

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

DANIELLE SILVEIRA MACÊDO

**ESTUDO FARMACOLÓGICO E DE ALTERAÇÕES
NEUROQUÍMICAS EM CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E CORPO
ESTRIADO DE CAMUNDONGOS APÓS CONVULSÕES E
MORTE INDUZIDAS POR *OVERDOSE* DE COCAÍNA**

FORTALEZA
2005

DANIELLE SILVEIRA MACÊDO

**ESTUDO FARMACOLÓGICO E DE ALTERAÇÕES
NEUROQUÍMICAS EM CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E CORPO
ESTRIADO DE CAMUNDONGOS APÓS CONVULSÕES E
MORTE INDUZIDAS POR *OVERDOSE* DE COCAÍNA**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa.

FORTALEZA
2005

DANIELLE SILVEIRA MACÊDO

**ESTUDO FARMACOLÓGICO E DE ALTERAÇÕES
NEUROQUÍMICAS EM CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E CORPO
ESTRIADO DE CAMUNDONGOS APÓS CONVULSÕES E
MORTE INDUZIDAS POR OVERDOSE DE COCAÍNA**

**Tese submetida à Coordenação do Curso
de Pós-Graduação em Farmacologia, da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para obtenção do grau
de Doutor em Farmacologia**

Aprovada em ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Luiz Eugênio Araújo de Moraes Mello
Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP

Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi
Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC

Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Otoni Cardoso do Vale
Universidade Federal do Ceará-UFC

Dedicatória

*A Deus que me guia por toda a vida,
ajudando a escolher os melhores caminhos a seguir;*

*A Ulysses, Ulysses Filho, Thays, meus Avós e Maria
por todo apoio e incentivo durante este trajeto,
que não foi fácil.*

"A mente que se abre a uma nova idéia, jamais volta ao seu tamanho original"

Albert Einstein

“A partir do cérebro em particular, nós pensamos, vemos, escutamos, e distinguimos o feio do bonito, o mal do bem e o prazeroso do desagradável.... As coisas que nos deixam loucos ou delirantes , nos trazem medos ou ansiedade, ou nos fazem ter atos contrários aos hábitos vem do cérebro quando ele se torna anormalmente quente, frio, úmido ou seco, ou sofre alguma afecção não natural, a qual ele não está acostumado. Estes eventos fazem com que a forma com que nós enxergamos ou escutamos as coisas, mude. Passamos a ver ou escutar agora uma coisa, agora uma outra, e a língua fala de acordo com as coisas vistas e escutadas naquelas ocasiões. Mas quando o cérebro está em equilíbrio, o homem pode pensar apropriadamente.”

Atribuído a Hipócrates

Século 5º, A. C.

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar por ter me iluminado durante todo este caminho e por sempre estar ao meu lado em todas as ocasiões;

À minha orientadora de toda a vida, Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa que teve a paciência de me acolher ainda como estudante de iniciação científica e me orientar por todo este tempo. Com ela aprendi tudo em pesquisa e até mesmo a manusear um computador.

À Dra. Glauce Socorro de Brarros Viana que sempre foi para mim um modelo de pesquisadora, muito dedicada, sempre querendo implantar as mais novas metodologias no Laboratório;

Aos Profs. Drs. Luiz Eugênio Mello, Reynaldo Takahashi e Otoni Cardoso, por terem gentilmente aceito o convite para participarem da banca de avaliação desta tese;

À ANVISA e ao Departamento de Polícia Federal do Estado do Ceará por terem liberado a cocaína para a realização deste estudo e ao Prof. Andrade por ter feito a análise cromatográfica da droga;

À minha família por ter suportado os momentos de ausência;

Às Profas. Silvânia (Gatinha), Marta Fonteles, Kalyne e Geanne por terem muito me ajudado durante este percurso;

À Rachel, Edenilce e Luciana que como bolsistas me acompanharam durante a execução deste trabalho;

Às minhas amigas do Laboratório de Neurofarmacologia Vera, Lissiana, Aline, Patrícia, Isabel, por terem também contribuído para a execução deste trabalho e às técnicas do Laboratório, Vilani e Jaqueline;

Aos funcionários do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia por terem cedido os animais para estudo;

Aos Professores, secretárias e funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, em especial à Aura.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE QUADROS	xviii
LISTA DE ABREVIATURAS	xix
LISTA DE DEFINIÇÕES	xxi
RESUMO	xxiv
ABSTRACT	xxvi
I INTRODUÇÃO	27
1 Cocaína	28
1.1 Introdução	28
1.2 Histórico	30
1.3 Ações da cocaína no organismo	33
1.4 Dados epidemiológicos relacionados ao vício por cocaína	34
1.5 Reações adversas ocasionadas pelo uso da cocaína	36
1.6 <i>Overdose</i> de cocaína	37
1.7 Adulterantes presentes na cocaína vendida nas ruas e sua relação com os efeitos colaterais da droga	38
2 Convulsões e estado de mal epilético	40
2.1 Convulsão e estado de mal epilético induzidos por cocaína	43
2.2 Neurotransmissão monoaminérgica e seu envolvimento nos processos convulsivos	44
2.2.1 Síntese, receptores e funções das monoaminas	44
2.2.2 Envolvimento das monoaminas nas convulsões	50
2.3 Neurotransmissão colinérgica e seu envolvimento nos processos convulsivos	52
2.3.1 Síntese, receptores e funções da acetilcolina	52
2.3.2 Neurotransmissão colinérgica e seu envolvimento nos processos convulsivos	55
2.4 Aminoácidos transmissores e seu envolvimento na convulsão	56
2.4.1 Síntese, receptores e funções	56
2.4.2 Aminoácidos e seu envolvimento nos processos convulsivos	63
3 Estresse oxidativo	65

4 Áreas cerebrais: corpo estriado e córtex pré-frontal	66
5 Possíveis mecanismos da convulsão induzida por cocaína e neurotransmissores envolvidos	70
6 Relevância e justificativa	71
II OBJETIVOS	75
III MATERIAIS E MÉTODOS	77
1 Material utilizado nos experimentos	78
2 Animais	78
3 Preparo das drogas	79
4 Determinação da dose convulsivante (DC) e da dose letal (DL) de cocaína a ser usada nos experimentos	79
5 Determinação dos sistemas neurotransmissores envolvidos na convulsão induzida por cocaína (Capítulo 1)	80
5.1 Procedimento experimental	80
6 Separação dos grupos estado de mal epilético (EME) e morte induzida por cocaína	83
7 Dissecção das áreas cerebrais (corpo estriado e córtex pré-frontal)	84
8 Determinação dos níveis de monoaminas e seus metabólitos com HPLC	85
Método	85
Procedimento Experimental	86
Soluções Reagentes	87
9 Determinação dos receptores que podem mediar a convulsão induzida por cocaína	87
9.1 Determinação da densidade dos receptores colinérgicos muscarínicos M ₁ -símile	88
Método	88
Procedimento experimental	89
Soluções reagentes	89
9.2 Determinação da densidade dos receptores dopaminérgicos	90
Receptores D ₁ -símile	90
Receptores D ₂ -símile	90
Método	90
Procedimento experimental	91
Soluções reagentes	92
9.3 Determinação dos receptores serotoninérgicos 5-HT ₂	93

Método	93
Procedimento experimental	94
Soluções reagentes	94
9.4 Preparo das membranas para determinação dos receptores gabaérgicos e glutamatérgicos	95
9.5 Determinação dos receptores gabaérgicos e glutamatérgicos	96
Método	96
Procedimento experimental	96
Receptores GABAérgicos	96
Receptores Glutamatérgicos	96
Soluções reagentes	97
10 Determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase	98
Método	98
Procedimento experimental	99
Soluções reagentes	99
11 Determinação da atividade da catalase	100
Método	
Procedimento experimental	100
Soluções reagentes	100
12 Dosagem de nitrito/nitrato	101
Método	101
Procedimento experimental	101
Soluções reagentes	102
13 Avaliação da peroxidação lipídica (dosagem de malonildialdeído)	102
Método	102
Procedimento experimental	103
Soluções reagentes	103
14 Dosagem de proteína (método de Lowry)	104
Método	104
Soluções reagentes	105
15 Análise estatística	105

IV CAPÍTULOS	106
CAPÍTULO 1- Determinação da dose convulsivante de cocaína e estudo das manipulações farmacológicas de diversos sistemas neurotransmissores nas convulsões induzidas por <i>overdose</i> de cocaína em camundongos	107
Introdução	108
Objetivos	111
Resultados	112
Discussão	123
CAPÍTULO 2 - Determinação dos níveis de monoaminas e seus metabólitos após as convulsões e morte induzidas por <i>overdose</i> de cocaína em corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos	
Introdução	134
Objetivos	136
Resultados	137
Discussão	146
CAPÍTULO 3- Determinação da densidade de receptores dopaminérgicos (D ₁ e D ₂ -símile), serotoninérgico (5HT ₂), muscarínico M ₁ -símile e atividade da acetilcolinesterase após as convulsões e morte induzidas por <i>overdose</i> de cocaína em corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos	
Introdução	152
Objetivos	154
Resultados	155
Discussão	170
CAPÍTULO 4- Determinação da densidade de receptores GABAérgicos, glutamatérgicos e níveis de nitrito/nitrato após as convulsões e morte induzidas por <i>overdose</i> de cocaína em corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos	
Introdução	182
Objetivos	187
Resultados	188
Discussão	194
CAPÍTULO 5- Estudo da participação do estresse oxidativo nas convulsões e morte induzidas por <i>overdose</i> de cocaína em corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos	

Introdução	201
Objetivos	207
Resultados	208
Discussão	217
V-CONSIDERAÇÕES FINAIS	225
VI- CONCLUSÕES	236
VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	239
VIII-APÊNDICES	292
Apêndice 1 – Abstract do trabalho aceito para publicação na revista Cellular and Molecular Neurobiology.	293
Apêndice 2 – Abstract do trabalho publicado na revista Neuroscience Letters. Julho/2005.	294
Apêndice 3 – Abstract do trabalho publicado na revista Epilepsy and Behavior. Dezembro/2004.	295
Apêndice 4 – Abstract do trabalho publicado na revista Neuroscience Letters. Maio/2004.	296
Apêndice 5 – Abstract do trabalho publicado na revista Cellular and Molecular Neurobiology. Fevereiro/2004.	297
Apêndice 6 – Abstract do trabalho publicado na revista Neuroscience Letters. Outubro/2001.	298

LISTA DE FIGURAS

I INTRODUÇÃO

Figura I-1a.-	Planta <i>Erythroxylon coca</i> Shrub	29
Figura I-1b -	Representação do Cloridrato de cocaína	29
Figura I-2	Parte do livro de Freud, onde o mesmo começa a trabalhar o conceito de toxicomania.	32
Figura I-3 -	Mecanismo de ação da cocaína	33
Figura I-4 -	Principais vias do metabolismo da dopamina no cérebro	45
Figura I-5 -	Principais vias dopaminérgicas no SNC	46
Figura I-6 -	Receptores muscarínicos da acetilcolina	53
Figura I-7 -	Metabolismo dos aminoácidos transmissores no cérebro	57
Figura I-8 -	Mecanismos da potenciação a longo prazo (LTP)	60
Figura I-9 -	Processo de síntese e recaptção do aminoácido GABA	62

III MATERIAIS E MÉTODOS

Figura II-1 -	Representação da região anatômica no camundongo referente ao córtex pré-frontal	84
Figura II-2 -	Dissecação do corpo estriado (CE)	85

IV CAPÍTULOS

CAPÍTULO 2

Figura 2-1 -	Determinação dos níveis de DA e seus metabólitos (DOPAC e HVA) em CE de camundongos após estado de mal epiléptico (EME) e morte induzidos por <i>overdose</i> cocaína.	138
Figura 2-2 -	Determinação dos níveis de 5HT, 5HIAA e NA em CE de camundongos após estado de mal epiléptico (EME) e morte induzidas por <i>overdose</i> de cocaína	139
Figura 2-3 -	Determinação dos níveis de 5HT, 5HIAA e NA em CPF após estado de mal epiléptico (EME) e morte induzidas por <i>overdose</i> de cocaína	141
Figura 2-4 -	Determinação dos níveis de DA e DOPAC em CPF após estado de mal epiléptico (EME) e morte induzidas por <i>overdose</i> de cocaína em camundongos	142
Figura 2-5 -	Determinação das taxas de metabolização dos	144

	neurotransmissores em CE de camundongos	
Figura 2-6 -	Determinação das taxas de metabolização dos neurotransmissores em CPF de camundongos	145
CAPÍTULO 3		
Figura 3-1 -	Plot de curva de saturação (gráfico menor) e <i>Scatchard</i> representativo (gráfico maior) para [³ H]-SCH-23390 (receptores D ₁ -símile) em <u>córtex pré-frontal</u> de camundongos	157
Figura 3-2 -	Plot de curva de saturação (gráfico menor) e <i>Scatchard</i> representativo (gráfico maior) para [³ H]-SCH-23390 (receptores D ₁ -símile) em <u>corpo estriado</u> de camundongos	158
Figura 3-3 -	Plot de curva de saturação (gráfico menor) e <i>Scatchard</i> representativo (gráfico maior) para [³ H]-espiroperidol em presença de mianserina (receptores D ₂ -símile) em <u>córtex pré-frontal</u> de camundongos	161
Figura 3-4 -	Plot de curva de saturação (gráfico menor) e <i>Scatchard</i> representativo (gráfico maior) para [³ H]-espiroperidol em presença de mianserina (receptores D ₂ -símile) em <u>corpo estriado</u> de camundongos	162
Figura 3-5-	Plot de curva de saturação (gráfico menor) e <i>Scatchard</i> representativo (gráfico maior) para [³ H]-NMS em presença de carbacol (receptores M ₁ -símile) em <u>córtex pré-frontal</u> de camundongos	167
Figura 3-6 -	Determinação da atividade da acetilcolinesterase em <u>corpo estriado</u> de camundongos após EME e morte induzidos por cocaína	168
Figura 3-7 -	Determinação da atividade da acetilcolinesterase em <u>córtex pré-frontal</u> de camundongos após EME e morte induzidos por cocaína	169
CAPÍTULO 4		
Figura 4-1 -	Determinação dos níveis de nitrito/nitrato em <u>corpo estriado</u> (CE) de camundongos após EME e morte induzidos por cocaína	192
Figura 4-2 -	Determinação dos níveis de nitrito/nitrato em <u>córtex pré-</u>	193

frontal de camundongos submetidos à convulsão e morte por *overdose* de cocaína

CAPÍTULO 5

Figura 5-1 -	Metabolismo da cocaína	204
Figura 5-2 -	Atividade da catalase em corpo estriado (A) e córtex pré-frontal (B) de camundongos.	210
Figura 5-3-	Níveis de glutathiona reduzida (GSH) em corpo estriado (A) e córtex pré-frontal (B) de camundongos após <i>overdose</i> de cocaína.	212
Figura 5-4-	Efeito da <i>overdose</i> de cocaína sobre a formação de malonildialdeído (MDA) em homogenatos de corpo estriado (A) e córtex pré-frontal (B) de camundongos.	214
Figura 5-5 -	Efeito do pré-tratamento com vitamina E sobre as convulsões e morte induzidas por cocaína.	216

