

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

LORENA BIANCHINE AREAL DE AZEVEDO

**ASPECTOS BIOQUÍMICOS, MOLECULARES E COMPORTAMENTAIS DA
DEPENDÊNCIA DE CRACK E COCAÍNA EM MODELOS ANIMAIS: ENFOQUE NOS
SISTEMAS DOPAMINÉRGICO E GLUTAMATÉRGICO.**

Belo Horizonte
2018

LORENA BIANCHINE AREAL DE AZEVEDO

**ASPECTOS BIOQUÍMICOS, MOLECULARES E COMPORTAMENTAIS DA
DEPENDÊNCIA DE CRACK E COCAÍNA EM MODELOS ANIMAIS: ENFOQUE NOS
SISTEMAS DOPAMINÉRGICO E GLUTAMATÉRGICO.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Neurociências da Universidade
Federal de Minas Gerais como requisito para a
obtenção do título de Doutora em Neurociências

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rita Gomes Wanderley
Pires

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Cristina Martins e Silva

Belo Horizonte
2018

043

Azevedo, Lorena Bianchine Areal de.

Aspectos bioquímicos, moleculares e comportamentais da dependência de crack e cocaína em modelos animais: enfoque nos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico [manuscrito] / Lorena Bianchine Areal de Azevedo. – 2018.

148 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rita Gomes Wanderley Pires. Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Cristina Martins e Silva.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Neurociências - Teses. 2. Sistema dopaminérgico - Teses. 3. Córtex pré-frontal - Teses. 4. Cocaína Crack. I. Pires, Rita Gomes Wanderley. II. Silva, Cristina Martins e. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612.8

LORENA BIANCHINE AREAL DE AZEVEDO

**ASPECTOS BIOQUÍMICOS, MOLECULARES E COMPORTAMENTAIS DA
DEPENDÊNCIA DE CRACK E COCAÍNA: ENFOQUE NOS SISTEMAS
DOPAMINÉRGICO E GLUTAMATÉRGICO.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Neurociências da Universidade
Federal de Minas Gerais como requisito para a
obtenção do título de Doutora em Neurociências

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rita Gomes Wanderley
Pires

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Cristina Martins e Silva

Belo Horizonte, 30 de maio de 2018

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 Fabiola Mara Ribeiro - UFMG

Prof.^a Dr.^a Grace Schenatto Pereira Gomes – UFMG

Prof.^a Dr.^a Vanessa Beijamini Harres – UFES

Prof.^a Dr.^a Sâmia Regiane Lourenço Joca - USP

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as oportunidades e pessoas que colocou em minha vida.

À minha família, pelo apoio incondicional, por me ensinarem desde sempre a importância do trabalho duro, pelo exemplo de coragem e dedicação. Obrigada em especial aos meus pais, por fazerem tudo ao seu alcance para o meu crescimento profissional. Sem vocês nada disso seria possível. Amo muito vocês!

Às minhas “Chefas” queridas, Prof.^a Dr.^a Rita G. W. Pires e Prof.^a Dr.^a Cristina Martins e Silva, pela confiança no meu trabalho, pelo apoio, disponibilidade e amizade. Vocês são grandes inspirações profissionais e foram determinantes para os caminhos que eu segui e para as minhas conquistas. Levarei os exemplos de vocês sempre comigo e serei eternamente grata.

Aos colegas do LNMC, àqueles que já passaram pelo lab e aos que ainda estão presentes. Obrigada pela disponibilidade em ajudar, pelos momentos de descontração e pela torcida. Tenho muito carinho por todos vocês! Agradeço especialmente à Dr.^a Alice Laschuk Herlinger pela colaboração direta com o trabalho, e pela amizade.

Às minhas amigas queridas que souberam compreender os momentos em que não pude estar presente, obrigada pela torcida e pelo apoio.

I'd like to thank Dr. Stephen Ferguson for giving me the opportunity to develop part of this project in his lab and for affording me great professional development by providing a new and resourceful environment. These experiences were invaluable in my pursuit of further international opportunity.

To my colleagues from the Ferguson lab: thank you for the help and friendship, it was an amazing journey being a part of the “Ferguson Tribe”.

To Dr. Henry A. Dunn, thank you for being my guardian angel in Ottawa, making my arrival and adaptation much easier and fun, for everything you taught me at the lab, for comforting and encouraging me when things got hard, and for continuing to share your knowledge and experience whenever I need. Most importantly, thank you for your love and support. I love you.

A todos os professores que passaram pela minha vida, desde o ensino fundamental à pós-graduação.

Ao Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares.

Ao Programa de Pós-graduação em Neurociências da UFMG pela oportunidade de realizar o doutorado.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A dependência química constitui um grave problema social e de saúde pública no mundo e, nas últimas décadas, o abuso de crack se tornou uma questão crítica em países em desenvolvimento como o Brasil. No entanto, estudos específicos para a dependência de crack ainda são escassos. No presente trabalho, decidiu-se ampliar os conhecimentos acerca dos efeitos do crack em processos cognitivos e suas bases moleculares, utilizando um modelo animal. Foi observado que a inalação de crack por 11 dias não afeta a memória de reconhecimento de objetos ou a memória espacial de referência. No entanto, camundongos expostos ao crack apresentam déficits na memória de trabalho e redução na interação social. Essas alterações comportamentais, em conjunto com uma redução nos níveis de dopamina no córtex pré-frontal e alteração na expressão de receptores D2R observados em um estudo anterior, além dos sintomas psiquiátricos apresentados por usuários de crack, nos levou a investigar se a exposição ao crack em nosso modelo animal leva a alterações moleculares semelhantes às observadas na esquizofrenia. Foi observado que após 11 dias de inalação de crack, a expressão das subunidades NR1, NR2A e NR2B de receptores NMDA foi reduzida e houve um aumento na razão entre a expressão das isoformas curta e longa de receptores D2R. Essas alterações moleculares, em conjunto com déficits na memória de trabalho e isolamento social são características encontradas em indivíduos com esquizofrenia. Dessa forma, demonstramos que a inalação de crack em camundongos promove alterações semelhantes às envolvidas com a esquizofrenia, provavelmente pelos mesmos mecanismos moleculares. Em relação à cocaína, estudos vêm demonstrando que a sinalização glutamatérgica, principalmente pelos receptores mGluR5, é importante para o desenvolvimento da dependência. Portanto, em uma segunda parte deste trabalho, decidimos investigar os efeitos de um modulador alostérico negativo de mGluR5 (CTEP) em aspectos comportamentais e bioquímicos da dependência de cocaína, e, ainda, investigar o possível papel da espinofilina, uma proteína envolvida na regulação e sinalização de mGluR5, na dependência dessa droga. Utilizando camundongos nocaute, observou-se que a ausência da espinofilina impede o desenvolvimento da sensibilização à cocaína no protocolo utilizado, revelando

um papel importante da mesma para esse processo. Em relação à preferência condicionada por lugar induzida pela cocaína, nem a deleção da espinofilina ou o bloqueio de mGluR5 afetaram esse comportamento. Ainda, foi observado que co-administração de CTEP atenuou a ativação de ERK, Akt e mTOR induzidas pela cocaína, e promoveu um aumento na expressão gênica de DARPP-32 e β -arrestina 2. Diante do exposto, observa-se que tanto o receptor mGluR5 quanto a espinofilina apresentam envolvimento em respostas à cocaína, porém, estudos complementares se fazem necessários para melhor elucidar o potencial efeito terapêutico da droga CTEP na dependência de cocaína.

Palavras-chave: crack, cocaína, córtex pré-frontal, sistema dopaminérgico, sistema glutamatérgico

ABSTRACT

Drug addiction is a social and health burden worldwide, and despite the extensive research in this field, there remains a lack of effective treatment for this condition. In the past few decades, crack cocaine (crack) addiction has increasingly become a major issue especially in developing countries. However, there is a lack of studies specifically for the addiction to this drug. In this study, we aimed to evaluate crack effects in memory and cognition and its molecular basis, using a mouse model of crack exposure. It was observed that 11 days of crack inhalation does not affect object recognition memory or reference spatial memory. However, mice exposed to this protocol exhibit working memory deficits and reduced social interaction. These alterations, along with a previously described reduction in dopamine levels in the prefrontal cortex (PFC) and increase in D2R receptor expression, in addition to the psychiatric symptoms exhibited by crack users, led us to investigate whether crack exposure in our model induce other molecular alterations observed in schizophrenia. We found that upon crack inhalation mice have shown increased D2S/D2L dopamine receptors expression ratio and decreased expression of NR1, NR2A and NR2B NMDA receptor subunits in the PFC, along with decreased social interaction and working memory deficits, and these alterations are also found in subjects with schizophrenia. Therefore, we showed that crack cocaine inhalation promotes behavioral alterations in mice resembling negative and cognitive symptoms of schizophrenia, likely underlined by similar molecular mechanisms. Studies have shown that glutamatergic signaling, especially through mGluR5, is involved in the development of cocaine addiction. Therefore, in a second part of this work, we investigated the effect of a negative allosteric modulator of mGluR5 in cocaine associated behaviors, and the possible role of spinophilin, a scaffold protein involved in mGluR5 signalling and regulation, in cocaine addiction. We observed that the knockout of spinophilin blocks the development of cocaine sensitization in the protocol used, revealing an important role of spinophilin in this process. In terms of rewarding aspects, neither spinophilin deletion nor mGluR5 blockade affected conditioned place preference to cocaine. However, it was observed that CTEP attenuated the activation of ERK, Akt and mTOR induced by cocaine. Additionally, gene expression of DARPP-32

and β -arrestin 2 was increased in response to the combination of cocaine and CTEP in wild type mice, suggesting a possible role of these proteins in the observed effects. Thus, both mGluR5 and spinophilin seem to be involved in cocaine responses, however, further studies are necessary to better characterize the therapeutic potential of CTEP in cocaine addiction.

Key-words: crack cocaine, cocaine, prefrontal cortex, dopaminergic system, glutamatergic system

LISTA DE ABREVIATURAS

AEME – Anidroecgonina metil éster

AMPA – amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazolepropionato

AMPc – Adenosina monofosfato cíclico

ATP – Adenosina trifosfato

BEG – Benzoilecgonina

EME – Ecgonina metil éster

CamKII – Proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina

Cdk5 – cinase dependente de ciclina 5

COMT – Catecol orto-metiltransferase

CPF – Córtex pré-frontal

CREB – Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico D1R – Receptor de dopamina 1

CTEP – 2-chloro-4-((2,5-dimethyl-1-(4-(trifluoromethoxy) phenyl)-1H-imidazol-4-yl)ethynyl)pyridine

D1R – Receptor de dopamina 1

D2R – Receptor de dopamina 2

D3R – Receptor de dopamina 3

DA – Dopamina

DAG – Diacilglicerol

DARPP-32 – Fosfoproteína regulada por dopamina e AMPc de 32kDa

DAT – Transportador de dopamina

DOPAC – Ácido dihidroxifenilacético

ERK – Cinase regulada por sinal extracelular

GABA – Ácido gama-aminobutírico

HVA – Ácido homovanílico

IP3 – Inositol trifosfato

KO – nocaute

MAO – Monoamina oxidase

mGluR1 – Receptor metabotrópico glutamatérgico 1

mGluR5 – Receptor metabotrópico glutamatérgico 5

NAc – Núcleo Accumbens

NMDA – N-metil-D-aspartato

VTA – Área tegmental ventral

Δ FosB – Delta FosB

PKA – Proteína cinase A

PKC – Proteína cinase C

PLC – Fosfolipase C

PP1 – Proteína fosfatase 1

qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SUMÁRIO

CONSIDERAÇÕES INICIAIS	16
Capítulo 1. Efeitos bioquímicos, moleculares e comportamentais da inalação de crack por camundongos: alterações semelhantes à esquizofrenia.....	20
1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Crack e cocaína	20
1.2 Sistema dopaminérgico.....	25
1.3 Circuito de recompensa e dependência de cocaína.....	32
1.4 O uso do crack e comorbidades neuropsiquiátricas.....	35
2 OBJETIVOS	39
2.1 Objetivo geral	39
2.2 Objetivos específicos	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1 Animais.....	40
3.2 Desenho experimental.....	40
3.3 Droga e protocolo de inalação	41
3.4 Avaliação de memória espacial de referência e de trabalho.....	42
3.5 Teste de reconhecimento de objetos	44
3.6 Teste de interação e reconhecimento social	45
3.7 Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real quantitativa	46
3.7.1 Extração de RNA.....	46
3.7.2 Síntese de cDNA.....	47
3.7.3 PCR quantitativa em tempo real.....	47
3.8 Avaliação da expressão protéica por imunoblot.....	48
3.9 Análise estatística	50
4 RESULTADOS	51
4.1 Efeito da exposição ao crack na memória espacial de referência e de trabalho.....	51
4.2 Avaliação da memória de reconhecimento de objetos.....	52
4.3 Efeito da exposição ao crack na interação e reconhecimento social.....	53
4.4 Avaliação da expressão gênica no estriado	54
4.5 Avaliação da expressão gênica no cortex pré-frontal	55
4.6 Expressão protéica de receptores D2 e do tipo NMDA no cortex pré-frontal	57

5 DISCUSSÃO	60
6 CONCLUSÕES	66
Capítulo 2. Investigação do envolvimento do receptor mGluR5 e da proteína espinofilina na dependência de cocaína	67
7 INTRODUÇÃO	67
7.1 Sistema Glutamatérgico	67
7.2 O sistema glutamatérgico na dependência de cocaína: destaque para o mGluR5	71
7.3 Espinofilina	77
7.4 Interação da espinofilina com mGluR5 e D2R e possível papel na dependência de cocaína	80
8 OBJETIVOS	83
8.1 Objetivo geral	83
8.2 Objetivos específicos	83
9 MATERIAIS E MÉTODOS	84
9.1 Animais e grupos experimentais	84
9.2 Curva dose-resposta	84
9.3 Protocolo de sensitização comportamental	85
9.4 Preferência condicionada por lugar (CPP)	86
9.5 SDS-PAGE e western blot	87
9.6 PCR quantitativa em tempo real	88
9.6.1 Extração de RNA	88
9.6.2 Síntese de cDNA.....	89
9.6.3 PCR quantitativa em tempo real	89
9.7 Cultura primária de neurônios	91
9.8 Imunofluorescência em cultura primária de neurônios	91
9.9 Imunohistoquímica em tecido cerebral.....	92
9.10 Análise estatística	93
10 RESULTADOS	94
10.1 Curvas dose-resposta para cocaína e CTEP	94
10.2 Efeito do CTEP e da espinofilina na sensitização comportamental à cocaína	95
10.3 Preferência condicionada por lugar (CPP) à cocaína	97
10.4 A espinofilina colocaliza com D2R e mGluR5 em cultura primária de neurônios	98
10.5 Alterações na imunoreatividade para c-fos	100

10.6 Efeito das diferentes condições experimentais na sinalização celular e expressão protéica de receptores e da tirosina hidroxilase no estriado.....	102
10.7 Efeito das diferentes condições experimentais na expressão gênica no estriado.....	109
11 DISCUSSÃO	113
12 CONCLUSÕES	122
13 CONCLUSÕES GERAIS	123
14 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A história das civilizações apresenta indícios de que o ser humano sempre procurou ferramentas para manipular o estado emocional e alterar a consciência. Portanto, o uso de substâncias psicoativas pode ser considerado uma prática milenar e universal (PACHECO, 2004). No entanto, há algumas décadas, o abuso de drogas se tornou um grave problema social e de saúde pública, devido a uma série de consequências negativas para a sociedade.

De acordo com relatório anual mundial sobre o uso de drogas do UNODC (*United Nations Office on Drugs and Crime, 2016*), bilhões de dólares são gastos anualmente na prevenção e tratamento de dependentes químicos em todo o mundo. Ainda assim, o impacto na redução da prevalência e incidência do abuso de drogas ainda é pequeno. Estima-se que 250 milhões de pessoas no mundo tenha utilizado alguma droga de abuso no ano de 2015 (UNODC, 2017). Atualmente, a maconha é a droga mais utilizada mundialmente (UNODC, 2017). Apesar de menor prevalência do que a maconha, a classe com maior impacto negativo sobre a saúde são os opióides, incluindo tanto a heroína quanto os opióides lícitos sujeitos à prescrição (UNODC, 2017). Em seguida, vem a cocaína, que apresentou uso estimado por 17 milhões de pessoas no ano de 2016 (UNODC, 2017). Houve um aumento no cultivo de coca nos últimos dois anos e a quantidade de cocaína (em variadas formas, incluindo crack) apreendida atingiu nível recorde em 2015, sendo 61% na América do Sul (UNODC, 2017). Enquanto o uso de cocaína nos EUA, maior mercado do mundo, vem diminuindo nos últimos anos, aumentos significativos têm sido observados na América Latina (UNODC, 2016). O Brasil representa 20% do consumo mundial de cocaína/crack e é considerado o maior mercado de crack do mundo (INPAD, 2012). Apesar de não haver estudos mais recentes publicados, a comparação entre os dois levantamentos realizados pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) em parceria com a Secretaria Nacional Antidrogas em 2001 e 2005 mostrou um aumento de quase 100% na prevalência do uso de crack no Brasil (CEBRID, 2001; CEBRID et al., 2005).

De acordo com o DSM-5, o transtorno por uso de substâncias consiste na presença de um agrupamento de sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos indicando o uso contínuo pelo indivíduo apesar de problemas significativos relacionados à substância. Nesta edição do DSM, as categorias de abuso de substância e dependência de substância foram eliminadas e substituídas pela categoria transtornos por uso de substâncias – em que a substância específica usada define o transtorno específico (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 2013).

O diagnóstico de um transtorno por uso de substância baseia-se em um padrão patológico de comportamentos relacionados ao seu uso, seguindo critérios relacionados com baixo controle, deterioração social, uso arriscado, tolerância e abstinência. Portanto, o diagnóstico de transtorno por uso de estimulantes consiste num padrão de uso de substância estimulante (como cocaína e anfetamina) que leva a comprometimento ou sofrimento clinicamente significativo, manifestado por pelo menos dois de alguns critérios, ocorrendo durante um período de 12 meses. Dentre os critérios, destacam-se os seguintes: o estimulante ser frequentemente consumido em maiores quantidades ou por um período mais longo do que o pretendido; desejo persistente ou esforços malsucedidos no sentido de reduzir ou controlar o uso; fissura ou um forte desejo ou necessidade de usar o estimulante; uso recorrente de estimulantes resultando em fracasso em cumprir obrigações importantes, ou em situações nas quais o uso representa perigo para a integridade física; dentre outros. Apesar de não ser necessário tolerância ou abstinência para o diagnóstico de transtorno por uso de substância, a presença dessas características no histórico do indivíduo geralmente está associada à um curso clínico mais grave (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 2013).

O transtorno por uso de substâncias envolve alterações de longo prazo em circuitos cerebrais, principalmente no circuito de recompensa, que persistem mesmo após longos períodos de abstinência (NESTLER, 2005). Essas alterações persistentes estão relacionadas às recaídas constantes e à fissura apresentada por indivíduos em abstinência quando expostos a estímulos relacionados à(s) droga(s) utilizada(s)

(NESTLER, 2005). Desta forma, até o presente momento, não existe cura para a dependência química. Portanto, o tratamento deve seguir uma estratégia de longo prazo, com abordagens farmacológicas e não farmacológicas. A terapia farmacológica depende do tipo de droga de abuso utilizada bem como de características individuais do paciente, e, até o momento não existem tratamentos farmacológicos padronizados para a dependência de drogas estimulantes como crack e cocaína (NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE, 2018). Dentre as estratégias não-farmacológicas, pode-se citar as terapias cognitivo-comportamentais, na qual ex-usuários em tratamento aprendem a evitar ambientes e situações que desencadeiam a vontade de usar as drogas bem como a reconhecer os pensamentos e sentimentos gerados pela falta da droga (KILUK et al., 2010). Infelizmente, a ocorrência de recaídas ainda é frequente em muitos pacientes, e, portanto, as pesquisas acerca dos mecanismos moleculares, bioquímicos e fisiológicos bem como a busca de tratamentos mais efetivos e específicos para diferentes tipos de drogas de abuso continuam sendo essenciais. Por se tratar de um distúrbio complexo, que envolve a integração de diferentes regiões cerebrais e sistemas neurotransmissores, diversas abordagens e possíveis alvos terapêuticos vêm sendo objeto de estudo para o tratamento da dependência química. Destacam-se, contudo, os estudos com enfoque nos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico, importantes componentes do circuito de recompensa que estão envolvidos com diversos processos relacionados ao desenvolvimento da adição (NESTLER, 2001; KALIVAS & MCFARLAND, 2003; ROBINSON & BERRIDGE, 2000; KALIVAS, 2009).

No presente estudo, investigamos aspectos comportamentais, moleculares e bioquímicos da dependência de crack e cocaína, e este trabalho foi dividido em dois capítulos.

No capítulo 1 serão abordadas alterações moleculares e comportamentais semelhantes à esquizofrenia observadas em modelo animal de abuso de crack. O abuso de crack está frequentemente associado à comorbidades psiquiátricas, muitas delas semelhantes a componentes observados na esquizofrenia como delírios e paranoia, comportamento antissocial e déficits em funções executivas, além da própria

esquizofrenia (SANVICENTE-VIEIRA et al., 2016; LEWANDOWSKI et al., 2016; OLIVEIRA & NAPO 2008; KESSLER et al., 2002). Algumas alterações neuroquímicas e moleculares induzidas pela inalação de crack que podem se relacionar com algumas dessas comorbidades neuropsiquiátricas foram descritas pelo nosso grupo, utilizando um modelo murino (AREAL et al., 2015). Entre elas, destaca-se a redução dos níveis de dopamina no córtex pré-frontal e o aumento da expressão gênica do receptor D2R, visto que a redução do tônus dopaminérgico é uma característica importante na fisiopatologia da esquizofrenia e o receptor D2R representa um importante alvo terapêutico no tratamento da esquizofrenia (AREAL et al., 2015; HOWES AND KAPUR, 2009; KAALUND et al., 2014). Considerando as alterações moleculares observadas no trabalho anterior e as características comportamentais descritas em usuários de crack, decidiu-se investigar se outras alterações moleculares e comportamentais relacionadas com os sintomas cognitivos e negativos da esquizofrenia também estariam presentes no nosso modelo animal.

No capítulo 2 avaliamos aspectos moleculares e comportamentais da dependência de cocaína relacionados ao receptor mGluR5, bem como o envolvimento da proteína espinofilina, uma proteína envolvida na regulação e sinalização desse receptor, nesse transtorno. Diversos estudos mostram que o sistema glutamatérgico possui um papel importante em diversos aspectos da dependência de cocaína, e o envolvimento do receptor mGluR5, especialmente, vêm ganhando destaque recentemente (KALIVAS & DUFFY, 1998; KENNY & MARKOU, 2004; D'SOUZA et al., 2015; CHIAMULERA et al., 2001; KUMARESAN et al., 2009). Portanto, decidimos investigar os efeitos de um modulador alostérico negativo do receptor mGluR5 em diferentes paradigmas para o estudo da dependência de cocaína, e, ainda, investigar o possível papel da proteína espinofilina, na dependência dessa droga.

Capítulo 1. Efeitos bioquímicos, moleculares e comportamentais da inalação de crack por camundongos: ocorrência de alterações semelhantes à esquizofrenia

1 INTRODUÇÃO

1.1 Crack e cocaína

Nos anos 70, o consumo generalizado de cocaína se tornou muito popular 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) o cloridrato de cocaína não pode ser fumado (CHASIN et al., 2008).

A partir do início dos anos 90, a forma fumada da cocaína, o 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.

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” (REDDA et al., 1989). 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 (REDDA et al., 1989; MARANDA et al., 2004). Essa nova forma de cocaína gerou uma mudança nos padrões de consumo e no perfil dos usuários.

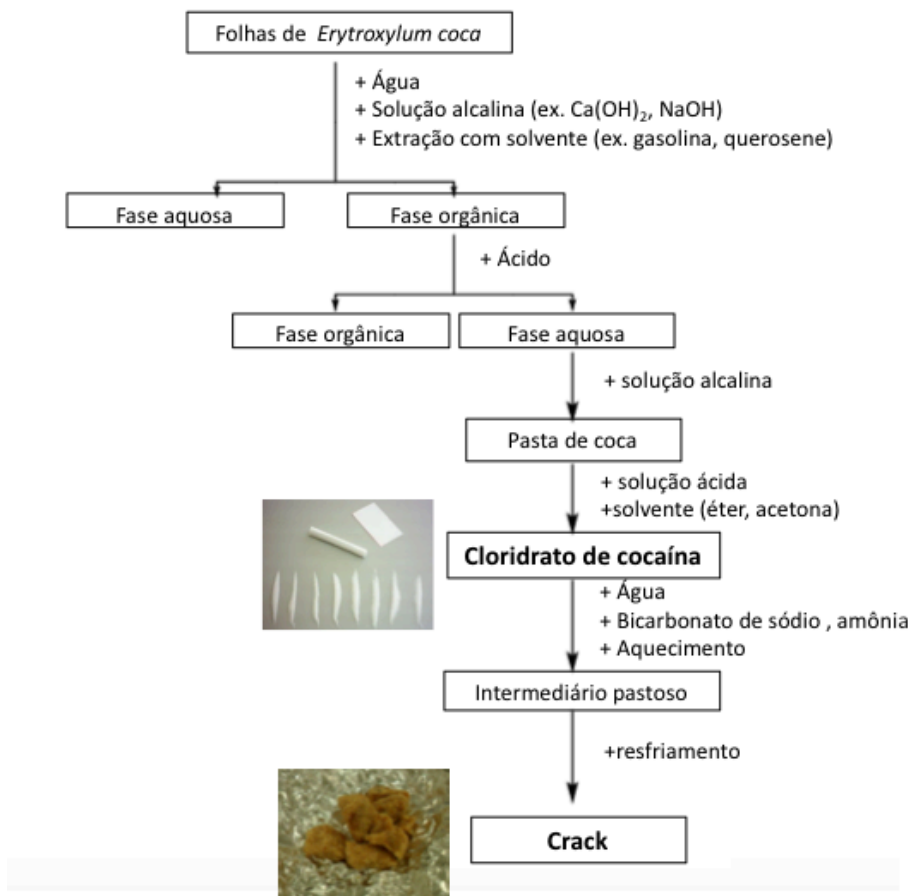


Figura 1. Fluxograma de produção de cloridrato de cocaína e crack a partir da planta *Erythroxylum coca*. Fonte: Adaptado de GARCIA et al., 2009; REDDA et al., 1989.

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. Esses usuários consomem em média 16 pedras de crack por dia. Já o levantamento da sobrevivência desses usuários nas capitais é de aproximadamente 8 anos, contradizendo as notícias comumente veiculadas de que os usuários de crack/similares teriam expectativa de vida inferior a 3 anos a partir do início do consumo (BASTOS & BERTONI, 2013; RIBEIRO et al., 2004; RIBEIRO et al., 2006).

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). Observa-se um aumento da criminalidade, violência doméstica, prostituição, abandono dos filhos bem como altos índices de doenças sexualmente transmissíveis atrelados ao uso do crack (RIBEIRO et al., 2004). Além das questões sociais, o abuso de crack leva a consequências físicas e psicológicas para o usuário. 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 (BOLLA, 1999; CUNHA et al., 2004; MEYER et al., 2014). Esses déficits cognitivos podem estar relacionados a problemas em regiões cerebrais frontais e temporais e essas alterações neuroquímicas em indivíduos com histórico de dependência ao crack, mostraram-se persistentes mesmo após a descontinuação do uso da droga por longo período (CUNHA et al., 2004; CHANG et al., 1999). Além disso, distúrbios psiquiátricos, alucinações e paranoia decorrentes do consumo dessa droga são observados (OLIVEIRA & NAPPO, 2008). Desta forma, o consumo de crack tem se apresentado como um grave problema social e de saúde pública.

Além da diferença na via de administração, e consequentes diferenças farmacocinéticas apresentada pelo crack em relação à cocaína, existe a formação de

um subproduto exclusivo durante o fumo de crack (figura 2). O aquecimento da cocaína gera um produto denominado anidroecgonina metil éster (AEME), também conhecido como metilecgonidina (MEG). 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). Ao utilizar essa via de administração, tanto a cocaína quanto AEME 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. Além disso, 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 (SCHEIDWEILER et al., 2003).

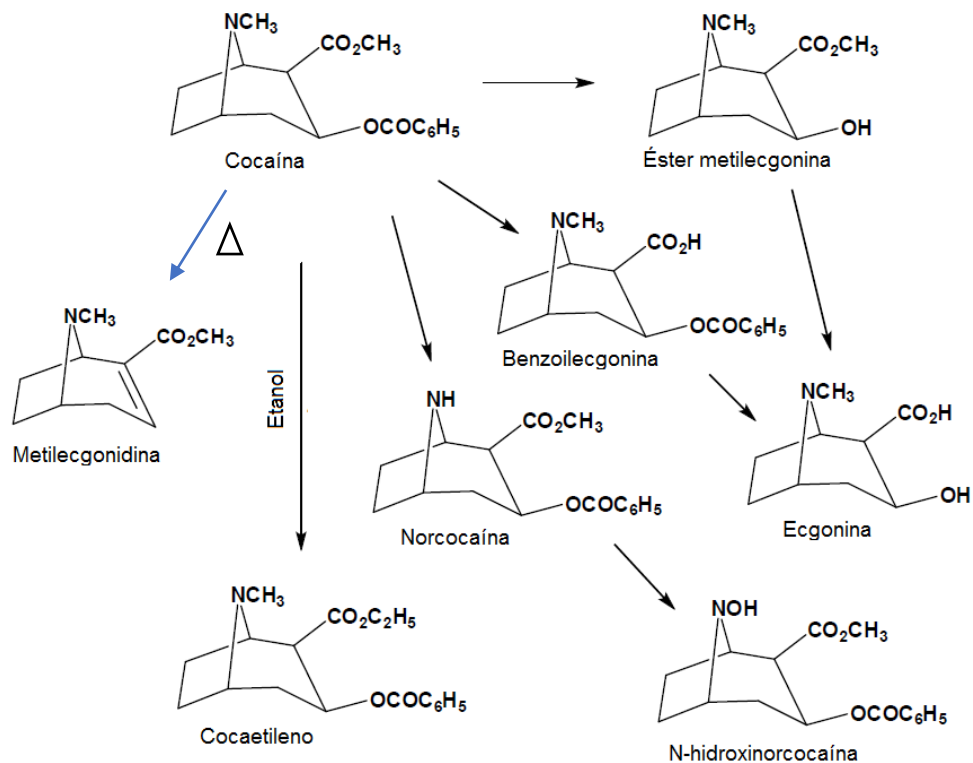


Figura 2. Molécula de cocaína e seus produtos de metabolismo e pirólise. Setas pretas: produtos de biotransformação; Seta azul: produto da pirólise da cocaína. Fonte: Adaptado de CHASIN et al., 2008 e GARCIA, 2009.

Um estudo de viabilidade celular em cultura primária de células hipocâmpais de ratos revelou que o AEME 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). Um estudo subsequente do mesmo grupo sugeriu que a neurotoxicidade do AEME é decorrente de sua ação como agonista parcial de receptores muscarínicos M1 e M3, que está associada à fragmentação de DNA e morte por apoptose (GARCIA et al., 2015).

Pouco se sabe sobre os efeitos específicos do AEME sobre o comportamento. Um estudo revelou que o AEME por si não altera a atividade locomotora de camundongos nem promove sensitização comportamental, porém, potencializa a sensitização comportamental à cocaína quando co-administrados (GARCIA et al., 2017). Além disso, Gomes et al. (2017) mostraram que a administração aguda de AEME prejudica a memória espacial operacional em ratos treinados.

A compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da dependência química é essencial na busca de estratégias terapêuticas eficazes. No entanto, a literatura acerca dos aspectos neuroquímicos e neurofisiológicos do abuso de crack, especificamente, ainda é escassa. Devido ao fato do princípio ativo do crack ser a cocaína, essas duas drogas são muitas vezes consideradas como a mesma, e, em consequência, os modelos animais são pouco específicos para o crack, utilizando na maioria das vezes o cloridrato de cocaína (JENKINS et al., 2002; HUESTIS et al., 2007).

Um estudo prévio realizado pelo nosso grupo 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 (AREAL et al., 2015). Neste trabalho, camundongos foram submetidos a 11 dias de inalação de fumaça de crack e foram observadas algumas alterações ainda não descritas em modelos de

adição à cocaína injetada. Entre elas, pode-se citar a presença de um comportamento peculiar, caracterizado por saltos repetitivos durante a avaliação da atividade locomotora em campo aberto, logo após a inalação de crack, e foi observada sensitização para esse comportamento ao longo de repetidas inalações (AREAL et al., 2015). Além da característica comportamental, observou-se ainda que 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 endocanabinoide no córtex pre-frontal (CPF) de camundongos, sugerindo que esses sistemas estão envolvidos nos mecanismos de adição ao crack (AREAL et al., 2015). Essas alterações em conjunto ainda não foram descritas em modelos utilizando cloridrato de cocaína, e é possível que um subproduto do aquecimento da cocaína, anidroecgonina metil éster (AEME), esteja envolvido nessas alterações, visto que o mesmo apresentou uma concentração mais elevada do que a própria cocaína no sangue dos animais submetidos à inalação (AREAL et al., 2015).

Apesar da presença comum de adulterantes no preparo do crack, e da presença do sub-produto AEME, a cocaína é a substância responsável pelos efeitos estimulantes e reforçadores da droga. Uma vez absorvida, a cocaína atinge rapidamente o SNC e inibe a recaptação de monoaminas, principalmente da dopamina (RITZ et al., 1990). O bloqueio do transportador de dopamina (DAT) pela cocaína leva ao acúmulo do neurotransmissor na fenda sináptica, promovendo uma hiperestimulação do sistema dopaminérgico, ativando principalmente o circuito de recompensa (RITZ et al., 1990).

1.2 Sistema dopaminérgico

Por ser um importante componente do circuito de recompensa, a maioria das drogas de abuso afeta direta ou indiretamente a neurotransmissão dopaminérgica (DI CHIARA & IMPERATO, 1998).

As inervações dopaminérgicas são as mais proeminentes no cérebro de mamíferos e quatro principais vias dopaminérgicas já foram descritas. A via nigroestriatal, via mesolímbica e mesocortical (que são frequentemente consideradas em conjunto e então chamada via mesocorticolímbica), e via tuberoinfundibular (ANDEN et al., 1964; DAHLSTROEM & FUXE, 1964; BEAULIEU & GAINETDINOV, 2011). Esses neurônios dopaminérgicos estão envolvidos em diversas funções vitais do sistema nervoso central, como movimento, recompensa, afeto, atenção, aprendizagem e memória (BEAULIEU & GAINETDINOV, 2011).

A síntese de dopamina ocorre nos terminais dos neurônios dopaminérgicos a partir do aminoácido tirosina em um processo envolvendo dois passos enzimáticos. Primeiramente, a tirosina sofre ação da enzima tirosina hidroxilase (TH) sendo convertida em dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Essa reação representa a etapa limitante da síntese de dopamina e a enzima requer ferro e tetrahidrobiopterina como co-fatores. A L-DOPA recém-produzida é rapidamente convertida em dopamina (DA) por ação da enzima aminoácido aromático descarboxilase, também conhecida como DOPA descarboxilase, utilizando como co-fator o fosfato de piridoxal (BRUNTON et al., 2012; STANDAERT & GALANTER, 2013).

Após a síntese, a dopamina é armazenada em vesículas por meio do transportador vesicular de monoaminas (VMAT2). 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. A dopamina liberada pode então se ligar a receptores dopaminérgicos pré e pós-sinápticos (BRUNTON et al., 2012; STANDAERT & GALANTER, 2013) (figura 3).

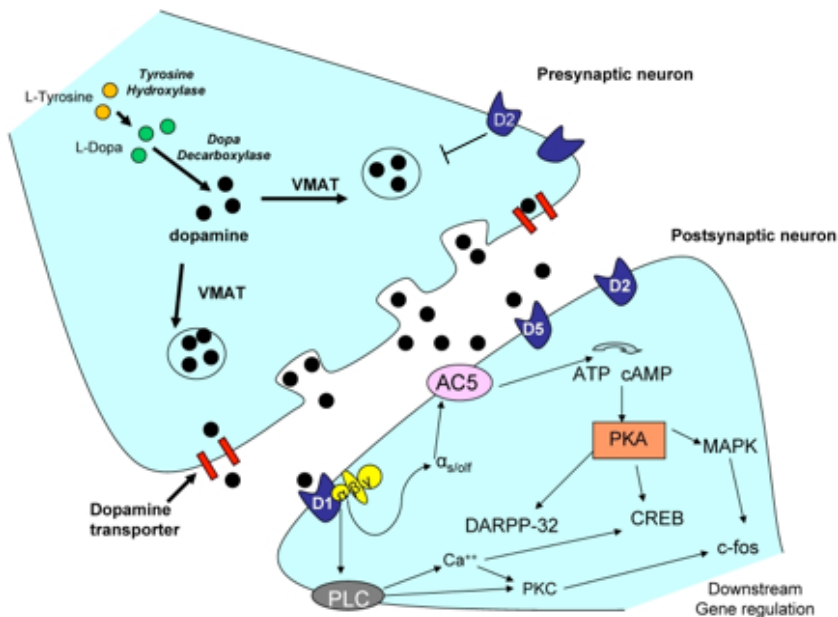


Figura 3. Neurotransmissão dopaminérgica. A dopamina é produzida no neurônio pré-sináptico a partir da tirosina por meio das enzimas tirosina hidroxilase e dopa descarboxilase. Após sintetizada, a dopamina é empacotada em vesículas por meio do transportador vesicular de monoaminas (VMAT) e liberada na fenda sináptica na presença do impulso nervoso. No neurônio pós-sináptico, a dopamina pode se ligar aos receptores dopaminérgicos ativando diferentes vias de sinalização e propagando o sinal. A dopamina pode ser recaptada para o neurônio pré-sináptico por meio do transportador de dopamina, e pode se ligar a receptores D2 pré-sinápticos que atuam como auto-receptores, inibindo a liberação de dopamina. Fonte: KNAB & LIGHTFOOT, 2010

Os receptores dopaminérgicos são receptores acoplados à proteína G e se dividem em 2 classes, com base em suas propriedades bioquímicas, estruturais e farmacológicas: receptores do tipo D1 (*D1-like*) e receptores do tipo D2 (*D2-like*). A classe D1 contempla os subtipos D1R e D5R, que são acoplados a proteína $G_{s/olf}$, portanto, ativam a enzima adenilato ciclase levando a um aumento da produção de AMPc, e são encontrados pós-sinápticamente em neurônios dopamino-receptivos. Já a classe D2 contempla os subtipos D2R, D3R e D4R, 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). Estruturalmente, os receptores dopaminérgicos

possuem sete domínios transmembrana, três alças extracelulares e três alças intracelulares, sendo que a família de receptores D1R apresenta uma longa cauda C-terminal e uma alça citoplasmática curta entre as hélices transmembranares 5 e 6, enquanto a família de receptores D2R apresenta uma cauda C-terminal curta e uma longa alça citoplasmática entre as hélices 5 e 6 (BEAULIEU & GAINETDINOV, 2011). Ao contrário da classe D1R, 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, sendo que a isoforma longa possui 29 aminoácidos adicionais 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).

