICAS E MOLECULARES EM
MODELO ANIMAL DE INALAÇÃO CRÔNICA DE “CRACK”: PAPEL DOS
SISTEMAS DOPAMINÉRGICO E ENDOCANABINÓIDE NO CÓRTEX PRÉ-
FRONTAL.**

Vitória

2014

LORENA BIANCHINE AREAL DE AZEVEDO

ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICAS E MOLECULARES EM
MODELO ANIMAL DE INALAÇÃO CRÔNICA DE “CRACK”: PAPEL DOS
SISTEMAS DOPAMINÉRGICO E ENDOCANABINÓIDE NO CÓRTEX PRÉ-
FRONTAL.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Área de concentração: Bioquímica

Orientadora: Rita Gomes Wanderley Pires

Co-orientadora: Cristina Martins e Silva

Vitória

2014

LORENA BIANCHINE AREAL DE AZEVEDO

Alterações comportamentais, bioquímicas e moleculares em modelo animal de inalação crônica de “crack”: papel dos sistemas dopaminérgico e endocanabinóide no córtex pré-frontal.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Área de concentração: Bioquímica

Orientadora: Rita Gomes Wanderley Pires

Co-orientadora: Cristina Martins e Silva

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Rita Gomes Wanderley Pires (Orientadora) - UFES

Prof.^a Dr.^a Cristina Martins e Silva (Co-orientadora) – UFES

Prof.^a Dr.^a Ana Paula Santana de Vasconcellos Bittencourt - UFES

Prof.^a Dr.^a Fabiola Mara Ribeiro - UFMG

Vitória

2014

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre colocar as oportunidades certas em meu caminho, mesmo que por vezes eu não tenha compreendido inicialmente.

À minha família, pelo apoio incondicional às minhas escolhas profissionais. Agradeço especialmente aos meus pais, que sempre me incentivaram na busca ao conhecimento e fizeram todo o possível para o meu crescimento, são meus exemplos de coragem e dedicação.

À Polícia Civil do Estado do Espírito Santo pela viabilização de parte indispensável à execução do projeto, especialmente ao Fabrício e à Josidéia pelas contribuições.

Às minhas professoras orientadoras Rita e Cristina, que são grandes inspirações profissionais para mim. Obrigada por confiarem no meu trabalho e acreditarem em mim de uma forma que por vezes eu não sabia se conseguiria corresponder. Dessa forma sempre me fizeram ir mais longe do que eu acreditava. Agradeço pela constante disponibilidade em ajudar, pela compreensão, pelo diálogo aberto, pelo apoio de sempre.

À Prof.^a Dr.^a Ester Miyuki Nakamura Palácios pela imensa colaboração com este trabalho.

Aos colegas de turma, pela união nos momentos de “sofrimento”, pelas amizades conquistadas, pelas risadas e momentos de descontração que ajudaram a deixar tudo mais tranquilo. Levo vocês no coração!

Aos amigos do Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental, sempre juntos e dispostos a ajudar, seja com a “mão-na-massa” ou com a companhia.

Ao Laboratório Multiusuário de Análise Biomolecular.

Aos professores Alexandre Martins, Maria Aparecida Cicilini, Lívia Carla de Melo, Letícia Rangel, pelas contribuições.

Aos professores membros do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia pelas críticas construtivas e sugestões dadas durante as apresentações do projeto e qualificação, que certamente contribuíram com o trabalho.

Aos alunos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer Humano por manterem as portas sempre abertas para as minhas frequentes “visitas” para utilizar o equipamento de real time PCR.

Ao meu noivo, Jonas Magnago, por entender e incentivar a carreira que eu decidi seguir, por compreender os momentos de ausência e estresse nesta etapa, e por transmitir a todos o orgulho que tem da “noiva cientista”.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo pela bolsa de mestrado concedida e apoio financeiro ao projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia por esta oportunidade, que me proporcionou um imenso crescimento profissional e pessoal.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.” – Madre Teresa de Calcuta

RESUMO

A adição ao crack tem se apresentado como um grave problema social e de saúde pública no mundo, principalmente em países emergentes como o Brasil. Esta droga, que tem a cocaína como princípio ativo, possui maior potencial de abuso em relação às formas cheirada e inalada, além de estar relacionada a maiores índices de violência e a um descontrole comportamental característico. O presente estudo objetivou verificar a ocorrência de alterações comportamentais, bioquímicas e moleculares em modelo animal de inalação crônica de “crack”, focando nos sistemas dopaminérgico e endocanabinóide no córtex pré-frontal. Dados na literatura sugerem um envolvimento desses sistemas nos mecanismos da adição à cocaína, mas essa relação no córtex pré-frontal, principal região responsável pelo controle comportamental, ainda não está bem elucidada. Camundongos C57BL/6 machos foram divididos em um grupo controle e um grupo crack, sendo o último submetido a duas inalações diárias de crack, por um período de 11 dias. As concentrações de cocaína e seus metabólitos, com destaque à metilecgonidina (MEG), no sangue dos animais, foram avaliadas por GC-MS. A concentração de MEG, um metabólito exclusivo do crack, com maior potencial neurotóxico do que a cocaína em si e neurotoxicidade aditiva quando associado a ela, foi muito maior do que a da própria cocaína e, também, maior do que já descrito em outros trabalhos. Observou-se que os animais expostos ao crack apresentaram hiperlocomoção durante todo o experimento, mas não houve diferença ao longo das sessões de inalação. Além disso, esses camundongos apresentaram um comportamento peculiar, caracterizado por pulos repetitivos nos cantos da caixa durante teste no campo aberto, aparentando uma tentativa de fuga, e a frequência desse comportamento aumentou ao longo das inalações. Após avaliação da expressão gênica no córtex pré-frontal por qPCR, verificou-se que os níveis de mRNA de Δ FosB, um fator de transcrição importante no desenvolvimento da adição, estava aumentada nos animais submetidos à inalação de crack. Os genes dos receptores dopaminérgicos D1R, D2R e D3R, além da enzima de síntese de dopamina tirosina hidroxilase, apresentaram *upregulation* nos animais do grupo crack, enquanto que genes relacionados ao sistema endocanabinóide, como o receptor CB1 e as enzimas de degradação FAAH e MAGL, apresentaram *downregulation*. Essas alterações

também foram observadas na expressão proteica. Além disso, por meio da quantificação por HPLC, observou-se uma diminuição dos níveis de dopamina e seus metabólitos no córtex pré-frontal dos animais submetidos à inalação de crack. Avaliando em conjunto os dados obtidos, o protocolo experimental e as informações encontradas na literatura, podemos inferir que após onze dias de inalação de crack os camundongos se encontraram em um estágio de dessensitização do sistema mesocorticolímbico, e que os efeitos observados nos sistemas dopaminérgico e endocanabinóide no córtex pré-frontal podem ser os mediadores dessa neuroadaptação. Considerando que a inalação crônica de crack promoveu alterações ainda não descritas para modelos com cloridrato de cocaína, e que os níveis de MEG encontrados no sangue dos animais submetidos à inalação foi muito maior do que os da cocaína, surge a possibilidade dessas alterações serem mediadas pelo MEG, e não apenas pela cocaína.

Palavras-chave: crack, córtex pré-frontal, sistema dopaminérgico, sistema endocanabinóide.

ABSTRACT

Crack cocaine addiction is a major social and health problem. This drug has higher abuse potential compared to other forms of cocaine, and it's more related to criminality and impaired control over behavior. This study aimed to evaluate behavioral, biochemical and molecular changes in a chronic crack cocaine inhalation model, focusing on dopaminergic and endocannabinoid systems in prefrontal cortex. It has been suggested an involvement of these systems in cocaine addiction, but this interaction in the prefrontal cortex, the main region involved in behavioral control, remains unclear. Male C57 BL/6 mice were divided into control or crack cocaine group. Mice from crack cocaine group were submitted to two inhalation sessions of crack cocaine a day, for an eleven days period. Locomotor activity was assessed after the exposure and mice from crack cocaine group exhibit hyperlocomotion in all sessions, however, there was no difference over the inhalation days. Moreover, these animals exhibit a particular behavior that was called "escape jumping", consisting in repetitive jumps in the corner of the open field, and the frequency of this jumps increased statistically with a time effect. GC-MS of blood collected right after the last inhalation session for quantification of cocaine and its metabolites, revealed that methylecgonidine (MEG) concentration was much higher than cocaine itself in mice exposed to crack cocaine. MEG is an exclusive crack cocaine metabolite and it was shown that this metabolite had greater neurotoxic potential than cocaine itself, and an additive neurotoxicity when associated to cocaine. Gene expression analyses by real time PCR revealed that Δ FosB mRNA levels, a key molecule in the establishment of addiction, were increased in the prefrontal cortex of mice submitted to crack cocaine exposure. Concerning the genes from dopaminergic and endocannabinoid systems, it was observed that chronic crack cocaine inhalation promoted upregulation of dopamine receptors and tyrosine hydroxylase, while most genes related to endocannabinoid system, CB1 receptor and cannabinoid degradation enzymes, were downregulated. Also, dopamine and its metabolites, dopac and hva levels assessed by HPLC were reduced in prefrontal cortex of mice exposed to crack cocaine inhalation for eleven days. Taking together our data, the regimen of drug exposure and data found in literature, it is possible to suggest that after eleven days of crack cocaine exposure mice developed neuroadaptations in order to reduce reinforcement mechanisms, and that dopaminergic and endocannabinoid systems might be mediators of this process. Since our data shows alterations produced by crack cocaine exposure that were never described previously in cocaine hydrochloride models, and considering the much higher levels of MEG than cocaine found, we could raise the possibility that those alterations might be mediated by MEG and not only by cocaine.

Keywords: crack cocaine, prefrontal cortex, dopaminergic system, endocannabinoid system.

LISTA DE ABREVIATURAS

- 2-AG – 2-aracdonoilglicerol
- AEA – Anandamida
- AEME – Anidroecgonina metil éster
- AMPc – Adenosina monofosfato cíclico
- ATP – Adenosina trifosfato
- BEG – Benzoilecgonina
- EME – Ecgonina metil éster
- CB1R – Receptor canabinóide 1
- COMT – Catecol orto-metiltransferase
- CPF – Córtex pré-frontal
- CREB – Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico
- D1R – Receptor de dopamina 1
- D2R – Receptor de dopamina 2
- D3R – Receptor de dopamina 3
- DA – Dopamina
- DAGL – Diacilglicerol lipase
- DAT – Transportador de dopamina
- DOPAC – Ácido dihidroxifenilacético
- eCBs – Endocanabinóides
- FAAH – Amida hidrolase de ácidos graxos
- GABA – Ácido gama-aminobutírico
- HVA – Ácido homovanílico
- MAGL – Monoacilglicerol lipase
- MAO – Monoamina oxidase
- MEG – Metilecgonidina
- NAcb – Núcleo Accumbens

N-PLD – N-acilfosfatidiletanolamida específica- fosfolipase D

SNC – Sistema Nervoso Central

VTA – Área tegmental ventral

Δ FosB – Delta FosB

qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Amostra de pedra de crack apreendida pela Delegacia de Entorpecentes da cidade de Vitória, ES.	16
Figura 2 – Produtos do metabolismo e pirólise da cocaína.	19
Figura 3 – Efeito da cocaína na neurotransmissão dopaminérgica.	20
Figura 4 – O circuito de recompensa.	23
Figura 5 – Sinalização retrógrada do sistema endocanabinóide resultando na inibição da liberação de neurotransmissores.	28
Figura 6 – A ativação de receptores canabinóides induz alterações na regulação da expressão gênica.	29
Figura 7 – Aparato de inalação de crack utilizado no estudo.	37
Figura 8 – Cromatograma de detecção de cocaína e metabólitos	47
Figura 9 – Avaliação comportamental. A e B: Média \pm erro padrão da atividade locomotora. C e D: Média \pm erro padrão da frequência de pulos.	49
Figura 10 – Expressão relativa de mRNA de genes relacionados à adição, normalizada com o gene da β -actina.	50
Figura 11 – Expressão relativa de mRNA de genes do sistema dopaminérgico, normalizada com o gene da β -actina.	51
Figura 12 – Expressão relativa de mRNA de genes do sistema dopaminérgico, normalizada com o gene da β -actina.	53
Figura 13 – Análise da expressão proteica do DAT por imunoblot	53
Figura 14 – Efeitos do crack nos níveis de dopamina e seus metabólitos no córtex pré-frontal.	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 A história do crack.....	15
1.2 Cocaína e o sistema dopaminérgico.....	19
1.3 O sistema endocanabinóide na adição à cocaína	27
1.4 Envolvimento dos sistemas dopaminérgico e endocanabinóide na adição à cocaína: enfoque no córtex pré-frontal.....	30
2 JUSTIFICATIVA	33
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo geral	35
3.2 Objetivos específicos.....	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Animais.....	36
4.2 Droga e protocolo de inalação	36
4.3 Avaliação da concentração sanguínea de cocaína, metilecgonidina, benzoilecgonidina e ecgonina metil éster.....	38
4.4 Avaliação comportamental	39
4.5 Avaliação da expressão gênica.....	40
4.5.1 Extração de RNA total	40
4.5.2 Eletrofose em gel de agarose desnaturante	40
4.5.3 Síntese de cDNA	41
4.5.4 Reação de PCR em tempo real.....	41
4.5.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida	43
4.6 Imunoblot.....	44
4.7 Dosagem de dopamina, DOPAC e HVA	45
5 RESULTADOS	47
5.1 Modelo animal de inalação de crack.....	47
5.2 Avaliação comportamental	47
5.3 Avaliação da expressão gênica no córtex pré-frontal	49
5.4 Expressão proteica	53
5.5 Quantificação de dopamina, DOPAC e HVA no córtex pré-frontal.....	54
6 DISCUSSÃO	55

7 CONCLUSÃO	64
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 A história do crack

A história das civilizações apresenta indícios de que o ser humano sempre procurou manipular o poder herbário em busca da alteração da consciência e do estado emocional. Portanto, o uso de substâncias psicoativas pode ser considerado uma prática milenar e universal (PACHECO, 2004). No entanto, há muitos anos, o abuso de drogas vem sendo tratado como um grave problema social e de saúde pública, devido às suas consequências devastadoras para a sociedade. De acordo com o relatório anual mundial sobre o uso de drogas do UNODC (Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime-2010), bilhões de dólares são gastos anualmente na prevenção e tratamento de usuários de drogas em todo o mundo. A droga ilícita mais utilizada mundialmente é a maconha, seguida de estimulantes como anfetaminas, cocaína e crack, e drogas opióides (UNODC, 2010). Enquanto o uso de cocaína nos EUA, maior mercado do mundo, vem diminuindo nos últimos anos, aumentos significativos têm sido observados na Ásia, Oceania, Caribe, América Central e América do Sul (UNODC, 2013). O Brasil representa 20% do consumo mundial de cocaína/crack e é considerado o maior mercado de crack do mundo (LARANJEIRA et al., 2012).

A cocaína é um psicoestimulante que conquistou extrema popularidade como droga recreativa ilícita entre os anos 70 a 90 (SIEGEL et al., 1982, MARANDA et al., 2004, Goldstein e col., 2009). Contudo, é milenar o uso terapêutico da cocaína. As folhas da planta *Erythroxylum coca* sempre foram utilizadas em chás ou mesmo mastigadas por habitantes das regiões do Peru e Bolívia como alívio para cansaço, fome e aumento da resistência ao frio (GOLDSTEIN et al., 2009). No início do século XX, as propriedades da cocaína eram empregadas com as mais diversas finalidades, como tônicos cerebrais, tratamento para dor de dente e anestésico local. Entretanto, os efeitos colaterais relatados, tais como dependência, comportamento psicótico e óbito levaram à proibição da cocaína e a restrição ao acesso pela população, tornando-a então uma droga de abuso ilícita (MARANDA et al., 2004, GOLDSTEIN et al., 2009).

Nos anos 70, o consumo generalizado da cocaína aumentou principalmente como droga recreativa (MARANDA et al., 2004). Durante essa fase de grande popularidade da cocaína a população de classe média com escolaridade superior foram os maiores consumidores, em decorrência do alto custo do entorpecente (HATSUKAMI et al., 1996). A cocaína é obtida a partir da maceração das folhas de *Erythroxylum coca* com um solvente, como o éter, formando-se a pasta base de cocaína, que, por sua vez, é tratada com ácido clorídrico refinando-se o produto e obtendo-se o cloridrato de cocaína. O cloridrato de cocaína é um pó branco facilmente solúvel em água e comumente administrado por via nasal ou intravenosa. Devido ao seu alto ponto de fusão (196°C, sofrendo decomposição a essa temperatura) essa forma não pode ser fumada (CHASIN et al., 2008).

A partir do início dos anos 90, a forma fumada da cocaína (crack) difundiu-se mundialmente (TOENNES et al., 1999, MARANDA et al., 2004). Diversos fatores contribuíram para o aumento no uso do crack nos últimos anos, incluindo o baixo custo de aquisição quando comparado à cocaína em pó, a intensidade e rapidez do efeito produzido por essa droga, e o menor risco de transmissão de HIV e hepatite C uma vez que não há o compartilhamento de agulhas (COSTA-LEITE; ANDRADE, 1999). A inalação do cloridrato de cocaína requer entre 3 a 5 minutos para o início do efeito estimulante, enquanto que o efeito da cocaína fumada se inicia dentro de 5 a 8 segundos (HAIM et al., 1995). A rapidez e maior intensidade do efeito da cocaína obtido com o uso do crack contribuem para um maior potencial de abuso da droga, bem como maior propensão à dependência quando comparado a outras vias de administração.



Figura 1. Amostra de pedra de crack apreendida pela Delegacia de Entorpecentes da Polícia Civil do Espírito Santo e utilizada nos experimentos.

O crack pode ser obtido a partir do aquecimento de uma solução aquosa de cocaína, adicionada a uma substância básica (frequentemente o bicarbonato de sódio ou amônia). É formada uma fase oleosa que posteriormente é resfriada para que a base livre precipite obtendo-se cristais irregulares (Figura 1). Essas “pedras” obtidas podem ser fumadas e durante a queima produzem um som característico que lhe conferiu o nome “crack” (GARCIA, 2009). Por conter frequentemente um teor de cocaína menor do que a forma em pó e sofrer grande adulteração, essa nova forma de produção permitiu o barateamento da droga, tornando-a mais acessível aos consumidores de menor renda, fator que contribuiu para sua rápida disseminação (MARANDA et al., 2004). Essa nova forma de cocaína gerou uma mudança nos padrões de consumo e no perfil dos usuários.

Um estudo realizado pela Fundação Oswaldo Cruz em parceria com a Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas (MS-Brasil) em 2013, revelou que aproximadamente 370.000 pessoas fazem uso regular de crack e/ou similares nas capitais no país, o que corresponde a 35% dos consumidores de drogas ilícitas com exceção da maconha. Além disso, estima-se que cerca de 40% dos usuários se encontram em situação de rua enquanto que aproximadamente 55% possuem moradia própria ou alugada. Esses usuários consomem em média 16 pedras de crack por dia (BASTOS; BERTONI, 2013).

Além da intensa sensação de prazer e euforia, o crack provoca no usuário um estado de hiperatividade, insônia e perda do apetite, que leva a uma exacerbada perda de peso característica. O crack apresenta maior potencial de abuso em comparação à cocaína em pó, bem como maior propensão à violência e atos criminosos (SCHIFANO; CORKERY, 2008). Como os efeitos do crack são rápidos e intensos, mas, de curta duração, a “fissura” pelo crack é avassaladora, o que leva o usuário a uma busca incontrolável pela droga independente das possíveis consequências.

