

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

José Gomes dos Santos Neto

**ENVOLVIMENTO DO SISTEMA COLINÉRGICO HIPOCAMPAL
NO EFEITO TIPO DEPRESSIVO PROVOCADO PELA RETIRADA
DO CRACK**

Maceió, 2019

José Gomes dos Santos Neto

**ENVOLVIMENTO DO SISTEMA COLINÉRGICO HIPOCAMPAL
NO EFEITO TIPO DEPRESSIVO PROVOCADO PELA RETIRADA
DO CRACK**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Duzzioni

Maceió, 2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB4 - 661

S237e Santos Neto, José Gomes dos.

Envolvimento do sistema colinérgico hipocampal no efeito tipo depressivo provocado pela retirada do crack / José Gomes dos Santos Neto. – 2019.
44 f. : il.

Orientador: Marcelo Duzzioni.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 35-44.

1. Crack (Droga). 2. Acetilcolina. 3. Hipocampo. 4. Depressão. I. Título.

CDU: 615.214



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL – Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária – Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Folha de Aprovação

José Gomes dos Santos Neto

Envolvimento do sistema colinérgico hipocampal no efeito tipo depressivo provocado pela retirada do crack

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 26 de Fevereiro de 2019.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcelo Duzzioni (Orientador)

Prof. Dr. Olágide Wagner de Castro – (UFAL)

Prof. Dr. Filipe Silveira Duarte - (UFPE)

Dedicatória

Dedico esse trabalho a todos aqueles que participaram comigo durante essa jornada. A Deus, minha mãe Janisete, meu orientador Marcelo Duzzioni e meus amigos Fernanda Maria, Amanda Pacheco e Evandro Belo, por tornarem esse sonho possível, me incentivando e apoiando com amor e carinho, gosto muito de vocês!

Agradecimentos

Aproximadamente 2,5 anos atrás, eu escrevia o meu texto para convite de formatura, no curso de Bacharel em Farmácia, nesta Universidade Federal de Alagoas, o quanto me orgulho. E nesse texto, eu contava a história de uma ÁRVORE. Hoje ela cresceu, tendo como base Deus (a raiz), que sempre está ali sustentando, faça tempestade ou não.

A minha mãe (Janisete) continua sendo a pessoa mais importante, além de ajudar a nutrir, ela também fica com a função de podar para crescer mais e comece a dar frutos. Alguns galhos temporários nasceram, ajudaram da melhor forma a deixar a árvore mais bonita, mas quando chegou a hora deles, eles tiveram que ir, mas que eu agradeço de coração a sua permanência na árvore (professores, colegas da graduação e do dia-dia).

Teve alguns galhos que eu pensava que seriam temporários, viraram galhos permanentes e continua deixando a árvore mais bonita (Danny Pimentel, Gabriela Tenório e Nívea). Mas olha que interessante! Os galhos permanentes que eu citava no começo da história (fim da graduação) ainda permanecem vívidos e floridos (Prof Marcelo Duzzioni, Fernanda e Amanda), são eles que ajudam a dar novas formas a árvore, mas quando não dá certo, eles mesmos a podam.

Pois é, esta árvore está crescendo e surgiram novas folhas (Mirella, Anne, Gabriela, Gabriela, Walleska), as antigas permanecem [Daniela (prima), Evandro (amigo), Talma (amiga e comadre), Thayne (madrinha), Kaline (amiga e chefe)], que faça chuva ou faça sol, estão sempre por lá. E agora, a árvore está amadurecendo o segundo fruto dela (MESTRADO) e o terceiro já está nascendo, porém ainda está verde.

Ah! Faltei falar que árvore dá sombra e em troca ganha carinho de uma cadela maravilhosa, chamada Bela, que sempre está lá, fazendo companhia, faça chuva ou faça sol.

E é assim que a árvore que a titulei como VÍRGÍNIA, uma homenagem que fiz a minha voinha vai nascendo, criando formas. Tem alguns dias que ela está triste e alguns amigos a regam para que ela não perca o brilho e não deixe de nascer os novos galhos.

E por onde eu for eu seguirei contando a história dessa árvore o quão me orgulho.

Epígrafe

“Quanto mais ganhares a benevolência desta venerável Princesa e Virgem Fiel (Nossa Senhora), tanto mais o teu comportamento de vida estará inspirado pela fé pura”. São Luis-Maria Grignon de Monfort

Resumo

Introdução: O *crack/cocaine*, quando retirado abruptamente após administrações repetidas, está associado a desordens físicas e psicológicas, como os transtornos mentais. O sistema colinérgico hipocampal tem sido implicado em várias patologias, como na dependência de drogas de abuso e nos transtornos de ansiedade e depressão. **Objetivo:** Avaliar o envolvimento do sistema colinérgico hipocampal nos comportamentos relacionados com ansiedade e depressão associados à retirada do *crack/cocaine* em camundongos *Swiss* machos. **Material e métodos:** Animais foram expostos à fumaça do *crack/cocaine* (queima de 200 ou 800 mg) uma vez ao dia, por 5 minutos, e durante 5 dias consecutivos. Passadas 24h ou 48h da última exposição, os camundongos foram submetidos aos testes de ansiedade (LCE, labirinto em cruz elevado), locomoção (CA, campo aberto) e depressão (TNF, teste do nado forçado). A atividade hipocampal das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) foi avaliada em um grupo de animais 24h após a última exposição à fumaça do *crack/cocaine* (200 ou 800 mg); enquanto outro grupo de animais, nesse mesmo período de retirada e exposto somente a 200 mg de *crack/cocaine*, foi tratado via intra-hipocampal com PBS ou Pirenzepina (0,06 nmol; antagonista seletivo do receptor muscarínico M1, e, passados 5 min, submetido ao TNF. Por fim, os níveis sorológicos de corticosterona foram avaliados 24h e 48h após a última exposição à fumaça do *crack/cocaine* (200 mg). **Resultados:** Nossos resultados demonstraram que 24h ou 48h após a última exposição a fumaça do *crack/cocaine* (200 mg, somente) houve uma redução no número de *head dipping* no LCE; no tempo de 48h e nessa mesma quantidade de *crack/cocaine* encontramos um aumento na porcentagem de tempo nos braços abertos do LCE. Quando avaliada 24h (200 e 800 mg) ou 48h (200 mg, apenas) encontramos um aumento na atividade locomotora no CA e um aumento no tempo de imobilidade no TNF. No conjunto, esses resultados indicam que os animais apresentaram um comportamento do tipo depressivo, mas não ansioso. Em relação as enzimas hipocampais AChE e BChE, a exposição à fumaça do *crack/cocaine* (800 mg, somente) diminuiu a atividade dessas enzimas. Entretanto, essa mesma quantidade de *crack/cocaine* diminuiu significativamente a concentração de proteínas totais no hipocampo, indicando um efeito neurotóxico dessa quantidade de *crack/cocaine*. Além disso, a administração da Pirenzepina foi capaz de reverter o efeito do tipo depressivo provocado 24h após a última exposição à fumaça do *crack/cocaine*. Por fim, 24h ou 48h após a última exposição à fumaça do *crack/cocaine* (200 ou 800 mg) os animais apresentaram níveis elevados de corticosterona, indicando níveis elevados de estresse nos animais. **Conclusão:** nossos resultados indicaram que 24h após a última exposição à fumaça do *crack/cocaine* (200 mg, dose não tóxica) os animais apresentaram um comportamento do tipo depressivo – proveniente da ativação de receptores muscarínicos do tipo M1 no hipocampo e da elevação nos níveis sorológicos de corticosterona. Além disso, o protocolo experimental estabelecido permitirá melhor estudar o envolvimento do sistema colinérgico hipocampal na retirada de drogas de abuso e nas comorbidades associadas, em especial o *crack/cocaine* e a depressão, respectivamente.

Palavras-chave: *crack*, acetilcolina, hipocampo, depressão.

Abstract

Introduction: Crack, when withdrawn abruptly after repeated administrations, is associated with physical and psychological disorders, such as mental disorders. The hippocampal cholinergic system has been implicated in several pathologies, such as in addiction to drugs of abuse and in anxiety and depression disorders. **Objective:** Evaluate the involvement of the hippocampal cholinergic system in the behaviors related to anxiety and depression associated with crack withdrawal in *Swiss* male mice. **Material and methods:** The animals were exposed to crack smoke (burning of 200 or 800 mg of crack) once daily for 5 minutes, for 5 consecutive days. After 24 and 48 hours of the last exposure the animals were submitted to tests of anxiety (elevated plus maze; EPM), locomotion (open field, OF) and depression (forced swim test, FST). The hippocampal activity of the enzymes acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) was evaluated in one group of animals 24h after the last exposure to crack smoke (200 or 800 mg); while another group of animals, in the same withdrawal period and exposed to only 200 mg of crack, was treated with intra-hippocampal administration with PBS or Pirenzepine (0.06 nmol; selective M1 muscarinic receptor antagonist), and, after 5 min, submitted to FST. Finally, serological levels of corticosterone were evaluated 24 hours and 48 hours after the last exposure to crack smoke (200 mg). **Results:** Our results showed that 24h or 48h after the last exposure to crack smoke (200 mg, only) there was a reduction in the number of head dipping in the EPM; in the time of 48 hours and in this same amount of crack we found an increase in the percentage of time in the open arms of the EPM. When evaluated 24 hours (200 and 800 mg) or 48 hours (200 mg, only), we found an increase in locomotor activity in the OF and an increase in the time of immobility in the FST. These results taken together indicate that the animals presented a depressive-like behavior, but not anxious. In relation to hippocampal enzymes AChE and BChE, exposure to crack smoke (800 mg, only) decreased the activity of these enzymes. However, this same amount of crack decreased significantly the concentration of total proteins in the hippocampus, indicating a neurotoxic effect of this amount of crack. In addition, administration of pirenzepine was able to reverse the effect of the depressive-like effect triggered 24 hours after the last exposure to crack smoke. Finally, 24h or 48h after the last exposure to crack smoke (200 or 800 mg) animals had increased levels of corticosterone, indicating high levels of stress in animals. **Conclusion:** Our results indicated that 24 h after the last exposure to crack smoke (200 mg, non-toxic dose) the animals presented a depressive-like behavior – from the activation of M1-muscarinic receptors in the hippocampus and from elevation in serologic levels of corticosterone. In addition, the established experimental protocol will allow better study of the involvement of the hippocampal cholinergic system in the withdrawal of drugs of abuse and associated comorbidities, especially crack and depression, respectively.

Key Words: crack, acetylcholine, hippocampus, depression.

Lista de Figuras

Figura 1 - Efeito da exposição à fumaça do crack na atividade locomotora avaliada no teste do campo aberto (TCA) durante 5 dias consecutivos.....	25
Figure 2 - Efeito da exposição à fumaça do crack (200 mg) no labirinto em cruz nos períodos de 24 horas e 48 horas após a última exposição.....	26
Figure 3 - Efeito da administração de crack (200 mg) nos parâmetros etológicos de camundongos submetidos ao Teste do Labirinto em Cruz Elevado 24 horas após a retirada da droga.....	27
Figura 4 - Efeitos na atividade locomotora avaliada no teste do campo aberto (TCA) 24 horas (A1 e B1) e 48 horas (A2 e B2) após a última exposição à fumaça de crack, 200 mg	28
Figura 7 - Efeitos 24 horas e 48 horas após a última exposição à fumaça de crack 200 mg no tempo de imobilidade avaliado no teste do nado forçado (TNF).....	28
Figura 8 - Atividades das enzimas acetilcolinesterase (A) e butirilcolinesterase (B) e de proteínas totais (C) no hipocampo de camundongos 24 horas após a última exposição à fumaça do crack.....	29
Figura 9 – A administração intra-hipocampal de pirenzepina, um antagonista seletivo do receptor muscarínico M1, bloqueio o efeito do tipo depressor causado 24h após a última exposição à fumaça do crack em camundongos avaliados no teste do nado forçado.....	29
Figura 10 - Avaliação dos níveis de corticosterona no soro sanguíneo após a última exposição (24 horas) à fumaça do crack (200 mg).....	30