Receptores dopaminérgicos são altamente expressos no sistema nervoso central (SNC). No entanto, os diferentes subtipos estão distribuídos de forma distinta. D1R e D2R são altamente expressos no núcleo accumbens (NAcb), caudado-putâmen, substância negra, amígdala, tubérculo olfatório e córtex pré-frontal, e em níveis um pouco menores, mas ainda significantes, no hipocampo, hipotálamo, e no caso do D2R, área tegmental ventral (VTA) (MISSALE et al., 1998; VALONE et al., 2000; BEAULIEU & GAINETDINOV, 2011). Receptores D3 exibem padrão de distribuição mais limitado, sendo predominantemente encontrados maior distribuição no NAcb e tubérculo olfatório e de forma mais discreta na substância negra e área tegmental ventral (MISSALE et al., 1998; SOKOLOFF et al., 2006). D4R são os receptores dopaminérgicos que apresentam menor nível de expressão no SNC, sendo encontrados no córtex pré-frontal, hipotálamo, tálamo, hipocampo, substância negra e amígdala (RONDOU et al., 2010; BEAULIEU & GAINETDINOV, 2011). Já os receptores D5 também são expressos em baixos níveis e localizam-se principalmente no hipocampo, hipotálamo regiões do córtex (BEAULIEU & GAINETDINOV, 2011; RANKIN et al., 2010).

As funções dos receptores dopaminérgicos são tipicamente associadas com a regulação de AMPc e proteína cinase A (PKA), via sinalização mediada por proteína G. Dessa

forma, os receptores da classe D1-like, que são acoplados à $G_{s/olf}$ estimulam a produção de AMPc e a atividade de PKA. Ao contrário, os receptores da classe D2-like por serem acoplados à $G_{i/o}$ regulam negativamente a produção de AMPc e reduzem a atividade de PKA (MISSALE et al, 1998; BEAULIEU & GAINETDINOV, 2011). Conseqüentemente, diversos substratos da PKA, como CREB, os receptores glutamatérgicos ionotrópicos AMPA e NMDA, bem como outros canais iônicos, também são afetados pela estimulação de receptores dopaminérgicos (GREENGARD, 2001). Dentre as moléculas alvo da PKA, destaca-se a fosfoproteína regulada por dopamina e AMPc de 32kDa (DARPP-32) na sinalização dopaminérgica. A DARPP-32 é altamente expressa nos neurônios espinhosos médios (MSNs), onde atua com uma importante função integradora da sinalização de diversos neurotransmissores, como por exemplo glutamato e dopamina (GREENGARD et al., 1999; SVENNINGSSON et al., 2004). Receptores D1R promovem a fosforilação da DARPP-32 na treonina-34, via ativação de PKA, enquanto que a estimulação de receptores D2 reduz essa fosforilação (BATEUP et al., 2008) (Figura 4).

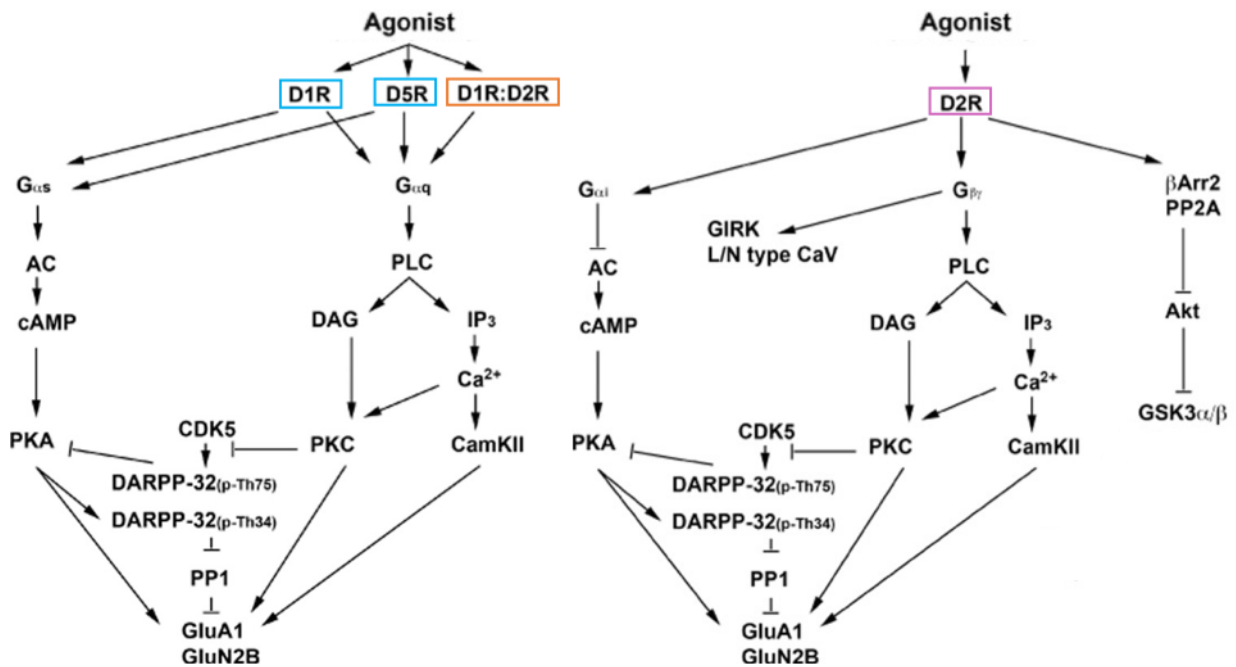


Figura 4. Vias de sinalização dos receptores dopaminérgicos. Os receptores dopaminérgicos da classe D1-like (D1R e D5R) são primariamente acoplados à proteína $G_{\alpha s/olf}$ e estimulam a produção de AMPc. Em contraste, receptores da classe D2-like são acoplados à proteína $G_{\alpha i/o}$ e inibem a produção de AMPc. A modulação da síntese de AMPc resulta na regulação de PKA, que possui diversos substratos intracelulares, como a fosfoproteína regulada por dopamina e AMPc de 32kDa (DARPP-32). Além disso, os receptores D2-like ativam PLC por meio das subunidades $\beta\gamma$ e apresentam ainda uma via independente de AMPc mediada por beta-arrestina 2 que resulta na regulação de Akt e GSK3. Ainda, existem evidências de que os heterodímeros formados por D1R e D2R podem se acoplar a $G_{\alpha q}$ resultando em produção de inositol trifosfato e ativação de PKC. Adaptado de BEAULIEU et al., 2015.

Os receptores dopaminérgicos podem também regular a atividade de MAP cinases (MAPK), principalmente no estriado. ERK 1/2 são ativadas via D1R, enquanto receptores da classe D2, principalmente o subtipo D3, inibem a sinalização mediada por ERK (VALJENT et al., 2000; ZHANG et al., 2004). É sabido que as MAPKs são intermediárias de sinalização envolvidos na regulação de comportamentos associados à dopamina, incluindo efeitos promovidos pela cocaína (BERHOW et al., 1996; VALJENT et al., 2000). Ainda, existem evidências de que os receptores dopaminérgicos podem também se acoplar à G_q , ativando PLC com consequente produção de diacil glicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). No entanto, os mecanismos envolvidos nesse

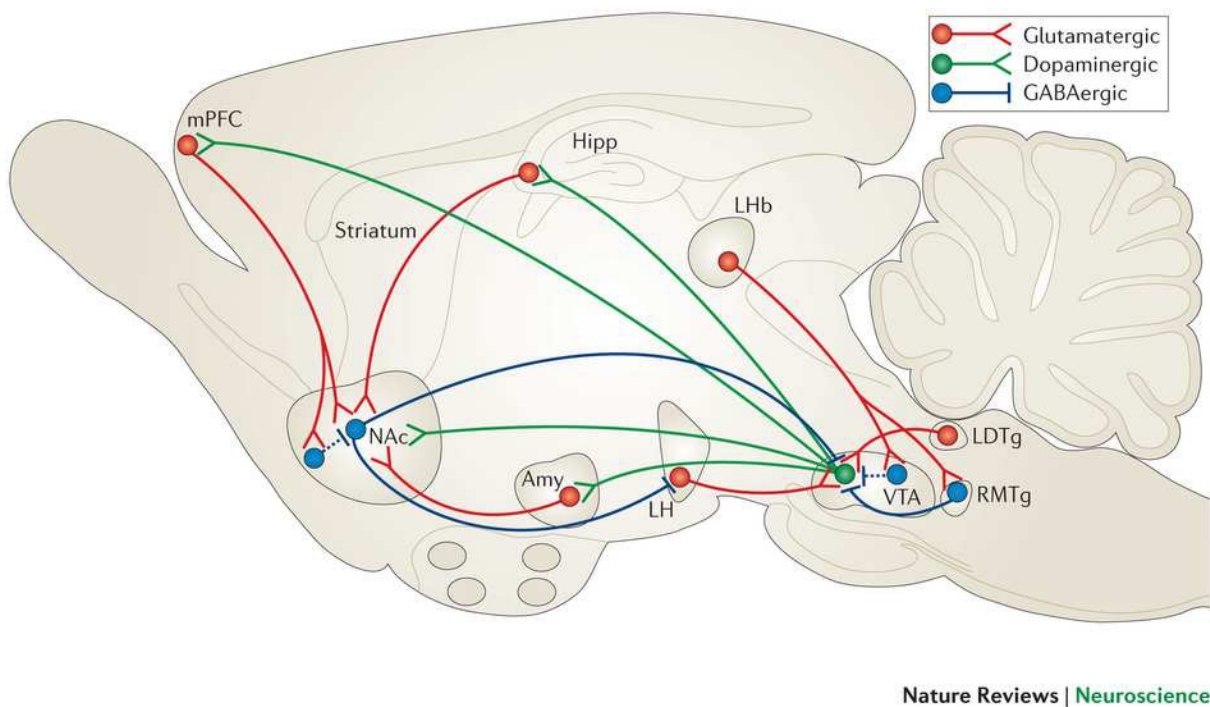
efeito ainda são controversos (FRIEDMAN et al., 1997; LEE et al., 2004). Existem evidências de que D1R e D5R isoladamente, podem acoplar à Gq alternativamente em algumas circunstâncias, e ainda, de que dímeros de D1R e D2R também podem se acoplar à Gq (Hasbi et al., 2009; RASHID et al., 2007). Além disso, D2R também pode ativar PLC por meio das subunidades $\beta\gamma$ (HERNANDEZ-LOPEZ et al., 2000; BEAULIEU et al., 2015). Adicionalmente, receptores do tipo D2-like regulam a atividade de Akt e GSK3 por meio da formação de um complexo dependente de beta-arrestina 2. Esse mecanismo de sinalização é independente de AMPc e ocorre de forma mais tardia (BEAULIEU et al., 2005; BEAULIEU et al., 2007) (Figura 4).

O sinal produzido pela ativação dos receptores pós-sinápticos pela dopamina pode ser interrompido de diferentes formas. Aproximadamente 80% da DA liberada pode ser recaptada por meio dos transportadores de dopamina (DAT) localizados na membrana pré-sináptica (HALBACH; DERMIETZEL, 2006). Uma vez recaptada pelo neurônio pré-sináptico, 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 (Figura 3). 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).

Como mencionado, a dopamina tem papel central na sensação de prazer produzida pelo consumo de drogas de abuso, especialmente da cocaína, por meio de sua ação no circuito de recompensa cerebral (NESTLER, 2001).

1.3 Circuito de recompensa e dependência de cocaína

O circuito de recompensa tem origem na área tegmental ventral (VTA), uma região cerebral formada principalmente por neurônios dopaminérgicos (60-65%) e GABAérgicos (30-35%) (SWANSON, 1982; NAIR-ROBERTS et al., 2008). Os neurônios dopaminérgicos da VTA se projetam para o núcleo accumbens (NAc) e córtex pré-frontal (CPF), além de emitir projeções para a amígdala e o hipocampo (SWANSON, 1982; NESTLER, 2005) (figura 5). A liberação de dopamina no NAc (ou estriado ventral) promove sensações de prazer, e esta região é considerada o centro de recompensa no cérebro (NESTLER, 2005). Esses efeitos se dão principalmente pela ativação de receptores dopaminérgicos nos neurônios espinhosos médios (MSNs), o principal tipo neuronal presente região (COOPER et al., 2017).



Nature Reviews | Neuroscience

Figura 5. O circuito de recompensa em roedores. Em verde estão representadas projeções dopaminérgicas, em vermelho glutamatérgicas e em azul GABAérgicas. Fonte: RUSSO & NESTLER, 2013.

Esse circuito está envolvido na modulação das respostas a estímulos em geral que gerem uma sensação de prazer, incluindo os reforçadores naturais como água, comida, sexo e interação social (NESTLER, 2001). A cocaína, bem como outras drogas de abuso, afeta esse circuito com uma intensidade e persistência muito maior do que os reforçadores naturais (NESTLER, 2001). Dessa forma, a sensação de prazer intensa gerada pelo uso da droga, associada ao aprendizado associativo promovido pelos fatores ambientais envolvidos pode levar ao uso compulsivo da droga (ROBINSON & BERRIDGE, 2000; KALIVAS & MCFARLAND, 2003).

Além das projeções dopaminérgicas da VTA, o NAc também recebe projeções glutamatérgicas, especialmente do córtex pré-frontal, hipocampo ventral e amígdala basolateral (SESACK & GRACE, 2010). As projeções glutamatérgicas do CPF para o NAc estão associadas com o controle executivo e acredita-se que medeiam comportamentos direcionados à um objetivo, como o comportamento de busca e o planejamento de ações para obter uma droga de abuso (KALIVAS et al., 2005). O hipocampo ventral, que também emite projeções glutamatérgicas para o NAc, age como um centro de integração da informação espacial ou contextual emitida pelo hipocampo dorsal, com a informação emocional proveniente da amígdala e do locus coeruleus (FRENCH E TOTTERDELL, 2003). Desta forma, as conexões entre hipocampo e NAc fornecem informações emocionais associadas à um contexto, que irão por sua vez influenciar o comportamento (FRENCH E TOTTERDELL, 2003; PASCOLI et al., 2014). Além disso, já foi demonstrado que a ativação das projeções da BLA para o NAc facilita a busca por recompensa e contribui para o reforço positivo (STUBBER et al., 2011).

Em conjunto, essas regiões formam um circuito complexo altamente integrado, responsável por vários aspectos do transtorno por uso de substâncias. As experiências com drogas de abuso induzem diversas formas de plasticidade neuronal nessa circuitaria (HORNE et al., 2008; UNGLESS et al., 2001; KALIVAS, 2004; VAN HUIJSTEE & MASVELDER, 2014). 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;

KAUER, 2004). Essas alterações são extremamente duradouras, fazendo com que o indivíduo sofra sintomas de abstinência e esteja sob risco de recaídas mesmo após longos períodos sem utilizar a droga.

Desta forma, a dependência química pode ser vista como uma forma patológica de memória (NESTLER 2002; NESTLER, 2013). Essa teoria é corroborada pelas observações de que a maior parte das alterações associadas ao desenvolvimento da dependência, como alterações na transcrição gênica, epigenética, plasticidade sináptica e alterações morfológicas também estão envolvidas nas formas tradicionais de memória comportamental, como memória espacial, medo condicionado e condicionamento operante (KALIVAS & O'BRIEN, 2008; ROBINS et al., 2008; NESTLER, 2002). Adicionalmente, as regiões cerebrais afetadas pelas drogas de abuso também são substratos comuns para a memória comportamental, como hipocampo, amígdala e CPF. Dessa forma, características importantes da dependência como a fissura pela droga e recaídas refletem anormalidades em circuitos tradicionalmente envolvidos com memória, sendo as memórias de longa prazo envolvidas com o uso da droga um gatilho potente para essas ocorrências (KALIVAS & O'BRIEN, 2008; ROBINS et al., 2008; NESTLER, 2002).

As alterações na expressão gênica que ocorrem no circuito de recompensa em resposta a exposições repetidas à cocaína têm papel fundamental nas mudanças plásticas observadas. Entre os fatores de transcrição que vem sendo sugeridos como mediadores dos efeitos de longo prazo, destaca-se o Δ FosB. A exposição 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 para a maioria das proteínas Fos, devido à baixa estabilidade (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). 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; KELZ et al., 1999).

Algumas comorbidades neuropsiquiátricas também estão associadas ao consumo de crack e cocaína, como ansiedade, comportamento paranoide, episódios psicóticos e déficits em funções executivas.

1.4 O uso do crack e comorbidades neuropsiquiátricas

A manifestação de transtornos psiquiátricos concomitantes à dependência de crack é frequente relatada (RATTO & CORDEIRO, 2004; DA SILVA, et al., 2009; OLIVEIRA & NAPPO, 2008). O comportamento agressivo ou violento é comum quando doses altas de cocaína são fumadas, ingeridas ou administradas via intravenosa (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 2013). Além disso, ansiedade temporária intensa que lembra transtorno do pânico ou transtorno de ansiedade generalizada também são observados (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 2013). 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 et al., 1999; CUNHA et al., 2004; MEYER et al., 2014; LEVANDOWSKI et al., 2016; SANVICENTE-VIEIRA et al., 2016). Em conjunto, estudos mostram que as comorbidades neuropsiquiátricas mais comumente diagnosticadas em usuários de crack são os transtornos de humor (incluindo depressão, transtorno bipolar e ansiedade), transtorno do estresse pós-traumático, transtornos de personalidade (principalmente comportamento antissocial), transtorno psicótico induzido por substância e esquizofrenia (VASCONCELOS et al., 2014; RATTO & CORDEIRO, 2004; DA SILVA, et al., 2009).

Assim como em usuários de crack, delírios e paranoia também são relatados por usuários de cloridrato de cocaína, quando em altas doses (OLIVEIRA & NAPPO, 2008;

AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 2013). No entanto, usuários de crack apresentam maior prevalência de comorbidades psiquiátricas, principalmente relacionadas à comportamentos antissocial e de risco, observados em conjunto com uma alta participação em atividades ilegais (KESSLER et al. 2012). Algumas alterações neuroquímicas e moleculares induzidas pela inalação de crack em camundongos que podem se relacionar com algumas dessas comorbidades neuropsiquiátricas foram descritas pelo nosso grupo (AREAL et al., 2015). Entre elas, destaca-se a redução dos níveis de dopamina no córtex pré-frontal e o aumento da expressão gênica do receptor D2R, visto que a redução do tônus dopaminérgico é uma característica importante na fisiopatologia da esquizofrenia assim como o envolvimento de D2R (AREAL et al., 2015; HOWES AND KAPUR, 2009; KAALUND et al., 2014).

A esquizofrenia é caracterizada por sintomas positivos, negativos e cognitivos. As alucinações, paranoia e discurso desorganizado observados em indivíduos com esquizofrenia são conhecidas como os sintomas positivos da doença (STAHL, 2007). São exemplos de sintomas negativos a anedonia e o isolamento social, e de sintomas cognitivos os déficits em funções executivas, como a memória de trabalho (STAHL, 2007).

De acordo com a teoria dopaminérgica da esquizofrenia, esses sintomas são decorrentes de alterações na neurotransmissão dopaminérgica (HOWES & KAPUR, 2009). Enquanto um aumento no tônus dopaminérgico na região estriatal seria responsável pelos sintomas positivos, uma redução do tônus dopaminérgico no córtex pré-frontal estaria associada aos sintomas negativos e cognitivos (SCHWARTZ et al., 2012). De fato, o tratamento da esquizofrenia tradicionalmente tem foco no sistema dopaminérgico, sendo muito comum na clínica o uso de antagonistas de receptores D2 (SEEMAN, 2010). Além disso, um aumento na razão D2S/D2L já foi demonstrado em análises *post mortem* no córtex pré-frontal de indivíduos com esquizofrenia, sugerindo um possível mecanismo para essa redução do tônus dopaminérgico nessa região (KAALUND et al., 2014).

Apesar das evidências do envolvimento do sistema dopaminérgico na esquizofrenia serem conhecidas há muitos anos, mais recentemente, trabalhos vem sugerindo que essas alterações na transmissão dopaminérgica têm origem em disfunções no sistema glutamatérgico. Segundo a teoria glutamatérgica da esquizofrenia, uma hipofunção de receptores do tipo NMDA no córtex pré-frontal, especialmente os contendo subunidade NR1, pode ser responsável pelas alterações dopaminérgicas encontradas nesses pacientes (SCHWARTZ et al., 2012). Essa teoria se baseia em parte em estudos *post-mortem* que observaram diminuição na expressão de receptores NMDA no córtex pré-frontal de indivíduos com esquizofrenia, bem como na observação de que o uso de antagonistas de receptores do tipo NMDA induz um estado tipo psicótico em humanos (MALHOTRA et al., 1996).

Uma circuitaria envolvendo as projeções glutamatérgicas do córtex para o tronco encefálico e projeções dopaminérgicas de volta para o córtex frontal seria afetada por uma disfunção de NMDAR no início do circuito, resultando na hipofrontalidade. Essa circuitaria forma uma rede neuronal resultando em conexões GLU-GABA-GLU-GABA-DA. No caso da esquizofrenia, neurônios glutamatérgicos no córtex frontal que estimulariam interneurônios gabaérgicos encontram receptores NMDA hipo ou não funcionais, causando diminuição do tonus gabaérgico com consequente hiperestimulação dos neurônios glutamatérgicos que se projetam para o tronco. No tronco encefálico, essas projeções aumentam também a estimulação de um grupo de interneurônios gabaérgicos, que, por sua vez, são responsáveis por inibir neurônios dopaminérgicos que se projetam de volta para o córtex frontal. Dessa forma, a taxa de disparo dos neurônios dopaminérgicos nas projeções originadas no tronco encefálico é reduzida resultando em diminuição do tónus dopaminérgico no córtex pré-frontal (STAHL, 2007; SCHWARTZ et al., 2012) (Figura 6).

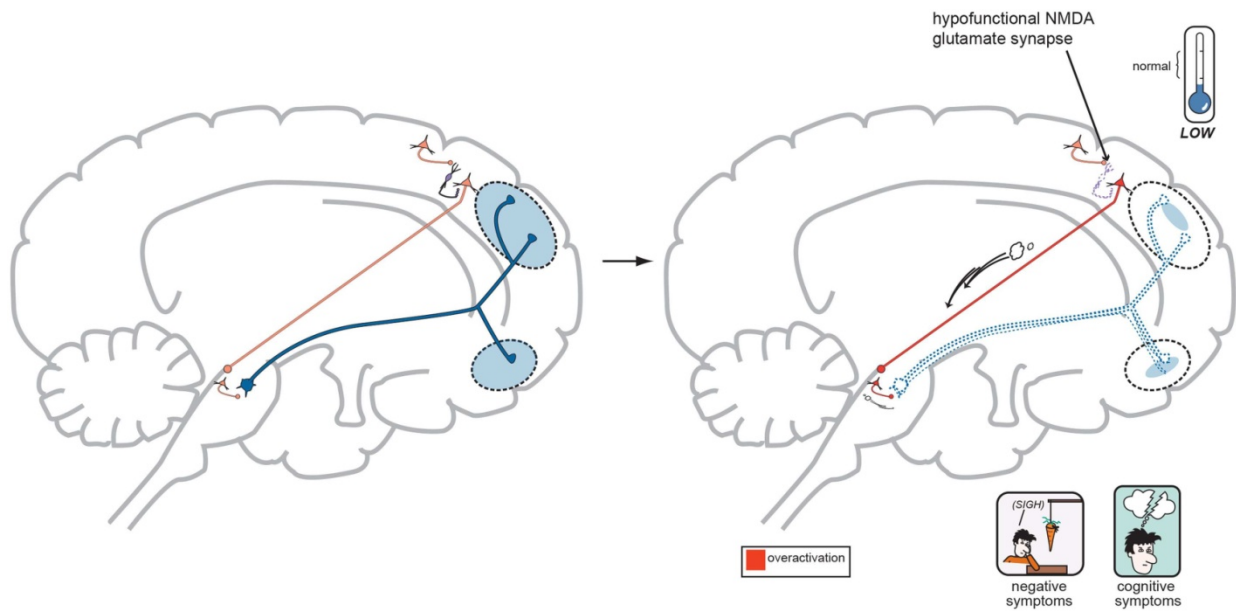


Figura 6. Representação da hipótese glutamatergica com base em receptores NMDA para os sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia. Circuitaria GLU-GABA-GLU-GABA-DA normal à esquerda, com liberação balanceada de dopamina no córtex pré-frontal. À direita, representação dessa circuitaria afetada pela disfunção de NMDA, que levaria à redução do tônus dopaminérgico no CPF e em consequência, aos sintomas negativos e cognitivos. Nessa condição, o neurônio GABAérgico que apresenta receptores NMDA hipofuncionais passa a ter atividade reduzida, limitando, portanto, a inibição do neurônio glutamatergico subsequente. Então, essa projeção glutamatergica desinibida (em vermelho) hiperestimula neurônios GABAérgicos localizados no mesênfalo (em vermelho) que passam a inibir de forma mais acentuada os neurônios dopaminérgicos originados nessa região e que se projetam para CPF (em azul). Consequentemente, a liberação de dopamina no córtex pré-frontal é reduzida.

Fonte: SCHWARTZ, et al., 2012.

A grande similaridade descrita para os comportamentos e sintomas psiquiátricos exibidos por usuários de crack e pacientes com esquizofrenia, bem como as evidências iniciais dessa relação observadas em camundongos expostos ao crack no trabalho anterior, nos motivou a investigar se alterações comportamentais semelhantes aos sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia poderiam ser induzidas em camundongos expostos à inalação de crack, e se essas alterações seriam mediadas por mecanismos moleculares semelhantes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar possíveis alterações cognitivas e comportamentais provocadas pela inalação crônica de crack bem como avaliar se a exposição ao crack em camundongos promove alterações moleculares semelhantes às observadas em pacientes com esquizofrenia

2.2 Objetivos específicos

Em animais submetidos ou não à inalação de fumaça de crack, avaliar:

- a presença de déficits de memória espacial de referência e de trabalho através do Labirinto Aquático de Morris;
- a presença de alterações na interação social e déficits de memória social;
- a presença de alterações no teste de reconhecimento de objetos de curta e longa duração;
- a presença de alterações na expressão gênica de componentes dos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico no estriado.
- a presença de alterações na expressão gênica das isoformas curta e longa do receptor D2 e NMDAR no córtex pré-frontal;
- a presença de alterações na expressão protéica de receptores dopaminérgicos D2S e D2L e receptores glutamatérgicos do tipo NMDAR, no córtex pré-frontal;
- a relação entre os dados bioquímicos e moleculares com os dados comportamentais

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 37 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.

3.2 Desenho experimental

Após 11 dias de inalação, um grupo de animais (grupo 1) foi eutanasiado para as análises bioquímica e molecular. Um segundo grupo (grupo 2) foi submetido aos testes de reconhecimento de objetos e reconhecimento social, e um terceiro grupo (grupo 3) foi utilizado para avaliação da memória espacial de referência e de trabalho (Figura 7).

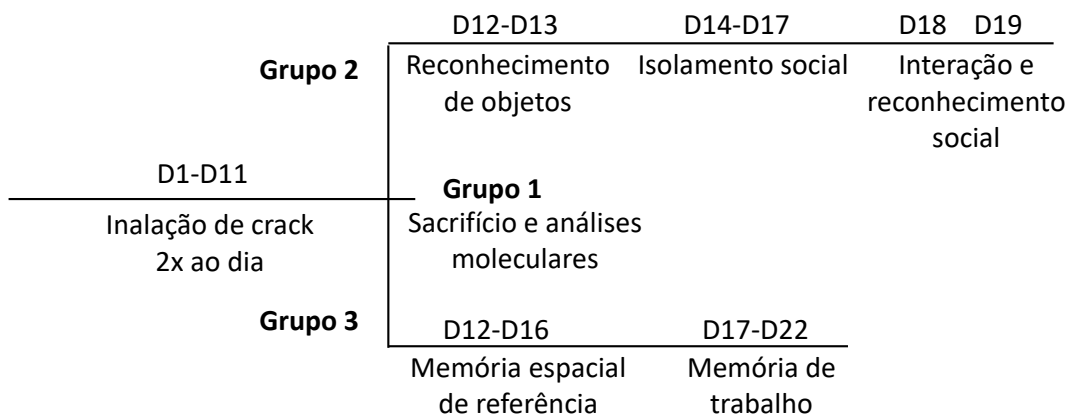


Figura 7. Delineamento experimental.

3.3 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.

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%.

A exposição ao crack foi feita de acordo com método inicialmente descrito por Herculiane et al., 2009 com modificações (AREAL et al, 2015). Os animais do grupo crack foram submetidos a cinco minutos de inalação da fumaça produzida pela queima de cinco gramas da droga, duas vezes por dia por um período de onze dias. Os animais do grupo controle foram expostos ao sistema de inalação nas mesmas condições, porém sem exposição à droga. O procedimento de inalação ao crack foi realizado dentro de uma câmara de inalação mantida em uma cabine de segurança biológica tipo BII (Figura 8).

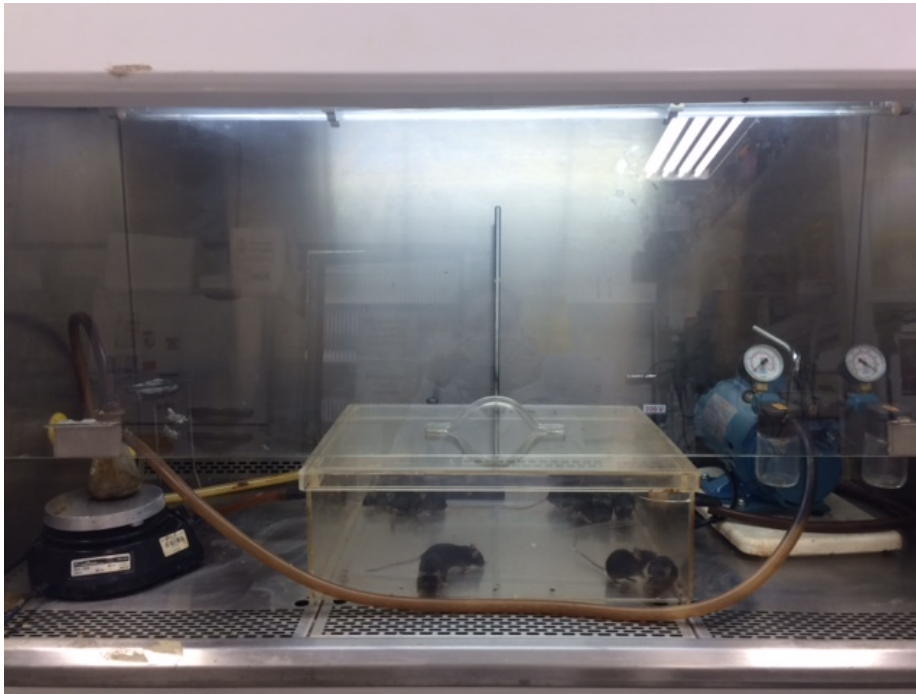


Figura 8. Sistema de inalação de crack utilizado no estudo. A droga é acondicionada dentro de um kitassato localizado sobre uma placa de aquecimento. A fumaça produzida é então transportada por meio de uma mangueira até o interior de uma caixa de acrílico por meio de pressão positiva produzida por uma bomba de vácuo, e depois liberada por um orifício no lado oposto da caixa. Fonte: arquivo próprio

Conforme revelado por análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, esse procedimento de inalação gera concentrações plasmáticas de $46,16 \pm 10$ ng/mL de cocaína, $247,05 \pm 40,32$ ng/mL de AEME, $64,61 \pm 9,80$ ng/mL de benzoilecgonina e $137,1 \pm 5,38$ ng/mL de éster metilecgonina nos animais expostos ao crack (AREAL et al., 2015).

3.4 Avaliação de memória espacial de referência e de trabalho

Para avaliar a memória espacial de referência, os animais foram testados no labirinto aquático de Morris (MORRIS, 1984). O labirinto utilizado consiste em um tanque azul circular de 66 cm de diâmetro por 50 cm de altura, dividido em quatro quadrantes imaginários pelos pontos cardeais, e, em um desses quadrantes foi fixada a plataforma de escape. A plataforma esteve submersa 0,75 cm em água turvada com leite de modo

a impedir a visualização da plataforma pelo animal. Pistas foram posicionadas nas paredes da sala para auxiliar a orientação espacial dos animais. Para avaliação da memória de referência, a plataforma é mantida sempre no mesmo quadrante. O treino foi realizado durante quatro dias, com uma sessão por dia, cada uma com quatro tentativas. Em cada tentativa o animal foi liberado de uma posição diferente com focinho voltado para a parede da piscina, e este foi permitido nadar livremente por 60 segundos ou até que o mesmo encontrasse a plataforma de escape. Caso a plataforma não fosse encontrada em 60 segundos, o animal era gentilmente conduzido até a plataforma e mantido por 15 segundos. A avaliação do desempenho dos animais se deu pela latência, ou seja, o intervalo de tempo desde a liberação do animal até o encontro da plataforma. No quinto dia de experimento foi realizado o teste comprobatório, no qual a plataforma foi retirada e o tempo despendido nos quadrantes alvo (onde a plataforma se encontrava durante o treino) e oposto foi mensurado.

A tarefa do labirinto aquático de Morris pode ser modificada a fim de avaliar a memória de trabalho. Para isso, a plataforma é alocada em uma posição diferente a cada sessão, de modo que o animal aprende uma nova localização da plataforma diariamente utilizando a informação obtida recentemente e mantida ativa.

No dia seguinte ao teste comprobatório, os animais foram colocados novamente no labirinto e submetidos a uma sessão idêntica à da memória de referência, para evitar a extinção da tarefa. Após 24 horas iniciou-se o treino para avaliação da memória de trabalho, baseado no protocolo de Niyuhire et al., 2007, com modificações. Em cada sessão diária, a plataforma foi semi-aleatoriamente alocada em um novo ponto do labirinto (Figura 9) e os animais tiveram cinco tentativas por sessão para encontrar a plataforma. Em cada tentativa o animal foi liberado de um dos quatro pontos cardeais sendo o primeiro ponto repetido na quinta tentativa, e os animais tiveram 60s para encontrar a plataforma. A avaliação do desempenho dos animais foi realizada primeiramente pela latência para encontrar a plataforma ao longo de cada tentativa. Além disso, um critério de desempenho satisfatório foi utilizado, o qual se baseia no

encontro da plataforma em menos de 30s nas últimas 3 tentativas. O número de sessões em que cada animal atingiu esse critério foi contabilizado.

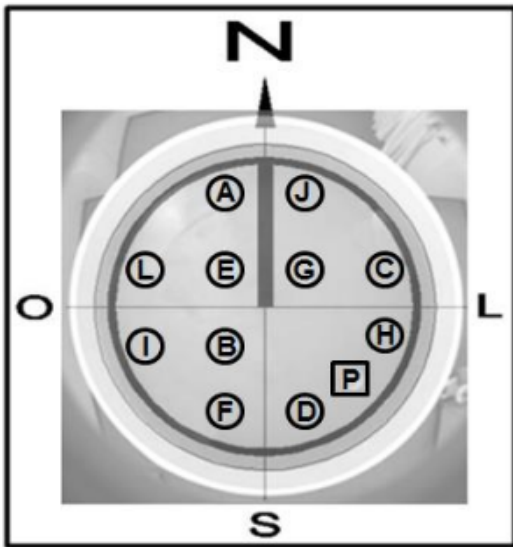


Figura 9. Posições da plataforma para avaliação da memória de trabalho. (NIYUHIRE et al., 2007) Foram utilizadas as posições de A-E nesse estudo. O retângulo P representa o local em que a plataforma se encontrava durante o teste de memória de referência.

3.5 Teste de reconhecimento de objetos

No primeiro dia do protocolo, todos os animais foram expostos à caixa onde o teste seria realizado por um período de 30 minutos para habituação ao aparato (caixa retangular de 41x34x16cm). Iniciou-se então a fase de treino, na qual os animais foram colocados na caixa contendo dois objetos idênticos e puderam explorar livremente por um período de 5 minutos. Em seguida, realizou-se o teste, em que um dos objetos foi substituído por um objeto diferente e os animais foram colocados novamente no aparato e puderam explorar os objetos novamente por 5 minutos (Figura 10). Durante o teste, caso o animal explore mais o objeto novo, presume-se que ele se recorda do objeto familiar, e essa medida é utilizada como um indicativo de memória de reconhecimento do objeto (AKKERMAN et al., 2012). Em um grupo de animais esse procedimento foi realizado 30 minutos após o teste, para avaliação da memória de curta duração e em um segundo grupo 24 horas após o teste, para avaliação da memória de

longa duração. O treino e o teste foram filmados e os dados foram analisados com auxílio do software ANYmaze™ (Stoelting Co.).



