



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**CRACK: DO EFEITO PSICOESTIMULANTE AO TRATAMENTO, UM NOVO
MODELO EXPERIMENTAL DE DROGAS DE ABUSO**

NÍVEA KARLA DE GUSMÃO TAVEIROS SILVA

MACEIÓ-AL

2016

NÍVEA KARLA DE GUSMÃO TAVEIROS SILVA

**CRACK: DO EFEITO PSICOESTIMULANTE AO TRATAMENTO, UM NOVO
MODELO EXPERIMENTAL DE DROGAS DE ABUSO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Orientador: Olagide Wagner de Castro
Coorientador: Marcelo Duzzioni**

MACEIÓ-AL

2016

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

S586c Silva, Nívea Karla de Gusmão Taveiros.
Crack: do efeito psicoestimulante ao tratamento, um novo modelo experimental de drogas de abuso / Nívea Karla de Gusmão Taveiros Silva. – 2016.
86 f.; il.

Orientador: Olagide Wagner de Castro.
Coorientador: Marcelo Duzzioni.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2016.

Bibliografia: f. 74-84.
Anexos: f. 85.

1. Droga – Toxicologia. 2. Crack. 2. Ansiedade. 3. Depressão.
4. Epilepsia. 5. *Citrus limon*. I. Título.

CDU: 615.32

Folha de Aprovação

Nívea Karla de Gusmão Taveiros Silva

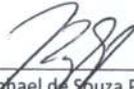
Crack: do efeito psicoestimulante ao tramento, um novo modelo experimental de drogas de abuso

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 22 de fevereiro de 2016.

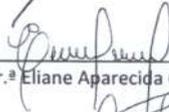


Prof. Dr. Olagide Wagner de Castro (Orientador)

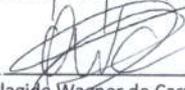
Banca Examinadora



Prof. Dr. Raphael de Souza Pinto – (CESMAC)



Prof.ª Dr.ª Eliane Aparecida Campesatto – (UFAL)



Prof. Dr. Olagide Wagner de Castro - (UFAL)

*Dedico a todos que acreditaram
em mim, quando eu mesma não acreditei.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre me por à prova e me mostrar o quanto sou capaz de superar dificuldades e desafios.

Aos meus pais, Nilka e Marcos, por serem meus maiores exemplos de dignidade e caráter. Muito obrigada por nunca medirem esforços pela minha felicidade e por sempre demonstrarem orgulho de mim. Agradeço por me ensinarem a ser uma pessoa melhor a cada dia e por toda compreensão, conselhos e dedicação. Eu amo vocês!

Ao meu irmão, pelos momentos de apoio, diversão e até mesmo de puxões de orelha. Obrigada por me dar a coisa mais linda, meiga e inteligente da tia: Clarinha!

Ao meu amor, Aécio Diniz Neto, que sem dúvida esteve ao meu lado em cada momento, fosse de desespero ou comemoração e que sempre me incentivou a lutar pelo que quero e nunca abrir mão dos meus sonhos, não importando o tamanho da dificuldade. Obrigada por nunca desistir de mim e sempre me dar forças nos momentos de fraqueza. Obrigada pela compreensão nas horas em que eu menos merecia. Obrigada por me acompanhar em cada feriado e final de semana de experimento sem reclamar e zelando pela minha segurança. Obrigada por caminhar ao meu lado nessa trajetória, enxugando cada lágrima e sempre me fazendo sorrir. Você sempre será fundamental na minha vida. Eu te amo neguinho!

Ao Prof. Dr. Olagide Wagner de Castro, que além de me orientar no mestrado, me orientou na vida, acreditando em mim e apostando todas suas fichas na minha capacidade. Obrigada pela confiança e por me ensinar como ser uma pesquisadora, sempre mostrando os dois lados desta moeda chamada ciência.

Ao Prof. Dr. Marcelo Duzzioni, por ser um excelente coorientador e amigo. Obrigada pelos ensinamentos, conselhos e caronas. O senhor sempre consegue ver o lado bom da situação e com sua calma e paciência, me convenceu de que “no fim tudo dá certo” e que “se ainda não deu certo, é porque não é o fim”. Se hoje cheguei até aqui e decidi ser a melhor farmacologista possível, tenho certeza que foi graças ao senhor, que serviu como inspiração.

Às minhas “lindas”, que sempre me deram força para continuar e me fizeram rir nos momentos mais inoportunos: Mariah, com seu jeitinho sem-noção, sempre com bons conselhos (às vezes disfarçados de crítica ou patada), que me levavam a refletir e me dedicar mais e mais;

Amanda, com seu jeito singelo de me mandar sempre seguir em frente, tentar e nunca desistir; Marcela, com sua meiguice e espontaneidade, sempre com um comentário inocente que me mostrava o quão simples a vida pode ser se a gente não dificultar. Nunca vou esquecer da FeSBE 2015 e do nosso “que linda, linda, tá linda”, “razô viado”. Obrigada a vocês por me proporcionarem momentos tão bons de viagem, diversão, ciência, e acima de tudo, amizade.

Aos membros do LNFI, que contribuíram de diversas formas para que eu chegasse aqui: Igor Santana, por ser minha dupla em todas as disciplinas e dividir comigo a apreensão da seleção do mestrado; Maisa Costa, por ser a mãezona do laboratório, sempre disposta a se esforçar, a resolver os problemas mais absurdos com sua destreza e por cuidar de nós sempre com muito carinho e amizade; Neto Gomes, pela ajuda nos experimentos, disponibilidade, confiança e amizade; Mariana Barbosa pela colaboração nos experimentos e por me deixar sempre te ajudar e com isso aprender cada vez mais; Juliana Aquino e Brunna Layne pela ajuda com os animais e leituras dos vídeos.

Agradeço também a um grupo especial de amigos que fiz no LNFI, o grupinho Falamansa: Fernanda Souza, Ricardo Albernaz e Jardel Batista. Nanda com seu jeito carismático, sempre meiga e alegre, conseguia superar meu mau humor matinal e me dar coragem para me manter firme, com ótimos conselhos, cheios de otimismo e incentivo; que, não importasse o assunto, sempre acabavam em comida e risadas. Ricardinho com seu sotaque marcante, sempre tinha uma piada na manga para me tirar do baixo astral, mesmo que fosse sempre a pergunta fatídica “você quer conversar sobre isso?”. Menino Jardel, com seu sotaque igualmente marcante, sempre tão quieto, mas extremamente solícito. Agradeço a vocês pela companhia nos feriados, finais de semana e pelas horas de sono perdidas para me ajudarem com experimentos, perfusão e leitura de vídeos. Vocês foram essenciais nesse trabalho.

Aos meus amigos da graduação: Alex Cavalcante, Amanda Thais, Isa Rafaella, Bruno Rafael e Pedro Leite. Não importa a distância, falta de tempo ou imprevistos... estamos sempre juntos em pensamento e coração! Obrigada por todos os bons momentos, histórias inesquecíveis e por serem esse grupinho selete que só faz valer a própria opinião. Amo vocês, Corja!

Aos meus amigos distribuídos ao longo do Brasil e do mundo, que enchem de alegria, cultura e bondade por onde passam. Obrigada pelas amizades indescritíveis e pelo conhecimento que agreguei à minha vida!

A todos os amigos que fiz ao longo da minha formação pessoal e profissional e que de alguma maneira contribuíram para eu chegar onde cheguei.

À banca examinadora pelas dicas, conselhos e colocações bastante pertinentes, sempre visando à melhoria do meu trabalho.

Aos animais utilizados, dedico meu respeito e agradecimento, pois sem eles nada seria possível. Eles foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, a todos os professores e funcionários.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FAPEAL pelo apoio financeiro.

Obrigada de coração a todos que fizeram parte destes anos tão importantes da minha vida. Cada um me ensinou a amadurecer de alguma maneira e foi fundamental para meu crescimento pessoal e profissional. Muito obrigada, de verdade!

“Eu tentei 99 vezes e falhei. Mas na centésima eu consegui. Nunca desista de seus objetivos. Mesmo que eles pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser vitoriosa”.

Albert Einstein

RESUMO

Nas últimas décadas, a cocaína em sua forma fumada (*crack*) vem se tornando um grande problema de saúde pública, devido ao seu baixo custo e a sua alta capacidade de causar dependência aos usuários. Após a queima, os vapores do *crack* inalados são rapidamente absorvidos e exercem efeitos estimulantes, que se dissipam ligeiramente - frequentemente associado à comorbidades como ansiedade e depressão. Além disso, a cocaína e seus derivados atuam em vias glutamatérgicas, promovendo excitotoxicidade em regiões diretamente ligadas à gênese das crises epiléticas, e em vias dopaminérgicas, atuando nos centros de prazer e que estão relacionados com o sistema recompensa do cérebro. A maior parte dos tratamentos convencionais contra fissura e dependência da droga incluem ansiolíticos e antidepressivos tradicionais, fármacos com diversos efeitos indesejados, além do alto custo econômico. Plantas medicinais tem sido tradicionalmente utilizadas por suas propriedades farmacológicas, como é o caso do *Citrus limon*, descrito na literatura com atividades anti-inflamatórias, anticonvulsivantes, neuroprotetoras, ansiolíticas e hipnóticas. Dessa forma, o presente trabalho buscou desenvolver um protocolo de exposição de animais a fumaça do *crack*, com caracterização de seu efeito psicoestimulante, bem como verificar as alterações causadas pela droga em testes animais de ansiedade, depressão e epilepsia; além de avaliar os efeitos do óleo essencial de *Citrus limon* em atenuar ou reverter essas alterações. Para isto, camundongos *Swiss* adultos machos foram expostos individualmente ou coletivamente (máximo 6 animais) à fumaça do *crack* em aparato apropriado durante 5 dias consecutivos. Imediatamente após a exposição ou 72h após a última exposição, os animais foram individualmente submetidos ao teste do campo aberto (TCA). A análise da atividade locomotora no TCA imediatamente após a exposição individual confirmou o efeito psicoestimulante do *crack*, porém nenhuma alteração nos parâmetros comportamentais relacionados à medo, ansiedade e depressão foi observada nos testes do labirinto em cruz elevado (LCE) e suspensão pela cauda (TSC) 72h após a última exposição à droga. Em contrapartida, a exposição coletiva dos animais à fumaça do *crack*, além de promover o esperado efeito psicoestimulante no TCA, promoveu um efeito do tipo-ansiógênico 72h após a retirada da droga no LCE. O pré-tratamento com o óleo essencial de *Citrus limon* (OEL, 300mg/Kg, v.o.) bloqueou de maneira dose-dependente o efeito psicoestimulante do *crack* no TCA. No modelo de crises convulsivas induzidas por pilocarpina, o OEL na mesma dose e via de administração foi capaz de desenvolver crises mais brandas, quando comparado ao grupo sem pré-tratamento. Dessa forma, nossos dados demonstraram que os protocolos desenvolvidos de exposição à fumaça do *crack* (individual ou coletivo) são capazes de promover o efeito psicoestimulante da droga. Entretanto, somente o protocolo de exposição coletiva permitiu associar a retirada da droga a alterações comportamentais relacionadas com medo e ansiedade. Por fim, nossos resultados demonstraram que o OEL bloqueou, de maneira dose-dependente, os efeitos psicoestimulantes do *crack*, indicando que o OEL pode ser um adjuvante no tratamento para dependência química do *crack*. Entretanto, mais estudos são necessários para confirmar esses resultados.

Palavras-chaves: *Crack*, ansiedade, depressão, epilepsia, *Citrus limon*.

ABSTRACT

In recent decades, cocaine in its smoked form (*crack*) is becoming a major rival of public health, due to its low cost and its high ability to cause dependence users. After firing, the inhaled *crack* vapors are rapidly absorbed and exert stimulatory effects that dissipate slightly - often associated with comorbidities such as anxiety and depression. Furthermore, cocaine and its derivatives act on glutamatergic pathways by promoting excitotoxicity in regions directly related to the genesis of epileptic seizures, and dopaminergic pathways acting on the pleasure centers and that are related to the reward system in the brain. The most conventional treatments for craving and dependence on drugs include traditional antidepressants and anxiolytics, drugs with various unwanted effects, and the high economic cost. Medicinal plants have traditionally been used for its pharmacological properties, such as *Citrus limon*, described in the literature with anti-inflammatory activity, anticonvulsive, neuroprotective, anxiolytic and hypnotic. Thus, this study sought to develop a protocol of exposure of animals to smoke *crack* with his characterization of psychostimulant effect and verify the changes caused by the drug in animal tests of anxiety, depression and epilepsy; in addition to evaluating the effects of the essential oil of *Citrus limon* to mitigate or reverse these changes. For this, Swiss mice adult males were exposed individually or collectively (maximum 6 animals) to smoke *crack* in suitable apparatus for 5 consecutive days. Immediately after exposure and 72 hours after the last exposure, animals were individually subjected to the open field test (OF). The analysis of locomotor activity in the OF immediately after individual exposure confirmed the psychostimulant effects of *crack*, but no change in behavioral parameters related to fear, anxiety and depression was observed in the elevated plus maze (EPM) and tail suspension tests (TST) 72 hours after the last exposure to the drug. In contrast, the collective exposure of animals to smoke *crack* in addition to promote the expected psychostimulant effect on OF, promoted an effect-type anxiogenic 72 hours after withdrawal of the drug in the EPM. Pretreatment with the *Citrus limon* essential oil (CLEO, 300mg/kg, orally) blocked in a dose-dependent manner the psychostimulant effect of *crack* in OF. In the model of seizures induced by pilocarpine, the CLEO at the same dose and route of administration was able to develop milder crises, when compared to the group without pretreatment. Thus, our data showed that the protocols developed from exposure to smoke *crack* (individual or collective) are able to promote the psychostimulant effects of the drug. However, only the protocol group exhibition allowed to associate with drug withdrawal behavioral changes associated with fear and anxiety. Finally, our results demonstrated that the CLEO blocked in a dose-dependent manner, the psychoactive effects of *crack*, indicating that the CLEO may be an adjunct in the treatment of addiction *crack*. However, more studies are needed to confirm these results.

Keywords: *Crack*, anxiety, depression, epilepsy, *Citrus limon*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Consumidores de <i>crack</i> /cocaína no mundo (2011).....	18
Figura 2. Prevalência do consumo de cocaína via intranasal ou fumada ao longo da vida e no último ano	19
Figura 3. Estrutura química da cocaína (benzoilmetilecgonina).....	19
Figura 4. Esquema de produção do cloridrato de cocaína	20
Figura 5. Cristal de <i>crack</i> (“pedra”).....	20
Figura 6. Comparação dos níveis plasmáticos de cocaína após a administração por diferentes vias	21
Figura 7. Produtos da metabolização hepática da cocaína.....	22
Figura 8. Vias dopaminérgicas.....	24
Figura 9. Circuito de recompensa – via mesolímbocortical	25
Figura 10. Curva dose-resposta da tolerância	25
Figura 11. Mecanismo de ação da cocaína no sistema nervoso central: representação do sistema dopaminérgico	26
Figura 12. Representação esquemática do Teste do Campo Aberto	31
Figura 13. Representação esquemática do Labirinto em Cruz Elevado	31
Figura 14. Representação esquemática do Teste de Suspensão Pela Cauda.....	33
Figura 15. EPI's para manuseio do <i>crack</i>	38
Figura 16. Aparato de exposição localizado no interior de uma capela de exaustão	39
Figura 17. Protocolo de exposição individual: grupo para análise comportamental.....	41
Figura 18. Delineamento experimental - Protocolo de exposição coletiva	42
Figura 19. Teste do Campo Aberto.....	43
Figura 20. Labirinto em Cruz Elevado	43
Figura 21. Teste de Suspensão Pela Cauda	44
Figura 22. Número de cruzamentos no TCA - Dia 1.....	47
Figura 23. Número de cruzamentos no TCA - Dia 2.....	47
Figura 24. Número de cruzamentos no TCA - Dia 3.....	47
Figura 25. Número de cruzamentos no TCA - Dia 4.....	48
Figura 26. Número de cruzamentos no TCA - Dia 5.....	48
Figura 27. Validação do Labirinto em Cruz Elevado	50
Figura 28. Parâmetros espaço-temporais avaliados no Labirinto em Cruz Elevado 72h após a retirada do <i>crack</i>	51
Figura 29. Parâmetros etológicos avaliados no Labirinto em Cruz Elevado 72h após a retirada do <i>crack</i>	52
Figura 30. Parâmetros avaliados no Teste do Campo Aberto 72h após a retirada do <i>crack</i>	52
Figura 31. Parâmetros avaliados no Teste de Suspensão pela Cauda 72h após a retirada do <i>crack</i>	53
Figura 32. Alterações comportamentais em animais durante o protocolo de exposição coletiva	54
Figura 33. Parâmetros espaço-temporais avaliados no LCE 72h após a retirada do <i>crack</i> no protocolo de exposição coletiva	55

Figura 34. Parâmetros comportamentais avaliados no TCA 72h após a retirada do <i>crack</i> no protocolo de exposição coletiva	56
Figura 35. Frasco - Óleo Essencial de <i>Citrus limon</i> (Ferquima®).....	63
Figura 36. Esquema - protocolo para avaliação de limiar para crise convulsiva	65
Figura 37. Parâmetros espaço-temporais das diferentes doses de OEL no Labirinto em Cruz Elevado em dois protocolos distintos	68
Figura 38. Efeito do OEL na atividade psicoestimulante do <i>crack</i> na dose de 200mg	69
Figura 39. Efeito do OEL na atividade psicoestimulante do <i>crack</i> na dose de 400mg	70
Figura 40. Classificação das classes mais graves segundo a Escala de Racine (1972).....	71
Figura 41. Parecer de aprovação da CEUA - UFAL.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	5-hidroxitriptamina ou serotonina
%EBA	Porcentagem de Entradas nos Braços Abertos
%TBA	Porcentagem de Tempo nos Braços Abertos
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
dH₂O	Água destilada
DA	Dopamina
DAT	Transportador de Dopamina
DZP	Diazepam
EBA	Entrada nos Braços Abertos
EBF	Entrada nos Braços Fechados
EPI	Equipamento de Proteção Individual
FJ	FluoroJade
i.p.	Intraperitoneal
Kg	Quilogramas
LENAD	Levantamento Nacional de Álcool e Drogas
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
LNFI	Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa
mg	Miligramas
mL	Mililitros
MSN	Neurônios Espinhos Médios
NA	Noradrenalina
NAc	<i>Nucleus accumbens</i>
NT	Neurotransmissor
OEL	Óleo essencial de <i>Citrus limon</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão Fosfato-Salina
PFA	Paraformaldeído
PILO	Pilocarpina
SAL	Salina
SAP	<i>Stretch-attend posture</i>
SE	<i>Status Epilepticus</i>
s.c.	Subcutânea
SNC	Sistema Nervoso Central
TBA	Tempo de Permanência nos Braços Abertos
TBF	Tempo de Permanência nos Braços Fechados
TCA	Teste do Campo Aberto
TNF	Teste do Nado Forçado

TSC
v.o.
VTA

Teste de Suspensão Pela Cauda
Via Oral
Área Tegmental Ventral, do inglês *Ventral Tegmental Area*

Sumário

SEÇÃO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS E EFEITO PSICOESTIMULANTE DO <i>CRACK</i>	22
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. EPIDEMIOLOGIA DA COCAÍNA NO BRASIL E NO MUNDO	18
1.2. COCAÍNA: ASPECTOS QUÍMICOS	19
1.2.1. COCAÍNA: ASPECTOS FARMACOCINÉTICOS	21
1.2.2. COCAÍNA: ASPECTOS FARMACODINÂMICOS E NEUROBIOLÓGICOS	22
1.2.3. COCAÍNA: POTENCIAL DE REFORÇO E SISTEMA DE RECOMPENSA	23
1.2.4. TOLERÂNCIA	25
1.2.5. DEPENDÊNCIA	27
1.3. COCAÍNA E COMORBIDADES	27
1.3.1. Cocaína e transtornos de ansiedade.....	28
1.3.2. Cocaína e transtornos depressivos.....	28
1.3.3. Cocaína e epilepsia	29
1.4. MODELOS ANIMAIS.....	29
1.4.1. Teste do Campo Aberto (TCA)	30
1.4.2. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	31
1.4.3. Teste de Suspensão Pela Cauda (TSC).....	33
1.4.4. <i>Status Epilepticus</i> induzido por pilocarpina	34
1.5. EFEITO PSICOESTIMULANTE E COMORBIDADES Erro! Indicador não definido.	
2. OBJETIVOS.....	35
2.1. Objetivo Geral	36
2.1.1. Objetivos Específicos.....	36
3. METODOLOGIA.....	37
3.1. AQUISIÇÃO DA DROGA	38
3.2. ANIMAIS	39
3.3. APARATO DE EXPOSIÇÃO	39
3.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	40
3.4.1. PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO INDIVIDUAL	40
3.4.2. PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO COLETIVA - ANÁLISE PRELIMINAR	41
3.4.3. TESTES COMPORTAMENTAIS	42
3.4.3.1. Teste do Campo Aberto (TCA)	42
3.4.3.2. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	43
3.4.3.3. Teste de Suspensão Pela Cauda (TSC)	44
3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE PSICOESTIMULANTE DO <i>Crack</i>	46
4.2. VALIDAÇÃO DO MODELO DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	49
4.3. AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL APÓS A RETIRADA DA DROGA – PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO INDIVIDUAL	50
4.3.1. COMPORTAMENTOS RELACIONADOS COM ANSIEDADE	50
4.3.2. AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO	52
4.4. AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL NA EXPOSIÇÃO COLETIVA	53
4.5. AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL APÓS A RETIRADA DA DROGA – PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO COLETIVA	54
4.5.1. ESTUDO DA ATIVIDADE TIPO-ANSIOGÊNICA	54
SEÇÃO 2. ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Citrus limon</i>: ALTERNATIVA TERAPÊUTICA PARA REDUÇÃO DO EFEITO PSICOESTIMULANTE DO <i>Crack</i>?	57
1. INTRODUÇÃO	58
1.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE <i>Citrus limon</i>	59
2. OBJETIVOS	60
2.2. Objetivo Geral	61
2.2.1. Objetivos Específicos	61
3. METODOLOGIA	62
3.1. OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	63
3.2. PRÉ-TRATAMENTO COM OEL	63
3.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	63
3.3.1. REDUÇÃO DA ATIVIDADE PSICOESTIMULANTE	63
3.3.3.1. Avaliação da redução do efeito psicoestimulante do <i>crack</i> na dose de 200mg após tratamento com OEL 300mg/Kg (n=33):	64
3.3.3.2. Avaliação da redução do efeito psicoestimulante do <i>crack</i> na dose de 400mg após tratamento com OEL 300mg/Kg (n=31):	64
3.4. ALTERAÇÕES NO LIMIAR PARA CRISES CONVULSIVAS	64
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1. DEFINIÇÃO DE DOSE E PROTOCOLO DE JEJUM PARA O OEL	67
4.2. AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DO EFEITO PSICOESTIMULANTE DO <i>CRACK</i> PELA ADMINISTRAÇÃO DE OEL 300mg/Kg V.O.	69
4.3. ALTERAÇÕES NO LIMIAR PARA CRISES CONVULSIVAS	70
5. CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS	74
6. ANEXOS	85
6.1. PARECER DE APROVAÇÃO NA CEUA	86