Estudos revelam que o abuso de crack está relacionado a déficits cognitivos, resultando em baixo desempenho em testes de atenção, memória verbal e visual, capacidade de aprendizagem e danos em funções executivas, em processos de controle e integração destinados à execução de um comportamento (BOLLA, 1999; CUNHA et al., 2004; MEYER et al., 2014). Esses déficits cognitivos podem estar

relacionados a problemas em regiões cerebrais frontais e temporais (CUNHA et al., 2004). Alterações neuroquímicas no lobo frontal observadas em indivíduos com histórico de dependência ao crack se mostraram persistentes mesmo após a descontinuação do uso da droga por longo período (CHANG et al., 1999)

Durante o fumo do crack, o aquecimento da cocaína gera um produto denominado metilecgonidina (MEG), também conhecido como anidroecgonina metil éster (AEME) ou éster metil anidroecgonina (EMA) (figura 2). Esse composto é gerado exclusivamente a partir da pirólise da cocaína, sendo, portanto, um marcador analítico do uso do crack (WOOD et al., 1996; TOENNES et al., 1999). Um estudo de viabilidade celular em cultura primária de células hipocâmpais de ratos revelou que o MEG apresenta um potencial neurotóxico maior do que a própria cocaína, e que, quando associados, ocorre um efeito aditivo, sugerindo um maior risco de neurotoxicidade com o uso do crack em comparação ao uso da cocaína em pó (GARCIA et al, 2012). Ao utilizar essa via de administração, tanto a cocaína quanto MEG são volatilizadas, inaladas e absorvidas através dos alvéolos pulmonares. Um estudo realizado por Scheidweiler et al. (2003), em ovelhas, mostrou que ambas as substâncias apresentaram volume de distribuição aparente maior do que o volume sanguíneo das ovelhas, sugerindo que estas se distribuem para os demais tecidos. Nesse mesmo estudo, uma dose de 4mg/kg de cocaína apresentou meia-vida de 10,6 minutos, enquanto que 3mg/kg de MEG apresentou meia-vida entre 16,3 e 17,8 minutos.

Uma vez absorvida, a cocaína atinge rapidamente o SNC e exerce seus efeitos principalmente no sistema dopaminérgico, desencadeando uma hiperestimulação desse sistema (RITZ et al., 1990).

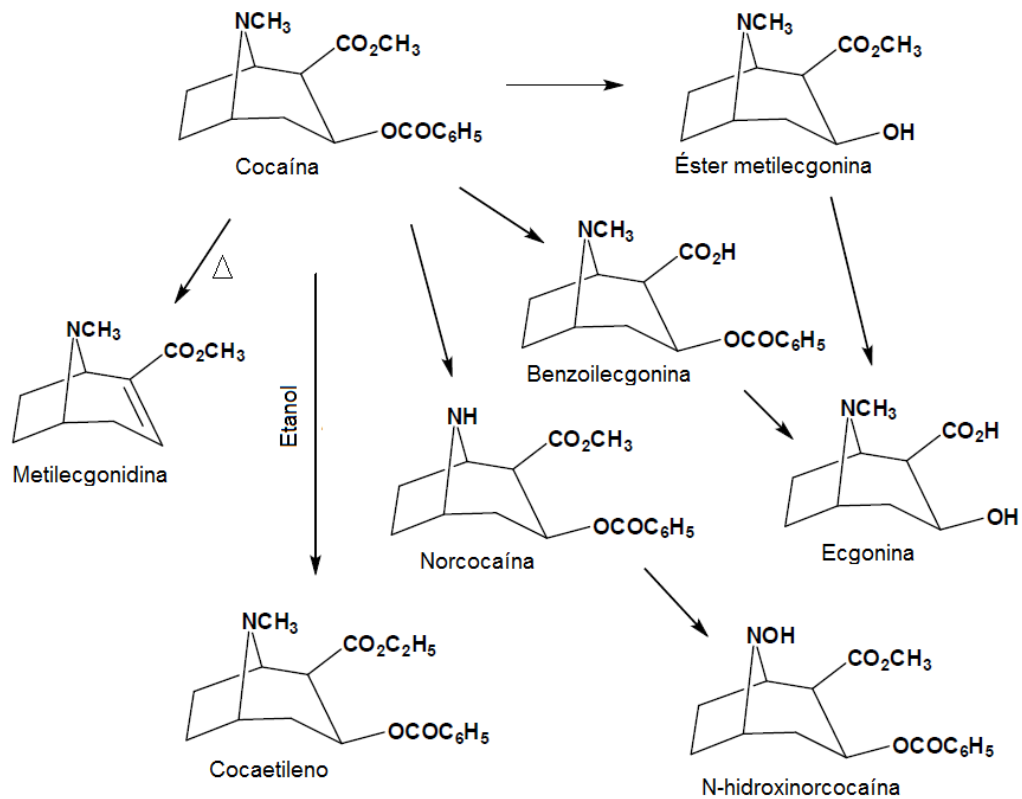


Figura 2. Produtos do metabolismo e pirólise da cocaína (CHASIN et al., 2008; GARCIA, 2009).

1.2 Cocaína e o sistema dopaminérgico

A maioria das drogas de abuso afeta, direta ou indiretamente, a neurotransmissão dopaminérgica. A cocaína inibe a recaptção de monoaminas, principalmente da dopamina, no SNC (RITZ et al., 1990). O bloqueio do transportador de dopamina (DAT) leva ao acúmulo do neurotransmissor na fenda sináptica, com conseqüente hiperestimulação dos neurônios pós-sinápticos no sistema mesolímbico, gerando os sintomas clássicos de euforia e agitação (Figura 3).

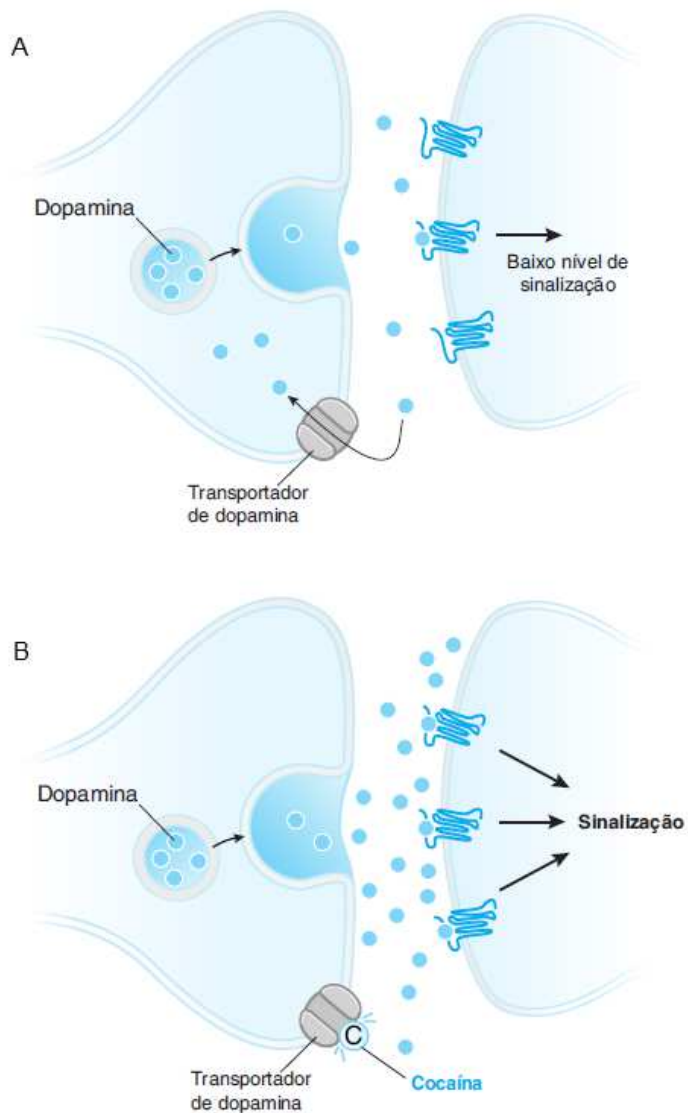


Figura 3. Efeito da cocaína na neurotransmissão dopaminérgica (SWIFT; LEWIS, 2013). A- neurotransmissão dopaminérgica normal; B- bloqueio da receptação de dopamina pela cocaína promovendo acúmulo do neurotransmissor na fenda sináptica e subsequente aumento da sinalização pós-sináptica.

A síntese de dopamina ocorre nos terminais dos neurônios dopaminérgicos a partir de seu precursor, o aminoácido tirosina, em um processo envolvendo dois passos enzimáticos. Primeiramente, a tirosina sofre ação da enzima tirosina hidroxilase (TH) convertendo-se em dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Essa enzima requer ferro e tetrahidrobiopterina como co-fator e sua ação representa a etapa limitante da síntese de dopamina. A L-DOPA recém-produzida é rapidamente convertida em dopamina (DA) por ação da enzima aminoácido aromático

descarboxilase, também conhecida como DOPA descarboxilase, que utiliza o fosfato de piridoxal como co-fator (BRUNTON et al., 2012; STANDAERT; GALANTER, 2013)

Após ser sintetizada, a dopamina é armazenada em vesículas pelo transportador vesicular de monoaminas (VMAT2) e, com a chegada do potencial de ação, os canais de cálcio voltagem-dependentes se abrem permitindo o influxo de Ca^{2+} , que promove a fusão das vesículas com a membrana pré-sináptica liberando a DA na fenda sináptica (BRUNTON et al., 2012; STANDAERT; GALANTER, 2013)

O sinal produzido pela ativação dos receptores pós-sinápticos pela dopamina pode ser interrompido de diferentes formas. Na membrana pré-sináptica estão localizados os transportadores de dopamina (DAT) que realizam a recaptação de aproximadamente 80% da DA liberada. (HALBACH; DERMIETZEL, 2006). Uma vez recaptada pela célula pré-sináptica, a DA pode ser reciclada em vesículas para uso subsequente na neurotransmissão (pelo VMAT2) ou pode ser degradada pela ação da enzima monoamina oxidase (MAO), especialmente pela isoforma B (MAO-B). A ação da MAO, juntamente com a aldeído desidrogenase, produz como metabólito o ácido dihidróxifenilacético (DOPAC). Parte da dopamina que não é recaptada pode ser degradada pela ação da catecol-O-metil transferase (COMT) produzindo ácido-homovanílico (HVA), que também pode ser originado pelo metabolismo de DOPAC, por essa mesma enzima. Em humanos, o HVA é o principal metabólito da dopamina, enquanto que em roedores o metabólito principal é o DOPAC (COOPER, 1996; STANDAERT; GALANTER, 2013)

Os receptores dopaminérgicos são receptores acoplados à proteína G e se dividem em 2 classes: receptores do tipo D1 (*D1-like*) e receptores do tipo D2 (*D2-like*). A classe D1 contempla os subtipos D1 e D5, que são acoplados a proteína $G_{s/olf}$, portanto aumentam a produção de AMPc por ativarem a enzima adenilato ciclase, e são encontrados pós-sinápticamente em neurônios dopamino-receptivos. Já a classe D2 contempla os subtipos D2, D3 e D4, ambos acoplados a proteína $G_{i/o}$, diminuem a concentração de AMPc após ativação e estão localizados tanto pós-sinápticamente como pré-sinápticamente em neurônios dopaminérgicos (RANKIN et al., 2010; BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011). Ao contrário da classe D1, que não apresenta íntrons nas suas regiões codificantes, os genes que codificam receptores *D2-like* possuem vários íntrons, permitindo a formação de variantes de *splicing*. As mais importantes são as isoformas curta (D2S) e longa (D2L) dos receptores D2R,

em que a isoforma longa possui adicionalmente 29 aminoácidos na terceira alça intracelular. Enquanto D2L é mais expressa em neurônios pós-sinápticos, D2S é mais expressa pré-sinápticamente e atua principalmente como auto-receptor, regulando a liberação de dopamina (DE MEI et al., 2009).

Estruturalmente, os receptores dopaminérgicos possuem sete domínios transmembrana, três alças extracelulares e três alças intracelulares, sendo que a família de receptores D1 apresenta uma longa cauda C-terminal e uma alça citoplasmática curta entre as hélices transmembranares 5 e 6, enquanto a família de receptores D2 apresenta uma cauda C-terminal curta e uma longa alça citoplasmática entre as hélices 5 e 6 (BEAULIEU;GAINETDINOV, 2011). Essas diferentes proteínas receptoras estão distribuídas de forma distintas pelo sistema nervoso central (SNC). D1 e D2 são altamente expressos no corpo estriado, núcleo accumbens (NAcb), substância negra, tubérculo olfatório e córtex pré-frontal. Receptores D3 tem maior distribuição no NAcb, tubérculo olfatório e área tegmental ventral, enquanto que D4 é mais encontrado no córtex pré-frontal, mesencéfalo e amígdala. Já os receptores D5 são expressos em baixos níveis e localizam-se principalmente no hipocampo, hipotálamo e tubérculo olfatório. (KVERNMO et al, 2006; BRUNTON et al., 2012).

Dentre os variados receptores dopaminérgicos, os que têm se mostrado mais relacionados a aspectos motivacionais, de reforço e recompensa, além de aprendizagem e memória, são D1, D2 e D3. Isso se deve em grande parte à distribuição desses receptores, visto que são muito expressos em regiões que participam do sistema mesocorticolímbico dopaminérgico. Alterações nesse sistema são as principais responsáveis pelos efeitos observados no abuso de drogas.

Apesar de apresentarem diferentes mecanismos de ação, as drogas de abuso produzem alguns efeitos em comum no sistema nervoso central, destacando-se a ativação do sistema mesolímbico dopaminérgico. Esse circuito está envolvido na modulação das respostas que envolvem uma recompensa, regulando as respostas a reforçadores naturais envolvidos com a sobrevivência e reprodução, como comida, bebida, sexo e interação social e, ainda, qualquer estímulo que gere uma sensação de prazer (NESTLER, 2001).

O sistema de recompensa consiste principalmente de neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral (VTA) que projetam-se para as regiões do

núcleo accumbens (NAcb), amígdala, hipocampo, além do córtex pré-frontal (CPF) (NESTLER, 2005) (Figura 4).

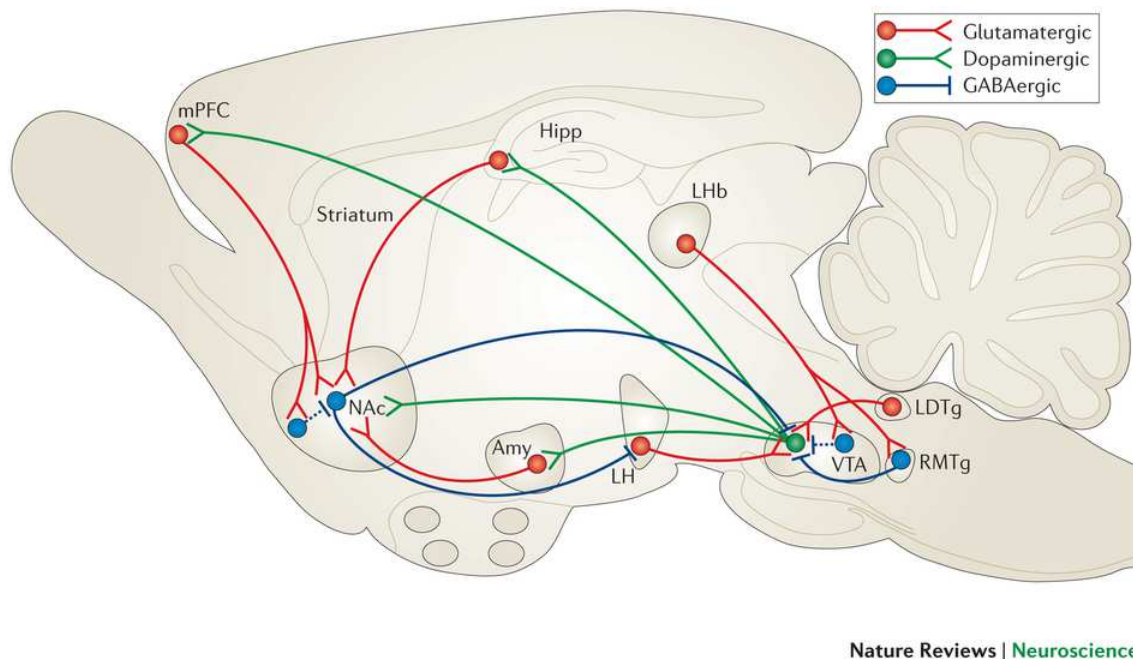


Figura 4. O circuito de recompensa. (RUSSO & NESTLER, 2013)

A estimulação dopaminérgica no NAc é a principal responsável pelas respostas de prazer e satisfação. Centros de memória como o hipocampo e a amígdala fazem com que o indivíduo lembre-se da ação realizada que levou à sensação de prazer. A região do córtex pré-frontal é responsável pelas avaliações e decisões tomadas pelo indivíduo perante uma determinada situação, por exemplo, permitindo que um indivíduo desista de realizar uma ação que envolva uma recompensa frente às consequências negativas dessa ação. (NESTLER 2005; GOLDSTEIN E VOLKOW 2002).

As drogas de abuso, incluindo a cocaína, afetam essa via com uma força e persistência não observadas em reforçadores naturais, como água e comida (NESTLER, 2001). Dessa forma, a sensação de prazer intensa gerada pelo uso da droga, associada ao aprendizado associativo promovido pelos fatores ambientais envolvidos (por exemplo, a parafernália utilizada para fumar, o local e as pessoas envolvidas) pode levar ao uso compulsivo da droga (ROBINSON;BERRIDGE, 2000; KALIVAS;MCFARLAND, 2003). A procura contínua do prazer gerado pelas drogas de abuso envolve principalmente as regiões mesencefálicas, mas o uso compulsivo

da droga, assim como a perda do controle comportamental, se devem, principalmente, à perda da função do CPF (PARKS et al., 2010).

Com o uso frequente, neuroadaptações no circuito de recompensa induzidas pelo uso da cocaína levam à transição do uso controlado dessa droga para o uso compulsivo (HYMAN;MALENKA, 2001; NESTLER, 2005). As alterações que levam ao desenvolvimento da adição são extremamente estáveis e duradouras, o que faz com que o indivíduo sofra os sintomas da abstinência, bem como permaneça sob o risco de recaídas, mesmo após muitos anos sem o uso da droga. As alterações na expressão gênica tem papel fundamental nas mudanças plásticas observadas. Estudos envolvendo microarranjos de DNA e RNA-seq já identificaram diversos genes que tem sua expressão alterada em determinadas regiões cerebrais em modelos de adição em roedores e primatas (MCCLUNG;NESTLER, 2003; YUFEROV et al., 2005). Ainda, vários fatores de transcrição vêm sendo sugeridos como mediadores dos efeitos a longo prazo na expressão gênica mediados por drogas de abuso, destacando-se CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta do cAMP/ *cAMP response element binding protein*) e Δ FosB (NESTLER, 2013).

CREB é um fator de transcrição ubiquamente expresso envolvido em diversos fenômenos como proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte celular, aprendizado e memória, depressão e respostas a estímulos emocionais (YIN;TULLY, 1996; DUMAN, 2002; BONNIE;GINTY, 2002). CREB regula a transcrição de genes que contêm o sítio de ligação CRE, de sequência TGACGTCA, em suas regiões promotoras (DE CESARE;SASSONE-CORSI, 2000). Esse sítio já foi identificado em numerosos genes expressos no SNC incluindo genes que codificam neuropeptídeos, enzimas de síntese de neurotransmissores, proteínas de sinalização e outros fatores de transcrição (NESTLER, 2001)

A dopamina em excesso na fenda sináptica em resposta à ação da cocaína se liga a receptores D1 ativando a enzima adenilato ciclase, que catalisa a conversão de ATP em AMPc, levando ao aumento desse mensageiro, o que ativa a proteína quinase A dependente de AMPc (PKA). A ativação de PKA leva à dissociação das subunidades regulatória e catalítica, permitindo que a última migre para o núcleo e fosforile CREB, que, uma vez fosforilado, pode se ligar ao sítio CRE e regular a transcrição gênica (RON;JURD, 2005). A *upregulation* de CREB no NAcB

induzida por cocaína ou outras drogas de abuso já demonstrou mediar a tolerância às propriedades de reforço, diminuindo seus efeitos recompensadores, bem como um estado emocional negativo durante a abstinência (DINIÉRI et al., 2009; NESTLER, 2013).