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1-1 -** Efeito da administração de diferentes doses de cocaína na indução de convulsão e morte em camundongos **113**
- Tabela 1-2 -** Efeito do pré-tratamento com drogas gabaérgicas sobre as convulsões induzidas por cocaína 90 mg/kg em camundongos **116**
- Tabela 1-3 -** Efeito do pré-tratamento com drogas dopaminérgicas e muscarínicas nas convulsões induzidas por cocaína 90 mg/kg em camundongos **118**
- Tabela 1-4 -** Efeito do pré-tratamento com drogas serotoninérgicas nas convulsões induzidas por cocaína 90 mg/kg em camundongos **120**
- Tabela 1-5 -** Efeito do pré-tratamento com drogas com ação nos receptores glutamatérgicos NMDA, sistema opióide e inositol nas convulsões induzidas por cocaína 90 mg/kg em camundongos **122**

CAPÍTULO 3

- TABELA 3-1 -** Efeito da administração de *overdose* de cocaína sobre o *binding* de [³H]-SCH 23390 (receptores dopaminérgicos D₁-símile) em córtex pré-frontal (CPF) e corpo estriado (CE) de camundongos **156**
- TABELA 3-2 -** Efeito da administração de *overdose* de cocaína sobre o *binding* de [³H]-espiroperidol na presença de mianserina (receptores dopaminérgicos D₂-símile) em córtex pré-frontal (CPF) e corpo estriado (CE) de camundongos **160**
- TABELA 3-3 -** Efeito da administração de *overdose* de cocaína sobre o *binding* de [³H]-espiroperidol na presença de dopamina (receptores serotoninérgicos 5HT₂-símile) em córtex pré-frontal (CPF) e corpo estriado (CE) de camundongos **164**
- TABELA 3-4 -** Efeito da administração de *overdose* de cocaína sobre o *binding* de [³H]-N-metil-escopolamina (³H-NMS) na **166**

presença de carbacol (receptores muscarínicos M₁-símile) em córtex pré-frontal (CPF) e corpo estriado (CE) de camundongos

CAPÍTULO 4

- TABELA 4-1 -** Efeito da administração de *overdose* de cocaína sobre o **189**
binding de [³H]-GABA (receptores GABAérgicos) em córtex pré-frontal (CPF) e corpo estriado (CE) de camundongos
- TABELA 4-2 -** Efeito da administração de *overdose* de cocaína sobre o **190**
binding de [³H]-glutamato (receptores glutamatérgicos) em córtex pré-frontal (CPF) e corpo estriado (CE) de camundongos

LISTA DE QUADROS

I- INTRODUÇÃO

Quadro I-1 -	Classificação Internacional das Crises Epiléticas	41
Quadro I-2 -	Propriedades e localizações dos subtipos de receptores dopaminérgicos	48
Quadro I-3 -	Funções dos receptores muscarínicos afetadas em animais geneticamente modificados	54

III MATERIAIS E MÉTODOS

Quadro III-1 -	Principais materiais utilizados nos experimentos	78
Quadro III-2 -	Grupos experimentais utilizados no teste das convulsões induzidas pela cocaína.	82

IV-CAPÍTULOS

CAPÍTULO 4

Quadro 4-1 -	Identificação dos receptores mGlu, sistemas de transdução e principais agonistas e antagonistas	184
---------------------	---	------------

CAPÍTULO 5

Quadro 5-1 -	Reações catalisadas por diferentes enzimas antioxidantes	203
---------------------	--	------------

V CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quadro V-1 -	Ação de drogas agonistas e antagonistas de diversos sistemas neurotransmissores na proteção contra as convulsões e letalidade associadas à <i>overdose</i> de cocaína	233
Quadro V-2 -	Resumo das alterações neuroquímicas encontradas após estado de mal epilético (EME) e morte induzidos por <i>overdose</i> de cocaína (90 mg/kg, i.p.) em corpo estriado (CE) e córtex pré-frontal (CPF) de camundongos	234

LISTA DE ABREVIATURAS

A. C.	- Antes de Cristo
ACh	- Acetilcolina
AChE	- acetilcolinesterase
ACPD	- Aminociclopentano-1,3-ácido descarboxílico
AMPA	- Propionato de α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxale
AMPc	- 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	- Análise de variância
ATC	- Acetiltiocolina
ATV	- Área tegmentar ventral
BSA	- Albumina sérica bovina
BuChE	- Butirilcolinesterase
CA	- Cainato
CE	- Corpo estriado
ChAT	- Colina acetiltransferase
CHPG	- Carboxi-3-hidroxifenilglicina
c.p.m.	- Cintilações por minuto
5HIAA	- Ácido 5 hidroxindolacético
5HT	- Serotonina
COMT	- Catecol-o-metil transferase
CPF	- Córtex pré-frontal
CPFm	- Córtex pré-frontal medial
DA	- Dopamina
DAG	- Diacilglicerol
DOPAC	- Ácido dihidroxifenilacético
DTNB	- Ácido ditiobisnitrobenzóico
EEG	- eletroencefalograma
EME	- Estado de mal epiléptico
EMECG	- Estado de mal epiléptico por crises generalizadas
EMENC	- estado de mal epiléptico por crises não convulsivas
EO	- Estresse oxidativo
EPM	- Erro padrão da média
ERO	- Espécies reativas do oxigênio
GABA	- Ácido γ -amino butírico
GABA-T	- GABA transaminase
GAD	- Ácido glutâmico descarboxilase
GSH	- Glutationa reduzida
GSH-Px	- Glutationa peroxidase
GSH-Rd	- Glutationa reduzida
HPLC	- Cromatografia líquida de alta performance
HVA	- Ácido homovanílico
i.p.	- intraperitoneal
IP₃	- Inositol 1,4,5-trifosfato
L-AP4	- L(+)-2-amino-4-ácido fosfobutírico
LC	- Locus coeruleus
L-DOPA	- L-3,4-dihidroxifenilalanina
LPS	- Lipopolissacarídeo

LTP	- Potenciação a longo prazo
MA	- Metanfetamina
MAO	- Monoamina oxidase
MDA	- Malonildialdeído ou malondialdeído
Min	- Minuto
MK-801	- 5-metil-10,11-diidro5H-dibenzo-(a,d)-ciclohepten-5,10-imine
NA	- Noradrenalina
NMDA	- N-metil-D-aspartato
NMS	- N-metil-escopolamina
NO	- Óxido nítrico
NOS	- Óxido nítrico sintase
NOSe	- Óxido nítrico sintase endotelial
NOSi	- Óxido nítrico sintase induzível
NOSn	- Óxido nítrico sintase neuronal
PET Scan	- Tomografia por emissão de pósitrons
PI	- Fosfatidilinositol
PKC	- Proteína quinase C
PTZ	- Pentilenotetrazol
7-NI	- 7-nitroindazol
SIDA	- Síndrome da imunodeficiência adquirida
SNC	- Sistema Nervoso Central
SNpr	- Substância negra pars reticulata
SOD	- Superóxido dismutase
TBA	- Ácido tiobarbitúrico
TE	- Agentes transferidores de elétrons
TH	- Tirosina hidroxilase
VOCC	- Canais de cálcio operados por voltagem

LISTA DE DEFINIÇÕES

Convulsão – Descarga paroxística, excessiva e sincrônica de neurônios isolados ou de um grupo de neurônios, causada pela alteração de sua excitabilidade que pode produzir variadas manifestações subjetivas, comportamentais e motoras.

Desejo (*craving*)- ânsia ou intensa vontade por doses adicionais da droga. Representa o maior fator para a recaída ao abuso da cocaína após um período de abstinência. O desejo é prontamente obtido por estímulos associados a situações que precedem o uso da droga, tais como, pessoas, lugares, objetos, odores ou estados emocionais (euforia e disforia). O desejo por cocaína pode ser resultado de um desequilíbrio da neurotransmissão dopaminérgica.

Epilepsia – grupo etiologicamente e clinicamente diverso de desordens neurológicas caracterizada por descargas cerebrais espontâneas, recorrentes, paroxísticas, chamadas convulsões.

Estado de mal epiléptico – O dicionário da Organização Mundial de Saúde define EME como “uma condição caracterizada por crises epiléticas que são suficientemente prolongadas ou repetidas a intervalos curtos de forma a produzir uma crise epilética duradoura e invariável, sem recuperação da consciência entre as crises”.

Estresse oxidativo – condição na qual as defesas antioxidantes celulares encontram-se inadequadas para detoxificar completamente os radicais livres gerados, devido à produção excessiva de espécies reativas do oxigênio, perda das defesas antioxidantes ou mais comumente ambos.

Kindling (abrasamento) – processo no qual um estímulo inicial em estruturas límbicas (como amígdala e hipocampo) seguido por uma resposta elétrica (pós-descarga) torna-se mais extenso e prolongado com a repetição destes estímulos até que a convulsão generalizada ocorra.

Overdose – superdose, excesso, quantidade ou exposição excessiva a algo ou alguém (KOOGAN & HOUSSAIS, 2000).

Recompensa – é o objetivo do comportamento motivado. Uma recompensa (ex.: comida) geralmente é um estímulo complexo tendo propriedades motivacionais primárias (ex.,> calorias) e secundárias (ex.: cheiro e sabor).

Reforço – é uma teoria pela qual um estímulo (isto é, um estímulo não condicionado, como a droga ou a abstinência da droga, ou um estímulo condicionado, como os utensílios utilizados para o preparo e administração da droga) aumenta a probabilidade de uma resposta (isto é, o uso continuado da droga). O reforço é um fenômeno chave para o desenvolvimento do vício

pela cocaína. O reforço positivo é um processo pelo qual uma ação que resulta em prazer, ou recompensa se torna repetitiva. Muitas pessoas acham a euforia associada ao uso da cocaína recompensatória, este efeito pode levar a um reforço positivo e um comportamento de persistente busca pela droga. O reforço parece ser regulado pela interação de múltiplos sistemas neurotransmissores e neuromoduladores.

RESUMO

Estudo farmacológico e de alterações neuroquímicas em corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos após convulsões e morte induzidas por *overdose* de cocaína. DANIELLE SILVEIRA MACÊDO. Orientadora: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa. Tese de Doutorado. Curso de Pós-graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2005.

Convulsões e morte são as principais conseqüências relacionadas à *overdose* de cocaína (COC). Para determinar os sistemas neurotransmissores envolvidos com as convulsões induzidas pela droga camundongos Swiss machos (20-30 g), foram pré-tratados (i.p.) 15, 30 ou 60 min antes da administração de COC 90 mg/kg com drogas que interferem com vários sistemas de neurotransmissão, observados por 30 min e avaliados quanto à latência para o início da primeira convulsão, percentagem de animais que convulsionaram e percentagem de animais que sobreviveram ao tratamento. Dentre as drogas estudadas as GABAérgicas (diazepam, fenobarbital e gabapentina) apresentaram melhor resultado, aumentando a latência para o início da primeira convulsão, reduzindo a percentagem de convulsões e morte. Das drogas dopaminérgicas, o antagonista do receptor D₁, SCH23390, melhorou os 3 parâmetros avaliados, enquanto o antagonista D₂ pimozide reduziu a latência. O antagonista muscarínico M₁, pirenzepina, reduziu a percentagem de animais que convulsionaram. A fluoxetina, um inibidor da recaptção da 5HT, reduziu a latência das convulsões e a sobrevivência, o mesmo acontecendo com o antagonista do receptor 5HT₂, mianserina. A buspirona, agonista parcial do receptor 5HT_{1A}, aumentou a sobrevivência dos animais na menor dose estudada (5 mg/kg). O NMDA reduziu a latência e a sobrevivência dos animais, enquanto a cetamina, antagonista NMDA melhorou os três parâmetros estudados. Uma redução na percentagem de animais que convulsionaram foi vista com o lítio, enquanto a vitamina E reduziu a percentagem de animais que convulsionaram e aumentou a percentagem de sobrevivência. O antagonista opióide naltrexone reduziu a latência e aumentou a morte. Observou-se que após a *overdose* de COC alguns animais apresentaram estado de mal epiléptico (EME), enquanto outros morreram após as convulsões. Assim, para a realização dos estudos neuroquímicos estes animais foram dissecados para retirada do corpo estriado (CE) e córtex pré-frontal (CPF) e divididos em dois grupos, EME e morte. Após EME ocorreu uma redução (40 %) e aumento (125 %) nos níveis de dopamina (DA), respectivamente em CE e CPF, havendo também um aumento nos metabólitos DOPAC e HVA, respectivamente em CPF e CE. Após a morte os níveis de DA reduziram (38 %) em CPF e ambos os metabólitos aumentaram em CE. As taxas metabólicas para esta monoamina aumentaram após EME no CE e após a morte no CE e CPF. O aumento no metabolismo da DA está relacionado à formação de radicais livres. A 5HT aumentou (123 %) apenas no CPF após EME, enquanto seu metabólito 5HIAA reduziu no CPF após EME e morte induzida por cocaína. A taxa metabólica da 5HT reduziu após EME no CPF e após a morte em ambas as áreas estudadas. A NA no EME diminuiu (52 %) no CE e aumentou (56 %) no CPF, enquanto na morte aumentou no CE e reduziu em CPF. O EME promoveu redução (46 %) no número de receptores D₁-símile em CE e CPF. Esta redução foi acompanhada por uma redução e aumento, respectivamente da afinidade (Kd) do receptor pelo ligante radioativo. Tanto EME como morte aumentaram (48 % em CPF e 82 % no CE) o número de receptores D₂-símile, com aumento na afinidade no CPF e redução no CE. Os receptores M₁-símile reduziram no CPF após EME e morte induzida por COC. A atividade da AChE aumentou após EME (CE) e após a morte (CE e CPF). Os receptores 5HT₂ aumentaram (em torno de 46 e 460 %, respectivamente, no CPF e CE) após EME e morte. Os receptores GABAérgicos e glutamatérgicos apresentaram a mesma alteração, com redução do número após EME nas duas áreas estudadas, e na morte apenas no CPF. Os níveis de nitrito/nitrato aumentaram em ambas condições experimentais e áreas cerebrais que no caso dos receptores GABAérgicos e glutamatérgicos. Os níveis de MDA aumentaram (46 %) no CE após a morte induzida por cocaína. Das enzimas antioxidantes a catalase teve sua atividade reduzida pela *overdose* de COC no CPF e CE e pela COC em baixas doses (10 e 30 mg/kg) apenas no CE. O pré-tratamento com diazepam levou a catalase para níveis controle. A glutatona reduzida (GSH) aumentou após a morte no CE e CPF. Os resultados mostram que as convulsões e morte induzidas por cocaína são eventos multimediados e que as áreas cerebrais estudadas, CPF e CE têm uma importante participação neste processo. O estresse oxidativo também parece estar envolvido neste mecanismo. Estes achados podem ser importantes para a determinação de um mecanismo neural para a toxicidade aguda induzida pela cocaína.