Figura 10. Aparato para teste de reconhecimento de objetos, contendo objetos familiar e novo. Fonte: arquivo próprio

3.6 Teste de interação e reconhecimento social

Os testes de interação e reconhecimento social utilizados basearam-se nos protocolos de Gusmão et al., 2012 e Prado et al., 2006. O aparato consistiu em uma caixa de 41x34x16cm onde foi alocado um cilindro transparente contendo orifícios igualmente distribuídos para conter o animal intruso, de modo a permitir a investigação social mantendo a segurança dos animais. Após os 11 dias de inalação de crack, os animais foram mantidos em isolamento social por 4 dias antes do teste, a fim de estimular a territorialidade. O protocolo foi iniciado com um período de habituação, onde o animal a ser testado pôde explorar o aparato, incluindo um cilindro idêntico ao que irá em seguida conter o intruso, por 10 minutos. O animal intruso também foi habituado ao cilindro previamente por 5 minutos. Em seguida, o cilindro localizado no aparato foi substituído pelo cilindro contendo o intruso juvenil e os animais puderam interagir por 5 minutos (Figura 11). O tempo despendido explorando os orifícios do cilindro contendo o

intruso nesse primeiro contato foi quantificado e representado como uma medida de interação social. Para avaliação da memória social, o mesmo teste foi repetido após 24 horas, para verificar se o tempo de exploração no segundo contato seria menor em relação ao primeiro. O treino e o teste foram filmados e o tempo de exploração foi analisado com auxílio do software ANYmaze™ (Stoelting Co.).



Figura 11. Teste de reconhecimento social. Fonte: arquivo próprio

3.7 Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real quantitativa

3.7.1 Extração de RNA

Os tecidos foram triturados em nitrogênio líquido e o RNA total extraído utilizando TRI Reagent RNA Isolation Reagent (Sigma-aldrich) 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

(500 μ L/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 ressuspenso em 40 μ L de água deionizada, previamente tratada com dietilpicrocarbonato (DEPC). A concentração e a qualidade do RNA extraído foram verificadas utilizando o equipamento NanoDrop™ (ThermoScientific).

3.7.2 Síntese de cDNA

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

3.7.3 PCR quantitativa 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) e o kit iQ SYBR Green Supermix (Biorad). Em suma, as reações foram preparadas em um volume total de 10 μ L contendo 5 μ L de SYBR Green Supermix 2x, 3,5 μ L de água purificada, 0,5 μ L de cada iniciador a 10 μ M e 0,5 μ L 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- $\Delta\Delta$ Ct 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	NCBI Refseq	Sequência (5' - 3')	Tamanho do fragmento (pb)
D1R	NM_010076.3	F: CCAAGAACGTGAGGGCTAAG R: TGAGGATGCGAAAGGAGAAG	120
D2R	NM_010077.2	F: GAGCCAACCTGAAGACACC R: TGACAGCATCTCCATTTCCAG	158
TH	NM_009377.1	F: AAGATCAAACCTACCAGCCG R: TACGGGTCAAACCTCACAGAG	118
D2S	XM_006509996.3	F: TGCAGTGTTAGCTTGGCTCG R: GTGAAAGGGGCACTCTGTGA	138
D2L	NM_010077.2	F: CCACTCAAGGGCAACTGTACC R: TGACAGCATCTCCATTTCCAG	143
mGluR5	NM_001143834.1	F: AGTCATTTACCTAAAGCCCGG R: CTTCTCGCTGATACCCATCTG	166
NR1	NM_008169.3	F: TGACCCAGGAACCAAGAATG R: CTTGCCGTTGATTAGCTGAAG	235
NR2A	NM_008170.2	F: ATGACTATTCTCCGCCTTTCC R: AGTTTACAGCCTTCATCCCTC	220
NR2B	NM_008171.3	F: GAACGAGACTGACCCAAAGAG R: CAGAAGCTTGCTGTTCAATGG	248
Actina	NM_007393.5	F: TGAATCCTGTGGCATCCATGA R: AATGCCTGGGTACATGGTGGTA	122

3.8 Avaliação da expressão protéica por imunoblot

Para a preparação do extrato protéico, os tecidos foram triturados e 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 12.000xg 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 proteico obtido, 80µg 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 55°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 imunoblot, 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 sob refrigeração. 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 TBST (137mM NaCl; 20mM Tris.HCl; pH 7,6; Tween 0,1% (v/v)) e 5% de leite desnatado. 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 e então incubada com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase por 1 hora. Ao término da incubação, o processo de lavagem foi repetido. 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).

3.9 Análise estatística

Os dados comportamentais foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de *post-hoc* de Bonferroni, exceto para a interação social, que foi avaliada por teste t de Student não pareado. Para análise estatística dos dados moleculares e bioquímicos, utilizou-se o teste t de Student não pareado. Os dados foram representados como média \pm erro padrão, e o nível de significância considerado foi de $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o software Graphpad Prism 7.0.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da exposição ao crack na memória espacial de referência e de trabalho

Em relação à memória espacial de referência, não houve diferença entre os grupos no desempenho dos animais durante a fase de aprendizagem [$F(1,33)=0,02$ $p=0,8817$] (Figura 12a) ou no teste comprobatório [$F(1,22)=0,04$ $p=0,8515$] (Figura 12b), podendo ser observado que os animais de ambos os grupos aprenderam a tarefa [$F(3,33)= 7,37$ $p=0,0007$] para a curva de aprendizagem, [$F(1,22)=22,31$ $p=0,0001$] para o teste comprobatório.

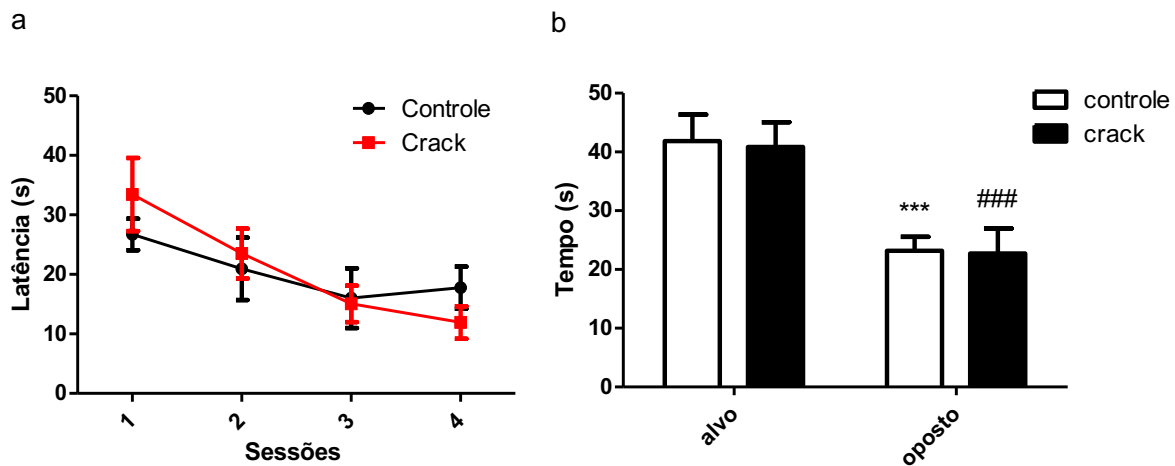


Figura 12. A exposição ao crack por 11 dias não altera a memória espacial de referência. a) Curva de aprendizagem. b) teste comprobatório. *** $p<0,001$ em relação ao quadrante alvo para o grupo controle. ### em relação ao quadrante alvo para o grupo crack. Média \pm erro padrão, ANOVA de duas vias. controle $n=7$, crack $n=6$.

Em relação à memória de trabalho, foi observado que camundongos de ambos os grupos conseguiram desenvolver a tarefa, o que pode ser observado pela redução do tempo de latência ao longo das tentativas (ANOVA de duas vias: $F(4,44)=11,7$ $p<0,0001$; Figura 13a). No entanto, animais do grupo crack apresentaram maior tempo de latência na segunda ($p=0,0425$) e terceira tentativas ($p=0,0164$), e uma tendência se manteve nas seguintes tentativas, porém a diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,0875$ e $p=0,0745$ para quarta e quinta tentativas, respectivamente), sugerindo um possível déficit na memória de trabalho. Esse prejuízo também pode ser observado quando o número de sessões em que os animais atingiram o critério de

desempenho satisfatório foi contabilizado, sendo este menor para o grupo crack em relação ao grupo controle ($p=0,0111$; Figura 13b).

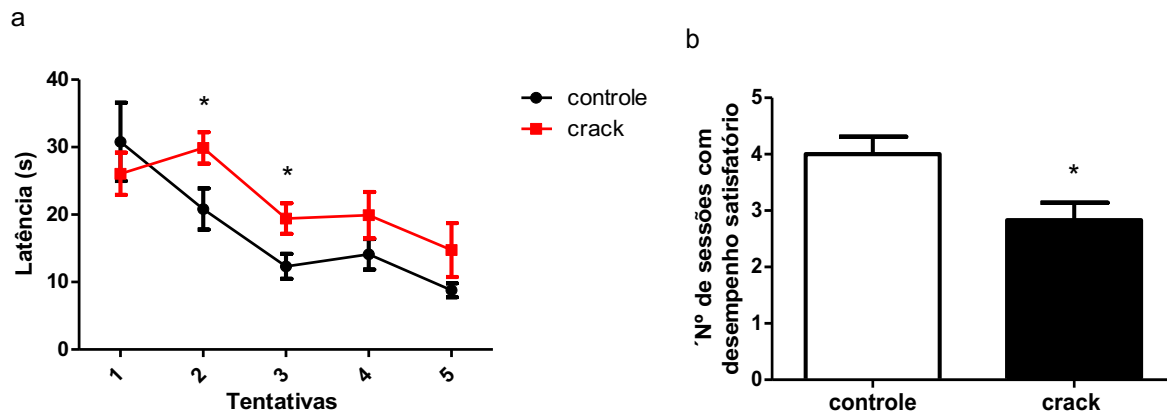


Figura 13. Avaliação no labirinto aquático de Morris demonstra prejuízo na memória de trabalho para animais do grupo crack. a) Curva de aprendizagem ao longo das cinco tentativas. b) Número de sessões nas quais o critério de desempenho satisfatório (encontrar a plataforma em menos de 30s nas três últimas tentativas) foi atingido. Média \pm erro padrão, controle $n=7$, crack $n=6$ * $p<0,05$.

4.2 Efeito da exposição ao crack na memória de reconhecimento de objetos

A memória de reconhecimento de objetos foi avaliada a nível de curta e de longa duração (Figura 14). A exposição ao crack não afetou a memória de reconhecimento de objetos de curta duração [$F(1,16)= 0,04$ $p=0,8402$] entre os grupos, visto que ambos os grupos tiveram bom desempenho [$F(1,16)= 15,51$ $p=0,0012$] entre os objetos. O mesmo foi observado para a memória de longa duração [$F(1,16)=0,47$ $p=0,5035$] entre os grupos; [$F(1,16)=50,43$ $p<0,0001$] entre objetos.

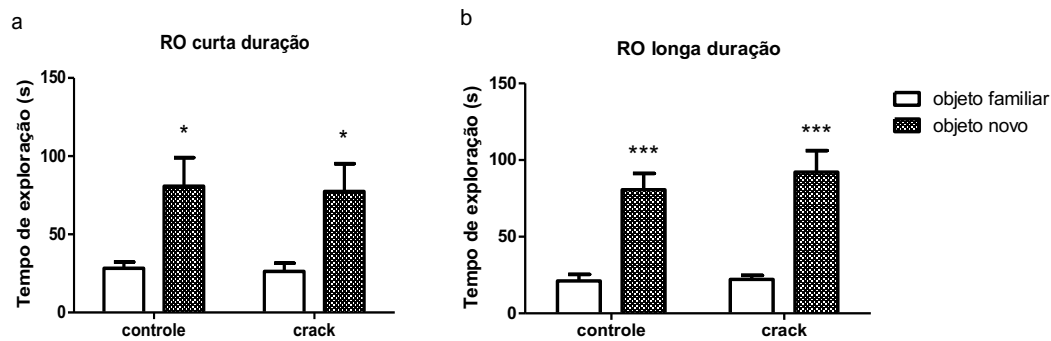


Figura 14. A exposição ao crack não afeta a memória de reconhecimento de objetos. a) avaliação da memória de curta duração. b) avaliação da memória de longa duração. Média \pm erro padrão, controle n=6, crack n=6. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, ANOVA de duas vias.

4.3 Efeito da exposição ao crack na interação e reconhecimento sociais

Durante a fase de treino, o primeiro contato entre o animal teste e o intruso, já foi observado que os animais submetidos à inalação de crack apresentaram menor interação com o animal intruso em relação aos animais controle ($p = 0,0193$; Figura 15a). No dia do teste, camundongos do grupo controle apresentaram menor tempo de investigação em relação ao treino ($p = 0,0299$), sugerindo que a memória social foi estabelecida (Figura 15b). Já para o grupo crack, essa diferença não foi observada ($p = 0,1477$). Deve-se ressaltar, no entanto, que a menor investigação durante o treino pode ter impactado nesse resultado do grupo crack.

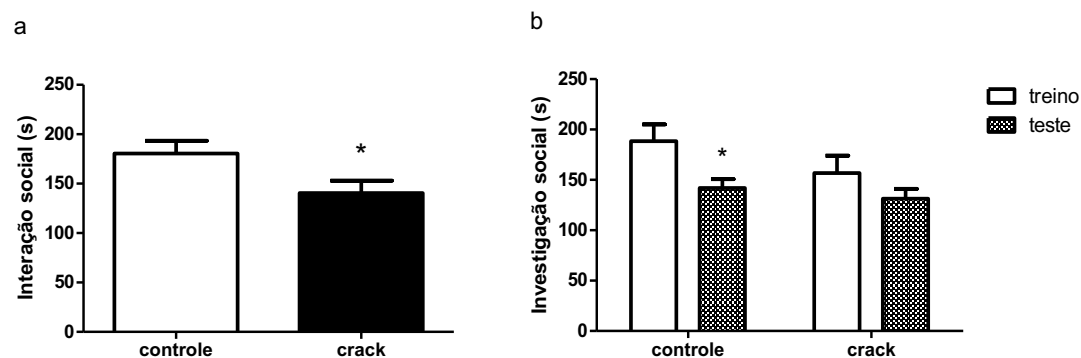
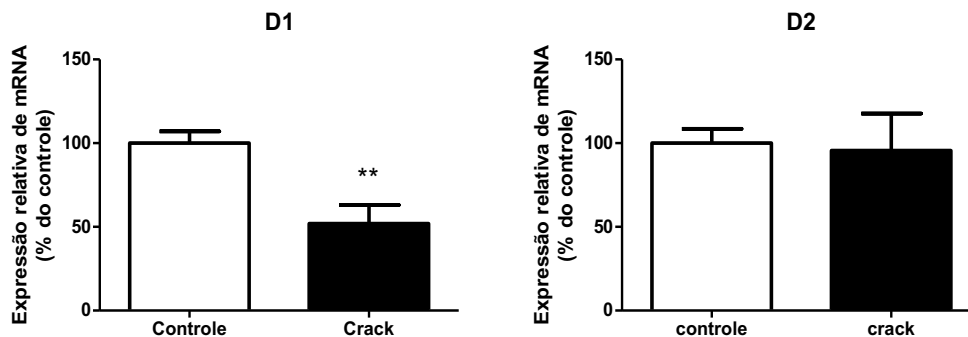


Figura 15. Animais expostos ao crack apresentam menor interação social. a) Interação social no primeiro contato. b) teste de reconhecimento social. Média \pm erro padrão. * $p < 0,05$ ANOVA de duas vias para

reconhecimento social (controle n=6, crack n=6). Teste t não pareado para interação social (controle n=12, crack n=12).

4.4 Avaliação da expressão gênica no estriado

Conforme mencionado anteriormente, a região do estriado tem papel central na produção dos efeitos motores e de prazer induzidos pela cocaína (NESLTER, 2005; KALIVAS, 2009; COOPER et al., 2017). A ativação de receptores dopaminérgicos nessa região é crucial para as sensações de prazer promovidas pela droga e evidências mais recentes demonstram também a participação do receptor glutamatérgico mGluR5 em diversos processos envolvidos com a dependência de cocaína (COOPER et al., 2017; KENNY et al., 2005; MARTIN-FARDON & WEISS; 2012; KUMARESAN et al., 2009). No intuito de avaliar possíveis alterações moleculares nos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico nessa região, foram realizadas análises de qPCR para componentes desses sistemas. Em relação ao sistema dopaminérgico, foi observada uma diminuição na expressão gênica do receptor D1R ($p=0,0032$) e da enzima tirosina hidroxilase ($p=0,0080$) enquanto os níveis de mRNA do receptor D2 não se mostraram alterados ($p=0,4279$; figura 16). No que diz respeito ao receptor mGluR5, foi observada uma diminuição da expressão gênica no estriado ($p=0,0235$).



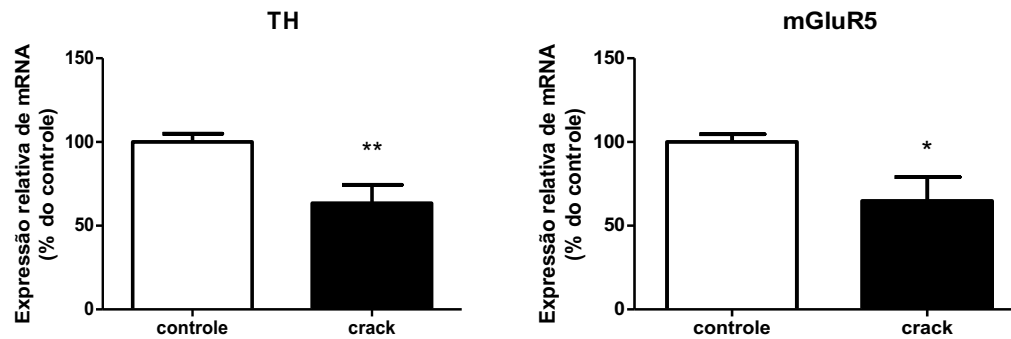


Figura 16. Análise da expressão gênica relativa no estriado. Média \pm erro padrão, controle n=5, crack n=5. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$. Teste t não pareado.

4.5 Avaliação da expressão gênica no cortex pré-frontal

Para avaliar possíveis alterações transcricionais em resposta à exposição ao crack, e correlacioná-las com alterações semelhantes à esquizofrenia, amostras do córtex pré-frontal de animais de ambos os grupos foram submetidas à análise por PCR quantitativa em tempo real. A análise de genes relacionados ao sistema dopaminérgico revelou que a inalação de crack induziu um aumento na expressão gênica dos receptores dopaminérgicos D1R ($p=0,0178$), D2S a isoforma curta do receptor D2, ($p=0,0299$), D2L, a isoforma longa do receptor D2 ($p=0,0138$), bem como da enzima de síntese tirosina hidroxilase ($p=0,0076$) (figura 17).

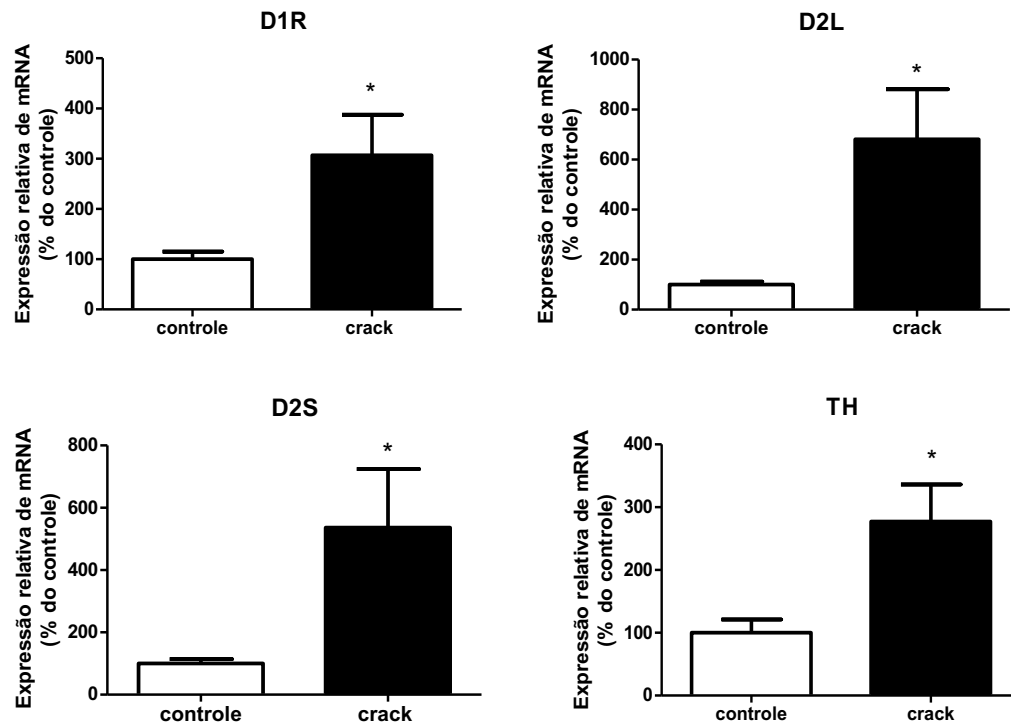


Figura 17. Alterações na expressão gênica de componentes do sistema dopaminérgico no córtex pré-frontal induzidas pelo crack. Média \pm erro padrão, controle n=7, crack n=7. *p<0,05. Teste t não pareado.

Os níveis de expressão gênica de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA também foram avaliados, e observou-se diminuição na expressão das subunidades NR1 ($p=0,0166$), NR2a ($p=0,0237$) e NR2b ($p=0,0015$; figura 18).

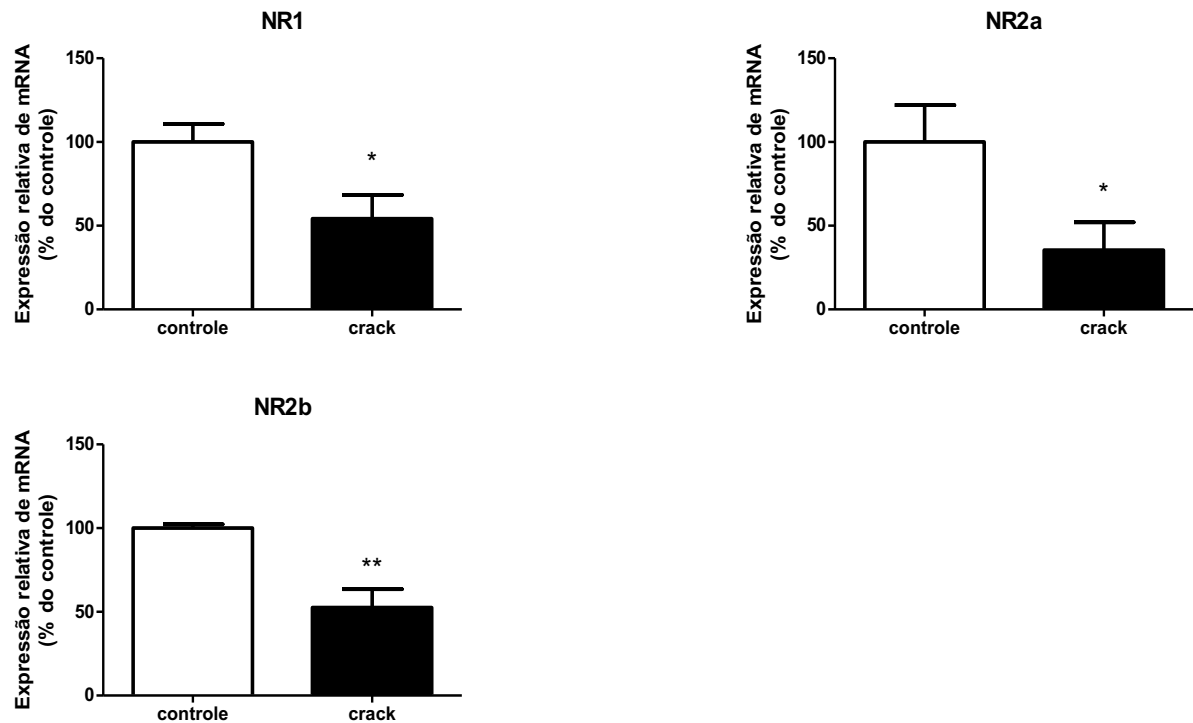


Figura 18. Diminuição da expressão gênica de receptores glutamatérgicos no córtex pré-frontal de animais expostos ao crack. Média \pm erro padrão, controle n=7, crack n=7. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$. Teste t não pareado.

4.6 Expressão protéica de receptores D2 e do tipo NMDA no cortex pré-frontal

Uma vez encontradas alterações nos níveis de RNA mensageiro de componentes dos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico, avaliamos a expressão protéica desses componentes. A expressão proteica dos receptores D2 foi avaliada por *western blotting* (Figura 19). Apesar de não ter sido observado um aumento isolado na expressão das isoformas D2S ($p=0,237$) ou D2L ($p=0,1529$), a razão D2S/D2L mostrou-se aumentada no córtex pré-frontal dos animais do grupo crack em relação ao grupo controle ($p=0,0302$).

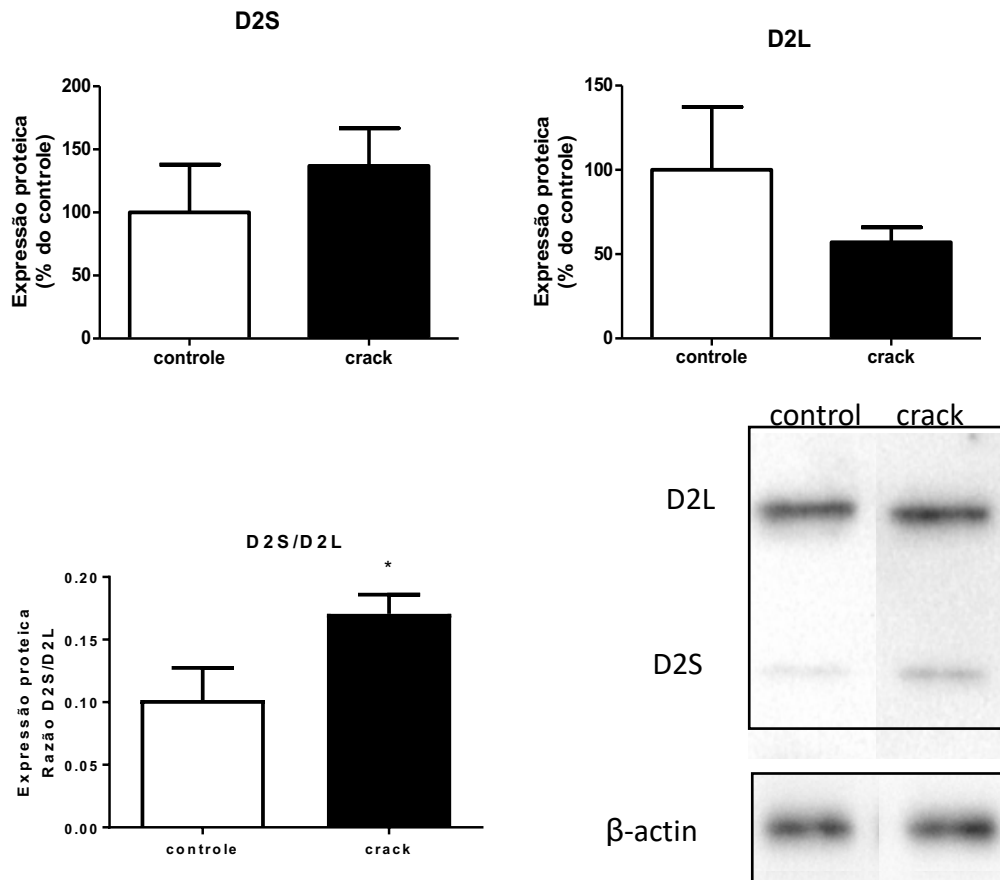


Figura 19. A inalação de crack promove um aumento da razão D2S/D2L no córtex pré-frontal. Média \pm erro padrão, controle n=5, crack n=5. * $p < 0,05$. Teste t não pareado.

A expressão protéica de subunidades do receptor NMDAR também foi quantificada e observou-se uma diminuição de NR2A ($p=0,0319$) e de NR2B ($0,0323$) no córtex pré-frontal do grupo crack em relação ao grupo controle (Figura 20).

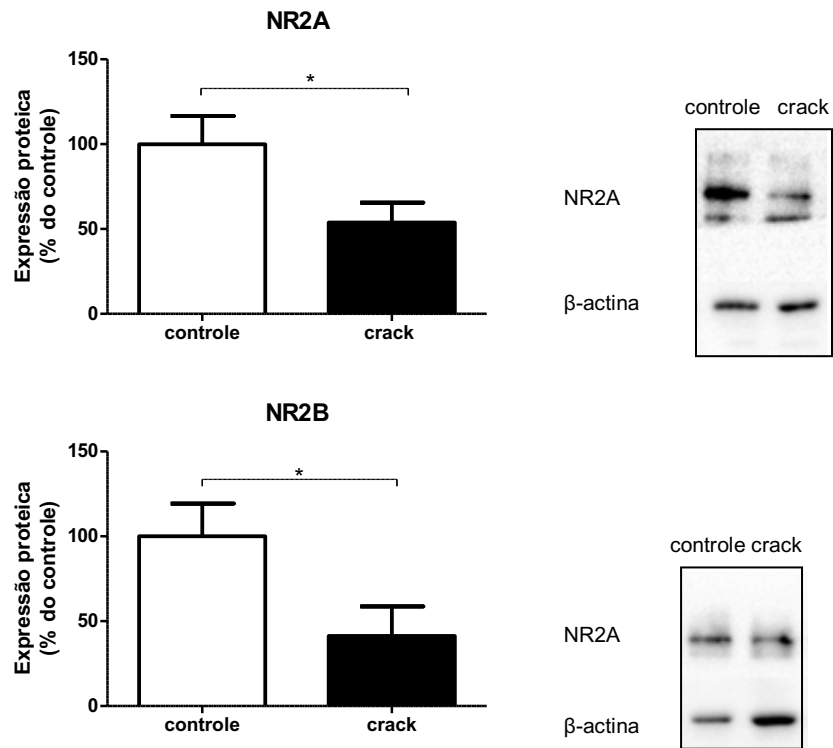


Figura 20. Diminuição na expressão das subunidades NR2A e NR2B induzidas pela inalação de crack. Média \pm erro padrão, controle n=5, crack n=5. *p<0,05. Teste t não pareado.

5 DISCUSSÃO

Com o intuito de identificar possíveis alterações moleculares induzidas pela exposição de crack, foi realizada análise da expressão gênica de componentes dos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico no estriado de animais submetidos ou não à inalação de crack por 11 dias. O estriado é uma região diretamente envolvida nas respostas motoras e de recompensa produzidas pela cocaína, e tanto a aquisição quanto a manutenção de comportamentos relacionados à dependência parecem ser decorrentes de uma série de adaptações moleculares e celulares que ocorrem nos circuitos estriatais (KALIVAS, 2009; COOPER et al., 2017; HYMAN et al., 2006). Com relação ao sistema dopaminérgico, observou-se uma redução na expressão gênica dos receptores D1R, bem como da enzima TH, enquanto a expressão de D2R não foi alterada. De forma semelhante, animais submetidos a um protocolo de sensitização comportamental com administração de cocaína+AEME, ou cocaína isoladamente, apresentam redução na expressão proteica de D1R, mas não de D2R no caudado-putâmen (GARCIA et al., 2017). Os resultados obtidos para o sistema dopaminérgico no estriado diferem dos previamente descritos pelo nosso grupo para o córtex pré-frontal e hipocampo, evidenciando alterações específicas por região causadas pela inalação da fumaça de crack (AREAL et al., 2015; ALVIM, 2014).

Em relação à expressão gênica do mGluR5, observamos uma diminuição deste mRNA nos animais expostos à inalação da fumaça de crack. Alterações na expressão de mGluR5 já foram relatadas em diversos estudos com cocaína. Uma *upregulation* da expressão de mGluR5 já foi observada no hipocampo após 14 dias de administração de cocaína (FREEMAN et al., 2001). Em relação à região do estriado, um aumento na expressão de gênica de mGluR5 no NAc após 3 semanas de abstinência foi relatado por GHASEMZADEH et al. (1999). Em contraste, Huang et al. (2011) observaram redução da expressão de mGluR5 no NAc, tanto no mRNA quanto na quantidade de proteína, após 2 semanas de abstinência. Semelhante ao observado no presente trabalho, Pomierny-Chamiolo et al. (2017) observaram redução da expressão de mGluR5 no NAc após 14 dias de auto-administração ou administração de cocaína pelo

experimentador. Por outro lado, a expressão desse receptor se mostrou aumentada na substância negra. Esse trabalho também mostrou que após um período de 10 dias de extinção, a expressão de mGluR5 se mostrou elevada no hipocampo. Interessantemente, a administração de cocaína seguida de extinção promoveu uma alteração bifásica na densidade desses receptores nas conexões córtex pré-frontal-núcleo accumbens, que foi demonstrada por experimentos de *binding*. Enquanto não foram observadas alterações significativas durante a fase de administração de cocaína, a densidade de mGluR5 diminuiu no CPF e aumentou no NAc após a abstinência. Ainda, o desafio com uma única injeção de cocaína após o período de abstinência provocou um aumento na expressão de mGluR5 no córtex cingulado, pré-límbico, infra-límbico e estriado dorsal. Essas alterações foram específicas para animais com o histórico de administração de cocaína (operante ou forçada) seguido da abstinência, não sendo observadas em animais que vinham recebendo injeções de salina e vieram a receber uma injeção única de cocaína (POMIERNY-CHAMIOLO et al., 2017). Esses dados evidenciam a ocorrência de alterações dinâmicas e específicas por região promovidas pelo uso de cocaína em diferentes condições.

Em relação aos parâmetros comportamentais, no presente estudo observou-se que a exposição ao crack, no protocolo utilizado, não afetou a tarefa de reconhecimento de objetos e nem a memória espacial de referência. Por outro lado, os animais expostos ao crack exibiram um déficit na memória de trabalho e menor interação social em comparação ao grupo controle.

O fato de que, quando avaliados no labirinto aquático de Morris, os camundongos do grupo crack apresentaram um déficit da memória de trabalho, mas não da memória espacial de referência, sugere uma disfunção no córtex pré-frontal. Apesar do prejuízo em funções executivas, inclusive na memória de trabalho, em usuários de crack já ter sido relatado (LEVANDOWSKI et al., 2016; SANVICENTE-VIEIRA et al., 2016), as alterações neuroquímicas que levam a esse quadro ainda não estão elucidadas. Sabe-se que as drogas de abuso afetam a neurotransmissão no córtex pré-frontal, uma região responsável pela capacidade de julgamento, autocontrole, atenção e memória de

trabalho (GOLDSTEIN; VOLKOW, 2002). Desta forma, é provável que os déficits em funções executivas apresentados por usuários de crack sejam consequência de uma disfunção do córtex-frontal (GOLDSTEIN; VOLKOW, 2011).

No presente estudo, além do prejuízo na memória de trabalho, foi observado que os animais expostos ao crack também apresentaram menor interação social do que os do grupo controle, quando expostos a um animal intruso. Adicionalmente, conforme descrito em um estudo anterior realizado pelo nosso grupo, a inalação de crack leva à redução dos níveis de dopamina no CPF de camundongos, além de um expressivo aumento na expressão gênica de receptores dopaminérgicos D2 (AREAL et al., 2015), um importante alvo na terapia da esquizofrenia. Distúrbios psiquiátricos envolvendo alucinações e paranoia decorrentes do consumo crack são frequentemente relatados (OLIVEIRA & NAPPO, 2008; MORTON, 1999). Em conjunto, esses dados levantam a hipótese de que o consumo de crack pode provocar alterações semelhantes à esquizofrenia. Sintomas positivos como alucinações, delírios e paranoia associados ao uso de crack são frequentemente descritos (MORTON, 1999). Além disso, sintomas cognitivos como isolamento social e prejuízos em funções executivas vem sendo identificados recentemente (LEVANDOWSKI et al., 2016; SANVICENTE-VIEIRA et al., 2016). Considerando os sintomas psiquiátricos descritos em usuários de crack e os dados obtidos previamente e no presente estudo, decidiu-se investigar a presença de outras alterações moleculares características da esquizofrenia, em nosso modelo animal.

Os sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia parecem estar intimamente relacionados com uma diminuição do tônus dopaminérgico no córtex pré-frontal, um fenômeno conhecido como hipofrontalidade (HOWES AND KAPUR, 2009). Inclusive, terapias focadas no córtex pré-frontal dorsolateral, como a estimulação transcraniana, vem sendo propostas como um tratamento alternativo para os sintomas negativos em pacientes resistentes ao tratamento com clozapina, um antipsicótico atípico, usado no tratamento da esquizofrenia (KALLEL et al., 2016). Digno de nota, uma estratégia semelhante vem sendo aplicada no controle de recaídas em usuários de crack, e

parece estar associada à uma melhora na memória de trabalho dos pacientes (NAKAMURA-PALACIOS et al., 2016). Em relação às características comportamentais, apesar de distintos modelos animais para esquizofrenia apresentarem diferentes alterações, a redução na interação social vem se mostrando um fator em comum na maioria destes estudos (MOHN et al., 1999; JONES et al., 2011). Corroborando a hipótese de que a adição ao crack poderia resultar em alterações comportamentais semelhantes à esquizofrenia, foi identificado neste trabalho que os animais que foram expostos à inalação de crack apresentaram menor interação social do que os do grupo controle.

Conforme já descrito, a inalação de crack leva à redução dos níveis de dopamina no CPF de camundongos (AREAL et al., 2015), de forma semelhante ao que ocorre na hipofrontalidade descrita para a esquizofrenia. Além disso, conforme demonstrado neste trabalho, a exposição ao crack altera a razão D2S/D2L no CPF e essa modificação pode estar relacionada à diminuição do tônus dopaminérgico observada. Enquanto a isoforma longa, D2L, é mais expressa em neurônios pós-sinápticos, D2S (curta) é mais expressa pré-sinápticamente e atua principalmente como auto-receptor, regulando a síntese e a liberação de dopamina (DE MEI et al., 2009). Sabe-se que a ação da enzima tirosina hidroxilase é a etapa limitante para a síntese de catecolaminas (ELSWORTH & ROTH, 1997). Areal et al., 2015 revelaram aumento nos níveis de mRNA da TH no CPF em resposta à exposição ao crack, o que a princípio poderia sugerir aumento na síntese de dopamina. No entanto, a atividade da TH depende de modificações pós-traducionais e regulação por fosforilação, incluindo fosforilação no resíduo de serina 40, processo inibido pela sinalização de D2S (LINDGREN et al., 2003). Conforme já comentado, a exposição ao crack induziu um aumento na expressão da isoforma D2S em relação à D2L, e essa alteração já foi descrita em análises *post mortem* de indivíduos com esquizofrenia (KAALUND et al., 2014). Portanto, é possível que o aumento de D2S, por meio da inibição de TH, possa mediar a redução de dopamina no CPF, tanto na esquizofrenia quanto no abuso de crack.