A exposição aguda à cocaína induz a expressão dos fatores de transcrição da família FOS em várias regiões cerebrais, principalmente no NAcb. Essa indução, apesar de rápida, é transitória. Por apresentarem baixa estabilidade, os níveis das proteínas Fos voltam ao normal entre 8-12 horas após a exposição (MORGAN;CURRAN 1995). Uma exceção é um produto truncado do gene FosB, o fator de transcrição Δ FosB. Esse produto apresenta altíssima estabilidade, o que permite que ele se acumule ao longo de exposições repetidas à droga e, ainda, persista por várias semanas durante a abstinência (MORATALLA et al., 1996).

Δ FosB dimeriza-se com uma proteína membro da família Jun formando o complexo AP1 (proteína ativadora -1). Os complexos AP-1 podem então se ligar aos sítios AP-1 (de sequência TGAC/GTCA) presentes nas regiões promotoras de vários genes regulando a transcrição (MORGAN;CURRAN 1995). Diversos genes alvos do Δ FosB demonstraram mediar a habilidade de certas drogas, como a cocaína, de induzir plasticidade sináptica. Exposições repetidas à cocaína aumentam as ramificações dendríticas e a densidade das espinhas nos neurônios espinhosos médios do NAcb e em neurônios piramidais no córtex pré-frontal, células que recebem projeções dopaminérgicas (ROBINSON;KOLB, 1999; RUSSO et al., 2010). É importante ressaltar que essas mudanças celulares são persistentes por longos períodos após a última exposição à droga e, com isso, sugere-se que sejam responsáveis pela elevada e duradoura responsividade à droga, que pode levar à recaídas. Essas alterações a nível celular parecem mediar as respostas comportamentais observadas em modelos de adição à cocaína.

Estudos mostram que a indução de Δ FosB medeia respostas comportamentais de sensibilização à cocaína, como o aumento da atividade locomotora e de respostas de reforço, bem como um aumento das auto-administrações e da busca pela droga em modelos de recaída (MCCLUNG;NESTLER, 2003; WHISTLER et al., 1999).

McClung & Nestler (2003) avaliaram a regulação da expressão gênica e dos efeitos de recompensa da cocaína por CREB e Δ FosB e observaram que a expressão gênica após um tratamento curto com cocaína se mostrou mais dependente de CREB, enquanto que após um tratamento longo com cocaína a expressão gênica se torna crescentemente dependente de Δ FosB. Esse estudo mostrou ainda que genes que apresentam regulação compartilhada entre Δ FosB induzido a curto prazo e CREB estão envolvidos principalmente na redução dos efeitos recompensadores da cocaína, enquanto que os regulados por Δ FosB induzido a longo prazo estão envolvidos com o aumento desses efeitos.

Em conjunto, esses dados sugerem que Δ FosB é o principal responsável pela sensibilização duradoura à cocaína, o que faz com este seja proposto como a molécula chave na transição do uso recreacional para a adição (NESTLER et al., 2001b). Porém, outras moléculas tem participação importante nos mecanismos da adição.

O fator neurotrófico BDNF é conhecido por mediar alterações sinápticas envolvidas com aprendizagem e memória, e dessa forma, se relaciona com as neuroadaptações envolvidas com a adição a drogas (MCCARTHY et al., 2012). A isoforma IV, em especial, já demonstrou ter sua expressão induzida por drogas de abuso em regiões do circuito de recompensa e a literatura mostra que a regulação de BDNF difere dependendo da região e do período de exposição à cocaína ou abstinência (BOULLE et al., 2012; MCCARTHY et al., 2012; FUMAGALLI et al., 2013). O aumento de BDNF após exposição à cocaína pode levar a alterações sinápticas que contribuem para aumentar a busca pela droga (MCCARTHY et al., 2012). Além do BDNF, a expressão de genes precoces de transcrição imediata, como o Zif268 (também conhecido como Egr-1), também é importante para a plasticidade neuronal envolvida com o desenvolvimento da adição. Estudos anteriores mostram uma associação entre o restabelecimento da busca pela cocaína em modelos de recaída e o aumento da expressão de Zif268 no CPF (VALJENT et al., 2006; ZIÓLKOWSKA et al., 2011). Zif268, que atua como um fator de transcrição, já mostrou participar da formação de memórias de longo prazo, incluindo os efeitos comportamentais duradouros em resposta à cocaína (JONES et al., 2001; VALJENT et al., 2006).

Recentemente, vem sendo investigada a participação de um novo sistema neurotransmissor na neurobiologia da adição: o sistema endocanabinóide. Esse sistema tem demonstrado envolvimento na regulação de diversos processos fisiológicos, incluindo participação no circuito de recompensa e na modulação de processos motivacionais (VLACHOU; PANAGIS, 2014).

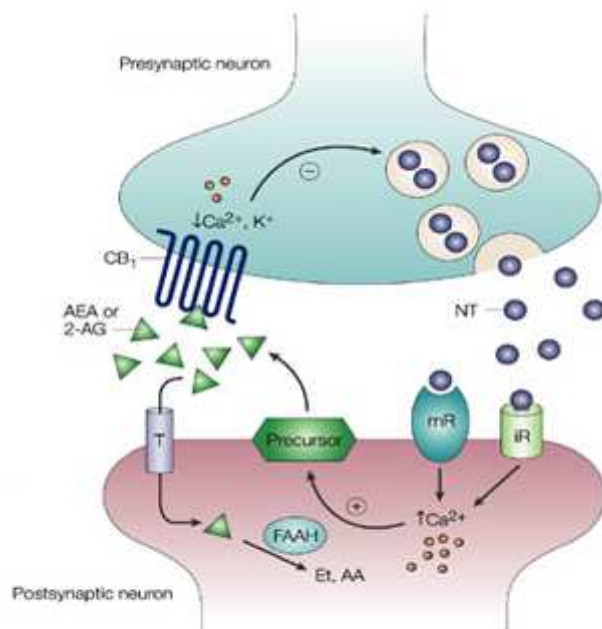
1.3 O sistema endocanabinóide na adição à cocaína

O sistema endocanabinóide foi identificado no início dos anos 90 durante investigações acerca do mecanismo de ação do Δ^9 -THC. Essa substância, o componente mais ativo da *Cannabis sativa*, tem seus efeitos mediados pelos receptores canabinóides CB1R (MATSUDA et al, 1990) e CB2R (MUNRO et al., 1993). Os receptores do tipo CB1R estão amplamente distribuídos no Sistema Nervoso Central (SNC), enquanto os receptores do tipo CB2R se encontram praticamente restritos às células do sistema imunológico (MORERA-HERRERAS et al., 2009). Após a clonagem e caracterização desses receptores, especialmente do receptor CB1R, surpreendentemente, foi descoberta a existência de alguns ligantes endógenos, atualmente denominados endocanabinóides. (eCBs) (DEVANE et al., 1992; STELLA et al., 1997). Já foram identificadas cinco substâncias endógenas que podem se ligar ao CB1R, porém as mais estudadas até o presente momento são a anandamida (AEA) e 2-aracdonil-glicerol (2-AG) (BISOGNO et al., 2005).

Diferente dos neurotransmissores clássicos, os eCBs não são armazenados em vesículas e agem predominantemente por uma sinalização retrógrada, na qual os endocanabinóides são liberados por neurônios pós-sinápticos e agem em receptores pré-sinápticos (WILSON; NICOLL, 2001). Por não serem armazenadas, essas moléculas são sintetizadas sob demanda a partir de precursores fosfolipídicos de membrana. A síntese de AEA ocorre por meio das enzimas N-acetil transferase (NAT) e N-acilfosfatidiletanolamida específica- fosfolipase D (NAPE-PLD), enquanto que para a síntese de 2-AG é necessária a ação de uma fosfolipase C específica (PLC) seguida pela enzima diacilglicerol lipase (DAGL) (UEDA et al., 2011).

Por meio dessa sinalização retrógrada, o sistema endocanabinóide atua como um importante modulador das funções fisiológicas cerebrais, principalmente inibindo

a liberação de neurotransmissores como acetilcolina (KATHMANN, 2001), GABA (KATONA et al, 2006), glutamato (TAKAHASHI; CASTILLO, 2006) e dopamina (SZABO, 1999, DE FONSECA et al., 2001) (Figura 5).



Nature Reviews | Cancer

Figura 5. Sinalização retrógrada do sistema endocanabinóide resultando na inibição da liberação de neurotransmissores (GUZMAN, 2003).

A ativação dos receptores CB1 e CB2, com subsequente estimulação da proteína Gi/o, promove inibição da adenilato ciclase, o que reduz a formação de cAMP com consequente inativação da via de fosforilação da proteína cinase A (PKA). A ligação de um agonista leva, ainda, à estimulação da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK). Esses eventos intracelulares levam, dentre outros efeitos, à regulação da expressão gênica (Figura 6). Além disso, a estimulação da proteína Gi/o por ativação de CB1 está diretamente acoplada à inibição de canais de cálcio voltagem-dependentes e à estimulação de canais de potássio, resultando na diminuição da liberação de vesículas contendo neurotransmissores (DI MARZO et al., 2004; DI MARZO et al., 2009).

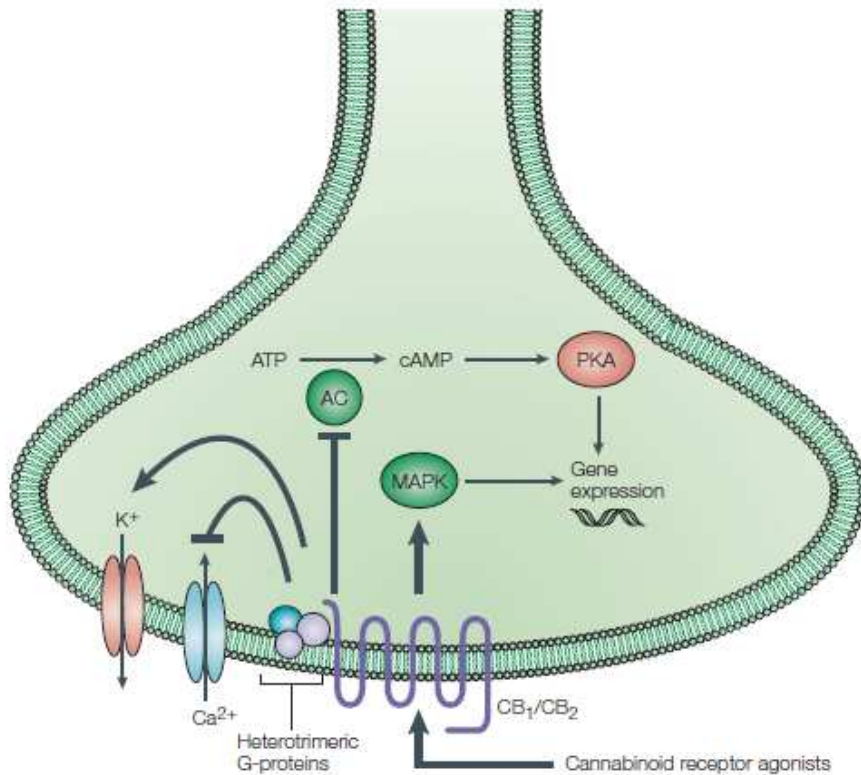


Figura 6. A ativação de receptores canabinóides induz alterações na regulação da expressão gênica (DI MARZO et al., 2009).

Os receptores CB1 são bastante expressos em regiões límbicas e corticais, o que torna o sistema endocanabinóide um importante componente do circuito de recompensa (VLACHOU; PANAGI, 2014). Em consequência disso, surgiram vários estudos para investigar um possível papel desse sistema na neurobiologia da adição. Estudos recentes vêm demonstrando o envolvimento do sistema endocanabinóide na adição a drogas estimulantes, inclusive a cocaína. Observou-se que a deleção genética de CB1R em camundongos, bem como o bloqueio farmacológico desse receptor, diminuem as propriedades de reforço da cocaína (SORIA et al, 2005). Ainda, verificou-se que os antagonistas de CB1R rimonabant e AM251 atenuam o restabelecimento do comportamento de busca pela droga induzido pelo ambiente ou pela cocaína (FILIP et al., 2006; XI et al., 2006). Adicionalmente, diminuição na expressão proteica do receptor CB1 já foi observada no córtex pré-frontal tanto de camundongos tratados com cocaína quanto de humanos viciados (*post-mortem*), além de desregulação na via de sinalização deste receptor (ALVARO-BARTOLOMÉ; GARCÍA-SEVILLA, 2013). Essa diminuição na expressão do receptor CB1 pode ser mediada pelo excesso de AEA, que tem sua

liberação aumentada com o uso de cocaína via ativação dos receptores D2R. (ÁLVARO-BARTOLOMÉ;GARCÍA-SEVILLA, 2013). Desta forma, percebe-se que existe uma relação entre o sistema endocanabinóide e o sistema dopaminérgico nos mecanismos da adição à cocaína.

1.4 Envolvimento dos sistemas dopaminérgico e endocanabinóide na adição à cocaína: enfoque no córtex pré-frontal

Receptores dopaminérgicos D1R e D2R, bem como receptores canabinóides CB1 são bastante expressos no CPF. A presença de receptores CB1 em células dopaminérgicas permite uma modulação da atividade dopaminérgica pelo sistema endocanabinóide (DE FONSECA et al., 2011).

O córtex pré-frontal é a região responsável pelo julgamento, tomada de decisões avaliando-se riscos e benefícios, e controle das respostas emocionais (GOLDSTEIN;VOLKOW 2002). Lesões no CPF levam as pessoas a tomarem suas decisões baseadas no benefício imediato dos seus atos sem preocupação com as consequências futuras (ENGLOT et al., 2010; GOLDSTEIN;VOLKOW 2002). As drogas de abuso afetam essa região, tornando o usuário incapaz de considerar as consequências dos seus atos. Dessa forma, eles continuarão em busca da droga desconsiderando os prejuízos à qualidade de vida, os efeitos sobre a família, e até mesmo as implicações legais. Deve-se ressaltar ainda que os usuários de crack apresentam um descontrole comportamental muito mais exacerbado do que se observa com outras drogas de abuso, o que sugere que essa droga afete de forma importante a região do córtex pré-frontal (RIBEIRO et al., 2010; OLIVEIRA;NAPO, 2008)

Ainda são poucos os estudos que caracterizam a modulação endocanabinóide sobre o sistema dopaminérgico no CPF. No estriado, foi observado um aumento nos níveis extracelulares de dopamina após administração sistêmica de agonistas canabinóides exógenos (TANDA et al., 1997), administração de anandamida sozinha ou associada a inibidores das enzimas de degradação de eCBs (SOLINAS et al., 2006), e ainda em protocolos de auto-administração de canabinóides (FADDA et al., 2006). No entanto, experimentos *in vitro* demonstraram

que a ativação de CB1R não tem efeito direto no aumento da liberação de dopamina (KOFALVI et al., 2005), o que sugere que a regulação dessa liberação por CB1R não é mediada localmente, nos terminais sinápticos, e sim, envolve uma regulação do disparo dos neurônios dopaminérgicos na VTA (EL KHOURY et al., 2012). Inclusive, um aumento da atividade dos neurônios dopaminérgicos da VTA após administração de canabinóides exógenos já foi observado (FRENCH et al., 1997). Sugere-se que os canabinóides regulam o disparo de neurônios dopaminérgicos via receptores CB1R presentes em terminais GABAérgicos, favorecendo uma desinibição da atividade neuronal dopaminérgica (EL KHOURY et al., 2012).

No CPF também já foi observado aumento nos níveis de DA após administração sistêmica de antagonistas CB1 (TZAVARA et al., 2004). Em condições fisiológicas, o sistema endocanabinóide no córtex pré-frontal está envolvido no controle homeostático do balanço de dopamina cortical/subcortical, participando de neuroadaptações apropriadas, bem como de comportamentos objetivados. Interferências nesse balanço podem levar a déficits cognitivos e comportamentais (EL KHOURY et al., 2012).

Dados na literatura sugerem que respostas neuroquímicas e comportamentais à cocaína são mediadas pelo sistema endocanabinóide, visto que muitas delas são revertidas com o uso de antagonistas de receptores CB1. Em estudos com cocaína, já foi observado que a utilização de antagonistas de CB1R promovem o bloqueio dos efeitos locomotores (MEREU et al., 2012), diminuição das propriedades de reforço em experimentos de auto-administração (SORIA et al., 2005), redução nos níveis de dopamina no NAcb (CHEER, et al., 2007) e diminuição da busca pela droga em modelos animais de recaída (XI et al., 2013)

Tendo em vista os dados encontrados na literatura, é possível que as alterações promovidas pelo crack na neurotransmissão dopaminérgica possam ser moduladas por alterações no sistema endocanabinóide no córtex pré-frontal dos usuários. Ressalta-se a possibilidade dessas alterações serem diferentes ou de uma maior magnitude quando a cocaína é fumada, com consequente produção de MEG, do que quando se faz uso do cloridrato de cocaína. No entanto, estudos específicos para o abuso de crack ainda são escassos, o que motivou a utilização de um modelo animal específico para o abuso dessa droga para avaliação de alterações

moleculares, bioquímicas e comportamentais em animais expostos ao crack, focando nos sistemas dopaminérgico e endocanabinóide. Dessa forma, espera-se que uma melhor compreensão dos mecanismos neurobiológicos do abuso do crack, bem como das suas diferenças em relação ao cloridrato de cocaína, possam auxiliar na busca por estratégias terapêuticas específicas e eficazes contra esse vício devastador.

2 JUSTIFICATIVA

Desde o aparecimento do crack na década de 1990, houve uma intensa disseminação do uso dessa droga principalmente pelo baixo custo de aquisição e rapidez do efeito psicotrópico quando comparada ao uso da cocaína por via nasal (cheirada) (RIBEIRO et al., 2010; NAPPO et al., 1996 e 2001; RIBEIRO et al., 2004 e 2006; GUINDALINI et al., 2006; OLIVEIRA;NAPPO., 2008a e 2008b; ZUBARAN et al., 2010). Os dois levantamentos nacionais realizados pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID), em 2001 e em 2005, demonstraram que o consumo de crack (“uso na vida”) dobrou nesse período nas grandes cidades brasileiras.

A dependência ao crack atinge o indivíduo principalmente na fase produtiva da vida, sendo que a maioria dos usuários no Brasil são adultos jovens com idade média de 30 anos. Um estudo realizado pelo Ministério da Saúde em parceria com a FIOCRUZ em 2013 revelou que o tempo médio de uso do crack e/ou similares nas capitais é de aproximadamente 8 anos, contradizendo as notícias comumente veiculadas de que os usuários de crack/similares teriam sobrevida necessariamente inferior a 3 anos de consumo. Apesar de não ter como causa a dependência em si, estudos mostram um alto índice de mortalidade entre usuários de crack, sendo a grande maioria causada por HIV e homicídios (RIBEIRO et al., 2004; RIBEIRO et al., 2006).

Adicionalmente aos altos índices de doenças sexualmente transmissíveis atreladas ao uso do crack, observa-se um aumento da criminalidade, da violência doméstica, prostituição, estupro e abandono dos filhos (RIBEIRO et al., 2004). Além das questões sociais, o abuso de crack leva a consequências físicas e psicológicas para o usuário. Distúrbios psiquiátricos, alucinações e paranoia decorrentes do consumo dessa droga, além de diversos distúrbios motores, respiratórios e viscerais são observados (OLIVEIRA;NAPPO, 2008b, HERCULIANE et al., 2009). A necessidade compulsiva por fumar crack conduz a um completo esgotamento físico, já que no período de uso, é comum que os usuários não se alimentem, não durmam e muitas vezes não se higienizem (OLIVEIRA;NAPPO, 2008b). Desta forma, o consumo de crack tem se apresentado como um grave problema social e de saúde pública.