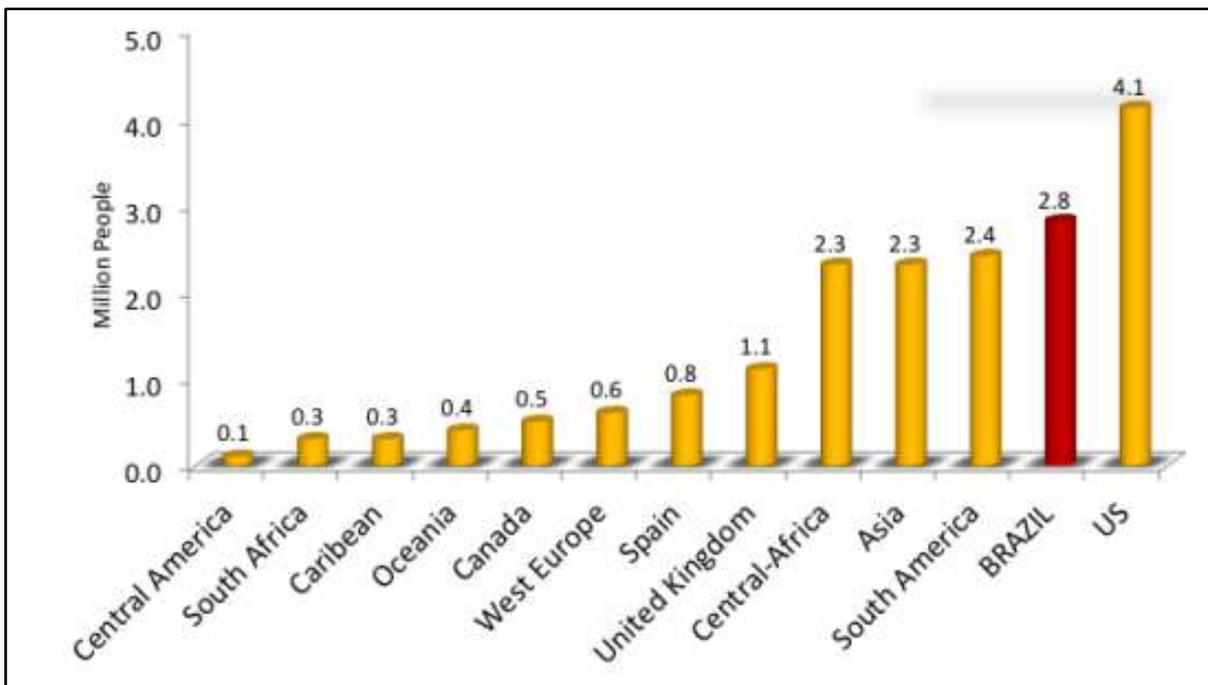
**SEÇÃO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS E EFEITO
PSICOESTIMULANTE DO *CRACK***

1. INTRODUÇÃO

1.1. EPIDEMIOLOGIA DA COCAÍNA NO BRASIL E NO MUNDO

No Brasil, o crescente uso de drogas psicoativas tem se tornado um problema emergente devido às dificuldades de controle e a falta de políticas sociais direcionadas aos dependentes químicos. Atualmente, o Brasil ocupa o posto de segundo maior consumidor de *crack*/cocaína no mundo (Figura 1). Infelizmente, dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) em relação ao Brasil não são animadores, pois não se observa diminuição na taxa de prevalência do uso de cocaína nos países em desenvolvimento, diferentemente dos países desenvolvidos.

Figura 1 - Consumidores de *crack*/cocaína no mundo (2011)

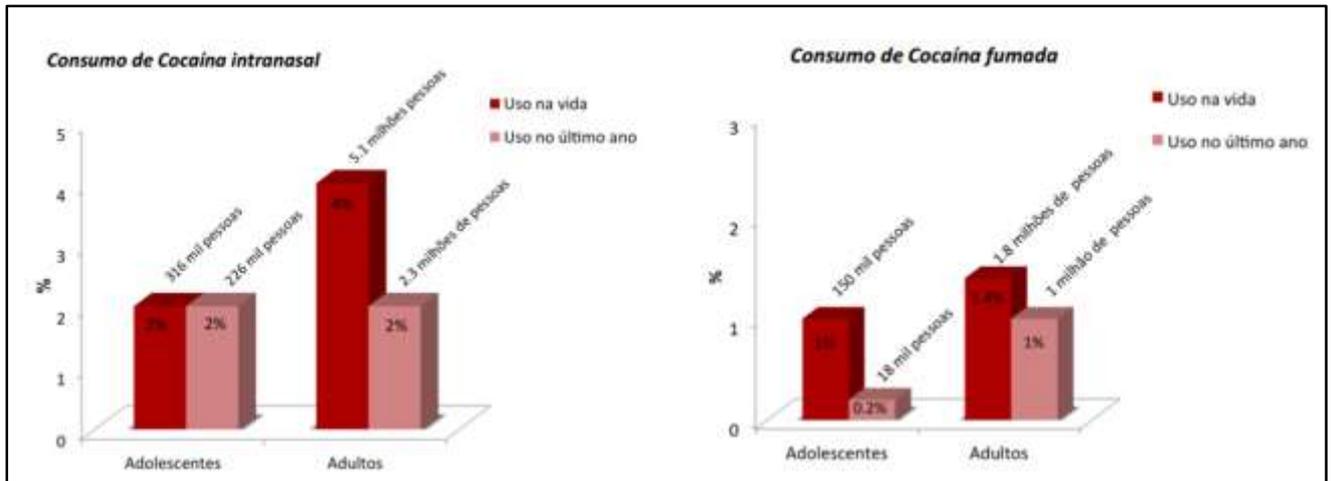


Fonte: Adaptado de II LENAD

Nota: disponível em: http://prattein.com.br/home/images/stories/Saude/Pesqu-LENAD_drogas.pdf

O II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD) do Instituto Nacional de Políticas Públicas do Álcool e Outras Drogas da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), realizado entre 2011 e 2012 demonstrou que cerca de 4% da população adulta brasileira (aproximadamente 6 milhões) e 3% da população de adolescentes já haviam utilizado cocaína pelo menos uma vez ao longo da vida. Nesse universo, mais de 5,4 milhões de pessoas (4% de adultos e 2% de adolescentes) utilizaram cocaína via intranasal e quase 2 milhões (1,4% de adultos e 1% de adolescentes) utilizaram cocaína na forma fumada: *crack*, merla ou oxi (Figura 2).

Figura 2 - Prevalência do consumo de cocaína via intranasal ou fumada ao longo da vida e no último ano



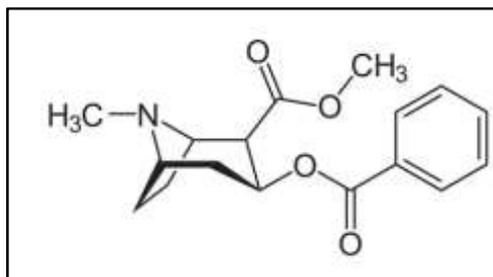
Fonte: Adaptado de II LENAD

Nota: disponível em: http://prattein.com.br/home/images/stories/Saude/Pesqu-LENAD_drogas.pdf

1.2. COCAÍNA: ASPECTOS QUÍMICOS

A cocaína (figura 3) geralmente se apresenta na forma de cloridrato, um pó branco e fino obtido por meio de procedimento químico (figura 4) a partir das folhas do gênero *Erythroxylon* – geralmente a espécie *Erythroxylon coca*, podendo ser inalado ou dissolvido em água e injetado via intravenosa (HAIM et al., 1995). No entanto, o cloridrato apresenta a desvantagem de exigir um alto custo de purificação, além de sofrer decomposição em temperatura de volatilização (PASSAGLI, 2009; OLIVEIRA et al., 2009). Baseado nisso, meios alternativos de adulteração tem sido desenvolvidos e empregados no mercado ilícito com o objetivo de baratear a droga. Eles vão desde a associação da cocaína com substâncias como giz, pó de mármore e talco; até a busca por novas vias de administração e desenvolvimento de subprodutos, como é o caso do *crack* (HAIM et al., 1995; JATLOW, 1987; COSTA-LEITE e ANDRADE, 1999).

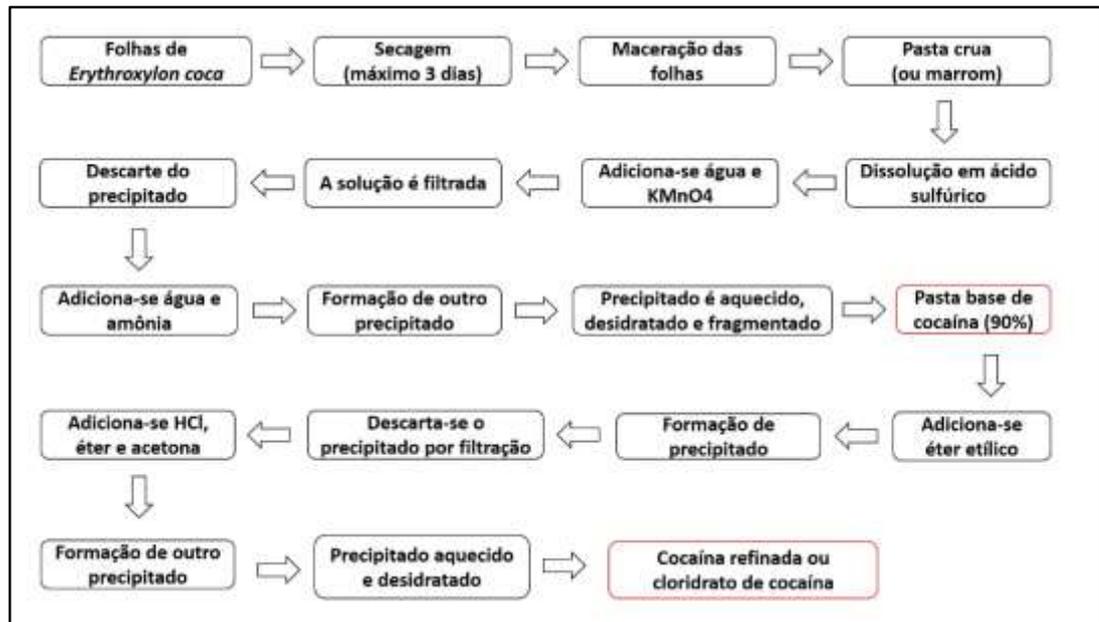
Figura 3 - Estrutura química da cocaína (benzoilmetilegonina)



Fonte: About education - Chemical Structures Starting with the Letter B

Nota: disponível em: <http://f.tqn.com/y/chemistry/1/S/o/B/1/Cocaine.jpg>

Figura 4 - Esquema de produção do cloridrato de cocaína



Fonte: Autora, 2015.

O *crack* (figura 5) é preparado geralmente a partir da dissolução de pasta base de cocaína em solução alcalina (bicarbonato de sódio), a qual origina pedras após a evaporação do solvente, alterando as propriedades químicas e recebendo este nome devido ao som que o cristal emite quando aquecido (Conselho Nacional de Justiça, 2011; ETTINGER e ALBIN, 1989; HAIM et al., 1995; MELECA et al., 1997).

Figura 5 - Cristal de *crack* (“pedra”)



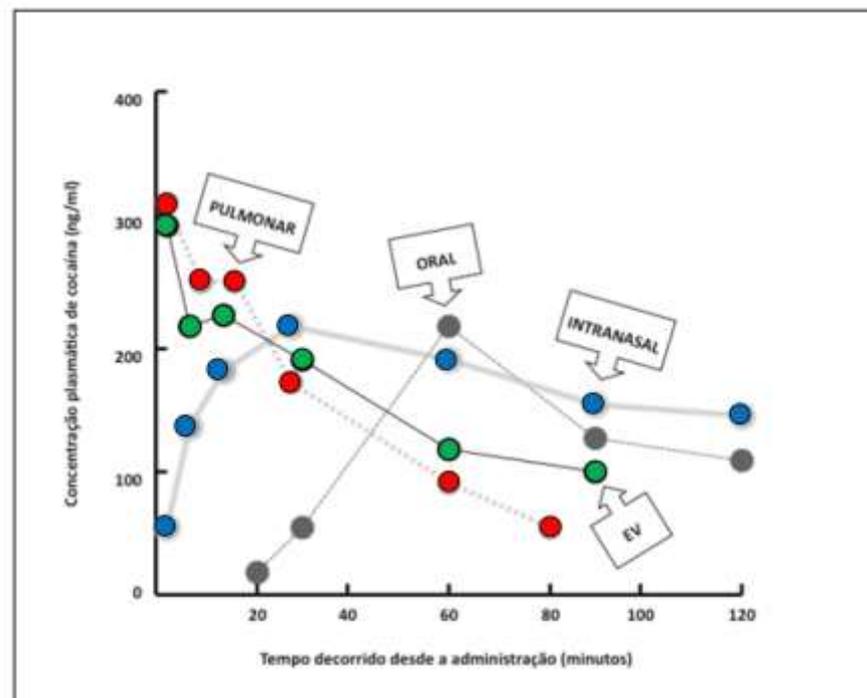
Fonte: Jornal Capixaba

Nota: disponível em <http://jornalocapixaba.com.br/wp-content/uploads/2013/09/Foto13.jpg>

1.2.1. COCAÍNA: ASPECTOS FARMACOCINÉTICOS

A velocidade de absorção da cocaína depende da via de administração, *e.g.*, a absorção na mucosa nasal é mais lenta do que a fumada (*crack*). Quando administrada por via intranasal (representado em azul na figura 6), a droga atinge a corrente sanguínea através dos capilares em até 2 minutos, podendo levar de 5 a 10 minutos para atingir seus efeitos. Geralmente os picos de concentração da via intranasal são observados em torno de 30 minutos, porém esta via pode ter a absorção limitada, pois pode levar à necrose do tecido pela vasoconstrição produzida. No caso da via endovenosa (representada em verde), os efeitos começam a aparecer após alguns segundos (12 a 16 segundos), tendo meia-vida de 60 a 90 minutos. Por fim, quando utilizada por via pulmonar (representada em vermelho), a cocaína (*crack*) produz seus efeitos quase que instantaneamente. Dessa forma, o potencial de adicção da cocaína tem sido mais pronunciado em usuários de *crack* e cocaína intravenosa (JEFFCOAT et al., 1989; HIGGINS et al., 1990; JONES, 1990; GOSSOP et al., 1992; CONE, 1995; MORTON, 1999; KARAN e BENOWITZ, 2000; LUFT e MENDES, 2007; RANG e DALE, 2011).

Figura 6 - Comparação dos níveis plasmáticos de cocaína após administração por diferentes vias

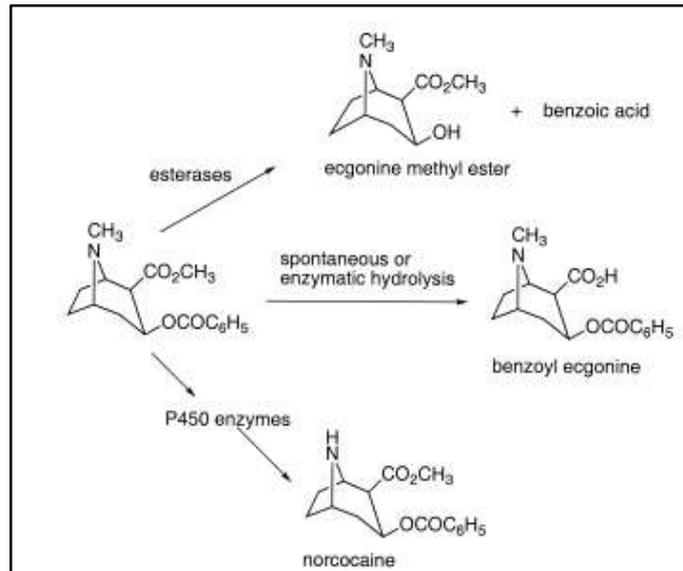


Fonte: Modificado de Fishman, 1988.

Cerca de 85% da cocaína é metabolizada no fígado por 3 diferentes vias (figura 7): esterases; hidrólise espontânea ou enzimática; e via citocromo P450. O principal metabólito é a benzoilecgonina, podendo ser detectada após 48 horas do uso em amostras de cabelo, sangue

e urina (SCHINDLER et al., 1995; RANG et al., 2011). Além deste metabólito, a cocaína é biotransformada em ecgonina metil éster (EME) por hidrólise e em norcocaína por desmetilação na via do citocromo P450. Outra quantidade da droga (1 a 5%) não é metabolizada, sendo eliminada na urina juntamente com os metabólitos após 6 a 14 horas da administração (GAY et al., 1975).

Figura 7 - Produtos da metabolização hepática da cocaína



Fonte: FOWLER et al., 2011

Nota: disponível em <http://isites.harvard.edu/fs/docs/icb.topic1047084.files/11Cocaine.pdf>

1.2.2. COCAÍNA: ASPECTOS FARMACODINÂMICOS E NEUROBIOLÓGICOS

A cocaína atua bloqueando a recaptação de monoaminas como dopamina (DA), noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT) pelos transportadores, o que aumenta a concentração desses neurotransmissores (NTs) na fenda sináptica, levando a uma hiperestimulação de seus receptores (HEIKKILA, 1975; DACKIS e GOLD, 1990; REITH et al., 1997). Os elevados níveis destes neurotransmissores estão relacionados com o efeito psicoestimulante da droga, destacando-se a dopamina como a principal catecolamina envolvida no comportamento euforizante, sendo o bloqueio de seus transportadores frequentemente associado a alucinações e outros sintomas psicóticos (BLOOMSTONE, 2002; VOLKOW et al., 1999; MORTON, 1999; CARVALHO, 2006). Embora menos significativa, a inibição da recaptação de NA e 5-HT também está envolvida nos efeitos da cocaína, como por exemplo a taquicardia, a sudorese e o

aumento da pressão arterial, relacionados a NA e o desenvolvimento de crises convulsivas, relacionado a 5-HT (KUHAR et al., 1991; MORITA et al., 2005; CARVALHO, 2006).

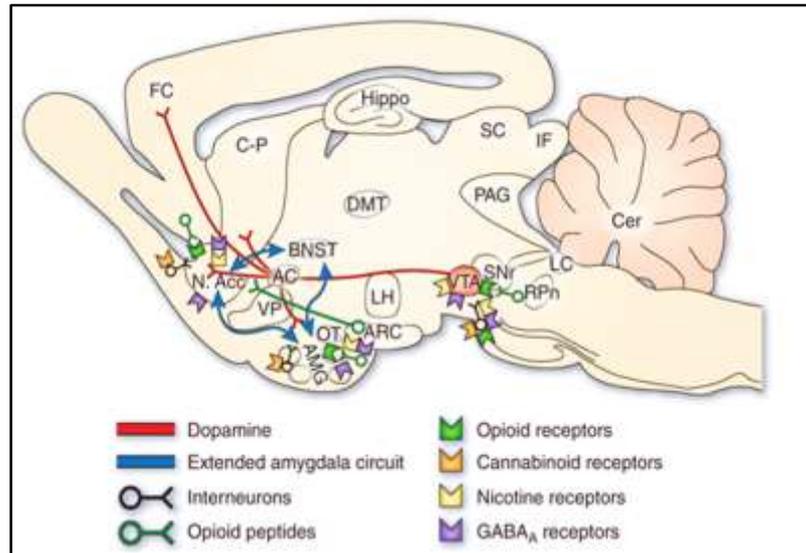
Quando utilizada pela via fumada (*crack*), a cocaína atravessa a membrana alveolar, bastante vascularizada, e atinge a circulação cerebral em poucos segundos, provocando efeitos agudos de euforia, prazer, melhora das funções motoras e intelectuais, perda da sensação de cansaço e taquicardia (VELASCO et al., 1993; GOLD, 1993; POLLOCK et al., 1991; FERREIRA-FILHO et al., 2003). Em contrapartida, exposições crônicas são relacionadas à redução dos efeitos euforizantes e prazer, aumento de irritabilidade, paranoia, ansiedade e crises convulsivas (RESNICK et al., 1977; SPOTTS e SHONTZ, 1984; POST e WEISS, 1988; KARLER et al., 1989; TRINKOFF et al., 1989; TRINKOFF et al., 1990; BREITER et al., 1997). Em 1985, Bozarth e Wise demonstraram que ratos com acesso ilimitado a autoadministração de cocaína não só chegavam a perder 47% do peso corporal, cessar o comportamento de limpeza e apresentar uma grave deterioração da saúde; como desenvolviam rapidamente a administração de doses cada vez mais elevadas da droga a fim de obter o efeito inicial, a chamada tolerância (SMALL et al., 2009).