Apesar da hipofrontalidade ser considerada um fator determinante para os sintomas negativos da esquizofrenia, e, como proposto, para os prejuízos cognitivos e o comportamento antissocial exibidos por camundongos submetidos à inalação de crack, os mecanismos moleculares que levam à essa diminuição do tônus dopaminérgico no CPF ainda estão sob investigação. Um outro mecanismo já proposto para essa alteração na esquizofrenia se baseia na atividade de receptores NMDAR (SCHWARTZ et al., 2012). Segundo essa hipótese glutamatérgica da esquizofrenia, tanto os sintomas positivos quanto os negativos resultariam, em grande parte, de hipofunção de receptores do tipo NMDA no CPF que alteraria uma circuitaria envolvendo neurônios GLU-GABA-GLU-GABA-DA, resultando numa redução do tônus dopaminérgico nessa mesma região (STONE et al., 2007). Conforme demonstrado neste trabalho, a inalação de crack induz diminuição da expressão de subunidades de NMDAR no CPF, uma alteração que poderia explicar a redução dos níveis de dopamina e as alterações comportamentais semelhantes aos sintomas da esquizofrenia tanto em humanos quanto no modelo animal.

Ainda, um estudo observou que camundongos que expressam apenas 5% dos níveis normais da subunidade NR1 apresentam baixa sociabilidade e estereotipia semelhante a modelos de esquizofrenia farmacologicamente induzidos (MOHN et al., 1999). Além disso, essas alterações comportamentais foram revertidas pela administração de antagonistas dopaminérgicos utilizados como antipsicóticos, corroborando a inter-relação entre os sistemas dopaminérgico e glutamatérgico na etiologia da esquizofrenia (MOHN et al., 1999; SCHWARTZ et al., 2012).

Em conjunto, os resultados apresentados demonstram que a exposição ao crack promove comportamentos semelhantes a alguns dos sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia. Ainda, de acordo com as alterações bioquímicas e moleculares observadas, o aumento da razão D2S/D2L e a diminuição da expressão de receptores do tipo NMDA podem ser responsáveis pelas alterações comportamentais observadas. Este é o primeiro trabalho a relacionar diretamente, de forma experimental, o abuso de crack com comportamentos *schizophrenia-like*. Esses dados são relevantes para uma

melhor compreensão do comportamento peculiar dos usuários de crack em relação às outras drogas, bem como podem direcionar a possibilidade de novas alternativas terapêuticas no tratamento de dependentes dessa droga.

6 CONCLUSÕES

- A inalação de crack por 11 dias não altera a memória espacial de referência, mas causa déficits na memória de trabalho;
- A exposição ao crack no protocolo utilizado não afeta a memória de reconhecimento de objetos;
- Animais submetidos à inalação de crack apresentam menor interação social;
- A inalação de crack produz efeitos comportamentais e déficits cognitivos semelhantes ao que ocorrem na esquizofrenia;
- A exposição ao crack altera a expressão gênica e protéica de receptores dopaminérgicos no córtex pré-frontal e no estriado;
- As características comportamentais exibidas por usuários de crack possivelmente resultam de alterações moleculares e bioquímicas semelhantes às que ocorrem na esquizofrenia;
- O mecanismo envolvido nessas alterações comportamentais provavelmente está relacionado com o aumento da razão D2S/D2L e com a redução da expressão de receptores do tipo NMDA, que também ocorrem na esquizofrenia.

Capítulo 2. Investigação do envolvimento do receptor mGluR5 e da proteína espinofilina na dependência de cocaína

7 INTRODUÇÃO

7.1 Sistema Glutamatérgico

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no encéfalo, participando de cerca de 70% da neurotransmissão no sistema nervoso central (NICHOLS, 1993; POMIERNY-CHAMIOLO, 2014). Originalmente especulava-se que o papel do glutamato no SNC era meramente metabólico, até que em 1984 foi de fato reconhecido como um neurotransmissor (KREBS, 1935; FONNUM et al., 1984). Embora envolvido em processos fundamentais para o funcionamento do sistema nervoso central, em altas concentrações, o glutamato pode levar à morte neuronal por excitotoxicidade (OLNEY, 1994). Portanto, a transmissão glutamatérgica deve ser finamente regulada, de modo a garantir a neurotransmissão excitatória em níveis ótimos bem como limitar a excitotoxicidade. Para isso, o metabolismo, a liberação, a sinalização e a captação/re-captção são controlados de forma complexa por múltiplos processos reguladores (NICIU et al., 2012).

Esse neurotransmissor pode ser sintetizado a partir de glutamina ou a partir do α -cetoglutarato proveniente do ciclo do ácido cítrico e, no neurônio pré-sináptico, é internalizado em vesículas sinápticas por meio de transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs) (TAKAMORI, 2006). Até o momento, três VGLUTs são conhecidos (NICIU et al., 2012). VGLUT1 e VGLUT2 são encontrados primariamente em neurônios glutamatérgicos, mas também estão presentes em células da glia, principalmente astrócitos (FREMEAU et al., 2004; MONTANA et al., 2004). Já o VGLUT3 se diferencia dos anteriores principalmente pela sua localização, sendo encontrado em neurônios GABAérgicos, colinérgicos e monoaminérgicos (SEAL & EDWARDS, 2006). De forma dependente de Ca^{2+} e do complexo de fusão SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-*

sensitive factor attachment protein receptor), as vesículas se fundem à membrana pré-sináptica e o glutamato é liberado na fenda, podendo então se ligar a receptores pós-sinápticos (SUDHOF & ROTHMAN, 2009; PANG & SUDHOF, 2010) (figura 21).

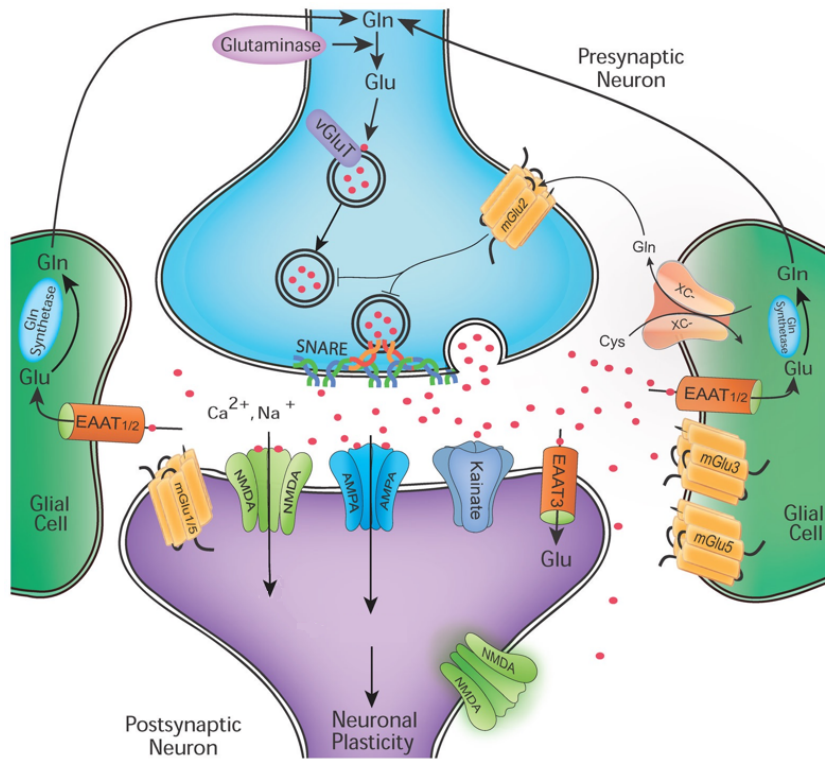


Figura 21. Representação esquemática da neurotransmissão glutamatérgica. A glutamina (Gln) é convertida em glutamato (Glu) e empacotada em vesículas sinápticas pelo transportador vesicular VGLUT no neurônio pré-sináptico e liberado na fenda sináptica com auxílio das proteínas SNARE. O glutamato pode se ligar a receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA, Kainato) ou metabotrópicos (mGluR1-8). O glutamato sinápticamente liberado pode ser reciclado por meio da captação por transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs) expressos predominantemente em células da glia, principalmente astrócitos, onde é convertido em Gln pela glutamina sintetase e exportado para o meio extracelular para ser captado pelos neurônios. Adicionalmente, o glutamato pode ser reciclado pelo sistema x-C cistina/glutamato também nas células da glia. Fonte: modificado de NICIU et al., 2012

O glutamato pode exercer sua ação via receptores ionotrópicos (canais iônicos ativados por ligantes) ou metabotrópicos (acoplados à proteína G). Os receptores

glutamatérgicos ionotrópicos possuem ação mais rápida e compreendem 3 diferentes classes: amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA), N-metil-D-aspartato (NMDA), e kainato. Os receptores do tipo AMPA se apresentam na forma de tetrâmeros constituídos de subunidades GluR1, GluR2, GluR3 ou GluR4 e permitem a passagem de Na^+ e K^+ . (HOLLMANN & HEINEMANN, 1994). Os receptores do tipo NMDA também se organizam na forma de tetrâmeros, podendo ser compostos pelas subunidades NR1, NR2A-D, e mais raramente, NR3A e B (ZHU & PAOLETTI, 2015). Para sua ativação, os receptores NMDA requerem a ligação do glutamato, do co-agonista glicina, e de uma despolarização na membrana para remoção do íon magnésio, que em condições de repouso bloqueia o canal (NOWAK et al., 1984; BLISS & COLLINGRIDGE, 1993). Além disso, vale ressaltar que os receptores de NMDA permitem a entrada de Ca^{2+} de forma substancial, além dos íons monovalentes. Desta forma, quando ativados, podem aumentar a concentração de Ca^{2+} intracelular, que por sua vez pode atuar como segundo mensageiro (PURVES et al., 2001). Os receptores kainato, apesar de tradicionalmente agrupados com AMPA como uma família de receptores do tipo não-NMDA, possuem características próprias e representam um grupo diferente de receptores (NICIU et al., 2012). Assim como AMPA e NMDA, esses receptores se apresentam como tetrâmeros que pode ser formados por combinações das subunidades GluR5-7 e KA1-2 (BRAGA et al., 2004). A combinação apenas das subunidades KA1 e KA2 não formam receptores funcionais (BLEAKMAN et al., 2002). Os receptores ionotrópicos de glutamato possuem grande diversidade nas suas propriedades como canais iônicos devido às diversas subunidades componentes e o perfil de expressão diferencial no sistema nervoso (NICIU et al., 2012).

Além dos receptores ionotrópicos, o glutamato também ativa receptores metabotrópicos, que, quando estimulados, levam à ativação de segundos mensageiros mediada por proteína $\text{G}\alpha$, ativação de canais iônicos mediada por $\beta\gamma$, e de vias de sinalização independentes de proteína G (CONN & PIN, 1997; GERBER et al., 2007). Os receptores metabotrópicos glutamatérgicos tem como característica em comum o sítio de ligação para glutamato, constituído por um domínio amino-terminal grande característico, homologia de sequência nas 7 hélices transmembranares e a formação

de dímeros (PIN et al., 2003). Esses receptores fazem parte da família C de GPCRs e são divididos em três grupos de acordo com a sequência (homologia) e o mecanismo de sinalização (KIM et al., 2008; NISWENDER et al., 2010). O grupo I é formado pelos receptores mGluR1 e mGluR5, que são predominantemente pós-sinápticos e acoplados à proteína $G_{\alpha q/11}$, promovendo a ativação de fosfolipase C (RIBEIRO et al., 2010). O grupo II, formado pelos receptores mGluR2 e mGluR3, bem como o grupo III, formado por mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8, se localizam predominantemente nos terminais pré-sinápticos e são acoplados à proteína $G_{\alpha i}$, levando à diminuição da produção de AMPc quando ativados. Os mGluRs de grupo II e III funcionam como auto-receptores, regulando negativamente a liberação de neurotransmissores como glutamato e GABA (PINHEIRO E MULLE, 2008).

O glutamato é removido da fenda sináptica e transportado para o citosol pelos transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs) de forma ativa contra o gradiente de concentração. Cinco tipos de EAATs já foram descritos e em sua maioria, estão presentes em astrócitos, podendo ser localizados também em terminais pré-sinápticos de neurônios (O'SHEA et al., 2002; KALIVAS, 2009). Uma vez no citosol de células da glia, o glutamato é convertido em glutamina, que pode ser transportada para os neurônios. Nos neurônios, a glutamina captada pode ser convertida novamente em glutamato e empacotada em vesículas sinápticas para serem liberadas (ERECINSKA & SILVER, 1990). Adicionalmente, o sistema de transporte xC cistina-glutamato pode promover a troca de cistina extracelular por glutamato intracelular na maior parte das células do SNC, permitindo uma liberação não-vesicular de glutamato (NICIU et al., 2012).

O sistema glutamatérgico está fortemente envolvido em importantes funções cerebrais como aprendizado e memória, e desequilíbrios nesse sistema podem estar relacionadas com doenças neurodegenerativas como esclerose lateral amiotrófica e doença de Huntington, e distúrbios neuropsiquiátricos como epilepsia, esquizofrenia e transtorno por uso de substâncias ou dependência química.

7.2 O sistema glutamatérgico na dependência de cocaína: destaque para o mGluR5

Por muitos anos o estudo da dependência química focou nos mecanismos mediados pelo sistema dopaminérgico, visto que este é considerado o principal neurotransmissor envolvido na recompensa e prazer (BERRIDGE & ROBINSON, 1998). No entanto, o envolvimento do sistema glutamatérgico no abuso de drogas vem se tornando cada vez mais evidente, e mais recentemente, diversos trabalhos tem focado na melhor compreensão do papel do sistema glutamatérgico na dependência de drogas.

Diversos estudos já mostraram que a administração de cocaína aumenta os níveis extracelulares de glutamato no NAc e na VTA (SMITH et al., 1995; REID et al., 1997; ZHANG et al., 2001; KALIVAS & DUFFY, 1998; WAKABAYASHI & KIYATCHKIN, 2012). O NAc recebe projeções glutamatérgicas importantes de áreas como o cortex pré-frontal, amígdala, hipocampo e tálamo (BROG et al., 1993). Além disso, glutamato também pode ser liberado juntamente com dopamina no NAc por neurônios dopaminérgicos da VTA (STUBER et al., 2010; HNASKO et al., 2012). Estudos mostram que a transmissão glutamatérgica cortico-estriatal está envolvida tanto na iniciação quanto na expressão de comportamentos relacionados à dependência, como sensibilização locomotora e comportamento de busca pela droga (KALIVAS, 2009). Em conjunto, essas projeções fornecem informação contextual e espacial, determinam o grau de atenção direcionado ao estímulo, inibem o comportamento impulsivo e regulam as respostas motivacionais e emocionais aos estímulos (D'SOUZA, 2015).

Diferentemente da hiperestimulação dopaminérgica aguda produzida pelo uso da droga, a vulnerabilidade persistente à recaídas tem origem em neuroadaptações de longo prazo que se desenvolvem nas projeções corticoestriatais (KALIVAS, 2009). As projeções glutamatérgicas e dopaminérgicas convergem nos neurônios espinhosos médios (MSNs) do núcleo accumbens, de modo que os *inputs* glutamatérgicos formam sinapses nas “cabeças” das espinhas dendríticas, enquanto os *inputs* dopaminérgicos se localizam no corpo das espinhas dendríticas (KALIVAS & VOLKOW, 2011). Essa organização morfológica permite que dopamina exerça uma função modulatória dos

inputs glutamatérgicos (KALIVAS & VOLKOW, 2011). Estudos apontam que a dopamina potencializa as respostas dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e atenua as respostas de receptores do tipo AMPA (CALABRESI, et al., 1997; NICOLA et al., 2000; FLORES-HERNANDEZ et al., 2002). Ainda, foi demonstrado que a ativação de D1R medeia essa potencialização de NMDAR enquanto a ativação de D2R promove efeitos contrários (WANG & O'DONNELL, 2001; WEST & GRACE, 2002). O aumento dos níveis de dopamina nas sinapses induzido por ação da cocaína e a consequente ativação de receptores D1R pré ou pós-sinápticos promove uma facilitação da transmissão glutamatérgica. A ativação de receptores D1R pré-sinápticos induz um aumento na liberação de glutamato (PIERCE et al., 1996). Adicionalmente, a ligação de dopamina em D1R pós-sinápticos regula a transmissão glutamatérgica ionotrópica via AMPA e NMDA (WOLF et al., 2003). A ligação de dopamina em D1R ativa a PKA, que promove um aumento do tráfico e inserção de AMPA e NMDA na membrana pós-sináptica (GAO & WOLF, 2007). Por outro lado, os *inputs* glutamatérgicos na VTA aumentam a atividade dos neurônios dopaminérgicos e a liberação de dopamina no NAc (TZSCHENTKE & SCHIMDT, 2000). No NAc, o glutamato também facilita a liberação de dopamina por meio da ativação de receptores pré-sinápticos que facilitam a liberação de dopamina (BLAHA et al., 1997; FLORESCO et al., 1998). A administração repetida de psicoestimulantes aumenta a arborização dendrítica e a densidade das espinhas dendríticas nesses neurônios (ROBINSON et al., 2001; LEE et al., 2006).

Dentro do sistema glutamatérgico, o receptor mGluR5, mais especificamente, vem ganhando maior destaque. Altamente expresso em áreas límbicas e corticais, o mGluR5 apresenta um alto potencial de envolvimento nos mecanismos de aprendizagem e memória envolvidos no desenvolvimento da adicção, bem como um possível papel nos aspectos de reforço e motivacionais do abuso de drogas (KENNY; MAKOU, 2004).

A ligação do agonista ao receptor mGluR5 promove a troca de GDP por GTP ativando a subunidade $G_{\alpha q/11}$ que se dissocia das subunidades $\beta\gamma$ e ativa a fosfolipase C (PLC),

que por sua vez hidroliza o fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato presente na membrana em inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol lipase (DAG) (Lefkowitz, 1998; HERMANS et al., 2001). IP3 se liga a receptores localizados no retículo endoplasmático promovendo a liberação de Ca^{2+} intracelular. O aumento concomitante de DAG e Ca^{2+} leva à ativação da proteína cinase C, que irá fosforilar diversas enzimas e fatores de transcrição que mediam os efeitos da ativação do receptor a nível celular (LEFKOWITZ, 1998; HERMANS et al., 2001, RIBEIRO et al., 2010) (figura 22).

A ativação de mGluR5 também aumenta a fosforilação de ERK1/2 e AKT. Enquanto a via IP3/ Ca^{2+} apresenta uma pequena contribuição para a ativação dessas cinases, a proteína Homer1b/c possui um papel central na ativação de ERK1/2 e AKT (MAO et al., 2005; GUHAN & LU et al., 2004). Adicionalmente, uma importante parcela dessa ativação de ERK ocorre após a internalização de mGluR5 por mecanismos dependentes de β -arrestina 2 (STOPPEL et al., 2017; CHUNG & KIM, 2017). Apesar de mecanismos diferentes, tanto os dependentes como os independentes de cálcio são necessários em conjunto para amplificar o sinal de forma suficiente a induzir alterações na transcrição gênica (MAO et al., 2005) (figura 22).

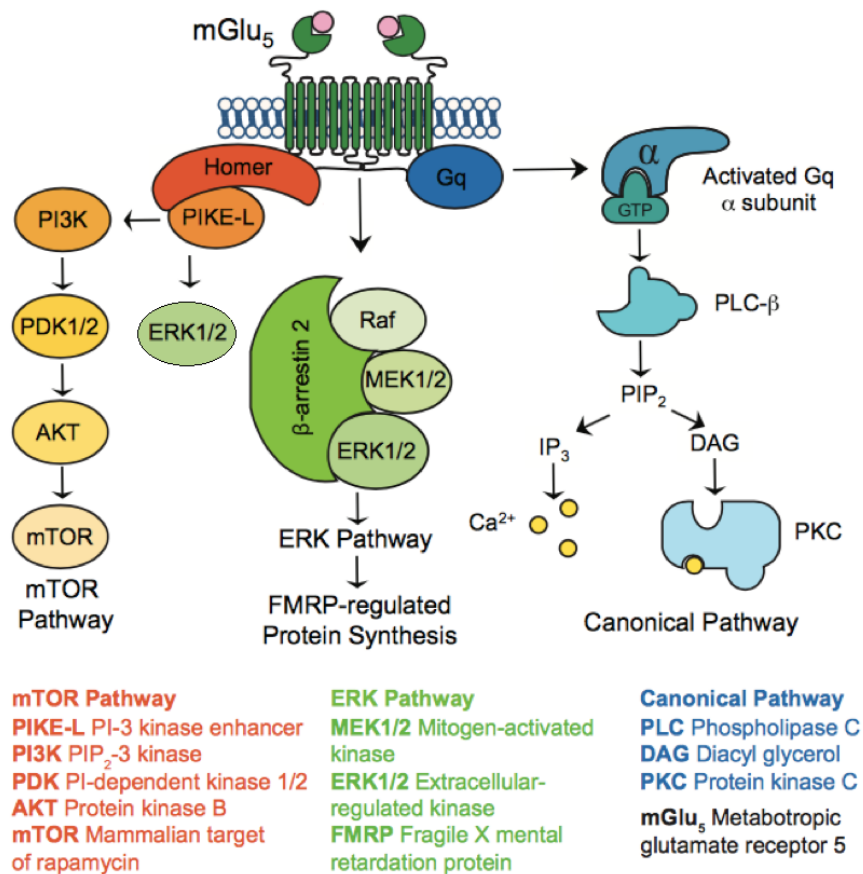


Figura 22. Vias de sinalização do receptor mGluR5. Ativação das vias PI3K-Akt-mTOR e ERK via Homer (esquerda), ativação de ERK mediada por β -arrestina 2 (meio) e a sinalização canônica por $G_{\alpha q}$ via PLC com formação de IP₃ e diacilglicerol lipase e consequente ativação da proteína cinase C (direita). Adaptado de STOPPEL et al., 2017

O desenvolvimento de ligantes sintéticos, incluindo os moduladores alostéricos negativos foi de suma importância para a caracterização desses receptores (SLASSI et al., 2005). Hoje, são também utilizados na avaliação do potencial terapêutico para diversas doenças neuropsiquiátricas. Em 1999 surgiu o 2-Methyl-6-(phenylethynyl)pyridine (MPEP) uma droga com boa solubilidade em solução aquosa, porém capaz de cruzar a barreira hematoencefálica e bloquear o mGluR5 com potência satisfatória (GASPARINI et al., 1999; OLIVE, 2009). No entanto, algumas evidências colocaram a especificidade do MPEP em questionamento (MOVSESYAN et al., 2001; MATHIESEN et al., 2003). No intuito de aumentar a seletividade e potência do MPEP,

foram sintetizados diversos análogos dessa droga. Um deles, o 3-[2-Methyl-1,3-thiazol-4-yl) ethynyl]pyridine (MTEP) atinge concentrações mais elevadas no líquido cefalorraquidiano, apresenta maior potência e maior seletividade para o mGluR5 e até o momento é bastante utilizado em estudos pré-clínicos (COSFORD et al., 2003). Mais recentemente, uma droga com propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas mais aprimoradas foi disponibilizada, o 2-chloro-4-((2,5-dimethyl-1-(4-(trifluoromethoxy) phenyl)-1H-imidazol-4-yl)ethynyl)pyridine (CTEP). CTEP é um modulador alostérico negativo no mGluR5 com propriedades de agonista inverso, que possui potência de 30 a 100 vezes maior do que o MPEP, além de excelente biodisponibilidade por via oral (LINDEMANN et al., 2011). Na última década, diversos trabalhos utilizando moduladores alostéricos negativos de mGluR5 para o estudo da dependência de cocaína foram realizados.

Uma forte evidência do envolvimento do mGluR5 na dependência de cocaína surgiu em 2001 quando Chiamulera e colaboradores demonstraram que animais nocautes para mGluR5 não auto-administravam cocaína (CHIAMULERA et al., 2001). Desde então, outros estudos surgiram com o objetivo de investigar o papel do mGluR5 em comportamentos relacionados a drogas psicoestimulantes e no desenvolvimento da adição. Estudos utilizando camundongos mGluR5 KO (nocaute) e antagonistas desses receptores em camundongos selvagens investigaram a participação do mGluR5 em diferentes paradigmas para o estudo da dependência de cocaína. Foi demonstrado que a deleção de mGluR5 ou seu antagonismo promove redução na auto-administração de cocaína, bem como da busca pela droga após a extinção desse comportamento, estimulada por pistas contextuais, stress ou administração aguda de cocaína (KENNY et al., 2005; TESSARI et al., 2004; MARTIN-FARDON & WEISS; 2012; KUMARESAN et al., 2009). Digno de nota, foi observado que a atenuação da expressão de mGluR5 (*knockdown*) especificamente em neurônios D1R positivos no estriado leva a um prejuízo no aprendizado associativo com atenuação da busca pela droga estimulada por pistas contextuais (NOVAK et al., 2010). Adicionalmente, existem trabalhos que mostram o uso de antagonistas de mGluR5 em reduzir a preferência condicionada por lugar (CPP) induzida pela cocaína. (MCGUEEHAN & OLIVE, 2003; HERZIG et al.,

2005). O envolvimento de mGluR5 em processos de extinção também já foi demonstrado por Bird et al., (2009), que observaram que camundongos deficientes em mGluR5 requerem o dobro de sessões para extinguir a preferência condicionada por lugar à cocaína quando comparados com camundongos selvagens, e um efeito semelhante foi observado com a administração de MTEP no estriado dorsal (KNACKSTEDT et al., 2014).

Apesar de muitos estudos apresentarem um papel importante do receptor mGluR5 nesses comportamentos, e, portanto, sugerirem o bloqueio desse receptor como uma potencial estratégia terapêutica no tratamento da adição, dados divergentes também já foram relatados (FOWLER et al., 2011; VEENEMAN et al., 2010; HERZIG & SCHIMDT, 2004; RUTTEN et al., 2011). Portanto, a literatura acerca dessa relação do mGluR5 com os efeitos da cocaína é diversa e os mecanismos pelos quais esse receptor pode mediar aspectos da dependência química ainda não estão bem elucidados.

A participação de proteínas que regulam o tráfico e a sinalização de mGluR5 nas respostas à cocaína mediadas por esse receptor vem sendo mais recentemente investigadas. Um exemplo é a proteína homer, que já foi associada às adaptações que ocorrem durante a abstinência (KNACKSTEDT et al., 2010). Foi demonstrado um aumento nos níveis de Homer acompanhado de diminuição da expressão de mGluR5 na membrana, o que foi sugerido como uma adaptação compensatória que inibe recaídas, fato que é corroborado pela observação de que a redução da expressão de homer, ao contrário, promove a auto-administração (KNACKSTEDT et al., 2010; SZUMLINSKI et al., 2006). Recentemente foi demonstrada a participação de uma outra proteína na regulação da atividade de mGluR5, a proteína *spinophilin*, aqui referida como espinofilina. O possível envolvimento da espinofilina no papel do receptor mGluR5 na dependência à cocaína é um dos objetos de estudo do presente trabalho.

7.3 Espinofilina

A espinofilina, também conhecida como *neurabin-2* é uma proteína *scaffold* multifuncional que apesar de ser expressa de forma ubíqua, é enriquecida na “cabeça” das espinhas dendríticas, razão pela qual foi chamada *spinophilin* - aqui referida como espinofilina (SATO, et al., 1998). Inicialmente, a espinofilina foi descrita como uma proteína de interação com a proteína fosfatase 1 (PP1) (ALLEN et al., 1997) e com a forma filamentosa da actina (F-actina) (NAKANISHI et al., 1997). Hoje, já foram identificadas mais de 30 proteínas que interagem com a espinofilina, incluindo moléculas do citoesqueleto e envolvidas com adesão celular, enzimas, receptores de membrana, canais iônicos, e moléculas envolvidas na proliferação celular como o fator supressor tumoral ARF (SARROUILHE et al., 2006).

Quanto à sua estrutura, a espinofilina apresenta peso molecular previsto de 89,5 kDa, porém, se apresenta no SDS-PAGE como aproximadamente 130 kDa, por razões ainda desconhecidas (SARROUILHE et al., 2006). A estrutura da espinofilina contém um domínio de ligação com a F-actina, um sítio de interação com a PP1, um domínio PDZ (PSD95/Disc Large/zona ocludens-1) e uma região de formação de super hélice (coiled-coil), conforme representado na figura 22 (VIVO et al., 2001; SARROUILHE et al., 2006) (Figura 23). A homologia desses domínios entre diferentes espécies é de 50% para o domínio de ligação com F-actina, 80% para o domínio de ligação com PP1, 90% para a região PDZ e 70% para o coiled-coil (SARROUILHE et al., 2006).

A espinofilina contém sítios para fosforilação por diversas proteínas cinases, que podem ser fonte de regulação para a interação de outras proteínas com a espinofilina (STEPHENS et al., 1999; FUTTER et al., 2005). Sítios de fosforilação para PKA foram identificados na Ser-94 e Ser-177 (HSIEH-WILSON et al., 2003) e para CaMKII nas Ser-100 e Ser-116 no mesmo domínio (GROSSMAN et al., 2005). Além disso, a região amino-terminal da espinofilina pode ser fosforilada por Cdk5 na Ser-17 e ERK2 nas Ser-15 e Ser-205 (Ser-15 apenas em células não neuronais). Ainda, existem dois sítios

potenciais de fosforilação da espinofilina na região da super hélice e mais dois na região adjacente ao domínio PDZ (SARROUILHE et al., 2006).

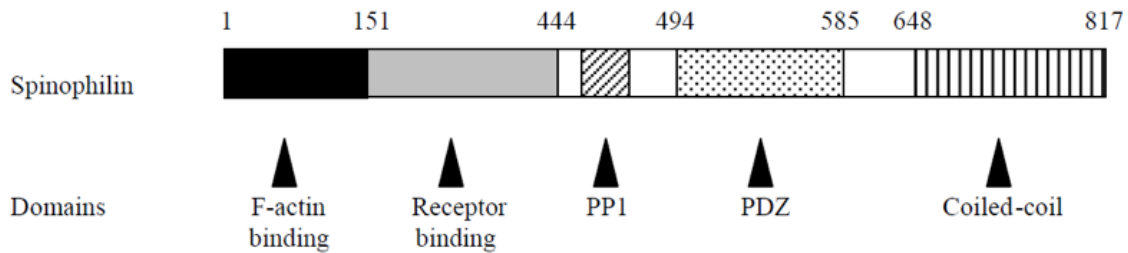


Figura 23. Representação dos domínios contidos na estrutura da espinofilina. Da esquerda para direita: sítio de ligação com F-actina, domínio de ligação com receptores, sítio de interação com PP1, domínio de ligação com proteínas PDZ, e região de super-hélice. Fonte: Sarruilhe et al., 2011.

A espinofilina interage com diversas proteínas que são altamente expressas nas espinhas dendríticas (ALLEN et al., 1997; SATOH, et al., 1998). Entre elas, destaca-se a actina, uma proteína importante para a formação, manutenção e morfologia das espinhas dendríticas (FISCHER et al., 1998). Foi demonstrado *in vitro* que a espinofilina promove as ligações cruzadas entre os filamentos de actina, sugerindo um papel da espinofilina na organização do citoesqueleto nas espinhas dendríticas (SATOH, et al., 1998). A maioria das sinapses excitatórias ocorrem nas espinhas dendríticas, protruções pós-sinápticas ricas em actina (NIMCHISNKY ET AL., 2002; HARRIS et al., 1994). O desenvolvimento e a plasticidade das espinhas dendríticas medeiam processos como aprendizagem e memória e, portanto, são importantes para o funcionamento cognitivo normal (EVANS et al., 2015).

FENG et al., (2000) observaram que camundongos jovens (P15) nocautes para espinofilina apresentam maior número de espinhas dendríticas do que animais selvagens, e que essa diferença é abolida após atingirem idade adulta. Com isso, os autores levantam a hipótese de que durante o desenvolvimento normal a espinofilina facilita a retração ou suprime o crescimento anormal dos filopódios e espinhas

dendríticas. Mais recentemente, foi demonstrado que a espinofilina desempenha um papel chave na modulação das espinhas dendríticas por meio da sua interação com Asef2, uma proteína da família Rho que promove a formação de espinhas dendríticas e sinapses (EVANS et al., 2015). Nesse estudo, foi demonstrado que a espinofilina recruta Asef2 para as espinhas dendríticas, e o que o silenciamento da espinofilina promove uma diminuição no número de espinhas dendríticas e na densidade sináptica (EVANS et al., 2015).

A literatura mostra que alterações na atividade sináptica podem causar alterações morfológicas nas espinhas dendríticas (MALETIC-SAVATIK et al., 1999; HARRIS, 1999; ENGERT et al., 1999). Por outro lado, sabe-se também que adaptações morfológicas nas espinhas dendríticas promovem efeitos proeminentes nas propriedades elétricas e bioquímicas dessa região, e, desta forma, regulam a eficácia da transmissão sináptica (DENK et al., 1996; FISCHER et al., 1998; YUSTE et al., 1999). Estudos revelam que a PP-1, é capaz de modular a atividade de diversos canais iônicos, incluindo os receptores glutamatérgicos AMPA e NMDA, e a espinofilina participa desse processo por ancorar a PP1 em proximidade a esses receptores (YAN et al., 1999; FENG et al., 2000). Utilizando *whole-cell patch-clamp* de neurônios estriatais, Feng et al. 2000 demonstraram que a redução (*run down*) das correntes de receptores AMPA mediada por PP1 observada em animas selvagens foi deficiente nos nocautes. Dessa forma, revelou-se que na ausência de espinofilina, receptores AMPA não estão mais sujeitos à *down-regulation* pela PP1, o que resulta em correntes AMPA mais persistentes (FENG et al., 2000). Em concordância, camundongos nocaute para espinofilina apresentam LTD deficiente, observação que corrobora estudos que demonstram que a PP1 é necessária para LTD (MULKEY et al., 1993; MULKEY et al., 1994). A LTD induzida por estimulação de mGluR5 também é deficiente em camundongos espinofilina-KO (DI SEBASTIANO et al., 2016). Por outro lado, a deleção da espinofilina não afeta a LTP, que por sua vez não é dependente de PP1 (MULKEY et al., 1993; FENG et al., 2000).

Considerando o envolvimento da espinofilina na plasticidade sináptica e neuronal, e a sua interação com receptores glutamatérgicos de grupo 1 e com o receptor

dopaminérgico D2, é possível que a espinofilina esteja envolvida em mecanismos moleculares relacionados com a adição à cocaína.

7.4 Interação da espinofilina com mGluR5 e D2R e possível papel na dependência de cocaína

Além de participar da regulação de receptores ionotrópicos, a espinofilina interage com receptores acoplados à proteína G. Estudos mostram que a espinofilina se liga aos receptores α 2-adrenérgico, μ -opióide, mGluRs de grupo 1 (mGluR1 e mGluR5) e receptor dopaminérgico D2R (WANG et al., 2004; CHARLTON et al., 2008; SMITH et al., 1999; DI SEBASTIANO et al., 2016).

Di Sebastiano et al., (2016) demonstraram que a espinofilina interage com os receptores mGluR5 e mGluR1 na extremidade C-terminal e no segundo loop intracelular, e investigou efeitos dessa interação na regulação e sinalização desses receptores. Utilizando cultura primária de neurônios corticais de camundongos selvagens e nocautes, foi demonstrado que a deleção da espinofilina aumenta a internalização de mGluR5 estimulada por agonista, bem como a fosforilação de ERK1/2 e AKT, e os níveis de Ca^{2+} intracelular. Ainda, foi observado que esses efeitos requerem a presença do domínio de ligação PDZ, mas não o de PP1 (DI SEBASTIANO et al., 2016).

Outro GPCR de interesse para a dependência à cocaína com a qual a espinofilina interage é o receptor dopaminérgico D2R (SMITH et al., 1999). Foi demonstrado que a espinofilina se liga ao terceiro loop citoplasmático de D2R, e essa interação ocorre numa região distinta do domínio de ligação com actina, domínio PDZ ou região *coiled-coil* (SMITH et al., 1999). Além disso, a região de interação com D2R também é distinta do sítio de interação com a PP1, dessa forma, a espinofilina pode se ligar à D2R e à PP1 ao mesmo tempo (SMITH et al., 1999). Adicionalmente, essa interação não parece ser mediada pela inserção de 29 aminoácidos presente na isoforma longa do receptor

D2R, visto que já foi demonstrado que tanto D2S quanto D2L interagem com a espinofilina (SMITH et al., 1999).

Apesar da ligação da espinofilina ao terceiro loop citoplasmático do receptor D2R ser bem estabelecida, as consequências dessa interação ainda não estão bem descritas. Hipotetiza-se que a espinofilina seja importante no estabelecimento de um complexo que medeia a conexão dos receptores D2R às moléculas de sinalização bem como ao citoesqueleto via actina (SMITH et al., 1999).

É possível que a espinofilina promova ações semelhantes às aquelas observadas em $\alpha 2AR$, um receptor metabotrópico adrenérgico acoplado à G_i , com terceiro loop citoplasmático semelhante ao D2R. Em relação aos receptores $\alpha 2AR$, a espinofilina compete com a GRK2 para ligação ao complexo receptor- $G\beta\gamma$, reduzindo a fosforilação desse receptor e antagonizando as funções da β -arrestina 2, reduzindo, portanto, a endocitose e a aceleração da atividade de MAPK pós-endocitose (WANG et al., 2004; WANG & LIMBIRD, 2007). Por outro lado, foi demonstrado que a interação da espinofilina com o receptor μ -opióide aumenta a internalização do receptor estimulada por agonista, mas não afeta a ativação de ERK1/2 ou os níveis de AMPc (CHARLTON et al., 2008; FOURLA et al., 2012).