A compreensão dos mecanismos moleculares responsáveis pela dependência a essa droga é essencial na busca de estratégias terapêuticas eficazes. Entretanto, o número de estudos que visam elucidar os aspectos neuroquímicos e neurofisiológicos do abuso de crack é muito pequeno. Isso se deve ao fato de ser a cocaína o princípio ativo do crack e conseqüentemente, por muitas vezes, serem tratadas como a mesma droga. (JENKS et al., 2002, HUESTIS et al., 2007). Sendo assim, os modelos animais utilizados até hoje são pouco específicos para o crack e não permitem acessar as diferenças entre o abuso dessa droga e da cocaína injetada ou cheirada, razão pela qual o conhecimento acerca das bases moleculares do abuso e dependência do crack são quase inexistentes. Um melhor entendimento dos aspectos neurobiológicos que expliquem o desenvolvimento rápido da adição e/ou as alterações moleculares decorrentes do uso do crack são imprescindíveis na busca de tratamentos específicos e efetivos para sua dependência.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar a ocorrência de alterações comportamentais, bioquímicas e moleculares em modelo animal de inalação crônica de “crack”.

3.2 Objetivos específicos

Verificar a presença de sensibilização ou tolerância comportamental em animais submetidos à inalação crônica de crack através da avaliação da atividade locomotora em campo aberto;

Determinar as concentrações de cocaína e seus metabólitos no sangue dos animais submetidos à inalação de crack;

Avaliar se a inalação crônica de crack altera a expressão de genes relacionados à adição, como Δ FosB, CREB, Zif268, BDNFIV, TrkB1 e TrkB2, no córtex pré-frontal;

Avaliar se a inalação crônica de crack altera a expressão gênica de componentes do sistema dopaminérgico no córtex pré-frontal, como D1R, D2R, D3R e TH;

Verificar se a inalação de crack por 11 dias altera os níveis de dopamina e de seus metabólitos no córtex pré-frontal dos animais em estudo;

Avaliar se a inalação crônica de crack altera a expressão gênica de componentes do sistema endocanabinóide no córtex pré-frontal, como CB1R, FAAH, MAGL, n-PLD e DAGL;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 25 camundongos machos da linhagem C57BL/6, com 60 dias de idade provenientes de colônia própria do Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental. Os animais receberam água e ração *ad libitum* e foram mantidos sob um ciclo claro-escuro de 12:12 horas. Os experimentos realizados foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA/UFES) sob o número 002/2011.

4.2 Droga e protocolo de inalação

A droga utilizada foi concedida pela Polícia Civil do Estado do Espírito Santo através de convênio firmado entre esse órgão e a Universidade Federal do Espírito Santo. As pedras de crack foram fornecidas pela Delegacia de Entorpecentes da cidade de Vitória, ES e trata-se de material de uso popular apreendido de fonte única, compondo um único lote que foi utilizado durante toda a execução desse projeto.

A droga foi analisada pelo Departamento Médico Legal do Estado do Espírito Santo (DML/ES) por meio de Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) (TOENNES et al., 1999) e a concentração de cocaína presente na amostra foi de 46%. Além disso, foram detectados traços do adulterante fenacetina e de cinamoilcocaína, um alcaloide proveniente das folhas de coca, muito encontrado na pasta- base de cocaína.

A exposição ao crack foi feita de acordo com método descrito por Herculiane et al., 2009 com modificações. Os animais dos grupos expostos ao crack foram submetidos a cinco minutos de inalação da fumaça produzida pela queima de cinco gramas da droga dentro de uma câmara de inalação (descrita abaixo) mantida em

uma cabine de segurança biológica tipo BII. Os camundongos do grupo crack foram submetidos à inalação de crack duas vezes por dia por um período de onze dias. Os animais do grupo controle permaneceram em suas gaiolas durante esta etapa. O sistema de inalação é constituído por três partes (Figura 7):

- (i) Queima e produção da fumaça de crack: a droga é acondicionada em um kitassato apoiado sobre uma chapa de aquecimento que promove a queima das pedras de crack. O uso da chapa em vez do fogo permite manter a temperatura de queima constante durante todo o experimento. O aquecimento foi mantido a 350°C em todas as seções. Esta temperatura permite a formação visível de fumaça, é suficiente para a queima de 5 gramas da droga em 5 minutos, e garante a formação de quantidade considerável de MEG, visto que 50 a 80% da cocaína é convertida a MEG em uma faixa entre 255-420°C (NAKAHARA;ISHIGAMI, 1991). Assim, a fumaça produzida é então direcionada para a câmara de inalação;
- (ii) Câmara de inalação: consiste em uma caixa de acrílico com dimensões de 45x35x13,5 cm, com tampa, onde são colocados os animais. O kitassato é conectado através de uma mangueira diretamente a um orifício lateral na câmara de inalação. Na lateral oposta, outro orifício permite a saída da fumaça;
- (iii) Controle do fluxo da fumaça: esse controle é feito através da criação de pressão positiva de ar por meio de uma bomba de vácuo conectada ao kitassato. Essa pressão promove o fluxo da fumaça para dentro da câmara de inalação e a mesma sai por um orifício no lado oposto da câmara.



Figura 7. Aparato de inalação de crack utilizado no estudo. Modificado de Herculiane et al. (2009)

4.3 Avaliação da concentração sanguínea de cocaína, metilecgonidina, benzoilecgonidina e ecgonina metil éster

No 11º dia de exposição à droga, os camundongos foram sacrificados logo após a última inalação e o sangue foi coletado. As concentrações de cocaína, metilecgonidina (MEG), benzoilecgonina (BEG) e ecgonina metil éster (EME) no sangue dos animais foram determinadas por GC-MS no DML de Vitória, ES. A MEG é formada apenas quando a cocaína é fumada, uma vez que não é produzida metabolicamente e sim como resultado do aquecimento da cocaína, sendo, portanto, sugerida como marcador analítico do uso do crack (WOOD et al., 1996; TOENNES et al., 1999). A BEG e a EME são metabólitos da cocaína no organismo, sendo a BEG o principal. Desta forma, a detecção destes metabólitos no sangue dos animais permite a validação do modelo de inalação utilizado.

Logo após a decaptação, o sangue foi coletado e foram obtidos, ao todo, 6 *pools* contendo sangue de 2 a 3 animais cada. As amostras coletadas foram acondicionadas em tubos contendo fluoreto de sódio a 2% e armazenadas a -80°C até o momento da análise. 1mL de sangue total foi homogeneizado com 6mL de tampão fosfato 0,1M em tubo para centrífuga com capacidade de 15mL. O padrão interno foi adicionado para a obtenção de uma concentração final de 100ng/mL. Os tubos foram agitados em vórtex por 10 segundos e sonicados por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1055xg por 15 minutos.

Os cartuchos de extração em fase sólida foram condicionados com 2 mL de metanol seguido de 2 mL de tampão fosfato 0,1M evitando-se a secagem. As amostras foram cuidadosamente aplicadas nos cartuchos que então foram lavados 1 mL de água e 0,5mL de ácido acético 0,01M. Aplicou-se vácuo máximo por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 50 mL de metanol e aplicou-se vácuo máximo novamente por 1 minuto.

Os analitos foram eluídos no mesmo tubo utilizando 2 misturas de solventes diferentes: analitos ácidos e neutros foram eluídos com 4 mL (2x2mL) de acetona: solução de clorofórmio (1:1, v/v); analitos básicos foram eluídos com uma solução de acetato de etila: hidróxido de amônio (98:2, v/v). Os resíduos foram evaporados até a secagem a 40°C sob um fluxo suave de nitrogênio em um *dry block*. 50 mL de N-

methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA), foi adicionado a um vial de 2 mL que foi vedado e derivatizado a 80°C por 30 minutos.

A análise das amostras foi realizada no cromatógrafo a gás *Varian CP-3800* (Palo Alto, EUA) acoplado ao espectrômetro de massa *ion trap Varian Saturn 2200* (Palo Alto, EUA). As injeções foram feitas com volume de 1 mL no modo *splitless* a 280°C. Foi aplicado pulso de pressão de 25 psi por 1 minuto. As separações foram realizadas em uma coluna capilar HP-5MS utilizando gás hélio como carreador em um fluxo de 1.1 mL/min.

O programa de aquecimento da coluna foi o seguinte: a temperatura inicial de 90°C por 2 minutos foi aumentada até 220°C a 10°C/minuto, e em seguida aumentada até a temperatura final de 290°C a 30°C/minuto e mantida por 6 minutos. O tempo de corrida foi de 23.33 minutos.

O espectrômetro de massa operou no modo de impacto de elétrons com uma corrente de emissão de filamento de 15mA e um multiplicador offset de 200 V, no modo de varredura (70–500 m/z) para a quantificação. As temperaturas da linha de transferência, *manifold* e *ion trap* foram de 290, 120 e 240°C, respectivamente. Os analitos foram identificados e quantificados utilizando o tempo de retenção (tolerância de +2%) e o espectro de referência. O espectro de referência foi obtido de amostras de sangue extraídas e adicionadas de todos os analitos.

4.4 Avaliação comportamental

Durante 10 dias, após cada sessão de inalação, os animais foram transferidos para caixas de 41x34x16cm para avaliação da atividade locomotora. No 11° dia de inalação, a análise comportamental não foi realizada com o objetivo de sacrificar os animais imediatamente após a inalação para coleta de sangue e posterior dosagem de cocaína e seus metabólitos. A atividade locomotora foi avaliada durante 10 minutos, sendo estes, divididos em dois segmentos de tempo: 0 a 5 minutos após a exposição e de 5 a 10 minutos após a exposição. O procedimento foi o mesmo para animais do grupo crack e do grupo controle. Os testes foram gravados e a distância percorrida foi calculada com auxílio do software Anymaze®, com objetivo de verificar o desenvolvimento de sensibilização comportamental, caracterizada por um aumento

progressivo na atividade locomotora com administrações repetidas da droga na mesma dose (VEZINA, 2007). No decorrer do experimento observou-se um comportamento peculiar nos animais expostos ao crack. Estes animais apresentavam saltos nos cantos das caixas durante o teste no *open-field*. Devido à possibilidade de se tratar de um comportamento estereotipado, estes saltos também foram contabilizados.

4.5 Avaliação da expressão gênica

4.5.1 Extração de RNA total

Os tecidos foram triturados em nitrogênio líquido e o RNA total extraído utilizando TRI Reagent RNA Isolation Reagent (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Em suma, os tecidos foram solubilizados em trizol (1mL/100mg de tecido) com o uso de um homogeneizador elétrico por 30 segundos e o homogenato centrifugado a 12.000 xg por 15 minutos a 4°C. Ao sobrenadante, foi adicionado clorofórmio (200µL/100mg tecido), misturado por inversão por 15 segundos e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. A mistura foi então centrifugada a 12.000xg por 20 minutos a 4°C. Recuperou-se a fase aquosa e a esta adicionou-se isopropanol (500µL/100mg tecido) para a precipitação do RNA. Centrifugou-se a 12.000xg por 15 minutos e o precipitado foi lavado com etanol 75% (1mL/100mg tecido) e centrifugado a 7500xg por 5 minutos. O RNA foi ressuspendido em 40 µL de água deionizada, previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC).

A concentração e a qualidade do RNA extraído foram verificadas utilizando o equipamento NanoDrop™ (ThermoScientific, Wilmington, USA) e por meio de eletroforese em gel de agarose, respectivamente.

4.5.2 Eletroforese em gel de agarose desnaturante

Para verificar a qualidade do RNA extraído as amostras foram submetidas a uma eletroforese em gel desnaturante de agarose (LEHRACH et al., 1977). O gel de

agarose foi preparado a 1% em água previamente tratada com DEPC e autoclavada, adicionado de 9 mL de formaldeído e 5 mL de tampão MOPS 10X (MOPS [3-(N-morpholino)propanesulfonic acid] 0,2 M, acetato de sódio 0,05 M, EDTA 0,01 M; pH 5,5-7,0). As amostras foram homogeneizadas com 2 µL de MOPS 10X, 4 µL de formaldeído, 10 µL de formamida, 0,5 µL de brometo de etídeo a 10%, aquecidas a 80°C por 10 minutos e resfriadas no gelo. As mesmas foram homogeneizadas com tampão de amostra contendo 0,25% azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol e 30% de glicerol em água, e então aplicadas no gel. Para a corrida, 10X MOPS foi diluído para 1X MOPS e utilizado como tampão de corrida. As amostras correram a 80V por aproximadamente 80 minutos e as bandas foram observadas em um transiluminador UV.

4.5.3 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada com o kit iScript cDNA Synthesis Kit (Biorad, CA, USA) usando o equipamento S1000 Thermal Cycler (Biorad, CA, USA). As condições da reação foram as seguintes: 25°C por 5 min., 42°C por 30min., 85°C por 5 min.

4.5.4 Reação de PCR em tempo real

As amostras de cDNA obtidas foram submetidas à reação de PCR em tempo real utilizando o equipamento CFX96 Real Time PCR (Biorad, CA, USA) e o kit iQ SYBR Green Supermix (Biorad, CA, USA). Em suma, as reações foram preparadas em um volume total de 10µL contendo 5 µL de SYBR Green Supermix 2x, 3,5 µL de água purificada, 0,5µL de cada iniciador a 10µM e 0,5 µL de cDNA. Foram realizados 45 ciclos após a desnaturação inicial (95°C, 2 minutos) de acordo com os seguintes parâmetros: 95°C (desnaturação) por 15s; 60°C (anelamento) por 30s e 72°C (amplificação) por 30s.

Para garantir a qualidade da reação, as amostras foram preparadas em triplicata e para cada experimento incluiu-se uma reação sem molde como controle negativo.

Além disso, a ausência de contaminantes de DNA foi avaliada utilizando-se amostras RT-negativas e pela análise da curva de *melting* dos produtos amplificados, que foi feita resfriando-se as amostras a 60°C e, em seguida, aumentando-se a temperatura para 95°C a 0,1°C/s. A especificidade das reações de PCR também pôde ser confirmada pela verificação dos *amplicons* em gel de acrilamida, além da curva de *melting*. A quantificação relativa da expressão gênica foi feita pelo método 2- $\Delta\Delta C_t$ utilizando o gene da β -actina para normalização dos dados. Os *primers* utilizados tiveram a eficiência de amplificação avaliada, apresentaram desempenho satisfatório, e estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Iniciadores utilizados na qPCR.

Gene	Sequência (5'- 3')	Tamanho do fragmento (pb)	TM (°C)
CREB	F: GGA GCT TGT ACC ACC GGT AA	167	59
	R: GAT GTT GCA TGA GCT GCT GG		59
ΔFosB	F: TGC AGC TAA GTG CAG GAA CCG T	224	64
	R: GAG GAC TTG AAC TTC ACT CGG CCA		64
BDNF IV	F: CAG AGC AGC TGC CTT GAT GTT	159	61
	R: GCC TTG TCC GTG GAC GTT TA		60
TRKB2	F: TCA AGT TGG CGA GAC ATT CC	195	58
	R: ACC AGA CAC CCT CAA ATA AGC		57
TRKB1	F: CGC TAG GAT TTG GTG TAC TGA G	173	58
	R: TTG TAA GGT TTC TCA GCC CC		58
Zif 268	F: AAG GGA GAG GCA GGA AAG AC	156	59
	R: GGC AGG GAT GGT AAG TGA AA		57
D1R	F: CCA AGA ACG TGA GGG CTA AG	120	58
	R: TGA GGA TGC GAA AGG AGA AG		57
D2R	F: GAG CCA ACC TGA AGA CAC C	158	58
	R: TGA CAG CAT CTC CAT TTC CAG		58
D3R	F: GAA CTC CTT AAG CCC CAC CAT	166	59

	R: GAA GGC CCC GAG CAC AAT		60
CB1R	F: ACC TAT ACC CAC ACC CCT AC	143	57
	R: TCA TTC CAA ACA GAG CCA GG		57
FAAH	F: GTC TGG GCT CTG TAA GGT TTA TC	145	58
	R: GCA TAG AAG TAA TCG GGA GG		55
MAGL	F: ACC ATC TCA ACC ACT AAG CCC	124	59
	R: GAG AAA GGG AAG TGT GAG GTG		58
n-PLD	F: TTG GTT TGC TCC TTA GTC TCG	173	58
	R: CGC TTT CTC CGT GTT TCT TTT GG		61
DAGL	F: CGT AGC TGT GGA CCA TGA CA	157	59
	R: TGA GAG TAC CAT GCC CTT GTG		59
TH	F: AAG ATC AAA CCT ACC AGC CG	118	57
	R: TAC GGG TCA AAC TTC ACA GAG		57
Actina	F: TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG A	122	61
	R: AAT GCC TGG GTA CAT GGT GGT A		61

4.5.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para confirmar a amplificação de produto único, de tamanho esperado, os produtos da reação de PCR em tempo real foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida, posteriormente corado com nitrato de prata (CHRAMBACH;RODBARD, 1971)

O gel foi preparado com 6% acrilamida/bisacrliamida 29:1 em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 5X, 120 µL de persulfato de amônio e 12 µL de TEMED. As amostras foram homogeneizadas com tampão de amostra contendo 0,25% azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol, 30% de glicerol em água, e aplicadas no gel após a polimerização. Para a corrida, utilizou-se tampão Tris-TBE 1X e as amostras correram a 80V por aproximadamente 1:30h. A visualização das bandas se deu por coloração com nitrato de prata.

4.6 Imunoblot

Tendo em vista que a análise da expressão gênica de DAT não foi possível, já que os primers desenhados para este gene não obtiveram uma boa eficiência de amplificação para a região em estudo, foi realizado o imunoblot para análise da expressão proteica de DAT.

Para a preparação do extrato protéico, os tecidos foram homogenizados em um tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% triton x-100 e coquetel de inibidores de protease (Sigma-aldrich). Os tecidos foram então mantidos no gelo por 30 minutos, centrifugados a 10.000xg por 20 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi recolhido. O conteúdo protéico foi dosado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e utilizou-se uma curva padrão de calibração com BSA (1 a 30µg).

Do extrato protéico obtido, 100µg de cada amostra foram resolvidos em gel de SDS-PAGE (LAEMMLI et al., 1970). As amostras foram homogeneizadas com tampão de amostra (SDS 0,2% (p/v), glicerol 0,2% (v/v), 2-mercaptoetanol 0,32% (v/v), azul de bromofenol 0,001% (p/v) e Tris-HCl 12,5 mM pH 6,8), aquecidas a 37°C por 15 minutos e aplicadas no gel. O gel de separação constitui-se de 15% (v/v) de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (p/p); Tris-HCl 0,4 M pH 8,8; SDS 0,1% (p/v); Persulfato de amônio 50 mM e 0,05% (v/v) de TEMED. O gel de concentração constituiu-se de 4% (v/v) de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (p/p); Tris-HCl 0,125 M pH 8,8; SDS 0,1% (p/v); Persulfato de amônio 4 mM e 0,025% (v/v) de TEMED. Para a corrida, foi utilizado tampão contendo Tris-HCl 0,0025 M pH 8,3; glicina 0,192 M e SDS 0,1% (p/v).

Para o *western blotting*, utilizou-se o método descrito por Towbin et al. (1979). Ao término da eletroforese, o gel foi lavado em tampão de transferência (48 mM Tris; 39 mM glicina; 20% metanol (v/v); 0,13 mM SDS) e foi montado um sanduíche com papéis Watmamm 1 e membrana de PVDF, previamente umedecida em metanol. A transferência foi realizada a 10V, 200mA por 12 horas. Ao fim da transferência, a membrana foi corada com solução de 1% de Ponceau em ácido acético 10% (v/v) por 3 minutos e em seguida descorada com água. A membrana foi então incubada

por 1 hora em tampão de bloqueio contendo TBS (137mM NaCl; 20mM Tris.HCl; pH 7,6); Tween 0,1% (v/v) e 5% de leite desnatado (Molico). Adicionou-se o anticorpo primário, incubou-se por 12 horas sob refrigeração. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes, por 10 minutos cada lavagem, com TBS/Tween então incubada com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase por 1 hora. Ao término da incubação, o processo de lavagem foi repetido. Os anticorpos utilizados foram anti-DAT (1:1000, Alomone Labs) e anti-actina (1:2500, Sigma-aldrich). A detecção foi realizada por quimioluminescência com o kit ECLTM (Amersham) utilizando o equipamento ChemiDoc (Bio-rad), e as imagens foram analisadas por meio do software ImageLab (Bio-rad).