Palavras-chave: Cocaína; toxicidade aguda; convulsões; corpo estriado; córtex pré-frontal.

ABSTRACT

Pharmacological study and neurochemical alterations in striatum and prefrontal cortex of mice after convulsions and death induced by cocaine overdose. DANIELLE SILVEIRA MACÊDO. Supervisor: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa. Doctorate's thesis. Post-graduation course in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, UFC, 2005.

Seizures and death are the most important toxic consequences related to cocaine (COC) overdose. In order to determine the main neurotransmitter systems involved with cocaine-induced seizures, male Swiss mice (20-30 g) were pretreated (i.p.) 15, 30 or 60 min before COC 90 mg/kg administration with drugs that interferes with various neurotransmitter systems. The animals were observed (30 min) to determine: latency to first seizure, number of seizures, and number of deaths after cocaine overdose. Gabaergic drugs (diazepam, Phenobarbital and gabapentin) were the best ones, increasing latency to 1st seizure and decreasing cocaine-induced seizures and mortality. The D₁ receptor antagonist SCH23390 improved the three parameters observed, while the D₂ antagonist pimozide (20 mg/kg) decreased latency. Pirenzepine, a M₁ receptor antagonist decreased the number of animals that seized. Fluoxetine, an inhibitor of serotonin reuptake, decreased latency to 1st seizure and survival, and the same happened with mianserin, a 5-HT₂ receptor antagonist. Buspirone, a partial agonist of 5HT_{1A} receptor increased animals survival, while ketamine, a NMDA receptor antagonist improved all three parameters evaluated. Lithium decreased the number of animals that seized, while vitamin E decreased the number of animals that seized and also mortality. The opioid antagonist naltrexone, decreased latency and increased cocaine-induced death. It was observed that after cocaine overdose some animals presented only status epilepticus (SE), while others died after seizures. Thus, for neurochemical studies these animals were dissected, striatum (ST) and prefrontal cortex (PFC) removed, and divided in two groups, SE and death. SE decreased (40 %) and increased (125 %) DA levels in ST and PFC, respectively. There was also an increase in DA metabolites, DOPAC and HVA in PFC and ST, respectively. After death, DA levels decreased (38%) in PFC and both metabolites increased in ST. Metabolic rates for this monoamine increased after SE in ST and after death in ST and PFC. The increase in DA metabolism is related to free radicals formation. 5HT increased (123 %) only in PFC after SE, while its metabolite 5HIAA decreased in PFC after SE and death induced by cocaine. The metabolic rate for 5HT decreased after SE in PFC and after death in both areas studied. NA decreased (52 %) in ST and increased (56 %) in PFC during SE, while after death increased in ST and decreased in PFC. Dopaminergic D₁-like receptors decreased (46 %) in ST and PFC after SE. This reduction was followed by a decrease and increase, respectively, of the affinity (K_d) receptor-radioactive ligand. An increase (48 % in PFC and 82 % in ST) in D₂-like receptors number was observed and followed by an increase in affinity in PFC and decrease in ST. Muscarinic M1 receptors decreased in PFC after cocaine-induced SE and death. AChE activity increased after SE (ST) and after death (ST and PFC). Serotonergic 5HT₂ receptors increased (around 46 % and 460 %, respectively to PFC and ST) after SE and death. GABAergic and glutamatergic receptors presents the same alterations, reduction after SE in both brain areas studied and only in PFC after death. Nitrite/nitrate levels increased in all conditions determined for GABAergic and glutamatergic receptors. MDA levels increased (46 %) only after death in ST. From antioxidant enzymes, catalase had its activity decreased after cocaine overdose in ST and PFC, the same happened with cocaine in low doses (10 and 30 mg/kg), only in ST. Pretreatment with diazepam brought catalase levels to control values. Glutathione increased after death in ST and PFC. Taken together these results showed that cocaine-induced seizures and death are multimediated events and that the brain areas studied, PFC and ST are important to this brain process. Oxidative stress also seems to be involved in this mechanism. These findings may be important for determining the neural mechanisms that mediate acute cocaine toxicity.

Keywords: Seizures, cocaine-induced lethality, toxicity, prefrontal cortex, striatum.

I-INTRODUÇÃO GERAL

1 COCAÍNA

1.1 Introdução

A cocaína é obtida das folhas do arbusto da coca (*Erythroxylon coca*) (**figura I -1 A**), do qual existem variedades como a boliviana (huanaco), colombiana (novagranatense) e peruana (trujilense). A planta possui 0,5 % a 1 % de cocaína e pode ser produtiva por períodos de 30 ou 40 anos, com cerca de 4 a 5 colheitas por ano.

Esta substância possui propriedades estimulantes e é comercializada sob a forma de um pó branco cristalino, inodoro, de sabor amargo e solúvel em água, assumindo apelidos como: “coca”, “branca”, “branquinha”, “gulosa”, “Júlia”, “neve” ou “snow”. O pó (**figura I-1 B**) é obtido mediante um processo de transformação das folhas da coca em pasta de cocaína e esta em cloridrato (PLATT, 1997).

Geralmente, o cloridrato de cocaína é consumido por inalação, mas pode também ser absorvido pelas mucosas (por exemplo, esfregando nas gengivas). Além disso, pode ainda ser injetado puro ou misturado com outras drogas. Não é adequado para fumar. A cocaína é, por vezes, adulterada com o objetivo de aumentar o seu volume ou de potenciar os efeitos. Nestes casos, é misturada a substâncias como: lactose, medicamentos (procaína, lidocaína ou benzocaína), estimulantes (como anfetaminas ou cafeína) ou outras substâncias, como descrito em seção posterior (PLATT, 1997).

A droga pertence ao grupo das substâncias simpatomiméticas indiretas: provoca um aumento de neurotransmissores na fenda sináptica e um elevado estímulo das vias de neurotransmissão, nas quais a dopamina, a noradrenalina e a serotonina estão implicadas. É um estimulante do Sistema Nervoso Central (SNC), agindo sobre ele com efeito similar ao das anfetaminas. Esta substância atua especialmente nas áreas motoras, produzindo agitação intensa. No plano terapêutico, foi usada como analgésico e anestésico, sendo protótipo de parte dos anestésicos locais usados atualmente (PLATT, 1997).



a



b

Fonte: <http://www.usdoj.gov/dea/pubs/intel/99024/99024.html>. Acesso 27/06/2005

Figura I-1a. Planta *Erythroxylon coca* Shrub; **1b.** Representação do Cloridrato de cocaína

1.2 Histórico

Estudos arqueológicos mostraram que a utilização da folha da coca é muito antiga, tendo sido encontrados vestígios do seu consumo no Equador e no Peru datados de 2500 A.C. A planta *Erythroxylon coca* tem origem na América do Sul, nas regiões altas dos Andes. Foram os índios bolivianos Aymara, conquistados pelos Incas no século X, que começaram a utilizar a palavra “coca” que significa “planta”. Nos séculos XII e XIII, a coca deu origem a inúmeros confrontos, até que os Incas, em 1315, conseguiram o seu monopólio. Para este povo, a coca era uma planta medicinal e sagrada, incluída, por isso, em rituais religiosos, profecias, casamentos, funerais e nos rituais de iniciações de jovens nobres (“haruaca”). No entanto, a sua utilização não era generalizada, sendo apenas acessível à elite Inca (SIEGEL, 1982).

Com a descoberta da América, começaram a surgir atitudes contraditórias face à coca. Se por um lado a Igreja proíbe a sua mastigação, com o intuito de abolir um vício pagão, por outro, quando percebe os benefícios que poderiam advir da manutenção do seu consumo, permite que os índios trabalhem sob o seu efeito. Um édito de Felipe II da Espanha legaliza o uso da coca, generalizando seu consumo por toda a população nativa. A coca chega a tornar-se um substituto da alimentação. Neste momento, multiplicam-se as referências ao consumo de coca por viajantes e cronistas, que lhe atribuem benefícios medicinais e estimulantes. Apesar disso, os espanhóis não exploravam comercialmente este produto, ao contrário do que aconteceu com o tabaco e o quinino (SIEGEL, 1982).

Em 1580, Monardes descreve a planta da coca pela primeira vez. No entanto, esta continua a ser exclusiva da América do Sul. Apenas em 1750 é que são enviadas as primeiras plantas para a Europa pelo botânico Joseph Tussie (SIEGEL, 1982).

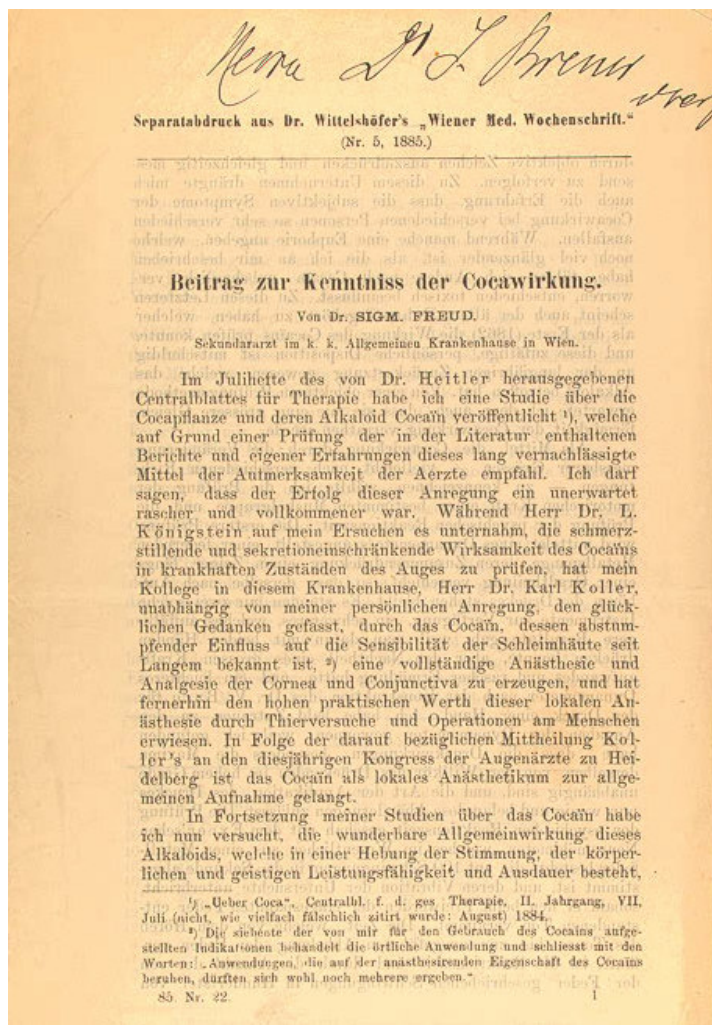
Em 1858, o químico alemão Albert Niemann reconhece as propriedades estimulantes da planta coca e nos meados de 1800 (1862) extrai a substância pura, cloridrato de cocaína. A droga foi inicialmente usada como medicamento para a astenia e diarreia num

regimento alpino por Aschenbrant, um médico militar baviero. Foi rapidamente comercializada em grande escala, passando a ser constituinte de vários produtos como o vinho tônico de Ângelo Mariani (Vin Mariani), remédios caseiros e até mesmo a Coca-Cola. Acredita-se que a fórmula original da Coca-Cola® que foi desenvolvida em 1886 pelo farmacêutico John Pemberton continha aproximadamente 2,5 mg de cocaína por 100 mL de solução (<http://cocaine.org/coca-cola/> acesso: 22/06/2005). A fórmula era vendida como cura para dor de cabeça e estimulante. A cocaína permaneceu na composição da coca-cola por 17 anos.

Nesse ínterim a cocaína passou a ser o remédio de eleição para quase todas as doenças. Personalidades como Sir Arthur Conan Doyle (criador do famoso detetive Sherlock Holmes), Júlio Verne, Thomas Edison, o Papa Leão XIII, Rei William III, Alexandre Dumas, R. L. Stevenson, dentre outros se tornam seus convictos defensores (PLATT, 1997).