Lista de Abreviaturas e Siglas

UNODC - *United Nations Office on Drugs and Crimes*
FIOCRUZ – Fundação Osvaldo Cruz
SEPREV – Secretaria de Estado de Prevenção à Violência
SNC – Sistema Nervoso Central
DA – Dopamina
VTA - *ventral tegmental área*
NAc – *nucleus accumbens*
PFC – *prefrontal córtex*
NA – Noradrenalina
ACh – Acetilcolina
AEME – *anhydroecgonine methyl ester*
mAChRs – Receptores Colinérgicos Muscarínicos
DSM-V – *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - V*
APA – Associação Americana de Psiquiatria
OMS – Organização Mundial da Saúde
ECL – *Elevated Cross Labyrinth and forced swim test (FST)*
OFT – *Open Field Test*
FST – *Forced Swim Test*
BIOCEN – Biotério Central
UFAL – Universidade Federal de Alagoas
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
EUA – Estados Unidos da América
PBS – Phosphate Buffer Saline
SAP – *stretchattend posture*
AChE – Acetilcolinesterase
BChE – Butirilcolinesterase
PZP – Pirenzepina

SUMÁRIO

Embasamento Teórico.....	12
1. Introdução	11
1.2. Crack: Cinética, Mecanismos de Ação e Efeitos	11
1.3. Crack: Dependência e Transtornos Mentais (Depressão e Ansiedade)	13
1. Introdução	18
2. Materiais e Métodos	19
2.1. Animais	19
2.2. Drogas	19
2.3. Protocolo de exposição ao <i>crack</i>	20
2.4. Procedimentos experimentais	20
2.4.1. Caracterização do efeito estimulante psicomotor do <i>crack</i>	20
2.4.2. Efeitos comportamentais relacionados à ansiedade, locomoção e depressão 24 e 48h após a última exposição ao <i>crack</i>	21
2.4.3. Análise da atividade da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) no hipocampo 24h após a última exposição ao <i>crack</i>	22
2.4.4. Papel dos receptores muscarínicos do tipo M1 (mAChRs) hipocampais no efeito tipo-depressivo observado 24h após a última exposição ao <i>crack</i>	22
2.4.5. Dosagem dos níveis sorológicos de corticosterona 24h após a última exposição à fumaça do <i>crack</i>	23
2.5. Análise Estatística	23
3. Resultados.....	25
3.1. Efeito estimulante psicomotor do <i>crack</i>	24
3.2. Efeito do tipo depressivo 24h e 48h após a última exposição ao <i>crack</i>	25
3.3. Análise da atividade da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) no hipocampo	27
3.4. Pirenzepina bloqueia o efeito tipo depressivo 24h após a última exposição ao <i>crack</i>	28
3.5. Avaliação dos níveis sorológicos de corticosterona 24h após a última exposição à fumaça do <i>crack</i>	29
4. Discussão	30
5. Conclusão	34
6. Referencias	34

1. Introdução

1.1. Crack: Definição e Epidemiologia

O *crack* surgiu nos Estados Unidos na década de 80. No Brasil, a substância apareceu pela primeira vez no final da década de 80 (RODRIGUES et al., 2012), e rapidamente se espalhou pelo território nacional (DUNN et al., 1996). O *crack* é obtido a partir da mistura de cocaína (*Erythroxylon coca*) com substâncias alcalinas, que quando aquecida, provoca precipitação de cristais que podem ser fumados; configurando uma via alternativa de administração da droga. Seu nome deriva dos estalos (do inglês *crack*: ruído seco ou estalo) que as pedras produzem quando aquecidas no momento do uso (GUIMARÃES et al., 2008).

De acordo com o Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crimes (UNODC, do inglês *United Nations Office on Drugs and Crimes*), estima-se que o número de usuários de cocaína e seus derivados aproxima-se dos 23 milhões no mundo, correspondendo à uma prevalência de 0,47%. Em relação ao *crack*, os resultados demonstraram um aumento no consumo nos últimos anos (UNODC, 2016). Em 2013, um estudo realizado pela FIOCRUZ apontou que o Brasil possui cerca de 700 mil usuários de *crack*, sendo que a maior proporção está na região Nordeste do país (aproximadamente 40% dos usuários). Em 2016, a Secretaria Nacional de Política sobre Drogas, do Ministério da Justiça e Cidadania, informou que o Brasil possui cerca de 370 mil usuários regulares de *crack* nas capitais. Em Alagoas, a Secretaria de Estado de Prevenção à Violência (SEPREV) informou que dos aproximadamente 25 mil dependentes químicos acolhidos pela Rede Acolhe, de 2009 a setembro de 2017, 2.553 eram dependentes de *crack*.

O uso do *crack* causa grandes impactos na saúde pública, como a ruptura de vínculos sociais, o envolvimento em atividades ilícitas (RIBEIRO et.al., 2006 e RIBEIRO et. al., 2010), o aumento das taxas de homicídio (DIAS et. al., 2011 e REICHENHEIM et. al., 2011), a prostituição e o sexo inseguro com múltiplos parceiros, resultando em infecções por HIV (WECHSBERG et. al., 2010 e NAPPO et. al., 2011).

1.2. Crack: Cinética, Mecanismos de Ação e Efeitos

Devido à via de administração (respiratória), o início de ação no sistema nervoso central (SNC) varia entre 5 e 10 segundos para o *crack*, e os efeitos estimulantes se dissipam rapidamente (entre 5 e 10 minutos). Os usuários típicos do *crack* são homens

pobres, com menos de 30 anos, desempregados, com baixa escolaridade e de lares desfeitos. Esses fatores, aliado ao baixo custo da droga, tornaram atrativo o consumo em diferentes classes sociais (JEFFCOAT et al., 1989; HIGGINS et al., 1990; JONES, 1990).

Drogas psicoestimulantes como o *crack* atuam aumentando as concentrações extracelulares de dopamina (DA), mais especificamente, na via mesocorticolímbica, que se projeta da área tegmental ventral (VTA, do inglês *ventral tegmental area*) do mesencéfalo para o núcleo *accumbens* (NAc, do inglês *nucleus accumbens*) e córtex pré-frontal (PFC, do inglês *prefrontal cortex*), que corresponde ao chamado “sistema de recompensa cerebral” (PULCHERIO et al. 2010) e alterações nesse 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).

O sistema dopaminérgico desempenha um papel importante nos efeitos causados pelo consumo do *crack* (WOODS et al. 1987; KOMETSKY e BAIN 1987). Entretanto, o bloqueio na captação de outros neurotransmissores como a noradrenalina (NA) e acetilcolina (ACh) e a conseqüente hiperestimulação de seus receptores, e o bloqueios de canais específico de sódio (responsáveis pelos efeitos anestésicos locais da cocaína) devem ser levados em consideração ao analisar os efeitos centrais e periféricos causados pelo consumo do *crack* (HEIKKILA, 1975; DACKIS e GOLD, 1990; REITH et al., 1997).

O *crack* provoca 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 do prazer, aumento da irritabilidade, paranoia, crises convulsivas e transtornos de ansiedade e depressão (RESNICK et al., 1977; SPOTTS e SHONTZ, 1984; POST e WEISS, 1988; KARLER et al., 1989; TRINKOFF t al., 1989; TRINKOFF et al., 1990; BREITER et al., 1997). Os efeitos neurotóxicos do consumo do *crack* podem também ser observado nos déficits cognitivos apresentados pelos seus usuários, podendo haver comprometimento das funções de aprendizado e memória, pensamentos abstratos, distúrbios motores, entre outros; mesmo após longos períodos de abstinência (KÜBLER; MURPHY e GARAVAN, 2005; HAILE et al., 2012; VONMOOS et al., 2013; MORENO et al., 2014; XIE; WELLS e FUCHS, 2014; MA et al., 2015; MIN et al., 2015).

Diferentes estudos têm demonstrado que parte dos efeitos provocados pelo *crack* pode ser proveniente de um produto da sua pirólise, a anidro metilester ecgonina (AEME, do inglês *anhydroecgonine methyl ester*; FANDIÑO et. al. 2002). Dependendo do teor de pureza das amostras, da temperatura e dos dispositivos utilizados para a queima do *crack*, até 80% da cocaína presente nas amostras pode ser convertida em AEME, que é absorvida pelos pulmões (PAUL et.al., 2005). De fato, *in vitro* a AEME promove efeito ionotrópico negativo mediado por receptores colinérgicos muscarínicos (mAChRs), uma vez que tal efeito foi revertido pela atropina, um antagonista do receptor muscarínico não específico (WOOLF et. al., 1997). Além da ação direta nos mAChRs do tipo M1 e M2 (FLYNN et al., 1992; KARPEN e HESS, 1986; SHARKEY et al., 1988) a AEME pode se ligar a receptores nicotínicos da acetilcolina (NIU et al., 1995; SWANSON e ALBUQUERQUE, 1987). Estudos de Garcia e colaboradores (2012) demonstraram a neurotoxicidade e o envolvimento dos mAChRs na morte neuronal induzida pela AEME em culturas de células hipocámpais de roedores. Por fim, Rasmussen e colaboradores (2000) demonstraram que o pré-tratamento sistêmico com um antagonista dos mAChRs diminuiu o efeito reforçador positivo da cocaína, quando injetada em camundongos. Sendo assim, a ACh pode desempenhar um papel importante nos processos aditivos subjacentes à dependência de cocaína/*crack*, bem como nos efeitos neurotóxicos produzidos por um de seus metabólitos após a pirólise, a AEME.

1.3. Crack: Dependência e Transtornos Mentais (Depressão e Ansiedade)

Segundo o DSM-V, manual elaborado pela Associação Psiquiátrica Americana (APA, do inglês *American Psychiatric Association*), a dependência de substâncias é definida como um padrão mal adaptativo do uso dessas substâncias, que leva ao prejuízo ou sofrimento clínico significativo, evidenciado por características, que incluem: tolerância, abstinência e abandono ou redução de importantes atividades sociais, ocupacionais ou recreativas, em razão do uso da substância.

Quando comparado as outras drogas derivadas da cocaína, sejam elas administradas por via intravenosa ou intranasal, as evidências mostram uma maior propensão à dependência para os usuários de *crack*. As variáveis cruciais parecem ser o imediatismo, a duração e a magnitude do efeito, bem como a frequência e a quantidade usada, e não a forma administrada (HATSUKAMI e FISCHMAN, 1996). Consequentemente, a dependência química resulta em um número significativo de

problemas médicos e psicossociais diretos, bem como associados, como as comorbidades (OMS).

As comorbidades, como os transtornos de humor e ansiedade, são altamente prevalentes entre usuários de cocaína (GRANT et al., 2004; TANG et al., 2007). Estima-se que 36% dos adultos com transtornos depressivos são usuários de cocaína e que 48% dos adultos dependentes de cocaína sofrerão de depressão durante a vida (CONWAY et al., 2006). Similarmente, 32% dos adultos apresentam transtornos de ansiedade decorrentes do uso de cocaína, enquanto 45% dos adultos dependentes de cocaína sofrem de algum distúrbio de ansiedade (CONWAY et al., 2006).

Diferentes estudos têm demonstrado que os distúrbios psiquiátricos, *e.g.*, transtornos de depressão, ansiedade e pânico, compartilham uma série de semelhanças neurobiológicas com a retirada da droga, como diminuição de serotonina e DA e aumento do fator de liberação de corticotrofina (SILVA et al., 2010), assim como alterações no conteúdo de ACh. De fato, a depressão pode variar de uma condição muito branda, aproximando-se da normalidade, à severa (psicótica), acompanhada por alucinações e delírios. Os sintomas da depressão incluem componentes emocionais e biológicos. Dentre eles estão a apatia, o pessimismo, a baixa autoestima, sentimento de culpa, inadaptação, indecisão e perda de motivação, bem como o retardo de pensamento e de ação, a perda da libido, distúrbio do sono e perda do apetite (SILVA, 2016).

Dentre as comorbidades encontradas nos usuários de *crack* a depressão maior atinge em média um terço desses pacientes (DAVIS et al., 2008). A questão da causalidade na relação entre abuso de cocaína e transtornos depressivos tem sido investigada em diversos estudos. Algumas pesquisas indicam que em uma certa proporção de usuários de cocaína, a depressão precede o abuso, sugerindo, portanto, que alguns indivíduos possam escolher a cocaína como uma tentativa de automedicar sintomas depressivos (GAWIN e KLEBER, 1986; WEISS et al., 1992; KLEINMAN et al., 1990). Post e colaboradores (1974), em um estudo no qual foi investigado o potencial antidepressivo da cocaína, encontraram que doses moderadas da droga elevavam o humor em pacientes deprimidos. Entretanto, muitos pacientes experimentavam uma exacerbação de seus sintomas após utilizarem doses elevadas da droga.