4.7 Dosagem de dopamina, DOPAC e HVA

Após dissecação, o córtex pré-frontal foi pesado e armazenado a -80°C até o seu processamento. Os tecidos foram homogeneizados em solução gelada de ácido perclórico 0,1 M; EDTA 0,1 mM e centrifugados a 10.000xg por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram filtrados com um filtro de poro 0,22µm. 20 microlitros foram injetados em HPLC equipado com uma coluna de fase reversa (Eclipse XDB – C18 Agilent, 4,6 x 250 mm, 5 µm) e detector eletroquímico (VT-03, Decode II Antec®) para quantificar os níveis de dopamina, ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA).

Para quantificação da dopamina, utilizou-se uma fase móvel contendo 0,15 M de NaH₂PO₄, 1 mM de EDTA dissódico diidratado, 2,28 mM de ácido octanossulfônico de sódio e 13% (v/v) de metanol em água grau HPLC, com pH 5,25, sob um fluxo de 0,7 mL/min (ZAPATA et al., 2009). Para quantificação de DOPAC e HVA, a fase móvel consistiu de 0,02 M de acetato de sódio, 0,0125 M ácido cítrico, 16% v/v de metanol, 0,033% p/v de ácido octanossulfônico e 0,1mM EDTA, com pH 3,92. Todas as soluções utilizadas no HPLC foram filtradas com membrana de 0,22 µm de porosidade e as injeções das amostras foram feitas em triplicata. Os resultados foram normalizados pela concentração de proteína e os níveis do neurotransmissor e seus metabólitos foram expressos em % do controle.

4.8 Análise estatística

Os dados comportamentais foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de *post-hoc* de Bonferroni. Para os dados moleculares e bioquímicos, utilizou-se o teste t de Student. Os dados foram representados como média \pm erro padrão, e o nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Modelo animal de inalação de crack

Imediatamente após a última sessão de inalação, os animais do grupo crack foram sacrificados e amostras de sangue foram coletadas com o objetivo de avaliar as concentrações de cocaína, BE, EME e MEG. Foram analisados 6 pools obtidos a partir de 2-3 animais cada. A quantificação realizada por GC-MS mostrou $46,16 \pm 10$ ng/mL de cocaína, $247,05 \pm 40,32$ ng/mL de MEG, $64,61 \pm 9,80$ ng/mL de BEG e $137,1 \pm 5,38$ ng/mL de EME no sangue dos animais expostos aos crack (média \pm erro padrão).

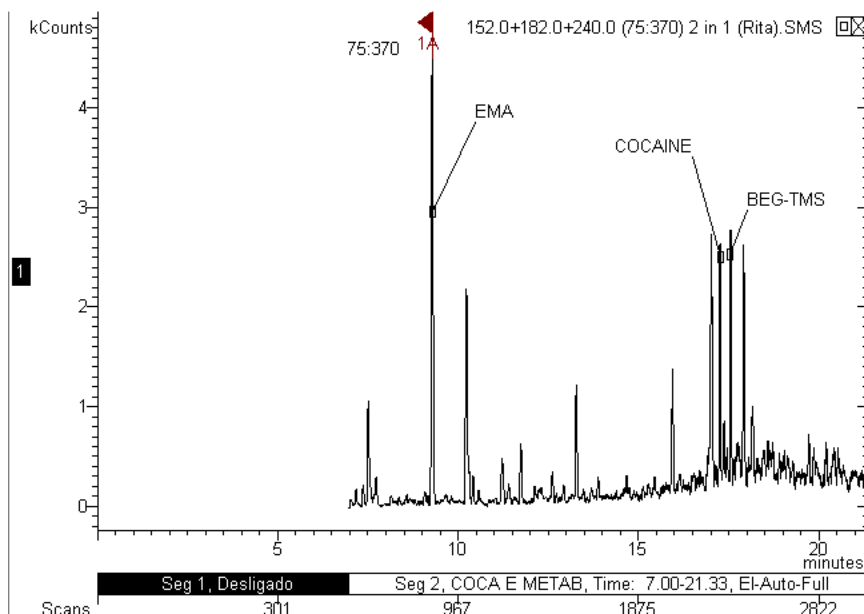


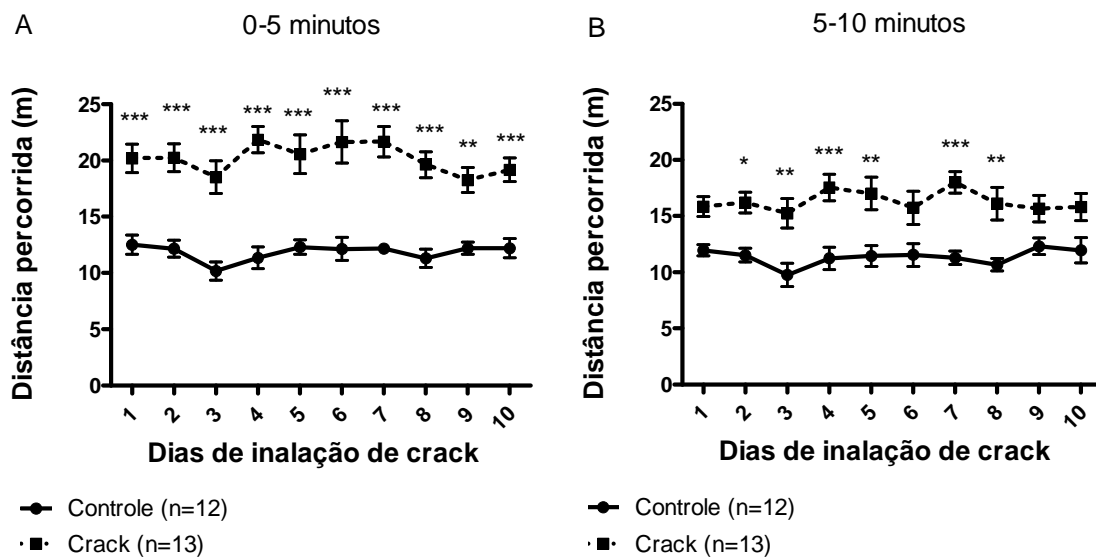
Figura 8. Cromatograma de detecção de cocaína e metabólitos por GC-MS (EMA=MEG= éster metil anidroecgonina, BEG= benzoilecgonina).

5.2 Avaliação comportamental

Observou-se que os animais do grupo crack apresentaram hiperlocomoção após as sessões de inalação (Figuras 8A e 8B). Apesar de não ser verificado o aumento progressivo na atividade locomotora, característico do desenvolvimento de sensibilização comportamental, os animais tratados apresentaram hiperlocomoção

desde a primeira sessão e esse comportamento se manteve durante todo o experimento [$F(1,207)=48,85$; $p<0,0001$ no segmento 0-5 min e $F(1,207)=20,39$; $p=0,0002$ no segmento 5-10 min] não apresentando diferença estatística no fator tempo [$F(9,207)=1,88$; $p=0,0571$] no segmento 0-5 min e $F(9,207)=1,19$; $p=0,3050$ no segmento 5-10 min].

Além da hiperlocomoção, foi observado um comportamento característico nos camundongos submetidos à inalação. Esses animais apresentaram pulos repetitivos nos cantos da caixa durante o teste no campo aberto, que aparentam uma tentativa de fuga, e houve um aumento significativo desses pulos nos dois segmentos de tempo no grupo crack [$F(1,207)=11,31$; $p=0,0027$ no segmento 0-5 min e $F(1,153)=9,81$; $p=0,0061$ no segmento 5-10 min] (Figuras 8C e 8D). Além disso, através da análise estatística por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, verificou-se que a frequência desse comportamento aumentou ao longo das sessões de inalação, apresentando um aumento significativo no fator tempo nos dois segmentos [$F(9,207)=3,97$; $p=0,0001$ no segmento 0-5 min e $F(1,153)=2,78$ $p=0,0048$ no segmento 5-10 min].



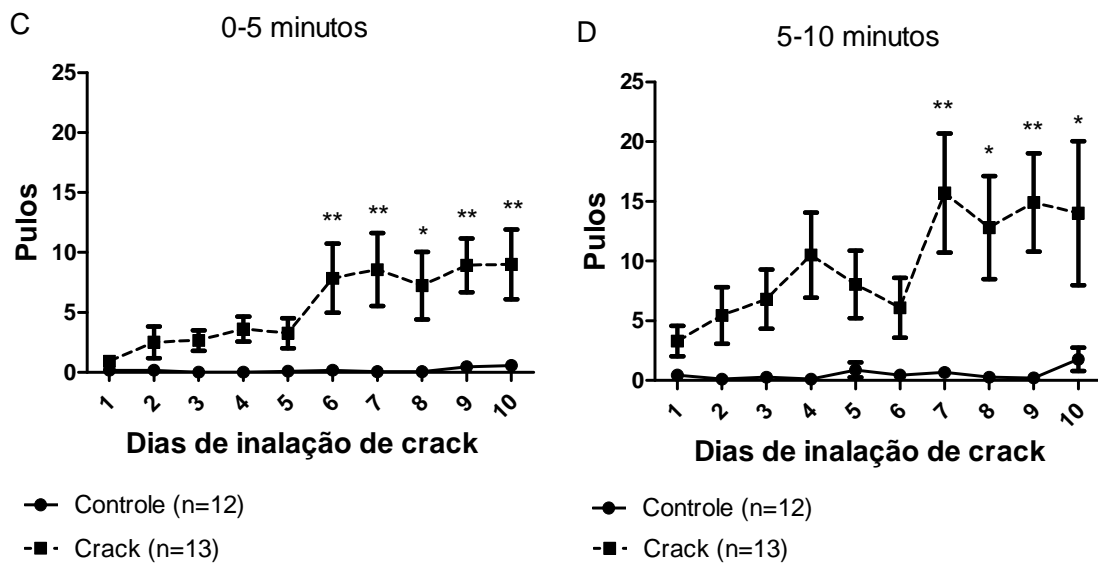


Figura 9. Avaliação comportamental. A e B: Média \pm erro padrão da atividade locomotora. C e D: Média \pm erro padrão da frequência de pulos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ ANOVA de duas vias e *post-hoc* de Bonferroni.

5.3 Avaliação da expressão gênica no córtex pré-frontal

Com o objetivo de avaliar possíveis alterações transcricionais no córtex pré-frontal de animais expostos ao crack, a expressão gênica relativa foi avaliada por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para genes relacionados à adição e componentes dos sistemas dopaminérgico e endocanabinóide.

Com relação à expressão de genes relacionados à adição, observou-se um aumento significativo na expressão de Δ FosB ($p = 0,0220$) e diminuição na expressão de CREB ($p = 0,0369$) nos animais do grupo crack em relação ao grupo controle. Não houve alteração na expressão gênica de BDNF IV e seus receptores, TrkB1 e TrkB2, assim como para Zif268 nos animais tratados com o crack quando comparados ao grupo controle ($p > 0,05$) (Figura 10).

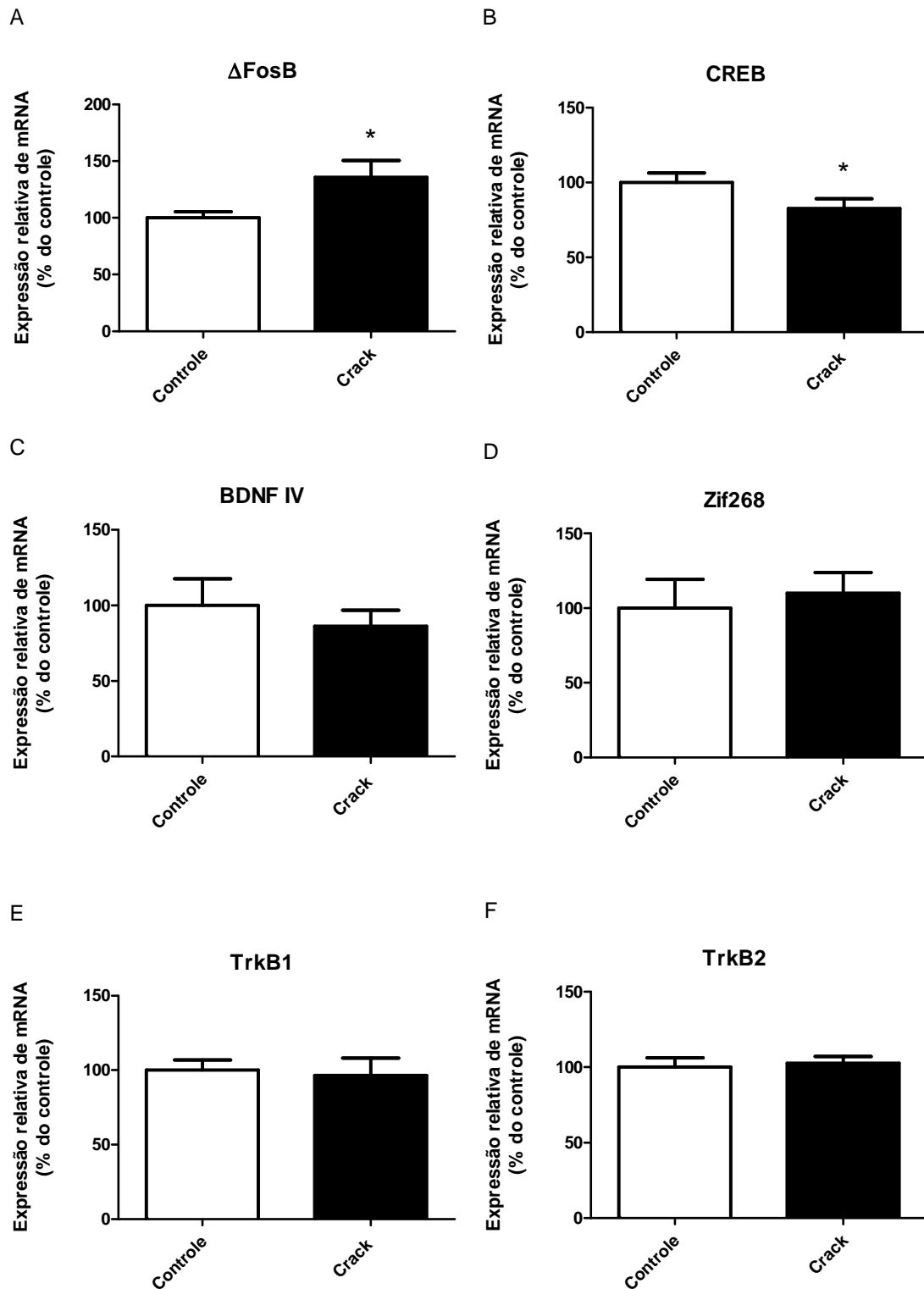


Figura 10. Expressão relativa de mRNA de genes relacionados à adição, normalizada com o gene da β -actina. Dados expressos como Média \pm erro padrão de 7-8 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, teste T não pareado.

Relativo ao sistema dopaminérgico foi possível observar um aumento expressivo de todos os genes analisados (D1R $p=0,0178$; D3R $p=0,0347$; TH $p=0,0076$), especialmente nos níveis de mRNA do receptor D2R, que apresentou um aumento de cerca de 10 vezes em relação ao grupo controle ($p=0,0050$) (Figura 10).

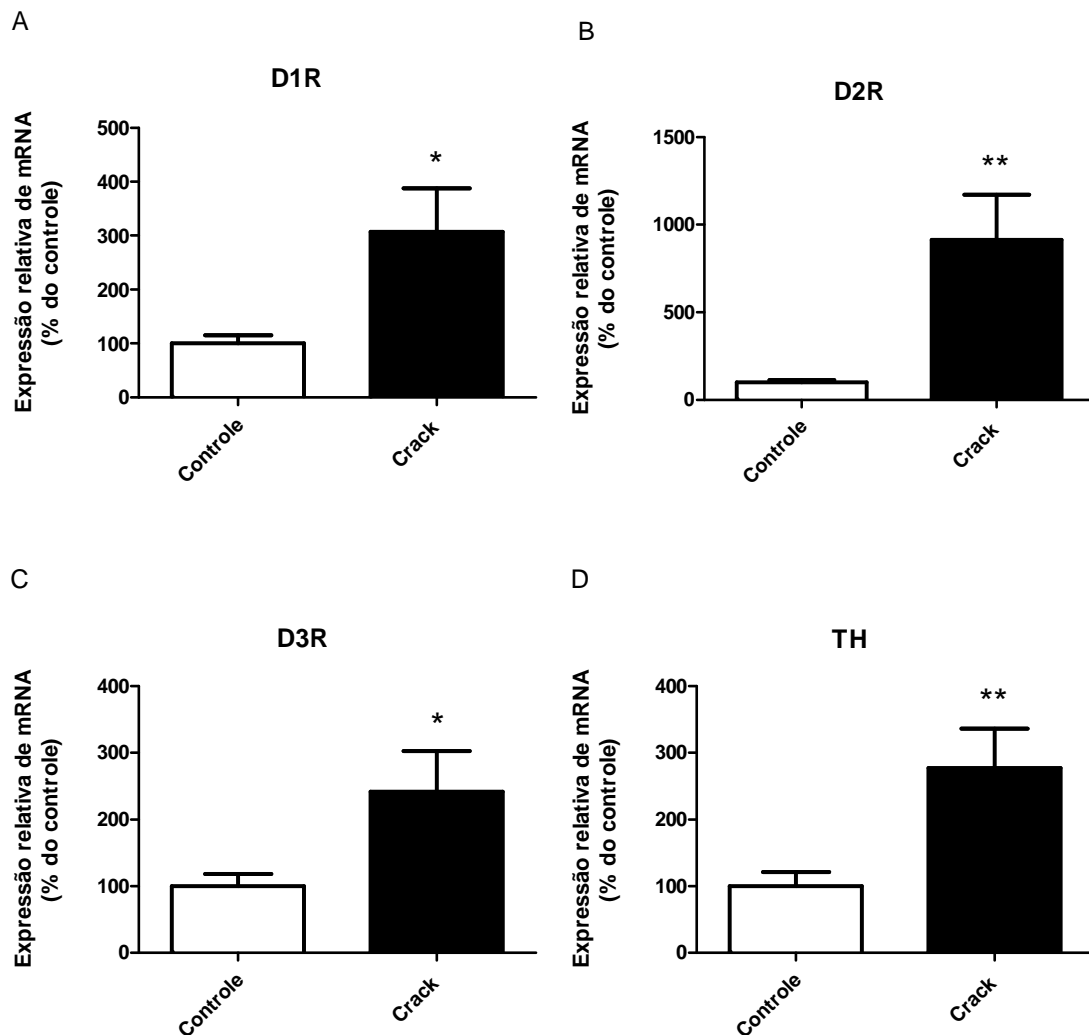
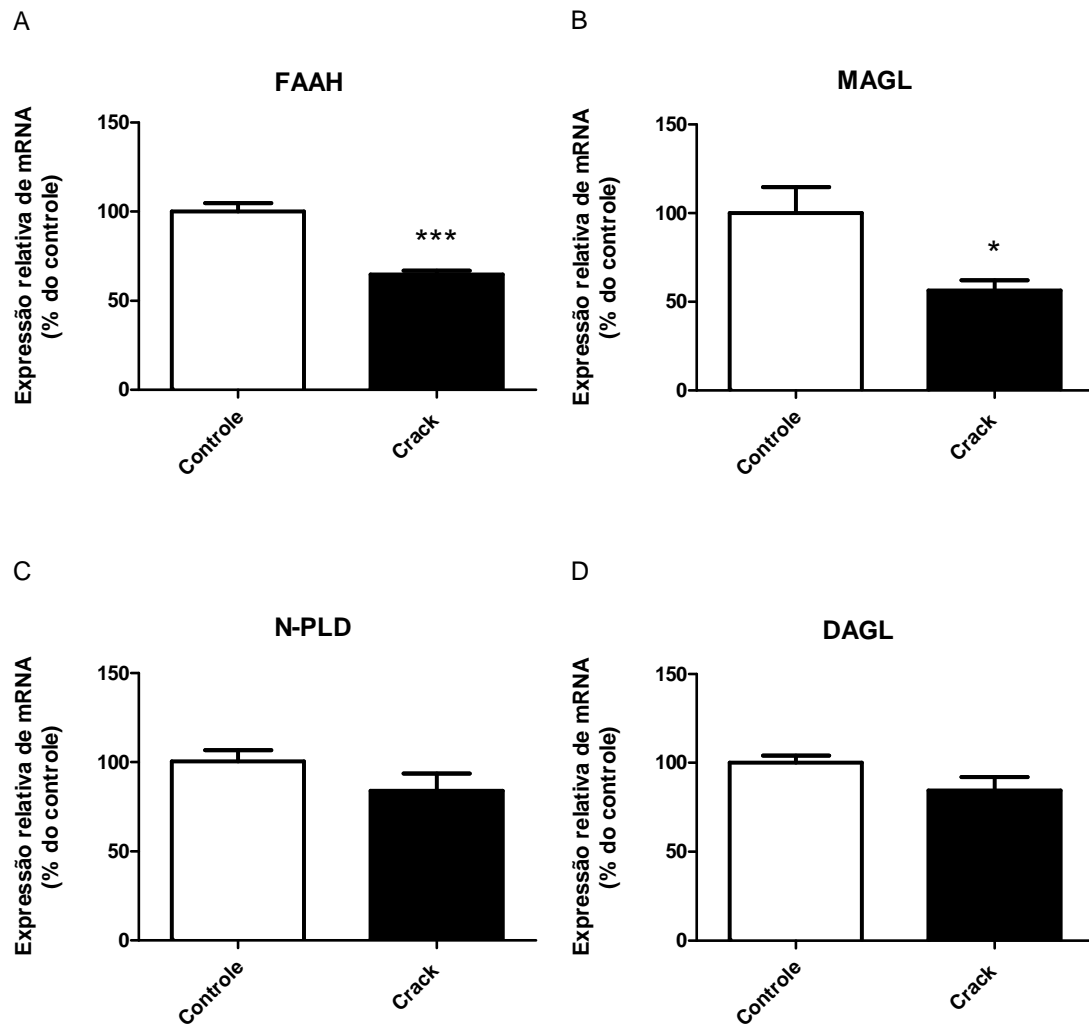


Figura 11. Expressão relativa de mRNA de genes do sistema dopaminérgico, normalizada com o gene da β -actina. Dados expressos como Média \pm erro padrão de 5-7 animais por grupo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$, em relação ao grupo controle, teste T não pareado.