1.2.3. COCAÍNA: POTENCIAL DE REFORÇO E SISTEMA DE RECOMPENSA

Sabe-se que a rápida absorção e alta concentração de cocaína nos transportadores de dopamina são os principais contribuintes para as suas propriedades de reforço, de forma que quanto menor o intervalo de tempo entre a administração da droga e seus efeitos, mais intensa a estimulação (BALSTER e SCHUSTER, 1973).

A principal via cerebral envolvida na administração repetida de psicoestimulantes é a mesolímbica através do sistema dopaminérgico (WISE e ROMPRE, 1989). Nesta via (representada em vermelho na figura 8), as fibras se projetam através do feixe prosencefálico medial para áreas do sistema límbico (especialmente núcleo amigdalóide e *nucleus accumbens*) e os corpos celulares se voltam para a área tegmental ventral (VTA) adjacentes à substância negra (RANG e DALE, 2011).

Figura 8 - Vias dopaminérgicas



Fonte: KOOB e VOLKOW, 2010.

Nota: disponível em: <http://www.nature.com/npp/journal/v35/n1/images/npp2009110f1.jpg>

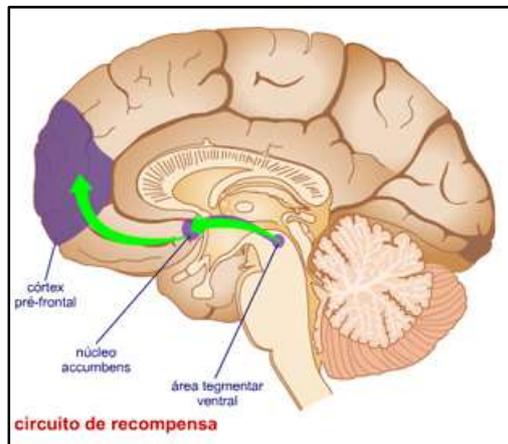
A via mesolímbica (figura 9) tem sido associada a efeitos de recompensa de diversos estímulos, como estimulação elétrica de populações neuronais e drogas de abuso (WISE e BOZARTH, 1987; DI CHIARA, 1995). Sabe-se que essas drogas tendem a aumentar a dopamina extracelular no *nucleus accumbens* (NAc), uma região crítica para o sistema de recompensa, cujas alterações em seu circuito são associadas à toxicod dependência (KELLEY, 2004; DI CHIARA et al, 2004; WHEELER et al., 2011; KALIVAS e VOLKOW, 2005; EVERITT e ROBBINS, 2005).

Os principais receptores dopaminérgicos envolvidos nas vias de recompensa são D₁ e D₂. Ambos são largamente expressos no estriado e no NAc, sendo sugeridos na literatura como tendo papéis opostos: D₁ seria responsável pela diminuição no comportamento de busca pela cocaína, enquanto D₂ promoveria o efeito contrário, potencializando o reforço (KOOB et al., 1997; LESHNER (1996). Koob et al. (1997) destacaram ainda o papel do receptor D₃ no reforço causado pela cocaína, pois, assim como D₁, também é encontrado no NAc; porém a participação desses receptores não está totalmente esclarecida.

O principal tipo celular do *nucleus accumbens* (neurônios espinhosos médios - MSN) recebe inervação glutamatérgica de regiões límbicas e corticais, que transmite informações ligadas à emoção (amígdala), contexto (hipocampo) e planejamento motor/execução (córtex pré-frontal). Os MSN integram essas informações e através de suas projeções, influenciam regiões motoras que executam comportamentos guiados por objetivos, como é o caso da busca

por drogas (GROENEWEGEN et al., 1999; KELLEY, 1999). Aliado a isto, Shaham et al. (2000) mostraram que a ativação neuronal no núcleo central da amígdala e na porção ventral do córtex pré-frontal medial é fundamental para a expressão do desejo de cocaína.

Figura 9 - Circuito de recompensa – via mesolímbocortical



Fonte: Saúde Humana e Ambiental - Universidade Estadual Paulista (UNESP)

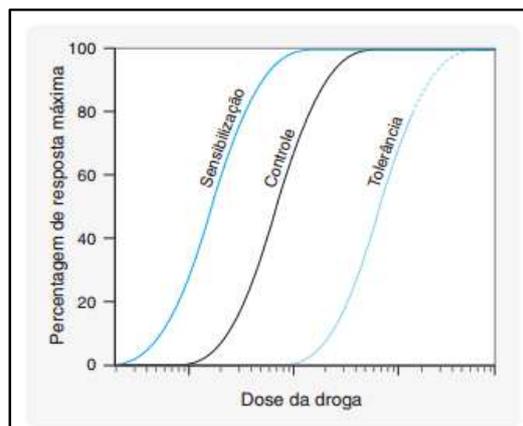
Nota: disponível em:

http://www2.ibb.unesp.br/Museu_Escola/2_qualidade_vida_humana/imagens/farmaco_cerebro.jpg

1.2.4. TOLERÂNCIA

A tolerância a fármacos/drogas é definida como a queda no efeito farmacológico após a exposição crônica a esta substância, isto é, a diminuição da sensibilidade após administração repetida (RANG e DALE, 2011). De acordo com Swift e Lewis (2008), uma curva dose-resposta característica é observada na primeira administração de uma droga; porém, após repetidas administrações essa curva desloca-se para à direita, indicando que serão necessárias doses maiores da droga para obter o efeito inicial, caracterizando a tolerância (figura 10).

Figura 10 - Curva dose-resposta da tolerância

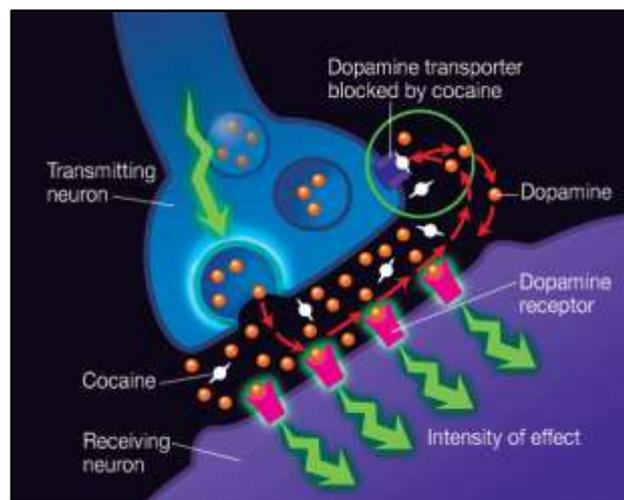


Fonte: SWIFT e LEWIS, 2008

Em 1987, Ritz et. al. correlacionaram a capacidade inibitória da cocaína sobre os transportadores de dopamina (DAT – figura 11) com o comportamento de autoadministração. No mesmo ano, Wise e Bozarth sugeriram que a recompensa induzida pela cocaína podia ser atenuada após constante repetição do procedimento de autoadministração, caracterizando a tolerância.

Em 2009, Small et al. mostraram em um estudo retrospectivo que o uso crônico de cocaína em humanos levou ao desenvolvimento da tolerância, havendo redução na sensação prazerosa causada pela droga, acompanhada por um aumento na frequência de administração e na dose de cocaína. Desde então, diversos estudos em roedores vem caracterizando a tolerância aos efeitos inibitórios da cocaína sobre os DAT em diferentes modelos (FERRIS et al., 2012; CALIPARI et al., 2013).

Figura 11 - Mecanismo de ação da cocaína no sistema nervoso central: representação do sistema dopaminérgico



Fonte: National Institute on Drug Abuse

Nota: disponível em <https://d14rmgtrwzf5a.cloudfront.net/sites/default/files/images/colorbox/cocrenneuron.jpg>

Em 2014, Calipari et al. demonstraram uma redução da sensibilidade dos DAT à inibição da recaptação de dopamina em ratos com acesso estendido à autoadministração de cocaína, o que levou à uma diminuição do fluxo de DA na fenda, caracterizando uma tolerância neuroquímica. Esse achado foi corroborado por dados comportamentais, onde os animais apresentaram atenuação da atividade locomotora, indicativa de tolerância aos efeitos psicomotores da cocaína.

1.2.5. DEPENDÊNCIA

A Associação Psiquiátrica Americana (APA, 1994) estabeleceu 7 critérios reportados por meio do Manual Estatístico e Diagnóstico de Transtornos Mentais, dos quais pelo menos 3 devem ser atendidos pelo paciente para o diagnóstico da dependência de cocaína:

- ✓ Desenvolvimento de tolerância aos efeitos eufóricos da cocaína;
- ✓ Sintomas de abstinência (agitação, distúrbios de sono, depressão) após retirada da droga;
- ✓ Uso de cocaína em grandes quantidades sempre ela estiver disponível;
- ✓ Incapacidade de reduzir a quantidade utilizada;
- ✓ Gastar muito tempo e energia na obtenção e uso da cocaína (se isolando de amigos e família) ou praticar atividades ilícitas a fim de obter dinheiro para comprar a droga;
- ✓ Incapacidade de arranjar ou se manter no emprego por ineficácia no trabalho ou excesso de faltas;
- ✓ Continuar usando cocaína mesmo sabendo que pode desenvolver sintomas como paranoia, alucinações, delírios, perda de peso, anemia ou convulsões;

Em 1996, Hatsukami e Fischman já mencionavam a maior propensão à dependência pelos usuários de *crack* por variáveis como velocidade de ação, duração e magnitude do efeito, associadas à frequência e quantidade de droga utilizada quando comparado a outras drogas. Atualmente a OMS aponta a dependência química como uma dificuldade substancial da saúde pública, resultando em um número significativo de problemas médicos e psicossociais.

No usuário de *crack* é bastante comum a presença da fissura, termo designado pela APA (2002) como impulso em utilizar determinada substância. A fissura envolve comportamento compulsivo e repetitivo do usuário em busca do consumo de *crack*, que quando retirado abruptamente após administrações repetidas está associado a desordens físicas e psicológicas (GAWIN e KLEBER, 1986) como ansiedade e depressão.

1.3. COCAÍNA E COMORBIDADES

Um estudo com pacientes abusivos de substâncias psicoativas revelou que usuários de *crack* apresentavam maior taxa de transtorno de personalidade antissocial (TPAS), além de maiores relatos de violência, como roubo e furto (PAIM KESSLER et al., 2012).

Adicionalmente, o consumo de *crack* vem sendo frequentemente associado com complicações gastrintestinais, musculares, cardiovasculares - como isquemia, taquicardia, infartos, arritmias e acidentes vasculares - além de transtornos no SNC, como ansiedade, depressão e epilepsia (LANGE e HILLIS, 2001; KALIMULLAH e BRYANT, 2008; JONSSON et al., 1983; CARLIN et al., 2014; MUNIZ e EVANS, 2001; VAZQUEZ-RODRIGUEZ et al., 2009; ISNER e CHOKSHI, 1996; SCHWARTZ, 1989).

1.3.1. Cocaína e transtornos de ansiedade

Segundo a OMS (2001), os transtornos de ansiedade são uma das maiores ameaças para a saúde mental no mundo moderno. Embora ansiedade e medo sejam normalmente confundidos (RAMOS e MORMEDE, 1998), o medo desencadeia respostas comportamentais defensivas frente a um perigo em potencial, enquanto a ansiedade caracteriza-se por um estado de avaliação do risco, geralmente ocorrendo antecipação de sintomas, mesmo quando a iminência do perigo é vaga e incerta (BLANCHARD e BLANCHARD, 1988; GRAEFF, 1999).

Muitos trabalhos tem relacionado o uso de cocaína à ansiedade, uma vez que a droga leva a um aumento dos níveis de dopamina na fenda sináptica, o que pode acarretar um *down-regulation* dos receptores, além de causar o esgotamento deste neurotransmissor devido à sua constante liberação. Dessa forma, quando o usuário tem intervalos abruptos no uso da droga (“retiradas”) emergem sintomas ansiosos em resposta à menor estimulação (LESHNER, 1996; WEDDINGTON et al., 1990; ROBINSON e KOLB, 2004). Além disto, Herrero et al. (2008) diagnosticaram a ansiedade como o segundo transtorno mais comum em um estudo com 139 adultos jovens usuários regulares de cocaína; e Zubaran et al. (2013) caracterizaram uma prevalência de até 86% deste transtorno em usuários de *crack*.

1.3.2. Cocaína e transtornos depressivos

Os transtornos depressivos são frequentemente diagnosticados em usuários de drogas de abuso, destacando-se a depressão maior, que atinge em média um terço desses pacientes (DAVIS et al., 2008). Um estudo realizado por Garlow et al. (2003) em um serviço de dependência química mostrou que mais da metade dos pacientes registrados tinha ideação suicida. Dentre estes, 85% apresentavam desordem por uso de cocaína, sendo 43,7% desses pacientes, usuários apenas dessa substância, a qual foi relatada como a principal droga de abuso associada ao comportamento suicida.

Um estudo de metanálise demonstrou uma correlação positiva entre depressão e utilização de cocaína (Conner et al., 2008). Existem algumas hipóteses para justificar essa relação. As principais são que pacientes deprimidos se tornariam mais susceptíveis ao uso de drogas para aliviar os sintomas da doença (MARKOU et al, 1998) ou que o abuso dessas substâncias aumentaria a vulnerabilidade do usuário à depressão por alterações neurofisiológicas e comportamentais (CHINET et al., 2006).

Essa segunda teoria é mais aceita, levando em conta que apesar de o uso agudo de cocaína promover aumento de dopamina na fenda sináptica, sabe-se que o consumo prolongado da droga promove uma diminuição nos níveis cerebrais desse neurotransmissor, o que provavelmente justificaria as elevadas taxas de depressão observadas em usuários da droga (DACKIS e O'BRIEN, 2001).

1.3.3. Cocaína e epilepsia

Além de atuar nos transportadores de dopamina, a cocaína age também no principal neurotransmissor excitatório: o glutamato. Kalivas e Duffy (1995) mostraram que o consumo de cocaína provoca liberação de glutamato na Área Tegmental Ventral (ATV), enquanto Zhang et al. (1997) demonstraram que a cocaína altera a capacidade de resposta dos receptores de glutamato na mesma área após repetidas exposições.

Oliveira et al. (2011) descreveram uma excitotoxicidade glutamatérgica secundária causada pelo uso da cocaína. Sabe-se que essa excitotoxicidade está envolvida em alterações neurológicas como epilepsia (MELDRUM, 2000). Na literatura, alguns trabalhos relacionam crises epiléticas com uso de *crack* e cocaína, sendo relatado aumento na frequência de crises nos usuários, e mencionados episódios de *Status Epilepticus* (SE) – definido como uma crise epilética prolongada ou repetidas crises epiléticas sem recuperação entre elas (OGUNYEMI et al., 1989; TANEN et al., 2000; PASCUAL-LEONE et al., 1990). Essa conexão entre cocaína/*crack* e epilepsia ainda não é totalmente esclarecida e, portanto, merece ser investigada mais detalhadamente.

1.4. MODELOS ANIMAIS

Segundo McKinney e Bunney (1969), para que um modelo animal seja validado, existem alguns pré-requisitos a serem atendidos, tais como: promover alterações comportamentais que possam ser monitoradas objetivamente e revertidas por fármacos-padrão; gerar sintomatologia razoavelmente semelhante à humana; e ser reprodutível em qualquer laboratório.

1.4.1. Teste do Campo Aberto (TCA)

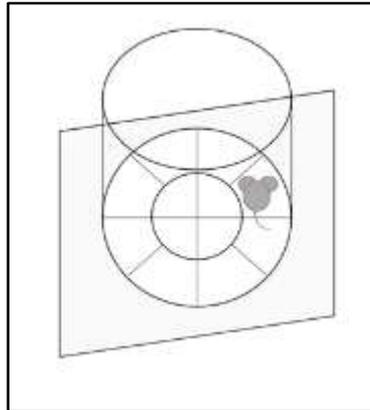
Introduzido por Hall (1934), o TCA (figura 12) foi proposto para avaliar a emocionalidade em ratos, sendo sua eficiência para camundongos demonstrada posteriormente (CHRISTMAS e MAXWELL, 1970). O experimento de Hall consistiu em inserir os animais individualmente em uma arena circular iluminada envolta por uma parede alta e avaliar parâmetros como bolos fecais e padrão de atividade locomotora durante 2 minutos em ensaios repetidos diariamente, com ou sem privação de alimento. Foi observado que os animais em privação apresentavam maiores níveis de defecação e atividade locomotora predominante na área periférica do aparato, sugerindo que estes dois parâmetros poderiam ser indicativos de um indivíduo com medo ou ansioso.

Em sua revisão, Walsh e Cummins (1976) mencionam uma gama de adaptações feitas no experimento inicial de Hall, desde o formato do campo aberto, tempo de avaliação comportamental até a intensidade de luz utilizada no teste. Além disto, eles relacionaram mais de 30 parâmetros que podem ser avaliados no TCA. Desses, 2 são destaques na avaliação comportamental: a distância percorrida por unidade de tempo (contabilizada através do número de cruzamentos), e a frequência de *rearings* (comportamento do animal se levantar sobre as patas posteriores). Esses parâmetros podem ser considerados indiretamente como sugestivos de emocionalidade ou ansiedade (CHOLERIS et al., 2001).

Por um lado, o número de cruzamentos avalia a atividade locomotora do animal e pode ser considerado sugestivo de emocionalidade, pois roedores apresentam aversão a ambientes novos; e, portanto, quando expostos ao ambiente desconhecido, aberto e iluminado do TCA tendem a entrar em conflito sobre explorar o aparato ou evitar situações perigosas (CHOLERIS et al., 2001; CRUSIO, 2001; STEIMER e DRISCOLL, 2003). Em contrapartida, a frequência de *rearings* atua de forma contrária ao número de cruzamentos, pois sua redução está correlacionada a condições ansiosas (PRUT e BELZUNG, 2003).

Dessa forma, o TCA é útil para avaliar a exploração do ambiente, bem como atividade locomotora geral e ainda permite uma visão – mesmo que superficial – do comportamento animal relacionado à ansiedade (PRUT e BELZUNG (2003). Todos esses parâmetros dependem da interação do animal com diversos fatores, destacando-se o isolamento social do animal quando retirado da caixa com os companheiros; e a própria situação de tensão envolvida no teste, onde o animal é exposto a um ambiente desconhecido e iluminado, cuja fuga é impedida pelas paredes (WALSH e CUMMINS, 1976; FILE, 1980; PRUTZ e BELZUNG, 2003).

Figura 12 - Representação esquemática do Teste do Campo Aberto

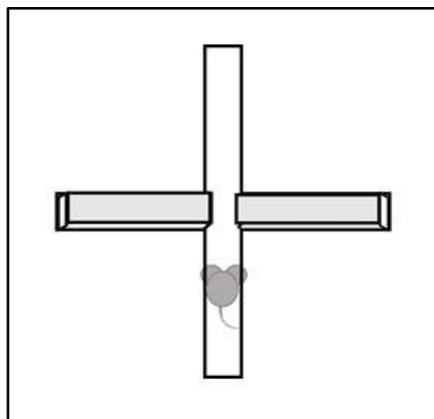


Fonte: Autora, 2015.

1.4.2. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O Labirinto em Cruz Elevado (figura 13) foi modificado a partir de um labirinto em Y, proposto por Montgomery (1955), onde ele constatou um forte conflito do animal entre aproximação e esquiva do beco elevado, interpretando esse comportamento como neofobia (“medo do novo”), o que geraria aversão o ambiente. Baseado nesse modelo, Handley e Mithani (1984) fizeram adaptações e desenvolveram um aparato em forma de cruz, com 2 braços abertos e 2 braços fechados (cercado por paredes) e elevado 70 cm do solo. Estes autores descreveram o LCE como um modelo para estudo de comportamento motivado pelo medo, uma vez que ansiogênicos como a picrotoxina diminuíam a proporção de entradas nos braços abertos, enquanto ansiolíticos como o diazepam a aumentavam.

Figura 13 - Representação esquemática do Labirinto em Cruz Elevado



Fonte: Autora, 2015.

Em 1985, Pellow et al. validaram o modelo como uma medida de ansiedade em ratos dos pontos de vista fisiológico, farmacológico e comportamental. Eles constataram que ratos

submetidos ao LCE apresentavam uma redução significativa no número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos, além de aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona, indicando comportamento tipo-ansioso. Além disso, eles verificaram que o tratamento com fármacos ansiolíticos amplamente utilizados na clínica (como o diazepam) aumentavam significativamente esses parâmetros; e que drogas com ação contrária (ansiogênicas) como cafeína e anfetaminas exibiam uma diminuição significativa nestes parâmetros espaço-temporais.

A fim de investigar se o LCE poderia ser utilizado para camundongos, Lister (1987) avaliou o comportamento desses roedores no aparato. Ele verificou que camundongos *Swiss* tratados com ansiolíticos como pentobarbital sódico e etanol apresentaram um aumento no tempo gasto nos braços abertos, enquanto o grupo tratado com substâncias ansiogênicas como cafeína e picrotoxina apresentavam redução dessa medida, validando assim o modelo para camundongos.

Além dos parâmetros espaço-temporais avaliados no LCE (número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos e fechados), característicos da atividade locomotora do animal; alguns parâmetros etológicos também são levados em conta no modelo. Segundo Rodgers e Johnson (1995), esses parâmetros ampliam as dimensões de comportamento no labirinto, aumentando a sensibilidade do modelo à ação de drogas.

Comportamentos como mergulho de cabeça (*head-dipping*), postura esticada (*stretch-attend posture* - SAP) e levantamento apoiado nas patas traseiras (*rearing*) são mencionados por Rodgers e Johnson (1995) como possíveis envolvidos em respostas de ansiedade, constituindo a chamada avaliação de risco. Segundo eles, parâmetros como *head-dipping* e SAP parecem ainda ser dependentes do contato com as paredes do LCE, diferenciando comportamentos “protegidos” (onde o animal encontra-se em contato com as paredes do aparato ou na plataforma central); e “desprotegidos”, onde o roedor encontra-se nos braços abertos, isto é, sem contato com as paredes.