Em relação ao período de abstinência da cocaína foi observado que o tratamento de retirada da droga falhava, principalmente, porque os pacientes apresentavam depressão (GAWIN e KLEBER, 1988). Além disso, outro estudo demonstrou que a manifestação

dos sintomas de retirada pode acarretar na interrupção precoce do tratamento de usuários de cocaína (MULVANEY et al., 1999).

A ansiedade, incluindo os componentes cognitivo, somático, emocional e comportamental, é um dos sintomas ocasionados pela retirada do *crack*, que pode ser caracterizada por uma incapacidade de sentir ou experimentar prazer relacionado ao sistema de recompensa ou por uma desregulação do sistema no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal após repetidas exposições à cocaína (YANG et al., 1992). Paine, Jackman e Olmstead (2002) afirmam que a administração aguda de *crack* pode levar a uma resposta ansiogênica em diferentes modelos animais de ansiedade.

Atualmente, o grande desafio na pesquisa psiquiátrica consiste na identificação de fatores biológicos e ambientais de risco, ou de proteção, para a vulnerabilidade ao desenvolvimento da dependência. Estudos clínicos e epidemiológicos apontam que mais da metade dos indivíduos dependentes de drogas têm transtornos de ansiedade e/ou depressão. Apesar da ocorrência destas comorbidades ser excepcionalmente alta em dependentes de drogas, estes fatores ainda são bastante negligenciados e, conseqüentemente, o diagnóstico e o tratamento destes indivíduos são particularmente ineficientes. Além disso, devido aos efeitos na recompensa, na autoadministração de drogas, a localização neuroanatômica (BUTCHER e BUTCHER, 1974; PISANI et al., 2001) e ao envolvimento nos processos cognitivos (PEPEU e GIOVANNINI, 2004), a ACh desempenha um papel importante nos processos de dependência (DACKIS e O'BRIEN, 2001), bem como na ansiedade e depressão. Assim, o presente trabalho teve por objetivo geral avaliar o envolvimento do sistema colinérgico hipocampal nos transtornos de ansiedade e depressão associados à retirada do *crack*.

Esses estudos são necessários pois acreditamos que as alterações comportamentais (ansiedade e depressão) encontradas no período de abstinência ao *crack* são dependentes ou influenciadas pelo sistema colinérgico hipocampal. Nossa hipótese é suportada pelos achados de Garcia e colaboradores (2012) com a AEME (um metabólito da pirólise do *crack*), que mostrou se ligar a receptores colinérgicos muscarínicos hipocampais.

2. ARTIGO

ENVOLVIMENTO DO SISTEMA COLINÉRGICO HIPOCAMPAL NO EFEITO TIPO DEPRESSIVO PROVOCADO PELA RETIRADA DO CRACK

Artigo a ser enviado para publicação no periódico **Toxicology** (A2)

José Gomes dos Santos Neto¹, Fernanda Maria Araújo de Souza¹, Nívea Karla de Gusmão Taveiros Silva²; Amanda Larissa Dias Pacheco¹; Danyele Cynthia Santos Pimentel Nicácio¹; Gabriela Tenório Silva Cavalcante¹; Walleska Bismaida Zacarias Galvão Barros Correia¹; Mirrella Priscila dos Santos Vieira¹; Gabriela Ferreira de Souza¹; Ozileudiane Barros Santos da Silva¹; Isa Rafaella Rocha Brito¹; Valdemir da Costa Silva³; Sônia Machado Salgueiro⁴, Daniel Leite Góes Gitai¹, Olagide Wagner de Castro¹,
Marcelo Duzzioni¹.

¹Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, Brasil.

²Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

³Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Brasil

⁴Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Brasil

Autor correspondente:

Marcelo Duzzioni

marceloduzzioni@hotmail.com

Resumo

Introdução: Nas últimas décadas, a cocaína em sua forma fumada (*crack*) vem se tornando uma grande rival da 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, exercendo efeitos estimulantes e durante sua retirada ocasiona o aparecimento de transtornos relacionados a ansiedade e depressão. O sistema colinérgico hipocampal tem sido implicado em várias patologias, como na dependência de drogas de abuso e nos transtornos de ansiedade e depressão. **Objetivo:** Avaliar o envolvimento do sistema colinérgico hipocampal nos comportamentos relacionados com ansiedade e depressão associados à retirada do *crack* em camundongos *Swiss* machos. **Material e métodos:** Animais foram expostos à fumaça do *crack* (queima de 200 ou 800 mg) uma vez ao dia, por 5 minutos, e durante 5 dias consecutivos. Passadas 24h ou 48h da última exposição, os camundongos foram submetidos aos testes de ansiedade (LCE, labirinto em cruz elevado), locomoção (CA, campo aberto) e depressão (TNF, teste do nado forçado). A atividade hipocampal das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) foi avaliada em um grupo de animais 24h após a última exposição à fumaça do *crack* (200 ou 800 mg); enquanto outro grupo de animais, nesse mesmo período de retirada e exposto somente a 200 mg de *crack*, foi tratado via intra-hipocampal com PBS ou Pirenzepina (0,06 nmol; antagonista seletivo do receptor muscarínico M1, e, passados 5 min, submetido ao TNF. Por fim, os níveis sorológicos de corticosterona foram avaliados 24h e 48h após a última exposição à fumaça do *crack* (200 mg). **Resultados:** Nossos resultados demonstraram que 24h ou 48h após a última exposição a fumaça do *crack* (200 mg, somente) houve uma redução no número de *head dipping* no LCE; no tempo de 48h e nessa mesma quantidade de *crack* encontramos um aumento na porcentagem de tempo nos braços abertos do LCE. Quando avaliada 24h (200 e 800 mg) ou 48h (200 mg, apenas) encontramos um aumento na atividade locomotora no CA e um aumento no tempo de imobilidade no TNF. No conjunto, esses resultados indicam que os animais apresentaram um comportamento do tipo depressivo, mas não ansioso. Em relação as enzimas hipocampais AChE e BChE, a exposição à fumaça do *crack* (800 mg, somente) diminuiu a atividade dessas enzimas. Entretanto, essa mesma quantidade de *crack* diminuiu significativamente a concentração de proteínas totais no hipocampo, indicando um efeito neurotóxico dessa quantidade de *crack*. Além disso, a administração da Pirenzepina foi capaz de reverter o efeito do tipo depressivo provocado 24h após a última exposição à fumaça do *crack*. Por fim, 24h ou 48h após a última exposição à fumaça do *crack* (200 ou 800 mg) os animais apresentaram níveis elevados de corticosterona, indicando níveis elevados de estresse nos animais. **Conclusão:** nossos resultados indicaram que 24h após a última exposição à fumaça do *crack* (200 mg, dose não tóxica) os animais apresentaram um comportamento do tipo depressivo – proveniente da ativação de receptores muscarínicos do tipo M1 no hipocampo e da elevação nos níveis sorológicos de corticosterona. Além disso, o protocolo experimental estabelecido permitirá melhor estudar o envolvimento do sistema colinérgico hipocampal na retirada de drogas de abuso e nas comorbidades associadas, em especial o *crack* e a depressão, respectivamente.

Palavras-chave: *crack*, acetilcolina, hipocampo, depressão.

1. Introdução

Desde a sua introdução, no final da década de 1980, aos dias atuais, o *crack* tem se tornado um problema de saúde pública devido ao baixo custo e à rápida ação e dissipação no sistema nervoso central (SNC), ocasionando uma rápida dependência (MORETTI *et al.*, 2016). O *crack* é preparado geralmente a partir da dissolução da pasta base de cocaína (*Erythroxylon coca*) em solução alcalina, a qual origina pedras após a evaporação do solvente (ETTINGER e ALBIN, 1989; HAIM *et al.*, 1995; MELECA *et al.*, 1997). Durante a queima das pedras de *crack* vários produtos são formados, dentre os quais a anidroecgonina metil éster (AME).

O *crack*, quando retirado abruptamente após administrações repetidas, está associado a desordens físicas e psicológicas, como os transtornos mentais (GAWIN e KLEBER, 1986). De fato, um terço da população usuária de substâncias psicoativas apresenta comorbidades psiquiátricas (APA, 2012). Os transtornos mentais mais prevalentes são depressão (47,8%) e ansiedade (21,2%), independentemente de os usuários estarem ou não sendo tratados para sua dependência (WATKINS *et al.*, 2004; PAIM KESSLER *et al.*, 2012). A presença de comorbidades psiquiátricas torna o tratamento do usuário ainda mais difícil, levando a um prognóstico menos otimista (HOPWOOD *et al.*, 2011; SWENDSEN *et al.*, 2010).

Vários estudos têm demonstrado o envolvimento do sistema colinérgico nos transtornos afetivos, sendo que os primeiros resultados foram obtidos com inibidores da acetilcolinesterase, como a fisostigmina, que mimetizavam os sintomas da depressão (para revisão ver Janowsky, Davis e colaboradores, 1972). De fato, Yann e colaboradores (2013) demonstraram que a sinalização colinérgica no hipocampo promove comportamentos relacionados a ansiedade e depressão. Witkin e colaboradores (2014), usando camundongos knockout para os receptores muscarínicos da acetilcolina (M1-M5), encontraram que o efeito do tipo antidepressivo da escopolamina não era observado em animais M1^{-/-} e M2^{-/-}. Tais resultados indicam que os receptores muscarínicos, em especial os M1, como novos alvos proteicos para o tratamento da depressão maior e dos pacientes refratários ao tratamento convencional com antidepressivos (WITKIN *et al.*, 2014).

Além disso, o hipocampo contém altos níveis de receptores de glicocorticoides que regulam o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), tornando a região do hipocampo mais suscetível ao estresse e à depressão (WEI *et al.*, 2017). Mudanças na plasticidade

do hipocampo podem resultar de estresse e outros estímulos negativos, causados por drogas psicoestimulantes (PITTENGER et. al., 2008). O estresse causa impacto na plasticidade do hipocampo de várias maneiras. Tem sido demonstrado que o estresse crônico e severo prejudica a memória explícita dependente do hipocampo em modelos animais de depressão (PITTENGER et. al., 2008). A hipótese de depressão causada por estresse originou-se dos estudos realizados por Gibbons e McHugh (1962), onde se verificou que os pacientes deprimidos apresentavam altos níveis de cortisol no plasma sanguíneo antes de iniciar o tratamento, e que isso era proporcional à gravidade do distúrbio (FERNANDES et. al., 2018).

Tanto o estresse quanto a depressão estão associados a disfunções colinérgicas, bem como a mudanças estruturais e funcionais em múltiplas áreas cerebrais. A disfunção colinérgica pode, em parte, está na base cognitiva associada à depressão, que, por sua vez, pode precipitar o curso da doença. Por outro lado, a disfunção colinérgica também pode predispor à depressão através da desregulação de numerosos sistemas e circuitos neurobiológicos envolvidos em sua fisiopatologia (DAGYTE et. al., 2011).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o envolvimento do sistema colinérgico hipocampal nos transtornos de ansiedade e depressão associados à retirada do *crack*. Tais estudos são necessários para uma melhor compreensão dessa condição e desenvolver novas estratégias de intervenção.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, com idade aproximadamente de 90 dias. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (BIOCEN/UFAL), submetidos a um ciclo claro-escuro de 12:12h (período claro – início às 7:00 horas, período escuro – início às 19:00 horas), temperatura ambiente de $22\pm 2^\circ$ C e tratados com água e ração *ad libitum*. O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Experimentação Animal da UFAL protocolos nº 48/2013 e nº 39/2018.

2.2. Drogas

As amostras do *crack* foram obtidas de apreensões da delegacia de entorpecentes da cidade de Maceió, Alagoas, após autorização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e ordem judicial. A composição das amostras de *crack* após a

pirólise foi analisada pela técnica de CG-EM: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (mais detalhes, ver Araújo et al., 2018).

O dicloridrato de pirenzepina, antagonista seletivo do receptor muscarínico M1, (LOPAC®1280, Sigma-Aldrich Co., Texas, EUA) foi diluído em PBS (Tampão Fosfato Salino, Tocris Bioscience, Bristol, UK) no momento da administração.