Considerando o envolvimento da espinofilina na morfologia e densidade das espinhas dendríticas, na regulação da neurotransmissão glutamatérgica e plasticidade sináptica, e a interação com receptores dopaminérgicos D2R, é possível que a espinofilina participe de processos que mediem o desenvolvimento da dependência de cocaína. Dois estudos na literatura fornecem evidências para essa relação. O aumento da expressão de espinofilina após auto-administração de cocaína por macacos foi observado por MCINTOSH et al., (2013). Adicionalmente, ALLEN et al. (2006) sugeriram que camundongos nocautes para espinofilina seriam mais sensíveis aos efeitos da cocaína, visto que efeitos comportais no campo aberto e na preferência condicionada por lugar foram observados em uma dose que não foi efetiva em camundongos selvagens. Todavia, a literatura acerca do envolvimento da espinofilina

na dependência ainda é escassa. Portanto, se fazem necessários mais estudos que sustentem essas evidências, investigando diferentes paradigmas comportamentais bem como os possíveis mecanismos bioquímicos e moleculares que medeiam esses processos.

8 OBJETIVOS

8.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da modulação alostérica negativa de mGluR5 e o papel da proteína espinofilina na dependência de cocaína.

8.2 Objetivos específicos

- Avaliar o envolvimento de mGluR5 e da espinofilina na sensitização comportamental e na preferência condicionada por lugar à cocaína;
- Avaliar o efeito do antagonismo de mGluR5 pela droga CTEP) nos paradigmas avaliados, na presença e na ausência da proteína espinofilina;
- Investigar o efeito do CTEP e da deleção da espinofilina na expressão gênica e protéica de receptores dos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico;
- Investigar o efeito do antagonismo de mGluR5 e da deleção da espinofilina na sinalização celular em resposta à cocaína;
- Relacionar os dados bioquímicas e moleculares com os comportamentos relacionados à dependência de cocaína avaliados.

9 MATERIAIS E MÉTODOS

9.1 Animais e grupos experimentais

Foram utilizados ao todo 199 camundongos, incluindo animais das linhagens C57BL/6 e nocautes para espinofilina de 70 a 90 dias de idade. Os camundongos espinofilina KO foram inicialmente doados pelo Dr. Paul Greengard (Rockefeller University, Nova Iorque) e a partir destes uma colônia própria foi estabelecida. Os animais foram criados no biotério central da Universidade de Ottawa, onde foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12/12h com água e ração *ad libitum*, a 24 °C em estantes ventiladas. Todos os procedimentos realizados foram previamente aprovados pelo uOttawa Animal Care Committee sob protocolo de número #CMM-2519.

Camundongos dos tipos selvagem e nocaute (KO) para espinofilina foram subdivididos em 4 grupos, os quais receberam salina, cocaína (15mg/Kg), CTEP (1mg/Kg) ou cocaína (15mg/Kg) + CTEP (1mg/Kg) por via intraperitoneal, resultando em 8 grupos experimentais: salina-wt, salina-KO, cocaína-wt, cocaína-KO, CTEP-wt, CTEP-KO, cocaína+CTEP-wt, cocaína+CTEP-KO). Cada animal foi submetido a apenas um dos dois experimentos comportamentais realizados: sensitização comportamental ou preferência condicionada por lugar. Ao final dos experimentos comportamentais, os animais foram sacrificados e a região do estriado dissecada para posteriores análises moleculares e bioquímicas.

9.2 Curva dose-resposta

O padrão de resposta das duas drogas a serem utilizadas foi inicialmente avaliado no intuito de direcionar a escolha das doses experimentais. Para isso, foram realizadas curvas dose-resposta para cocaína e CTEP com base na atividade locomotora dos animais. As doses de cocaína utilizadas foram 0,3, 1, 3, 10 e 30 mg/Kg enquanto as

doses de CTEP foram 0.06, 0.2, 0.6, 2 e 6 mg/Kg. As doses escolhidas para a curva foram baseadas na literatura e seguiram padrão de diluição de aproximadamente meio log.

Os animais foram previamente habituados ao aparato por 30 minutos, e após injeção, foram colocados novamente no campo aberto e a atividade locomotora foi medida durante 1h. Os testes foram filmados e os dados foram analisados com auxílio do software EthoVision XT 13.0 (Noldus).

9.3 Protocolo de sensitização comportamental

O protocolo utilizado foi constituído de 4 fases, conforme descrito abaixo e demonstrado em figura representativa (SAKAE et al., 2015; fig. 24):

- i) **Habituação:** os animais foram injetados com salina e imediatamente submetidos ao teste de campo aberto, a fim de se habituarem às injeções e se familiarizarem com o aparato, estabilizando a linha de base antes dos tratamentos serem iniciados.
- ii) **Desenvolvimento da sensitização comportamental:** os animais receberam injeções com as drogas designadas dependendo do grupo ao qual pertencem e imediatamente testados no campo aberto por 30 minutos 1 vez ao dia por 5 dias consecutivos.
- iii) **Abstinência:** os animais foram mantidos em suas gaiolas sem receber nenhum tipo de droga ou teste por um período de 5 dias.
- iv) **Desafio:** os animais foram novamente injetados com as mesmas drogas utilizadas previamente e testados no campo aberto por 30 minutos para avaliar a expressão da sensitização comportamental.

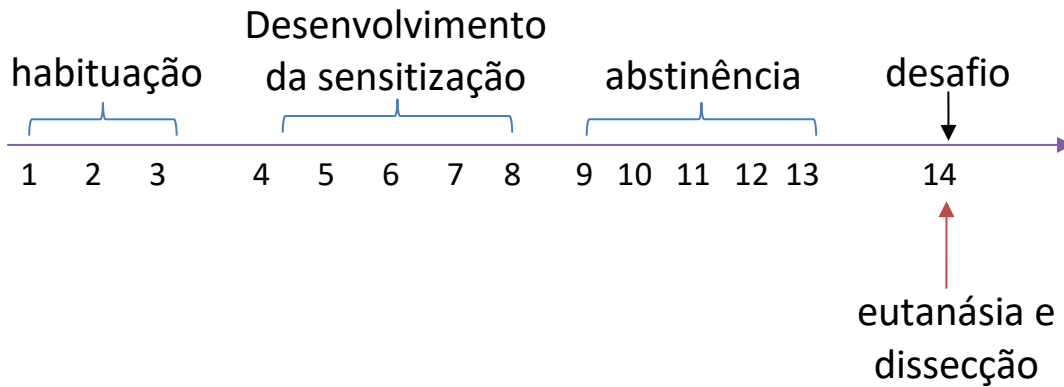


Figura 24. Protocolo de sensibilização comportamental

Todas as sessões foram filmadas e os dados foram analisados com auxílio do software EthoVision XT 13.0 (Noldus).

9.4 Preferência condicionada por lugar (CPP)

O experimento foi realizado em caixas de acrílico de 27.3 x 27.3 x 20.3 cm dividida em dois ambientes, equipada com sensores de infra-vermelho e acoplada a um computador com software próprio para o equipamento (Med Associates Inc.). Os dois lados da caixa foram customizados de forma a gerar 2 ambientes diferentes (figura 25), separados por uma porta removível do tipo guilhotina.



Figura 25. Equipamento utilizado para o teste da preferência condicionada por lugar. Fonte: arquivo próprio

O protocolo para o teste de preferência condicionada por lugar consistiu em 3 fases:

1) habituação: no primeiro dia de experimento, os animais foram colocados no aparato com a porta divisória aberta e foram permitidos explorar ambos os ambientes livremente por 20 minutos.

2) condicionamento: nessa fase, os animais receberam injeções de forma associada a um determinado ambiente, sendo confinados em um determinado lado da caixa após injeção de salina, ou no lado oposto da caixa após injeção de uma das drogas de acordo com seus respectivos grupos (salina, cocaína, CTEP, cocaína+CTEP). O condicionamento foi feito em dias alternados durante 6 dias consecutivos, conforme esquema abaixo (figura 26). De modo a evitar interferência de uma possível preferência natural por um dos lados, metade dos animais de cada grupo teve o lado A pareado com a droga enquanto a outra metade teve o lado B associado à droga.

3) teste: no oitavo dia do experimento, a porta divisória foi novamente removida e os animais, sem receber injeção de nenhuma das drogas, puderam explorar livremente ambos os lados da caixa durante 20 minutos. A preferência condicionada por lugar foi avaliada pela diferença entre o tempo despendido no lado associado à droga e no lado associado à salina.

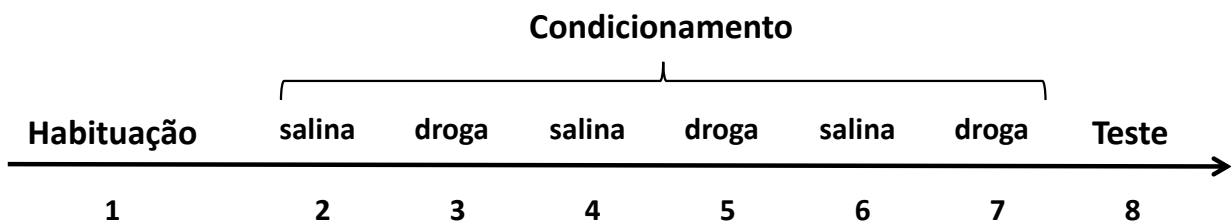


Figura 26. Delineamento experimental para o teste de preferência condicionada por lugar.

9.5 SDS-PAGE e western blot

As amostras de estriado, previamente acondicionadas em freezer a -80°C , foram trituradas em tampão RIPA (NaCl 150 mM, EDTA 5mM, Tris base 50 mM, NP-40 1%,

deoxicolato de sódio 0.5%, SDS 0.1% em água) e mantidas em rotação a 4°C por 30 min para extração das proteínas. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 12.000 xg por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas no sobrenadante foi determinada por método de Lowry modificado utilizando o kit DC™ Protein Assay (Bio rad). As amostras foram diluídas em tampão de amostra 3x, e aquecidas a 55 °C por 5 minutos. 25ug de proteínas foram separadas em SDS-PAGE. Ao final da eletroforese, foi montando um “sanduíche” formado por papéis de filtro de alta espessura, uma membrana de nitrocelulose de 0.45um e o gel recém resolvido, umedecidos em tampão de transferência 5x Transfer Buffer (Bio rad) diluído para 1x. A transferência foi realizada por meio do equipamento Trans-Blot® Turbo™ (Bio rad) utilizando 2.5A e voltagem de até 25V por 10-15 dependendo do peso molecular da proteína alvo. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com TBS-T contendo 10% de leite em pó desnatado por 1h e então incubadas com anticorpo primário diluído em TBS-T contendo 3% de leite em pó desnatado durante aproximadamente 12h. Em seguida, as membranas foram lavadas 3x com TBS-T por 5 minutos e incubadas com anticorpo secundário diluído em leite em pó desnatado por 2 horas. O processo de lavagem foi repetido, porém a última lavagem foi realizada com TBS. Para a detecção por quimioluminescência, as membranas foram incubadas com o reagente Clarity Western ELC substrate (Bio rad) por alguns minutos e as imagens foram adquiridas no equipamento ChemiDoc™ (Bio rad). A quantificação foi realizada por meio do software ImageLab (Bio rad).

9.6 PCR quantitativa em tempo real

9.6.1 Extração de RNA

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 ressuscitado em 30 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).

9.6.2 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.

9.6.3 PCR quantitativa em tempo real

As amostras de cDNA obtidas foram submetidas à reação de PCR em tempo real utilizando o equipamento CFX398 Real Time PCR (Biorad) e o kit Luna Universal qPCR Mastermix (New England Biolabs). Em suma, as reações foram preparadas em um volume total de 8µL contendo 4 µL de Luna Mastermix 2x, 2 µL de água purificada, 0,5µL de cada iniciador a 10µM e 1 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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando a expressão de GAPDH para normalização dos dados. Os *primers* utilizados tiveram a eficiência de amplificação avaliada, apresentaram desempenho satisfatório, e as sequências estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Sequências dos primers utilizados na qPCR.

Gene	NCBI Refseq	Sequência (5' - 3')	Tamanho do fragmento (pb)
D1R	NM_010076.3	F: CCAAGAACGTGAGGGCTAAG R: TGAGGATGCGAAAGGAGAAG	120
D2S	XM_006509996.3	F: TGCAGTGTTAGCTTGGCTCG R: GTGAAAGGGGCACTCTGTGA	138
D2L	NM_010077.2	F: CCACTCAAGGGCAACTGTACC R: TGACAGCATCTCCATTTCCAG	143
mGluR5	NM_001143834.1	F: AGTCATTTACCTAAAGCCCGG R: CTTCTCGCTGATACCCATCTG	166
NR2A	NM_008170.2	F: ATGACTATTCTCCGCCTTTCC R: AGTTTACAGCCTTCATCCCTC	220
NR2B	NM_008171.3	F: GAACGAGACTGACCCAAAGAG R: CAGAAGCTTGCTGTTCAATGG	248
Barr-2	NM_001271358.1	F: CCACCCGAGATACACACTGG R: GCCAAACATGGGCGTTCTTT	188
DARPP-32	NM_144828.2	F: CCCAGAACTCGGCGTTGTAT R: GCGAAGAGGTTAAAGCCAGA	101
DeltaFosB	NM_001347586.1	F: TGCAGCTAAGTGCAGGAACCGT R: GAGGACTTGAACCTCACTCGGCCA	224
espinofilina	NM_172261.3	F: CAGGGTGTGTGGAGATTCCC R: AGCTCATATTCCGCAGAGGC	169

GAPDH NM_001289726.1

F: CCTCGTCCCGTAGACAAAATG

194

R: TTGACTGTGCCGTTGAATTTG

9.7 Cultura primária de neurônios

Os cérebros de embriões no estágio E15 foram dissecados em tampão HBSS, submetidos à digestão por tripsina (3% em HBSS) em banho-maria a 37 °C, tratados com DNase (10% em HBSS) e dissociados com auxílio de uma pipeta. Em seguida, os neurônios foram plaqueados em placas de 6 poços contendo lamínulas previamente tratadas com poli-L-ornitina contendo meio Neurobasal completo (Neurobasal, 0,25% de GlutaMAX, 1% de N2, 2% de B27 e penicilina+estreptomicina 50ug/mL). As culturas foram mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ por 14 dias e o meio foi parcialmente renovado a cada 4 dias.

9.8 Imunofluorescência em cultura primária de neurônios

Para a imunofluorescência, os neurônios foram inicialmente lavados com PBS e fixados com solução de paraformaldeído 4% em PBS por 15 minutos. Em seguida, os neurônios foram tratados com solução permeabilizante (triton 0.2% em PBS) por 5 minutos, e então com solução de bloqueio (BSA 3% em PBS) por 30 minutos. A seguir, os neurônios foram incubados com anticorpo primário coelho anti- D2R ou coelho anti-mGluR5 (1:500 em PBS contendo 1% de BSA e 0,1% de tween) *overnight* a 4 °C. Após a incubação, as células foram lavadas 3X com PBS e incubadas com anticorpo secundário burro anti-coelho Alexa Fluor 647 (1:500 em PBS contendo 1% de BSA e 0,1% de tween) por 2h à temperatura ambiente. Em seguida, os neurônios foram lavados 3X com PBS e bloqueados novamente com 5% soro de cabra e 1% de BSA em PBS por 30 minutos. Então, foram realizadas uma incubação com anticorpo primário coelho anti-espinofilina (1:800 em PBS contendo 1% de BSA e 0,1% de tween) por 2h, 3 lavagens com PBS, e incubação com anticorpo secundário cabra anti-coelho Alexa

Fluor 488 por 1h à temperatura ambiente. Então, os neurônios foram lavados e incubados com Hoescht para marcação do núcleo por 10 min. Por fim, as lamínulas foram montadas em lâminas utilizando meio conservante ProLong Gold Antifade Mountant (ThermoFisher) e seladas. As imagens foram adquiridas utilizando o microscópio Zeiss LSM880 AxioObserver Z1 com os filtros 405 para Hoescht (azul), 488 para espinofilina (verde) e 639 para D2R e mGluR5 (vermelho).

9.9 Imunohistoquímica em tecido cerebral

Os cortes foram lavados com PBS e tratados com solução de peróxido de hidrogênio a 0,3% em PBS por 30 minutos à temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes com PBS por 5 minutos. Então, os cortes foram incubados com solução permeabilizante de triton X-100 a 0,3% em PBS por 10 minutos. A seguir, foi feito o bloqueio das amostras com solução contendo 2,5% de soro de cabra por 30 minutos à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as amostras foram incubadas *overnight* com anticorpo primário coelho anti-c-Fos (1:200) em solução contendo 1,5% de soro de cabra + 0,1% de triton X-100 a 4°C sob agitação. No dia seguinte, foram feitas três lavagens de 5 minutos cada com PBS. Então, os cortes foram incubados com anticorpo secundário burro anti-coelho biotinilado (1:500 em PBS contendo 1% de soro de cabra + 0,1% de triton X-100) por 90 minutos à temperatura ambiente sob agitação. Os cortes foram submetidos a três lavagens com PBS e então incubados com solução ABC do kit VECTASTAIN® Elite® ABC-HRP Kit (Vector Laboratories) por 90 minutos a 4°C sob agitação. Os cortes foram lavados três vezes por 5 minutos, revelados por incubação com o substrato de peroxidase Vector® SG substrate (Blue-Gray) por 5 minutos, lavados com água destilada e montados nas lâminas para microscopia. As imagens foram adquiridas utilizando o microscópio Zeiss LSM880 AxioObserver Z1 e quantificação foi realizada com auxílio do software ImageJ. Foram quantificadas 3 áreas de cada corte, sendo 5 cortes de cada cérebro, de 2 a 3 cérebros por grupo.

9.10 Análise estatística

Os dados foram analisados por meio da ANOVA de duas vias seguido de *post-hoc* LSD de Fisher para comparações múltiplas. Para análise da sensitização comportamental, exclusivamente, utilizou-se ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Bonferroni. Os dados foram representados como média \pm erro padrão, e o nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

10 RESULTADOS

10.1 Curvas dose-resposta para cocaína e CTEP

A fim de avaliar o padrão de resposta das duas drogas utilizadas de modo a nortear a escolha das doses experimentais, foram realizadas curvas dose-resposta baseadas na atividade locomotora para cocaína e CTEP (Figura 27).

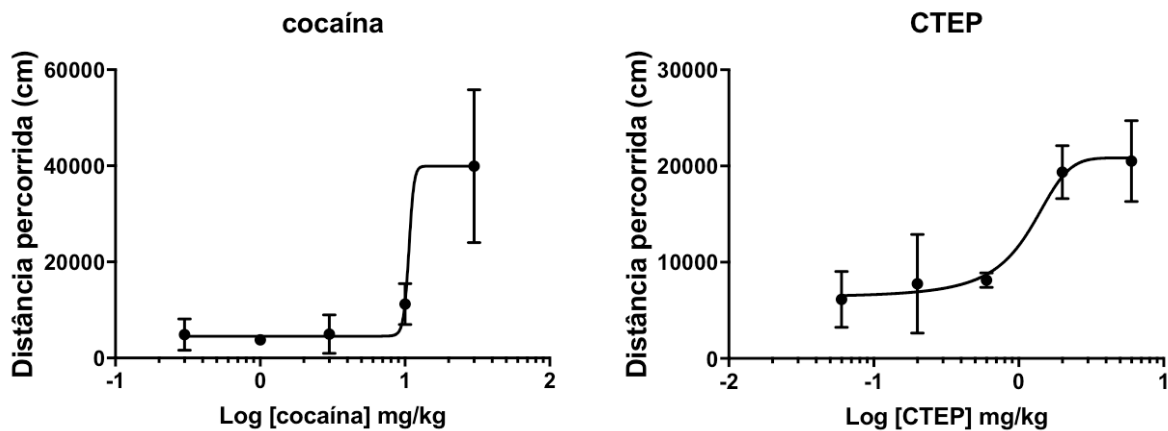


Figura 27. Curvas de dose-resposta para cocaína e CTEP em camundongos selvagens. Dados expressos como Média \pm erro padrão de 3 animais cada.

A DE50 observada para cocaína foi de 10,63 mg/Kg e para o CTEP foi de 1,16 mg/Kg. Apesar de ter sido observada hiperlocomoção de forma dose-dependente para ambas as drogas, pode-se notar que o efeito obtido pela dose máxima de CTEP utilizada equivale a aproximadamente metade do observado na dose máxima de cocaína, demonstrando que o efeito estimulante da cocaína na locomoção é muito maior do que o promovido pelo CTEP. Os dados das curvas-dose resposta foram utilizados para a escolha das doses a serem utilizadas no experimento de sensibilização comportamental. A fim de poder ser observado um efeito considerável para cada droga e ainda permitir a manipulação deste para mais ou para menos pelas diferentes condições experimentais, optou-se por uma dose logo acima da DE50. Desta forma, foram selecionadas as doses de 15 mg/Kg de cocaína e 1,5 mg/Kg de CTEP.

10.2 Efeito do CTEP e da espinofilina na sensibilização comportamental à cocaína

Avaliando-se o efeito agudo das drogas utilizadas, por meio da primeira sessão do experimento (Figura 28), pode ser observado que a administração de cocaína provocou hiperlocomoção tanto em camundongos selvagens quanto KO para espinofilina ($p < 0,001$ para ambos, em relação ao grupo salina-wt). A administração de CTEP resultou em hiperlocomoção em camundongos KO, sem afetar a locomoção em camundongos selvagens ($p = 0,0386$ e $p = 0,5482$, respectivamente, em relação ao grupo salina-wt). Em relação ao tratamento combinado, cocaína+CTEP, este promoveu hiperlocomoção tanto em camundongos selvagens ($p < 0,001$) como KO ($p < 0,001$). Adicionalmente, foi observado que a hiperlocomoção foi mais exacerbada nos camundongos KO, sendo significativamente maior do que a produzida pela cocaína isoladamente ($p < 0,001$).

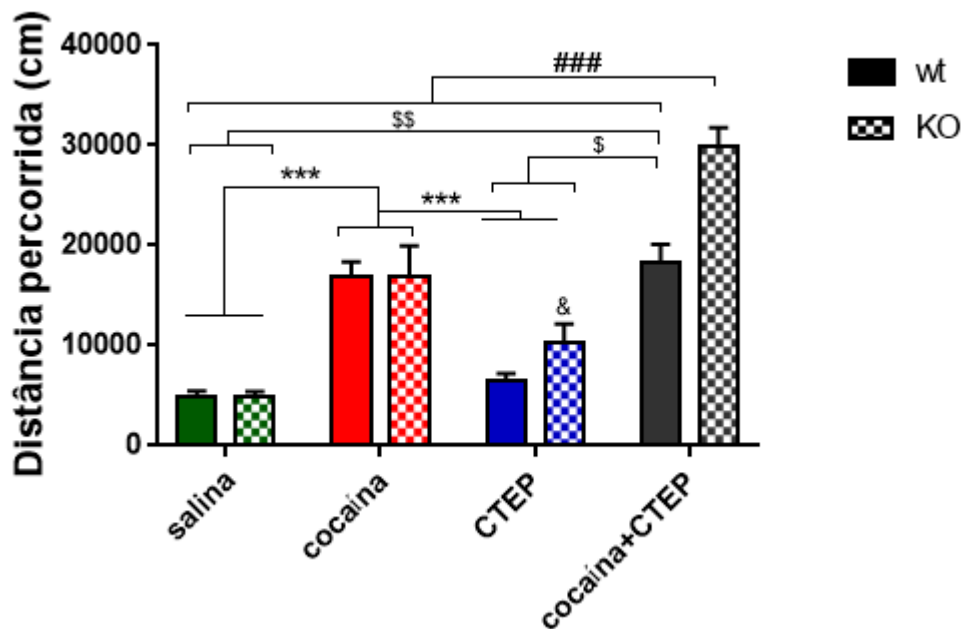


Figura 28. Efeito agudo da administração de cocaína, CTEP, ou ambos, em camundongos KO ou selvagem. Dados expressos como média \pm erro padrão. ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de *post hoc* de Tukey. *** $p < 0,001$ em relação à cocaína-wt e cocaína-KO, ### $p < 0,001$ em relação ao grupo cocaína+CTEP-KO, & $p < 0,05$ comparado ao CTEP-wt, \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo cocaína+CTEP-wt, $n = 11-13$.

Na figura 29 podemos observar o comportamento de cada grupo experimental ao longo do experimento de sensibilização. Ao comparar a atividade locomotora dos animais no último dia de tratamento com a exibida no desafio, não se observou diferença em nenhum dos grupos, incluindo o grupo cocaína-wt. É provável que, com as doses utilizadas, no quinto dia de teste o efeito máximo já havia sido atingindo. Com isso, optamos por avaliar o resultado final do protocolo de sensibilização (desafio) em comparação com a resposta à primeira exposição às respectivas drogas. Ao compararmos a atividade locomotora exibida na primeira exposição às drogas com a do desafio (Figura 30), podemos observar, conforme esperado, um aumento na resposta para o grupo cocaína-wt ($p < 0,0001$), no entanto, esse efeito não foi observado no grupo cocaína-KO ($p = 0,1383$). Não foi observado alteração em resposta ao CTEP nos animais selvagens ou KO ($p > 0,9999$ para ambos). O grupo cocaína+CTEP-wt apresentou uma resposta semelhante à observada para o grupo cocaína-wt, com um aumento significativo da atividade locomotora do momento do desafio em comparação ao primeiro dia de teste ($p < 0,0001$). Já para o grupo cocaína+CTEP-KO esse efeito não foi significativo ($p = 0,0908$) [ANOVA de duas vias com medidas repetidas, fator tempo: $F(1, 78) = 44.25$ $p < 0.0001$; fator grupos: $F(7, 78) = 32.29$ $p < 0,0001$; interação: $F(7, 78) = 5.074$ $p < 0,0001$; matching: $F(78, 78) = 3.132$ $p < 0,0001$].

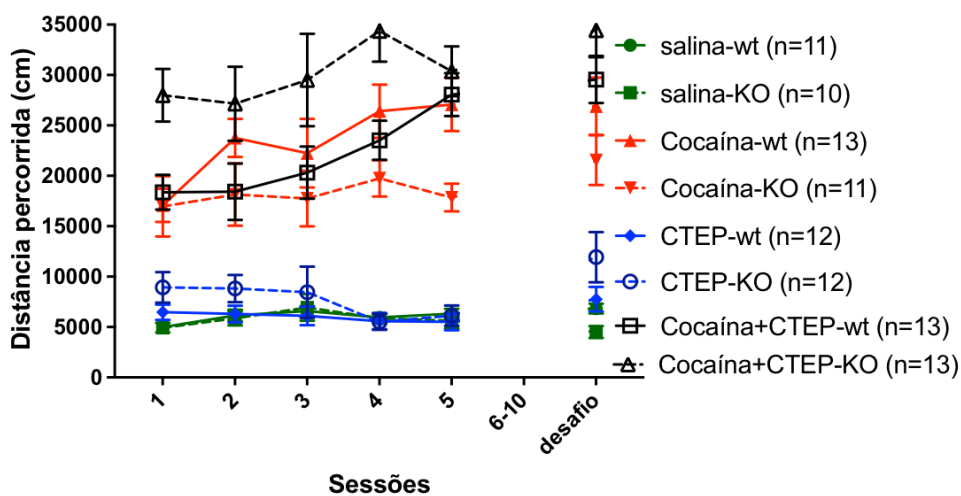


Figura 29. Experimento de sensibilização comportamental ao longo das sessões. Observa-se que os animais do grupo cocaína+CTEP-KO mantém locomoção acentuada observada na primeira sessão. Ainda, destaca-se a comparação entre os grupos cocaína-wt e cocaína-KO. Pode ser observado que o aumento progressivo da atividade locomotora observado nos animais selvagens não ocorre nos animais nocaute. Dados apresentados como média \pm erro padrão.

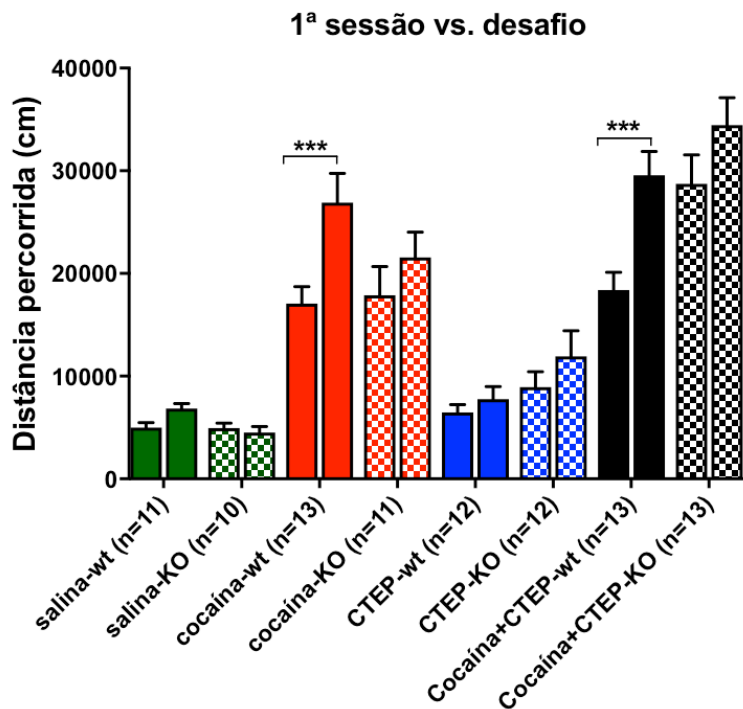


Figura 30. A ausência da proteína espinofilina bloqueia o desenvolvimento da sensitização à cocaína. Dados expressos como média \pm erro padrão. ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de pós-teste de Bonferroni, *** $p < 0,001$.

10.3 Preferência condicionada por lugar (CPP)

No teste de preferência condicionada por lugar, foi observado que os animais tratados com cocaína desenvolveram preferência pelo ambiente pareado com a droga, permanecendo significativamente mais tempo no lado da caixa previamente associado à cocaína em comparação ao lado pareado com injeções de salina, independentemente do genótipo ($F(3, 75) = 13.44$ $p < 0.0001$ para tratamento, $F(1, 75) = 0.5172$ $p = 0.4743$ para genótipo, ANOVA de duas vias). A administração de CTEP por si não causou preferência ou aversão por lugar (salina-wt vs. CTEP-wt $p = 0,6378$; salina-wt vs. CTEP-KO $p = 0,4579$) e a combinação de CTEP não afetou a CPP à cocaína (salina-wt vs. cocaína+CTEP-wt $p = 0.0018$; salina-wt vs. cocaína+CTEP-KO $p = 0,0034$) (Figura 31).

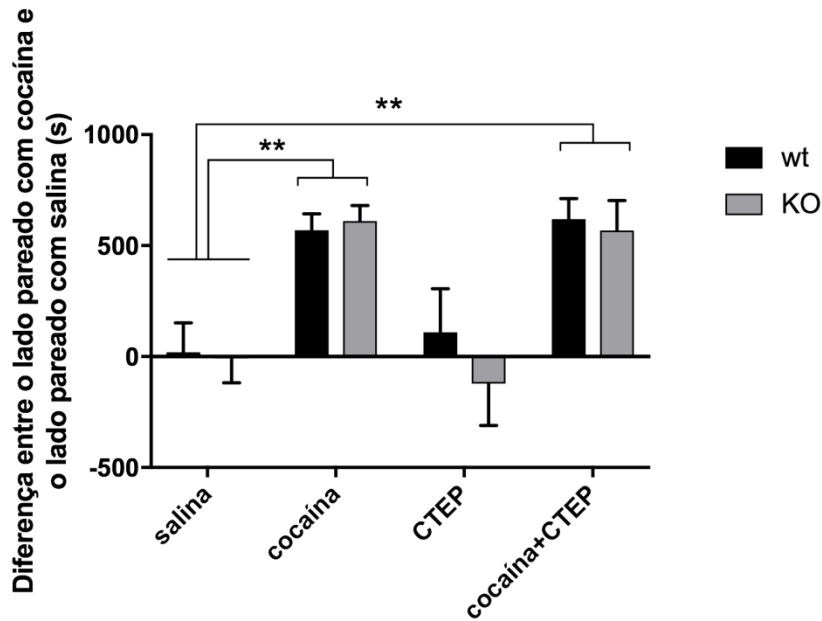


Figura 31. O nocaute da espinofilina ou tratamento com CTEP não afetam a CPP à cocaína. Média \pm erro padrão, n=9-13 por grupo. Teste LSD de Fisher $**p < 0,01$.

10.4 A espinofilina colocaliza com D2R e mGluR5 em cultura primária de neurônios

Com o objetivo de identificar se há colocalização entre a espinofilina e os receptores D2R e mGluR5, neurônios estriatais foram duplamente marcados por imunofluorescência para as três proteínas mencionadas. As imagens obtidas por microscopia confocal revelam a co-localização dos receptores D2R e mGluR5 com a proteína espinofilina (Figura 32).

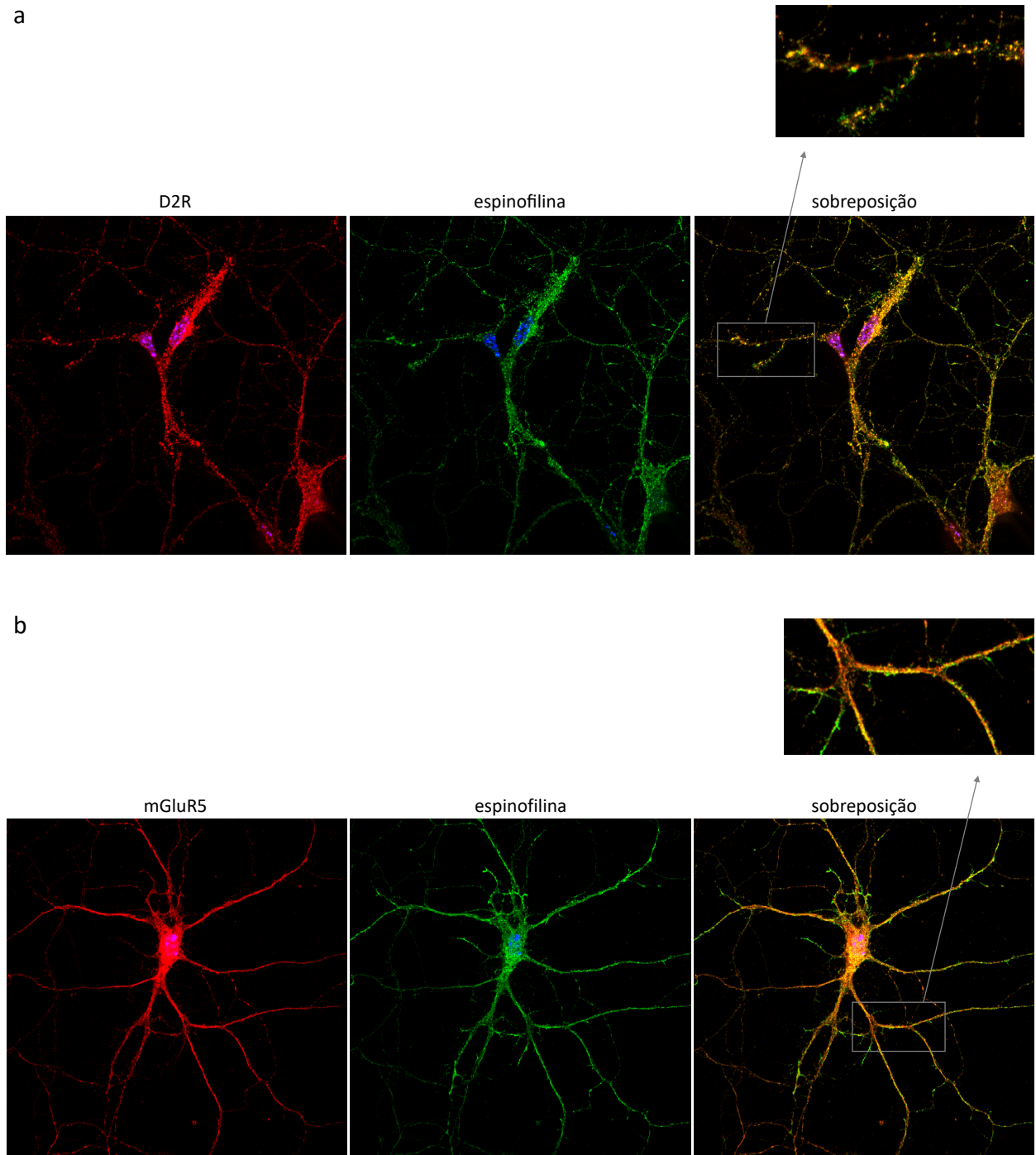


Figura 32. Imagem confocal de cultura primária de neurônios estriatais marcados para D2R (a, vermelho), mGluR5 (b, vermelho) e espinofilina (verde em a e b) revelando colocalização da espinofilina com estes receptores.

Os neurônios foram também marcados com MAP2 para caracterização da cultura, e foi observado que as células em cultura consistem predominantemente em neurônios (Figura 33).