Freud, após a ter experimentado e feito revisão da literatura disponível sobre o assunto, contribui para provar a ação da cocaína como anestésico local, recomendando-a inclusive para problemas como depressão, perturbações digestivas, asma, estimulante, afrodisíaco, dentre outros. (FREUD, 1884). Na medida em que se vão observando os efeitos negativos do consumo de droga e após a publicação sobre *heroinomania* de Louis Lewin, Freud (1974 - **figura I-2**) reformula a sua posição e começa a trabalhar o conceito de toxicomania, publicando também os "apontamentos sobre a ânsia de cocaína". Entre 1885 e 1890, a literatura médica apresenta mais de 400 relatos de perturbações físicas e psíquicas devido ao consumo desta substância. Dado que muitos deles se referiam a pessoas a quem tinha sido administrada cocaína como antídoto para a morfinomania, as duas drogas (cocaína e morfina), apesar de possuírem efeitos muito diferentes, começam a ser confundidas e regulamentadas, internacionalmente, de forma igual.

O uso da cocaína como anestésico local em cirurgia ocular e otorrinolaringológica generalizou-se, tendo sido, mais tarde, substituída por equivalentes mais seguros (PLATT, 1997).



Fonte: <http://www.loc.gov/exhibits/freud/freud01.html>. Acesso: 23/09/2005.

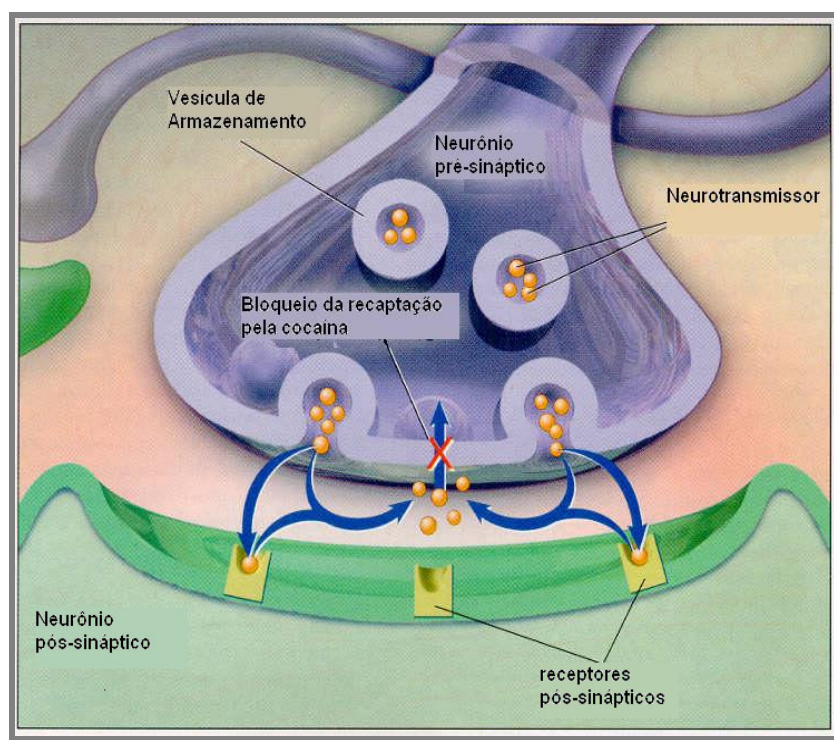
FIGURA I-2 – Parte do livro de Freud, onde o mesmo começa a trabalhar o conceito de toxicomania.

De uma maneira mais acentuada nos anos 20, verificou-se nos países ocidentais um grande aumento no consumo de cocaína por aspiração nasal. Foram necessárias medidas de controle internacionais e a Segunda Guerra Mundial para que a magnitude desta epidemia começasse a sofrer uma redução. Até os anos 70, o consumo manteve-se bastante marginal, quando a partir daí a cocaína começou a ser associada à imagem de êxito social (nos Estados Unidos). Tal fato voltou a acentuar o consumo, que se generalizou às diferentes classes sociais e teve grande aceitação entre consumidores de outras drogas como heroína, álcool ou anfetaminas, tornando-se um grave problema de saúde pública (CREGLER & MARK, 1986).

No Brasil, os anos 80 marcam o aparecimento da cocaína no mercado negro. Inicialmente como droga utilizada pela elite, mas rapidamente sofreu banalização e generalização do seu consumo. Atualmente, enquanto o uso da cocaína parece ser menos prevalente na Europa do que nos EUA, na América do Sul a cocaína é um problema importante e crescente, particularmente em países produtores de cocaína, tais como Colômbia, Peru e Bolívia (NEGRESS, 1992). O Brasil, devido à sua posição estratégica, tornou-se uma importante rota para o tráfico de cocaína e isto tem levado a uma disseminação de seu uso e ao surgimento de um importante mercado consumidor (WORLD DRUG REPORT, 2004).

1.3 Ações da cocaína no organismo

A cocaína inibe a captação de neurotransmissores, como dopamina, serotonina e noradrenalina, portanto aumentando seus níveis na fenda sináptica (**figura I-3**).



Fonte: www.ac-rouen.fr/pedagogie/equipos/svt/perso/synapse-dopamine/synapse.html. Acesso: 24/05/05

Figura I-3. Mecanismo de ação da cocaína. A cocaína inibe a recaptção de neurotransmissores como a NA, DA e 5HT, aumentando seus níveis na fenda sináptica.

A ingestão da cocaína provoca uma sensação de euforia e prazer e produz melhora das atividades motoras e intelectuais, perda da sensação de cansaço, anorexia e insônia (POLLOCK et al., 1991). Em dose exagerada (*overdose*) aparecem sintomas de irritabilidade, agressividade, delírios e alucinações. Pode ocorrer também aumento da temperatura e da pressão arterial, taquicardia e degeneração dos músculos esqueléticos. Este excesso pode levar a convulsões, falência cardíaca ou depressão respiratória, culminando com a morte (GAY, 1983).

Quando a droga é usada por via endovenosa ou respiratória os efeitos são quase imediatos, devido a não sofrer metabolismo de primeira passagem, aumentando a probabilidade de uma *overdose*. No caso da via endovenosa, além do risco de *overdose*, há também o perigo de infecção através do uso de seringas contaminadas, principalmente com o vírus da SIDA, da hepatite e de outras doenças transmissíveis (BROWN, 1992).

1.4 Dados epidemiológicos relacionados ao vício por cocaína

O Informe Mundial sobre Drogas de 2004 (WORLD DRUG REPORT 2004), mostra que a cocaína é a segunda droga-problema mais comum no mundo e a principal das Américas. Em vários países do Oeste Europeu, é a segunda ou terceira droga-problema mais comum.

Estimativas do referido Informe indicam que o consumo da cocaína afeta um número maior que 13 milhões de pessoas ou 0,3 % da população mundial com idade de 15 a 64 anos. A maior parte da cocaína continua a ser consumida nas Américas (65 %), notavelmente na América do Norte (48 %). A taxa de prevalência total do uso de cocaína nas Américas é de 1,6 %. O maior mercado da cocaína no mundo continua a ser os Estados Unidos (5,9 milhões de pessoas em 2002, o que equivale a 2,5 % da população com idade acima de 12 anos ou 3,1 % da população com idade entre 15 e 64 anos).

Os 3,3 milhões de usuários da cocaína na Europa são responsáveis por ¼ do uso global da droga (0,6 % da população com idade entre 15-64 anos). As maiores prevalências de uso da cocaína na Europa foram reportadas na Espanha (2,6 % em 2001), Irlanda (2,4 % em 2002), Reino Unido (2,1 % em 2003) e Holanda (1,1 % em 2001). O nível mais baixo de uso da droga foi visto na Ásia.

De acordo com o “I Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil” feito em 2001 usando uma amostragem de 107 cidades com mais de 200 mil habitantes o que abrange 41,3 % da população total do Brasil (ou seja, 45.045.907 pessoas), foi observado que da população estudada, 2,3 %, ou seja, 1.076.000 pessoas já haviam usado cocaína durante sua vida. Na faixa etária dos 25 aos 34 anos, 7,2 % dos entrevistados do sexo masculino já haviam experimentado a cocaína. Dentre os entrevistados, tanto homens como mulheres em todas as faixas etárias estudadas, dos 12 anos até acima de 35 anos, em torno de 45 % destes relataram ser muito fácil obter cocaína, caso desejassem. Com relação ao crack esta percentagem caiu para 35 %. Deste grupo 55 % considerou como risco grave usar cocaína/crack uma ou duas vezes na vida e quando a pergunta abordou o uso diário da droga esta percentagem subiu para quase 100 %. A prevalência de maior uso de cocaína foi na Região Sul, com 3,6 %. A região Sudeste em segundo lugar, com 2,6 % e, nas regiões Nordeste e Centro-oeste, em cada uma delas a percentagem ficou em torno de 1,4 %. A menor percentagem foi de 0,8 % na Região Norte onde foi observado um maior consumo de merla, uma forma de cocaína que é fumada. Observou-se neste estudo o predomínio de uso da cocaína entre homens (CARLINI et al., 2002).

Com relação à cidade de São Paulo é estimado que 1,7 % da população geral e 10 % daqueles com idade entre 18 e 28 anos já tenham usado cocaína (GALDURÓZ et al., 2000). A maioria dos pacientes que se apresenta nos serviços para tratamento contra o abuso de drogas são usuários de cocaína. Até a década de 80 a forma de cocaína utilizada era predominantemente o pó, mas na década de 90 ocorreu uma explosão do uso de crack (DUNN, 1999). Os usuários de cocaína em tratamento são pessoas jovens, solteiras, principalmente do sexo masculino com baixo grau de escolaridade. Com relação à via de administração, 61 % deles fumam crack, 37 % cheiram o pó da cocaína, e 2 % usam a droga na forma injetável (FERRI et al., 2004).

Nos Estados Unidos os números são mais precisos porque no Brasil, não existem dados das incidências de casos emergência por *overdose* da droga. Nos EUA em 2002 as estimativa mostravam 1,5 milhões de americanos classificados como dependentes da droga ou abusando da mesma durante os últimos 12 meses de acordo com o *U.S. Department of Health and Human Services*. A mesma pesquisa estima a existência de 2 milhões de usuários. O uso constante aumentou durante os anos 90 chegando a 1,2 milhões em 2001. Os adultos entre 18 e 25 anos são os usuários mais freqüentes e destes a maioria são homens. Os dados do Alerta sobre drogas de abuso nos EUA (*DAWN- DRUG ABUSE WARNING NETWORK, 2002*) mostraram que as emergências devido ao uso da cocaína aumentaram em 33 % entre 1995 a 2002, subindo de 58 para 78 ocorrências por 100.000 habitantes.

Muitas pessoas continuam a usar a droga apesar das severas penas associadas ao porte e venda da cocaína (FISCHMAN, 1987). Conseqüentemente, o uso da cocaína é freqüentemente associado ao crime. De fato, alguns estudos mostram que cerca de 70 % dos presos em cadeias estão nesta condição por episódios relacionados a drogas (STEWART, 1990), sendo a cocaína a mais utilizada entre os presos tanto do sexo masculino como feminino (FEUCHT, 1995).

1.5 Reações adversas ocasionadas pelo uso da cocaína

A cocaína pode provocar uma variedade de efeitos adversos. Até mesmo em baixas doses, alguns usuários referem efeitos como inquietação, palpitações e ansiedade. Em altas doses, sinais e sintomas mais severos se desenvolvem, tais como hipertensão, tremores, hiperatividade, hiperreflexia, arritmias cardíacas e convulsões (BENOWITZ, 1993). A morte pode ocorrer por hemorragia cerebral ou infarto cardíaco ou cerebral (CALLAWAY & CLARCK, 1994; DAVIS & SWALWELL, 1996). As vias injetáveis e fumo de crack são associadas ao rápido início de ação e a liberação de bolus da droga para o cérebro e outros órgãos. Estas vias são mais associadas a reações adversas agudas (POTTIEGER et al., 1992). Em um estudo sobre reações adversas por drogas estimulantes (pó da cocaína, anfetaminas e ecstasy) em uma amostra de viciados não submetidos a tratamento em Londres (WILLIAMSON et al., 1997), cerca de ¼ dos indivíduos que haviam usado cocaína na forma de pó reportaram terem tido má experiência com a droga e em 16 % esta experiência havia

sido no último ano. As experiências mais comuns foram perda de apetite, ataques de pânico, paranóia e sensação de desmaio.

1.6 *Overdose* de cocaína

Overdose significa o uso de qualquer droga em quantidades tais que efeitos adversos agudos físicos e mentais ocorram. Ela pode ser deliberada ou acidental, fatal ou não fatal. A overdose *de* cocaína constitui uma emergência médica. O paciente pode apresentar psicose aguda ou comportamento maníaco, incluindo paranóia, pânico, agitação. Alucinações táteis e visuais também podem ocorrer. Os sintomas físicos da *overdose* podem ser neurológicos (tremores grosseiros e convulsões), cardiovasculares (taquicardia e contração ventricular prematura que podem levar a fibrilação ventricular, ou efeitos tóxicos diretos da cocaína no miocárdio podem levar a uma falência cardíaca), ou respiratórios (edema pulmonar e colapso respiratório). Hipertermia, coma e paralisia flácida também podem estar presentes (PLATT, 1997).

A princípio a *overdose* era considerada como sendo um evento raro, mas parece que sua ocorrência está aumentando. Por exemplo, em São Francisco nos EUA, as convulsões associadas com *overdose* de cocaína sofreram um incremento de 4 % quando relacionadas a todas as convulsões associadas com o envenenamento e intoxicação por drogas em 1981 para 23 % no período de 1988 a 1989 (OLSON et al., 1994). POTTIEGER et al. (1992) relataram que a *overdose* por cocaína foi muito comum em uma amostra combinada de usuários da droga em tratamento e não-tratados (usuários de rua): 40,3 % já havia apresentado pelo menos um episódio de *overdose*, 26,6 % pelo menos 2; 17,6 % pelo menos 3 e 10,3 % 4 ou mais vezes. Estas taxas foram mais altas em usuários não tratados. Com relação ao uso do *crack* 11 % dos usuários em tratamento e 25,5% dos usuários de rua relataram terem constantemente episódios de overdose. Para os que cheiram a droga estas percentagens foram alteradas para 5,2 e 55,8 %, respectivamente. No caso dos usuários por via intravenosa os números subiram para 14,5 e 64 % respectivamente para os usuários em tratamento e usuários de rua (PLATT, 1997). A overdose por cocaína é dose-relacionada, mas não dose-específica, com grandes variações dependendo da via de administração e características do paciente. O uso oral pode resultar em menor toxicidade do que o inalatório, injetável e o fumado, devido à rápida hidrólise da droga no estômago (GAY, 1982).