No mesmo estudo, Rodgers e Johnson (1995) correlacionam as formas “protegidas” dos parâmetros etológicos com a aversão aos braços abertos. No mesmo ano, Molewijk e colaboradores (1995) correlacionaram a redução de SAP com agentes ansiolíticos de diferentes classes, sugerindo esse comportamento como um importante paradigma na caracterização de drogas ansiolíticas.

Enquanto alguns ensaios de ansiedade baseiam-se em respostas condicionadas por estímulos lesivos (privação de água, ração; choques elétricos), o LCE fundamenta-se na tendência dos roedores em direção aos espaços fechados e no medo incondicionado de espaços

abertos e elevados (BARNETT, 1975). Assim, o labirinto em cruz elevado é considerado um método simples e capaz de avaliar respostas de ansiedade em roedores (PELLOW et al., 1985).

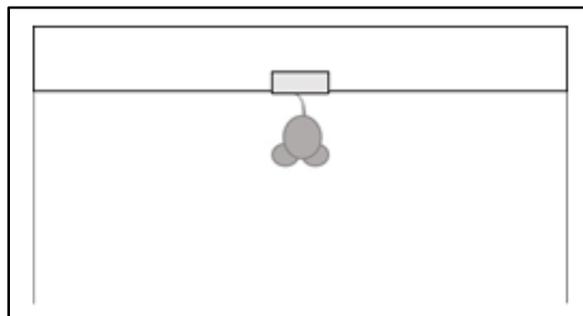
1.4.3. Teste de Suspensão Pela Cauda (TSC)

Introduzido por Steru et al. (1985), o TSC (figura 14) foi baseado no “desespero comportamental” do animal descrito por Porsolt et al. (1977) no modelo de nado forçado. Segundo Porsolt et al. (1977), quando inseridos em um cilindro estreito e com água, camundongos são induzidos à depressão por não poderem escapar da situação, adotando - após um breve período de atividade vigorosa - uma postura imóvel facilmente identificável. Além disso, no mesmo trabalho, Porsolt et al. observaram que essa imobilidade foi reduzida por antidepressivos tricíclicos, atípicos, inibidores da monoamina oxidase, choque eletroconvulsivo e psicoestimulantes; onde estes últimos, em contraste aos antidepressivos, promoveu estimulação motora.

Semelhante ao teste do nado forçado, no TSC os camundongos também são colocados em situação inevitável, porém moderadamente estressante, pois não existe risco de hipotermia devido à inserção na água (THIERRY et al., 1986). A ausência de comportamento de fuga é considerada imobilidade (STERU et al., 1985), portanto, nesse teste o animal é avaliado durante 6 minutos, onde são contabilizados a latência que o animal leva para adotar uma postura imóvel, bem como o tempo em que ele assim permanece.

O TSC é um teste validado para avaliação da eficácia antidepressiva de drogas, geralmente associado com testes de atividade locomotora como o campo aberto, para evitar falsos-positivos; pois sabe-se que substâncias com atividade antidepressiva diminuem o tempo de imobilidade dos animais, sem alterar sua atividade locomotora (CRYAN et al. 2002; GOULD et al., 2009).

Figura 14 - Representação esquemática do Teste de Suspensão Pela Cauda



Fonte: Autora, 2015.

1.4.4. *Status Epilepticus* induzido por pilocarpina

A epilepsia é uma síndrome crônica, recorrente, caracterizada por alterações paroxísticas da atividade intelectual, sensorial, motora, autonômica ou afetiva, sendo tempo-limitada e relacionada à hiper-reatividade neuronal síncrona (ALTER et al., 1972). O tipo mais comum de epilepsia é a Epilepsia do Lobo Temporal (ELT), sendo uma de suas principais características a presença do *Status Epilepticus* (SE), definido como repetidas crises, devido a descargas excessivas de neurônios em diferentes estruturas ou uma crise epiléptica prolongada (DE LORENZO et al., 2001).

O modelo de indução de SE por pilocarpina (PILO) é bastante difundido na literatura e foi proposto por Turski et al. (1983). Em seus estudos, foram verificados que a administração de PILO em ratos em doses crescentes (100 a 400mg/Kg) desencadeou alterações comportamentais em diferentes limiares a depender da dose. Na maior dose administrada (400mg/kg), a PILO produziu diversas alterações como automatismos faciais e convulsões límbicas, evoluindo para *Status Epilepticus* ao longo de 1 a 2 horas após a administração da droga. As mudanças eletrográficas corresponderam aos achados comportamentais, de modo que as primeiras alterações observadas ocorreram na atividade epileptiforme do hipocampo e, em seguida, propagaram-se para amígdala e córtex; aparecendo posteriormente crises eletrográficas em regiões límbicas e corticais.

Dessa forma, observou-se que quando administrada por via sistêmica, a pilocarpina é capaz de modular a atividade epileptiforme, acarretando em crises convulsivas, *Status Epilepticus* e dano cerebral generalizado; fazendo da administração de PILO um modelo de epilepsia do lobo temporal bastante utilizado (EL-ETRI et al., 1993; TETZ et al., 2006; CURIA et al., 2008).

Uma vez estabelecida a relação entre *crack* e comorbidades como ansiedade, depressão e epilepsia; especialmente na retirada abrupta dessa droga após certo tempo de exposição, o presente trabalho pretende estabelecer um novo teste animal (camundongos) de exposição à fumaça do *crack* e correlacionar a retirada da droga à essas comorbidades.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estabelecer um novo teste animal de exposição à fumaça do *crack* e correlacionar a retirada dessa droga à susceptibilidade ao desenvolvimento de comportamentos relacionados com ansiedade e depressão.

2.1.1. Objetivos Específicos

- ✓ Estabelecimento de um novo modelo experimental para drogas de abuso;
- ✓ Avaliar a atividade locomotora de animais expostos individualmente ou coletivamente (6 animais) à fumaça do *crack* e submetidos ao teste do campo aberto;
- ✓ Analisar parâmetros comportamentais relacionados com medo e ansiedade em animais expostos individualmente ou coletivamente (6 animais) à fumaça do *crack* e submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado;
- ✓ Analisar parâmetros comportamentais relacionadas à depressão em animais expostos individualmente ao *crack* e submetidos ao teste de suspensão pela cauda 72 horas após a última exposição;



3. METODOLOGIA

3.1. AQUISIÇÃO DA DROGA

As amostras foram obtidas na delegacia de entorpecentes da cidade de Maceió, mediante a autorização da ANVISA e ordem judicial determinando a entrega e armazenamento da substância aos coordenadores do projeto. Todos os documentos foram organizados pela Procuradoria Federal junto à UFAL, que integra a Procuradoria-Geral Federal.

Os documentos necessários para o desenvolvimento do protocolo foram:

- ✓ Declaração da Polícia Federal salientando conhecimento do desenvolvimento do protocolo experimental na UFAL;
- ✓ Autorização da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA);
- ✓ Petição expedida pela Procuradoria Federal junto à UFAL solicitando a liberação do *crack* pelo juiz competente (décima quinta vara criminal da capital), conforme autorização da ANVISA;
- ✓ Declaração da Unidade (ICBS) de ciência do protocolo desenvolvido;
- ✓ Adequação do laboratório as exigências da Procuradoria Federal junto à UFAL para realização dos experimentos.

3.1.1. Protocolo de segurança para manuseio da droga

Durante a manipulação da substância os pesquisadores estiveram devidamente protegidos com o uso dos equipamentos de proteção individual (EPI's), a saber: roupas preparadas para manipulação de agentes químicos, toucas ou capacetes e máscaras de gás lacrimogênio (figura 15).

Figura 15 - EPI's para manuseio do *crack*



Fonte: Superepi.com.br

Disponível em: <http://migre.me/sjLPn>

3.2. ANIMAIS

Em todos os experimentos foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss* adultos machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (BIOCEN). Os animais foram dispostos em caixas de acrílico com tampa de ferro cromado, subdivididos em grupos de, no máximo, 8 animais por caixa e acomodados no biotério setorial do Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa (LNFI) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) da mesma instituição. Durante toda a vigência do projeto, estes animais foram acondicionados sob temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), submetidos a um ciclo claro-escuro de 12h cada e tratados com água e ração *ad libitum*. Todos os animais permaneceram no mínimo 1 hora em ambientação com luz branca antes dos experimentos. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFAL (048/2013).

3.3. APARATO DE EXPOSIÇÃO

Para a exposição dos animais à droga, foi utilizado um modelo modificado do sistema de Petros et al. (2012), o qual foi inserido no interior de uma capela de exaustão (figura 16). O aparelho consiste em um ventilador setado para geração de 150 ml/min (VETERINARY ANESTHESIA VENTILATOR MODEL, 2000, Hallowell EMC, Pittsfield, MA), uma bomba geradora de fumaça (substância será queimada em um cachimbo) e uma câmara de acrílico, na qual ficam alojados os animais. As caixas são serialmente conectadas por tubos de silicone interligadas por válvulas heimlich (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) para evitar a regressão da fumaça. A câmara apresenta uma tampa superior e dois conjuntos de orifícios para eliminação da fumaça do lado contralateral ao tubo por onde esta é fornecida.

Figura 16 - Aparato de exposição localizado no interior de uma capela de exaustão



Fonte: Autora, 2015

3.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Todo o procedimento experimental foi dividido de acordo com 2 protocolos desenvolvidos: o de exposição individual e o de exposição coletiva.

3.4.1. PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO INDIVIDUAL

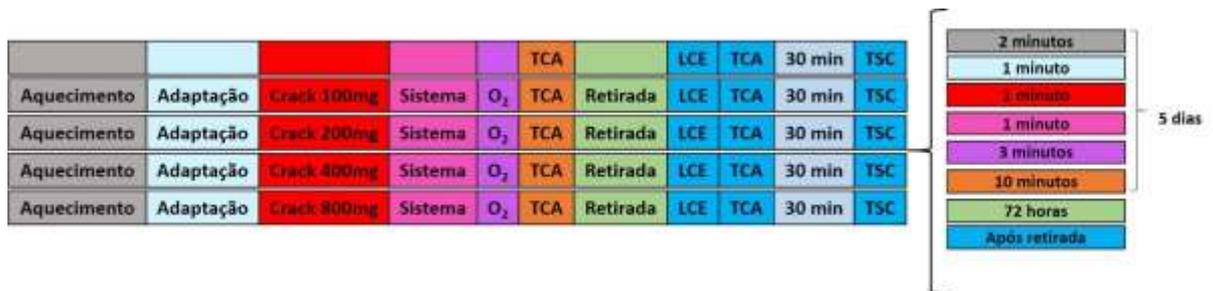
1) Grupo para análise comportamental (n=31)

- a. Animais sem exposição, submetidos individualmente a testes comportamentais [grupo controle (n=8)];
- b. Animais submetidos à exposição individual ao *crack* na dose de 100mg, expostos a testes comportamentais logo em seguida e após 72h (n=5);
- c. Animais submetidos à exposição individual ao *crack* na dose de 200mg, expostos a testes comportamentais logo em seguida e após 72h (n=6);
- d. Animais submetidos à exposição individual ao *crack* na dose de 400mg, expostos a testes comportamentais logo em seguida e após 72h (n=8);
- e. Animais submetidos à exposição individual ao *crack* na dose de 800mg, expostos a testes comportamentais logo em seguida e após 72h (n=4);

Primeiramente foi realizado o aquecimento do cachimbo acoplado a bomba por 2 minutos, com o auxílio de um maçarico culinário. Em seguida, os animais foram submetidos individualmente e por 1 minuto à câmara de exposição para adaptação. Durante esse período o cachimbo permaneceu aquecido. Posteriormente, foi realizada a queima da droga no cachimbo durante 1 minuto. Após a queima, o animal permaneceu exposto ao sistema gerador de fumaça por mais 1 minuto para que toda fumaça contida nos tubos de silicone fosse lançada na câmara e mais 3 minutos de exposição ao oxigênio para eliminar toda fumaça restante, além de fornecer oxigênio adicional para o animal (totalizando 8 minutos). Depois da exposição, o animal foi retirado e levado imediatamente para o TCA por 10 minutos a fim de verificar alterações na atividade locomotora, indicativas da absorção da droga pelo animal. A câmara de acrílico foi higienizada com álcool 70% no intervalo entre os animais. Os animais do grupo controle não passaram por esse protocolo, sendo inseridos diretamente no TCA sem exposição prévia à câmara de acrílico. Esse procedimento foi repetido por 5 dias consecutivos.

Após 5 dias de exposição à droga, os animais foram deixados 72 horas sem exposição (período de “retirada”). Após estas 72 horas, os animais foram expostos ao teste do LCE por 5 minutos, novamente ao TCA (5 minutos) e após 30 minutos, ao TSC (6 minutos); caracterizando dois momentos: durante a exposição e após a retirada (figura 17).

Figura 17 - Protocolo de exposição individual: grupo para análise comportamental



Fonte: Autora, 2015.

3.4.2. PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO COLETIVA - ANÁLISE PRELIMINAR

Nesta análise preliminar, os animais (n=8) foram divididos em 2 grupos:

- Animais submetidos à exposição coletiva ao oxigênio, expostos ao LCE e TCA após 72h (n=2);
- Animais submetidos à exposição e retirada coletiva do *crack* na dose de 400mg, expostos ao LCE e ao TCA após 72h (n=6);

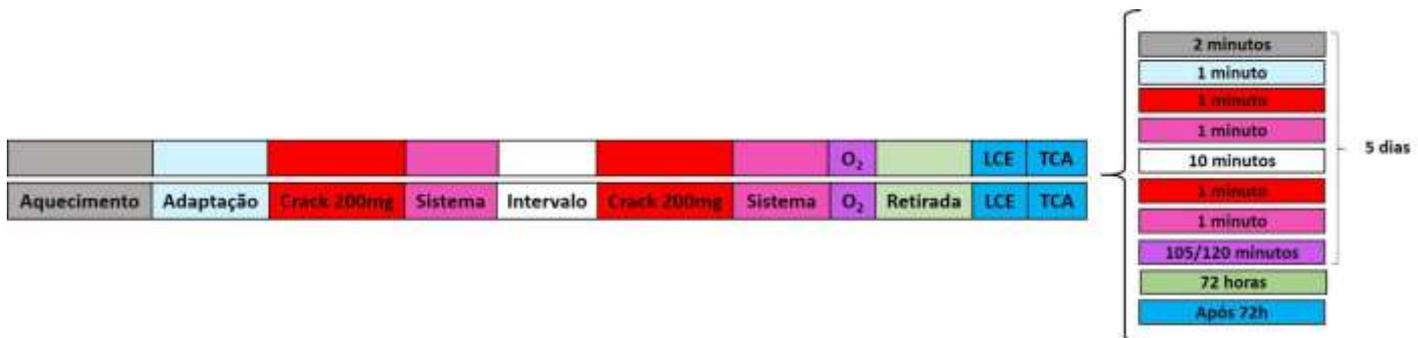
Primeiramente foi realizado o aquecimento do cachimbo acoplado a bomba por 2 minutos, com o auxílio de um maçarico culinário. Em seguida, os animais foram submetidos coletivamente (n=6) a 1 minuto de adaptação prévia à câmara com tampa e orifícios laterais bloqueados (fechada). Posteriormente, foi realizada a queima de metade da droga (200mg) no cachimbo acoplado à bomba durante 1 minuto. Após a queima, os animais permaneceram expostos ao sistema gerador de fumaça por mais 1 minuto para que toda fumaça contida nos tubos de silicone fosse lançada na câmara.

Passada a primeira exposição, os animais ficaram expostos ao oxigênio em um intervalo de 10 minutos (para que toda fumaça fosse eliminada) até a segunda exposição. Nesta, foi queimada a metade restante da droga (200mg) por 1 minuto, seguida por mais 1 minuto de sistema e 105 minutos de oxigênio (totalizando 120 minutos). Ao fim das 2 horas, os animais foram retirados da câmara e levados de volta ao biotério para repetição do protocolo nos dias

subsequentes. Os animais do grupo controle passaram pelo mesmo protocolo, sendo expostos a 120 minutos de oxigênio diariamente. Todos os procedimentos foram filmados diariamente.

Após as 2 horas de exposição diária, os animais retornaram às suas caixas acondicionadas no biotério. Esse procedimento se prosseguiu por 5 dias. Em seguida, os animais foram submetidos à retirada da droga por 72 horas. Após esse período, os animais foram expostos ao LCE e TCA, sendo avaliados parâmetros apenas no período pós-retirada (figura 18).

Figura 18 - Delineamento experimental - Protocolo de exposição coletiva



Fonte: Autora, 2015.

3.4.3. TESTES COMPORTAMENTAIS

3.4.3.1. Teste do Campo Aberto (TCA)

Foi utilizado o Campo Aberto para camundongos (figura 19), confeccionado em acrílico, com base em acrílico de 100cm x 80cm e dimensões de 50cm de altura x 60cm de diâmetro, acondicionado em ambiente com luminosidade e temperatura controladas. No protocolo de exposição aguda, os animais foram submetidos um a um a este teste em dois momentos: 1) diariamente (durante 5 dias) por 10 minutos imediatamente após a inalação da fumaça da droga a fim de verificar alterações locomotoras relacionadas à absorção da mesma, no qual foram registrados 2 principais parâmetros: número de cruzamentos (passagem do animal com as quatro patas entre os quadrantes) e número de *rearings* (comportamento do animal de se levantar sobre as patas posteriores); e 2) após 72h da retirada, em seguida ao LCE, durante 5 minutos no intuito de descartar qualquer prejuízo locomotor durante a ausência da droga.

Por outro lado, no protocolo de overdose, os animais foram expostos individualmente a este teste somente após as 72h de retirada do *crack*, depois do LCE, durante 5 minutos a fim de eliminar a possibilidade de déficit locomotor do animal na ausência da droga.

Figura 19 - Teste do Campo Aberto



Fonte: Insight®

Nota: Disponível em: <http://migre.me/soct5>

3.4.3.2. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O modelo de LCE é bastante simples e difundido pela capacidade de avaliar respostas de ansiedade. Neste modelo foi utilizado um LCE para camundongos (figura 20), confeccionado em acrílico, elevado 40cm do chão, com dois braços laterais fechados e elevados (50cm) e dois braços abertos (1cm). Em ambos os protocolos, os animais foram submetidos individualmente a este teste após 72h da retirada da droga. Eles foram inseridos na plataforma central com a face voltada para um dos braços fechados e filmados por 5 minutos. Os comportamentos avaliados foram divididos em espaço-temporais: número de entradas nos braços abertos (EBA), porcentagem de entradas nos braços abertos ($\%EBA = EBA/(EBA+EBF) \times 100$) - onde EBF é o número de entradas nos braços fechados; tempo de permanência nos braços abertos (TBA) e porcentagem de tempo nos braços abertos ($\%TBA = TBA/(TBA+TBF) \times 100$) - onde TBF é o tempo de permanência nos braços fechados; e parâmetros etológicos: *unprotected head dipping* e *stretched-attend posture* (SAP). Foi realizada uma padronização do modelo antes de sua implantação, utilizando diazepam como fármaco ansiolítico padrão (vide resultados, figura 27).

Figura 20 - Labirinto em Cruz Elevado



Fonte: Insight®

Nota: Disponível em:

http://insightltda.com.br/images/dinamica/gera_thumb.php?h=336&w=351&img=labirinto_cruz.jpg

3.4.3.3. Teste de Suspensão Pela Cauda (TSC)

Após a realização do LCE e TCA, aguardou-se 30 minutos para a realização do TSC (figura 21). Neste protocolo, adaptado de Steru et al. (1985), o animal foi suspenso a 1 metro do chão e teve sua cauda presa à uma superfície plana por uma fita adesiva, onde permaneceu durante 6 minutos com a parte ventral voltada para o observador. Neste tempo, o animal teve dois parâmetros contabilizados: latência para imobilidade (expressa em segundos - representa o tempo que o animal levou do início do experimento até permanecer totalmente imóvel); e o tempo de imobilidade (expresso em segundos e que condiz com o tempo que o animal passou com ausência total de movimento); sendo estes parâmetros inversa e diretamente proporcional ao comportamento tipo-depressivo do animal, respectivamente.

Figura 21 - Teste de Suspensão Pela Cauda



Fonte: Autora, 2015

3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os testes estatísticos foram conduzidos utilizando o programa GraphPad Prism® versão 5.0. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e foi considerada estatisticamente significativa qualquer diferença com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

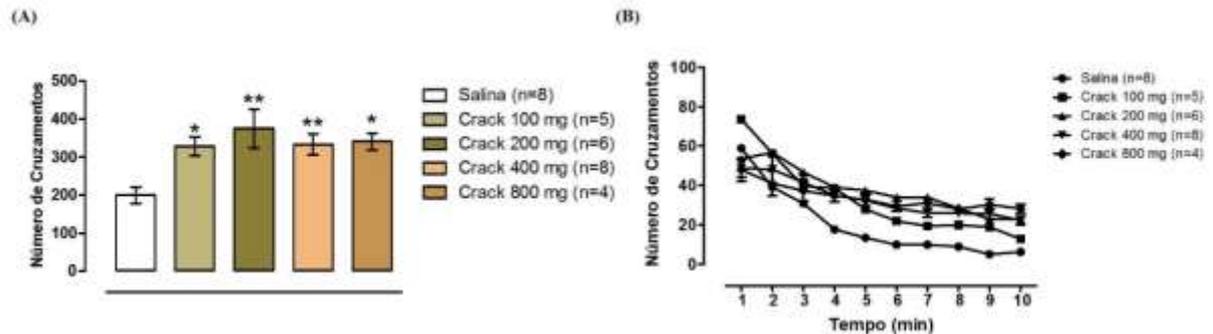
4.1. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE PSICOESTIMULANTE DO *Crack*

Uma vez caracterizado o LCE, realizou-se a padronização do modelo experimental de exposição dos camundongos ao *crack*. Os animais foram submetidos durante 5 dias a 1 minuto de adaptação prévia à câmara aberta do aparato de exposição, seguida pela queima da droga no cachimbo acoplado à bomba durante 1 minuto. Após a queima, o animal permaneceu exposto ao sistema gerador de fumaça por mais 1 minuto para que toda fumaça contida nos tubos de silicone fosse lançada na câmara e mais 3 minutos de exposição ao oxigênio para eliminar toda fumaça restante. Depois da exposição, o animal foi retirado e levado imediatamente para o Teste do Campo Aberto (TCA) por 10 minutos.