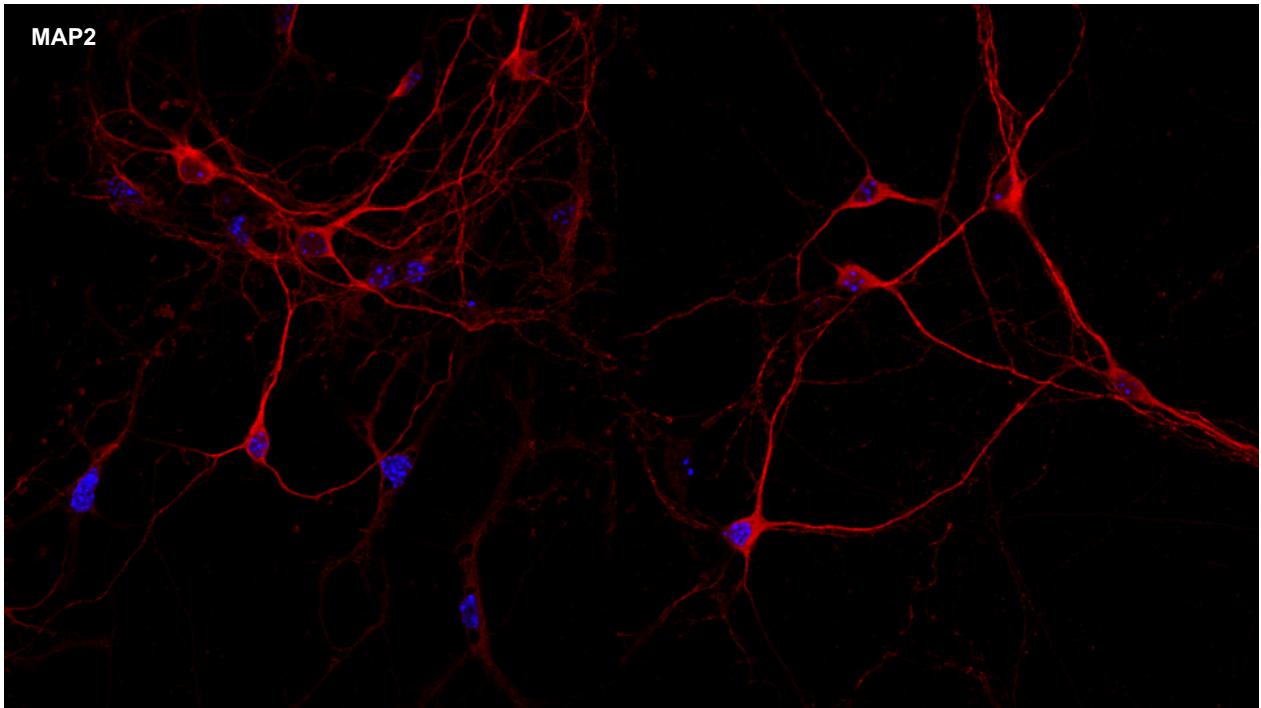


Figura 33. Imunofluorescência para MAP2 em cultura primária de estriado.

10.5 Alterações na imunoreatividade para c-Fos

Para avaliar um possível efeito do CTEP ou da espinofilina na indução de c-Fos, um marcador de atividade neuronal (HOFFMAN et al., 1993; CRUZ et al., 2013), induzido de forma expressiva e transiente pela cocaína (GAYBRIEL et al., 1990; NESTLER, 2001; DRAGO et al., 1996), foi realizada uma análise imunohistoquímica. A ANOVA de duas vias revelou efeito geral do fator genótipo [$F(1, 232) = 331,6$ $p < 0,0001$], tratamento [$F(3, 232) = 1249$ $p < 0,0001$] e interação [$F(3, 232) = 205,1$ $p < 0,0001$]. Observou-se que a indução de c-Fos promovida pela cocaína em animais selvagens não foi observada nos animais nocaute para espinofilina ($p < 0,0001$). Adicionalmente, a

administração de CTEP atenuou a imunoreatividade para c-fos induzida pela cocaína em animais selvagens ($p < 0,0001$). Não foi observada diferença entre os grupos cocaína-KO e cocaína+CTEP-KO ($p = 0,2828$) ou entre CTEP-wt e CTEP-KO ($p > 0,9999$) (Figura 38).

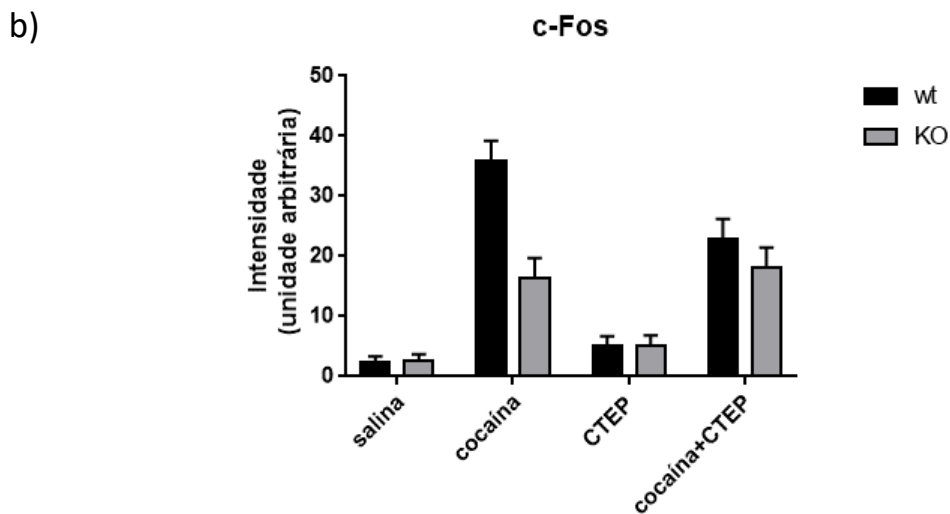
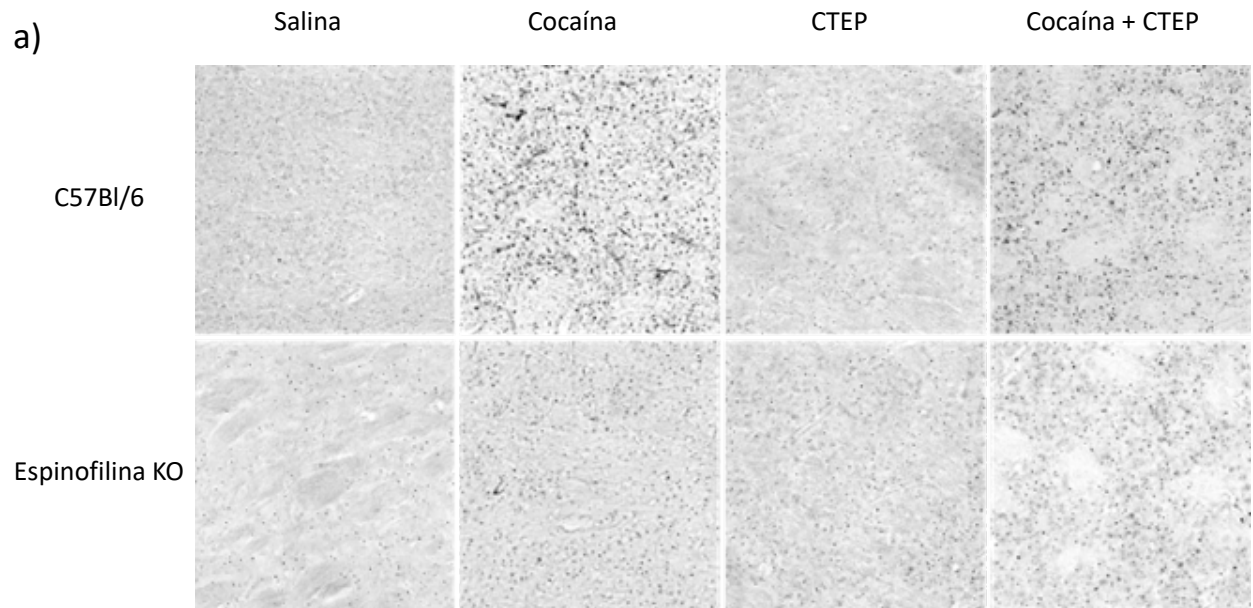


Figura 38. Análise por imunohistoquímica de amostras de estriado dos animais. Observa-se que o aumento na expressão de c-Fos induzido pela cocaína é menos intenso em animais nocautes para espinofilina em relação aos selvagens e, ainda, que a co-administração de CTEP atenuou a indução de c-Fos promovida pela cocaína. a) Figura representativa da imunohistoquímica para as diferentes

condições. b) Representação da quantificação da imunoreatividade para c-fos. $p < 0,001$ para todas as comparações múltiplas exceto salina-wt vs. salina-KO, cocaína-KO vs. Cocaína+CTEP-KO, e CTEP-wt vs. CTEP-KO. ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni.

10.6 Efeito das diferentes condições experimentais na sinalização celular e expressão proteica de receptores e da tirosina hidroxilase no estriado

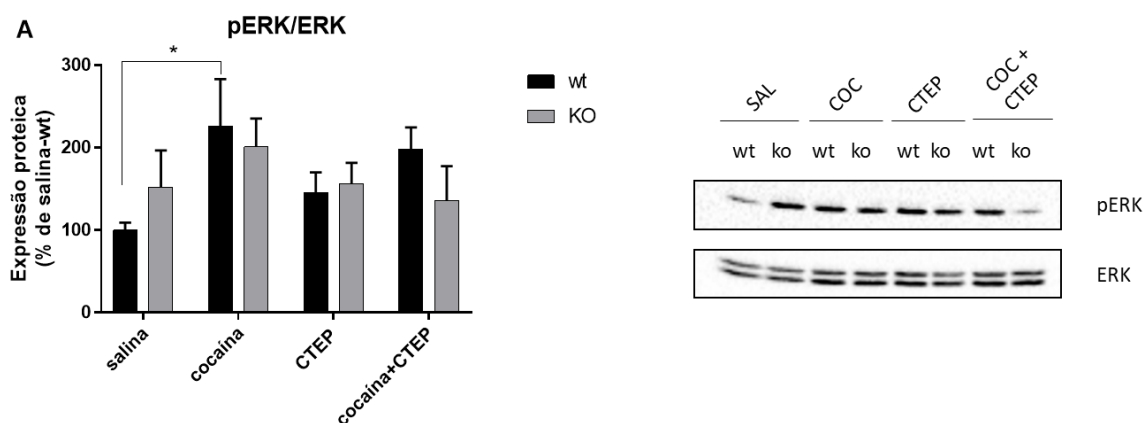
As proteínas de sinalização e receptores envolvidos com os sistemas dopaminérgico e glutamatérgico estriatais foram avaliadas por SDS-PAGE seguida de *western blotting* e os resultados estão apresentados na figura 34.

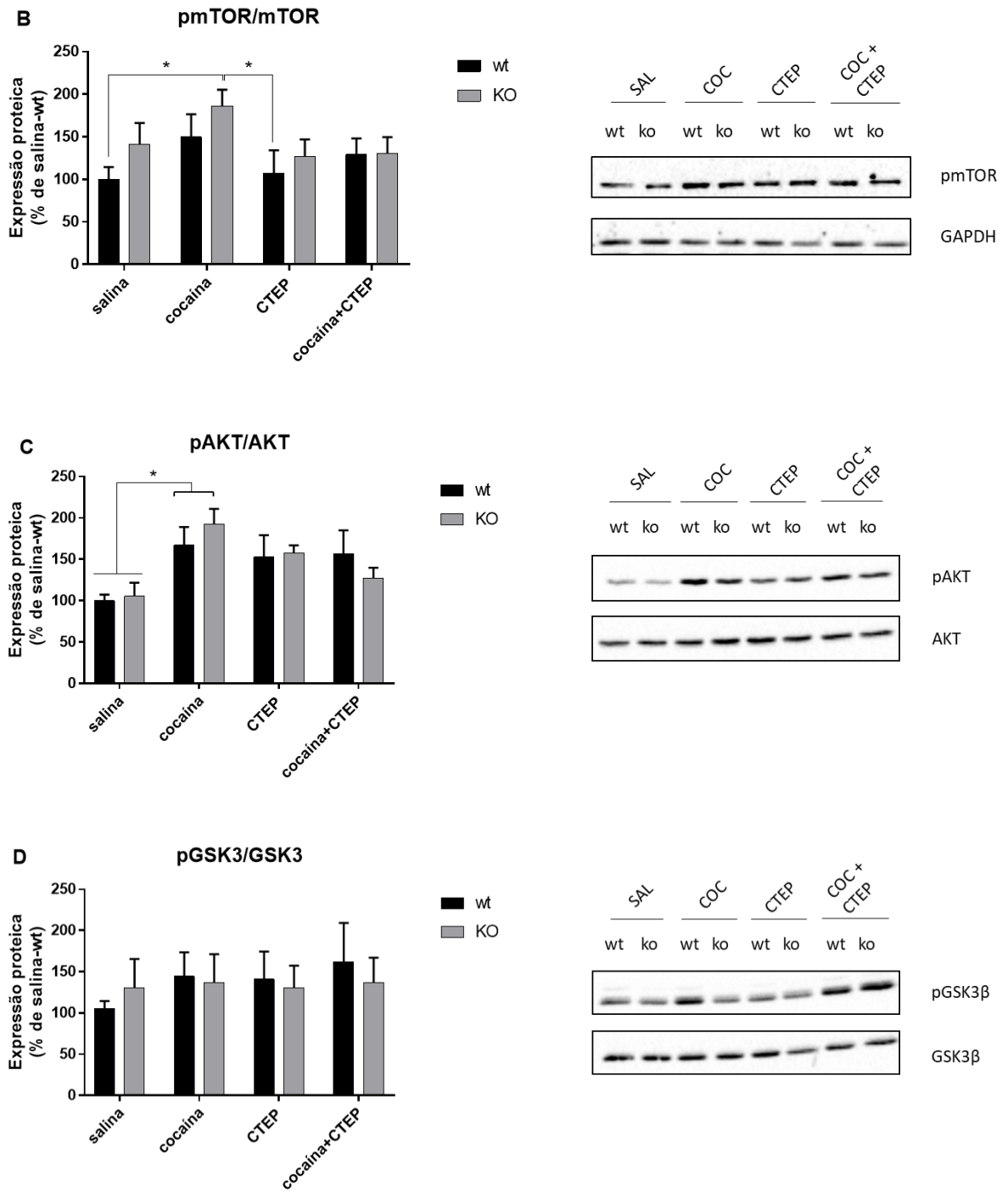
Observou-se que a ativação de ERK, induzida pela cocaína ($p = 0,0488$), foi atenuada com a adição de CTEP visto que a análise de comparações múltiplas não demonstrou diferença entre salina-wt e os grupos cocaína+CTEP-wt ($p = 0,4299$) ou cocaína+CTEP-KO ($p = 0,2016$). Esse aumento de pERK induzido pelo tratamento isolado com cocaína não foi estatisticamente significativo para os animais nocaute ($p = 0,1177$). Animais tratados com CTEP não apresentaram diferença em relação ao controle (CTEP-wt $p = 0,5085$; CTEP-KO $p = 0,3998$). Ainda, com relação aos possíveis efeitos da deleção de espinofilina nos níveis basais de pERK, os resultados demonstram grande variabilidade e ausência de diferença estatística entre o grupo salina-KO e o grupo salina-wt ($p = 0,1336$).

Em relação à ativação de mTOR, a análise dos níveis de fosforilação revelou que apesar de uma tendência de aumento nos animais selvagens (cocaína-wt vs. salina-wt $p = 0,0975$), a administração de cocaína induziu um aumento estatisticamente significativo na ativação de mTOR apenas nos animais nocaute (cocaína-KO vs. salina-wt $p = 0,0050$). Esse efeito foi revertido pela combinação de cocaína com CTEP, visto que não há diferença entre os grupos tratados com cocaína+CTEP em relação aos grupos tratados com cocaína ou com os grupos salina (cocaína+CTEP-wt vs. salina-wt $p = 0,3436$; cocaína+CTEP-wt vs. cocaína-wt $p = 0,5030$; cocaína+CTEP-KO vs. salina-KO $p = 0,7011$; cocaína+CTEP-KO vs. cocaína-KO $p = 0,0626$).

No que diz respeito à ativação de Akt, a análise por ANOVA de duas vias revelou efeito no fator tratamento [$F(3, 50) = 6.542$ $p=0.0008$]. A administração de cocaína causou aumento na fosforilação de Akt tanto em animais selvagens (cocaína-wt vs. salina-wt $p=0,0101$; cocaína-wt vs. salina-KO $p=0,0172$) como nocautes (cocaína-KO vs. salina-wt $p=0,0006$; cocaína-KO vs. salina-KO $p=0,0011$) quando comparados aos grupos tratados com salina. Esse efeito foi parcialmente revertido pela co-administração de CTEP, apenas no grupo KO, visto que os níveis de pERK no grupo cocaína+CTEP-KO não apresentaram diferença em relação aos grupos salina-wt ($p=0,2996$) ou salina-KO ($p=0,4022$), enquanto um aumento de pERK nos animais selvagens tratados com a combinação de cocaína e CTEP ainda foi observado em relação ao grupo salina-wt ($p=0,0347$), mas não ao salina-KO ($p=0,0547$). Já em relação à proteína GSK3, o nível de fosforilação não foi afetado por nenhum dos tratamentos nem pela deleção da espinofilina [$F(1, 39) = 0.03643$ $p=0.8496$] para genótipo e $F(3, 39) = 0.3306$ $p=0.8033$ para tratamento; $p>0.05$ para todas as comparações múltiplas).

O nível de ativação da enzima tirosina hidroxilase também foi avaliado, e nenhuma alteração na fosforilação foi observada entre os grupos [$F(1, 53) = 0.1341$ $p=0.7156$] para genótipo e [$F(3, 53) = 0.1787$ $p=0.9104$] para tratamento; $p>0.05$ para todas as comparações múltiplas. No entanto, o nível total de tirosina hidroxilase se mostrou diminuído no grupo CTEP-KO em relação ao CTEP-wt (0.0374) e salina-wt (0.0307).





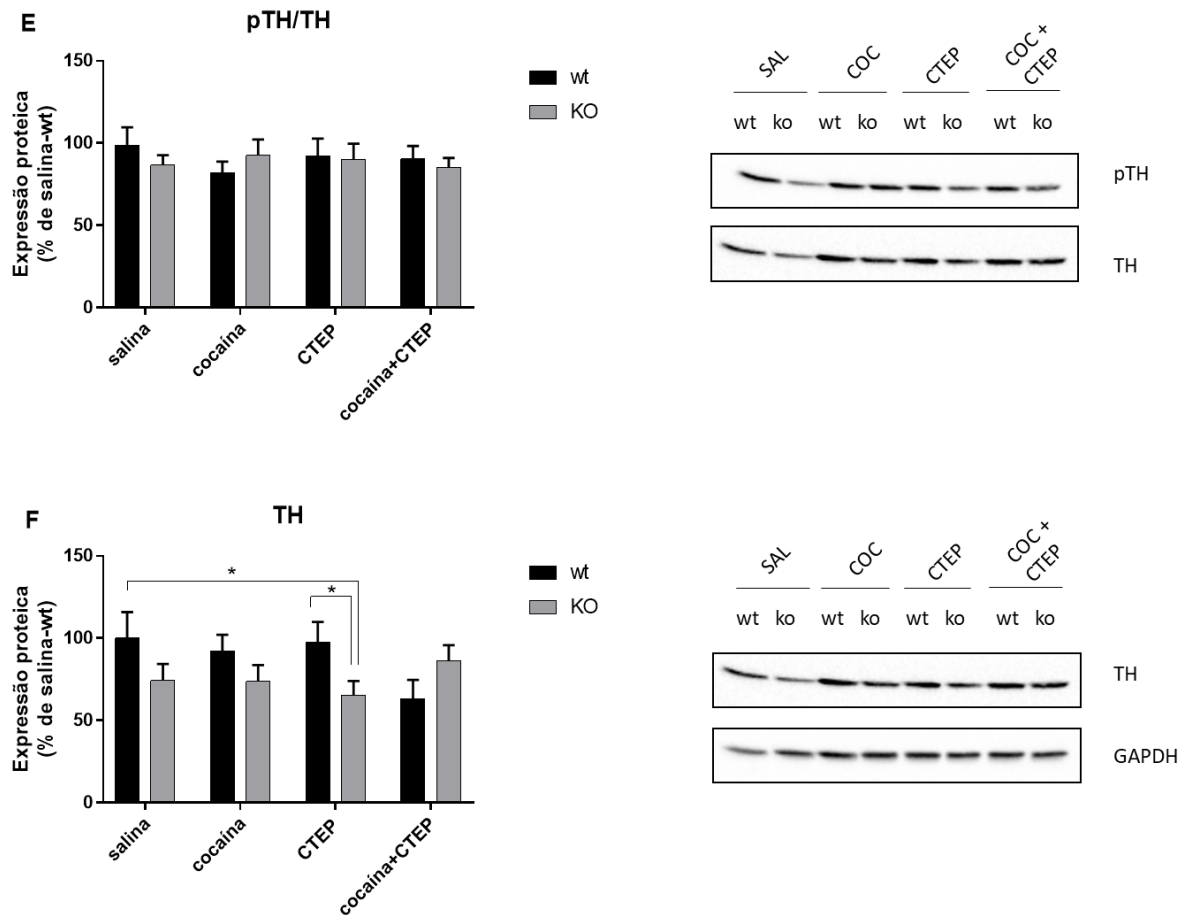
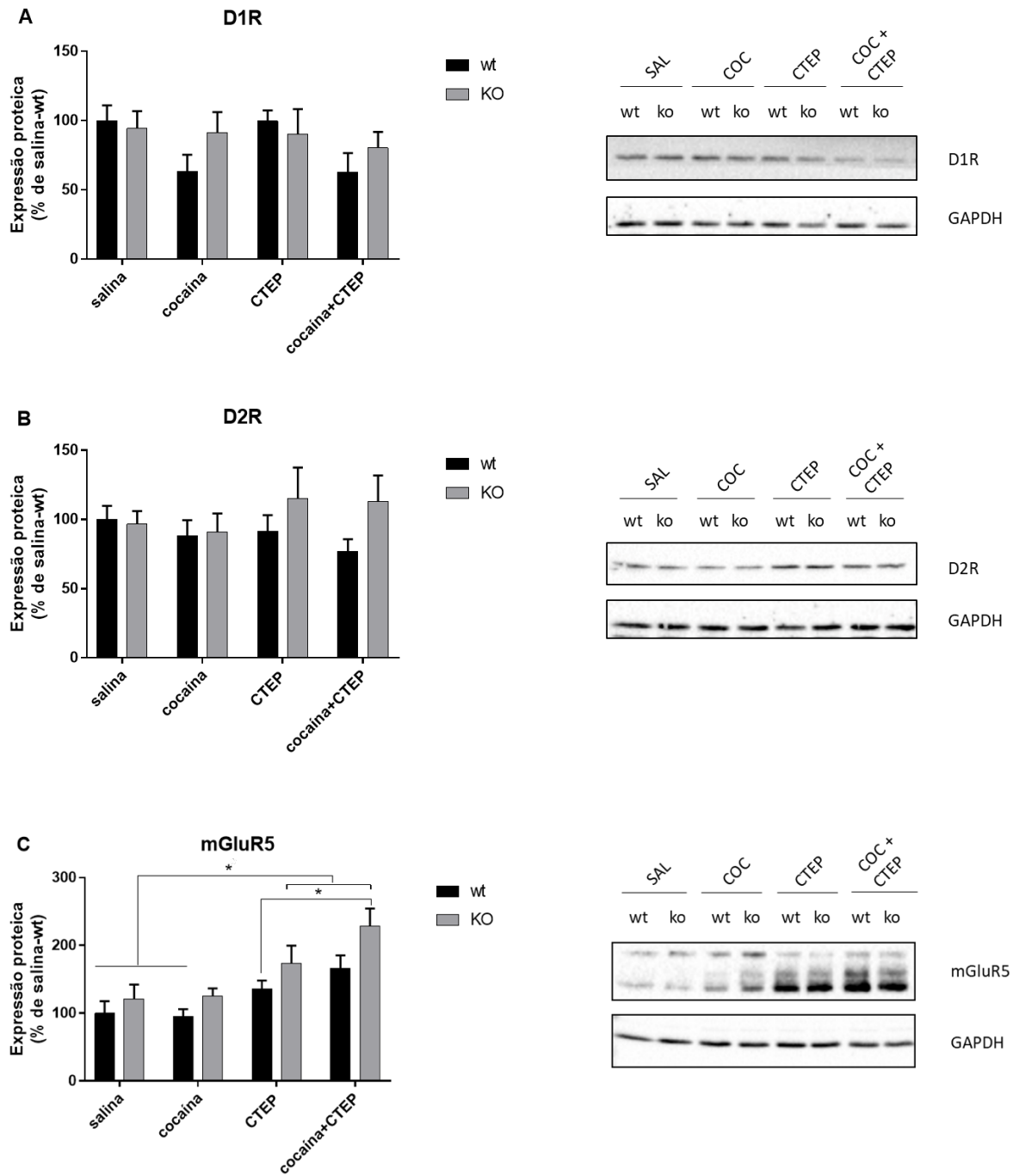


Figura 34. Efeito dos diferentes tratamentos em proteínas de sinalização na região estriatal. Dados expressos como média \pm erro padrão ($n=7-8$), ANOVA de duas vias seguida de LSD de Fisher. * $p<0,05$.

A expressão de receptores dos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico também foi avaliada (Figura 35). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação ao receptor D1R, apesar de uma tendência ter sido observada para os animais selvagens que receberam cocaína (salina-wt vs. cocaína-wt $p=0.0536$ e salina-wt vs. cocaína+CTEP $p=0.0506$). A expressão total de D2R não foi afetada por nenhum dos tratamentos nem pela deleção da espinofilina [$F(1, 53) = 2.082$ $p=0.1549$] para genótipo e [$F(3, 53) = 0.3122$ $p=0.8165$] para tratamento; $p>0.05$ para todas as comparações múltiplas).

A análise de variância ANOVA de duas vias revelou efeito do genótipo na expressão do receptor mGluR5 [F (1, 51) = 8.001 p=0.0067 para genótipo, F (3, 51) = 9.841 p<0.0001 para tratamento e F (3, 51) = 0.4262 para interação]. Animais que receberam a combinação de CTEP+cocaína apresentaram aumento na expressão de mGluR5 (salina-wt vs. cocaína+CTEP-wt p=0.0151; salina-wt vs. cocaína+CTEP-KO p<0.0001), assim como camundongos nocaute que receberam CTEP (salina-wt vs. CTEP-KO p=0,0074). Observou-se que esse aumento foi correspondente à forma monomérica do receptor. O tratamento isolado com CTEP não alterou a expressão de mGluR5 em camundongos selvagens (p=0,1963). Além disso, o tratamento com cocaína, apenas, não afetou os níveis de expressão de mGluR5 nem em camundongos selvagens (salina-wt vs. cocaína-wt p=0,8468) nem nocautes (salina-wt vs cocaína-KO p=0,3243). Ainda, não foi observado nenhum efeito na expressão de mGluR5 induzido apenas pelo nocaute da espinofilina (salina-wt vs. salina-KO p=0,4084).

Receptores NMDA também foram avaliados. Em relação à subunidade NR2A pode-se ser observado que a deleção da espinofilina promove um aumento da expressão de NR2A em níveis basais, sendo esta mais elevada em relação aos grupos salina-wt (p=0.0005), cocaína-wt (p=0,0007), CTEP-wt (p=0,009), cocaína+CTEP-wt (p=0,0017) e cocaína+CTEP-KO (p=0,0015). Além disso, ANOVA de duas vias mostrou efeito de genótipo [F (1, 49) = 12.55 p=0.0009] mas não de tratamento [F (3, 49) = 1.235 p=0.3070]. Nenhuma das drogas utilizadas (ou a combinação destas) afetou a expressão de NMDAR2A (p>0,05 para todas as outras comparações múltiplas). Já para a subunidade NR2B, não houve nenhum efeito geral de tratamento [F (3, 31) = 0.3633 p=0.7800] ou genótipo [F (1, 31) = 0.5373 p=0.4690], e nenhuma diferença entre os grupos foi revelada pela análise de comparações múltiplas (p>0,05).



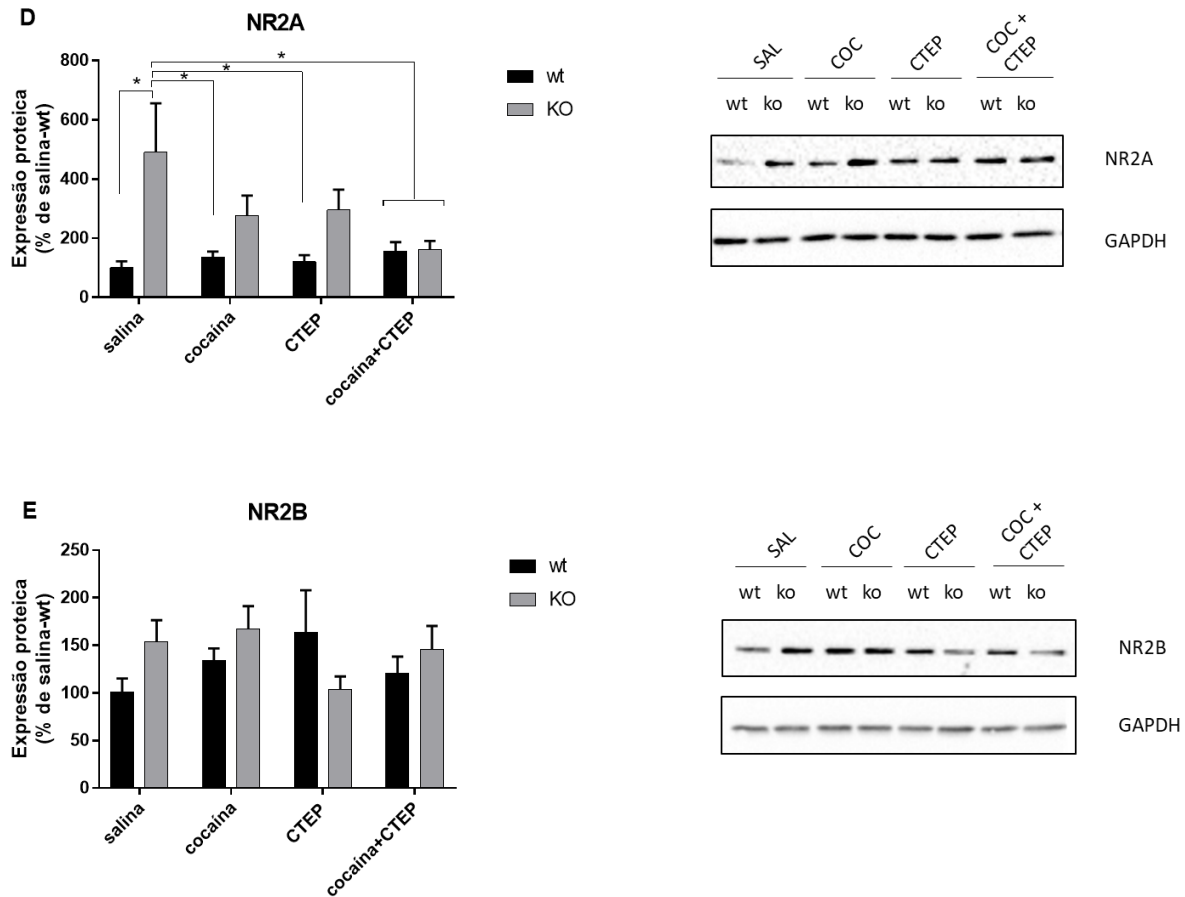


Figura 35. Avaliação da expressão de receptores dos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico no estriado. A expressão dos receptores foi normalizada pela expressão de GAPDH e os dados foram expressos como média \pm erro padrão ($n=7-8$), ANOVA de duas vias seguida de LSD de Fisher. $*p<0,05$.

Não foi observado diferença na expressão de PSD95 em nenhum dos grupos ($F(1, 38) = 1.222$ $p=0.2759$ para genótipo e $F(3, 38) = 1.26$ $p=0.3020$ para tratamento; $p>0.05$ para todas as comparações múltiplas). Por fim, a expressão de espinofilina não se mostrou alterada em função de nenhum dos tratamentos nos camundongos do tipo selvagem ($F(3, 19) = 1.111$ $p=0.3691$; $p>0.05$ para todas as comparações múltiplas) (Figura 36).

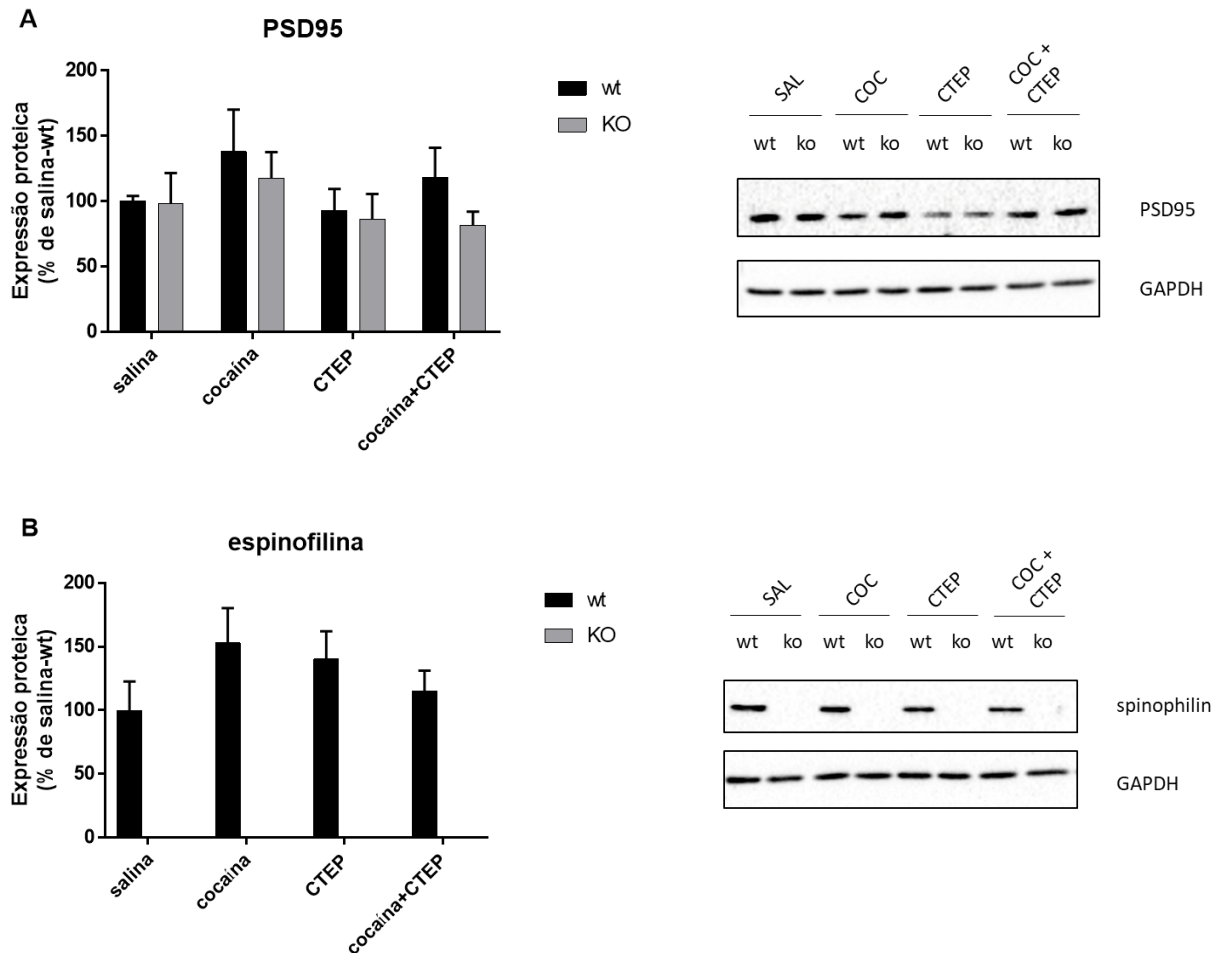


Figura 36. Expressão de PSD95 e espinofilina no estriado. Dados normalizados pela expressão de GAPDH e expressos como média \pm erro padrão (n=7-8), ANOVA de duas vias seguida de LSD de Fisher. * $p < 0,05$.

10.7 Efeito das diferentes condições experimentais na expressão gênica no estriado

No intuito de verificar possíveis alterações no nível transcricional induzidas pelos diferentes tratamentos, em animais nocautes e selvagens, análises de expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real foram realizadas em amostras de estriado (Figura 37). Os mesmos receptores previamente avaliados em *western-blot* também foram avaliados por qPCR, a fim de co-relacionar a expressão gênica com a expressão protéica. Adicionalmente, a expressão gênica de DARPP-32, devido ao seu papel

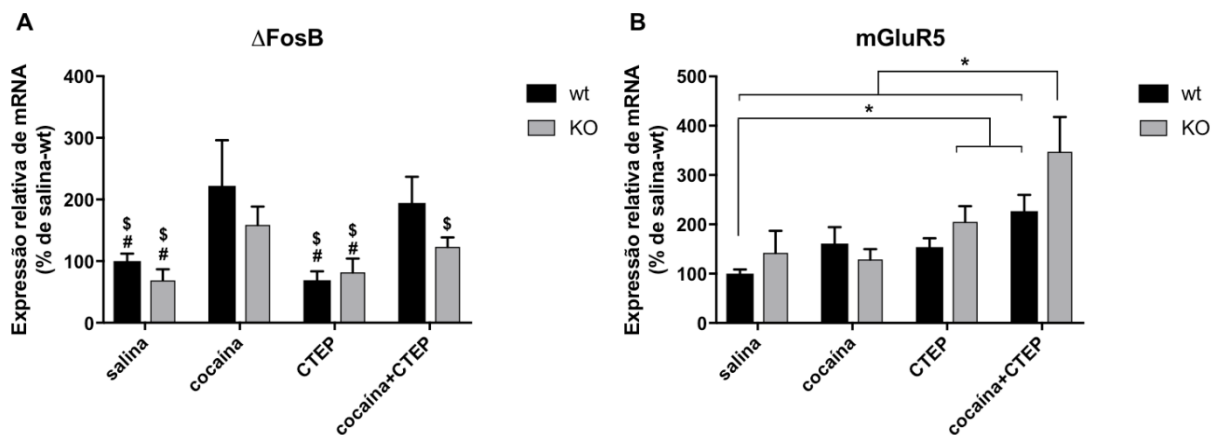
notável na sinalização e integração dos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico, e de deltaFosB, um fator de transcrição importante para diversas alterações de longo prazo promovidas pela cocaína, também foram avaliados. ANOVA de duas vias nos dados de deltaFosb relevou um efeito geral de tratamento na expressão desse gene [F (3, 40) = 8,657 p=0,0002] mas não de genótipo [F (1, 40) = 3,979 p=0,0529]. Foi observado um aumento na expressão de deltaFosb nos grupos cocaína-wt (p=0,0022) e cocaína+CTEP-wt (p=0,0452) em relação ao controle, mas não para os grupos cocaína-KO (p=0,1070) e cocaína+CTEP-KO (p=0,6130). Por outro lado, não foi observada diferença entre os grupos cocaína-wt e cocaína-KO (p=0,0964) ou cocaína+CTEP-wt e cocaína+CTEP-KO (p=0,1273).