A impureza da droga vendida na rua pode contribuir para o desenvolvimento da overdose, visto que o usuário precisará de doses adicionais da droga para conseguir o efeito desejado. A curta duração de ação da droga e como resultado desta curta ação um aumento no número de administrações também aumentam o risco de *overdose* por erro na quantidade de droga administrada (POTTIEGER et al., 1992).

O uso de uma série de doses pequenas de cocaína abaixo do limiar da convulsão pode resultar nos mesmos sintomas desencadeados pelo uso de altas doses. Este fenômeno é denominado *kindling* ou abrasamento e é observado principalmente com relação ao desenvolvimento de convulsões (POST et al., 1976; POST & KOPANDA, 1976).

Com relação à morte relacionada à cocaína, quando esta ocorre é de forma relativamente rápida e imprevisível (SMART & ANGLIN, 1987). Deve-se ressaltar que a cocaína tem um baixo índice terapêutico (GAY, 1981).

1.7 Adulterantes presentes na cocaína vendida nas ruas e sua relação com os efeitos colaterais da droga

Um outro aspecto importante com relação à ocorrência de convulsões são os adulterantes presentes nas drogas de rua. No Brasil, bem como em outros países a cocaína de rua é comumente vendida no mercado ilícito como um pó branco, contendo cloridrato de cocaína e várias outras substâncias. Alguns contaminantes derivados do refino também são encontrados. No mercado ilícito a cocaína é raramente encontrada como droga 100 % pura (BARRIO et al., 1997; FUCCI & GIOVANNI, 1998; BARMEJO-BARRERA & BERMEJO-PARRERA, 1999). Estes produtos de adulteração podem causar reações inesperadas em pacientes intoxicados, as quais podem ser fatais (SHANNON, 1988).

Entre os adulterantes encontrados são geralmente adicionados pós-brancos, dentre os quais os anestésicos locais como a lidocaína são os mais comuns, provavelmente adicionados para mimetizar o efeito anestésico local da cocaína. Em um estudo que analisou a composição da cocaína ilícita, foi observado que das 634 amostras analisadas, 211 também

continham lidocaína e outros anestésicos locais (BROWN & MALONE, 1976). Uma outra investigação determinou que 29 % das 3000 amostras analisadas continham lidocaína (CUNNINGHAM et al., 1984). A presença de lidocaína pode sensibilizar o coração e induzir arritmias e depressão cardíaca (SHANNON, 1988; DERLET et al., 1991). Estudos de casos clínicos em humanos documentaram comportamento bizarro, psicose aguda e mortes atribuídas à ingestão de lidocaína e cocaína simultaneamente (WETLI & FISHBAIN, 1985). Nestes casos quando houve morte, os níveis de cocaína estavam abaixo daqueles que produzem *overdose* (BROWN & MALONE., 1976). A presença de lidocaína também pode produzir ou potencializar convulsões e outros problemas quando usada em grandes quantidades, da mesma forma que a cocaína.

Efeitos aditivos ou sinérgicos podem aparecer quando estas duas drogas são utilizadas em associação (DERLET et al., 1991). Este estudo foi confirmado por BARAT & ABDEL-RAHMAN (1996), que administraram injeções intravenosas de cocaína 5 mg/kg e lidocaína 5 mg/kg sozinhas e em associação e observaram que nestas doses quando administradas sozinhas as drogas não causavam convulsão, mas quando associadas produziam convulsão semelhante à da administração de cocaína 20 mg/kg sozinha. Estes pesquisadores concluíram que esta potencialização ocorre em parte pela depressão de mecanismos inibitórios de neurotransmissão.

A presença de outros contaminantes como cafeína foi estudada em amostras na Espanha (LOPES-ARTIGUEZ et al., 1995). A presença desta droga pode potencializar efeitos neuropsiquiátricos e cardiovasculares. Outros adulterantes como carbonatos e bicarbonatos, açúcares, dentre outros também foram encontrados. Em um trabalho recente BERNARDO et al. (2003), foi traçado o perfil dos contaminantes em amostras apreendidas pela polícia entre Janeiro e Dezembro de 2001 em Minas Gerais. Resultados positivos foram obtidos em 88,9 % das amostras, das quais cafeína foi encontrada em 50,2 % e lidocaína em 65 % dessas amostras, vale ressaltar que uma delas continha 92 % de lidocaína. Carbonatos e bicarbonatos foram encontrados em 41,2 e 51,2 %, respectivamente das amostras apreendidas e açúcares como glicose, sacarose e frutose foram encontrados em 11,5; 14,8; 6,2 e 3,3 % das amostras, respectivamente.

2 Convulsões e estado de mal epiléptico

Crises convulsivas por definição são descargas sincrônicas, de grande intensidade (paroxísticas) e excessivas de um grupo de neurônios (MELDRUM & CHAPMAN, 1999). Estas podem ser classificadas clinicamente em duas categorias: parciais e generalizadas (**Quadro I-1**). Esta classificação simples provou ser extremamente útil para os clínicos, pois a efetividade das medicações anticonvulsivantes depende do tipo de convulsão. As crises do tipo parcial originam-se em um grupo pequeno de neurônios que constituem o foco da convulsão. Desta forma a sintomatologia depende da localização do foco no cérebro. Estas crises podem ser do tipo parcial simples (sem alterações na consciência) ou parcial complexa (com alterações na consciência). As crises podem ter início focal e posteriormente generalizarem (envolverem o cérebro como um todo), sendo nestes casos chamadas crises parciais complexas com tônico-clônicas secundárias. As crises generalizadas envolvem os dois hemisférios cerebrais desde seu início. Elas podem ser divididas em convulsivas e não convulsivas dependendo se a crise é associada com movimentos tônicos/clônicos ou não, respectivamente. Um exemplo das não convulsivas é a crise de ausência típica ou pequeno mal onde o paciente cessa a atividade motora, acompanhado de perda da consciência.

As crises generalizadas podem consistir apenas de movimentos motores (mioclônicos, clônicos ou tônicos) ou uma abrupta perda do tônus (atonia). Porém, a crise generalizada mais comum é a tônico-clônica também chamada de grande mal. Estas crises convulsivas iniciam abruptamente com um grito ou grunhido, freqüentemente com contração tônica do diafragma e tórax e desenvolvimento de uma expiração forçada. É durante esta fase (tônica) que o paciente pode cair chão perder o controle dos esfíncteres e ficar cianótico. Esta fase tem duração aproximada de 30 s. Após esta fase ocorrem clonias das extremidades durando 1 a 2 min (WESTBROOK et al., 2000).

Quadro I-1 Classificação Internacional das Crises Epilépticas

I. Crises Parciais (focais)
A. Crise parcial simples (com sintomas motores, sensoriais, autonômicos ou psicológicos)
B. Crise parcial complexa
C. Crise parcial complexa com generalização secundária
II. Crises Generalizadas (convulsivas ou não convulsivas)
A. Ausência
1. Típica (pequeno mal)
2. Atípica
B. Mioclônicas
C. Clônicas
D. Tônicas
E. Tônico-clônicas (grande-mal)
F. Atônicas
III. Não Classificadas

Fonte: WESTBROOK, G. L. In: Kandel et al.,2000

A primeira descrição na história do que poderia ser um caso de estado de mal epiléptico (EME) pode ser encontrada nas 25ª e 26ª tábuas do Sakikku cuneiforme datando de 718-612 AC. O EME descrito neste período geralmente consistia em convulsões tônico-clônicas generalizadas (EME por crises generalizadas, ou EMECG). Descrições esporádicas de outras formas de EME apareceram, mas foram realmente descobertas após o advento do eletroencefalograma (EEG). EMECG foi reconhecido rapidamente como uma emergência médica, enquanto as outras formas foram agrupadas juntamente com o EME não convulsivo (EMENC). Isto deu origem à primeira classificação prática de EME: EMECG e EMENC. Esta classificação logo foi considerada inadequada. Ela agrupava EME consistindo em crises de ausência ou pequeno mal e EME decorrente de crises parciais complexas ambas podendo levar a estados clínicos similares. No Colóquio de Marselha em 1962, a definição tradicional de EME foi ampliada para convulsões epilépticas que eram tão prolongadas ou repetidas para

consistir em um estado epiléptico durável e fixado. Esta definição implicava que existiam tantos tipos de EME como existiam tipos de crise e que as classificações de EME deveriam ser similares às das crises. O dicionário da Organização Mundial de Saúde define EME como “uma condição caracterizada por descargas elétricas que são suficientemente prolongadas ou repetidas a intervalos curtos de forma a produzir uma crise duradoura e invariável”. Esta definição foi modificada na versão de 1981 da classificação internacional como uma condição na qual “uma crise que persiste uma quantidade suficiente de tempo ou é repetida a uma frequência suficiente para que a recuperação entre os ataques não ocorra”.

Existem algumas controvérsias em relação à exata definição de EME, SHORVON (2000) sugeriu que a crise deveria durar 30 a 60 min para ser considerado EME. Alguns trabalhos sugerem um tempo de corte de 30 min. DELORENZO et al. (1995) compararam pacientes com crises que duraram entre 10 e 29 min com aqueles nos quais as crises duraram mais que 30 min e concluíram que crises mais curtas são mais fáceis de controlar e têm uma mortalidade mais baixa. SHINNAR et al., 2001 identificaram uma sub-população de crianças predispostas a convulsões prolongadas (>30 min) e concluíram que seus dados dão suporte para o início do tratamento 5-10 min após o início de qualquer crise, mas mantiveram o tempo de corte de 30 min da definição de EME. LOWENSTEIN et al. (1999) argumentaram que basear uma definição de EME em início de lesão neuronal é questionável. Como crises isoladas raramente duram mais que poucos minutos, eles propuseram a revisão do tempo de corte operacional do EME para 5 min no adulto.

Segundo WARNER-SMITH (2001) o EME duradouro, ou seja, maior que 30 a 45 min leva a várias complicações, incluindo lesão neuronal. Estas lesões ocorrem principalmente como consequência da excitotoxicidade do glutamato (WARNER-SMITH, 2001). Modificações fisiológicas no estado de mal epiléptico generalizado podem ser subdivididas em: recentes (0-30 min)- durante esta fase, o metabolismo cerebral é aumentado, mas os mecanismos fisiológicos são suficientes para compensar esta demanda, desta forma o tecido está protegido contra hipóxia e dano metabólico; tardias (após 30 minutos) - os mecanismos fisiológicos são insuficientes para impedir a lesão, o que leva a uma alteração metabólica por hipóxia do tecido cerebral (SHORVON , 2000).

O mecanismo para a ocorrência do EME ainda não está elucidado. Sabe-se que ocorre uma falha nos mecanismos fisiológicos de finalização das crises. Embora algumas modificações bioquímicas que ocorrem no EME sejam conhecidas, por exemplo, perda da sensibilidade do receptor GABA_A ou acentuação da excitação glutamatérgica, ainda faltam dados experimentais. Especula-se que a adenosina está sendo especulada como tendo alguma ação na finalização do EME.

2.1 Convulsão e estado de mal epilético induzidos por cocaína

Um aspecto importante com relação às drogas de abuso e também referente especificamente à cocaína é a incidência cada vez maior nas emergências, de pacientes com quadro de convulsão e estado de mal epilético (EME) (HANSON et al., 1999).

Em pelo menos um estudo (LOWENSTEIN et al., 1987), convulsão e EME representaram as principais complicações do uso de cocaína. O'DELL et al. (2000) também enfatizaram que além de seu poder em causar vício o abuso da cocaína está associado a consequências tóxicas, incluindo convulsão e morte. O aparecimento de convulsões e EME pode ser em parte devido à redução no limiar da convulsão produzida pela cocaína (JONSSON et al., 1983; RITCHIE & GREENE, 1990), ou pode ocorrer secundariamente aos eventos cardíacos induzidos pelo SNC (MITTLEMAN & WETLI, 1984), ou também como resultado das febres altas induzidas pela droga (ROBERTS et al., 1984).

De modo geral, as convulsões induzidas por cocaína se manifestam como ataques tônico-clônico generalizados e EME capaz de produzir modificações epileptogênicas, lesão neurológico e psiquiátrico duradouro e morte (KRAMER et al., 1990; DHUNA et al., 1991; BENOWITZ, 1993). As convulsões podem ocorrer após um uso recreacional de baixas doses, bem como após episódios de *overdose* (KRAMER et al., 1990; DHUNA et al., 1991) e geralmente produzem EME que ocorre em minutos após a administração da droga através das vias endovenosa, nasal ou inalatória; pela via oral o tempo é pouco previsível (SCHRANCK, 1993).

O EME causado pela cocaína é de difícil controle e pode ser fatal (CAMPBELL, 1988; ROTH et al., 1988). Além disso, a droga pode causar outros tipos de ataques, alguns dos quais até nem parecem convulsões à primeira vista. Comportamento bizarro, confusão, incoerência, movimentos repetitivos incontroláveis dos braços ou pernas ou boca, e outros movimentos estranhos no corpo podem ser resultados de descargas elétricas focais em áreas específicas do cérebro (MERRIAM et al., 1988).