Sabe-se que a exposição de roedores a drogas psicoestimulantes como cocaína induz um efeito hiperlocomotor; e para tal, foi utilizado o TCA, teste que permite observar como o animal se comporta em amplo ambiente durante os 5 dias de exposição ao *crack*, além de verificar alterações na atividade locomotora, indicativas da absorção da droga pelo animal (ROBINSON e BECKER, 1986; KALIVAS e STEWART, 1991; HO et al., 2002).

Neste modelo, foi observado um aumento significativo no número de cruzamentos em todas as doses do *crack* no dia 1 quando comparados ao controle (figura 22A). Pode-se notar ainda que o número de cruzamentos avaliados durante os 10 minutos no TCA diminuiu ao longo do tempo do animal no aparato (figura 22B). Por outro lado, nos dias 2 e 3, nota-se que a dose de 100mg não é mais capaz de promover um aumento significativo da atividade locomotora dos animais (figuras 23A e 24A, respectivamente); fato também observado com a dose de 200mg nos dias 4 e 5 (figuras 25A e 26A respectivamente).

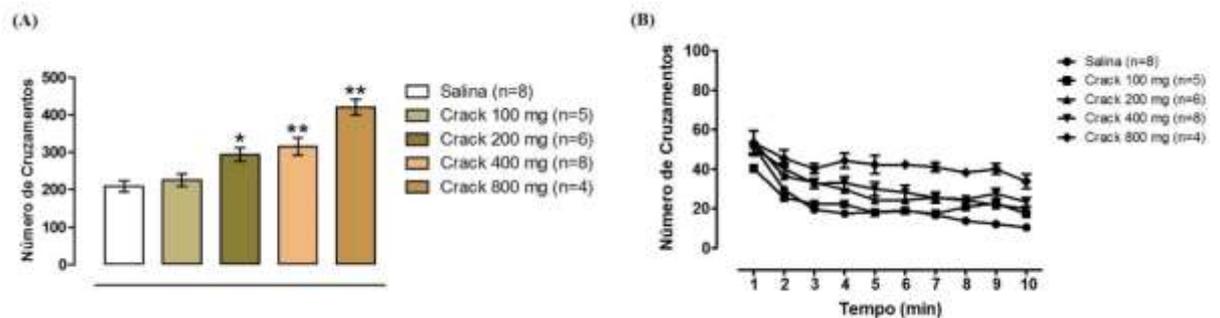
Figura 22 - Número de cruzamentos no TCA - Dia 1



Fonte: Autora, 2015.

Nota: (A) Número médio de cruzamentos/dia. (B) Número de cruzamentos por minuto. Efeito da administração de *crack* em diferentes doses na atividade locomotora de camundongos no Teste do Campo Aberto - Dia 1. Resultados expressos como média \pm E.P.M com * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Significativos após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnet quando comparado ao controle negativo.

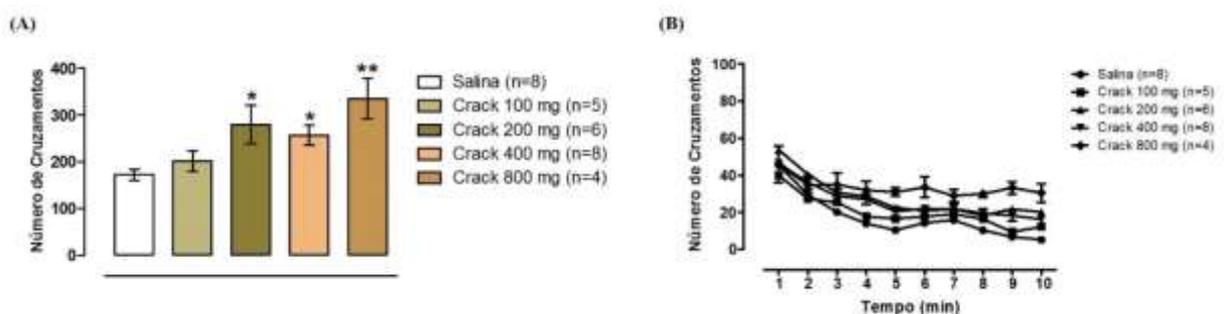
Figura 233 - Número de cruzamentos no TCA - Dia 2



Fonte: Autora, 2015.

Nota: (A) Número médio de cruzamentos/dia. (B) Número de cruzamentos por minuto. Efeito da administração de *crack* em diferentes doses na atividade locomotora de camundongos no Teste do Campo Aberto - Dia 2. Resultados expressos como média \pm E.P.M com * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Significativos após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnet quando comparado ao controle negativo.

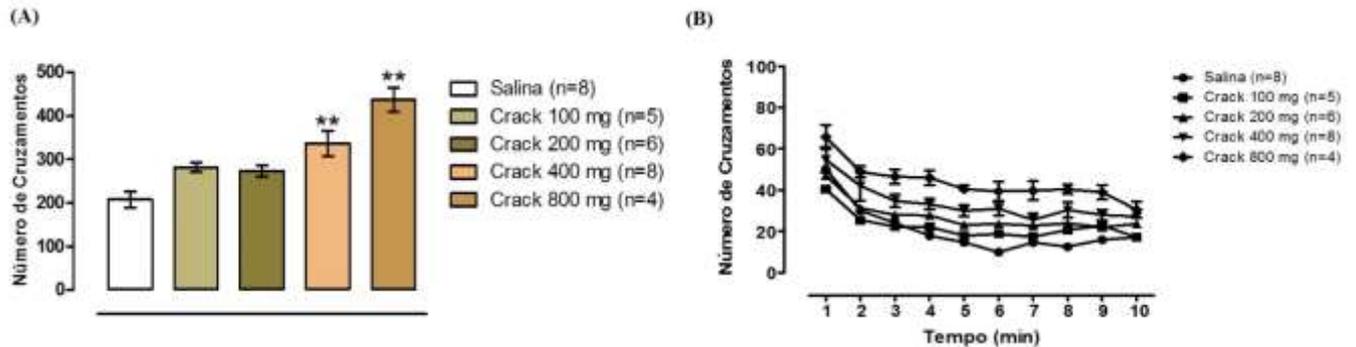
Figura 24 - Número de cruzamentos no TCA - Dia 3



Fonte: Autora, 2015.

Nota: (A) Número médio de cruzamentos/dia. (B) Número de cruzamentos por minuto. Efeito da administração de *crack* em diferentes doses na atividade locomotora de camundongos no Teste do Campo Aberto - Dia 3. Resultados expressos como média \pm E.P.M com * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Significativos após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnet quando comparado ao controle negativo.

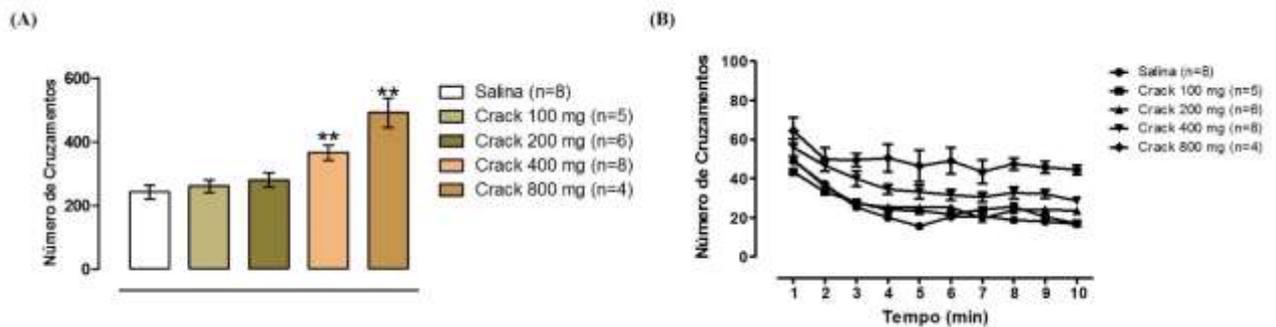
Figura 25 - Número de cruzamentos no TCA - Dia 4



Fonte: Autora, 2015.

Nota: (A) Número médio de cruzamentos/dia. (B) Número de cruzamentos por minuto. Efeito da administração de crack em diferentes doses na atividade locomotora de camundongos no Teste do Campo Aberto – Dia 4. Resultados expressos como média \pm E.P.M com $**p < 0,01$. Significativos após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnet quando comparado ao controle negativo.

Figura 26 - Número de cruzamentos no TCA - Dia 5



Fonte: Autora, 2015.

Nota: (A) Número médio de cruzamentos/dia. (B) Número de cruzamentos por minuto. Efeito da administração de crack em diferentes doses na atividade locomotora de camundongos no Teste do Campo Aberto – Dia 5. Resultados expressos como média \pm E.P.M com $**p < 0,01$. Significativos após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnet quando comparado ao controle negativo.

O efeito psicoestimulante inicial era esperado, pois sabe-se que a administração aguda de drogas de abuso, como a cocaína, é associada com maior acúmulo de dopamina no sistema mesolímbico, sobretudo no *nucleus accumbens*, o que foi associado a efeitos de recompensa e psicomotores, como a atividade locomotora aumentada (KELLY et al., 1975; WISE e BOZARTH, 1987; HURD et al., 1989; DELFS et al., 1990; KOOB e LEMOAL, 2006; ALCARO et al., 2007; FUKUSHIRO et al., 2012; SAITO et al., 2014; MARINHO et al., 2014; HOLLAIS et al., 2014).

Em contraste ao achado psicoestimulante, foi observada nos dias subsequentes uma redução nesse efeito nas duas menores doses, o que poderia ser caracterizado como tolerância, pois a

exposição repetida à substância levou a uma diminuição no efeito locomotor observado. Esse achado é corroborado por Wise e Bozarth (1987), onde eles sugerem que a recompensa induzida pela cocaína é atenuada após constante repetição do procedimento de administração. Hurd et al. (1989) atribuem esse efeito à redução da dopamina na via mesolímbica em animais expostos continuamente à droga.

Nossos achados são confirmados ainda por Calipari et al. (2014), no qual foi verificado que ratos com amplo acesso à cocaína apresentavam tolerância neuroquímica por redução da sensibilidade dos transportadores de dopamina; além de atenuação da atividade locomotora, indicativa de tolerância aos efeitos psicomotores da cocaína.

4.2.VALIDAÇÃO DO MODELO DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Para validar o LCE nas condições do laboratório, foram utilizados um grupo controle (n=10) e um grupo pré-tratado com o fármaco ansiolítico padrão: diazepam (DZP), na dose de 1,5mg/Kg (n=10). Foram contabilizados os 2 principais parâmetros espaço-temporais na validação do modelo: porcentagem de entrada nos braços abertos (%EBA) e porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA).

Para o cálculo da %EBA, dividiu-se o número de entradas nos braços abertos (EBA) pela soma do número de entrada nos braços abertos mais o número de entradas nos braços fechados (EBF) e multiplicou-se o resultado por 100, conforme a seguinte equação:

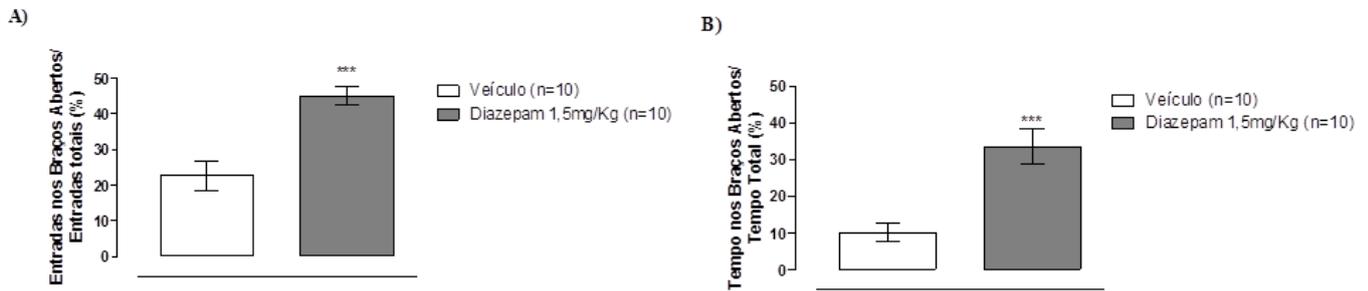
$$\%EBA = \frac{EBA}{(EBA + EBF)} \times 100$$

Para a %TBA, calculou-se a razão entre o tempo de permanência nos braços abertos (TBA) e o tempo de permanência nos braços abertos mais o tempo de permanência nos braços fechados (TBF) multiplicado por 100, de acordo com a equação:

$$\%TBA = \frac{TBA}{(TBA + TBF)} \times 100$$

Na %EBA (figura 27A) os animais pré-tratados com DZP apresentaram um aumento significativo ($p < 0,001$) deste parâmetro quando comparado ao grupo controle. Quando avaliada a %TBA, nota-se que o DZP também foi capaz de elevar significativamente este parâmetro ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo controle (figura 27B).

Figura 27 - Validação do Labirinto em Cruz Elevado



Fonte: Autora, 2015.

Nota: (A) Porcentagem de Entradas nos Braços Abertos (%EBA); (B) Porcentagem de Tempo nos Braços Abertos (%TBA). Efeito da administração de salina e diazepam nos parâmetros espaço-temporais de camundongos submetidos ao Teste do Labirinto em Cruz Elevado. Resultados expressos como média \pm E.P.M com *** $p < 0,001$. Significativos após Teste T não pareado.

Conforme mencionado, para a validação de um modelo animal, um dos pré-requisitos a se atender é promover a alteração comportamental e ser capaz de revertê-la com o fármaco-padrão (MCKINNEY e BUNNEY, 1969). Quando expostos ao Labirinto em Cruz Elevado, os animais do grupo controle apresentaram uma redução significativa no número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos, corroborando a literatura (PELLOW et al., 1985; LISTER, 1987). Este comportamento foi revertido pelo diazepam, fármaco ansiolítico bastante empregado na clínica; o qual promoveu uma redução dos comportamentos tipo-ansiosos, promovendo um aumento na exploração dos braços abertos, conforme descrito por Pellow et al., 1985; caracterizando o correto funcionamento do LCE e padronizando o modelo em nossas condições experimentais.

4.3. AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL APÓS A RETIRADA DA DROGA – PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO INDIVIDUAL

Uma vez padronizados os modelos experimentais, o protocolo de exposição e caracterizado o efeito psicoestimulante do *crack*, bem como o desenvolvimento de tolerância, propôs-se verificar possíveis alterações relacionadas à ansiedade e depressão nos animais submetidos a retirada da droga por 72h, pois essas comorbidades são frequentemente associadas aos usuários de cocaína e relacionadas na literatura aos intervalos abruptos de retirada da droga.

4.3.1. COMPORTAMENTOS RELACIONADOS COM ANSIEDADE

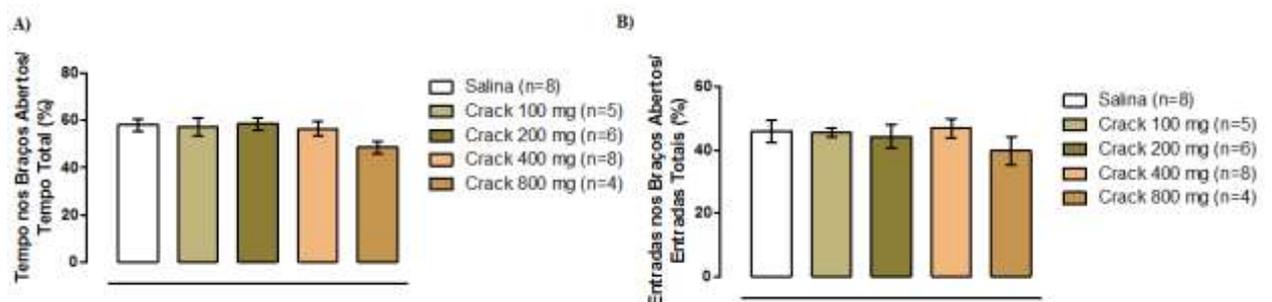
A ansiedade surge como o segundo transtorno mais comum em jovens usuários regulares de cocaína e é relacionada à dessensibilização dos receptores de dopamina, além do

esgotamento deste neurotransmissor após constante liberação (WEDDINGTON et al., 1990; LESHNER, 1996; ROBINSON e KOLB, 2004; HERRERO et al. (2008).

Nossos achados não evidenciaram efeitos tipo-ansiosos em animais submetidos à retirada da droga por 72 horas após 5 dias de exposição no LCE (figuras 28 e 29). A atividade locomotora também não foi afetada (Figura 30A e 30B). Embora aparentemente controverso, esse resultado é sustentado pela literatura. Em 2011, Ferris e colaboradores encontraram diferenças nos níveis basais de dopamina 24 horas após a exposição de animais a cocaína, enquanto Calipari et al. (2014) não fizeram o mesmo achado 72 horas após.

Apesar de a tolerância comportamental se manter, a linha base de dopamina retorna à função normal após 3 dias de abstinência, se normalizando rapidamente após a experiência de cocaína (FERRIS et al., 2011). Adicionalmente, Sarnyai et al. (1995) mencionam que comportamentos tipo-ansiosos são normalmente observados nas primeiras 48 horas de retirada. Esses achados podem justificar a ausência de efeitos comportamentais tipo-ansiosos em nossos experimentos com o LCE 72h após a retirada da droga.

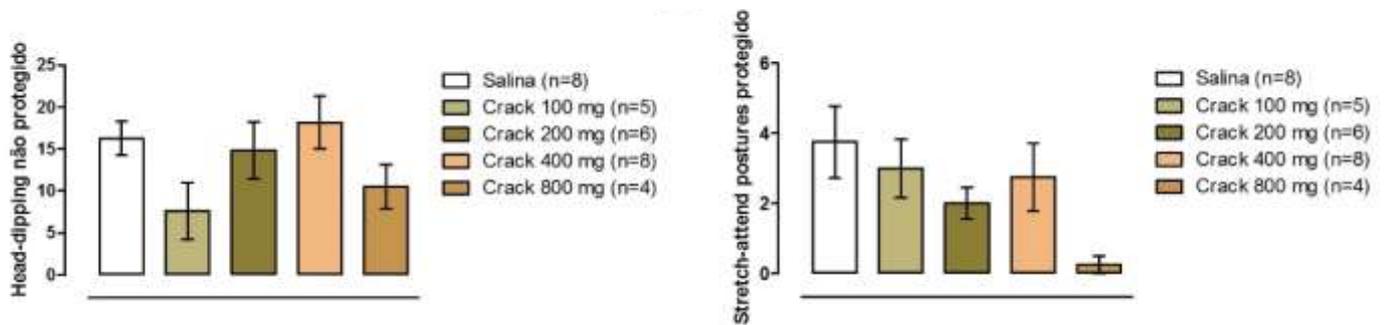
Figura 28 - Parâmetros espaço-temporais avaliados no Labirinto em Cruz Elevado 72h após a retirada do crack



Fonte: Autora, 2015.

Nota: (A) (B) Porcentagem de Entradas nos Braços Abertos (%EBA). Efeito da administração de crack em diferentes doses nos parâmetros espaço-temporais de camundongos submetidos ao Teste do Labirinto em Cruz Elevado 72 horas após a retirada da droga. Resultados expressos como média±E.P.M. Não-significativos após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnet quando comparado ao controle negativo.

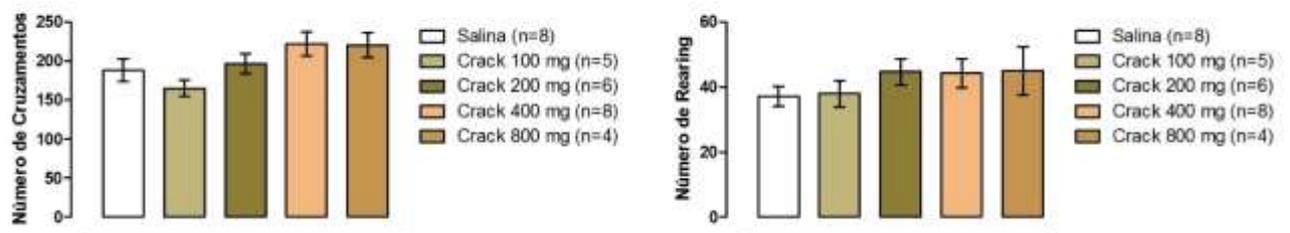
Figura 29 - Parâmetros etológicos avaliados no Labirinto em Cruz Elevado 72h após a retirada do crack



Fonte: Autora, 2015.

Nota: (A) Head-dipping não-protégido; (B) *Stretch-attend posture* protegido. Efeito da administração de crack em diferentes doses nos parâmetros espaço-temporais de camundongos submetidos ao Teste do Labirinto em Cruz Elevado 72 horas após a retirada da droga. Resultados expressos como média±E.P.M. Não-significativos após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnet quando comparado ao controle negativo.

Figura 30 - Parâmetros avaliados no Teste do Campo Aberto 72h após a retirada do crack



Fonte: Autora, 2015.

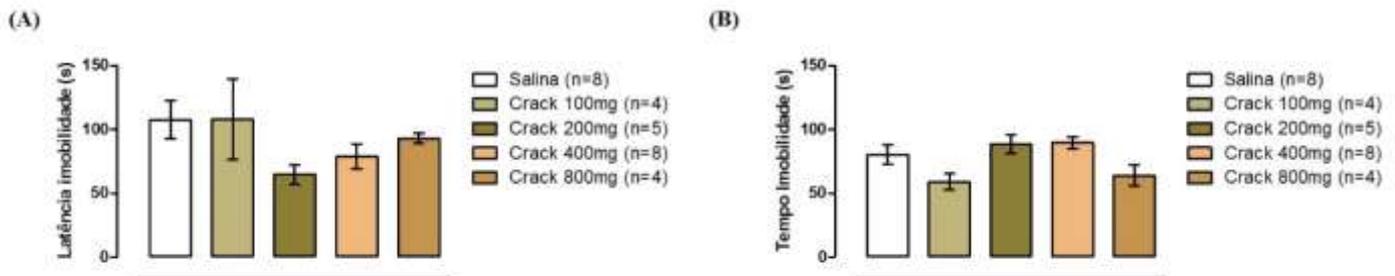
Nota: (A) Número de cruzamentos; (B) Número de rearings. Efeito da administração de crack em diferentes doses na atividade locomotora de camundongos submetidos ao Teste do Campo Aberto 48 horas após a retirada da droga. Resultados expressos como média ± E.P.M com $**p < 0,01$. Significativos após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnet quando comparado ao controle negativo.