Um perfil de expressão gênica oposto ao observado para o sistema dopaminérgico foi verificado para os genes relacionados ao sistema endocanabinóide. Os níveis de mRNA das enzimas de degradação FAAH e MAGL

encontraram-se diminuídos nos animais do grupo crack em relação aos do grupo controle ($p < 0,0001$ e $p = 0,0119$, respectivamente). A expressão gênica do receptor CB1 também se apresentou diminuída nos animais submetidos à inalação de crack ($p = 0,0138$). Já para as enzimas de síntese, n-PLD e DAGL, a análise da expressão gênica não demonstrou nenhuma alteração entre os grupos ($p > 0,05$) (figura 11).



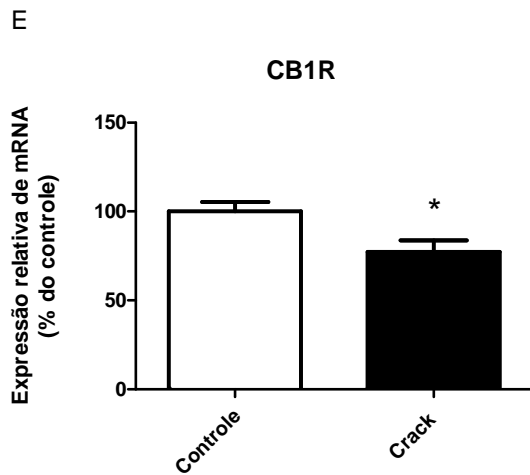


Figura 12. Expressão relativa de mRNA de genes do sistema dopaminérgico, normalizada com o gene da β -actina. Dados expressos como Média \pm erro padrão de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, teste T não pareado.

5.4 Expressão proteica

Por meio da técnica de imunoblot, a expressão proteica do DAT revelou-se aumentada no córtex pré-frontal dos animais submetidos à inalação de crack em relação ao grupo controle ($p = 0,0136$).

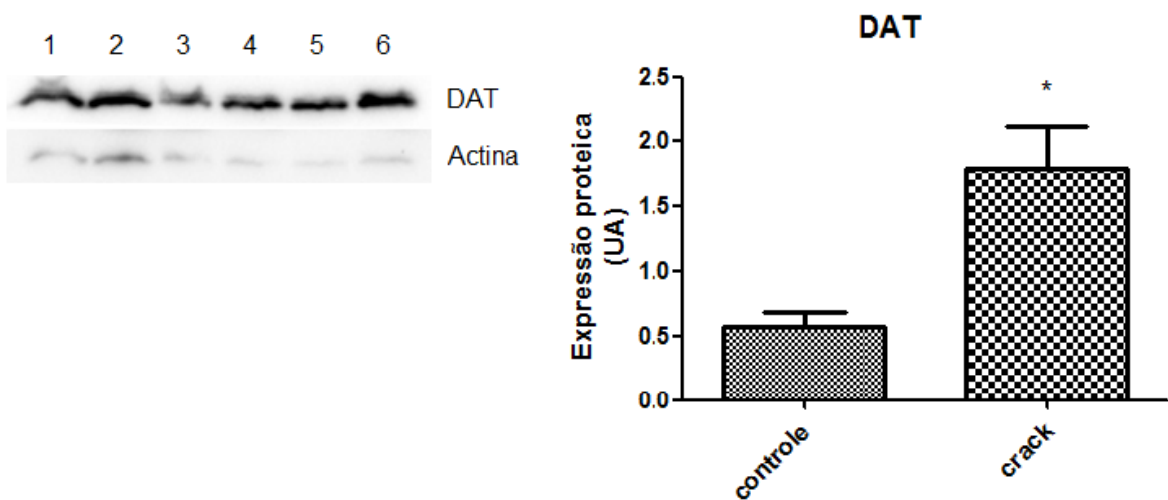


Figura 13. Análise da expressão proteica do DAT por imunoblot (1-3= grupo crack, 4-6=grupo controle). Valores expressos em unidade arbitrária normalizada com actina. UA= unidade arbitrária. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, teste T não pareado.

5.5 Quantificação de dopamina, DOPAC e HVA no córtex pré-frontal

A quantificação de dopamina e seus metabólitos por HPLC revelou diminuição nos níveis do neurotransmissor [$F(3,5)=2,262$; $p=0,0377$], bem como de seus metabólitos DOPAC [$F(5,3)=1,429$; $p=0,0009$] e HVA [$F(3,5)=14,72$; $p=0,0021$], de aproximadamente 60% nos animais expostos ao crack (Figura 14).

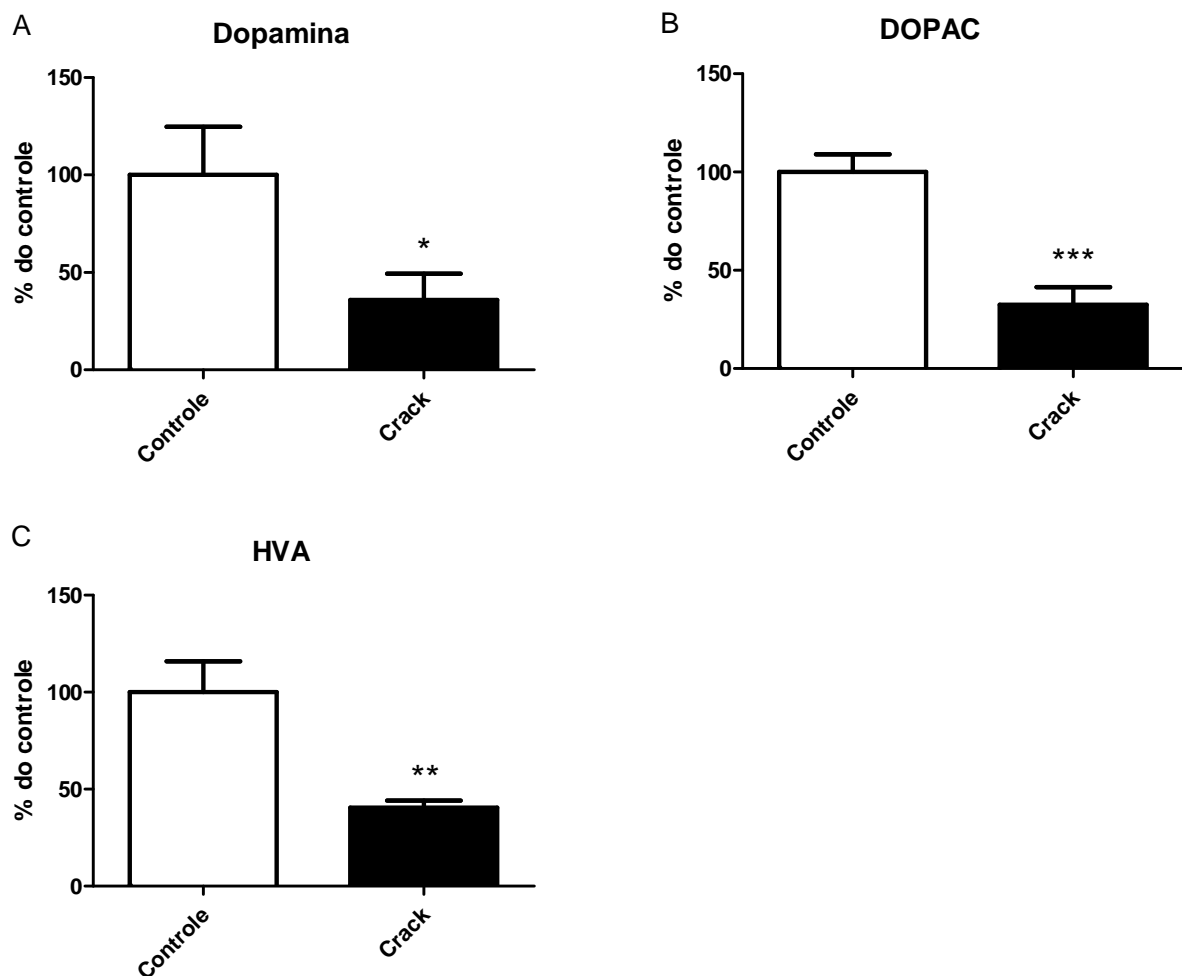


Figura 14. Efeitos do crack nos níveis de dopamina no córtex pré-frontal. Dados expressos como Média \pm erro padrão de 4 animais por grupo. * $p<0,05$, ** $p<0,001$ e $p<0,0001$ em relação ao grupo controle, teste T não pareado.

6 DISCUSSÃO

Para auxiliar na validação do modelo animal de inalação de crack utilizado, foi realizada a quantificação de cocaína e seus metabólitos BEG, EME, e MEG no sangue coletado dos animais logo após a exposição. Até onde sabemos, esse foi o primeiro estudo a realizar essa quantificação logo após a inalação crônica de crack em roedores. Um resultado interessante obtido a partir da análise pelo GC-MS foi que a concentração de MEG se apresentou bem mais elevada do que a da própria cocaína. Além disso, a concentração sanguínea de cocaína foi menor, enquanto que a concentração de MEG foi bem maior do que o encontrado por Han et al. (2006). No trabalho citado, a amostra de sangue coletada 30 minutos após uma única administração apresentou níveis de MEG abaixo do limite de detecção, e ao final de uma única sessão de auto-administração com duração de 120 minutos os níveis de MEG se apresentaram entre 10-15 ng/mL. Uma importante diferença entre os dados encontrados nos dois estudos se relaciona com a origem da droga. Enquanto a droga utilizada por Han et al. (2006) foi produzida no laboratório pelos próprios autores, a droga utilizada no presente estudo foi apreendida do tráfico de drogas pela polícia civil.

O MEG é um metabólito exclusivo do crack, produzido apenas pela pirólise da cocaína (WOOD et al, 1996). Um estudo realizado em ovelhas por Scheidweiler et al. (2003) revelou que tanto o volume de distribuição quanto o tempo de meia vida do MEG são maiores do que os da cocaína. Mais do que um simples marcador analítico do crack, esse metabólito chama atenção devido à sua neurotoxicidade. Por meio de ensaios de viabilidade celular utilizando cultura de células hipocâmpais de ratos, Garcia et al. (2012) demonstrou que o MEG apresenta maior potencial neurotóxico do que a própria cocaína, e, ainda, que a combinação desses dois compostos gera um efeito neurotóxico aditivo. Os autores sugerem que a indução da morte celular por MEG envolve apoptose, desencadeada por ativação da caspase-3, enquanto a toxicidade induzida pela cocaína envolve dano à membrana, como sugerido pela liberação de lactato desidrogenase intracelular. Em conjunto, esses mecanismos levariam ao efeito neurotóxico aditivo da combinação das duas substâncias. Dessa forma, acreditamos que os efeitos observados nos parâmetros avaliados possam ter contribuição desses dois compostos.

No aspecto comportamental, os animais do grupo crack apresentaram hiperlocomoção após as sessões de inalação. Apesar de não ter sido observado um aumento progressivo na atividade locomotora, característico de sensitização comportamental, os animais apresentaram um aumento na distância percorrida quando comparados ao grupo controle desde a primeira sessão de inalação e durante todo o experimento, sugerindo o desenvolvimento de um comportamento estereotipado induzido pela droga. Dados na literatura demonstram claramente que os efeitos locomotores promovidos pela cocaína variam de acordo com a dose e o padrão de administrações da droga (CALIPARI et al., 2013; SCHLUSSMAN et al., 2003; ZHANG et al., 2013; JAYARAM; STEKETEE, 2005; GRIGNASCHI et al., 2004; LI et al., 2004). Diversos estudos demonstram que protocolos com tratamento crônico do tipo *binge* (altas doses) não produzem sensitização, e, em alguns casos, promovem tolerância comportamental (SCHLUSSMAN et al., 2003; BEN-SHAHAR et al., 2004; ZHANG et al., 2013). Por outro lado, a sensitização comportamental pode ser observada em estudos com padrão de administração intermitente (CALIPARI et al., 2013) e em exposição aguda ou a curto-prazo (Solinas et al., 2008; GRIGNASCHI et al., 2004; LI et al., 2004). Além disso, já foi demonstrado que o acesso estendido e em altas doses da droga falha em desenvolver sensitização comportamental, mas promove aumento escalonado no consumo em experimentos de auto-administração, demonstrando que a sensitização e o uso compulsivo estão dissociados (BEN-SHAHAR et al., 2004).

Ainda no plano comportamental, foi observado um comportamento característico nos camundongos submetidos à inalação durante avaliação no campo aberto. Esses animais apresentaram pulos repetitivos nos cantos da caixa, inicialmente levantando a hipótese de ser um “efeito *popcorn*”. No entanto, o “efeito *popcorn*”, observado em intoxicação aguda por cocaína ou canabinóides, é um comportamento de hiper-reflexia no qual os animais se encontram em um estado de sedação, apresentando quase nenhum movimento, até que um estímulo os faça saltar (DEWEY, 1989). Como os camundongos do grupo crack não se encontravam em sedação, e sim com hiperlocomoção, e os saltos ocorriam sempre nos cantos das caixas aparentando uma tentativa de fuga, observou-se que esse comportamento, característico dos animais do grupo crack, não se tratava do “efeito *popcorn*”. Inicialmente, a avaliação dos animais no campo aberto foi dividida em dois

segmentos de 5 minutos cada considerando a curta duração dos efeitos do crack. De forma interessante, pôde-se observar que a frequência dos pulos aumenta no segmento de 5-10 min. após a inalação em comparação com o segmento de 0-5 min, enquanto que a atividade locomotora propriamente dita (avaliada pela distância percorrida) é maior no primeiro segmento de tempo. Desta forma, podemos inferir que no segundo segmento de tempo no teste do campo aberto a atividade locomotora passa a ser substituída pelo comportamento dos saltos. Além disso, foi observado que o fator tempo foi significativo na diferença observada entre os grupos em relação aos saltos, mostrando que esta frequência aumenta ao longo dos dias de inalação. Com isso, podemos inferir que houve sensibilização para este tipo de comportamento. Tendo em vista que esse comportamento ainda não havia sido relatado em modelos animais de adição à cocaína, sugere-se que esse seja um comportamento induzido exclusivamente pelo uso do crack e poderia ser um sinal de “*craving*”, já que a frequência aumenta no segundo segmento de tempo, no qual o efeito da droga já está se dissipando, ou ainda, uma manifestação de paranoia, um distúrbio psiquiátrico muito observado em usuários de crack (NAPPO et al., 2007; OLIVEIRA; NAPPO, 2008; RIBEIRO et al., 2010).

No intuito de compreender melhor os mecanismos moleculares da ação do crack no SNC, avaliou-se a expressão gênica relativa de alguns genes de interesse, a maior parte deles previamente relatados como alterados pela exposição à cocaína em diferentes regiões cerebrais (BOULLE et al, 2012; MCCARTHY et al, 2012; NESTLER, 2005; BESSON et al., 2013; HOLLIS et al, 2012; YUFEROV, et al, 2003).

Δ FosB é um produto de splicing do gene fosB que se acumula, principalmente no NAc, em resposta à exposição repetida à drogas de abuso (MCCLUNG; NESTLER, 2003;. RENTHAL et al, 2009). Esse fator de transcrição tem sido proposto como uma molécula chave na transição do uso recreativo de drogas para o estabelecimento da adição, tendo em vista que a elevação nos seus níveis leva a um aumento das propriedades recompensadoras das drogas (NESTLER, 2008). Em nosso estudo, a exposição ao crack promoveu um aumento na expressão de Δ FosB e uma diminuição na expressão de CREB, que também é um fator de transcrição envolvido no desenvolvimento da adição. Drogas estimulantes ativam o CREB em várias regiões cerebrais importantes para a adição e esta ativação, em geral, reduz a sensibilidade aos efeitos recompensadores das drogas e medeia o estado emocional negativo observado durante a abstinência. (NESTLER, 2003).

Alterações na expressão gênica induzidas pela exposição à cocaína a curto prazo são mais dependentes do CREB, enquanto que o acúmulo de Δ FosB, a longo prazo, leva este fator a ser o principal regulador da expressão gênica (MCCLUNG;NESTLER, 2003).

Outro alvo molecular envolvido com a adição à cocaína é o BDNF, principalmente a isoforma IV. Já foi reportada uma regulação positiva (*upregulation*) de BDNF na região da VTA promovida por exposição aguda e, também, após abstinência prolongada, enquanto que no CPF foi observada *upregulation* após administração aguda e regulação negativa (*downregulation*) após abstinência prolongada (MCGUINTY et al, 2010). Com o protocolo utilizado no presente estudo, a inalação de crack não alterou a expressão gênica de BDNFIV, nem de seus receptores, TrkB1 e TrkB2, como esperado.

Como a cocaína altera a neurotransmissão dopaminérgica, decidiu-se avaliar a expressão gênica relativa dos receptores D1R, D2R e D3R, além da enzima de síntese tirosina hidroxilase. Observou-se um aumento acentuado na expressão desses genes, especialmente do receptor D2R, sugerindo, inicialmente, uma hiperativação do sistema dopaminérgico. Os receptores D1R estão diretamente envolvidos nos efeitos de reforço da cocaína. Conforme demonstrado em estudos utilizando camundongos D1R-KO (*knockout*), a ativação de receptores D1R é necessária para a indução das respostas celulares e comportamentais típicas à administração da cocaína (XU et al, 1994; CAINE, et al., 2007). Já foi relatado que a administração de antagonistas D1R na região da amígdala basolateral em modelo de auto-administração de cocaína bloqueia o comportamento de busca pela droga. Além disso, a microinjeção de antagonistas D1R no CPF se mostrou capaz de bloquear o restabelecimento da preferência condicionada por lugar (CPP) à cocaína induzida por estresse ou pela droga (SANCHEZ et al., 2003; BERGLIND et al., 2006). A superexpressão de D1R induzida por exposição à cocaína já foi observada anteriormente no corpo estriado (YUFEROV, et al, 2003).