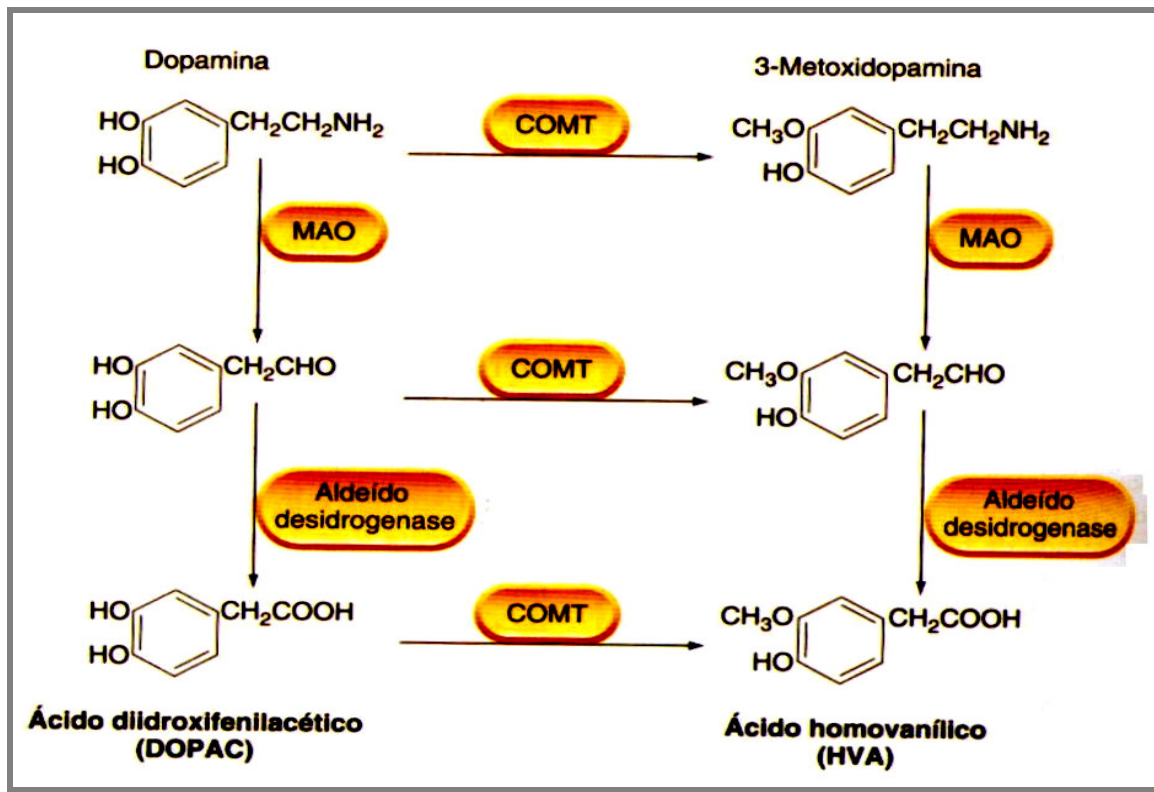
2.2 Neurotransmissão monoaminérgica e seu envolvimento nos processos convulsivos

2.2.1 Síntese, receptores e funções das monoaminas

As monoaminas, compostos que possuem apenas um grupamento amina, compreendem a noradrenalina (NA), dopamina (DA) e serotonina (5HT).

Dentre as monoaminas, as catecolaminas, substâncias que possuem um núcleo catecol (anel benzeno com dois grupamentos hidroxil adjacentes) e uma cadeia lateral de etilamina ou um de seus derivados (FELDMAN et al., 1997), como noradrenalina (NA) e dopamina (DA), são sintetizadas a partir do aminoácido aromático L-tirosina. Duas reações transformam tirosina em DA: a primeira é catalisada pela enzima tirosina hidroxilase (TH) a qual converte tirosina em L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). A TH é considerada a enzima limitante nesta síntese (FELDMAN et al., 1997). O segundo passo é a descarboxilação da DOPA, catalisada pela enzima DOPA descarboxilase, a qual produz DA que sofre ação da dopamina β -hidroxilase para tornar-se NA. Após serem sintetizadas as catecolaminas se difundem pela fenda sináptica e podem ser catabolizadas pelas enzimas monoamina oxidase (MAO) e catecol o-metil transferase (COMT) que estão amplamente distribuídas no corpo e SNC. A MAO está localizada na parte externa da membrana mitocondrial (COSTA & SANDLER, 1972) e pela sua localização intracelular, tem um papel estratégico na inativação das catecolaminas que estão livres na fenda sináptica. A COMT age nas catecolaminas extraneuronais. Os metabólitos produzidos pela ação destas enzimas são: o

ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA), sendo este último o principal metabólito da DA (Figura I-4).



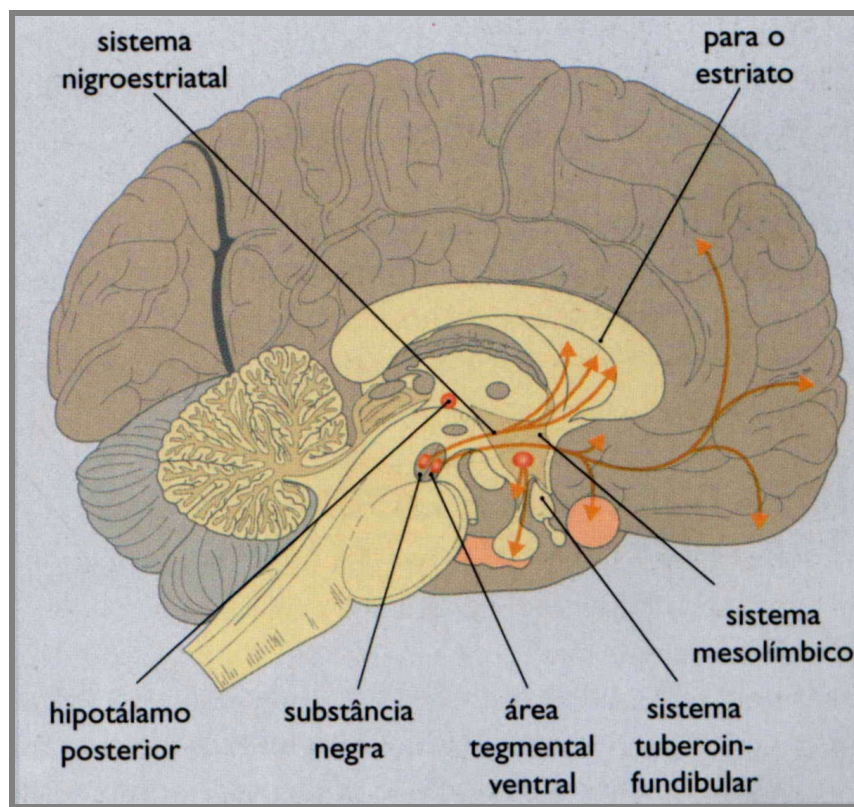
Fonte: RANG et al., 2004

Figura I-4. Principais vias do metabolismo da dopamina no cérebro (MAO, monoamina oxidase; COMT, catecol- o-metiltransferase).

O processo de captação das monoaminas foi originalmente descrito por AXELROD (1971) e é de suma importância para a finalização da ação do neurotransmissor na fenda sináptica. A captação é mediada por um carreador ou transportador localizado no lado externo do neurônio catecolaminérgico, e é saturável, obedecendo a cinética de Michaelis-Menten. Um processo de transporte seletivo para NA é encontrado apenas nos neurônios noradrenérgicos, enquanto um transportador com especificidade diferente é encontrado nos neurônios dopaminérgicos. Estes transportadores fazem parte de uma grande família de neurotransportadores (AMARA & KUHAR, 1993). O processo de captação é dependente de energia, desde que ele pode ser inibido pela incubação a baixas temperaturas

ou por inibidores metabólicos. O processo depende de um gradiente de Na^+ e de Cl^- . Este transporte pode ser inibido por drogas como os antidepressivos e a cocaína.

A DA constitui cerca de 80 % do conteúdo de catecolaminas no cérebro. Projeções originárias de áreas cerebrais que sintetizam este neurotransmissor originam quatro vias axonais: (1) Nigro-estriatal; (2) mesolímbica; (3) mesocortical e (4) tuberoinfundibular (**Figura I-5**).



Fonte: KERWIN et al. In: Page, 1999

Figura I-5. Principais vias dopaminérgicas no SNC

As projeções que constituem a via nigroestriatal originam-se de neurônios sintetizadores de DA do mesencéfalo e substância negra pars compacta (SNpc) que inervam o estriado dorsal (caudado-putamen). A via nigroestriatal está envolvida no controle dos movimentos e sua degeneração leva a doenças como a doença de Parkinson (GERFEN, 1992; LANG & LOZANO, 1998). A via mesocortical origina-se na área tegmentar ventral (ATV) e inerva diferentes regiões do córtex frontal. Esta via parece estar envolvida em alguns aspectos do aprendizado e memória (LE MOAL & SIMON, 1991; FELDMAN et al., 1997). A via

mesolímbica origina-se na ATV e inerva o estriado ventral (núcleo accumbens), o tubérculo olfatório e partes do sistema límbico (FELDMAN et al., 1997). Esta via foi implicada no comportamento motivacional (KOOB & BLOOM, 1988; KOOB, 1992). A via tuberoinfundibular inicia a partir de células dos núcleos arqueado e periventricular do hipotálamo (FELDMAN et al., 1997). As projeções desta via alcançam a eminência média do hipotálamo onde ocorre liberação de DA nos espaços perivasculares do plexo capilar do sistema hipotalâmico-hipofisário. Por esta via a DA é transportada para a hipófise anterior onde atua inibindo a liberação de prolactina.

A DA exerce suas ações ao se ligar a receptores de membrana específicos (GINGRICH & CARON, 1993). Estes receptores podem ser de 5 tipos subdivididos nas subfamílias D₁-símile (D₁ e D₅) e D₂-símile (D₂, D₃ e D₄), com base em suas propriedades bioquímicas e farmacológicas (**Quadro I-2**), enquanto os efeitos da NA são mediados por receptores dos tipos α e β . Os camundongos que não apresentam estes receptores apresentam significantes déficits fisiológicos. Como, por exemplo, animais *knockout* para receptor D₁, apresentam hiperlocomoção e propriedades estriatais alteradas. Os *Knockout* para receptor D₂ apresentam os movimentos comprometidos e para o receptor D₃ hiperlocomoção. No caso dos receptores β os animais *Knockout* para receptor β_1 morrem prematuramente após o nascimento e os sobreviventes apresentam respostas cardiovasculares alteradas. Os receptores pós-sinápticos dos neurônios recebem informações dos transmissores liberados de um outro neurônio (pré-sináptico).

Quadro I-2 Propriedades e localizações dos subtipos de receptores dopaminérgicos

	D₁	D₅	D_{2S}/D_{2L}	D₃	D₄
Aminoácidos	446	477	415/444	400	387
Cromossomo	5	4	11	3	11
Vias Efetoras	↑ AMPc	↑ AMPc	↓AMPc ↑ canais K ⁺ ↓canais Ca ²⁺	↓AMPc	↓AMPc ↑ canais K ⁺
Distribuição do RNAm	Caudado-putamen; Núcleo accumbens; Tubérculo olfatório	Hipocampo; Hipotálamo;	Caudado putamen; Núcleo accumbens; Tubérculo olfatório	Tubérculo olfatório; Hipotálamo; Núcleo accumbens	Córtex frontal; Medula; Mesencéfalo

Fonte: KUHAR et al. In: Siegel et al., 1999

Os receptores dopaminérgicos estão envolvidos em importantes ações, como comportamento estereotipado e hiperlocomoção. Também podemos citar seu envolvimento em doenças como a esquizofrenia, que é causada principalmente pela superestimulação de receptores D₂. O bloqueio destes receptores pode levar à doença de Parkinson ou discinesia tardia. Os ligantes destes receptores facilmente discriminam as subfamílias D₁- e D₂-símile porém a maioria deles não diferencia claramente os diferentes membros de uma mesma subfamília.

Os receptores noradrenérgicos existentes no cérebro são receptores β_1 e β_2 os quais não podem ser diferenciados em termos de função fisiológica. A densidade do receptor β_1 varia em diferentes áreas cerebrais, diferentemente do que acontece com os receptores β_2 que estão restritos à glia e vasos sanguíneos.

A serotonina é sintetizada a partir do aminoácido L-triptofano após sua captação do sangue para o cérebro. A fonte primária do triptofano é a dieta. O triptofano é convertido a 5-hidroxitriptofano pela ação da triptofano hidroxilase, enzima sintetizada no corpo celular dos neurônios do núcleo da rafe. A enzima descarboxilase converte então o 5-hidroxitriptofano em serotonina (5-hidroxitriptamina – 5HT). A serotonina é metabolizada pela MAO dando origem ao ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA).

Este neurotransmissor após sua síntese é armazenado em vesículas e liberado por exocitose para interagir com seus receptores. A serotonina pode se ligar a 14 receptores que são agrupados em famílias (FRAZER & HENSLER,1999):

- A família 5HT₁ compreende os receptores 5HT_{1A}, 5HT_{1B}, 5HT_{1D}, 5ht_{1E} e 5ht_{1F} que são acoplados à proteína G inibitória, produzindo inibição da atividade da adenililciclase e abertura dos canais de potássio, o que resulta em hiperpolarização.

- A família 5HT₂ inclui os receptores 5HT_{2A}, 5HT_{2B} e 5HT_{2C} (formalmente 5HT_{1C}). Estes estimulam a fosfolipase C específica para os fosfoinositídeos.

- O receptor 5HT₃ pertence à superfamília dos receptores ligados a canais iônicos, causando uma rápida despolarização nos neurônios.

- As famílias 5HT₄, 5ht₆ e 5HT₇ são incluídos na família acoplada positivamente à adenilciclase. Uma nova família de receptores serotoninérgicos 5ht_{5A} e 5HT_{5B} ainda possui o mecanismo efetor desconhecido.

Os subtipos de receptores serotoninérgicos possuem localizações diferentes no SNC; os receptores 5HT_{1A} localizam-se principalmente no hipocampo, septo, amígdala, hipotálamo e neocórtex. Este receptor está localizado em alta densidade no corpo celular de neurônios serotoninérgicos nos núcleos da rafe dorsal e medial onde fazem a função de autoreceptores modulando a atividade de neurônios serotoninérgicos. Os subtipos 5HT_{1B} e 5HT_{1D} estão localizados nos núcleos da base particularmente no globo pálido e substância negra. Os receptores 5HT_{2A} estão localizados em áreas corticais, particularmente no córtex frontal, também estão localizados no claustrum, núcleos da base e núcleo olfatório. Os receptores 5HT₄ estão localizados em grande concentração no corpo estriado, substância negra e tubérculo olfatório e hipocampo e indiretamente medeiam o aumento da liberação de DA estriatal. O receptor 5HT₇ está localizado no córtex, septo, tálamo, hipotálamo, amígdala (FRAZER & HENSLER,1999).