4.3.2. AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO

Sabe-se que existe uma estreita relação entre pacientes usuários de cocaína e comportamentos depressivos (Conner et al., 2008). Esse fato pode ser atribuído em ambos os sentidos: ou as alterações neurofisiológicas e comportamentais causadas pela droga aumentam a vulnerabilidade do usuário à depressão; ou a depressão aumenta a suscetibilidade do indivíduo ao uso de drogas a fim de aliviar os sintomas do transtorno (MARKOU et al, 1998; CHINET et al., 2006). Baseando-nos no estudo publicado por DACKIS e O'BRIEN (2011) onde as elevadas taxas de depressão pelos usuários de cocaína são associadas à diminuição dos níveis de dopamina após consumo prolongado da droga, propomos avaliar alterações relacionadas a

depressão em camundongos submetidos ao Teste de Suspensão Pela Cauda após 72 horas da última exposição ao *crack*. No entanto, apesar da relação entre cocaína e depressão, não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros avaliados (latência para imobilidade e tempo para imobilidade – Figura 31).

Figura 31 - Parâmetros avaliados no Teste de Suspensão pela Cauda 72h após a retirada do *crack*



Fonte: Autora, 2015.

Nota: (A) Latência para imobilidade; (B) Tempo de imobilidade. Efeito da administração de *crack* em diferentes doses nos parâmetros de depressão em camundongos submetidos ao Teste de Suspensão pela Cauda 48 horas após a retirada da droga. Resultados expressos como média \pm E.P.M. Não-significativos após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnet quando comparado ao controle negativo.

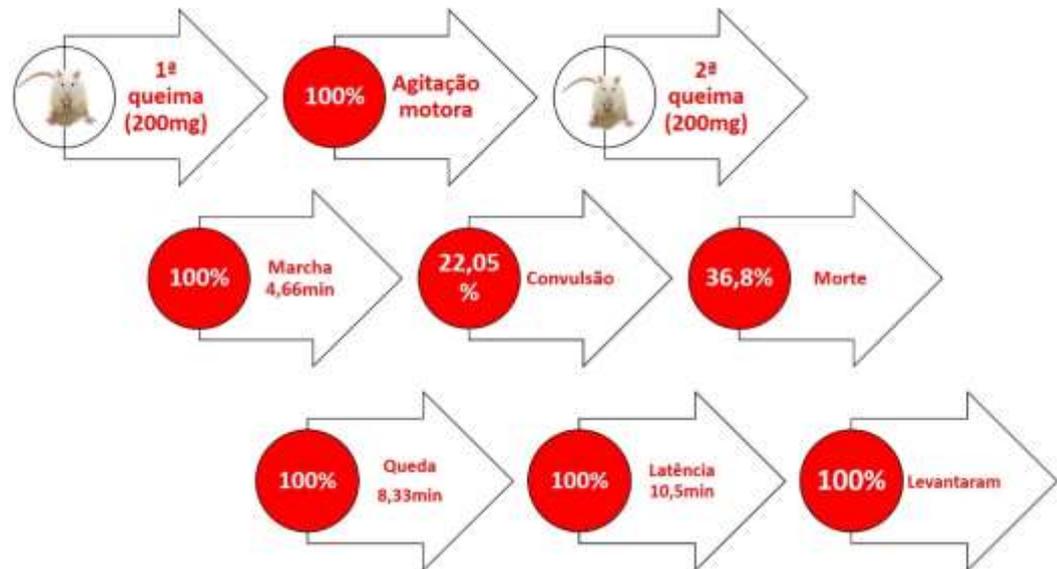
Um achado semelhante foi encontrado por Zilkha et al. (2014). Esse grupo indicou que a exposição subcrônica de ratos à cocaína, embora tenha desencadeado alterações neuroquímicas características da depressão (aumento da expressão da proteína BDNF no Córtex Pré-Límbico), não promoveu diferenças significativas no Teste de preferência pela Sacarose (TPS) nem alterações comportamentais tipo-depressivas no Teste do Nado Forçado. Isso provavelmente corrobora a ausência de alterações significativas no TSC, as quais podem ter sido apenas a nível neuroquímico, sem reflexo comportamental.

4.4. AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL NA EXPOSIÇÃO COLETIVA

Após a caracterização do protocolo de exposição individual, propôs-se avaliar o comportamento dos animais durante a exposição coletiva, isto é, as mudanças comportamentais de animais expostos em grupo durante 5 dias à fumaça da droga na dose de 400mg, dividida em 2 exposições de 200mg cada. Conforme observado na figura 32, após a 1ª queima (200mg de *crack*), todos os animais apresentaram apenas agitação motora. No entanto, após a queima da 2ª metade, 100% dos animais apresentaram uma marcha desordenada não mencionada na literatura. Destes, 22,05% apresentaram pelo menos um episódio de convulsão, dos quais 36,8% evoluíram para a morte. Dos animais restantes, 100% apresentaram queda, praticamente ao

mesmo tempo (latência média para queda de 8,33 minutos após a 2ª queima), adquirindo decúbito dorsal ou lateral e passaram cerca de 10,5 minutos nessa posição. Após este tempo, 100% dos animais levantaram, novamente em momentos bastante semelhantes (figura 32).

Figura 32 - Alterações comportamentais em animais durante o protocolo de exposição coletiva



Fonte: Autora, 2015.

4.5. AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL APÓS A RETIRADA DA DROGA – PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO COLETIVA

Após a avaliação do comportamento dos animais durante a exposição coletiva, propôs-se avaliar os efeitos comportamentais 72 horas após a retirada do *crack* nos animais submetidos a este protocolo durante 5 dias. Para isto, foram analisados parâmetros relacionados à ansiedade.

4.5.1. ESTUDO DA ATIVIDADE TIPO-ANSIOGÊNICA

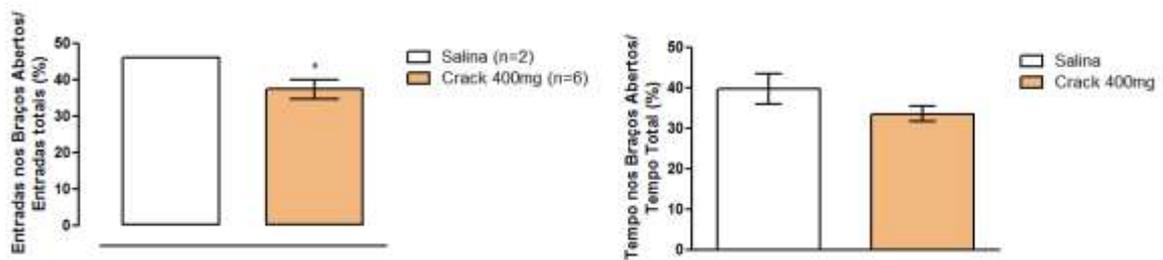
O LCE é descrito na literatura como o modelo mais aceito para detecção de efeitos ansiolíticos e ansiogênicos em roedores (TREIT, 1985). Frente a isto, utilizou-se o modelo para avaliar o comportamento de camundongos expostos ao protocolo de exposição coletiva ao *crack* e expostos ao teste após 72h de retirada da droga.

Embora no protocolo de exposição aguda não tenham sido evidenciadas alterações relacionadas à ansiedade 72h após a retirada da droga, as figuras 33A e 33B mostram que os animais submetidos a retirada da droga 72h após o protocolo de exposição coletiva

apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa na %EBA, característica de um efeito tipo-ansio gênico; embora não tenham apresentado redução significativa na %TBA.

Esse comportamento provavelmente se deve à exposição dividida em 2 momentos de 200mg, dose na qual já é observado efeito psicoestimulante no 1º dia. Além disto, outros contribuintes para o efeito mais robusto da exposição e portanto, da retirada da droga, podem ter sido o fechamento da caixa de acrílico com os animais no interior, inalando toda a fumaça contida na mesma; além da própria interação de um animal com o outro na câmara, uma vez que sabe-se que o comportamento de um animal pode influenciar no do outro contido no mesmo ambiente.

Figura 33 - Parâmetros espaço-temporais avaliados no LCE 72h após a retirada do *crack* no protocolo de exposição coletiva

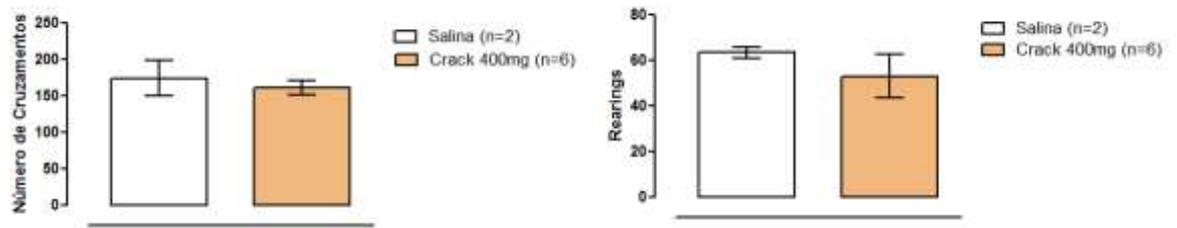


Fonte: Autora, 2015.

Nota: (A) Porcentagem de Entradas nos Braços Abertos (%EBA); (B) Porcentagem de Tempo nos Braços Abertos (%TBA). Efeito da administração coletiva de *crack* na dose de 400mg nos parâmetros espaço-temporais de camundongos submetidos ao Teste do Labirinto em Cruz Elevado 72 horas após a retirada da droga. Resultados expressos como média±E.P.M. Significativos após teste *t* não-pareado.

Após o LCE, os animais foram inseridos no TCA para avaliação dos parâmetros locomotores, traduzidos pelo número de cruzamentos e comportamentos de levantar-se em apenas duas patas (*rearing*). A atividade locomotora está relacionada ao comportamento de fuga, sendo normalmente aumentada por substâncias psicoestimulantes e situações de estresse, bem como reduzida por fármacos ansiolíticos. Na figura 34A, pode ser observado que não houve diferença significativa no número de cruzamentos do grupo *crack* 400mg quando comparado ao controle (161.8 ± 9.534 e 174.5 ± 24.50 , respectivamente); ao passo que na figura 34B, observa-se que também não houve diferença significativa no número de rearings do grupo *crack* 400mg quando comparado ao grupo controle (53.17 ± 9.738 e 63.50 ± 2.500 , respectivamente). Essa ausência de diferenças estatisticamente significativas provavelmente se deve à ausência de prejuízo locomotor nos animais submetidos a estes testes após 72 horas da retirada do *crack*.

Figura 34 - Parâmetros comportamentais avaliados no TCA 72h após a retirada do *crack* no protocolo de exposição coletiva



Fonte: Autora, 2015.

Nota: (A) Número de cruzamentos. (B) Número de rearings. Efeito da administração de *crack* em diferentes doses na atividade locomotora de camundongos submetidos ao Teste do Campo Aberto 48 horas após a retirada da droga. Resultados expressos como média \pm E.P.M. Não-significativos após teste *t* não-pareado.

**SEÇÃO 2. ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus limon*:
ALTERNATIVA TERAPÊUTICA PARA REDUÇÃO DO
EFEITO PSICOESTIMULANTE DO *Crack*?**

1.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE *Citrus limon*

Na literatura, há diversas atividades biológicas de espécies do gênero *Citrus* mencionadas, tais como: anti-inflamatória, antioxidante, antinociceptiva, analgésica e antimicrobiana (BENAVENTE-GARCÍA e CASTILLO, 2008; CAMPÊLO et al., 2011a; SETTANNI et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2014; PARHIZ et al., 2015). Além de ações periféricas, existem inúmeros relatos de efeito a nível de sistema nervoso central de espécies deste gênero, com destaque para atividade anticonvulsivante, ansiolítica, sedativa e antidepressiva (CARVALHO-FREITAS e COSTA, 2002; FATURI et al., 2010; COSTA et al., 2013; POTDAR e KIBILE, 2011; AZANCHI et al., 2014; MALLICK e KHAN, 2015).

Nesse contexto, destaca-se a espécie *Citrus limon*, popularmente conhecida como limoeiro, limão siciliano ou limão verdadeiro, cujas folhas e frutos são utilizados na medicina popular como terapia (PENIDON e SILVA, 2007). O fruto é utilizado há centenas de anos com inúmeras propriedades medicinais e nutricionais. Vendruscolo et al (2005) descreveram o uso popular de *Citrus limon* em Porto Alegre (Rio Grande do Sul) na forma de chá e do fruto *in natura* (fruto, casca do fruto, semente, folhas) para bronquite, colesterol, dor de cabeça, garganta, enxaqueca, gripe, dentre outros. Além disto, Ortencio (1997) relatou usos populares do limão em pressão alta, anemia, diabetes e controle do ácido úrico.

Citrus limon vem sendo bastante associado a ações a nível central em distintas vias de administração, doses e espécies animais. Em 1995, Komori et al. mencionaram o efeito antidepressivo do odor do limão em ratos no teste do nado forçado (TNF), tanto isoladamente quanto associado à imipramina, potencializando seu efeito. Em 2010, Komiya et al. mencionaram o vapor do óleo essencial do limão como o mais potente dentre 3 diferentes óleos na ação anti-estresse de camundongos submetidos ao LCE, TCA e TNF.

Recentemente, Khan e Riaz (2015) sugeriram que comorbidades como ansiedade e depressão podem ser atenuadas por uma dieta rica em antioxidantes. Dessa forma, eles trataram ratos com *Citrus limon* em doses consideradas baixa, moderada e alta e observaram um efeito tipo-ansiolítico e tipo-antidepressivo da espécie nos testes do LCE, TCA e TNF na dose considerada moderada. Além disso, Campêlo e colaboradores (2011_{a,b,c,d}) caracterizaram os efeitos sedativo, ansiolítico, antidepressivo, antioxidante, neuroprotetor e anticonvulsivante do óleo essencial de *Citrus limon* por via oral em camundongos, sugerindo esta espécie como um potencial alvo de estudos. Apesar desses avanços, não existem dados na literatura relacionando o efeito do óleo essencial de *Citrus limon* em efeitos centrais pós-exposição a drogas.

Diante disto, o presente capítulo buscou avaliar o papel do óleo essencial de *Citrus limon* na atividade locomotora e no limiar de crises convulsivas induzidos pela exposição à droga.

2. OBJETIVOS

2.2. Objetivo Geral

Avaliar o potencial do óleo essencial extraído das cascas do fruto de *Citrus limon* (OEL) na redução da atividade psicoestimulante do *crack*, bem como seu efeito no limiar para crises convulsivas.

2.2.1. Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar alterações nos parâmetros locomotores de animais tratados ou não com OEL e expostos ao *crack* em diferentes doses por meio do Teste do Campo Aberto;
- ✓ Observar possíveis alterações no limiar para crises convulsivas em animais expostos à droga e tratados ou não com OEL, no modelo de *Status Epilepticus* induzido por pilocarpina;

3.1. OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Os procedimentos experimentais foram realizados com Óleo Essencial de *Citrus limon* (OEL) na forma em que é comercializado; no qual foi adquirido 1 frasco de 100mL da distribuidora Ferquima Ind. e Com. Ltda, São Paulo (figura 35)

Figura 35 - Frasco - Óleo Essencial de *Citrus limon* (Ferquima®)



Fonte: Autora, 2015

3.2. PRÉ-TRATAMENTO COM OEL

O pré-tratamento com OEL na dose de 300mg/Kg via oral foi realizado 1 vez ao dia, através da técnica de gavagem 1 hora antes dos testes comportamentais. Dessa forma, foi preparada diariamente uma suspensão de OEL, salina e tween, administrada de acordo com o peso individual do animal. Para isto, foi utilizada uma seringa de 1mL dotada de uma cânula específica para gavagem em camundongos, onde a suspensão foi introduzida diretamente no estômago do animal, após um jejum mínimo de 6 horas. A dose e o jejum foram estabelecidos após um estudo farmacológico de diferentes doses de OEL (vide figura 37).

3.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O procedimento experimental foi conduzido de acordo com os 2 protocolos propostos: o de redução da atividade psicoestimulante e o do limiar para crises convulsivas.

3.3.1. REDUÇÃO DA ATIVIDADE PSICOESTIMULANTE

Uma vez caracterizada a atividade psicoestimulante do *crack* nas doses testadas, propôs-se avaliar a redução desta atividade através do pré-tratamento dos animais com o OEL na dose de 300mg/Kg via oral. Para isto, foram realizados dois experimentos separados: um com a dose de 200mg e outro com a dose de 400mg de *crack*, de acordo com a disposição a seguir:

3.3.3.1. Avaliação da redução do efeito psicoestimulante do *crack* na dose de 200mg após tratamento com OEL 300mg/Kg (n=33):

- a) Animais sem pré-tratamento e sem exposição ao *crack* (n=8)
- b) Animais sem pré-tratamento expostos ao protocolo de exposição individual com *crack* na dose de 200mg (n=10)
- c) Animais pré-tratados com OEL 300mg/Kg sem exposição ao *crack* (n=8)
- d) Animais pré-tratados com OEL 300mg/Kg e expostos ao protocolo de exposição individual com *crack* na dose de 200mg (n=7)

3.3.3.2. Avaliação da redução do efeito psicoestimulante do *crack* na dose de 400mg após tratamento com OEL 300mg/Kg (n=31):

- a) Animais sem pré-tratamento e sem exposição ao *crack* (n=8)
- b) Animais sem pré-tratamento expostos ao protocolo de exposição individual com *crack* na dose de 400mg (n=8);
- c) Animais pré-tratados com OEL 300mg/Kg sem exposição ao *crack* (n=8);
- d) Animais pré-tratados com OEL 300mg/Kg e expostos ao protocolo de exposição individual com *crack* na dose de 400mg (n=7);

3.4. ALTERAÇÕES NO LIMIAR PARA CRISES CONVULSIVAS

Sabendo que o *crack* tem uma relação estreita com a epilepsia, propôs-se avaliar a capacidade da droga de alterar o limiar para crises convulsivas induzidas pela pilocarpina. Dessa forma, a dose escolhida de pilocarpina foi 75mg/Kg, considerada subconvulsivante na literatura e, portanto, esperava-se que a mesma não desencadeasse crises convulsivas nos animais submetidos apenas à sua administração. Por outro lado, caso o *crack* interferisse no limiar para estas crises, reduzindo-o, seriam observadas crises de diferentes níveis na escala arbitrária de Racine (1972). Por fim, foi proposto também avaliar a capacidade do OEL de reverter o possível efeito do *crack* no limiar para as crises.

Diante disto, os animais (n=20) foram divididos nos seguintes grupos:

- a) Animais sem pré-tratamento com OEL, sem exposição ao *crack* e sem administração de PILO [grupo controle sem exposição (n=4)];
- b) Animais sem pré-tratamento com OEL, expostos ao *crack* 400mg e sem administração de PILO [grupo controle exposto (n=4)];

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

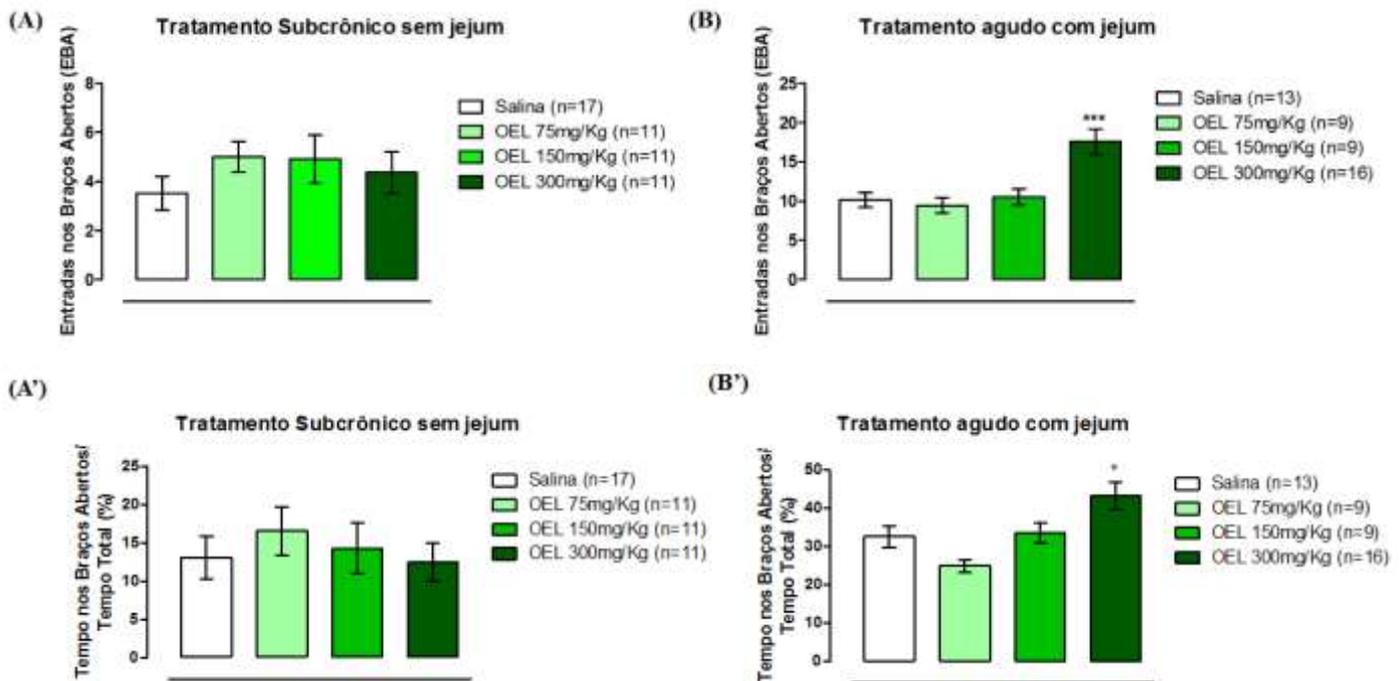
4.1. DEFINIÇÃO DE DOSE E PROTOCOLO DE JEJUM PARA O OEL

Para utilização do OEL, o primeiro passo foi estabelecer a dose do óleo a ser utilizada. Para isso, camundongos *Swiss* foram tratados com diferentes doses de OEL e submetidos a 2 protocolos distintos: (A) animais tratados por 7 dias com OEL 1 vez ao dia e submetidos ao LCE após o período de tratamento sem restrição alimentar (grupo subcrônico sem jejum); e (B) animais tratados com OEL 60 minutos antes da inserção no LCE com restrição alimentar mínima de 6h antes do experimento (grupo agudo com jejum).