Em relação aos receptores D3R, estudos em humanos (*post-mortem*) reportaram um aumento da expressão de D3R no estriado de usuários mortos por overdose de cocaína (SEGAL et al, 1997; STALEY;MASH, 1996), além de um aumento nos níveis de mRNA de D3R no NAcB de camundongos após exposição crônica à cocaína (LE FOLL et al., 2002). Estudos utilizando antagonistas para D3R bem como camundongos D3R-KO revelam que este receptor não está diretamente

envolvido nos efeitos de reforço da cocaína em modelos de auto administração com esquema de razão fixa 1 e 2 (FR1 e FR2), onde são necessárias uma ou duas respostas para a obtenção de cocaína (CAINE et al., 2004; LE FOLL et al., 2005). No entanto, observou-se que a ativação desse receptor controla a motivação de auto administrar a cocaína em esquemas de razão progressiva (PR), em que a proporção de respostas exigidas aumenta gradualmente, ou ainda, em razão fixa 10, onde dez respostas são necessárias para a obtenção da droga (GILBERT et al., 2003). Dessa forma, observa-se que a habilidade de antagonistas D3R em reduzir a motivação à administração da droga depende do “preço”, ou seja, da dificuldade em conseguí-la (LE FOLL et al., 2005). Além disso, já foi demonstrado que um antagonista seletivo de D3R reduz a preferência condicionada por lugar à cocaína (HACHIMINE, et al., 2014). Esse receptor, claramente envolvido nos mecanismos de adição à cocaína, apresentou *upregulation* na região do córtex pré-frontal nos animais submetidos à inalação de crack por 11 dias.

O DAT é o principal sítio de ação da cocaína, e o uso crônico da droga pode levar a alterações moleculares e bioquímicas nesse transportador. No presente trabalho, foi verificado que os níveis da proteína DAT se encontraram aumentados no CPF dos animais submetidos à inalação crônica de crack. Estudos anteriores demonstraram níveis proteicos elevados no CPF após experimentos de auto-administração crônica de cocaína, inclusive da forma glicosilada, que é a mais abundante e mais eficiente no transporte de dopamina (GRIMM et al., 2002; MCINTOSH, et al., 2013). Por outro lado, em um estudo avaliando os níveis de mRNA do DAT no caudado-putâmen não foi verificada diferença em animais submetidos a tratamento crônico ou agudo com cocaína em relação ao grupo controle (ZHANG, et al., 2013). A avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real no presente estudo não foi possível visto que a eficiência de amplificação dos *primers* desenhados na região estudada não foi satisfatória. Dessa forma, foi avaliada apenas a expressão da proteína, que se apresentou aumentada no CPF dos animais do grupo crack.

Apesar de alguns autores apontarem a ativação de D1R como o principal responsável pelos efeitos provocados pelo uso da cocaína, estudos recentes revelam o envolvimento de D2R tanto nas propriedades de reforço quanto na resposta motora a essa droga (WELTER, et. al., 2007; DE MEI et al., 2009). Embora alguns estudos tenham mostrado uma diminuição da expressão de receptores D2R

(NADER et al., 2006) bem como inibição de sua sinalização no estriado (NAVARRO et al., 2013), promovidas pela cocaína, os resultados aqui encontrados revelaram um aumento na expressão gênica de D2R no córtex pré-frontal dos animais do grupo crack.

Uma condição sabidamente relacionada à hiperativação dopaminérgica, especialmente dos receptores D2R, é a esquizofrenia. Essa característica chama a atenção devido aos relatos de alucinações e paranoia observados entre os usuários de crack (NAPPO et al., 2007; OLIVEIRA & NAPPO, 2008), o que sugere a possibilidade desses sintomas serem mediados pelos receptores D2R. Ainda com relação a esse aumento na expressão de D2R, surge a possibilidade de que o comportamento repetitivo dos saltos, observado nos animais do grupo crack, possa ser uma expressão de paranoia, mediada por uma superexpressão desses receptores.

Apesar de ainda não ter sido relatado no córtex pré-frontal, já foi demonstrado que a cocaína é capaz de aumentar os níveis de anandamida no estriado via ativação de receptores D2R, que leva à inibição da FAAH e à estimulação da N-PLD (CENTONZE, 2004). No presente estudo, observou-se diminuição na expressão gênica de CB1R, FAAH e MAGL no córtex pré-frontal de animais expostos à inalação de crack. Já foi observada previamente uma diminuição na expressão proteica do receptor CB1 no córtex pré-frontal tanto de camundongos e ratos tratados com cocaína quanto de humanos viciados (análises *post-mortem*), além de desregulação na via de sinalização deste receptor (ÁLVARO-BARTOLOMÉ; GARCÍA-SEVILLA, 2013). Essa diminuição na expressão do receptor CB1 pode ser mediada pelo excesso de AEA, que tem sua liberação aumentada com o uso de cocaína via ativação dos receptores D2R (ÁLVARO-BARTOLOMÉ; GARCÍA-SEVILLA, 2013).

A deleção genética de CB1 bem como seu bloqueio farmacológico já demonstrou diminuir os efeitos reforçadores e comportamentais da cocaína, além de reduzir tanto a concentração basal extracelular de dopamina quanto o aumento dessa concentração induzida pela cocaína no NAcb (SORIA et al., 2005; LI et al., 2009). A concentração de dopamina, DOPAC e HVA, determinada por HPLC, revelou uma diminuição desse neurotransmissor, bem como de seus metabólitos, na região do córtex pré-frontal nos animais submetidos à inalação crônica de crack.

Alguns autores sugerem que a atividade neuronal no circuito de recompensa sofre dessensitização como resultado do uso crônico de cocaína, e que esse processo facilita a transição do uso controlado para o uso compulsivo por favorecer o aumento do consumo (KOOB;LE MOAL, 2001; BEN-SHARAR et al., 2004). A sensibilização inicial aos efeitos da cocaína pode aumentar os efeitos reforçadores da droga e levar ao desejo de consumir a droga novamente. No entanto, com o aumento na frequência das administrações, inicia-se um estágio de intoxicação que resulta na ativação de processos contrários à sensibilização como um mecanismo de adaptação, que atua no sentido de diminuir os mecanismos de reforço (KOOB;LE MOAL, 1997; KOOB;LE MOAL, 2001).

Ben-Sharar (2004) demonstrou diferenças celulares e comportamentais importantes em grupos de animais que foram submetidos a experimentos de auto-administração de cocaína com acesso curto ou acesso prolongado à droga. Animais com acesso diário de 1h à cocaína mantiveram níveis estáveis de auto-administração durante os 8 dias de protocolo, enquanto os animais com acesso diário de 6h apresentaram um aumento escalonado (uso compulsivo) nas administrações. Além disso, após um período de abstinência e um subsequente desafio, os animais que tiveram previamente um acesso curto à droga apresentaram aumento na expressão de c-Fos em regiões como NAcb e CPF, bem como um aumento na atividade locomotora (sensibilização). Já no grupo de animais submetidos a acesso longo à cocaína esses efeitos celulares e comportamentais estavam diminuídos. Esses dados contribuem com a hipótese previamente levantada de que o uso compulsivo e em altas doses ativa processos contrários à sensibilização inicial, que resultam na diminuição dos mecanismos de reforço.

Avaliando em conjunto os dados obtidos, o protocolo experimental e as informações encontradas na literatura, podemos inferir que após 11 dias de inalação diária de crack os camundongos se encontraram nesse estágio de recalibração do sistema mesocorticolímbico, desenvolvendo uma dessensitização desse sistema. Os efeitos observados nos sistemas dopaminérgico e endocanabinóide pela exposição ao crack podem ser os mediadores desse processo.

Sabe-se que a exposição inicial ao crack leva a uma hiperestimulação dopaminérgica devido ao acúmulo de dopamina na fenda sináptica. A ativação de

receptores D2R causa inibição da FAAH e estimulação da MAGL, resultando no aumento da concentração de AEA (CENTONZE, 2004). Os níveis elevados de AEA podem estar induzindo a dessensibilização do receptor CB1R como um mecanismo compensatório (ÁLVARO-BARTOLOMÉ; GARCÍA-SEVILLA, 2013). Como a ativação de CB1R está envolvida em alterações de plasticidade nos neurônios dopaminérgicos influenciando nos efeitos celulares e comportamentais da cocaína (VLACHOU & PANAGIS, 2014), inclusive na liberação de dopamina, é possível que a diminuição na expressão gênica observada para esse receptor possa estar envolvida com uma diminuição nos mecanismos de recompensa, que, por sua vez, pode estar relacionada com a diminuição dos níveis de dopamina encontrada. Em resposta aos baixos níveis de dopamina existentes, a regulação gênica poderia agir de forma compensatória levando ao aumento observado na expressão dos receptores dopaminérgicos avaliados, bem como da enzima de síntese de dopamina, tirosina hidroxilase.

Outro fator que não pode ser desconsiderado é a neurodegeneração promovida pelo uso do crack. Resultados preliminares de um ensaio com o Fluoro-Jade B®, um marcador específico de neurônios mortos, demonstraram uma intensa morte neuronal na região do córtex pré-frontal de um animal submetido à inalação de crack. No entanto, ainda não foi possível realizar a quantificação dos neurônios marcados e o número de animais avaliado até o momento foi de apenas 1 animal por grupo, requerendo novas análises para a confirmação desses dados. Ainda assim, dados na literatura demonstrando a neurotoxicidade causada pela cocaína e pelo MEG (GARCIA et al., 2012) associados a esse resultado prévio sugerem que a inalação de crack por 11 dias promove morte neuronal no córtex pré-frontal. Mecanismos compensatórios frente a essa neurodegeneração, induzida pela associação de MEG e crack, também podem contribuir para o aumento da expressão gênica de componentes dopaminérgicos, essenciais para o funcionamento normal do sistema.

Frente aos resultados observados, incluindo alterações ainda não descritas para modelos de adição utilizando cocaína por via intravenosa ou intraperitoneal, e considerando que a concentração de MEG encontrada no sangue dos animais expostos ao crack se mostrou muito mais elevada do que a da cocaína em si, surge a possibilidade de que os efeitos observados no córtex pré-frontal bem como os

efeitos comportamentais possam ser mediados pelo MEG e não somente pela cocaína. As alterações promovidas pelo crack no córtex pré-frontal podem ser as principais responsáveis pelo descontrole comportamental característico dos usuários de crack, que os levam a quadros não observados em usuários de cocaína por via nasal. Dessa forma, ressalta-se a importância de estudos específicos para o abuso de crack, para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na adição a essa droga. Os resultados aqui encontrados reforçam que a adição ao crack não pode ser tratada como a adição à cocaína em pó. O presente trabalho propôs um modelo animal específico para o abuso de crack, com o objetivo de verificar as alterações moleculares, bioquímicas e comportamentais promovidas pela inalação crônica dessa droga. No entanto, ainda são escassas as pesquisas que visam elucidar os aspectos neurobiológicos da adição ao crack. Estudos comparativos com a cocaína e até mesmo com o MEG também contribuiriam com a identificação das principais diferenças entre os processos neurobiológicos associados ao uso do crack e da cocaína. A compreensão dos mecanismos bioquímicos e moleculares responsáveis pela dependência ao crack é essencial na busca de estratégias terapêuticas específicas e eficazes para o abuso dessa droga.

7 CONCLUSÃO

- A exposição ao crack no modelo utilizado promoveu uma concentração maior de MEG em relação à cocaína no sangue dos animais submetidos à inalação da droga.
- A exposição de camundongos à inalação de crack por 11 dias promoveu hiperlocomoção em todas as sessões, contudo, essa característica não apresentou aumento dependente de tempo. Portanto, os animais não apresentaram sensitização comportamental no modelo utilizado;
- Os camundongos expostos à inalação crônica de crack apresentaram saltos repetitivos durante o teste do campo aberto, com aumento da frequência ao longo das sessões, demonstrando o desenvolvimento de sensitização para este comportamento;
- O aumento na expressão gênica de Δ FosB nos animais submetidos a 11 dias de inalação de crack confirma que estes animais desenvolveram adição à droga;
- A inalação crônica de crack aumenta a expressão gênica de componentes do sistema dopaminérgico, diminui os níveis de dopamina e seus metabólitos, e reduz a expressão gênica de componentes do sistema endocanabinóide no CPF de camundongos, sugerindo que esses sistemas estão envolvidos nos mecanismos de adição ao crack;
- A inalação de crack, via D2R, diminui a expressão de componentes do sistema endocanabinóide levando a uma diminuição nos níveis de dopamina, o que resulta no aumento da expressão de componentes do sistema dopaminérgico por mecanismo compensatório;
- O aumento da expressão do sistema dopaminérgico no CPF promovido pela exposição ao crack pode ser responsável pelo comportamento tipo psicótico observado nos usuários do crack.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARO-BARTOLOMÉ, M.; GARCIA-SEVILLA, J.A. Dysregulation of cannabinoid CB1 receptor and associated signaling networks in brains of cocaine addicts and cocaine-treated rodents. **Neuroscience**. v.247, p.294-308, 2013.
- BASTOS, F.I; BERTONI, N. Perfil dos usuários de crack e/ou similares no Brasil. Brasil, 2013. Disponível em: < <http://www.casacivil.gov.br/noticias/perfil-brasil.pdf>>. Acesso em: 20/05/2014.
- BEAULIEU, J.; GAINETDINOV, R. R. The Physiology , Signaling , and Pharmacology of Dopamine Receptors. **Pharmacol Rev.**, v. 63, n. 1, p. 182–217, 2011.
- BEN-SHAHAR, O., et al. The transition from controlled to compulsive drug use is associated with a loss of sensitization. **Brain Res**. v.995, n.1, p.46-54, 2004.
- BERGLIND, W.J.; CASE, J.M.; PARKER, M.P.; FUCHS, R.A.; SEE, R.E. Dopamine D1 or D2 receptor antagonism within the basolateral amygdala differentially alters the acquisition of cocaine-cue associations necessary for cue-induced reinstatement of cocaine-seeking. **Neuroscience**. v.137, n.2, p.699-706, 2006.
- BESSON, M.; PELLOUX, Y.; DILLEEN, R.; THEOBALD, D.E.; LYON, A.; BELIN-RAUSCENT, A.; ROBBINS, T.W.; DALLEY, J.W.; EVERITT, B.J.; BELIN, D. Cocaine modulation of frontostriatal expression of Zif268, D2, and 5-HT2c receptors in high and low impulsive rats. **Neuropsychopharmacology**. v.38, n.10, p.1963-73, 2013.
- BISOGNO, T.; LIGRESTI, A.; DI MARZO, V. The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 81, n. 2, p. 224-238, 2005.
- BOLLA, K.I.; ROTHMAN, R.; CADET, J.L. dose-related behavioral effects of chronic cocaine use. **J. Neuropsychiatry Clin Neurosci**. v.11, p.361-369, 1999.
- BOULLE, F.; VAN DEN HOVE, D.L.; JAKOB, S.B.; RUTTEN, B.P.; HAMON, M.; et al. Epigenetic regulation of the BDNF gene: implications for psychiatric disorders. **Mol Psychiatry**. v.17, n.6, p.584-96, 2012.
- BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. Goodman & Gilman: As Bases farmacológicas da Terapêutica. 12ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

CALIPARI, E. S.; FERRIS, M. J.; ZIMMER, B. A.; ROBERTS, D. C. S.; JONES, S. R. Temporal pattern of cocaine intake determines tolerance vs sensitization of cocaine effects at the dopamine transporter. **Neuropsychopharmacology**. v. 38, n. 12, p. 2385–92, 2013.

CAINE, S.B.; THOMSEN, M.; BARRETT, A.C.; COLLINS, G.T.; GRUNDT, P.; NEWMAN, A.H.; BUTLER, P.; XU, M. Cocaine self-administration in dopamine D₃ receptor knockout mice. *Exp Clin Psychopharmacol*. v.20, n.5, p.352-63, 2012.

CENTONZE, D.; BATTISTA, N.; ROSSI, S.; et al. A critical interaction between dopamine D2 receptors and endocannabinoids mediates the effects of cocaine on striatal gabaergic Transmission. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 8, p. 1488–97, 2004.

CHANG, L.; ERNST, T.; STRICKLAND, T.; MEHRINGER, C.M. Gender effects on persistent cerebral metabolite changes in the frontal lobes of abstinent cocaine users. **Am. J. Psychiatry**. v.156, p.716-722, 1999.

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

CHEER, J.F.; WASSUM, K.M.; SOMBERS, L.A.; HEIEN, M.L.; ARIANSEN, J.L.; ARAGONA, B.J.; PHILLIPS, P.E.; WIGHTMAN, R.M. Phasic dopamine release evoked by abused substances requires cannabinoid receptor activation. **J Neurosci**. v.27, p.791–795, 2007.

COOPER, J.R.; BLOOM, F.E.; ROTH, R.H. **The biochemical basis of neuropharmacology**. 7 ed. New York: Oxford, 1996.

COSTA-LEITE, M.; ANDRADE, A. **Cocaína e crack**: dos fundamentos ao tratamento. Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul, 1999.

CUNHA, P. J.; NICASTRI, S.; GOMES, L. P.; MOINO, M.; PELUSO, A. Alterações neuropsicológicas em dependentes de cocaína / crack internados : dados preliminares. **Rev Bras Psiquiatr**. v. 26, n. 2, 2004.

DEWEY, W. L. Cannabinoid pharmacology. **Pharmacological reviews**, v. 38, n. 2, p. 151–78, 1986.

DI MARZO, V.; BIFULCO, M.; DE PETROCELLIS, L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. **Nature Reviews**. v.3, p. 771-784, 2004.

DINIERI, J. A.; NEMETH, C.; PARSEGHIAN, A.; et al. **J Neurosci**. v. 29, n. 6, p. 1855–1859, 2009.

DE CESARE, D.; SASSONE-CORSI, P. Transcriptional regulation by cyclic AMP-responsive factors. **Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.** v. 64, p.343–369, 2000.

DEVANE, W.A.; HANUS, L.; BREUER, A.; PERTWEE, R.G.; STEVENSON, L.A.; GRIFFIN, G.; GIBSON, D.; MANDELBAUM, A.; ETINGER, A.; MECHOULAM, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946-1949, 1992.

DUMAN, R.S. Synaptic plasticity and mood disorders. **Mol. Psychiatry**. v.7, p.29-34, 2002.

ENGLLOT, D.J.; YANG, L.; HAMID, H.; et al. Impaired consciousness in temporal lobe seizures: role of cortical slow activity. **Brain**. v.133, p.3764-3777, 2010.

FADDA, P.; SCHERMA, M.; SPANO, M.S., *et al.* Cannabinoid selfadministration increases dopamine release in the nucleus accumbens. **Neuroreport**. v.17, p.1629-32, 2006.

FILIP, M.; GOŁDA, A.; ZANIEWSKA, M.; MCCREARY, A.C.; NOWAK, E.; KOLASIEWICZ, W.; PRZEGALIŃSKI, E. Involvement of cannabinoid CB1 receptors in drug addiction: effects of rimonabant on behavioral responses induced by cocaine. **Pharmacol. Rep.** v.58, n.6, p. 806–819, 2006.

FONSECA, F.R.; GORRITI, M.A.; BILBAO, A.; et al. Role of the Endogenous Cannabinoid System as a Modulator of Dopamine Transmission : Implications for Parkinson ' s Disease and Schizophrenia. **Neurotoxicity Research**. v. 3, p. 23–35, 2001.

FRENCH, E.D.; DILLON, K.; WU, X. Cannabinoids excite dopamine neurons in the ventral tegmentum and substantia nigra. **Neuroreport**. v.8, p.649–52, 1997.