2.3. Protocolo de exposição ao crack

Os animais foram randomicamente divididos em dois grupos: controle ou *crack*. O sistema de exposição à fumaça do *crack* foi adaptado de Ypsilantis et al. (2012), sendo o protocolo de inalação realizado no interior de uma capela de exaustão com filtro de carvão ativado, e estando o responsável pela manipulação dos animais munido de máscara de proteção (*respirador semifacial* - modelo *Comfo I Plus*) com *cartucho químico GMC acoplado*. O aparato de exposição é composto por: 1) um cachimbo (local onde é queimado o *crack*); 2) uma câmara de acrílico (local onde os animais são confinados para exposição à fumaça do *crack*); 3) uma bomba peristáltica, responsável por transferir a fumaça gerada pela queima do *crack* para a câmara de acrílico; 4) mangueiras de silicone, que conectam os diferentes componentes do aparato; e 5) válvulas heimlich (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) para evitar a regressão da fumaça.

Os animais do grupo *crack* foram expostos aos produtos da pirólise do *crack* nas quantidades de 100, 200, 400 ou 800 mg da droga por 5 minutos, durante 5 dias consecutivos, enquanto os animais do grupo controle passaram pelo mesmo procedimento de estresse, mas não tiveram contato com objetos usados na exposição, permanecendo em suas caixas-moradias durante o período de exposição

2.4. Procedimentos experimentais

2.4.1. Caracterização do efeito estimulante psicomotor do crack

Imediatamente após a exposição à fumaça do *crack* (100, 200, 400 ou 800 mg), os animais foram submetidos individualmente ao teste do campo aberto. Cada animal foi avaliado por 10 minutos. Uma vídeo-câmera, posicionada a 1 m de altura do centro do aparelho, foi utilizada para registrar o comportamento dos animais. O campo aberto foi construído em acrílico com as paredes transparentes (50 cm de altura x 60 cm de diâmetro) e o piso branco (100 cm x 100 cm) dividido em 12 quadrantes (Insight®, Brazil). O número de quadrantes cruzados com as 4 patas foi utilizado para avaliar a atividade

locomotora dos animais. A intensidade luminosa no centro da arena era de 3 lux. Após cada animal passar pelo teste do campo aberto, o aparato foi limpo com álcool 10%.

2.4.2. Efeitos comportamentais relacionados à ansiedade, locomoção e depressão 24 e 48h após a última exposição ao *crack*

Para avaliar os efeitos da retirada da droga nos comportamentos relacionados à ansiedade, locomoção e depressão, os animais foram expostos à fumaça do *crack* (200 mg), por 5 dias consecutivos (uma vez ao dia). Após 24h ou 48h da última exposição, cada animal foi submetido ao labirinto em cruz elevado (LCE), ao campo aberto (TCA) e ao teste do nado forçado (TNF). O critério de escolha da quantidade de *crack* (200 mg) leva em consideração a menor quantidade da substância que apresentou aumento na atividade locomotora durante os dias de exposição.

Os comportamentos relacionados com medo e ansiedade foram avaliados durante 5 minutos no LCE (Insight®, Brazil). O LCE foi confeccionado em madeira e possui quatro braços, sendo dois braços laterais fechados e elevados (50 cm) e dois braços abertos. Para evitar quedas dos animais, os braços abertos possuíam uma orla de 1 cm de altura. O aparato foi elevado a 40 cm do chão e uma vídeo-câmera, posicionada a 1 m de altura do centro do aparelho, foi utilizada para registrar o comportamento dos animais. A intensidade luminosa no centro do aparato era de 3 lux.

Os comportamentos avaliados foram divididos em espaço-temporais e etológicos. A saber, porcentagem de entradas nos braços abertos [%EBA = $EBA/(EBA+EBF) \times 100$] - onde EBA é o número de entradas nos braços abertos e EBF é o número de entradas nos braços fechados; porcentagem de tempo nos braços abertos [%TBA = $TBA/(TBA+TBF) \times 100$] - onde TBA é o tempo de permanência nos braços abertos e TBF é o tempo de permanência nos braços fechados; número de mergulhos de cabeça não protegido (*unprotected head-dipping*, uHD), número de *stretch-attend posture protegido* (pSAP) e o número de levantamentos apoiados nas patas traseiras (*rearing*, REA).

O teste do campo aberto foi utilizado novamente para avaliar a atividade locomotora e ocorreu imediatamente após o LCE. As condições experimentais, a exceção do tempo de avaliação, que agora foi de 5 minutos, são as mesmas descritas previamente.

O teste do nado forçado (TNF) foi utilizado para avaliar os efeitos da retirada do *crack* nos comportamentos relacionados à depressão (PORSOLT et al., 1978). O teste foi realizado 30 minutos após o teste do campo aberto. Para isto, os animais foram colocados

individualmente em um cilindro de vidro (20 cm x 40 cm), contendo água limpa à $26\pm 1^\circ\text{C}$, e profundidade de 25 cm. Um pré-teste foi realizado nos animais 24 horas antes do teste, para adaptação. Uma vídeo-câmera, posicionada a 1 m de altura do centro do aparelho, foi utilizada para registrar o comportamento dos animais durante 6 minutos. Neste teste foi verificado o tempo de imobilidade dos animais, período em que o camundongo preserva apenas os movimentos necessários para manter a cabeça fora d'água, durante os 4 últimos minutos do teste.

2.4.3. Análise da atividade da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) no hipocampo 24h após a última exposição ao crack

Após os ensaios realizados no experimento 1 os animais dos grupos controle e *crack* foram decapitados e os cérebros retirados para dissecação bilateral do hipocampo. Em seguida, os hipocampos foram pesados, processados e homogeneizados, resultando em um extrato. Posteriormente, foram realizadas análises de proteínas totais, pelo método de Bradford (leitura de absorbância a 595nm determinada em espectrofotômetro, utilizando 100 μL de água em lugar de solução padrão para referência); e a atividade de acetilcolinesterase e butirilcolinesterase foi mensurada pelo método de Ellman (leituras de absorbância a 412nm utilizando espectrofotômetro UV/VIS - Specord 200 Plus) por um período de 5 minutos. A atividade enzimática foi expressa em μmol de substrato hidrolisado por minuto ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mL}^{-1}$).

2.4.4. Papel dos receptores muscarínicos do tipo M1 (mAChRs) hipocampais no efeito tipo-depressivo observado 24h após a última exposição ao crack

Cirurgia – implante de cânula-guia no hipocampo

Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/Kg, i.p.) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg, i.p.). Depois de verificada a perda total dos reflexos, foram submetidos a cirurgia estereotáxica para inserção de uma cânula-guia no hipocampo dorsal (8 mm de comprimento), [AP = - 2,3 mm; ML = \pm 1,6 mm; e DV = - 1,4 mm – PAXINOS e FRANKLIN (2001)]. Após a cirurgia os animais foram tratados com: 1) antibiótico Pencil Pronto® (5 mg/kg, i.p. dose única); e 2) analgésico Acetaminofeno® (150 mg/kg, i.p.; a cada 12 h por dois dias).

Administração intra-hipocampal de Pirenzepina

Passados 5 a 7 dias da cirurgia para implante da cânula-guia, os animais foram expostos por 5 dias consecutivos, conforme o protocolo descrito anteriormente, à fumaça

do *crack*. 24 horas após a última exposição, cada animal foi cuidadosamente imobilizado e tratado com pirenzepina intra-hipocampal (0,06 nmol) (FOGAÇA et. al., 2016). O grupo veículo recebeu salina 0,9%. O volume administrado foi de 1 µL/min, durante 1 minuto. A agulha injetora permaneceu por mais 1 minuto no interior da cânula-guia para garantir a difusão total da droga. 5 minutos após a administração, os animais foram submetidos ao teste de nado forçado.

2.4.5. Dosagem dos níveis sorológicos de corticosterona 24h após a última exposição à fumaça do *crack*

1 hora após o teste do nado forçado, foi realizada a decapitação do animal e coleta do sangue em tubo de 1 mL. 60 minutos após a coleta (tempo para retenção do coágulo na amostra), o sangue foi centrifugado (2000 RCF, temperatura 24°C, durante 15 minutos), o soro foi coletado e armazenado em freezer -80°C até a análise de corticosterona por kit de imunoenensaio (Cayman®, 501320).

2.5. Análise Estatística

Todos os valores foram reportados como média \pm SEM. As comparações das médias foram realizadas pelo teste t de Student não pareado ou teste ANOVA uma via seguida de teste de Duncan (GraphPad Prism versão 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3. Resultados

3.1. Efeito estimulante psicomotor do crack

Como pode ser observado na Figura 1A-E, a exposição à fumaça do crack aumentou significativamente a atividade locomotora espontânea no TCA. A análise estatística mostrou diferença significativa no número de cruzamentos nos dias 1 [F(4,25) = 7,54; $p < 0,001$; Figura 1A], 2 [F(4,25) = 6,97; $p < 0,001$; Figura 1B], 3 [F(4,25) = 22,15; $p < 0,001$; Figura 1C], 4 [F(4,25) = 16,19; $p < 0,001$; Figura 1D] e 5 [F(4,25) = 28,22; $p < 0,001$; Figura 1E] entre os grupos experimentais. Nos dias 1, 4 e 5 a análise *post-hoc* de Duncan revelou que o número de cruzamentos no TCA foi significativamente maior para os animais expostos à fumaça do crack (100, 200, 400 e 800 mg) quando comparado ao grupo controle. Nos dias 2 e 3 a mesma análise revelou que o número de cruzamentos no TCA foi significativamente maior para os animais expostos à fumaça do crack (200, 400 e 800 mg), quando comparado ao grupo controle.

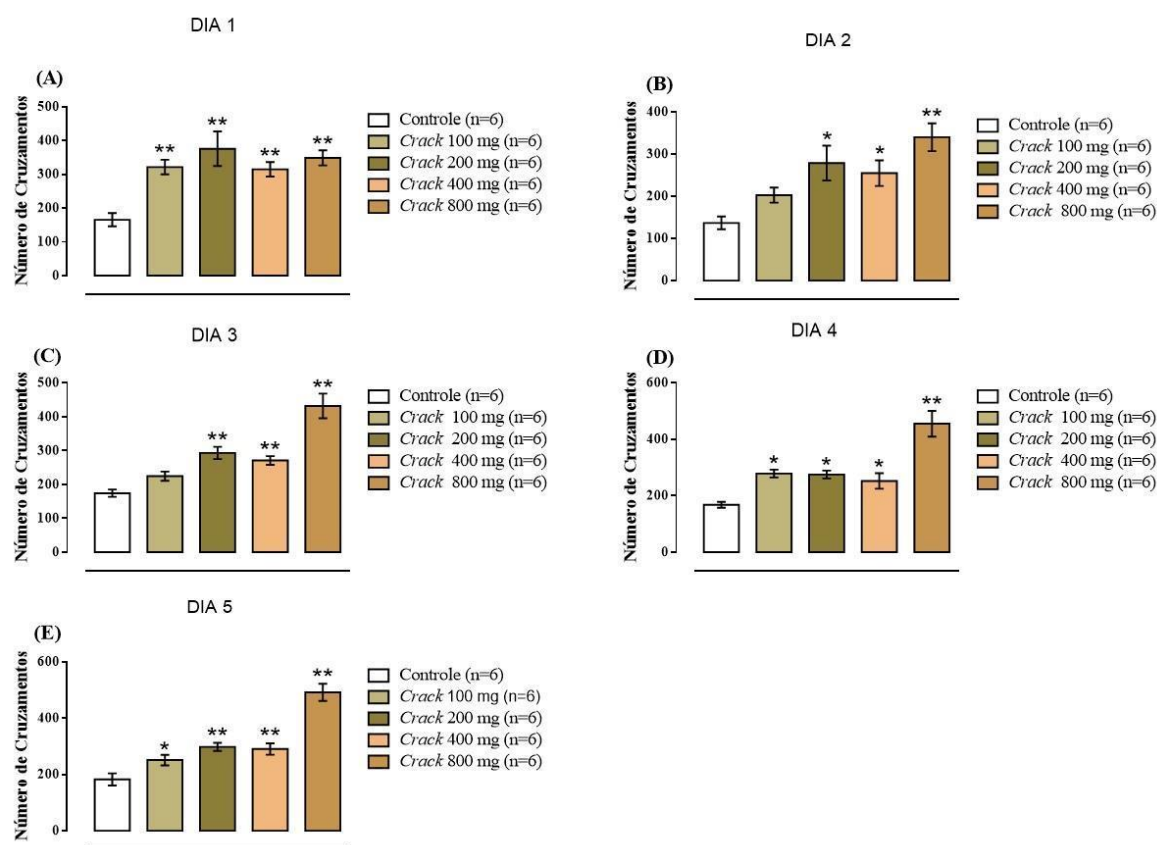


Figura 1 - Efeito da exposição à fumaça do crack (100, 200, 400 e 800 mg) na atividade locomotora avaliada no teste do campo aberto (TCA, 5 minutos) durante 5 dias consecutivos. Dados representados como média \pm E.P.M. com * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan).