A serotonina está envolvida em praticamente todo tipo de comportamento tais como, apetitivo, emocional, motor, cognitivo e autonômico. Por suas ações os neurônios

serotonérgicos e receptores são alvos para uma ampla variedade de drogas, como antidepressivos, antipsicóticos, antimigranosos e envolvidas no tratamento de náusea e vômitos entre outros.

2.2.2 Envolvimento das monoaminas nas convulsões

A habilidade dos neurotransmissores monoaminérgicos na regulação das convulsões foi primeiramente observada por CHEN et al. (1954). Desde suas observações iniciais, pesquisas substanciais têm dado suporte à teoria de que os sistemas noradrenérgico e serotonérgico exercem efeitos inibitórios na atividade convulsivante.

Os sistemas noradrenérgico e serotonérgico no SNC parecem regular a atividade convulsiva em uma relação inversa à concentração de NA e 5HT. Quando os principais nervos noradrenérgicos do loco cerúleo (*locus coeruleus*, LC) são lesionados, a sensibilidade à convulsão por vários agentes convulsivantes é aumentada (CORCORAN et al., 1974; MASON & CORCORAN, 1979; TROTTIER et al., 1988; SULLIVAN & OSÓRIO, 1991). O inverso também é verdadeiro, ou seja, quando a neurotransmissão noradrenérgica é aumentada devido a uma estimulação elétrica do LC, a atividade convulsivante desencadeada por agentes convulsivos é reduzida (SEGAL & BLOOM 1974; LIBET et al., 1977; SULLIVAN & OSÓRIO, 1991; MISHRA et al., 1994). A serotonina parece modular a atividade convulsivante do mesmo modo que a NA, ou seja, níveis aumentados de 5HT reduzem a severidade das convulsões induzidas pelo eletrochoque máximo ou agentes quimioconvulsivantes (BUTTERBAUGH & LONDON, 1977; PASINI et al., 1992; PRENDIVILLE & GALLE, 1993; SALGADO & ALCADHI, 1995), porém a redução dos níveis de serotonina tem efeitos variáveis na atividade convulsivante (BROWNING et al., 1978). Portanto, pesquisas dão suporte à teoria de que o aumento da suscetibilidade à convulsão pode provir de uma redução dos níveis de NA e 5HT.

Os neurônios noradrenérgicos no LC sofrem ativação nas convulsões induzidas por sons, pentilenotetrazol (PTZ), eletrochoque máximo, ácido caínico, *kindling* da amígdala, dentre outros (SZOT et al., 1996; EELLS et al., 1997; SILVEIRA et al., 1998a, 1998b, 2000), evidenciados por estudos da expressão do *fos* (gene envolvido com respostas recentes, sendo bons marcadores para ativação neuronal). Estudos de microdiálise *in vivo*, também

evidenciaram aumento de NA durante convulsões em animais normais e redução de NA em animais submetidos ao *kindling* ou geneticamente predispostos à convulsão (BENZON et al., 1990, YAN et al., 1993). Estes resultados mostram que os neurônios NA disparam durante o início da convulsão e/ou propagação. Além do mais, alterações na síntese e liberação da NA que ocorrem após a convulsão podem afetar o número e severidade das convulsões recorrentes. Existe uma controvérsia com relação a esta monoamina, pois apesar dos estudos mostrarem uma ação anticonvulsivante da NA o tratamento com antidepressivos que aumentam os níveis desta monoamina mostram efeitos proconvulsivantes (PETERSON et al., 1985; APPLGATE et al., 1986). O mesmo ocorre em relação à 5HT, onde pesquisas recentes mostram que o uso de antidepressivos que aumentam os níveis de 5HT têm como efeito adverso, no caso de *overdose*, o surgimento de convulsões (ZIEN OWICZ et al., 2004).

O papel do sistema dopaminérgico na regulação da atividade convulsivante permanece difícil de determinar (SZOT et al., 1996). Mas, certamente este sistema se comporta de forma diferente do observado com o noradrenérgico. As convulsões induzidas por uma série de agentes convulsivantes não aumentam a expressão do *c-fos* em neurônios dopaminérgicos (WHITE & PRICE, 1993, APPLGATE et al., 1995, SZOT et al., 1997). A falta da expressão do *c-fos* em resposta às convulsões nos neurônios dopaminérgicos sugere que estes não são estimulados imediatamente após uma convulsão. A DA no SNC se liga a dois principais tipos de receptores: D₁-símile e D₂-símile. Com relação a estes, drogas que antagonizam o receptor D₂ como haloperidol produzem um profundo efeito proconvulsivante (OGREN & PAKH, 1993). Agonistas do receptor D₁ mostram efeito proconvulsivante em muitos modelos de convulsão, inclusive no das convulsões induzidas por pilocarpina (BARONE et al., 1991). Em contraste, agonistas do receptor D₂ como quinpirole e lisurida mostram atividade anticonvulsivante que é bloqueada por antagonistas deste receptor (AL-TAJIR & STARR, 1991).

2.3 Neurotransmissão colinérgica e seu envolvimento nos processos convulsivos

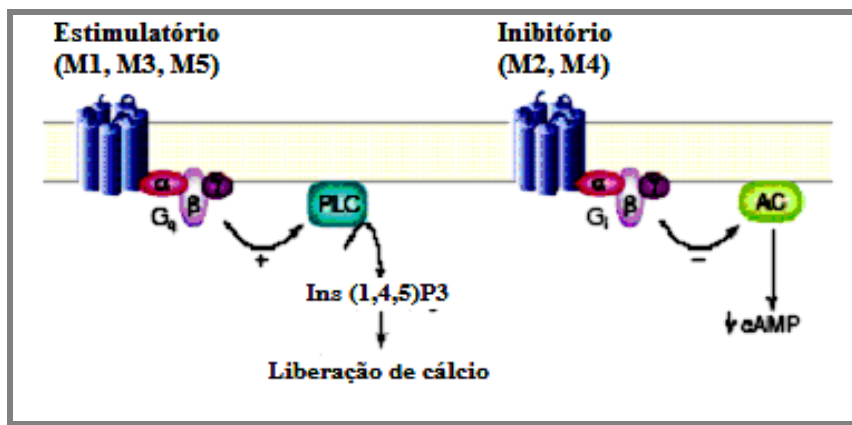
2.3.1 Síntese, receptores e funções da acetilcolina

A acetilcolina (ACh) é formada a partir da colina presente no plasma que é captada por mecanismos de captação por um carreador específico, semelhante ao que opera para muitos transmissores. A diferença é que esse carreador transporta o precursor da acetilcolina, colina, e não a acetilcolina, de modo que não é importante no término da ação do transmissor (PARSONS et al., 1993). A colina livre no interior da terminação nervosa é acetilada por uma enzima citosólica a colina acetiltransferase (ChAT), que foi primeiramente descoberta em uma preparação livre de células em 1943 e posteriormente foi purificada e clonada (WU & HERSCH, 1994). A ChAT transfere o grupo acetila da acetil-CoA proveniente do piruvato formado da glicose, sendo transformada em ACh. A ACh é transportada para as vesículas nas terminações nervosas e após liberação na fenda sináptica pode se ligar a receptores colinérgicos dos tipos nicotínico e muscarínico.

Os receptores nicotínicos têm como ligante a nicotina, são acoplados a canais iônicos dependentes de sódio e podem ser de dois tipos: N₁ e N₂. Os receptores N₁ (nicotínicos neuromusculares) estão presentes na junção neuromuscular mostram seletividade para o feniltrimetilamônio como agonista, produzem despolarização da membrana em presença de agentes biquaternários como o decametônio, são antagonizados pela d-tubocurarina e podem ser dos subtipos juncional $[(\alpha_1)_2\beta\epsilon\delta]$ e embriônico $[(\alpha_1)_2\beta\gamma\delta]$. Os do tipo N₂ (nicotínicos ganglionares) estão presentes nos gânglios são bloqueados pelo trimetafan e podem ser dos subtipos β_2 ao β_5 (com estruturas primárias migrando do α_2 ao α_9) (TAYLOR & BROWN, 1999).

Os subtipos de receptores muscarínicos foram identificados por biologia molecular e estudos farmacológicos (BONNER et al., 1987). Nos últimos anos a biologia molecular e estudos farmacológicos identificaram pelo menos cinco diferentes subtipos de receptores muscarínicos – M₁ ao M₅ (CAULFIELD & BIRDSALL, 1998). Os receptores muscarínicos pertencem à superfamília dos receptores ligados à proteína G. Os subtipos M₁, M₃ e M₅ são acoplados aos subtipos de proteína G G_{aq/11} e G_{a13}, levando, por exemplo à ativação da fosfolipase C (PLC) e fosfolipase D (PLD), enquanto os receptores M₂ e M₄

preferencialmente são acoplados às proteínas Go e Gi, levando à inibição da adenilil ciclase (CAULFIELD, 1993; RUMENAPP et al., 2001) (**Figura I-6**).



Fonte: EGLÉN et al., 2001

Figura I-6. Receptores muscarínicos da acetilcolina. Cinco tipos de receptores fazem a mediação dos efeitos muscarínicos da acetilcolina. Os receptores M₁, M₃ e M₅ são estimulatórios e acoplados primariamente à mobilização de cálcio intracelular. Um aumento no Ca⁺⁺ citoplasmático resulta do acoplamento destes receptores com proteína Gq o que leva à estimulação da enzima fosfolipase C (PLC) e à liberação de 1,4,5-trifosfato de inositol [Ins(1,4,5) P₃]. Os receptores M₂ e M₄ são inibitórios e modulam negativamente a adenililciclase para reduzir as concentrações citoplasmáticas de AMPc.

Os receptores muscarínicos do tipo M₁ são os mais importantes receptores muscarínicos no SNC que medeiam a ativação da MAP quinase, um processo essencial para a plasticidade sináptica (HAMILTON et al., 1997; HAMILTON & NATHANSON, 2001). A deficiência do receptor M₁ também leva a uma elevação na transmissão dopaminérgica no corpo estriado, o que leva a um aumento da atividade locomotora (GERBER et al., 2001; MIYAKAWA et al., 2001). Além do mais, camundongos *Knockout* de receptor M₁ têm um aumento da resposta aos efeitos estimulantes das anfetaminas (GERBER et al., 2001). O receptor M₂ cerebral contribui para a antinocicepção centralmente mediada e animais *Knockout* para receptor M₂ mostram inibição nos tremores e atenuam a hipotermia induzidos por agonistas colinérgicos (GOMEZA et al., 1999a).

O receptor M₃ tem um papel chave na secreção salivar e na constrição da pupila (MATSUI et al., 2000). Estes receptores também estão envolvidos na regulação do apetite e camundongos com deficiência deste receptor apresentam uma redução no consumo de alimentos, no peso corporal e depósito de gorduras (YAMADA et al., 2001). Da mesma

forma que os receptores M₁, os receptores M₄ cerebrais estão envolvidos na modulação das respostas dopaminérgicas centrais. Camundongos *Knockout* de receptores M₄ mostraram um aumento na atividade locomotora basal e aumentaram respostas locomotoras após ativação de receptores D₁ (GOMEZA et al., 1999b). Finalmente, os receptores M₅ facilitam a liberação de dopamina no corpo estriado e modulam tanto os processos de recompensa como retirada da morfina (BASILE et al., 2002). Estes receptores também estão envolvidos na dilatação de artérias e arteríolas cerebrais (YAMADA et al., 2001) (**Quadro I-3**).

Quadro I-3 Funções dos receptores muscarínicos alteradas em animais geneticamente modificados

Modelo Genético	Resposta funcional ao agonista muscarínico
Animais <i>Knockout</i> para receptor M ₁	Redução (inibição) da convulsão induzida por pilocarpina, preservação dos tremores e salivação induzidos por pilocarpina
Animais <i>Knockout</i> para receptor M ₂	Perda dos tremores e analgesia induzidos por oxotremorina, atenuação da regulação muscarínica do coração, preservação da salivação induzida por oxotremorina
Animais <i>Knockout</i> para receptor M ₃	Atenuação da contração do íleo isolado e bexiga urinária ao carbacol, perda da salivação induzida por pilocarpina, perda da constrição pupilar em resposta à pilocarpina
Animais <i>Knockout</i> para receptor M ₄	Preservação da salivação, tremores e analgesia induzidos por oxotremorina
Animais <i>Knockout</i> para receptor M ₅	Perda das respostas secretórias á pilocarpina

Fonte: EGLLEN et al., 2001

Cada subtipo de receptor muscarínico exibe diferentes agonistas e antagonistas e cada um tem seu padrão específico de distribuição.

A ação da ACh é finalizada pela ligação das colinesterases, que são subdivididas em acetilcolinesterase (AChE) e butiril ou pseudocolinesterase (BuChE) (MASSOULIÉ et al., 1993; TAYLOR & RADIC, 1994). Estas enzimas promovem a conversão da ACh em colina e acetato. A BuChE é sintetizada principalmente no fígado e aparece no plasma. Tudo indica que esta enzima hidrolisa ésteres potencialmente tóxicos. A distribuição da AChE está correlacionada com a inervação e desenvolvimento do SNC.

A AChE pode ser alvo para algumas drogas usadas terapeuticamente, como para outras utilizadas como inseticidas. O bloqueio da ação da AChE produz um aumento ou potenciação da ACh administrada ou liberada após estimulação nervosa. Isto produz uma estimulação de receptores em uma área bem maior do que aquela onde houve a liberação do neurotransmissor.

2.3.2 Neurotransmissão colinérgica e seu envolvimento nos processos convulsivos

Convulsões podem ser induzidas por agentes colinérgicos, mais notavelmente os agonistas muscarínicos, tais como pilocarpina, e por inibidores da AChE, tais como fisostigmina e disopropilfluorofosfonato (MELDRUM & CHAPMAN, 1999). As convulsões induzidas por pilocarpina são um modelo para o estudo da epilepsia do lobo temporal humana (TURSKI et al., 1989; CAVALHEIRO et al., 1991). Estudos também sugerem a influência neuromodulatória da acetilcolina no desenvolvimento do *kindling* da amígdala (WADA, 1977; BAPTISTA et al., 1994; SERRA et al., 1997) e outros ainda relataram que o pré-tratamento com atropina, um antagonista colinérgico muscarínico inespecífico previne o desenvolvimento do *kindling* nesta área cerebral (ARNOLD et al., 1973).