GARCIA, R. C. T.; DATI, L. M. M.; FUKUDA, S.; et al. Neurotoxicity of anhydroecgonine methyl ester, a crack cocaine pyrolysis product. **Toxicological**

sciences : an official journal of the Society of Toxicology, v. 128, n. 1, p. 223–34, 2012.

GRIMM, J.W.; SHAHAM, Y.; HOPE, B.T. Effect of cocaine and sucrose withdrawal period on extinction behavior, cue-induced reinstatement, and protein levels of the dopamine transporter and tyrosine hydroxylase in limbic and cortical areas in rats. *Behav Pharmacol.* v.13, p.379–88, 2002.

GOLDSTEIN, R.A.; DESLAURIERS, C.; BURDA, A.; JOHNSON-ARBOR, K. Cocaine: history, social implications, and toxicity: a review. **Semin Diagn Pathol.** v.26, n.1, p.10-7, 2009.

GRIGNASCHI, G.; BURBASSI, S.; ZENNARO, E.; BENDOTTI, C.; CERVO, L. A single high dose of cocaine induces behavioural sensitization and modifies mRNA encoding GluR1 and GAP-43 in rats. *Eur J Neurosci.* v.20, n.10, p.2833-2837, 2004.

GUZMAN, M. Cannabinoids: Potential anticancer agents. **Nat Rev Cancer.** v.3, n.10, p.745-55, 2003.

HAIM, D.Y; LIPPMANN, M.L.; GOLDBERG, S.K.; WALKENSTEIN, M.D. The pulmonary complications of crack cocaine. A comprehensive review. **Chest.** v.107, n.1, p.233-40, 1995.

HACHIMINE, P.; SEEPERSAD, N.; ANANTHAN, S.; RANALDI, R. The novel dopamine D3 receptor antagonist, SR 21502, reduces cocaine conditioned place preference in rats. **Neurosci Lett.** v.21, n.569, p.137-14, 2014.

HALBACH, O.V.; DERMIETZEL, R. **Neurotransmitters and Neuromodulators: Handbook of Receptors and Biological Effects.** 2 ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2006.

HATSUKAMI, D.K.; FISCHMAN, M. W. Crack cocaine and cocaine hydrochloride. Are the differences myth or reality? *J Am Med Association.* v.276, n.19, p.1580-1588, 1996.

HE, F.; LIDOW, I. A; LIDOW, M. S. Inhalational model of cocaine exposure in mice: neuroteratological effects. **Neurotoxicology and teratology**, v. 28, n. 2, p. 181–97, 2006.

HOLLIS, F.; GAVAL-CRUZ, M.; CARRIER, N.; DIETZ, D.M.; KABBAJ, M. Juvenile and adult rats differ in cocaine reward and expression of zif268 in the forebrain. *Neuroscience*. v.200, p.91-98, 2012.

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

JAYARAM, P.; STEKETEE, J.D. Effects of cocaine-induced behavioural sensitization on GABA transmission within rat medial prefrontal cortex. *Eur J Neurosci*. v.21, n.7, p.2035-9, 2005.

JONES, M.W.; ERRINGTON, M.L.; FRENCH, P.J.; FINE, A. BLISS, T.V.; GAREL, S.; CHARNAY, P.; BOZON, B.; LAROCHE, S.; DAVIS, S. A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. **Nat Neurosci**. v.4, n.3, p.289-296, 2001.

KALIVAS, P.W., AND MCFARLAND, K. Brain circuitry and the reinstatement of cocaine-seeking behavior. **Psychopharmacology**. v.168, n.1-2, p.44-56, 2003.

KATHMANN, M.; WEBER, B; SCHLICKER, E. Cannabinoid CB1 receptor mediated inhibition of acetylcholine release in the brain of NMRI, CD-1 and C57BL/6J mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol**, v. 363, n. 1, p. 50-56, 2001.

KATONA, I.; SPERLÁGH, B.; MAGLÓCZKY, Z.; SÁNTHA, E.; KÖFALVI, A.; CZIRJÁK, S.; MACHIE, K.; VIZI, E. S.; FREUND, T. F. Gabaergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. **Neuroscience**, v. 100, n. 4, p. 797-804, 2000.

KHOURY, M. EL; GORGIEVSKI, V.; MOUTSIMILLI, L.; GIROS, B.; TZAVARA, E. T. Interactions between the cannabinoid and dopaminergic systems : Evidence from animal studies. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 38, n. 1, p. 36–50, 2012.

KOFALVI, A.; RODRIGUES, R.J.; LEDENT, C.; MACKIE, K., et al. Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. **J Neurosci**. v.25, p.2874–84, 2005.

KOOB GF, LE MOAL M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. **Science**. v.278, p.52–58, 1997.

KOOB GF, LE MOAL M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. **Neuropsychopharmacology**. v.24, p.97–129, 2001.

KOOB,G.F.; VOLKOW,N.D.Neurocircuitry of addiction. **Neuropsychopharmacology**. v.35, n.1, p. 217-38.

KVERNMO, T.; HÄRTTER, S.; BURGER, E. A review of the receptor-binding and pharmacokinetic properties of dopamine agonists. **Clinical therapeutics**, v. 28, n. 8, p. 1065–78, 2006.

LARANJEIRA, R.; MADRUGA, C.S.; PINSKY, I.; et al. II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD). São Paulo: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD), UNIFESP, 2012.

LE, B.; GOLDBERG, S. R.; SOKOLOFF, P. The dopamine D3 receptor and drug dependence : Effects on reward or beyond ? **Neuropharmacology**. v. 49, p.525-541, 2005.

LEFOLL B, GOLDBERG SR, SOKOLOFF P. The dopamine D3 receptor and drug dependence: effects on reward or beyond? **Neuropharmacology**. v.49, p.525–541, 2005.

LI, Y.; ACERBO, M.J.; ROBINSON, T.E. The induction of behavioural sensitization is associated with cocaine-induced structural plasticity in the core (but not shell) of the nucleus accumbens. **Eur J Neurosci**. v.20, n.6, p.1647-54, 2004.

LONZE, B. E.; GINTY, D. D. Function and Regulation of CREB Family Transcription Factors in the Nervous System. **Neuron**. v. 35, p. 605–623, 2002.

MARANDA, M.J.; HAN, C.; RAINONE, G.A. Crack cocaine and sex. **J Psychoactive Drugs**. v.36, n.3, p.315-22, 2004.

MARZO, V. DI. The endocannabinoid system : Its general strategy of action , tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. **Pharmacological Research**. v. 60, p. 77–84, 2009.

MATSUDA, L.A; LOLAIT, S.J.; BROWNSTEIN, M.J; YOUNG, A.C; BONNER, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, n. 6284, p. 561-564, 1990.

MCCARTHY, D. M.; BROWN, A. N.; BHIDE, P. G. Regulation of BDNF Expression by cocaine. **Yale Journal of Biology and Medicine**. v. 85, p. 437–446, 2012.

MCCLUNG, C. A; NESTLER, E. J. Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and DeltaFosB. **Nature neuroscience**, v. 6, n. 11, p. 1208–15, 2003.

MCGINTY, J.F., et al. Brain-derived neurotrophic factor and cocaine addiction. **Brain Res**. v.1314, p.183-193, 2010.

MCINTOSH, S.; HOWELL, L.; HEMBY, S.E. Dopaminergic dysregulation in prefrontal cortex of rhesus monkeys following cocaine self-administration. **Front Psychiatry**. v.4, n.88, p.1-10, 2013.

MEI, C. DE; RAMOS, M.; IITAKA, C.; BORRELLI, E. Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. **Current opinion in pharmacology**, v. 9, n. 1, p. 53–8, 2009.

MEREU, M.; TRONCI, V.; CHUN, L. E.; et al. Cocaine-induced endocannabinoid release modulates behavioral and neurochemical sensitization in mice. **Addiction Biology**, 2013.

MEYER, V. J.; LITTLE, D. M.; FITZGERALD, D. A; et al. Crack cocaine use impairs anterior cingulate and prefrontal cortex function in women with HIV infection. **Journal of neurovirology**, 2014.

MORATALLA, R.; ELIBOL, B.; VALLEJO, M.; GRAYBIEL, A. M. Network-level changes in expression of inducible Fos-Jun proteins in the striatum during chronic cocaine treatment and withdrawal. **Neuron**. v. 17, p.147–156, 1996.

MORERA-HERRERAS, T.; RUIZ-ORTEGA, J.A.; UGEDO, L. Two opposite effects of Δ^9 - tetrahydrocannabinol on subthalamic nucleus neuron activity: involvement of GABAergic and glutamatergic neurotransmission. **Synapse**, v. 64, p. 20-29, 2010.

MORGAN, J. I. & CURRAN, T. Immediate-early genes: ten years on. **Trends Neurosci**. v.18, p.66–67, 1995.

MUNRO, S.; THOMAS, K.L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a

peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61-65, 1993.

NADER, M.A.; MORGAN, D.; GAGE, H.D.; NADER, S.H.; CALHOUN, T.L.; BUCHHEIMER, N.; EHRENKAUFER, R.; MACH, R.H. PET imaging of dopamine D2 receptors during chronic cocaine self-administration in monkeys. **Nat Neurosci**. v. 9, n.8, p.1050-105, 2006.

NAVARRO,G., et al. Cocaine Inhibits Dopamine D2 Receptor Signaling via Sigma-1-D2 Receptor Heteromers. **PLoS One**. v.8, n.4, p.1-15, 2013.

NESTLER, E. J. The neurobiology of cocaine addiction. **Science & practice perspectives / a publication of the National Institute on Drug Abuse, National Institutes of Health**, v. 3, n. 1, p. 4–10, 2005.

NESTLER, E. J. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 2, n. 2, p. 119–28, 2001.

NESTLER, E. J. Is there a common molecular pathway for addiction? **Nature neuroscience**, v. 8, n. 11, p. 1445–9, 2005.

NESTLER, E. J. Cellular basis of memory for addiction. **Dialogues Clin Neurosci**. v.15, n.4 p. 431–443, 2013.

OLIVEIRA, L.G.; NAPPO, S.A. Caracterização da cultura de crack na cidade de São Paulo: padrão de uso controlado. **Rev Saúde Pública**. v.2, n.4, p.664-71, 2008.

PARKS, M.H.; GREENBERG, D.S.; NICKEL, M.K.; DIETRICH, M.S.; ROGERS, B.P.; MARTIN, P.R. Recruitment of additional brain regions to accomplish simple motor tasks in chronic alcohol-dependent patients. **Alcohol Clin Exp Res**. v.34, n.6, p.1098-109, 2010.

RANKIN, M.L.; HAZELWOOD, L.A.; FREE, R.B.; NAMKUNG, Y.; REX, E.B.; ROOF, R.A.; SIBLEY, D.R. Molecular pharmacology of the dopamine receptors. In: IVERSEN, L.L.; DUNNETT, S.B.; IVERSEN, S.D.; BJORKLUND, A. **Dopamine Handbook**. Nova Iorque: Oxford University Press, 2010, p. 63–87.

RENTHAL, W.; KUMAR, A.; XIAO, G.; WILKINSON, M.; ET AL. Genome-wide analysis of chromatin regulation by cocaine reveals a role for sirtuins. **Neuron**. v.62, n.3, p.335-48, 2009.

RIBEIRO, L.A.; SANCHEZ, Z.M.; NAPPO, S.A. Surviving crack: a qualitative study of the strategies and tactics developed by Brazilian users to deal with the risks associated with the drug. **BMC Public Health**. v.10, 2010.

RITZ, M.C.; CONE, E.J.; KUCHAR, M.J. Cocaine inhibition of ligand binding at dopamine, norepinephrine and serotonin transporters: a structure-activity study. **Life Sci** v.46, p.635–645, 1990.

ROBINSON, T. E. & BERRIDGE, K. C. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. **Addiction**. v.95, p.91–117, 2000.

ROBINSON, T. E.; KOLB, B. Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. **Eur. J. Neurosci**. v.11, p.1598–1604, 1999.

RON, D.; JURD, R. The “ups and downs” of signaling cascades in addiction. **Science’s STKE**. v. 2005, n. 309, p.1-16, 2005.

RUSSO, S.J.; DIETZ, D.M.; DUMITRIU, D.; MORRISON, J.H., et al. The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. **Trends Neurosci**. v.33, n.6, p.267-76, 2010.

SANCHEZ, C.J.; BAILIE, T.M.; WU, W.R.; LI, N.; SORG, B.A. Manipulation of dopamine d1-like receptor activation in the rat medial prefrontal cortex alters stress- and cocaine-induced reinstatement of conditioned place preference behavior. **Neuroscience**. v.119, n.2, p.497-505, 2003.

SCHEIDWEILER, K. B.; PLESSINGER, M. A.; SHOJAIE, J.; WOOD, R. W.; KWONG, T. A. I. C. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Methylecgonidine , a Crack Cocaine Pyrolyzate. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 307, n. 3, p. 1179–1187, 2003.

SCHIFANO, F.; CORKERY, J. Cocaine/crack cocaine consumption, treatment demand, seizures, related offences, prices, average purity levels and deaths in the UK (1990 -2004). **J Psychopharmacol**. v.22, n.1, p.71-9, 2008.

SCHLUSSMAN, S.D.; ZHANG, Y.; KANE, S.; STEWART, C.L.; HO, A.; KREEK, M.J. Locomotion, stereotypy, and dopamine receptors

after chronic "binge" cocaine in C57BL/6J and 129/J mice. **Pharmacol Biochem Behav.** v.75, n.1, p.123-31, 2003.

SEGAL, D.M.; MORAES, C.T.; MASH, D.C. Up-regulation of D3 dopamine receptor mRNA in the nucleus accumbens of human cocaine fatalities. **Brain Res Mol Brain Res.** v.45, p.335–339, 1997.

SCHEIDWEILER, K. B.; PLESSINGER, M. A.; SHOJAIE, J.; WOOD, R. W.; KWONG, T. A. I. C. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Methylecgonidine , a Crack Cocaine Pyrolyzate. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 307, n. 3, p. 1179–1187, 2003.

SIEGEL, R.K. Cocaine smoking. **J Psychoactive Drugs.** v.14, n.4, p.271-359, 1982.

SOLINAS, M.; JUSTINOVA, Z.; GOLDBERG, S.R.; TANDA, G. Anandamide administration alone and after inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH) increases dopamine levels in the nucleus accumbens shell in rats. **J Neurochem.** v.98, p.408– 419, 2006.

SOLINAS M, CHAUVET C, THIRIET N, EL RAWAS R, JABER M. Reversal of cocaine addiction by environmental enrichment. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.105, n.44, p.17145-17150, 2008.

SORIA, G.; MENDIZABAL, V.; TOURINO, C.; ROBLEDO, P.; LEDENT, C.; PARMENTIER, M.; MALDONADO, R.; VALVERDE, O. Lack of CB1cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. **Neuropsychopharmacology** v.30, p.1670–1680, 2005.

STANDAERT, D.G.; GALANTER, J.M. Farmacologia da neurotransmissão dopaminérgica. In: Golan, D.E., TASHJIAN, A.H., ARMSTRONG, E.J., ARMSTRONG, A.W. **Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia.** 3ª ed.Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, p.188-207.

STALEY, J.K.; MASH, D.C. Adaptive increase in D3 dopamine receptors in the brain reward circuits of human cocaine fatalities. **J Neurosci.** v.16, p.6100–6106, 1996.

STELLA, N.; SCHWEITZER, P.; PIOMELLI, D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. **Nature,** v. 388, n. 6644, p. 773-778, 1997.

SWIFT, R.M.; LEWIS, D.C. Farmacologia da dependência e abuso de drogas. In: Golan, D.E., TASHJIAN, A.H., ARMSTRONG, E.J., ARMSTRONG, A.W. **Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

SZABO, B.; MÜLLER, T.; KOCH, H. Effect of cannabinoids on dopamine release in the corpus striatum and nucleus accumbens in vitro. **J Neurochem**, v. 73, n. 3, p. 1084-1089, 1999.

TAKAHASHI, K.A.; CASTILLO, P.E. The Cb1 cannabinoid receptor mediates glutamatergic synaptic suppression in the hippocampus. **Neuroscience**, v. 139, n. 3, p. 795-802, 2006.

TOENNES, S.W.; FANDIÑO, A.S.; KAUERT, G. Gas chromatographic-mass spectrometric detection of anhydroecgonine methyl ester (methylecgonidine) in human serum as evidence of recent smoking of crack. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl.** v.26;735, n.1, p.127-32, 1999.

TZAVARA, E.T.; DAVIS, R.J.; PERRY, K.W.; LI, X. SALHOFF, C., et al. The CB1 receptor antagonist SR141716A selectively increases monoaminergic neurotransmission in the medial prefrontal cortex: implications for therapeutic actions. **Br J pharmacol.** v.138, p.544–53, 2003.

UEDA, N., TSUBOI, K., UYAMA, T., AND OHNISHI, T. Biosynthesis and degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. **Biofactors**, v. 37, p.1–7, 2011.

UNODC- World Drug Report 2010 (United Nations Publication, Sales No. E.10.XI.13).

VALJENT, E.; AUBIER, B.; CORBILLÉ, A., et al. Plasticity-associated gene Krox24/Zif268 is required for long-lasting behavioral effects of cocaine. **J. Neurosci.** v.26, n.18, p.4956-4960, 2006.

VEZINA P. Sensitization, drug addiction and psychopathology in animals and humans. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.31, p.1553–1555, 2007.

VLACHOU, S.; PANAGIS, G. Regulation of Brain Reward by the Endocannabinoid System: A Critical Review of Behavioral Studies in Animals. **Curr Pharm Des.** v.20, n.13, p.2072-2088, 2014.

WELTER M, VALLONE D, SAMAD TA, MEZIANE H, USIELLO A, BORRELLI E. Absence of dopamine D2 receptors unmasks an inhibitory control over the brain circuitries activated by cocaine. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.104, p.6840-6845, 2007.

WILSON, R. I.; NICOLL, R. A. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. **Nature**, v. 411, n. 6840, p. 2-6, 2001.

WOOD, R.W.; SHOJAIE, J.; FANG, C.P.; GRAEFE, J.F. Methylecgonidine coats the crack particle. **Pharmacol Biochem Behav.** v.53, n.1, p.57-66, 1996.

XI, Z.X.; GILBERT, J.G.; PAK, A.C.; ASHBY, C.R. JR.; HEIDBREDER, C.A.; GARDNER, E.L. Selective dopamine D3 receptor antagonism by SB-277011A attenuates cocaine reinforcement as assessed by progressive-ratio and variable-cost-variable-payoff fixed-ratio cocaine self-administration in rats. **Eur J Neurosci.** v.21, n.12, p.3427-38, 2005.

XI, Z.X.; GILBERT, J.G.; PENG, X.Q.; PAK, A.C.; LI, X.; GARDNER, E.L. Cannabinoid CB1 receptor antagonist AM251 inhibits cocaine-primed relapse in rats: role of glutamate in the nucleus accumbens. **J. Neurosci.** v.26, n.33, p.8531–8536, 2006.

XU, M.; HU, X.T.; COOPER, D.C.; MORATALLA, R.; GRAYBIEL, A.M.; WHITE, F.J.; TONEGAWA, S. Elimination of cocaine-induced hyperactivity and dopamine-mediated neurophysiological effects in dopamine D1 receptor mutant mice. **Cell.** v.79, p.945-955, 1994.

YIN, J.C.; TULLY, T. CREB and the formation of long-term memory. **Curr Opin Neurobiol.** v.6, p.264-268, 1996.

YUFEROV, V. et al. Differential gene expression in the rat caudate putamen after "binge" cocaine administration: advantage of triplicate microarray analysis. **Synapse.** V.48, n.4, p.157-69, 2003.

YUFEROV, V.; NIELSEN, D.; BUTELMAN, E.; KREEK, M.J. Microarray studies of psychostimulant-induced changes in gene expression. **Addict Biol.** v.10, p.101-118, 2005.

ZHANG, Y.; SCHLUSSMAN, D.F.; RABKIN, J.; BUTELMAN, E.R.; HO, A.; KREEK, M.J. 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.