3.2. Efeito do tipo depressivo 24h e 48h após a última exposição ao crack

24 horas após a última exposição à fumaça do crack (200 mg), os animais foram submetidos ao teste do LCE por 5 minutos. Conforme observado na Figura 2 (A1 e A2), não houve diferença significativa nas porcentagens de tempo e de entradas nos braços abertos [F (8,7) = 2,867; $p > 0,05$; e F (7,8) = 1,001; $p > 0,05$; respectivamente], quando utilizado o teste *t* para comparar o grupo exposto ao grupo controle. Também não foi encontrada nenhuma diferença significativa na porcentagem de entradas os braços abertos [F(8,9) = 5,228; $p > 0,05$, Figura 2-B2], quando avaliada 48h após a última exposição. Entretanto, o teste *t* revelou um efeito significativo do fator tratamento na porcentagem de tempo nos braços abertos do LCE [F(8,9) = 2,617; $p < 0,0001$, Figura 2-B1].

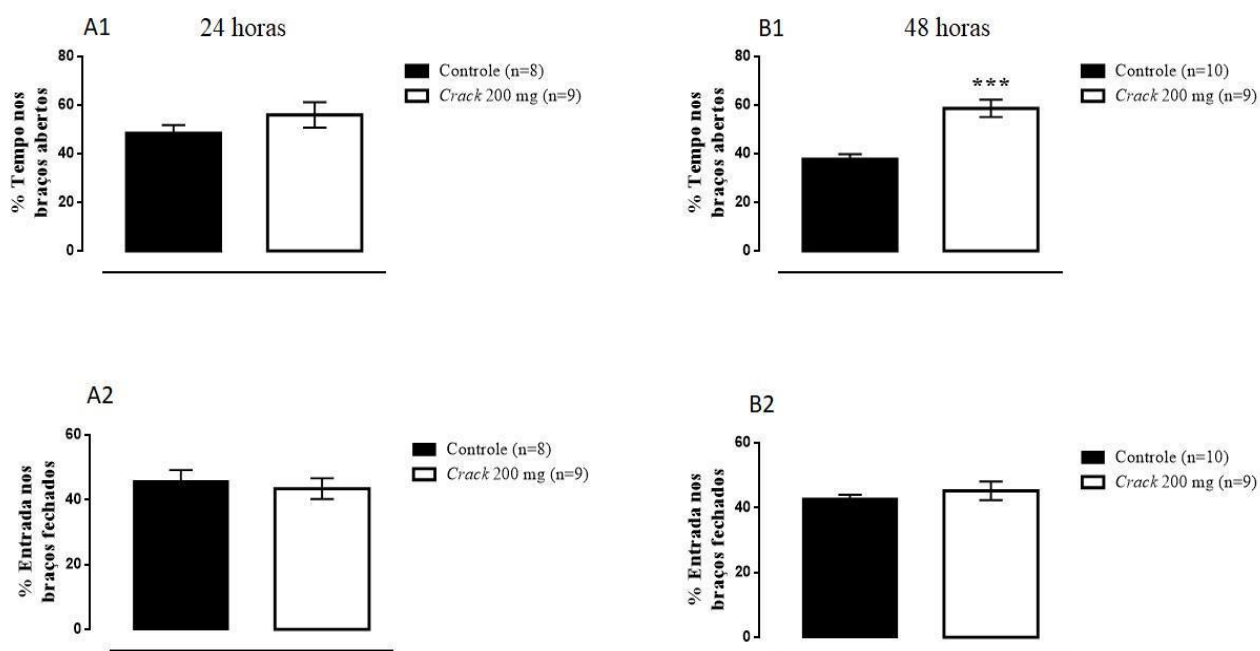


Figura 2 - Efeito da exposição à fumaça do crack (200 mg) no labirinto em cruz elevado (LCE, 5 minutos) nos períodos de 24 horas (A1 e A2) e 48 horas (B1 e B2) após a última exposição. (A1-B1) Porcentagem de tempo nos braços abertos. (A2-B2) Porcentagem de entradas nos braços abertos. Resultados expressos como média±E.P.M. *** $p < 0,0001$ vs. controle (test *t* Student).

Nos parâmetros etológicos, os animais expostos a dose de 200 mg de crack não apresentaram um efeito significativo no SAP tanto 24 horas [F(7,8) = 1,786; $p < 0,0001$; Figura 3-A1] quanto 48 horas [F(9,8) = 3,274; $p < 0,0001$; Figura 3-A2], após a retirada da droga, assim como, o rearing não apresentou um efeito significativo tanto 24 horas [F(8,7) = 15,76; $p < 0,0001$; Figura 3-C1], quanto 48 horas [F(8,9) = 3,666; $p < 0,0001$;

Figura 3-C2]. Em contrapartida, no comportamento *head-dipping* apresentou um efeito significativo em 24 horas [$F(7,8) = 2,195$; $p < 0,05$; Figura 3-B1] e 48 horas [$F(9,8) = 2,069$; $p < 0,05$; Figura 3-B2] após a retirada.

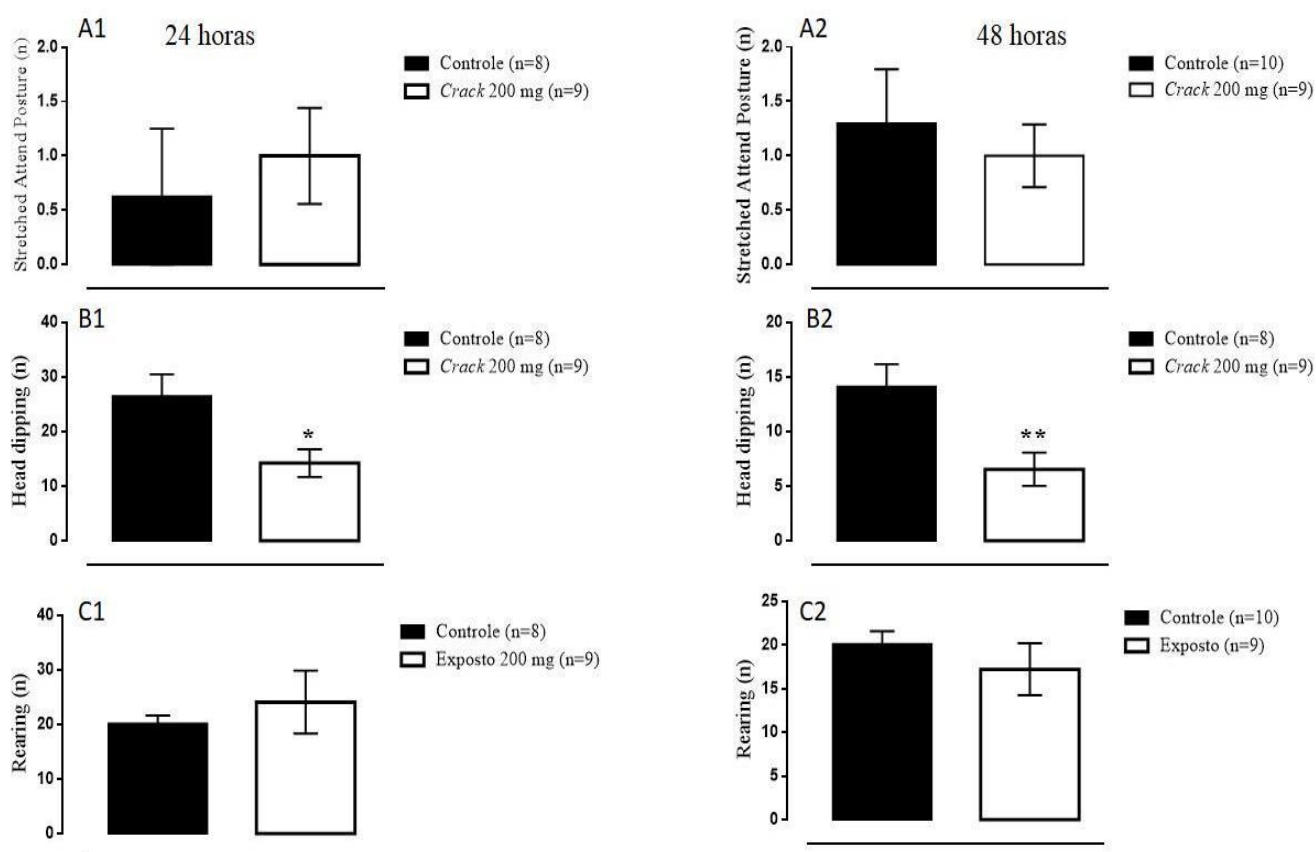


Figura 3 - Efeito da exposição à fumaça do *crack* (200 mg) no labirinto em cruz elevado (LCE, 5 minutos) 24h (A1, B1 e C1) ou 48h (A2, B2 e C2) após a última exposição. (A) *Stretch-attend posture*; (B) *head-dipping* (C) *rearing*. Resultados expressos como média±E.P.M. * $p < 0,05$; ** vs. controle (test *t* Student).

Após o teste do LCE, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto para avaliar a atividade locomotora [*crack* 200 mg, Figura 4 (A1-A2)]. Os animais expostos à fumaça do *crack* (200 mg) apresentaram um aumento significativo na atividade locomotora, quando comparado aos animais controle, tanto 24 horas [$F(8,7) = 4,057$; $p < 0,0002$, Figura 4-A1], quanto 48 horas [$F(8,9) = 1,873$; $p < 0,0064$, Figura 4-A2] após a última exposição.

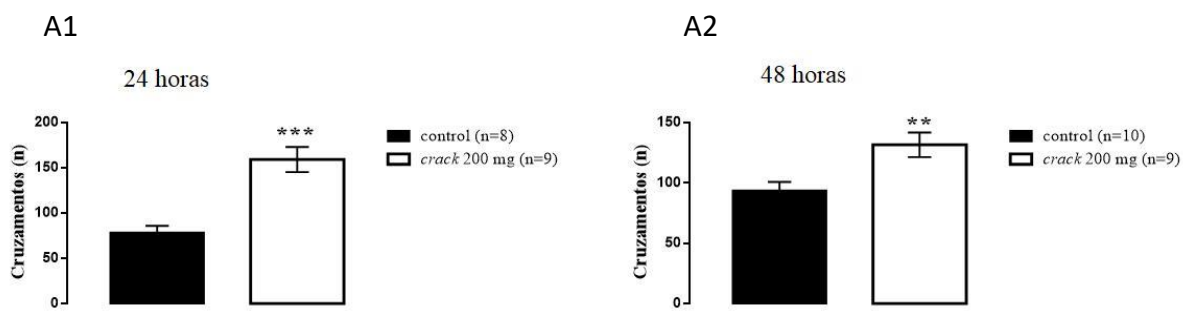


Figura 4 - Efeitos da exposição à fumaça do *crack* (200 mg) no campo aberto (TCA, 5 minutos) 24 horas e 48 horas após a última exposição. Resultados, (A1) número de cruzamentos – 24 horas (A2) número de cruzamentos – 48 horas, expressos como média \pm E.P.M.. * $p < 0,05$ vs. controle (test *t* Student).

Após 30 minutos da exposição ao TCA, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado (TNF) por 6 min. Como observado, os animais expostos à fumaça do *crack* 200 mg [Figura 5(A1-A2)] apresentaram um aumento significativo no tempo de imobilidade em 24 horas [F (8,7) = 1,805; $p < 0,0117$, Figura 5-A1] e 48 horas [F (9,8) = 1,679; $p < 0,0058$, Figura 5-A2].