Com relação à expressão do receptor mGluR5, foi observado um aumento nos grupos CTEP-KO (p=0,0435) e cocaína+CTEP-wt (p=0,0162) em relação ao salina-wt. Para o grupo cocaína+CTEP-KO foi observado um aumento não só em relação ao grupo salina-wt (p<0,0001) mas em relação a todos os outros grupos experimentais. Ainda em relação ao sistema glutamatérgico, receptores do tipo NMDAR também foram avaliados. Observou-se que animais nocautes para espinofilina apresentam maior expressão gênica para a subunidade NR2A (p=0,0190) em relação aos animais do tipo selvagem. Além disso, o tratamento com cocaína+CTEP induziu um aumento na expressão deste gene nos camundongos selvagens (p=0,0208). Ainda, a ANOVA de duas vias revelou interação [F (3, 41) = 3.405 p=0,0264] entre os dados. Já para a subunidade NR2B, apesar de uma tendência ter sido observada, não houve diferença significativa entre nocautes e selvagens a níveis basais (p=0.0668). No entanto, o grupo cocaína+CTEP-wt apresentou níveis de mRNA mais elevados do que salina-wt (p=0.0037), cocaína-wt (p=0,0277), cocaína-KO (p=0,0292), CTEP-KO (p=0,0400) e cocaína+CTEP-KO (p=0,0080). Assim como NR2A, também foi observado interação entre os fatores para NR2B [F (3, 45) = 3.771 p=0,0169].

Em relação aos receptores dopaminérgicos avaliados, foi observado um aumento na expressão gênica do receptor D1R no grupo cocaína-KO em relação aos outros grupos (p<0.05 para todas as comparações múltiplas) associado à interação entre os fatores [F

(3, 39) = 4.842 $p=0.0059$]. Já para a expressão de receptores D2R, não foi observada nenhuma diferença entre os grupos ($p>0.05$ para todas as comparações múltiplas).

A análise de variância revelou um efeito geral por tratamento [$F(3, 51) = 3.311$, $p=0.0272$] para a expressão gênica de beta-arrestina 2. Foi observado um aumento no grupo cocaína+CTEP-wt em relação aos grupos salina-wt ($p=0.0007$), salina-KO ($p=0,0052$), cocaína-wt ($p=0,0247$), cocaína-KO ($p=0,0027$) e cocaína+CTEP-KO ($p=0,0339$). Com relação à expressão de DARPP-32, os grupos CTEP-wt e cocaína+CTEP-wt apresentaram níveis de expressão mais elevados do que os observados nos grupos salina-wt, salina-KO e cocaína-KO ($p<0,005$ para as comparações citadas). Adicionalmente, o grupo cocaína+CTEP-wt apresentou maior expressão gênica do que o grupo cocaína+CTEP-KO ($p=0,0339$). A análise da expressão gênica de PSD95 não demonstrou diferença entre nenhum dos grupos experimentais ($p>0,05$ em todas as comparações múltiplas).



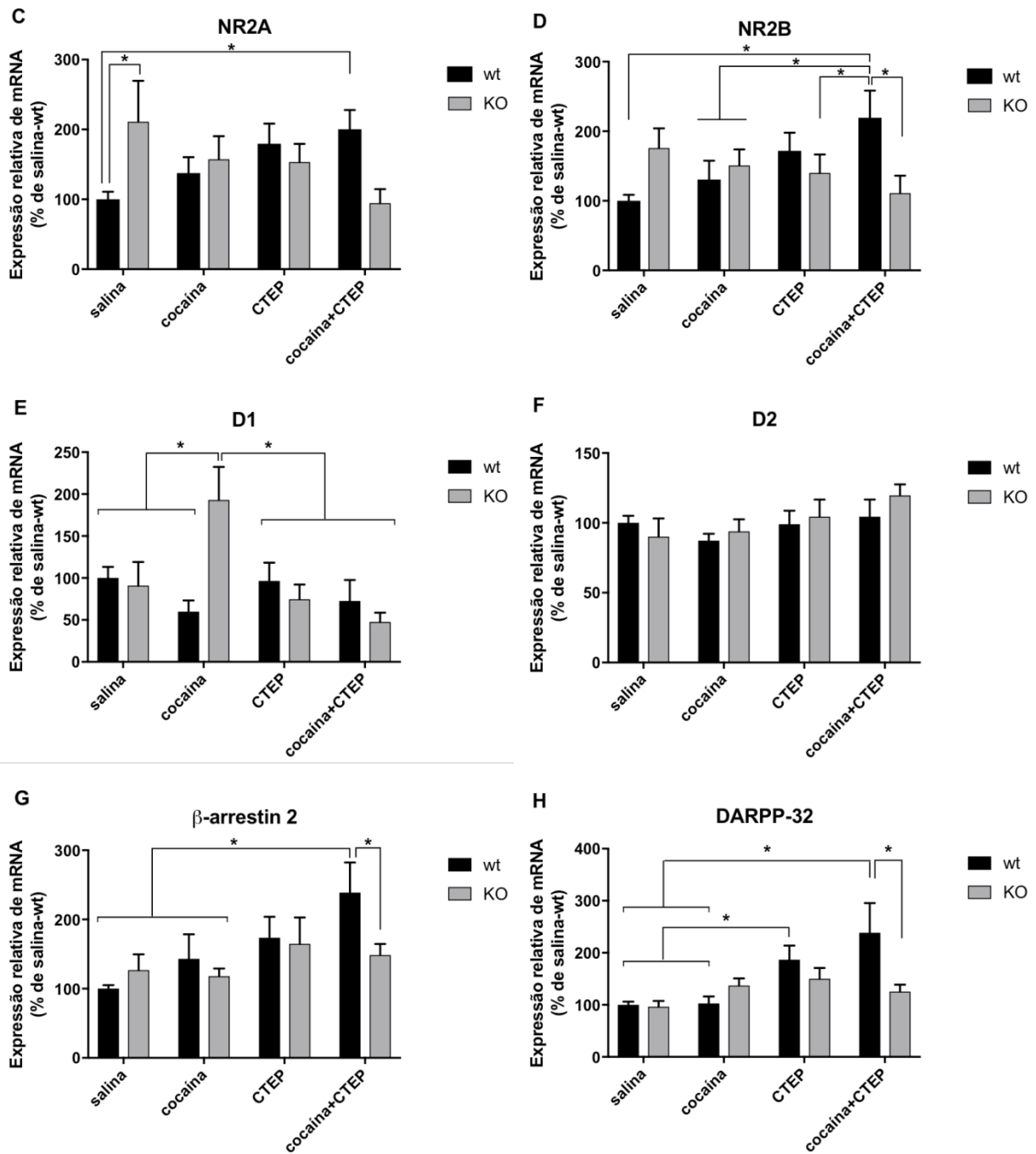


Figura 37. Avaliação da expressão gênica por qPCR em amostras de estriado. Os dados foram normalizados pela expressão do gene GAPDH e expressos como média \pm erro padrão (n=7-8), ANOVA de duas vias seguida de LSD de Fisher. \$ p<0.05 em relação ao grupo cocaína-wt e # p<0.05 em relação ao grupo cocaína+CTEP-wt. *p<0.05 para as comparações indicadas.

11 DISCUSSÃO

Para melhor compreender a relação entre a sinalização dopaminérgica e glutamatérgica na adição à cocaína, propusemos investigar o efeito da modulação alostérica negativa de mGluR5, bem como da presença ou ausência da proteína espinofilina utilizando dois paradigmas: a sensitização comportamental e a preferência condicionada por lugar.

Diversos protocolos já foram descritos para avaliação da sensitização comportamental, entre eles variações no período de tratamento e no tempo de abstinência podem ser observadas (SOLINAS et al., 2008; LIU e STEKETEE, 2011; SAKAE et al., 2015; GARCIA et al., 2017). Ao comparar a atividade locomotora dos animais no último dia de tratamento com a exibida no desafio, não se observou diferença em nenhum dos grupos, incluindo o grupo cocaína-wt. É provável que, com as doses utilizadas, no quinto dia de teste o efeito máximo já havia sido atingido. Com isso, optamos por avaliar o resultado final do protocolo de sensitização (desafio) em comparação com a resposta à primeira exposição às respectivas drogas. Um resultado notável foi o fato dos camundongos nocaute para espinofilina não desenvolverem sensitização à cocaína. Ainda, quando a cocaína foi combinada ao CTEP, a hiperlocomoção foi potencializada nos camundongos KO, efeito que foi observado já na primeira administração. No entanto, essa resposta se manteve aproximadamente no mesmo nível ao longo de todo o experimento, portanto, apesar da hiperlocomoção, essa resposta não foi sensitizada. Vale ressaltar, contudo, que nesse caso é possível que o efeito máximo já tenha sido atingido, impossibilitando um aumento ainda maior na atividade locomotora produzido por sensitização comportamental, assim como relatado em outros trabalhos (SAKAE et al., 2015).

Estudos mostram que o efeito geral da sinalização de mGluR5 nos núcleos da base age no sentido contrário à sinalização dopaminérgica (LIU, et al., 2001; CONN et al., 2005). O envolvimento de mGluR5 na locomoção é corroborado pela observação de que a deleção bem como o antagonismo desse receptor produz hiperlocomoção (RIBEIRO et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2015). Considerando dados prévios demonstrando que a

sinalização de mGluR5 é exacerbada na ausência de espinofilina (DI SEBASTIANO et al., 2016), é possível que o antagonismo de mGluR5 em animais nocaute para a espinofilina tenha um impacto maior do que em animais selvagens. Em conjunto, esses dados poderiam explicar a hiperlocomoção mais intensa promovida pela administração combinada de cocaína+CTEP em camundongos KO.

Um estudo relatou que camundongos nocaute para espinofilina seriam mais sensíveis aos efeitos da cocaína, utilizando experimentos de campo aberto (para avaliação de efeito agudo) e preferência condicionada por lugar. No entanto, esses efeitos foram observados apenas em uma baixa dose na qual a cocaína não foi efetiva em camundongos do tipo selvagem, e a sensibilização comportamental não foi alterada (ALLEN, et al. 2006).

Os mecanismos da sensibilização não estão totalmente elucidados, mas estudos mostram que esse fenômeno está associado a um aumento na neurotransmissão dopaminérgica principalmente no sistema mesocorticolímbico, onde já foram observados aumento na liberação de dopamina (KALIVAS & DUFFY, 1990; PARSONS & JUSTICE, 1993), aumento na sensibilidade de receptores D1R (HENRY & WHITE, 1991; KALIVAS & DUFFY, 1995), diminuição da atividade de autoreceptores (HENRY et al., 1989; STEKETEE & WALSH, 2005), e indução de LTP (BORGLAND et al., 2004) promovidos pelo uso repetido de cocaína e outras drogas. Estudos mostram ainda que ocorre uma redução na atividade de D2R no córtex pré-frontal associada ao desenvolvimento da sensibilização comportamental à cocaína e que administrações repetidas de um antagonista de receptores D2R induz sensibilização (BOWERS et al., 2004; STEKETEE & WALSH, 2005). Além disso, um aumento na excitabilidade de neurônios da VTA, durante o desenvolvimento da sensibilização a estimulantes, mostrou-se associado à uma diminuição na sensibilidade da função autorreceptora de D2R nesses neurônios (HENRY et al., 1989; STEKETEE & WALSH, 2005).

Sabe-se que a espinofilina se liga ao terceiro loop citoplasmático de receptores D2R, porém, os efeitos dessa interação na atividade do receptor ainda não foram bem

elucidados como no caso de outros receptores. Levando em consideração a similaridade do terceiro loop citoplasmático, região de interação dos receptores D2R e α 2AR com a espinofilina, e as semelhança quanto à sinalização desses receptores (ambos são acoplados à proteína Gi), hipotetiza-se que a espinofilina regule D2R de forma semelhante à descrita para α 2AR (SARRUILHE et al., 2011), antagonizando a sinalização de MAPK dependente de beta-arrestina 2 (WANG et al., 2004). Portanto, caso esta hipótese esteja correta, a sinalização de D2R seria exacerbada em camundongos nocaute para espinofilina o que seria um possível mecanismo para o bloqueio do desenvolvimento de sensitização comportamental observado. No entanto, estudos específicos sobre os efeitos da espinofilina na sinalização dos receptores D2R se fazem necessários para confirmar essa hipótese.

Apesar dos efeitos na sensitização comportamental citados acima, não foram observadas alterações promovidas pelo antagonismo de mGluR5 ou pela deleção da espinofilina na preferência condicionada por lugar induzida pela cocaína. Dados na literatura mostram que os neurocircuitos envolvidos na sensitização e na recaída, em grande parte se sobrepõem, com algumas diferenças sutis sendo observadas até o momento (revisados em STEKETEE & KALIVAS, 2011). Além disso, a ocorrência de sensitização comportamental em estudos de auto-administração e recaídas já foi relatada diversas vezes (DE VRIES et al., 1998; FERRARIO et al., 2005). Desta forma, é sugerido que o modelo de sensitização comportamental teria validade semelhante ao de auto-administração no estudo da dependência de drogas estimulantes (STEKETEE & KALIVAS, 2011). No entanto, outros estudos mostram que a sensitização comportamental nem sempre se correlaciona com a maior sensibilidade à recaídas em experimentos de auto-administração (AHMED & CADOR, 2006; LENOIR & AHMED, 2007; KNACKSTEDT & KALIVAS 2007; ZHANG et al., 2007). Além da diferença da administração passiva ou ativa entre os dois modelos, fatores como a via de administração (IV versus IP), a dose e a velocidade na qual a droga atinge o SNC podem influenciar essa falta de correlação por vezes observada. Adicionalmente, alguns autores defendem que a sensitização do incentivo motivacional, e não da atividade locomotora, seja de fato importante para a dependência (ROBINSON &

BERRIDGE, et al., 2008). Dessa forma, é possível que mesmo quando o sistema motor atinge o nível máximo de sensitização, a circuitaria envolvida com a motivação continua a sensibilizar, levando a um aumento no comportamento de busca pela droga mesmo sem efeito na sensitização comportamental motora (STEKETEE & KALIVAS, 2011).

A primeira forte evidência do envolvimento dos receptores mGluR5 na adição à cocaína foi demonstrada por Chiamulera et al., 2001, onde foi revelado que camundongos nocaute para mGluR5 não desenvolvem auto-administração de cocaína e que o padrão de auto-administração de animais selvagens é reduzido quando são tratados com altas doses de MPEP (CHIAMULERA et al., 2001). McGueehan & Olive, 2003 avaliaram o efeito do MPEP nos efeitos recompensadores de outras drogas além da cocaína. Os autores revelaram que MPEP foi capaz de reduzir a CPP apenas à cocaína, mas não à anfetamina, morfina, nicotina ou etanol. Como o MPEP não alterou a CPP promovida por outras drogas de abuso, o efeito do MPEP não parece interferir com a capacidade do animal de associar estímulos reforçadores de drogas de abuso com o ambiente pareado a tais efeitos. Portanto, os autores sugerem a existência de um mecanismo mais específico (ainda não elucidado) para a prevenção da CPP à cocaína induzido por essa droga (MCGUEEHAN & OLIVE, 2003). Ainda, estudos demonstram que o antagonismo de mGluR5 é capaz também de reduzir, de forma dose-dependente, a busca pela droga após extinção (recaída), induzida tanto por uma injeção de cocaína quanto por pistas associativas previamente utilizadas no treinamento de auto-administração (KUMARESAN et al., 2009; KENNY et al., 2005; MARTIN-FARDON & WEISS; 2012). Vale ressaltar que em alguns desses estudos, a administração de MPEP e MTEP ocorreu 30 minutos antes dos testes, promovendo o bloqueio dos receptores antes da primeira dose de cocaína.

Por outro lado, Fowler et al., 2011 demonstraram que camundongos nocaute para mGluR5 apresentam CPP normal à cocaína, bem como hiperlocomoção no mesmo nível de camundongos selvagens em doses moderadas de cocaína (10 e 20 mg/kg), apresentando locomoção menor em relação aos selvagens apenas na dose de 40mg/kg. Além disso, um estudo mostrou que o tratamento com MTEP não afetou a

CPP à cocaína em nenhuma das 3 doses testadas (1, 3 e 10 mg/Kg) (VEENEMAN et al., 2010). Adicionalmente, Rutten et al., (2011) demonstrou que o antagonismo de mGluR5 potencializou a CPP à cocaína e nicotina, visto que a dose mínima para promover CPP foi reduzida pelo pré-tratamento com MPEP. Nesse estudo, os autores sugerem que o efeito anti-abuso do bloqueio de mGluR5 proposto por outros trabalhos possa ser mediado por um mecanismo de substituição, visto que o MPEP também pode apresentar propriedades reforçadoras *per se* (RUTTEN et al., 2011).

Desta forma, é possível observar que os dados na literatura a respeito do papel do receptor mGluR5 na adição à cocaína são variados e, ainda, divergentes. Diante do exposto, observa-se que fatores como estratégia de intervenção no receptor (antagonismo ou nocaute), droga utilizada, dose, protocolo experimental e paradigmas avaliados são fontes de variação entre os estudos citados e, com isso, influenciam nos resultados e na interpretação dos mesmos. Como no presente estudo foi utilizado um modulador alostérico negativo ainda não utilizado em estudos com cocaína, não pode ser descartada a hipótese de que a dose utilizada não tenha sido suficiente para interferir na CPP ou mesmo na sensitização comportamental (no caso dos selvagens). Portanto, não se pode afirmar que a sinalização de mGluR5 não está envolvida na dependência à cocaína e que esse receptor não deve ser considerado como alvo terapêutico, mas sim que, na dose utilizada, e para os paradigmas avaliados, a droga CTEP não foi capaz de prevenir fenótipos induzidos pela cocaína. Nossos dados, assim como as divergências encontradas na literatura, ressaltam a necessidade de mais estudos para melhor compreensão do papel do receptor mGluR5 nos comportamentos relacionados à cocaína e de uma melhor estratégia farmacológica de modulação desse receptor para um potencial tratamento da dependência de cocaína.

No intuito de investigar as bases moleculares envolvidas nos possíveis efeitos do mGluR5 e da espinofilina na dependência de cocaína, avaliamos a expressão de proteínas de sinalização, receptores, e fatores de transcrição. Uma das respostas celulares à cocaína e à agonistas de D1R mais proeminentes é o aumento intenso e transitório da expressão dos *immediate early genes* (IEGs) da família Fos, especialmente

c-Fos, em regiões como NAc, caudado-putâmen, CPF e amígdala (GRAYBIEL et al., 1990; NESTLER, 2001; MCCLUNG & NESTLER, 2003; DRAGO et al., 1996). c-Fos ativa a formação do complexo de transcrição AP-1 e participa da regulação da expressão gênica, inclusive de outros IEGs (MORGAN & CURRAN, 1991; ZHANG et al., 2005). deltaFosB é um fator de transcrição da família fos, que, diferentemente das outras proteínas dessa família, se acumula em algumas regiões cerebrais em resposta a drogas de abuso, e medeia diversas alterações persistentes relacionadas ao desenvolvimento da dependência, incluindo a sensitização comportamental (NESTLER et al., 2001). Em um estudo onde foi realizado nocaute condicional do gene Fos em neurônios contendo receptores D1R, foi observado que a deleção de Fos associada à ausência de indução de c-Fos e de acúmulo de deltaFosB, usualmente promovidos pela cocaína, resultou em bloqueio da sensitização comportamental à essa droga (ZHANG et al., 2006). Por outro lado, os camundongos nocautes apresentaram CPP normal e, ainda, maior tempo de extinção dessa preferência, demonstrando a importância das proteínas da família Fos, nesses comportamentos (ZHANG et al., 2006). De forma semelhante, no presente trabalho foi observado um aumento de deltaFosB e c-Fos induzido por cocaína e associado à sensitização comportamental em camundongos selvagens, enquanto camundongos nocautes para espinofilina tratados com cocaína não apresentaram aumento significativo na expressão de deltaFosB ou c-Fos nem sensitização comportamental. Além disso, também não se observou relação entre a expressão de deltaFosB e a preferência condicionada por lugar.

Até o momento, existe apenas um trabalho na literatura que investigou respostas à cocaína em animais nocaute para espinofilina. Conforme mencionado anteriormente, o trabalho de ALLEN et al. (2006) apresenta alguns resultados contrastantes em relação aos aqui observados no que diz respeito ao comportamento. Adicionalmente, os dados em relação à indução de c-Fos também se mostraram divergentes, visto que os autores observaram aumento na expressão de c-Fos em animais espinofilina-KO enquanto, no presente trabalho, foi observada uma diminuição. Entre as diferenças nas condições experimentais, vale ressaltar que a indução de c-Fos em ALLEN et al. (2006) foi avaliada por hibridização *in situ*, portanto foi quantificado RNA e não proteína, e a dose

utilizada foi de 10 mg/Kg, versus 15 mg/Kg utilizadas no presente estudo. Adicionalmente, foi observado neste trabalho que a combinação de CTEP reduziu a imunoreatividade de c-Fos induzida pela cocaína, dado que é consistente com as alterações observadas na ativação de proteínas de sinalização celular, que serão discutidas em seguida.

A literatura mostra que a família MAPK está envolvida em diversos efeitos atribuídos à cocaína, como hiperatividade, sensitização comportamental, recompensa e dependência (GARCIA-PARDO et al., 2016). Já foi demonstrado que a expressão da preferência por lugar aumenta p-ERK no estriado, hipocampo, e VTA, e que o bloqueio da fosforilação de ERK no estriado inibe a expressão de sensitização comportamental à cocaína (PAN et al., 2011; FRICKS-GLEASON et al., 2011; KIM et al., 2011). Além disso, camundongos nocautes para o receptor D1R não apresentam aumento de p-ERK e não adquirem CPP à cocaína (CHEN & XU, 2010). Adicionalmente, sabe-se que a atividade de ERK está associada à plasticidade sináptica induzida por cocaína (PAN et al., 2011). No presente estudo, o tratamento com cocaína produziu aumento de p-ERK e esse efeito foi atenuado pela combinação com CTEP.

A via PI3K/Akt/GSK3/mTOR, implicada na neuroadaptação envolvida no desenvolvimento da dependência de cocaína (NEASTA et al., 2014), também foi avaliada. Foi observado aumento na ativação de mTOR e AKT induzido pela cocaína, e este efeito foi atenuado pelo co-tratamento com CTEP. Dados na literatura mostram que ocorre um aumento da ativação de mTOR e seus alvos induzido por cocaína, via receptor D1R (SUTTON & CARON, 2015; WU et al., 2011). Além disso, sabe-se que a via PI3K-Akt-mTOR também é ativada pelo receptor mGluR5 (MAO et al., 2005; GUHAN & LU et al., 2004). Estudos revelam que o tratamento com rapamicina, um inibidor de mTOR, é capaz de prevenir a expressão de preferência condicionada por lugar, mas não o desenvolvimento desta, além de atenuar a sensitização comportamental (BAILEY et al., 2011; WU et al., 2011). Apesar do tratamento com CTEP no presente estudo atenuar o aumento da ativação de ERK, AKT e mTOR

promovido pela cocaína, essa alteração não foi suficiente para afetar preferência condicionada por lugar induzida pela cocaína.

No presente estudo, foi observado que a droga CTEP induziu um aumento na expressão gênica de DARPP-32, tanto isoladamente quanto em combinação com a cocaína. A proteína DARPP-32 possui um importante papel na integração das sinalizações dopaminérgicas e glutamatérgicas (GREENGARD ET AL., 1999). Após ativação de D1R, a DARPP-32 é fosforilada na treonina 34 via PKA, se tornando um potente inibidor da PP1 (NISHI et al., 1997). Por outro lado, essa proteína pode ser fosforilada na treonina 75 pela CDK5, como ocorre em resposta à ativação de receptores mGluR5. Nesse caso, a DARPP-32(pTre75) atua como um inibidor da PKA, e, portanto, reduz o efeito da sinalização dopaminérgica em alvos da PKA, como CREB, MAPK e receptores do tipo AMPA (BIBB et al., 1999; NISHI et al., 2005; CONN et al., 2005). Ainda, já foi demonstrado que esse *switch* da pTre34 para pTre75 está relacionado com uma atenuação de respostas intracelulares induzidas pela cocaína como a fosforilação de CREB a indução de c-fos no estriado (TAKAHASHI et al., 2005). O aumento da expressão de DARPP-32 induzido pelo CTEP pode ser um indício de alterações na sinalização envolvendo essa proteína. No entanto, seria interessante verificar o nível de fosforilação nos dois sítios acima citados nessas amostras. Interessantemente, o efeito do CTEP na expressão gênica de DARPP-32 só ocorreu em animais selvagens.

Como o aumento na expressão de mGluR5 induzido pela combinação de cocaína+CTEP, ou pelo CTEP apenas no caso de animais nocaute, foi observado tanto a nível de mRNA quanto de proteína, é possível verificar que se trata de uma *upregulation* propriamente dita, e não de uma possível menor taxa de degradação do receptor. Possivelmente esse aumento na expressão ocorre como uma resposta compensatória ao bloqueio do receptor. Como camundongos nocaute para espinofilina apresentam sinalização exacerbada em níveis basais, há de se considerar que esse possível efeito compensatório possa ser ainda maior quando o receptor é bloqueado nesses animais, levando ao aumento mais pronunciado observado nos grupos nocaute.

Ainda em relação à sinalização basal mais elevada em camundongos nocautes observada em Di Sebastiano et al., 2016, é possível que esta seja mediada em parte por receptores NMDA com subunidade 2A, visto que no presente estudo foi verificado que animais nocaute para espinofilina apresentam maior expressão desses receptores em relação a animais do tipo selvagem. Dessa forma, é possível que esse aumento de NR2A esteja associado ao aumento nos níveis de Ca^{2+} intracelular, pAkt e pERK.

O presente trabalho apresenta evidências da participação espinofilina bem como do receptor mGluR5 na dependência de cocaína. No entanto, estudos complementares poderiam melhorar a compreensão do potencial efeito do CTEP no tratamento da dependência de cocaína. Nesse sentido, seria interessante avaliar o efeito de diferentes doses de CTEP nos paradigmas já avaliados, bem como, estudar o efeito do CTEP utilizando condicionamento operante em um sistema de auto-administração de cocaína.

12 CONCLUSÕES

- O nocaute da espinofilina previne o desenvolvimento da sensitização comportamental à cocaína;
- O CTEP potencializa a hiperlocomoção induzida por cocaína em camundongos nocautes para espinofilina;
- A espinofilina não é necessária para o desenvolvimento da CPP à cocaína;
- Na dose e regime utilizados, o CTEP não afetou a CPP à cocaína;
- A expressão de mGluR5 é aumentada pelo tratamento com CTEP apenas em camundongos nocaute para espinofilina, enquanto o tratamento combinado de CTEP com cocaína aumenta a expressão de mGluR5 tanto em animais selvagens quanto espinofilina KO.
- O CTEP atenuou a ativação de ERK, AKT e mTOR induzidas pela cocaína, no entanto, essas alterações na sinalização não foram suficientes para afetar o comportamento;
- O nocaute da espinofilina, bem como a administração de CTEP atenuam a indução de c-Fos promovida pela cocaína.

13 CONCLUSÕES GERAIS

No presente trabalho, foi observado que a inalação de crack por 11 dias não altera a memória de reconhecimento de objetos ou a memória espacial de referência, mas causa déficits na memória de trabalho. Além disso, os animais submetidos à inalação de crack apresentam menor interação social, demonstrando, em conjunto, efeitos comportamentais e déficits cognitivos semelhantes ao que ocorrem na esquizofrenia. Adicionalmente, a exposição ao crack altera a expressão gênica e protéica de receptores dopaminérgicos no córtex pré-frontal e no estriado também de forma semelhante a alterações observadas em indivíduos com esquizofrenia. Desta forma, sugerimos que as características comportamentais exibidas por usuários de crack possivelmente resultam de alterações moleculares e bioquímicas semelhantes às que ocorrem na esquizofrenia, e que o mecanismo envolvido nessas alterações comportamentais provavelmente está relacionado com o aumento da razão D2S/D2L e com a redução da expressão de receptores do tipo NMDA no córtex pré-frontal, que também ocorrem na esquizofrenia.

Em relação à segunda parte do trabalho, observou-se que o nocaute da espinofilina previne o desenvolvimento da sensitização comportamental à cocaína e que o CTEP potencializa a hiperlocomoção induzida por cocaína em camundongos nocautes para espinofilina. Adicionalmente, foi verificado que espinofilina não é necessária para o desenvolvimento da CPP à cocaína e, na dose e regime utilizados, o CTEP também não afetou a CPP à cocaína. À nível molecular e bioquímico, a expressão de mGluR5 é aumentada pelo tratamento com CTEP apenas em camundongos nocaute para espinofilina, enquanto o tratamento combinado de CTEP com cocaína aumenta a expressão de mGluR5 tanto em animais selvagens quanto espinofilina KO. Adicionalmente, verificou-se que o nocaute da espinofilina, bem como a administração de CTEP atenuam a indução de c-Fos promovida pela cocaína. Ainda, o co-tratamento com CTEP atenuou a ativação de ERK, AKT e mTOR induzidas pela cocaína, no entanto, essas alterações na sinalização não foram suficientes para afetar o

comportamento. Desta forma, estudos complementares poderiam melhorar a compreensão do potencial efeito do CTEP no tratamento da dependência de cocaína.

14 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S.H.; CADOR, M. Dissociation of psychomotor sensitization from compulsive cocaine consumption. **Neuropsychopharmacology**, v.31, p.563–571, 2006.

AKKERMAN, S.; BLOKLAND, A.; RENEERKENS, O.; VAN GOETHEM, N.P.; BOLLEN, E.; GIJSELAERS, E.J.M.; LIEBEN, C.K.J.; STEINBUSCH, H.W.M.; PRICKAERTS, J. Object recognition testing: Methodological considerations on exploration and discrimination measures. **Behavioural Brain Research**, v. 232, p. 335– 347, 2012.

ALVIM, Isabela Oliveira dos Anjos. Análise da Expressão Gênica e Protéica no Hipocampo de Camundongos Inalados Cronicamente com Crack. 2014. Trabalho de Conclusão de curso – Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo.

AREAL, L.B.; HERLINGER, A.L.; PELIÇÃO, F.S.; MARTINS-SILVA, C.; PIRES, R.G.W. Crack cocaine inhalation induces schizophrenia-like symptoms and molecular alterations in mice pré-frontal cortex. **Journal of Psychiatric Research**, v.91, p.57-63, 2017.

AREAL, L.B.; RODRIGUES, L.C.M.; ANDRICH, F., MORAES, L.S.; CICILINI, M.A.; MENDONÇA, J.B.; PELIÇÃO, F.S.; NAKAMURA-PALACIOS, E.M.; MARTINS-SILVA, C.; PIRES, R.G.W. Behavioural, biochemical and molecular changes induced by chronic crack-cocaine inhalation in mice: The role of dopaminergic and endocannabinoid systems in the prefrontal cortex. **Behav. Brain Res.**, 290, 8–16, 2015.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **DSM-5**: manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 992p.

ANDEN, N.E.; CARLSSON, A.; DAHLSTROEM, A.; FUXE, K.; HILLARP, N.A.; LARSSON, K. Demonstration and mapping out of nigro-neostriatal dopamine neurons. **Life Sci**, v.3, p.523–530, 1964.

AREAL, L.B.; RODRIGUES, L.C.; ANDRICH, F.; MORAES, L.S.; CICILINI, M.A.; MENDONÇA, J.B.; PELIÇÃO, F.S.; NAKAMURA-PALACIOS, E.M.; MARTINS-SILVA, C.; PIRES, R.G.W. Behavioural, biochemical and molecular changes induced by chronic crack-cocaine inhalation in mice: The role of dopaminergic and endocannabinoid systems in the prefrontal cortex. **Behav Brain Res**, v.290, p.8-16, 2015.

BAILEY, J.; MA, D.; SZUMLINSKI, K.K. Rapamycin attenuates the expression of cocaine-induced place preference and behavioral sensitization. **Addiction Biology**, v.17, p.248–258, 2011.

BARNES, A. P.; SMITH, F. D.; 3RD, VANDONGEN, H. M.; VANDONGEN, A. M.; MILGRAM, S. L. The identification of a second actin-binding region in spinophilin/neurabin II. **Brain Res. Mol. Brain Res.** v.124, p.105–113, 2004.

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.

BATEUP, H.S.; SVENNINGSSON, P.; KUROIWA, M.; GONG, S.; NISHI, A.; HEINTZ, N.; GREENGARD, P. Cell type-specific regulation of DARPP-32 phosphorylation by psycho- stimulant and antipsychotic drugs. **Nat Neurosci.** v.11, p.932–939, 2008.

BEAULIEAU, J.M.; GAINETDINOV, R.R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev*, v.63, n.1, p.182-217, 2011.

BEAULIEU, J.M.; GAINETDINOV, R.R.; CARON, M.G. The Akt-GSK-3 signaling cascade in the actions of dopamine. **Trends Pharmacol Sci**, v.28, p.166–172, 2007.

BEAULIEU, J.M.; SOTNIKOVA, T.D.; MARION, S.; LEFKOWITZ, R.J.; GAINETDINOV, R.R.; CARON, M.G. An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. **Cell**, v.122, p.261–273, 2005.

BERHOW, M.T.; HIROI, N.; NESTLER, E.J. Regulation of ERK (extracellular signal regulated kinase), part of the neurotrophin signal transduction cascade, in the rat mesolimbic dopamine system by chronic exposure to morphine or cocaine. **J Neurosci**, v.16, p.4707–4715, 1996.

BIBB, J.A.; SNYDER, G.L.; NISHI, A.; YAN, Z.; MEIJER, L.; FIENBERG, A.A.; TSAI, L.H.; KWON, Y.T.; GIRAULT, J.A.; CZERNIK, A.J.; HUGANIR, R.L.; HEMMINGS, H.C. JR; NAIRN, A.C.; GREENGARD, P. Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. **Nature**, v.402, n.6762, p.669-71, 1999.

BLAHA, C.D.; YANG, C.R.; FLORESCO, S.B.; BARR, A.M.; PHILLIPS, A.G. Stimulation of the ventral subiculum of the hippocampus evokes glutamate receptor-mediated changes in dopamine efflux in the rat nucleus accumbens. **Eur J Neurosci**, v.9, p.902–911, 1997.

BLEAKMAN, D.; GATES, M.R.; OGDEN, A.M.; MACKOWIAK, M. Kainate receptor agonists, antagonists and allosteric modulators. **Curr. Pharm. Dês.**, v. 8, p. 873-885, 2002.

BLISS, T.V.; COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, p. 31-39, 1993.

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.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**. v.72, 248-254, 1976.

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. Goodman & Gilman: As Bases farmacológicas da Terapêutica. 12a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

CALABRESI, P.; PISANI, A.; CENTONZE, D.; BERNARDI, G. Synaptic plasticity and physiological interactions between dopamine and glutamate in the striatum. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 21, p. 519-523, 1997.

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.

CHARLTON, J. J.; ALLEN, P. B.; PSIFOGEORGOU, K.; CHAKRAVARTY, S.; GOMES, I.; NEVE, R. L.; DEVI, L. A.; GREENGARD, P.; NESTLER, E. J.; ZACHARIOU, V. Multiple actions of spinophilin regulate opioid receptor function. **Neuron** v.58, p.238 – 247, 2008.

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.

CHEN, L.; XU, M. Dopamine D1 and D3 receptors are differentially involved in cue-elicited cocaine seeking. **J. Neurochem.**, v.114, p.530–541, 2010.

CHIFANO, 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.

CONN, P. J.; PIN, J. P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v.37, p.205-237, 1997.

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

COSFORD, N.D.; TEHRANI, L.; ROPPE, J.; et al. 3-[(2-Methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl]-pyridine: a potent and highly selective metabotropic glutamate subtype 5 receptor antagonist with anxiolytic activity. **J Med Chem.** v.46 p.204–206, 2003.

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

CRUZ, F.C.; KOYA, E.; GUEZ-BARBER, D.H.; BOSSERT, J.M.; LUPICA, C.R.; SHAHAM, Y.; HOPE, B.T. New technologies for examining the role of neuronal ensembles in drug addiction and fear. **Nature Reviews Neuroscience**, v.14, p. 743–754, 2013.

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.

DAHLSTROEM, A.; FUXE, K. Evidence for the existence of monoamine- containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. **Acta Physiol Scand**, v.232, p.231–255, 1964.

DE MEI, C.; RAMOS, M.; IITAKA, C.; BORRELLI, E. Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. **Curr. Opin. Pharmacol.** v. 9, p.53-58, 2009.

DENK, W.; YUSTE, R.; SVOBODA, K.; TANK, D. W. **Curr. Opin. Neurobiol.** v.6, p.372–378, 1996.

DE VRIES, T.J.; COOLS, A.R.; SHIPPENBERG, T.S. Infusion of a D-1 receptor agonist into the nucleus accumbens enhances cocaine-induced behavioural sensitization. **Neuroreport**, v.9, p.1763–1768, 1998.

DI CHIARA, G.; IMPERATO, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.85, p. 5274-5278, 1988.

DRAGO J.; GERFEN, C.R.; WESTPHAL, H.; STEINER, H. D1 dopamine receptor-deficient mouse: cocaine-induced regulation of immediate-early gene and substance P expression in the striatum. **Neuroscience**, v.74, n.3, p.813-23, 1996.

D'SOUZA, M.S. Glutamatergic transmission in drug reward: implications for drug addiction. **Front Neurosci.**, v.9, p.1-27, 2015.

ELSWORTH, J.D.; ROTH, R.H. Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of Parkinson's disease. **Exp. Neurol.** v.144, p.4-9, 1997.

ENGERT, F.; BONHOEFFER, T. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. **Nature**, v.399, n.6731, p.66-70, 1999.