Como observado na figura 37A, os animais submetidos ao tratamento subcrônico sem jejum não apresentaram diferença estatisticamente significativa no EBA em nenhuma dose de OEL quando comparados ao controle (SAL: $3,529 \pm 0,6812$; OEL75: $5,000 \pm 0,6179$; OEL150: $4,909 \pm 0,9859$; OEL 300: $4,364 \pm 0,8557$). Além disto, o OEL em nenhuma dose foi capaz de promover diferença estatística na %TBA, conforme visto na figura 37A' (SAL: $13,10 \pm 2,763$; OEL75: $16,54 \pm 3,127$; OEL150: $14,30 \pm 3,308$; OEL300: $12,45 \pm 2,501$).

Por outro lado, a figura 37B evidencia um aumento estatisticamente significativo no EBA pelo tratamento agudo dos animais com OEL 300mg/Kg quando comparado ao controle. As demais doses não foram capazes de promover diferença estatística nesse parâmetro quando comparadas ao controle (SAL: $10,15 \pm 0,9118$; OEL 75: $9,444 \pm 0,9590$; OEL150: $10,56 \pm 1,029$; OEL300: $17,56 \pm 1,643$). Corroborando o observado na figura 37B, a figura 37B' demonstra o aumento da %TBA pelo OEL 300mg/Kg quando comparado ao controle e às demais doses (SAL: $32,58 \pm 2,850$; OEL75: $24,92 \pm 1,694$; OEL150: $33,55 \pm 2,529$; OEL300: $43,22 \pm 3,597$).

Figura 37 - Parâmetros espaço-temporais das diferentes doses de OEL no Labirinto em Cruz Elevado em dois protocolos distintos



Fonte: Autora, 2015.

Nota: (A) Número de entradas nos braços abertos (EBA) de animais pré-tratados durante 7 dias (1 vez ao dia) com OEL via oral em diferentes doses sem jejum; (B) Número de entradas nos braços abertos (EBA) de animais pré-tratados com OEL via oral em diferentes doses 60 minutos antes do LCE, com jejum mínimo de 6 horas; (A') Porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA) de animais pré-tratados durante 7 dias (1 vez ao dia) com OEL via oral em diferentes doses sem jejum; (B') Porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA) de animais pré-tratados com OEL via oral em diferentes doses 60 minutos antes do LCE, com jejum mínimo de 6 horas. Resultados expressos como média \pm E.P.M com $*p < 0,05$ e $***p < 0,001$. Significativos após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnet quando comparado ao controle negativo.

Os dados encontrados corroboram com a literatura, onde o OEL vem sendo associado a efeitos tipo-ansiolíticos e anti-estresse no modelo do LCE (CAMPÊLO et al., 2011; KOMYIA et al., 2010). Além disto, uma revisão sistemática publicada por De-Sousa et al. (2015) mencionou o efeito tipo-ansiolítico do OEL via oral em camundongos submetidos ao tratamento agudo, corroborando nossos achados. Diante disto, foi estabelecido o protocolo de tratamento com OEL via oral por gavagem na dose de 300mg/Kg 60 minutos antes dos testes, com jejum mínimo de 6 horas, ressaltando o papel fundamental dessa privação de alimento para a observação do efeito do óleo.

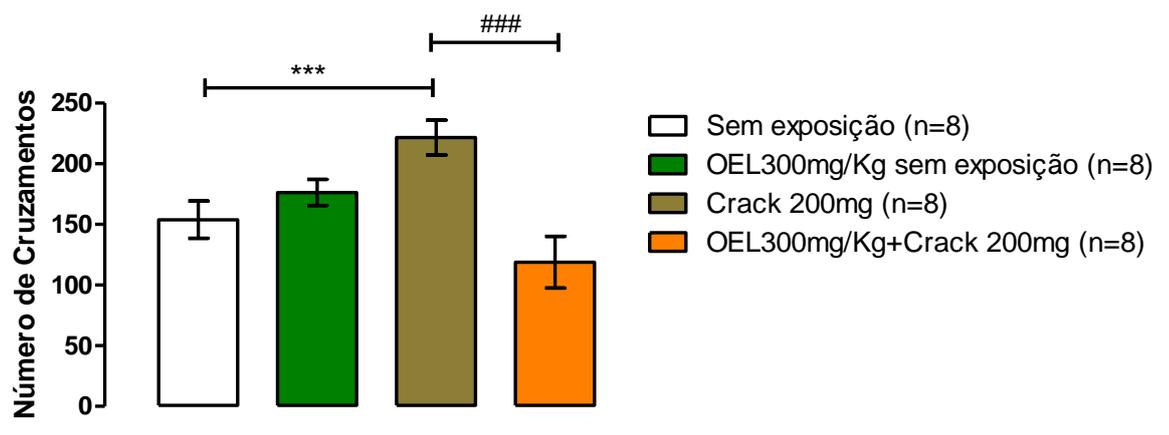
4.2. AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DO EFEITO PSICOESTIMULANTE DO *CRACK* PELA ADMINISTRAÇÃO DE OEL 300mg/Kg V.O.

Uma vez estabelecido protocolo e dose de óleo essencial de limão siciliano a serem utilizados, realizou-se o protocolo de exposição individual para avaliar a capacidade do OEL de reduzir o efeito psicoestimulante desencadeado pelo *crack*. Para isto, foram desenvolvidos 4 grupos de 8 animais tratados ou não com OEL e submetidos ou não à exposição ao *crack* nas doses de 200mg e 400mg.

Conforme observado na figura 38, a exposição ao *crack* na dose de 200mg foi capaz de aumentar significativamente ($p < 0,001$) o número de cruzamentos no Teste do Campo Aberto quando comparado ao grupo sem exposição (221.7 ± 14.33 e 153.9 ± 15.42 , respectivamente) caracterizando o efeito psicoestimulante esperado.

O OEL 300mg/Kg individualmente não promoveu alteração significativa neste parâmetro quando comparado ao grupo controle. Contudo, quando administrado como pré-tratamento à exposição à droga, o óleo foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,001$) o número de cruzamentos do grupo *crack* 200mg (118.9 ± 21.35 e 221.7 ± 14.33 , respectivamente), resultado comparável ao grupo sem exposição (153.9 ± 15.42), o que indica diminuição do efeito psicoestimulante ocasionado pelo *crack*.

Figura 38 - Efeito do OEL na atividade psicoestimulante do *crack* na dose de 200mg



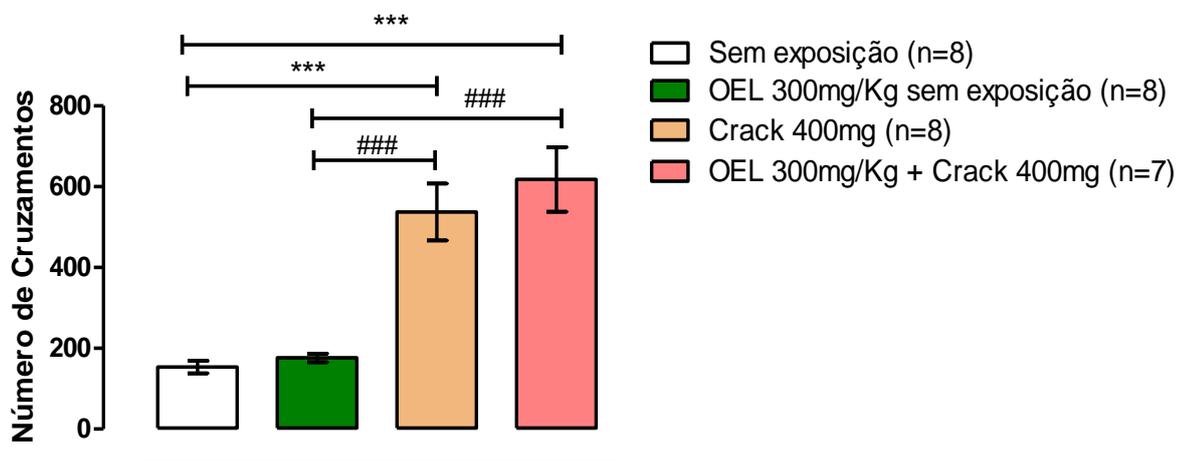
Fonte: Autora, 2016.

(A) Número de cruzamentos. Efeito da administração de *crack* na dose de 200mg na atividade locomotora de camundongos no Teste do Campo Aberto. Resultados expressos como média±E.P.M com *** $p < 0,001$ quando comparado ao controle e ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo *crack* 200mg. Significativos após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Newman-Keuls.

A fim de corroborar os dados encontrados, realizou-se o mesmo ensaio utilizando-se o *crack* na dose de 400mg. Como observado na figura 39, a dose de 400mg foi capaz de desencadear um aumento bastante significativo no número de cruzamentos no TCA ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo sem exposição (537.4 ± 70.23 e 153.9 ± 15.42 , respectivamente) e quando comparado ao grupo OEL300mg/Kg sem exposição (176.4 ± 10.77).

Por outro lado, surpreendentemente, o tratamento com o OEL antes da exposição ao *crack* não só foi incapaz de reduzir a atividade psicoestimulante da droga, como aumentou – ainda que não significativo estatisticamente – o número de cruzamentos no TCA (618.1 ± 80.09 e (537.4 ± 70.23).

Figura 39 - Efeito do OEL na atividade psicoestimulante do *crack* na dose de 400mg



Fonte: Autora, 2016.

(A) Número de cruzamentos. Efeito da administração de *crack* na dose de 400mg na atividade locomotora de camundongos no Teste do Campo Aberto. Resultados expressos como média ± E.P.M com $***p < 0,001$ quando comparado ao controle e $###p < 0,001$ quando comparado ao grupo OEL 300mg/Kg sem exposição. Significativos após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Newman-Keuls.

Estes dados são inéditos na literatura e, embora controversos, apontam para uma atividade redutora de efeito psicoestimulante do OEL de maneira dose-dependente, o que pode vir a ser uma alternativa terapêutica no futuro para distúrbios relacionados a utilização do *crack*.

4.3. ALTERAÇÕES NO LIMIAR PARA CRISES CONVULSIVAS

Uma vez que existem relatos na literatura de crises convulsivas após uso de *crack*, surgiram os questionamentos: a utilização da droga alteraria o limiar para estas crises? Em

outras palavras, o uso do *crack* associado a um estímulo epileptogênico facilitaria o desenvolvimento de crises convulsivas? E seriam estas crises mais graves do que as geradas apenas pelo estímulo? Por fim, se essas crises realmente são mais graves e facilmente desenvolvidas pela exposição ao *crack*, poderia o OEL impedir seu desenvolvimento ou torná-las mais brandas?

A fim de avaliar estas alterações, foram propostos 4 grupos conforme observado na figura 40: grupo controle sem exposição (animais sem pré-tratamento, sem exposição ao *crack* e sem pilocarpina, inseridos diretamente na caixa apenas para observação); grupo controle exposto (animais sem pré-tratamento, expostos ao *crack* 400mg, porém sem administração de pilocarpina); grupo sem pré-tratamento, exposto ao *crack* 400mg e submetido à administração intraperitoneal de PILO e, finalmente, o grupo pré-tratado com OEL 300mg/Kg 60 minutos antes da exposição ao *crack* 400mg e submetido à injeção i.p. de PILO.

Pode ser observado na figura 40 que, conforme o esperado, os grupos sem administração de PILO não desenvolveram crises convulsivas; ao passo que os grupos submetidos ao insulto epileptogênico desenvolveram crises classificáveis de acordo com a escala de Racine (1972). O grupo sem pré-tratamento, exposto ao *crack* e à administração de PILO apresentou em sua totalidade crises mais graves da classe 2 nesta escala arbitrária (mioclonia de cabeça e pescoço); enquanto o grupo submetido aos mesmos estímulos, porém pré-tratado com OEL 300mg/Kg apresentou crises um pouco mais brandas (classe 1 – automatismos faciais).

Figura 40 - Classificação das classes mais graves segundo a Escala de Racine (1972)

Grupo	N	Classe	Incidência
Controle sem exposição	4	-	-
Controle exposto ao <i>crack</i> 400mg	4	-	-
Controle exposto ao <i>crack</i> 400mg + PILO75mg/Kg	4	2	100%
Pré-tratamento com OEL 300mg/Kg + <i>crack</i> 400mg + PILO 75mg/Kg	8	1	100%

Fonte: Autora, 2016

Diante dos dados, sugere-se que, embora o óleo essencial de *Citrus limon* não tenha sido eficaz em inibir o desenvolvimento de crises convulsivas geradas pela pilocarpina em dose considerada previamente subconvulsivante (75m/Kg), o pré-tratamento com o OEL foi capaz de reduzir a gravidade das crises de acordo com a escala de Racine, o que pode ser um bom indicativo de controle de crises.

O conjunto dos dados expostos permite afirmar que a exposição de camundongos *Swiss* à inalação da fumaça do *crack* durante 5 dias desencadeou os efeitos psicomotores esperados no Teste do Campo Aberto, refletido através do aumento na atividade locomotora, bem como foi capaz de desenvolver o fenômeno de tolerância ao longo dos dias nas duas menores doses (100 e 200mg). Além disto, notou-se que o período de retirada da droga (72h) não foi capaz de promover diferenças estatisticamente significativas em parâmetros de ansiedade e depressão no protocolo de exposição individual, possivelmente pela duração deste período. Em contrapartida, foi demonstrado efeito tipo-ansio gênico no parâmetro de porcentagem de tempo nos braços abertos em animais expostos ao LCE após 72h da retirada do *crack* no protocolo de exposição coletiva overdose. Por fim, foi demonstrada atividade do óleo essencial de *Citrus limon* na dose de 300mg/Kg na redução do efeito psicoestimulante desencadeado pelo *crack* na dose de 200mg e na redução da gravidade das crises geradas pela pilocarpina. Esses resultados demonstram a necessidade do desenvolvimento de estudos voltados a este problema de saúde pública que é o uso de *crack*, a fim de caracterizar comportamentos e comorbidades relacionadas ao seu uso; além de ressaltarem a importância de investimentos em pesquisa para tratamentos de desordens causadas por drogas de abuso, especialmente tendo por base os produtos naturais, uma vez que são uma alternativa de baixo custo e potencial efeito farmacológico.

REFERÊNCIAS

- ALCARO, A.; HUBER, R.; PANKSEEP, J. Behavioral functions of the mesolimbic dopaminergic system: an affective neuroethological perspective. **Brain Res. Rev.** 2007; 56: 283–321.
- ALTER, M.; MASLAND, R.L.; KURTZKE, J.F. **Proposed definitions and classifications of epilepsy for epidemiological purposes.** In M. Alter & W.A. Hauser: The Epidemiology of Epilepsy: a Workshop. NINDS Monograph 14, Bethesda, 1972: 147.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition. Washington, DC: **American Psychiatric Association.** 1994; 221–229.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais, texto revisado (DSM-IV-TR).** Porto Alegre: Artmed; 2002.
- AZANCHI, T; SHAFAROODI, H.; ASGARPAHAH, J. Anticonvulsant activity of *Citrus aurantium* blossom essential oil (neroli): involvement of the GABAergic system. **Nat. Prod. Commun.** 2014; 9(11): 1615-8.
- BALSTER, R.L. e SCHUSTER, C.R. Fixed interval schedule of cocaine reinforcement: effect of dose and infusion duration. **J. Exp. Anal. Behav.** 1973: 119–129.
- BARNETT, S.A. **The Rat - A Study in Behavior.** Univ. Chicago Press; Chicago: 1975.
- BENAVENTE-GARCIA, O. e CASTILLO, J. Update on uses and properties of *Citrus* flavonoids: New findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-inflammatory Activity. **J. Agr. Food Chem.** 2008; 56: 6185-6205.
- BLANCHARD, D.C. e BLANCHARD, R.J. Defensive behaviors, fear, and anxiety. In: BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; NUTT, D.J. (Ed.). **Handbook of anxiety and fear.** Amsterdam: Elsevier, 2008; v.17, p.63-80.
- BLOOMSTONE, J.A. The drug-abusing parturient. **Int. Anesthesiol. Clin.** 2002; 40:137-150.
- BOZARTH, M.A.; WISE, R.A. Toxicity Associated With Long-term Intravenous Heroin and Cocaine Self-administration in the Rat. **JAMA.** 1985; 254(1):81-83
- BREITER, H.C. et al. Acute effects of cocaine on human brain activity and emotion. **Neuron.** 1997; 19(3):591–611.
- CALIPARI, E.S. et al. Temporal pattern of cocaine intake determines tolerance vs sensitization of cocaine effects at the dopamine transporter. **Neuropsychopharmacology.** 2013; 38(12):2385-92.
- CALIPARI, E.S.; FERRIS, M.J.; JONES, S.R. Extended access cocaine self-administration results in tolerance to the dopamine-elevating and locomotor stimulating effects of cocaine. **J. Neurochem.** 2014; 128(2): 224-232.
- CAMPÊLO, L.M.L. et al. Antioxidant activity of *Citrus limon* essential oil in mouse hippocampus, **Pharm. Biol.** 2011a; 49:709–715.

CAMPÊLO, L.M.L. et al. Antioxidant and antinociceptive effects of *Citrus limon* essential oil in mice. **J. Biomed. Biotechnol.** 2011b.

CAMPÊLO, L.M.L. et al. Sedative, anxiolytic and antidepressant activities of *Citrus limon* (Burn) essential oil in mice. **Pharmazie.** 2011c; 66(8):623-7.

CAMPÊLO, L.M.L. et al. Avaliação do potencial neuroprotetor do óleo essencial de *Citrus limon* em hipocampo e corpo estriado de camundongos após convulsões induzidas pela pilocarpina. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas,** 2011d; 10(2): 116-126.

CARLIN, N.; NGUYEN, N.; DePASQUALE, J.R. Multiple gastrointestinal complications of crack cocaine abuse. **Case Rep Med.** 2014; 2014: 512939.

CARVALHO, V.M. **Pesquisa dos indicadores do uso de crack em amostras de urina de indivíduos submetidos a exame médico-legal.** 2006. Dissertação (mestrado), Fac. Ciênc. Farm. USP, São Paulo.

CARVALHO-FREITAS, M.I. e COSTA, M. Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. **Biol. Pharm. Bull.** 2002; 25(12):1629-33.

CHINET, L. et al. Substance use and depression. Comparative course in adolescents. **Eur. Child Adolesc. Psychiatry.** 2006; 15, 149–155.

CHOLERIS, E. et al. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neurosci. Biobehav.** 2001; 25, 235–260.

CHRISTMAS, A.J. e MAXWELL, D.R. A comparison of the effects of some benzodiazepines and other drugs on aggressive and exploratory behavior in mice and rats. **Neuropharmacology.** 1970; 9 (1):17–29.

CONE, E.J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cocaine. **J. Anal. Toxicol.** 1995; 19: 459-478.

CONNER, K.R.; PINQUART, M.; HOLBROOK, A.P. Meta-analysis of depression and substance use and impairment among cocaine users. **Drug Alcohol Depend.** 2008; 98 (1-2): 13-23.

CONSELHO NACIONAL DE JUSTIÇA (CNJ). **Cartilha sobre o crack.** 2011. Disponível em: <http://uniad.org.br/desenvolvimento/images/stories/arquivos/cartilhacrack.pdf>

COSTA, C.A. et al. *Citrus aurantium* L. essential oil exhibits anxiolytic-like activity mediated by 5-HT(1A)-receptors and reduces cholesterol after repeated oral treatment. **BMC Complement. Altern. Med.** 2013; 23; 13:42.

COSTA-LEITE, M. e ANDRADE, A.G. **Cocaína e crack.** São Paulo: Artmed, 1999.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. **Molecular Psychiatry,** v.9, n.4, p.326-57, 2004.