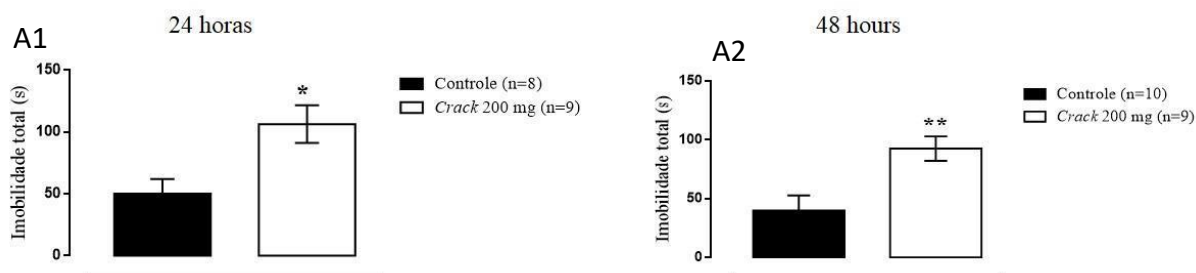


Figura 5 - Efeitos da exposição à fumaça do *crack* (200 mg) no teste do nado forçado (TNF, últimos 4 minutos) 24 horas (A1) ou 48 horas (A2) após a última exposição. Resultados expressos como média \pm E.P.M.. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ vs. controle (test *t* Student).

3.3. Análise da atividade da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) no hipocampo

Como observado na figura 6, a atividade da acetilcolinesterase (F (5, 11) = 12,74; $p < 0,05$, Figura 6A) e butirilcolinesterase (F (11, 5) = 44,18; $p < 0,8754$, Figura 6B) no hipocampo não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais. A análise da concentração de proteínas totais também não apresentou diferença significativa entre os grupos exposto (200 mg) e controle (F (11, 5) = 3,690; $p < 0,05$, Figura 6C).

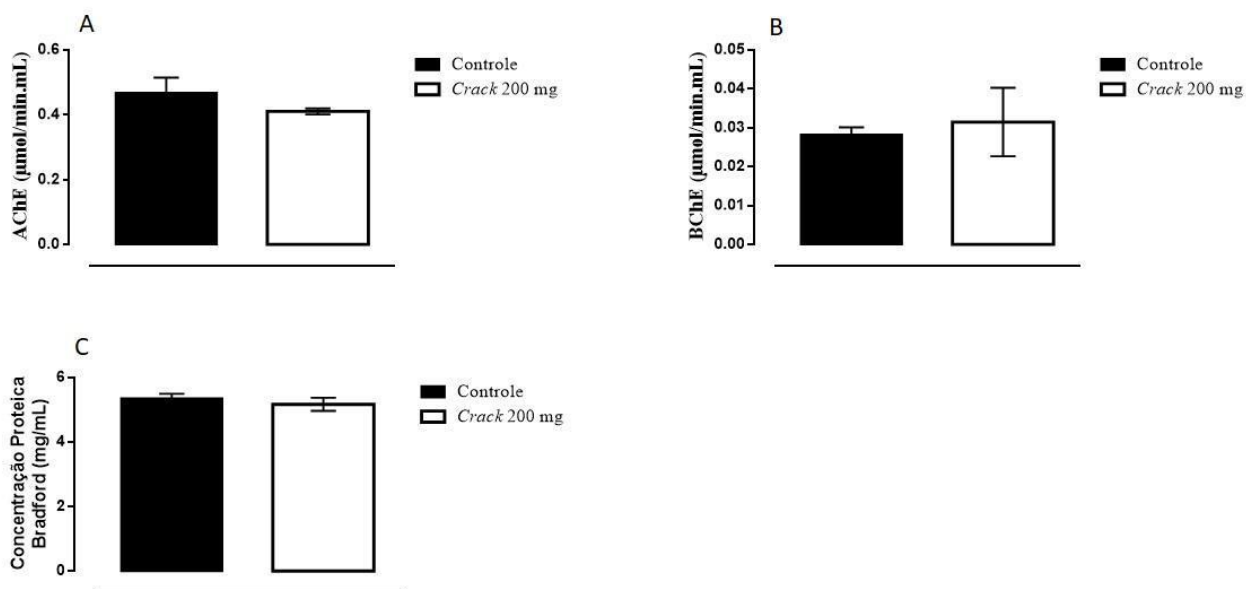


Figura 6 - Efeitos da exposição à fumaça do crack (200 mg) nas atividades das enzimas acetilcolinesterase (A) e butirilcolinesterase (B) e da concentração de proteínas totais (C) no hipocampo de camundongos 24h após a última exposição. Resultados expressos como média ± E.P.M.. (*test t Student*).

3.4. Pirenzepina bloqueia o efeito tipo depressivo 24h após a última exposição ao crack

A ANOVA de uma via detectou diferença significativa entre os diferentes grupos experimentais [$F(3, 27) = 8,520$; $p < 0,05$; Figura 7]. A análise *post-hoc* indicou que os animais expostos a fumaça do crack (200 mg) e tratados 24h após a última exposição com PBS (*Crack+PBS*) apresentaram maior tempo de imobilidade, reproduzindo dados anteriores. Entretanto, o tratamento com pirenzepina (0,06 nmol; *crack + PZP*) bloqueou o aumento no tempo de imobilidade produzido pelo crack. Além disso, a pirenzepina não aterou *per se* o tempo de imobilidade.

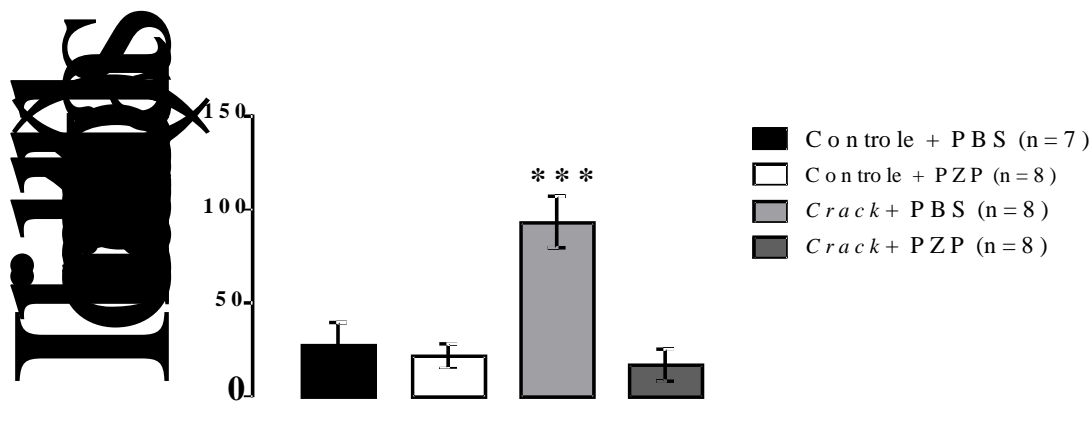


Figura 7 – Bloqueio do efeito do tipo depressivo no teste do nado forçado (TNF, últimos 4 minutos) provocado 24h após a última exposição à fumaça do *crack* (200 mg) com a administração intra-hipocampal de pirenzepina (0,06 nmol; um antagonista seletivo do receptor muscarínico M1). Resultados expressos como média \pm E.P.M com $**p < 0,01$, $##p < 0,01$ (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan).

3.5. Avaliação dos níveis sorológicos de corticosterona 24h após a última exposição à fumaça do crack

O teste *t* Student indicou que 24h após a última exposição à fumaça do *crack* (200 mg) os animais apresentavam níveis sorológicos de corticosterona maiores que os animais do grupo controle [F (5, 4) = 1,680; $p < 0,6354$; Figura 8].

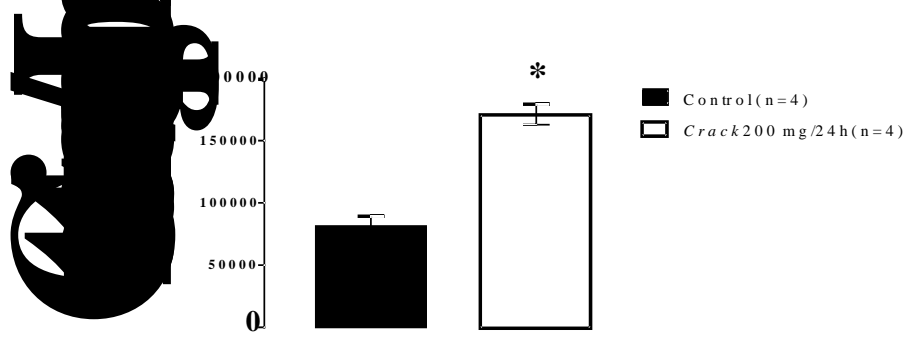


Figura 8 - Efeitos da exposição à fumaça do crack (200 mg) nos níveis sorológicos de corticosterona 24h após a última exposição. Resultados expressos como média \pm E.P.M com $*p < 0,05$ (test *t* Student).

4. Discussão

Nossos resultados demonstraram que os animais apresentaram um comportamento do tipo depressivo, mas não ansioso, e níveis sorológicos de corticosterona elevados após a retirada do *crack*. Além disso, a administração intra-hipocampal de pirenzepina, um antagonista seletivo do receptor muscarínico M1, bloqueou o efeito do tipo depressivo causado pela retirada do *crack*. Entretanto, nenhuma alteração na atividade das colinesterases (AChE e BChE), assim como, na concentração de proteínas totais no hipocampo foi encontrada.

Após a exposição à fumaça do *crack* nossos animais apresentaram um comportamento motor característico de tratamento com drogas psicoestimulantes (ROBINSON e BECKER, 1986; KALIVAS e STEWART, 1991; HO et al., 2002; HUEZA et al., 2016; HE et al., 2006; PARLAMAN et al., 2007). A administração repetida e/ou intermitente de cocaína em roedores promove aumento da atividade locomotora, conhecida como sensibilização comportamental (CASTRO et al., 2005, CHEN et al., 2009, DIROCCO et al., 2009, AREAL et al., 2015). No entanto, estudos realizados por Kalivas e colaboradores (1991) administração repetidas e/ou intermitente do produto da pirólise do cocaina em roedores não promove sensibilização comportamental. Recentemente, Garcia e colaboradores (2017) demonstraram que a AEME, o principal produto da pirólise do *crack*, não induz sensibilização comportamental. Dessa forma, a ausência da sensibilização nos nossos resultados não os inviabiliza

Transtornos mentais, em especial transtornos de ansiedade e depressão, são altamente prevalentes em usuários de cocaína e *crack* (MIGUEL et al., 2017). Em roedores, a abstinência de drogas é caracterizada por um estado de alta ansiedade que pode ocorrer paralelamente a comportamentos indefesos (ALVES et al., 2014; EL HAGE et al., 2012; ERB et al., 2006; HARRIS e ASTON-JONES, 1993; PERRINE et al., 2008; SANTUCCI e ROSARIO, 2010; SARNYAI et al. al., 1995; VALZACHI et al., 2013). Entretanto, nossos animais não apresentaram comportamento do tipo ansioso após a retirada do *crack*. Na verdade, nossos animais apresentaram resultados contraditórios, um perfil do tipo ansiolítico em um parâmetro espaço temporal e um perfil do tipo ansiogênico em um parâmetro etológico. Ausência de tais resultados ou ainda contraditórios também foram observados nos estudos de Sudakov e colaboradores (2015), no qual a mesma dose de cafeína apresentou um forte efeito ansiolítico e

psicoestimulante. Este efeito foi manifestado em um aumento significativo no tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, elevação da atividade locomotora e estimulação do metabolismo. Existem poucos trabalhos que fundamentam essas características de drogas psicoestimulantes ocasionando esse comportamento do tipo não ansiogênico. Sendo assim, os modelos de ansiedade disponíveis para aferir o comportamento do tipo-ansioso nos animais não são ideais.

Nossos animais exibiram comportamento hiperlocomotor no do teste do campo aberto após a retirada da droga. Esse comportamento hiperlocomotor pode ser associado a busca pela droga, nesse período de abstinência, uma vez que, quando os animais foram expostos à fumaça do *crack*, foram submetidos ao mesmo teste de campo aberto, associando o aparato ao uso da droga (condicionamento contextual). Esses dados corroboram com os estudos de Robinson e Berridge (2008) em que o aumento da atividade locomotora no ambiente emparelhado com a droga tem sido associada com a sensibilização contextual, que pode ser correlacionada com neuroadaptações molecular persistente que possam contribuir para o desejo da droga após a abstinência (ROBINSON e BERRIDGE, 2008). Portanto, o aumento na locomoção observado no período de abstinência não é proveniente de um efeito psicoestimulante de longa duração da droga.