FERRARIO, C.R.; GORNY, G.; CROMBAG, H.S.; LI, Y.; KOLB, B.; ROBINSON, T.E. Neural and behavioral plasticity associated with the transition from controlled to escalated cocaine use. **Biol Psychiatry**, v.58, p.751–759, 2005.

FISCHER, M.; KAECH, S.; KNUTTI, D.; MATUS, A. Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. **Neuron**. v.20, p.847–854, 1998.

FLORES-HERNANDEZ, J.; CEPEDA, C.; HERNANDEZ-ECHEAGARAY, E.; CALVERT, C.R.; JOKEL, E.S.; FIENBERG, A.A.; GREENGARD, P.; LEVINE, M.S. Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. **J. Neurophysiol.**, v. 88, p. 3010- 3020, 2002.

FLORESCO, S.B.; YANG, C.R.; PHILLIPS, A.G.; BLAHA, C.D. Basolateral amygdala stimulation evokes glutamate receptor-dependent dopamine efflux in the nucleus accumbens of the anesthetised rat. **Eur J Neurosci**, v.10, p. 1241–1251, 1998.

FOURLA, D. D.; PAPAKONSTANTINOY, M. P.; VRANA, S. M.; GEORGOUSI, Z. Selective interactions of spinophilin with the C-terminal domains of the μ - and δ -opioid receptors and G proteins differentially modulate opioid receptor signaling. **Cell. Signal.** v.24, p.2315–2328, 2012.

FREEMAN, W. M.; BREBNER, K.; LYNCH, W. J.; ROBERTSON, D. J.; ROBERTS, D. C. S.; VRANA, K. E. Cocaine-responsive gene expression changes in rat hippocampus. **Neuroscience**, v.108, p.371-380, 2001.

FREMEAU RT JR, KAM K, QURESHI T, JOHNSON J, COPENHAGEN DR, STORM-MATHISEN J, CHAUDHRY FA, NICOLL RA, EDWARDS RH. Vesicular glutamate transporters 1 and 2 target to functionally distinct synaptic release sites. **Science**. v.304, p.1815–9, 2004.

FRENCH, S.J.; TOTTERDELL, S. Individual nucleus accumbens-projection neurons receive both basolateral amygdala and ventral subicular afferents in rats. **Neuroscience**, p.119, v.19-31, 2003.

FRICKS-GLEASON, A.N.; MARSHALL, J.F. Role of dopamine D1 receptors in the activation of nucleus accumbens extracellular signal-regulated kinase (ERK) by cocaine-paired contextual cues. **Neuropsychopharmacology**, v.36, p.434–444, 2011.

FRIEDMAN, E.; JIN, L.Q.; CAI, G.P.; HOLLON, T.R.; DRAGO, J.; SIBLEY, D.R.; WANG, H.Y. D1-like dopaminergic activation of phosphoinositide hydrolysis is independent of D1A dopamine receptors: evidence from D1A knockout mice. **Mol Pharmacol.**, v.51, p.6 –11, 1997.

FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. **J Neurochem**. v.42, p.1–11, 1984.

GAO, C.; WOLF, M. E. Dopamine alters AMPA receptor synaptic expression and subunit composition in dopamine neurons of the ventral tegmental area cultured with prefrontal cortex neurons. **J. Neurosci.** v.27, p.14275–14285, 2007.

GARCIA, R.C.; TORRES, L.H.; BALESTRIN, N.T.; ANDRIOLI, T.C.; FLÓRIO, J.C.; DE OLIVEIRA, C.D.; DA COSTA, J.L.; YONAMINE, M.; SANDOVAL, M.R.; CAMARINI, R.; MARCOURAKIS, T. Anhydroecgonine methyl ester, a cocaine pyrolysis product, may contribute to cocaine behavioral sensitization. **Toxicology.** v.1, n.376, p.44-50, 2017.

GARCIA, Rafael Caio Tamboreli. Efeitos neurodegenerativos da metilecgonidina e da cocaína em cultura celular primária de hipocampo. 2009. 140 f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo, São Paulo.

GARCÍA-PARDO, M.P.; ROGER-SANCHEZ, C.; RODRÍGUEZ-ARIAS, M.; MIÑARRO, J.; AGUILAR, M.A. Pharmacological modulation of protein kinases as a new approach to treat addiction to cocaine and opiates. **European Journal of Pharmacology**, v.781, p.10–24, 2016.

GASPARINI, F.; LINGENHOHL, K.; STOEHR, N.; et al. 2-Methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP), a potent, selective and systemically active mGlu5 receptor antagonist. **Neuropharmacology.** v.38, p.1493–1503, 1999.

GERBER, U.; GEE, C. E.; BENQUET, P. Metabotropic glutamate receptors: intracellular signaling pathways. **Curr. Opin. Pharmacol.** v.7, n.1, p.56-61, 2007.

GHASEMZADEH, M. B.; NELSON, L. C.; LU, X.-Y.; KALIVAS, P. W. Neuroadaptations in ionotropic and metabotropic glutamate receptor mRNA produced by cocaine treatment. **J. Neurochem.**, v.72, p.157-165, 1999.

GOLDSTEIN, R. Z.; VOLKOW, N. D. Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. **Nature reviews Neuroscience**, v. 12, n. 11, p. 652 –69, 2011.

GOLDSTEIN, R.Z.; VOLKOW, N.D. Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. **Am J Psychiatry**, v.159, n.10, p.1642-52, 2002.

GOMES, E.F.; LIPAUS, I.F.S.; MARTINS, C.W.; ARAÚJO, A.M.; MENDONÇA, J.B.; PELIÇÃO, F.S.; LEBARCH, E.C.; RODRIGUES, L.C.M.; NAKAMURA-PALACIOS, E.M. Anhydroecgonine Methyl Ester (AEME), a Product of Cocaine Pyrolysis, Impairs Spatial Working Memory and Induces Striatal Oxidative Stress in Rats. **Neurotox Res**, p.1-14, 2017.

GRAYBIEL, A.M.; MORATALLA, R.; ROBERTSON, H.A. Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.87, p.6912–6916, 1990.

GREENGARD, P. The neurobiology of slow synaptic transmission. **Science**, v.294, p.1024 –1030, 2001.

GREENGARD, P.; ALLEN, P.B.; NAIRN, A.C. Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. **Neuron**, v.23, p.435–447, 1999.

GROSSMAN, S. D.; FUTTER, M.; SNYDER, G. L.; ALLEN, P. B.; NAIRN, A. C.; GREENGARD, P.; HSIEH-WILSON, L. C. Spinophilin is phosphorylated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II resulting in regulation of its binding to F-actin. **J. Neurochem.** v.90, p.317–324, 2004.

GROSSMAN, S. D.; HSIEH-WILSON, L. C.; ALLEN, P.B.; NAIRN, A. C.; GREENGARD, P. The actin-binding domain of spinophilin is necessary and sufficient for targeting to dendritic spines. **Neuromolecular Med.** v.2, p.61–69, 2002.

GUSMÃO, I.D.; MONTEIRO, B.M.M.; CORNELIO, G.O.S.; FONSECA, C.S.; MORAES, M.F.D.; PEREIRA, G.S., Odor-enriched environment rescues long-term social memory, but does not improve olfaction in social isolated adult mice. **Behav. Brain Res.** v.228, p.440-446, 2012.

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.

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

HASBI, A.; FAN, T.; ALIJANIARAM, M.; NGUYEN, T.; PERREAULT, M.L.; O'DOWD, B.F., et al. Calcium signaling cascade links dopamine D1–D2 receptor heteromer to striatal BDNF production and neuronal growth. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.106, p.21377–21382, 2009.

HARRIS, K.M. Structure, development, and plasticity of dendritic spines. **Curr Opin Neurobiol.**, v.9, n.3, p.343-8, 1999.

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.

HERCULIANI, P.P.; PIRES-NETO, R.C.; BUENO, H.M.S.; ZORZETTO, J.C.; SILVA, L.C.; SANTOS, A.B.G.; GARCIA, R.C.T.; YONAMINE, M.; DETREGIACHI, C.R.P.; SALDIVA, P.H.N.; MAUAD, T. Effects of chronic exposure to crack cocaine on the respiratory tract of mice. **Toxicol. Pathol.** v.37, p.324-332, 2009.

HERMANS, E.; CHALLISS, R. A. Structural, signalling and regulatory properties of the group I metabotropic glutamate receptors: prototypic family C G-protein-coupled receptors. **Biochem. J.** v.359, p.465-484, 2001.

HERNANDEZ-LOPEZ, S.; TKATCH, T.; PEREZ-GARCI, E.; GALARRAGA, E.; BARGAS, J.; HAMM, H.; SURMEIER, D.J. D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca² currents and excitability via a novel PLC[β 1]-IP3-calcineurin-signaling cascade. **J Neurosci**, v.20, p. 8987–8995, 2000.

HERZIG, V.; SCHMIDT, W. J. Effects of MPEP on locomotion, sensitization and conditioned reward induced by cocaine or morphine. **Neuropharmacology**. v.47, n.7, p.973–984, 2004.

HNASKO, T. S.; HJELMSTAD, G. O.; FIELDS, H. L.; EDWARDS, R. H. Ventral tegmental area glutamate neurons: electrophysiological properties and projections. **J. Neurosci.** v.32, p.15076–15085, 2012.

HOFFMAN, G.E.; SMITH, M.S.; VERBALIS, J.G. c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. **Front Neuroendocrinol**, v.14, n.3, 173-213, 1993.

HOLLMANN, M.; HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 17, p.31–108, 1994.

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

HOWES, O.D.; KAPUR, S. The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III: the final common pathway. **Schizophr. Bull.** v.35, p.549-56, 2009.

HUESTIS, M.A.; DARWIN, W.D.; SHIMOMURA, E.; LALANI, S.A.; TRINIDAD, D.V.; JENKINS, A.J.; CONE, E.J.; JACOBS, A.J.; SMITH, M.L.; PAUL, B.D. Cocaine and metabolites urinary excretion after controlled smoked administration. **J. Anal Toxicol.**, v.31, n.8, p.462-8, 2007.

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.

I Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 107 maiores cidades do país : 2001 / E.A. Carlini [et al.]. -- São Paulo : CEBRID – Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas Psicotrópicas : UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo, 2002.

II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil : estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país : 2005 / E. A. Carlini (supervisão) [et. al.], -- São Paulo : CEBRID - Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas: UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo, 2006.

II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD) – 2012. Ronaldo Laranjeira (Supervisão) [et al.], São Paulo: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD), UNIFESP. 2014

JENKINS, A.J.; KEENAN, R.M.; HENNINGFIELD, J.E.; CONE, E.J. Correlation between pharmacological effects and plasma cocaine concentrations after smoked administration. **J Anal Toxicol.** v.26, n.7, p.382-92, 2002.

JONES, C.; WATSON, D.; FONE, K. Animal models of schizophrenia. **Br. J. Pharmacol.**, v.164, p.1162-1194, 2011.

KAALUND, S.S.; NEWBURN, E.N.; YE, T.; TAO, R.; LI, C.; DEEP-SOBOSLAY, A.; HERMAN, M.M. HYDE, T.M.; WEINBERGER, D.R.; LIPSKA, B.K.; KLEINMAN, J.E. Contrasting changes in DRD1 and DRD2 splice variant expression in schizophrenia and affective disorders, and associations with SNPs in postmortem brain. **Mol. Psychiatry**. v.19, p.1258-1266, 2014.

KAALUND, S.S.; NEWBURN, E.N.; YE, T.; TAO, R.; LI, C.; DEEP-SOBOSLAY, A.; HERMAN, M.M. HYDE, T.M.; WEINBERGER, D.R.; LIPSKA, B.K.; KLEINMAN, J.E. Contrasting changes in DRD1 and DRD2 splice variant expression in schizophrenia and affective disorders, and associations with SNPs in postmortem brain. **Mol. Psychiatry**. v.19, p.1258-1266, 2014.

KALIVAS, P. W. Recent understanding in the mechanisms of addiction. **Curr. Psychiatry Rep.**, v.6, p.347–351, 2004.

KALIVAS, P. W. The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. **Nat. Rev. Neurosci.** v.10, p.561–572, 2009.

KALIVAS, P. W.; DUFFY, P. D1 receptors modulate glutamate transmission in the ventral tegmental area. **J. Neurosci.** v.15, p. 5379–5388, 1995.

KALIVAS, P. W.; DUFFY, P. Repeated cocaine administration alters extracellular glutamate in the ventral tegmental area. **J. Neurochem.** v.70, p.1497–1502, 1998.

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.

KALIVAS, P.W.; O'BRIEN, C. Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. **Neuropsychopharmacology**, v.33, n.1, p.166-80, 2008.

KALIVAS, P.W.; VOLKOW, N.; SEAMANS, J. Unmanageable motivation in addiction: a pathology in prefrontal-accumbens glutamate transmission. **Neuron**, v.45, p.647-650, 2005.

KALLEL, L.; MONDINO, M.; BRUNELIN, J. Effects of theta-rhythm transcranial alternating current stimulation (4.5 Hz-tACS) in patients with clozapine-resistant negative symptoms of schizophrenia: a case series. **J. Neural Transm.** v.123, p.1213-1217, 2016.

KAUER, J. A. Learning mechanisms in addiction: Synaptic plasticity in the ventral tegmental area as a result of exposure to drugs of abuse. **Annu. Rev. Physiol.**, v.66, p. 447-475, 2004.

KELZ, M.B.; CHEN, J.; CARELZON, W.A.; WHISLER, K.; GILDEN, L.; BECKMANN, A.M.; STEFFEN, C.; ZHANG, Y.J.; MAROTTI, L.; SELF, D.W.; TKATCH, T.; BARANAUSKAS, G.; SURMEIER, D.J.; NEVE, R.L.; DUMAN, R.S.; PICCIOTTO, M.R.; NESTLER, E.J. Expression of the transcription factor deltaFosB in the brain controls sensitivity to cocaine. **Nature**, v,401, 272–276, 1999.

KESSLER, F.H.P.; TERRA, M.B.; FALLER, S.; STOLF, A.R.; PEUKER, A.C.; BENZANO, D.; PECHANSKY, F. Crack users show high rates of antisocial personality disorder, engagement in illegal activities and other psychosocial problems. **Am. J. Addict.**, v.21, p.370–380, 2012.

KENNY, P. J.; BOUTREL, B.; GASPARINI, F.; KOOB, G. F.; MARKOU, A. Metabotropic glu- tamate 5 receptor blockade may attenuate cocaine self-administration by decreasing brain reward function in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v.179, n.1, p.247–254, 2005.

KENNY, P. J.; MARKOU, A. The ups and downs of addiction: role of metabotropic glutamate receptors. **Trends Pharmacol. Sci.** v.25, n.5, p.265-272, 2004.

KILUK, B.D.; NICH, C.; BABUSCIO, T.; CARROLL, K.M. Quality versus quantity: acquisition of coping skills following computerized cognitive-behavioral therapy for substance use disorders. **Addiction**. v.105, n.12, p.2120-7, 2010.

KIM, C.H.; LEE, J.; LEE, J.Y.; ROCHE, K.W. Metabotropic glutamate receptors: phosphorylation and receptor signaling. **J Neurosci Res**. v. 86, p.1–10, 2008.

KIM, S.; SHIN, J.K.; YOON, H.S.; KIM, J.H. Blockade of ERK phosphorylation in the nucleus accumbens inhibits the expression of cocaine-induced behavioral sensitization in rats. Korean. **J. Physiol. Pharmacol.**, v.15, p.389–395, 2011.

KNAB, A.M.; LIGHTFOOT, J.T. Does the difference between physically active and couch potato lie in the dopamine system? *Int J Biol Sci.* v.6, n.2, p.133–150, 2010.

KNACKSTEDT, L.A.; KALIVAS, P.W. Extended access to cocaine self-administration enhances drug-primed reinstatement but not behavioral sensitization. **J Pharmacol Exp Ther**, v.322, p.1103–1109, 2007.

KNACKSTEDT, L.A.; MOUSSAWI, K.; LALUMIERE, R.; SCHWENDT, M.; KLUGMANN, M.; KALIVAS PW. Extinction training after cocaine self-administration induces glutamatergic plasticity to inhibit cocaine seeking. **J Neurosci.** v.30, p.7984–7992, 2010.

KREBS, H.A. Metabolism of amino-acids: The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. **Biochem J.**, v.29, p.1951–69, 1935.

KUMARESAN, V.; YUAN, M.; YEE, J.; FAMOUS, K.R.; ANDERSON, S.M.; SCHMIDT, H.D.; PIERCE, R.C. Metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) antagonists attenuate cocaine priming- and cue-induced reinstatement of cocaine seeking. **Behav Brain Res**, v.202, n.2, p.238-44, 2009.

LADEPECHE, L.; DUPUIS, J. P.; BOUCHET, D.; DOUDNIKOFF, E.; YANG, L.; CAMPAGNE, Y., et al. Single-molecule imaging of the functional crosstalk between surface NMDA and dopamine D1 receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v.110, p.18005–18010, 2013.

LEE, K.-W.; KIM, Y.; KIM, A. M.; HELMIN, K.; NAIRN, A. C.; GREENGARD, P. Cocaine-induced dendritic spine formation in D1 and D2 dopamine receptor-containing medium spiny neurons in nucleus accumbens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.103, p.3399-3404, 2006.

LEE, S.P.; SO, C.H.; RASHID, A.J.; VARGHESE, G.; CHENG, R.; LANC, A.J, O'DOWD, B.F.; GEORGE, S.R. Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. **J Biol Chem.**, v.279, p.35671–35678, 2004.

LENOIR, M.; AHMED, S.H. Heroin-induced reinstatement is specific to compulsive heroin use and dissociable from heroin reward and sensitization. **Neuropsychopharmacology**, v.32, p.616–624, 2007.

LEVANDOWSKI, M.L., HESS, A.R.B., GRASSI-OLIVEIRA, R., DE ALMEIDA, R.M.M. Plasma interleukin-6 and executive function in crack cocaine-dependent women. **Neurosci. Lett.** v.628, p.85-90, 2016.

LINDEMANN, L.; JAESCHKE, G.; MICHALON, A.; VIEIRA, E.; HONER, M.; SPOOREN, W.; PORTER, R.; HARTUNG, T.; KOLCZEWSKI, S.; BÜTTELMANN, B.; FLAMENT, C.; DIENER, C.; FISCHER, C.; GATTI, S.; PRINSSSEN, E.P.; PARROTT, N.; HOFFMANN, G.; WETTSTEIN, J.G. CTEP: a novel, potent, long-acting, and orally bioavailable metabotropic glutamate receptor 5 inhibitor. **J Pharmacol Exp Ther.** v.339, n.2, p.474-486, 2011.

LINDGREN, N.; USIELLO, A.; GOINY, M.; HAYCOCK, J.; ERBS, E.; GREENGARD, P.; HOKFELT, T.; BORRELLI, E.; FISONE, G. Distinct roles of dopamine D2L and D2S receptor isoforms in the regulation of protein phosphorylation at presynaptic and postsynaptic sites. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v.100, 4305-4309, 2003.

MALETIC-SAVATIC, M.; MALINOW, R.; SVOBODA, K. Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. **Science.**, v.283, n.5409, p.1923-7, 1999.

MALHOTRA, A.K.; PINALS, D.A.; WEINGARTNER, H.; SIROCCO, K.; MISSAR, C.D.; PICKAR, D.; BREIER, A. NMDA receptor function and human cognition: the effects of ketamine in healthy volunteers. **Neuropsychopharmacology**, v.14, n.5, p.301-307, 1996.
MARANDA, M.J.; HAN, C.; RAINONE, G.A. Crack cocaine and sex. **J Psychoactive Drugs.** v.36, n.3, p.315-22, 2004.

MARTIN-FARDON, R.; BAPTISTA, M.A.; DAYAS, C. V.; WEISS, F. Dissociation of the effects of MTEP [3-[(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl]piperidine] on conditioned reinstatement and reinforcement: comparison between cocaine and a conventional reinforcer. **J Pharmacol Exp Ther** v.329, n.3, p.1084–1090, 2009.

MARTIN-FARDON, R.; WEISS, F. (-)-2-oxa-4-aminobicyclo[3.1.0]hexane-4,6-dicarboxylic acid (LY379268) and 3-[(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl] piperidine (MTEP) similarly attenuate stress-induced reinstatement of cocaine seeking. **Addict Biol**, v.17, n.3, p.557–564, 2012.

MATHIESEN, J.M.; SVENDSEN, N.; BRAUNER-OSBORNE, H.; THOMSEN, C.; RAMIREZ, M.T. Positive allosteric modulation of the human metabotropic glutamate receptor 4 (hmGluR4) by SIB-1893 and MPEP. **Br J Pharmacol.**, v.138, p1026–1030, 2003.

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.

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, 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.

MISSALE, C.; NASH, S.R.; ROBINSON, S.W.; JABER, M.; CARON, M.G. Dopamine receptors: from structure to function. **Physiol Rev** v.78, p.189–225, 1998.

MOHN, A.R.; GAINETDINOV, R.R.; CARON, M.G.; KOLLER, B.H. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. **Cell**, v.98, p.427-436, 1999.

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.

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

MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **J. Neurosci. Methods.** v.11, p.47–60, 1984.

MORTON, W.A. Cocaine and psychiatric symptoms. **J. Clin. Psychiatry.** v.1, p.109-113, 1999.

MOVSESYAN, V.A.; O'LEARY, D.M.; FAN, L.; et al. mGluR5 antagonists 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine and (E)-2-methyl-6-(2-phenylethenyl)-pyridine reduce traumatic neuronal injury in vitro and in vivo by antagonizing N-methyl-D-aspartate receptors. **J Pharmacol Exp Ther.** v.296, p.41–47, 2001.

NAIR-ROBERTS, R.G.; CHATELAIN-BADIE, S.D.; BENSON, E.; WHITE-COOPER, H.; BOLAM, J.P.; UNGLESSA, M.A. Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. **Neuroscience**, v.152, n.4-2, p.1024–1031, 2008.

NAKAMURA-PALACIOS, E.M.; LOPES, I.B.C.; SOUZA, R.A.; KLAUSS, J.; BATISTA, E.K.; CONTI, C.L.; MOSCON, J.A.; DE SOUZA, R.S.M. Ventral medial prefrontal cortex (vmPFC) as a target of the dorsolateral prefrontal modulation by transcranial direct current stimulation (tDCS) in drug addiction. **J. Neural Transm.** v.123, n.10, p.1179-94, 2016.

NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE, Principles of Drug Addiction Treatment: A Research-Based Guide. Disponível em:
<<https://www.drugabuse.gov/publications/principles-drug-addiction-treatment-research-based-guide-third-edition/frequently-asked-questions/what-drug-addiction-treatment>>. Acesso em 8 de abril de 2018.

NEASTA, J.; BARAK, S.; HAMIDA, S.B.; RON, D. mTOR Complex 1: A Key Player in Neuroadaptations Induced by Drugs of Abuse. **J Neurochem.** v.130, n2, p.172–184, 2014.

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. 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. Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiol Learn Mem.* v.78, n.3, p.637-47, 2002.

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

NISHI, A.; WATANABE, Y.; HIGASHI, H.; TANAKA, M.; NAIRN, A.C.; Greengard, P. Glutamate regulation of DARPP-32 phosphorylation in neostriatal neurons involves activation of multiple signaling cascades. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.102, n.4, p.1199–1204, 2005.

NISWENDER, C. M.; CONN, P. J. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* v.50, p.295–322, 2010.

NIYUHIRE, F.; VARVEL, S.A.; THORPE, A.J.; STOKES, R.J.; WILEY, J.L.; LICHTMAN, A.H. The disruptive effects of the CB1 receptor antagonist rimonabant on extinction learning in mice are task-specific. *Psychopharmacol. Berl.* v.191, p.223-231, 2007.

NOWAK, L.; BREGESTOVSKI, P.; ASCHER, P.; HERBET, A.; PROCHIANTZ, A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, v. 307, p. 462-465, 1984.

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.

OLNEY, J. W. New mechanisms of excitatory transmitter neurotoxicity. *J. Neural Transm.* v.43, p.47-51, 1994.

O'SHEA, R. D. Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* v.29, p.1018–1023, 2002.

PANG ZP, SUDHOF TC. Cell biology of Ca²⁺-triggered exocytosis. *Curr Opin Cell Biol.* v.22, p.496– 505, 2010.

PASCOLI, V.; TERRIER, J.; ESPALLERGUES, J.; VALJENT, E.; O'CONNOR, E.C.; LUSCHER, C. Contrasting forms of cocaine-evoked plasticity control components of relapse. **Nature**, v.509, p.459-464, 2014.

PIERCE, R. C.; BELL, K.; DUFFY, P.; KALIVAS, P. W. Repeated cocaine augments excitatory amino acid transmission in the nucleus accumbens only in rats having developed behavioral sensitization. **J. Neurosci.** v.16, p.1550–1560, 1996.

PIN, J. P.; GALVEZ, T.; PREZEAU, L. Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. **Pharmacol. Ther.** v.98, n.3, p.325-354, 2003.

PIN, J. P.; DUVOISIN, R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. **Neuropharmacology.** v.34, p.1–26, 1995.

PINHEIRO PS, MULLE C. Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. **Nat Rev Neurosci.** v.9, p.423–36, 2008.

POMIERNY-CHAMIOLO, A. L.; MISZKIELB, J.; FRANKOWSKAB, M.; BYSTROWSKAA, B.; FILIPB, M. Cocaine self-administration, extinction training and drug-induced relapse change metabotropic glutamate mGlu5 receptors expression: Evidence from radioligand binding and immunohistochemistry assays. **Brain Research**, v.1655, p. 66–76, 2017.

POMIERNY-CHAMIOLOA, L.; MISZKIELB, J.; FRANKOWSKAB, M.; BYSTROWSKAA, B.; FILIP, M. Cocaine self-administration, extinction training and drug-induced relapse change metabotropic glutamate mGlu5 receptors expression: Evidence from radioligand binding and immunohistochemistry assays. **Brain Research**, v.1655, p.66–76, 2017.

PRADO, V.F.; MARTINS-SILVA, C.; DE CASTRO, B.M.; LIMA, R.F.; BARROS, D.M.; AMARAL, E.; RAMSEY, A.J.; SOTNIKOVA, T.D.; RAMIREZ, M.R.; KIM, H.-G.; ROSSATO, J.I.; KOENEN, J.; QUAN, H.; COTA, V.R.; MORAES, M.F.D.; GOMEZ, M.V.; GUATIMOSIM, C.; WETSEL, W.C.; KUSHMERICK, C.; PEREIRA, G.S.; GAINETDINOV, R.R.; IZQUIERDO, I.; CARON, M.G.; PRADO, M.A.M. Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. **Neuron.** v.51, p.601-612, 2006.

PURVES D, AUGUSTINE GJ, FITZPATRICK D, et al. **Neuroscience 2nd edition**. Sunderland: Sinauer Associates, 2001.

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. ed) **Dopamine Handbook**. New York: Oxford University Press, 2004. p.63–87.

RASHID, A.J.; SO, C.H.; KONG, M.M.; FURTAK, T.; EL-GHUNDI, M.; CHENG, R., et al. D1–D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.104, p.654–659, 2007.

RATTO, L., & CORDEIRO, D.C. Principais comorbidades psiquiátricas na dependência química. In: S. Bordin, N. B. Figlie & R. Laranjeira (Orgs.), **Aconselhamento em dependência química**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.167-186.

REDA, K.K. Cocaine, marijuana, designer drugs: chemistry, pharmacology and behavior. Boca Raton: CRC Press, p.43-72, 1989.

REID, M. S.; HSU, K. JR.; BERGER, S. P. Cocaine and amphetamine preferentially stimulate glutamate release in the limbic system: studies on the involvement of dopamine. **Synapse** v 27, p.95–105, 1997.

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.; KUHAR, 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.

ROBBINS, T.W.; ERSCHKE, K.D.; EVERITT, B.J. Drug addiction and the memory systems of the brain. **Ann N Y Acad Sci.**, v.1141, p.1-21, 2008.

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

RONDOU, P.; HAEGEMAN, G.; VAN CRAENENBROECK, K. The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties. **Cell Mol Life Sci.** 67:1971–1986, 2010.

RUSSO, S.J.; NESTLER, E.J. The brain reward circuitry in mood disorders. **Nat Rev Neurosci.** v.14, n.9, p.609-25, 2013.

SANVICENTE-VIEIRA, B.; KOMMERS-MOLINA, J.; DE NARDI, T.; FRANCKE, I.; GRASSI-OLIVEIRA, R. Crack-cocaine dependence and aging: effects on working memory. **Rev. Bras. Psiquiatr.** v.38, p.58-60, 2016.

SATOH, A.; NAKANISHI, H.; OBAISHI, H.; WADA, M.; TAKAHASHI, K.; SATOH, K.; HIRAO, K.; NISHIOKA, H.; HATA, Y.; MIZOGUCHI, A., et al. Neurabin-II/spinophilin. An actin filament-binding protein with one pdz domain localized at cadherin-based cell-cell adhesion sites. **J. Biol. Chem.** v.273, p.3470–3475, 1998.

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.

SCHWARTZ, T.L.; SACHDEVA, S.; STAHL, S.M. Glutamate neurocircuitry: theoretical underpinnings in schizophrenia. **Front. Pharmacol.** v.3, p.1-11, 2012.

SEAL, R.P.; EDWARDS, R.H. The diverse roles of vesicular glutamate transporter 3. **Handb Exp Pharmacol.** v.175, p.137-50, 2006.

SEEMAN, P. Dopamine D2 receptors as treatment targets in schizophrenia. **Clin. Schizophr. Relat. Psychoses**, v.4, p.56-73, 2010.

SESACK, S.R.; GRACE, A.A. Cortico-basal ganglia reward network: microcircuitry. **Neuropsychopharmacology**, v.35, p.27-47, 2010.

SILVA, C.R.; KOLLING, N.M.; CARVALHO, J.C.N.; CUNHA, S.M.; KRISTENSEN, C.H. Comorbidade psiquiátrica em dependentes de cocaína/crack e alcoolistas: um estudo exploratório. **Aletheia**, v.30, p.101-112, 2009.

- SMITH, J. A.; MO, Q.; GUO, H.; KUNKO, P. M.; ROBINSON, S. E. Cocaine increases extraneuronal levels of aspartate and glutamate in the nucleus accumbens. **Brain Res.** v.683, p.264–269, 1995.
- SOKOLOFF, P.; DIAZ, J.; LE FOLL, B.; GUILLIN, O.; LERICHE, L.; BEZARD, E.; GROSS, C. The dopamine D3 receptor: a therapeutic target for the treatment of neuropsychiatric disorders. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v.5, p.25–43, 2006.
- STAHL, S.M. Beyond the dopamine hypothesis to the NMDA glutamate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. **CNS Spectr.** v.12, n.4, p.265-268, 2007.
- 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.
- STONE, J.M.; MORRISON, P.D.; PILOWSKY, L.S. Glutamate and dopamine dysregulation in schizophrenia - a synthesis and selective review. **J. Psychopharmacol.**, v.21, p.440-452, 2007.
- STOPPEL L.J.; AUERBACH, B.D.; SENTER, R.K.; PREZA, A.R. LEFKOWITZ, R.J.; BEAR, M.F. B-arrestin2 couples metabotropic glutamate receptor 5 to neuronal protein synthesis and is a potential target to treat fragile X. **Cell Reports.**, v.18, p.2807–2814, 2017.
- STUBER, G. D.; HNASKO, T. S.; BRITT, J. P.; EDWARDS, R. H.; BONCI, A. Dopaminergic terminals in the nucleus accumbens but not the dorsal striatum corelease glutamate. **J. Neurosci.**, v.30, p.8229–8233, 2010.
- STUBER, G.D.; SPARTA, D.R.; STAMATAKIS, A.M.; et al. Excitatory transmission from the amygdala to nucleus accumbens facilitates reward seeking. **Nature**, v.475, p.377-380, 2011.
- SUDHOF TC, ROTHMAN JE. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. **Science.** v.323, p.474–7, 2009.

SVENNINGSSON P.; NISHI, A.; FISONE, G.; GIRAULT, J.A.; NAIRN, A.C.; GREENGARD, P. DARPP-32: an integrator of neurotransmission. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.44, p.269–296, 2004.

SWANSON L.W. The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. **Brain Res Bull**, v.9, p.321–353, 1982.

SZUMLINSKI, K.K.; KALIVAS, P.W.; WORLEY, P.F. Homer proteins: implications for neuropsychiatric disorders. **Curr Opin Neurobiol**. v.16, p.251–257, 2006.

TAKAHASHI, S.; OHSHIMA, T.; CHO, A.; SREENATH, T.; IADAROLA, M.J. et al. Increased activity of cyclin-dependent kinase 5 leads to attenuation of cocaine-mediated dopamine signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.102, p.1737–1742, 2005.

TERRY-LORENZO, R. T.; CARMODY, L. C.; VOLTZ, J. W.; CONNOR, J. H.; LI, S., SMITH, F. D.; MILGRAM, S. L.; COLBRAN, R. J.; AND SHENOLIKAR, S. The neuronal actin-binding proteins, neurabin I and neurabin II, recruit specific isoforms of protein phosphatase-1 catalytic subunits. **J. Biol. Chem**. v.277, p.27716–27724, 2002.

TESSARI, M., PILLA, M.; ANDREOLI, M.; HUTCHESON, D.M.; HEIDBREDE, C. A. Antagonism at metabotropic glutamate 5 receptors inhibits nicotine- and cocaine-taking behaviours and prevents nicotine-triggered relapse to nicotine-seeking. **Eur J Pharmacol** v.499, p.121–133, 2004.

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.

TZSCHENTKE, T.M.; SCHMIDT, W.J. Functional relationship among medial prefrontal cortex, nucleus accumbens, and ventral tegmental area in locomotion and reward. **Crit Rev Neurobiol**, v.14, p.131–142, 2000.

UNGLESS, M. A.; WHISTLER, J. L.; MALENKA, R. C.; BONCI, A. Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. **Nature**, v.411, p.583-587, 2001.

United Nations Office on Drugs and Crime, **World Drug Report 2016** (United Nations publication, Sales No. E.16.XI.7).

United Nations Office on Drugs and Crime, **World Drug Report 2017** (United Nations publication, Sales No. E.17.XI.6).

VALJENT, E.; CORVOL, J.C.; PAGES, C.; BESSON, M.J.; MALDONADO, R.; CABOCHÉ, J. Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine- rewarding properties. **J Neurosci**, v.20, p.8701–8709, 2000.

VALLONE, D.; PICETTI, R.; BORRELLI, E. Structure and function of dopamine receptors. **Neurosci Biobehav Rev**, v.24, p.125–132, 2000.

VAN HUIJSTEE, A. N.; AND MANSVELDER, H. D. Glutamatergic synaptic plasticity in the mesocorticolimbic system in addiction. **Front. Cell. Neurosci.**, v.8, p.466, 2014.

VASCONCELOS, S.C.; SANTOS, A.R.; GUERRA, A.L.A.G.; NASCIMENTO, V.S.; LIMA, M.D.C.; ALBUQUERQUE, J.F.; FRAZÃO, I.S. Psychiatric Disorders in Crack and Cocaine Addicts. **American Journal of Nursing Research**, v.2, n. 3, p.31-37, 2014.

WAKABAYASHI, K. T.; KIYATKIN, E. A. Rapid changes in extracellular glutamate induced by natural arousing stimuli and intravenous cocaine in the nucleus accumbens shell and core. **J. Neurophysiol.** v.108, p.285–299, 2012.

WANG, J.; O'DONNELL, P. D(1) dopamine receptors potentiate nmda-mediated excitability increase in layer V prefrontal cortical pyramidal neurons. **Cereb. Cortex**, v. 11, p. 452-462, 2001.

WANG, Q.; LIMBIRD, L.E. Regulation of α_2 AR trafficking and signaling by interacting proteins. **Biochem Pharmacol.** v.73, n.8, p.1135-1145, 2007.

WANG, Q.; ZHAO, J.; BRADY, A. E.; FENG, J.; ALLEN, P. B.; LEFKOWITZ, R. J.; GREENGARD, P.; LIMBIRD, L. E. Spinophilin blocks arrestin actions *in vitro* and *in vivo* at G protein-coupled receptors. **Science** v.304, p.1940 –1944, 2004.

WEST, A.R.; GRACE, A.A. Opposite influences of endogenous dopamine D1 and D2 receptor activation on activity states and electrophysiological properties of striatal neurons: studies combining in vivo intracellular recordings and reverse microdialysis. **J. Neurosci.**, v. 22, p. 294-304, 2002.

WOLF, M. E.; MANGIAVACCHI, S.; SUN, X. Mechanisms by which dopamine receptors may influence synaptic plasticity. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v.1003, p.241–249, 2003.

WU, J.; MCCALLUM, S.E.; GLICK, S.D.; HUANG, Y. Inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway by rapamycin blocks cocaine-induced locomotor sensitization. **Neuroscience**, v.172, p.104-109, 2011.

YUSTE, R.; MAJEWSKA, A.; CASH, S. S.; DENK, W. Mechanisms of Calcium Influx into Hippocampal Spines: Heterogeneity among Spines, Coincidence Detection by NMDA Receptors, and Optical Quantal Analysis. **J. Neurosci.** v.19, p.1976 –1987, 1999.

ZHANG, L.; LOU, D.; JIAO, H.; ZHANG, D.; WANG, X.; XIA, Y.; ZHANG, J.; XU, M. Cocaine-induced intracellular signaling and gene expression are oppositely regulated by the dopamine D1 and D3 receptors. **J Neurosci**, v.24, p.3344–3354, 2004.

ZHANG, X.; LEE, T.H.; DAVIDSON, C.; LAZARUS, C.; WETSEL, W.C.; ELLINWOOD, E.H. Reversal of cocaine-induced behavioral sensitization and associated phosphorylation of the NR2B and GluR1 subunits of the NMDA and AMPA receptors. **Neuropsychopharmacology**, v.32, p.377–387, 2007.

ZHU, S.; PAOLETTI, P. Allosteric modulators of NMDA receptors: multiple sites and mechanisms. **Curr. Opin. Pharmacol.** v.20, p.14–23, 2015.

ZITO, K.; KNOTT, G.; SHEPHERD, G. M.; SHENOLIKAR, S.; SVOBODA, K. Induction of spine growth and synapse formation by regulation of the spine actin cytoskeleton. **Neuron** v.44, p.321–334, 2004.