- CRUSIO, W.E. Genetic dissection of mouse exploratory behaviour. **Behavioural Brain Research**. 2001; 125, 127–132.
- CURIA, G. et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **J. Neurosci. Methods**. 2008; 172 (2-4), 143-157.
- DACKIS, C.A. e GOLD, M.S. Addictiveness of Central Stimulants. Addiction potential of abused drugs and drug classes. **The Hawort Press**, 1990.
- DACKIS, C.A. e O'BRIEN, C. Cocaine dependence: a disease of the brain reward centers. **Journal of Substance abuse and Treatment**. 2001; 21: 111-17.
- DAVIS, L. et al. Major depression and comorbid substance use disorders. **Curr. Opin. Psychiatry**. 2008; 21,14–18.
- DELFS, J.M.; SCHREIBER, L.; KELLEY, A.E. Microinjection of cocaine into the *nucleus accumbens* elicits locomotor activation in the rat. **J. Neurosci**. 1990; 10: 303–310.
- DE LORENZO, R.J. et al. Long-term alteration of calcium homeostatic mechanisms in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Brain Research**. 2011; 903: 1-12.
- DE-SOUSA, D.P. et al. A systematic review of the anxiolytic-like effects of essential oils in animal models. **Molecules**. 2015; 20: 18620-18660
- DI CHIARA, G. The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation. **Drug Alcohol Depend**. 1995; 38:95–137.
- DI CHIARA et al. Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. **Neuropharmacology**. 2004; 47:227–241.
- EL-ETRI, M.M. et al. Pilocarpine-induced convulsions in rats evidence for muscarinic receptor-mediated activation of locus coeruleus and norepinephrine release in cholinergic seizure development. **Exp. Neurol**. 1993; 121(1): 24-39.
- ETTINGER, N. e ALBIN, R.J. A review of the respiratory effects of smoking cocaine. **Am. J. Med**. 1989; v.87, n.6, p.664-668.
- EVERITT, B.J. e ROBBINS, T.W. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. **Nat. Neurosci**. 2005; 8:1481–1489.
- FATURI, C.B. et al. Anxiolytic-like effect of sweet orange aroma in Wistar rats. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**. 2010; 30; 34(4):605-9;
- FERREIRA-FILHO, O.F. et al. Epidemiological profile of cocaine users on treatment in psychiatric hospitals. **Rev. Saúde Pública**. 2003; 37: 751-9.
- FERRIS, M.J. et al. Cocaine-insensitive dopamine transporters with intact substrate transport produced by self-administration. **Biol. Psychiatry**. 2011; 69(3): 201-207.
- FERRIS, M.J. et al. Cocaine self-administration produces pharmacodynamics tolerance: differential effects on the potency of dopamine transporter blockers, releasers, and methylphenidate. **Neuropsychopharmacology**. 2012; 37(7):1708-16.

- FILE, S.E. The use of social interaction as a method for detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs. **Journal of Neuroscience Methods**. 1980; 2 (3):219–238.
- FOWLER, J.S. et al. [¹¹C] Cocaine: PET studies of cocaine pharmacokinetics, dopamine transporter availability and dopamine transporter occupancy. **Nuclear Medicine and Biology**: 2001; 561–572.
- FUKUSHIRO, D.F. et al. Acute and chronic ethanol differentially modify the emotional significance of a novel environment: implications for addiction, **Int. J. Neuropsychopharm.** 2012; 15: 1109–1120.
- GARLOW, S.J.; PURSELLE, D.; D'ORIO, B. Cocaine use disorders and suicidal ideation. **Drug Alcohol Depend.** 2003. 1;70(1):101-4.
- GAWIN, F.H., KLEBER, H.D. Abstinence symptomatology and psychiatric diagnosis in cocaine abusers. **Arch. Gen. Psychiatry**. 1986; 43(2):107-1
- GAY, G.R. et al. Cocaine: history, epidemiology, human pharmacology, and treatment. **Clin. Toxicol.** 1975; 8:149-178.
- GOLD, M.S. **Drugs of Abuse: a comprehensive series for clinicians volume 3: cocaine**. New York: Plenum Medical Book Company, 1993.
- GOSSOP, M. et al. Severity of dependence and route of administration of heroin, cocaine and amphetamines. **Br. J Addict.** 1992; 87(11):1527-36.
- GRAEFF, F.G. Medicamentos ansiolíticos. In: GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. (Ed.). **Fundamentos de psicofarmacologia**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 135-178, 1999.
- GROENEWEGEN et al. Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. **Ann. N. Y. Acad Sci.** 1999; 877:49-63
- HAIM, D.Y. et al. The pulmonary complications of *crack* cocaine. **Chest**. 1995; 107: 233-40.
- HALL, C.S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**. 1934; 18 (3):385–403.
- HANDLEY, S.L. e MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.** 1984; 324:1–5.
- HATSUKAMI, D.K.; FISCHMAN, M.W. *Crack* cocaine and cocaine hydrochloride. Are the differences myth or reality. **JAMA**. 1996; 276:1580–1588.
- HEIKKILA, R.E.; ORTANSKY, H.; AND COHEN, G. Studies on the distinction between uptake inhibition and release of 3H-dopamine in rat brain tissue slices. **Biochem. Pharmacol.** 1975; 24:847-852.
- HERRERO, M.J. et al. Psychiatric comorbidity in young cocaine users: induced versus independent disorders. **Addiction**. 2008; 103:284-93.
- HIGGINS, S.T. et al. Effects of intranasal cocaine on humans learning, performance and physiology. **Psychopharmacology**. 1990; v. 102, n. 4, p. 451-458.

HO, Y.J.; EICHENDORFF, J.; SCHWARTING, R. K. On functionals of linear processes with estimated parameters. **Behavioural Brain Research**. 2002; 45: 136-139.

HOLLAIS, A.W. et al. Effects of acute and long-term typical or atypical neuroleptics on morphine-induced behavioral effects in mice. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** 2014; 41: 255–263.

HURD, Y.L. Cocaine reinforcement and extracellular dopamine overflow in rat nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study. **Brain Research**. 1989; 489(1): 199-203.

II LEVANTAMENTO NACIONAL DE ÁLCOOL E DROGAS. Disponível em: http://prattein.com.br/home/images/stories/Saude/Pesqu-LENAD_drogas.pdf

ISNER, J. e CHOKSHI, S. et al. Cocaine and vasospasm. **The New England Journal of Medicine**. 1996; 13, article 513.

JATLOW, P.I. Drug of abuse profile: cocaine. **Clin. Chem**. 1987; 33 (Suppl 11) 66-71B.

JEFFCOAT, A.R. et al. Cocaine disposition in humans after intravenous injection, nasal insufflation (snorting), or smoking. **Drug Metab. Disp.** 1989; 17:153-159.

JONES, R.T. Psychopharmacology of cocaine. In: WASHTON, A.M.; GOLD, M.S. (Ed) Cocaine: a clinician's handbook. **New York: Guilford**. 1987; p. 55-72.

JONES, R.T. The pharmacology of cocaine smoking in humans. In: CHIANG, C.N., AND HAWKS, R.L. (Ed). **Research Findings on Smoking of Abused Substances**. Washington, DC: Supt. of Docs., U.S. Govt. Print. Off., 1990. pp. 30-41.

JONSSON, S.; O'MEARA, M.; YOUNG, J.B. Acute cocaine poisoning. Importance of treating seizures and acidosis. **American Journal of Medicine**. 1983; 75(6):1061–1064.

KALIMULLAH E.A. e BRYANT, S.M. Case files of the medical toxicology fellowship at the toxikon consortium in Chicago: cocaine-associated wide-complex dysrhythmias and cardiac arrest - treatment nuances and controversies. **Journal of Medical Toxicology**. 2008; 4(4):277–283.

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

KALIVAS, P.W. e STEWART, J. Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. **Brain Res. Rev.** 1991; 16:223-244.

KALIVAS, P.W. e VOLKOW, N.D. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. **Am. J. Psychiatry**. 2005; 162:1403–1413.

KARAN, L.D.; BENEWITZ, N.L. Substance Abuse: Dependence and Treatment, em: CARRUTHERS, S.G., HOFFMAN, B.B., MELMON, K.L. et al. - **Melmon and Morrelli's Clinical Pharmacology**, 4th Ed. New York, McGraw-Hill, 2000; 1053-1086.

KARLER, R. et al. Proconvulsant and anticonvulsant effects in mice of acute and chronic treatment with cocaine. **Neuropharmacology**. 2009; 28: 709–714.

- KELLEY, A.E. Functional specificity of ventral striatal compartments in appetitive behaviors. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 1999; 877:71-90.
- KELLY, P.H.; SEVIOUR, P.W.; IVERSEN, S.D. Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the *nucleus accumbens* septi and corpus striatum, **Brain Res.** 1975; 94: 507–522.
- KHAN, R.A. e RIAZ, A. Behavioral effects of *Citrus limon* in rats. **Metab. Brain Dis.** 2015; 30(2):589-96.
- KOMIYA, M.; TAKEUCHI, T.; HARADA, E. Lemon oil vapor causes an anti-stress effect via modulating the 5-HT and DA activities in mice. **Behav. Brain Res.** 2006; 172(2):240-9.
- KOMORI, T. et al. Potential antidepressant effects of lemon odor in rats. **Eur. Neuropsychopharmacol.** 1995; 5(4):477-80.
- KOOB, G.F.; WALL, T.L.; SCHAFER, J. Rapid induction of tolerance to the antipunishment effects of ethanol. **Alcohol.** 1987; v. 4, p. 481-484.
- KOOB, G.F.; LE, H.T.; CREESE, I. The dopamine receptor antagonist SCH 23390 increases cocaine self-administration in the rat. **Neurosci. Lett.** 1997; v. 17, p. 315-320.
- KOOB, G.F. e LEMOAL. **Neurobiology of addiction.** Elsevier. 2006.
- KOOB, G.F. e VOLKOW, N.D. Neurocircuitry of addiction. **Neuropsychopharmacology.** 2010; 35(1): 217–238
- KUHAR, M.J.; RITZ, M.C.; BOJA, J.W. The dopamine hypothesis of the reinforcing properties of cocaine. **Trends in Neurosciences.** 1991; 14(7): 299-302.
- LANGE R.A. e HILLIS. L.D. Cardiovascular complications of cocaine use. **N. Engl. J. Med.** 2001; 345:351–358.
- LEITE, M.C.; e ANDRADE, A.G. **Cocaína e crack - dos fundamentos ao tratamento.** Artes Médicas. Porto Alegre, 1999.
- LESHNER, A.I. "Molecular mechanisms of cocaine addiction." **N. Engl. J. Med.** 1996: 335(2): 128-129.
- LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology.** 1987; 92(2): 180-5.
- LUFT, A. e MENDES, F.F. Anestesia no paciente usuário de cocaína. **Rev. Bras. Anesthesiol.** 2007; vol.57, n.3, pp. 307-314.
- MALLICK, N. e KHAN, R.A. Behavioral effects of *Citrus paradisi* in rats. **Metab. Brain Dis.** 2015; Oct 26.
- MARINHO, E.A. et al. Selective action of an atypical neuroleptic on the mechanisms related to the development of cocaine addiction: a pre-clinical behavioural study. **Int. J. Neuropsychopharmacology.** 2014; 17: 613–623.
- MARKOU, A.; KOSTEN, T.R.; KOOB, G.F. Neurobiological similarities in depression and drug dependence: a self-medication hypothesis. **Neuropsychopharmacology.** 2008; 18, 135–174.

- MCCCKINNEY, W.T.JR.; BUNNEY, W.E.Jr. Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research. **Archives of General Psychiatry**. 1969; 2: .240-8.
- MELDRUM, B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J. Nutr.** 2000; vol. 130, 1007-1015.
- MELECA, R.J. et al. Mucosal injuries of the upper aerodigestive tract after smoking *crack* or free base cocaine. **Laryngoscope**. 1997; 107:620-5.
- MOLEWIJK, H.E.; VAN DER POEL, A.M.; OLIVIER, B. The ambivalent behaviour “stretched approach posture” in the rat as a paradigm to characterize anxiolytic drugs. **Psychopharmacology**. 1995; 121: 81-90.
- MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of Comparative Physiology and Psychology**. 1955; 48: 254–260.
- MORITA, K. et al. Inhibition of serotonin transporters by cocaine and meprylcaine through 5-TH2C receptor stimulation facilitates their seizure activities. **Brain Res**. 2005; 1057: 153–160.
- MORTON, W.A. Cocaine and psychiatric symptoms. **Prim. Care Companion J. Clin. Psychiatric**. 1999; 1(4): 109-113.
- MUNIZ, A. e EVANS, T. Acute gastrointestinal manifestations associated with use of *crack*. **The American Journal of Emergency Medicine**. 2001; 19(1):61–63.
- OGUNYEMI, A.O. et al. Complex partial status epilepticus provoked by "*crack*" cocaine. **Ann Neurol**. 1989; 26(6):785-6.
- OLIVEIRA, M.F. et. al. Glutamatergic excitotoxicity secondary to *Status Epilepticus* after *crack* abuse: a case report. **Rev. Bras. Psiquiatr**. 2011; 33(2):209-10.
- OLIVEIRA, M.F. et al. Análise do teor de cocaína em amostras apreendidas pela polícia utilizando-se a técnica de CLAE com detector UV-Vis. **Eclética Química**. 2009; 34(3): 77-83.
- OLIVEIRA, S.A. et al. The antimicrobial effects of *Citrus limonum* and *Citrus aurantium* essential oils on multi-species biofilms. **Braz. Oral Res**. 2014; 28:22-7.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Disponível em: http://www.who.int/substance_abuse/facts/cocaine/en/ Acesso em: 21.11.2015.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). World health report 2001: mental health: new understanding, new hope. World Health Organization.
- ORTENCIO, B. **Medicina Popular do Centro-Oeste**. Theasaurus, 2ª edição. Brasília, 1997.
- PASSAGLI, M. **Toxicologia forense: teoria e prática**. Millennium Editora, 2ª edição. 2009.
- PAIM KESSLER, F.H. et al. *Crack* users show high rates of antisocial personality disorder, engagement in illegal activities and other psychosocial problems. **Am. J. Addict**. 2012; 21:370–380.

- PARHIZ, H. et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the *Citrus* flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. **Phytother. Res.** 2015; 29(3):323-31
- PASCUAL-LEONE A., DHUNA A., ALTAFULLAH I., ANDERSON D.C. Cocaine-induced seizures. **Neurology.** 1990; 40:404-7.
- PELLOW, S. et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods.** 1985; 14:149–167.
- PENIDON, A.B. e SILVA, M.W.B. Guia Fitoterápico. **Facimp**, 2007.
- PETROS, Y. et al. A Rat Model of Cigarette Smoke Abuse Liability. **Comparative Medicine.** 2012; 62(5): 395–399.
- POLLOCK, D.A. et al. Discrepancies in the reported frequency of cocaine-related deaths, United States, 1983 through 1988. **JAMA.** 1991; 266: 2233-7.
- PORSOLT, R.D.; BERTIN, A; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.** 1977; 229:327–336.
- POST, R.M. e WEISS, S.R. Psychomotor stimulant vs. local anesthetic effects of cocaine: role of behavioral sensitization and kindling. **NIDA Res. Monogr.** 1988; 88: 217–238.
- POTDAR, V.H. e KIBILE, S.J. Evaluation of antidepressant-like effect of *Citrus maxima* leaves in animal models of depression. **Iran J. Basic. Med. Sci.** 2011; 14(5): 478-83.
- PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. **European Journal of Pharmacology.** 2003; 463 (1–3):3–33.
- RACINE, R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. I. After-discharge threshold. **Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.** 1972; 32, 269-279.
- RANG, H.P. et al. **Farmacologia.** Elsevier, 7^a ed. 2011.
- RAMOS, A. e MORMEDE, P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews.** 1997; 22:33-57.
- REITH, M.E.; LI, M.Y., YAN, Q.S. Extracellular dopamine, norepinephrine, and serotonin in the ventral tegmental area and nucleus accumbens of freely moving rats during intracerebral dialysis following systemic administration of cocaine and other uptake blockers. **Psychopharmacol.** 1997; 134:309-317.
- RESNICK, R.B.; KESTENBAUM, R.S.; SCHWARTZ, L.K. Acute systemic effects of cocaine in man: A controlled study by intranasal and intravenous routes. **Science.** 1977; 195 (4279): 696–698.
- RITZ, M.C. et al. Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. **Science.** 1987; 237(4819):1219–1223.

ROBINSON, T.E.; BECKER, J.B. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. **Brain Res. Rev.** 1986; 396: 157-198.

ROBINSON, T. E. e KOLB, B. Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. **Neuropharmacology.** 2004; 47: 33-46.

RODGERS, R.J. E JOHNSON, N.J.T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior.** 1995; 52, 297–303.

SAITO, L.P. Acute total sleep deprivation potentiates amphetamine-induced locomotor-stimulant effects and behavioral sensitization in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 2014; 117: 7–16.

SARNYAI, Z. et al. Brain corticotropin-releasing factor mediates ‘anxiety-like’ behavior induced by cocaine withdrawal in rats. **Brain Res.** 1995; 675(1,2): 89-97.

SHAHAN, Y.; ERB, S.; STEWART, J. Stress-induced relapse to heroin and cocaine seeking in rats: a review. **Brain Research Reviews.** 2000; 33: 13-33.

SCHINDLER, C.W. et al. Pharmacological mechanisms in cocaine’s cardiovascular effects. **Drug Alcohol Depend.** 1995; 37:183-191.

SCHMUED, L.C.; ALBERTSON, C. e SLIKKER, W. Jr. Fluoro - Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. **Brain Res.** 1997; 751: 37- 46.

SCHWARTZ, R.H. Seizures associated with smoking 'crack' - a survey of adolescent 'crack' smokers. **West J. Med.** 1989; 150(2):213.

SETTANNI, L. et al. Seasonal variations of antimicrobial activity and chemical composition of essential oils extracted from three *Citrus limon* L. Burm. cultivars. **Nat. Prod. Res.** 2014; 28(6): 383-91.

SHAHAM, Y.; ERB, S.; STEWART, J. Stress-induced relapse to heroin and cocaine seeking in rats: a review. **Brain Res. Rev.** 2000; 33:13–33.

SMALL, A.C. et al. Tolerance and sensitization to the effects of cocaine use in humans: a retrospective study of long-term cocaine users in Philadelphia. **Subst. Use Misuse.** 2009; 44 (13): 1888-98.

SPOTTS, J.V.; SHONTZ, F.C. Drug-induced ego states. I. Cocaine: Phenomenology and implications. **Int. J. Addict.** 1984; 19(2):119–151.

STEIMER, T. e DRISCOLL, P. Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: Behavioural, neuroendocrine and developmental aspects. **Stress.** 2003; 6, 87–100.

STERU, L. et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology.** 1985;85:367–370.

- SWIFT, R.M. e LEWIS, D.C. Farmacologia da dependência e abuso de drogas. In: GOLAN, D.E.; TASHJIAN-JR, A.H.; ARMSTRONG, E.J.; ARMSTRONG, A.W. **Princípios de Farmacologia - A base fisiopatológica da terapêutica**. Guanabara Koogan, 2ª edição. Rio de Janeiro, 2008.
- TANEN, D.A., GRAEME, K.A., CURRY, S.C. Crack cocaine ingestion with prolonged toxicity requiring electrical pacing. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.** 2000; 38(6):653-7.
- TETZ, L.M. et al. Development of a rat pilocarpine model of seizures/status epilepticus that mimics chemical warfare nerve agent exposure. **Toxicol. Ind. Health.** 2006; 22(6): 255-86.
- THIERRY, B. et al. The tail suspension test: Ethical considerations. **Psychopharmacology.** 1986; 90:284–285.
- TREIT, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 1985; 9(2): 203-222.
- TRINKOFF, A.M.; RITTER, C.J.; ANTHONY, J.C. The prevalence and self-reported consequences of cocaine use. **NIDA Res. Monogr.** 1989; 95:329.
- TRINKOFF, A.M.; RITTER, C.; ANTHONY, J.C. The prevalence and self-reported consequences of cocaine use: An exploratory and descriptive analysis. **Drug Alcohol Depend.** 1990; 26 (3): 217–225.
- TURSKI, W.A. et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behav. Brain Research.** 1983; 9(3): 315-35.
- VAZQUEZ-RODRIQUEZ, S. et al. Cocaine induced acute pancreatitis. **Gastroenterología y Hepatología.** 2009; 32(8):588–589.
- VELASCO, A. et al. **Velasquez Farmacologia**. 16ª ed. New York: Interamericana McGraw-Hill, 1993.
- VENDRUSCOLO, G.S.; RATES, S.M.K.; MENTZ, L.A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** 2005; 15(4): 361-372.
- VOLKOW, N.D.; FOWLER, J.S.; WANG, G.J. Imaging studies on the role of dopamine in cocaine reinforcement and addiction in humans. **J. Psychopharmacol.** 1999; 13 (4): 337-345.
- WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A. The open field test: a critical review. **Psychol. Bull.** 1976; 83, 481–504.
- WEDDINGTON, W.W. et al. Changes in mood, craving, and sleep during short-term abstinence reported by male cocaine addicts. A controlled, residential study. **Arch. Gen. Psychiatric.** 1990; 47(9): 861-8.
- WHEELER R.A. et al. Cocaine cues drive opposing context-dependent shifts in reward processing and emotional state. **Biol. Psychiatry.** 2011; 69:1067–1074.

- WISE, R.A.; BOZARTH, M.A. A psychomotor stimulant theory of addiction. **Psychol. Rev.** 1987; 94: 469–492.
- WISE, R.A. e ROMPRE, P.P. Brain DA and reward. **Ann. Rev. Psychol.** 1989; 40, 191–225.
- ZHANG, X.F. et al. Increased responsiveness of ventral tegmental area dopamine neurons to glutamate after repeated administration of cocaine or amphetamine is transient and selectively involves AMPA receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 1997; 281: 699–706.
- ZILKHA, N. et al. Induction of depressive like-effects by subchronic exposure to cocaine or heroin in laboratory rats. **Journal of Neurochemistry.** 2014: 130, 575-582.
- ZUBARAN, CARLOS et al. Anxiety symptoms in *crack* cocaine and inhalant users admitted to a psychiatric hospital in southern Brazil. **Rev. Assoc. Med. Bras.** São Paulo, 2013; v. 59, n. 4, p. 360-367.

6.1. PARECER DE APROVAÇÃO NA CEUA

Figura 41. Parecer de aprovação da CEUA - UFAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO

Projeto n. 048/2013

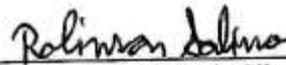
TÍTULO: Óleo essencial de limão (*Citrus limon*): potencial terapêutico alternativo para redução da fissura e do limiar para crises epilépticas causadas pelo uso de crack

RESPONSÁVEL: Olagide Wagner de Castro

OBJETIVO: Avaliar a atividade do óleo essencial de *Citrus limon* na redução da ansiedade e do limiar de crises convulsivas induzidas pela abstinência ao crack em camundongos.

SITUAÇÃO: Aprovado

Maceió, 11 de outubro de 2013.



Robinson Sabino da Silva

Coordenador da CEUA/UFAL

Robinson Sabino da Silva
Coordenador da CEUA-UFAL
Comissão de Ética no Uso de Animais