A retirada da cocaína tem sido relacionada a sintomas de depressão, o equivalente a um aumento no tempo de imobilidade no teste do nado forçado. De fato, estudos prévios têm demonstrado que a retirada de drogas psicoestimulantes pode induzir a um comportamento depressivo (GAWIN, 1991; SOFUOGLU et al., 2005). Dessa forma, nossos resultados corroboram com dados prévios da literatura. Um estudo realizado por Shane e colaboradores (2009) mostra que 24 horas após a administração crônica (14 dias) os animais apresentaram comportamento do tipo-depressivo, esse estudo corrobora com os nossos resultados e realça que o nosso modelo foi eficiente ao mostrar que a exposição à fumaça do crack durante cinco dias foi capaz de desenvolver o comportamento do tipo-depressivo.

O cérebro de mamíferos contém duas formas de colinesterase, acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE). O papel fisiológico da BChE não é claro, mas além de contribuir para a degradação da ACh pode metabolizar a cocaína e outros compostos exógenos (KENNETH GRASING, 2016). A acetilcolinesterase catalisa a hidrólise da acetilcolina (ACh) nas junções da fissura neuromuscular e sinápticas (SOREQ, 2001). O aumento na atividade colinérgica diminui o efeito recompensador das drogas. De fato, foi

observado que a fisostigmina, um inibidor da acetilcolinesterase (AChE), diminui a auto-administração de cocaína em macacos rhesus (DE LA GARZA e JOHANSON, 1982). Entretanto, até onde sabemos, não existem trabalhos que demonstrem o envolvimento dessas colinesterases no período de retirada do *crack*, apesar do envolvimento do sistema colinérgico hipocampal na dependência e depressão (CUMMINGS, 2000; ELLIS, 2005)

Muitos estudos de exposição aguda ou crônica à cocaína por via intraperitoneal ou auto-administração através de cânulas intracerebroventriculares revelaram alterações na atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal com aumento dos níveis de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), hormônio liberador de corticotropina (CRH) e corticosterona (GALICI e PECHNICK, 2000; GEORGIU et al., 2016). Estudos com roedores mostram a interação do sistema colinérgico com o eixo HPA, onde o hipocampo recebe projeções colinérgicas do núcleo septal e da banda diagonal de Broca (FIBIGER, 1982), e o estresse agudo ativa neurônios colinérgicos septo-hipocámpais, resultando no aumento da liberação de acetilcolina (ACh) no hipocampo de ratos machos (IMPERATO et al., 1991; MIZUNO et al., 1997; GILAD et al., 1987; FUNABASHI et al., 2003 e TAJIMA et al., 2003). Portanto, nossos resultados corroboram que esses achados e parte do efeito tipo depressor por nós encontrado pode ser justificado pelo aumento nos níveis de corticosterona, dado o seu envolvimento nas respostas relacionadas ao estresse (MITSUSHIMA et al., 2003).

Em um estudo realizado Volkow e colaboradores (2001) já mostrava a interação do sistema colinérgico, através de terapias farmacológicas, colinomiméticos, no tratamento de dependência no uso crônico de cocaína. Os colinomiméticos podem compensar a redução da ACh nos receptores observados durante a retirada da substância (CUMMINGS, 2000). No período de retirada de drogas psicoestimulantes, estudos de Gawin (1979) mostram a depressão como um dos sintomas e essa fisiopatologia está relacionada com o sistema colinérgico (Janowsky, 1972), onde tratamento com escopolamina, um antagonista do receptor muscarínico, produz melhorias rápidas e significativas nos sintomas da depressão (WITKIN et al., 2014). Os nossos resultados com a Pirenzepina mostraram a ação nos receptores muscarínicos do tipo M1 bloqueando o efeito do tipo-depressivo causados pela ação dos produtos da pirólise do crack, 24 horas após a última exposição, nesses receptores, o que reforça o envolvimento do sistema colinérgico como possível via na fisiopatologia da depressão causada pelo uso do crack.

Outra explicação é baseada na neurotoxicidade induzida pelo produto da pirólise do *crack* investigada nos estudos de Garcia e colaboradores (2012). Poucos estudos avaliaram os efeitos da AEME nos mAChRs (SCHEIDWEILER et. al., 2003 e ERZOUKI et. al., 1995). Além disso, em preparações de membrana do hipocampo foi constatada a afinidade do produto da pirólise do *crack* para receptores colinérgicos muscarínicos (GARCIA et. al., 2012). Com isso, nosso estudo correlacionou os efeitos desses metabólitos com a ativação de mAChRs do tipo M1, utilizando a Pirenzepina, antagonista colinérgico muscarínico, onde foi capaz de bloquear a ação desses metabólitos, assim como, o comportamento tipo depressivo nos animais expostos à fumaça do *crack*.

5. Conclusão

Nossos resultados demonstraram o papel dos receptores muscarínicos do tipo M1 hipocampal no comportamento do tipo depressor provocado pela retirada do *crack*. Acreditamos que tais resultados possam ser provenientes da ativação direta desses receptores M1 hipocampal por um dos produtos da pirólise do *crack*, a AEME. Também não descartamos a possibilidade da ativação direta ou indireta (via sistema colinérgico hipocampal) do eixo HPA por esse metabólito do *crack*. Assim, estudos futuros são necessários para confirmar tal hipótese.

6. Referencias

ARNOLD J.M., ROBERTS D.C. A critique of fixed and progressive ratio schedules used to examine the neural substrates of drug reinforcement. **Pharmacol Biochem Behav.** 1997; 57: 441–447.

Associação Brasileira de Psiquiatria. Abuso e dependência de múltiplas drogas [Internet]. 2012 Oct 15 [cited 2014 Nov 17]. diretrizes.amb.org.br/_BibliotecaAntiga/abuso_e_depend%C3%Aancia_de_multiplas_drogas.pdf

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais, texto revisado (DSM-V-TR)**. Porto Alegre: Artmed; 2013.

BARDO M.T. Neuropharmacological mechanisms of drug reward: beyond dopamine in the nucleus accumbens. **Crit Ver Neurobiol.** 1998, 12: 37–67.

BREITER, H.C. et al. Acute effects of cocaine on human brain activity and emotion. **Neuron.** 1997; 19(3):591–611.

BUTCHER S.G., BUTCHER L.L.B.R. Origin and modulation of acetylcholine activity in the neostriatum. **Brain Res.** 1974. 71: 167–171.

CAINE S. B. e KOOB G. F. Effects of dopamine D-1 and D-2 antagonists on cocaine self-administration under different schedules of reinforcement in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 1994. 270, 209–218.

CAINE S. B., HEINRICHS S. C., COFFIN V. L. e KOOB G. F. Effects of the dopamine D-1 antagonist SCH 23390 microinjected into the accumbens, amygdala or striatum on cocaine self-administration in the rat. **Brain Res.** 1995. 692, 47–56.

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

CONWAY K.P., COMPTON W., STINSON F.S., GRANT B.F. Lifetime comorbidity of DSM-V mood and anxiety disorders and specific drug use disorders: Results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. **The Journal of Clinical Psychiatry**, 2006, pp. 247-257

CORRIGALL W. A. e COEN K. M. Cocaine self-administration is increased by both D1 and D2 dopamine antagonists. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 1991. 39, 799–802.

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.
- DAGYTE, G. DEN BOER, J.A. TRENTANI, A. The cholinergic system and depression, **Behav. Brain Res**. 221 (2011) 574–582. doi:10.1016/j.bbr.2010.02.023.
- DAVIS, L. et al. Major depression and comorbid substance use disorders. **Curr. Opin. Psychiatry**. 2008: 21,14–18.
- DIAS A.C., ARAUJO M.R., DUNN J., SESSO R.C., CASTRO V, LARANJEIRA R. Mortality rate among crack/cocaine-dependent patients: a 12-year prospective cohort study conducted in Brazil. **J Subst Abuse Treat** 2011; 41:273-8
- DI CHIARA et al. Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. **Neuropharmacology**. 2004; 47:227–241.
- DUNN, J.; LARANJEIRA, R.R.; DA SILVEIRA, D.X.; FORMIGONI, M.L.; FERRI, C.P.; Crack cocaine: na increase in use among patients attending clinics São Paulo: 1990-1993. **Substance Use & Misuse**, v.31:519-527, 1996.
- ETTINGER N.A, ALBIN R.J. A review of the respiratory effects of smoking cocaine. **Am J Med** 1989; 87:664–8.
- 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.
- FERREIRA-FILHO, O.F. et al. Epidemiological profile of cocaine users on treatment in psychiatric hospitals. **Rev. Saúde Pública**. 2003; 37: 751 -9.
- FIBIGER HC: The organization and some projections of cholinergic neurons of the mammalian forebrain. **Brain Res Rev** 1982;4:327–388.
- FLYNN D.D., VAISHNAV A.A., MASH D.C. Interactions of cocaine with primary and secondary recognition sites on muscarinic receptors. **Mol Pharmacol**. 1992. 41: 736–742.
- GARDNER E.L., ASHBY C.R., Heterogeneity of the mesotelencephalic dopamine fibers: physiology and pharmacology. **Neurosci Biobehav Rev**. 2000; 24:115–8.
- GAWIN, F.H., KLEBER, H.D. Abstinence symptomatology and psychiatric diagnosis in cocaine abusers. **Arch. Gen. Psychiatry**. 1986; 43(2):107-1

GAWIN F.H., ALLEN D., HUMBELSTONE B.: Outpatient treatment of crack cocaine smoking with flupenthixol decanoate. **Arch Gen Psychiatry**, 46: 322-325, 1989.

GIBBONS, J.L. MCHUGH, P.R. Plasma cortisol in depressive illness., **J. Psychiatr. Res.** 1 (1962) 162–171. doi:10.1016/0022-3956(62)90006-7.

GILAD, G.M. The stress-induced response of the septo-hippocampal cholinergic system. A vectorial outcome of psychoneuroendocrinological interactions.

Psychoneuroendocrinology 1987;12:167–184.1 3

GOLD, M.S. Drugs of Abuse: a comprehensive series for clinicians., **Plenum Medical Book Company**, 1993, v 3: New York

GORELICK D.A., GARDNER E.L., XI Z.X., Agents in development for the management of cocaine abuse. **Drugs**. 2004. 64: 1547–1573.

GRANT B.F., STINSON F.S., DAWSON D.A., CHOU S.P., DUFOUR M.C., COMPTON W. et. al., Prevalence and co-occurrence of substance use disorders and independent mood and anxiety disorders: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. **Archives of General Psychiatry**. 2004;61(8):807–816.

GUIMARÃES, C.F. Perfil do usuário de crack e fatores relacionados à criminalidade em unidade de internação para desintoxicação no Hospital Psiquiátrico São Pedro de Porto Alegre (RS). **Rev. psiquiatr. Rio Gd. Sul** [online]. 2008, vol.30, n.2, pp. 101-108.

HAILE, C.N.; KOSTEN, T.R.; KOSTEN, T.A. Pharmacogenetic Treatments for Drug Addiction: Cocaine, Amphetamine and Methamphetamine. **Am Journal Drug Alcohol Abuse**, Texas, v. 35, n. 3, p.161-177, 29 set. 2009.

HAILE, C.N. et. al. Pharmacotherapeutics directed at deficiencies associated with cocaine dependence: Focus on dopamine, norepinephrine and glutamate. **Pharmacology & therapeutics**, v.134, n.2, p.260-277, 2012.

HAIM D.Y., LIPPMANN M.L., GOLDBERG S.K., WALKENSTEIN M.D. The pulmonary complications of crack cocaine: a comprehensive review. **Chest** 1995;107:233–40

HARTMAN D. S. e CIVELLI O. Dopamine receptor diversity: molecular and pharmacological perspectives. **Prog. Drug Res.**48, 1997, 173–194.

Hatsukami DK, Fischman MW. Crack cocaine and cocaine hydrochloride. Are the differences myth or reality. **JAMA**. 1996;276:1580-8.

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.

HIGGINS, S.T. et al. Effects of intranasal cocaine on humans learning, performance and physiology. **Psychopharmacology**. 1990; v. 102, n. 4, p. 451-458.

HOPWOOD C.J., MOREY L.C., SKODOL A.E., SANISLOW C.A., GRILO C.M., ANSELL E.B., et al. Pathological personality traits among patients with absent, current, and remitted substance use disorders. **Addict Behav.** 2011;36:1087-90.

HUBNER C. B. e MORETON J. E. Effects of selective D1 and D2 dopamine antagonists on cocaine self-administration in the rat. **Psychopharmacology**, 1991, 105, 151–156.

IMPERATO A, PUGLISI-ALLEGRA S, CASOLINI P, AN-GELUCCI L: Changes in brain dopamine and ace-tylcholine release during and following stressare independent of the pituitary-adrenocorticalaxis. **Brain Res** 1991;538:111–117.6

JANOWSKY DS, EL-YOUSEF MK, Davis JM, Sekerke HJ. A cholinergic-adrenergic hypothesis of mania and depression. **Lancet**. 1972;2(7778):632–635.

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. 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.

KALIVAS P.W., PIERCE R.C., CORNISH J., SORG B.A. A role for sensitization in craving and relapse in cocaine addiction. **J Psychopharmacol (Oxf)** 1998;12:49–53.

KALIVAS PW. Glutamate systems in cocaine addiction. **Curr Opin Pharmacol**, 2004. 4: 23–29.

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.

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

KARPEN J.W., HESS G.P. Cocaine, phencyclidine, and procaine inhibition of the acetylcholine receptor: characterization of the binding site by stopped-flow measurements of receptor-controlled ion flux in membrane vesicles. **Biochemistry (Mosc)**, 1986, 25: 1777–1785.

KESSLER, F. H. P.; TERRA, M. B.; FALLER, S.; STOLF, A. R.; PEUKER A. C.; BENZANO, D., et al. Crack users show high rates of antisocial personality disorder, engagement in illegal activities and other psychosocial problems. **Am J Addict**. 2012; 21: 370-80.

KLEINMAN PH et al. Psychopathology among cocaine abusers entering treatment. **J Nerv Ment Dis** 1990; 178:442-7.

KOOB G. F.; LE H. T. e CREESE I. The D1 dopamine receptor antagonist SCH 23390 increases cocaine self-administration in the rat. **Neurosci. Lett**. 1987, 79, 315–320.

KUBLER, A.; MURPHY, K.; GARAVAN, H. Cocaine dependence and attention switching within and between verbal and visuospatial working memory. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 7, p.1984-1992, 2005.

LLOYD, K.G.; STADLER, H.; BARTHOLINI, G. Dopamine and acetylcholine neurones in limbic structure effect of neuroleptic drugs. In. USDIN, E.; SNYDER, S. (eds) *Frontiers in Catecholamine Research*. **Pergamon Press**, New York, p. 777-779, 1973.

MA, L. et.al. Altered white matter in cocaine-dependent subjects with traumatic brain injury: A diffusion tensor imaging study. **Drug and Alcohol Dependence**, v.151, p. 128-134, 2015.

MALDONADO, R., ROBLEDO, P.; CHOVER, A. J.; CAINE, S. B.; KOOB, G. F. D1 dopamine receptors in the nucleus accumbens modulate cocaine self-administration in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 1993; 45, 239–242.

MARKOU, A.; KOSTEN, T. R.; KOOB, G. F. Neurobiological similarities in depression and drug dependence: a self-medication hypothesis. **Neuropsychopharmacology**. 2008; 18, 135– 174.

McGREGOR, A.; ROBERTS, D. C. Dopaminergic antagonism within the nucleus accumbens or the amygdala produces differential effects on intravenous cocaine self-administration under fixed and progressive ratio schedules of reinforcement. **Brain Res.**, 1993; 624, 245–252.

MELECA, R. J.; BURGIO, D. L.; CARR, R. M.; LOLACHI, C. M. Mucosal injuries of the upper aero digestive tract after smoking crack or freebase cocaine. **Laryngoscope** 1997; 107: 620–5.

MIN, M.O. et. al. Effects of prenatal cocaine exposure on early sexual behavior: Gender difference in externalizing behavior as a mediator. **Drug and Alcohol Dependence**. V.153, p.159-165, 2015.

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

MITSUSHIMA D, FUNABASHI T, SHINOHARA K, KI-MURA F: Rats living in small cages respond to restraint stress with adrenocortical corticosterone release but not with hippocampal acetylcholine release. **Psychoneuroendocrinology**, 2003;28:574–583.14

MIZUNO T, KIMURA F: Attenuated stress response of hippocampal acetylcholine release and adrenocortical secretion in aged rats. **Neurosci Lett** 1997;222:49–52.

MORENO, E. et. al. Cocaine disrupts histamine H₃ receptor modulation of dopamine D₁ receptor signaling: $\sigma(1)$ -D₁-H₃ receptor complexes as key targets for reducing cocaine's effects. **The Journal of Neuroscience**, v.34, n.10, p. 3545-3558, 2014.

MULLER, C. P.; CAREY, R. J.; HUSTON, J. P. Serotonin as an important mediator of cocaine's behavioral effects. **Drugs Today (Barc)**, 2003; 39: 497–511.

MULVANEY, F. D.; ALTERMAN, A. I.; BOARDMAN, C. R.; KAMPMAN, K. Cocaine abstinence symptomatology and treatment attrition. **J. Subst. Abuse Treat.**, v.16, p.129-135, 1999.

NAPPO SA, SANCHEZ Z, OLIVEIRA LG. Crack, AIDS, and women in Sao Paulo, Brazil. **Subst Use Misuse** 2011; 46:476-85.

NIU, L.; ABOOD, L. G.; HESS, G. P. Cocaine: mechanism of inhibition of a muscle acetylcholine receptor studied by a laser-pulse photolysis technique. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1995; 92: 12008–12012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Disponível em: http://www.who.int/substance_abuse/facts/cocaine/en/ Acesso em: 21.11.2015.

PAINE, T. A.; JACKMAN, S. I.; OLMSTEAD, M. C. Cocaine-induced anxiety: alleviation by diazepam, but not buspirone, dimenhydrinate, or dyphenhydramine. **Behav. Pharmacol.**, v. 13, p. 511-523, 2002.

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

PISANI, A.; BONSI, P.; PICCONI, B.; TOLU, M.; GIACOMINI, P.; SCARNATI, E. Role of tonically-active neurons in the control of striatal function: cellular mechanisms and behavioral correlates. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2001; 25: 211–230.

PITTENGER C., DUMAN R. S. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33(1):88–109. doi: 10.1038/sj.npp.1301574.

POLLOCK, D.A. et al. Discrepancies in the reported frequency of cocaine-related deaths, United States, 1983 through 1988. **JAMA**. 1991; 266: 2233-7.

POST, R. M.; KOTIN, J.; GOODWIN, F. K. The effects of cocaine on depressed patients. **Am J Psychiatry**, 1974; 131: 511-7.

POST, R. M.; WEISS, S. R. Psychomotor stimulant vs. local anesthetic effects of cocaine: role of behavioral sensitization and kindling. **NIDA Res. Monogr**. 1988; 88: 217–238.

PULCHERIO, G.; STOLF, A. R.; PETTENON, M.; FENSTERSEIFER, P. D.; KESSLER, F. Crack from rock crystal to treatment. **Revista da AMRIGS**. 2010; 54(3): 337-43.

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

REICHENHEIM M.E, SOUZA E.R., MORAES C.L., MELLO-JORGE M.H., SILVA C.M., MINAYO M.C.S. Violence and injuries in Brazil: the effect, progress made, and challenges ahead. **Lancet** 2011; 377:1962-75.

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.

RIBEIRO M, DUNN J, SESSO R, DIAS AC, LARANJEIRA R. Causes of death among crack cocaine users. **Rev Bras Psiquiatr** 2006; 28:196-202.

RIBEIRO L.A., SANCHEZ Z.M., NAPPO S.A. Surviving crack: a qualitative study of the strategies and tac-tics developed by Brazilian users to deal with the risks associated with the drug. **BMC Public Health** 2010; 10:671.

ROBERTS, D. C. Preclinical evidence for GABAB agonists as a pharmacotherapy for cocaine addiction. **Physiol Behav.**, 2005; 86: 18–20.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. **Brain Res Brain Res Rev.**, 1993; 18: 247–91.

RODRIGUES, D. S. Conhecimentos produzidos acerca do crack: uma incursão nas dissertações e teses brasileiras. **Ciênc. saúde coletiva** [online]. 2012, vol.17, n.5, pp. 1247-1258. ISSN 1413-8123.

SHARKEY, J.; RITZ, M. C.; SCHENDEN, J. A.; HANSON, R. C.; KUCHAR, M. J. Cocaine inhibits muscarinic cholinergic receptors in heart and brain. **J Pharmacol Exp Ther**, 1988; 246: 1048–1052.

SILVA, T. G. K. N. *Crack: do efeito psicoestimulante ao tratamento, um novo modelo experimental de drogas de abuso*. Dissertação (mestrado), Instituto de Ciências da Saúde. UFAL, Alagoas. 2016.

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

SWENDSEN, J.; CONWAY, K. P.; DEGENHARDT, L.; GLANTZ, M.; JIN, R.; MERIKANGAS, K. R.; et al. Mental disorders as risk factors for substance use, abuse and dependence: results from the 10 year follow-up of the National Comorbidity Survey. **Addiction**. 2010;105:1117-28.

TAJIMA T, ENDO H, SUZUKI Y, IKARI H, GOTOH M, IGUCHI A: Immobilization stress-induced increase of hippocampal acetylcholine and of plasma epinephrine, norepinephrine and glucose in rats. **Brain Res** 1996;13:155–158.

TANG, Y. L.; KRANZLER, H. R.; GELERNTER, J.; FARRER, L. A.; CUBELLS, J. F. Comorbid psychiatric diagnoses and their association with cocaine-induced psychosis in cocaine-dependent subjects. **American Journal of Addiction**. 2007; 16(5): 343–351. doi: 10.1080/10550490701525723.

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.

UNDIE, A. S.; FRIEDMAN, E. Differences in the cataleptogenic actions of SCH 23390 and selected classical neuroleptics. **Psychopharmacology**. 1988; 96: 311-316.

VELASCO, A. et al. **Velasquez Farmacologia**. 16^a ed. New York: Interamericana McGrawHill, 1993.

VONMOOS, M.; HULKA, L. M.; PRELLER, K. H.; JENNI, D.; BAUMGARTNER, M. R.; STOHLER, R.; BOLLA, K. I.; QUEDNOW, B. B. Cognitive dysfunctions in recreational and dependent cocaine users: role of attention-deficit hyperactivity disorder, craving and early age at onset. **Br. J. Psychiatry**, 2013; 203: 35-43.

XIE, X.; WELLS, A. M.; FUCKS, R.A. Cocaine seeking and taking: Role of hippocampal dopamine D1-like receptors. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**. V.17, n.9, p.1533-1538, 2014.

WATKINS, K. E.; HUNTER, S. B.; WENZEL, S. L.; TU, W.; PADDOCK, S. M.; GRIFFIN, A., et al. Prevalence and characteristics of clients with co-occurring disorders in outpatient substance abuse treatment. **Am J Drug Alcohol Abuse**. 2004; 30: 749-64.

WECHSBERG W.M., NOVAK S.P., ZULE W.A., BROWNE F.A., KRAL A.H., ELLERSON R.M., et al. Sustainability of intervention effects of an evidence-based HIV prevention intervention for African American women who smoke crack cocaine. **Drug Alcohol Depend** 2010; 109:205-12.

WEISS, R. D.; MIRIN, S. M.; GRIFFIN, M. L. Methodological considerations in the diagnosis of coexisting psychiatric disorders in substance abusers. **Br J Addict** 1992; 87: 179-87.

WEISS, R. D. Drug abuse as self-medication for depression: an empirical study. **Am J Drug Alcohol Abuse**, 1992; 18: 121-9

WITKIN J.M., OVERSHINER C., X. Li, CATLOW J.T., WISHART G.N., SCHOBBER D. A, B.; HEINZ A., NIKOLAYEV A., TOLSTIKOV V. V, ANDERSON W.H., Higgs R.E., Kuo M.S., Felder C.C., M1 and m2 muscarinic receptor subtypes regulate antidepressant-like effects of the rapidly acting antidepressant scopolamine., **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 351 (2014) 448–56. doi:10.1124/jpet.114.216804.

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.; ROMPRE, P. P. Brain DA and reward. **Ann. Rev. Psychol.**, 1989; 40, 191–225.

YANG, X. M.; GORMAN, A. L.; DUNN, A. J.; GOEDERS, N. E. Anxiogenic effects of acute and chronic cocaine administration: neurochemical and behavioral studies. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 41, n. 3, p. 643-650, 1992.