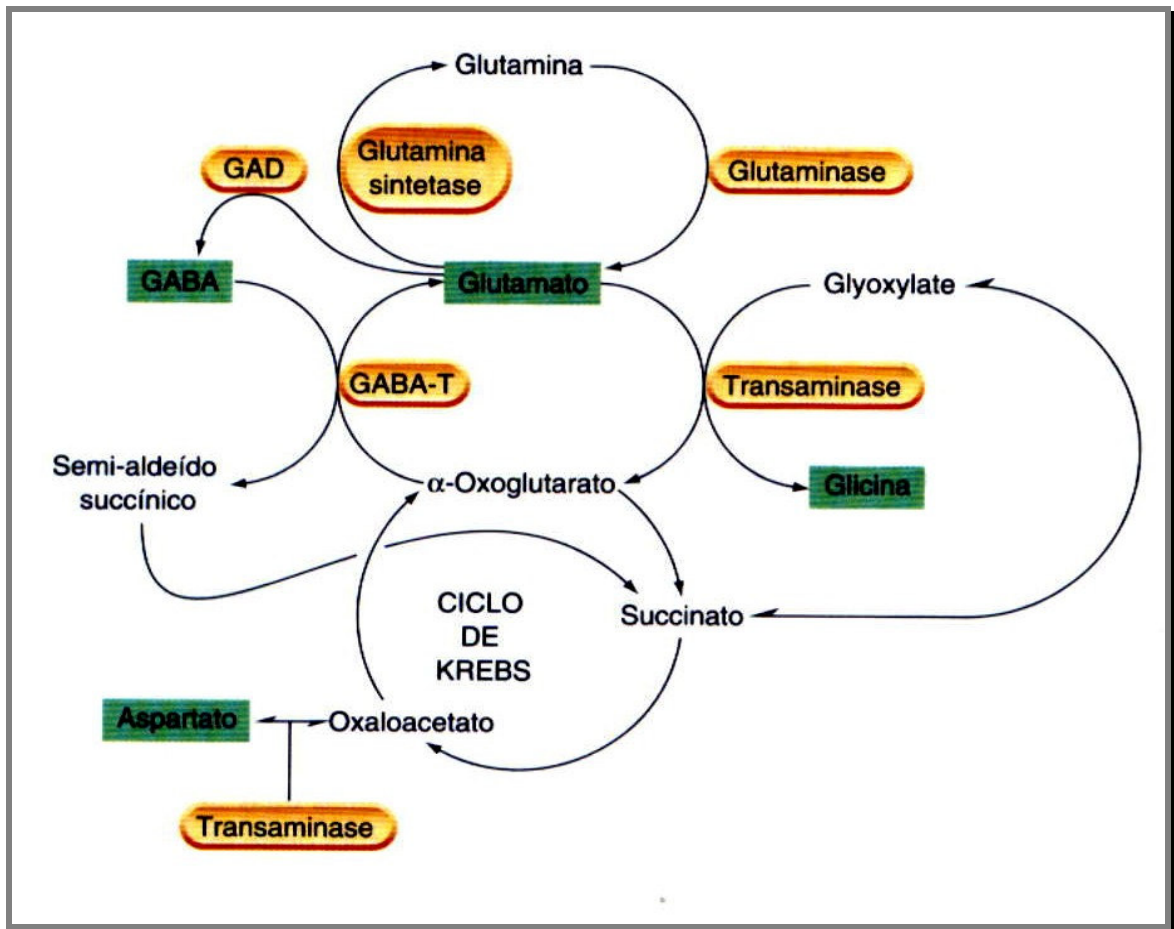
Outros estudos sugerem que a ACh endógena pode aumentar a atividade epileptogênica em hipocampos imaturos, via ativação de receptores muscarínicos (PSARROPOULOU et al., 1998; PSARROPOULOU & DALLAIRE, 1998).

Um grande número de pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de identificar o papel dos receptores muscarínicos na mediação das ações da acetilcolina em várias condições patológicas. Estudos recentes mostram um aumento no RNAm para os receptores M₁ e M₃ no hipocampo após o *kindling* (MINGO et al., 1998), entretanto o papel destes receptores nos processos convulsivos ainda não está totalmente elucidado.

2.4 Aminoácidos transmissores e seu envolvimento na convulsão

2.4.1 Síntese, receptores e funções

Glutamato e aspartato são aminoácidos não essenciais que não cruzam a barreira hemato-encefálica, por isso, são sintetizados a partir da glicose e de uma variedade de outros precursores no SNC. A glicose e glutamina parecem ser os precursores para a biossíntese do glutamato no cérebro (BRADFORD & THOMAS, 1969; SHANK & APRISON, 1977). A glicose está disponível na corrente sanguínea em grandes quantidades e como a taxa de metabolização é aumentada na terminação nervosa, ela é algumas vezes considerada como um importante precursor para a síntese do glutamato via ciclo do ácido cítrico e desidrogenase glutâmica (DAVIDSON, 1976). Outras moléculas importantes para esta síntese são o α -cetogluturato e glutamina (NICHOLS, 1994). A molécula de α -cetogluturato, substância que é convertida em glutamato no SN, é um componente do ciclo produtor de energia importante que ocorre na mitocôndria. Em contraste, a glutamina é fornecida principalmente por células chamadas células da glia, que ficam ao redor dos neurônios. Dentro dos neurônios, a glutamina também é convertida a glutamato por uma reação de hidrólise. As reações químicas e enzimas envolvidas na síntese de glutamato não são específicas dos neurônios, mas ocorrem em todas as células (**Figura I-7**).



Fonte: RANG et al., 2004.

Figura I-7. Metabolismo dos aminoácidos transmissores no cérebro. As substâncias estão indicadas nos quadros verdes. (GABA, ácido γ -aminobutírico; GAD, ácido glutâmico-descarboxilase; GABA-T, GABA transaminase.)

Em contraste com as outras células do corpo, os neurônios necessitam de glutamato não somente para as atividades metabólicas normais, mas também para transmissão sináptica. Como conseqüência as moléculas de glutamato destinadas para agir como neurotransmissores devem ser segregadas do glutamato não-transmissor. Para realizar esta separação, o *pool* de glutamato é estocado em pequenos compartimentos especiais dentro dos neurônios, ou seja, nas vesículas sinápticas, que estão localizadas nas terminações nervosas (região terminal).

Quando um neurônio glutamatérgico é ativado para passar um sinal a neurônios circunvizinhos, as vesículas sinápticas que contêm glutamato se fundem com a membrana da

região terminal e liberam seu conteúdo na fenda sináptica. O glutamato então atravessa a fenda sináptica para interagir com receptores no neurônio pós-sináptico, desse modo induzindo excitação do neurônio pós-sináptico (BLOOM & KUPFER, 1995).

A liberação destes aminoácidos excitatórios de terminações nervosas pode ser Ca^{2+} -dependente ou independente, embora os mecanismos não estejam totalmente compreendidos. O K^+ extracelular estimula o efluxo de aminoácidos excitatórios de neurônios estriatais (KORF & VENEMA, 1985), mas a liberação de glutamato pode depender de muitos outros sinais moleculares, tais como liberação do óxido nítrico (NO; MCNAUGHT & BROWN, 1998), da ativação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos pré-sinápticos (CARTMELL & SCHOEPP, 2000), bem como de receptores GABAérgicos e de proteínas quinases (PERKINTON & SIHRA, 1999).

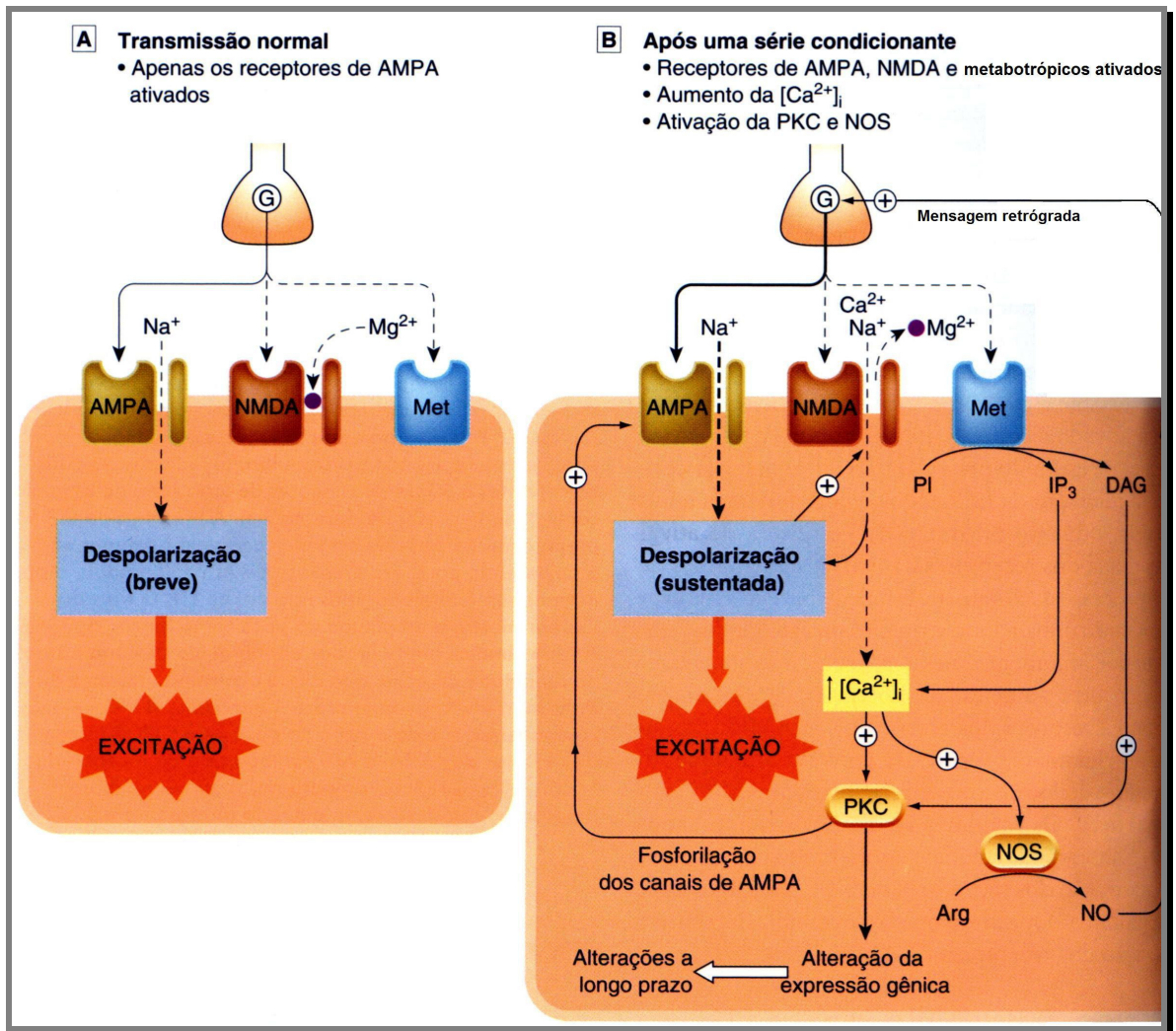
O glutamato depois de liberado na fenda sináptica pode se ligar a receptores ionotrópicos (associados a canais iônicos) e a receptores metabotrópicos (ligados à proteína G). Dentre os receptores ionotrópicos podemos citar: NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (propionato de α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole) e cainato (CA). A ativação dos receptores NMDA exige a presença de glicina, bem como de glutamato em sítios de ligação distintos e ambos precisam estar ocupados para a abertura do canal. Esta descoberta foi importante, visto que até então a glicina era considerada um transmissor inibitório, de modo que a constatação de que facilitava a excitação opôs-se à doutrina até então prevalente. A concentração de glicina necessária é baixa em relação à concentração geralmente presente no cérebro, sugerindo que pode atuar como constante fator permissivo para os efeitos do glutamato mediado pelo receptor NMDA, mais do que como mecanismo regulador.

Os receptores AMPA e, em determinadas regiões do cérebro, os receptores de cainato (BLEAKMAN & LODGE, 1998) atuam para mediar a transmissão sináptica excitatória rápida no SNC – absolutamente essencial para o funcionamento do nosso cérebro. Os receptores de cainato também desempenham um papel pré-sináptico (FRERKING & NICOLL, 2000). Os receptores de AMPA também ocorrem nos astrócitos, que parecem desempenhar um papel de comunicação, bem como uma função de simples sustentação, no cérebro. Os receptores de NMDA (que freqüentemente coexistem com os receptores AMPA) contribuem com um componente lento para o potencial pós-sináptico excitatório.

Os receptores metabotrópicos do glutamato são divididos em grupos: grupo I - receptores acoplados à proteína G estimulatória (Gq) que ativam a hidrólise do fosfato de inositol. Fosfatos de inositol são conhecidos por regular o transporte através das membranas, assim como o metabolismo da glicose, organização do citoesqueleto e têm como função mais importante, a homeostase do Ca^{2+} — particularmente, a liberação das reservas de Ca^{2+} via receptores sensíveis ao 1,4,5- trifosfato de inositol. Os receptores dos Grupos II e III agem via proteína G inibitória (Gi) com inibição da atividade da adenilato ciclase e redução da formação do AMPc o que resulta em inibição dos canais de cálcio operados por voltagem (MOLDRISH et al., 2003).

Os receptores glutamatérgicos desempenham um papel nas alterações adaptativas e patológicas a longo prazo no cérebro, sendo de particular interesse como alvos potenciais para fármacos em particular por causa da plasticidade sináptica e excitotoxicidade mediada por estes receptores.

Plasticidade sináptica é um termo utilizado para descrever alterações a longo prazo na conexão e eficácia sinápticas, após alterações fisiológicas da atividade neuronal (como na aprendizagem e memória) ou em decorrência de distúrbios patológicos (como na epilepsia, dor crônica ou dependência de drogas). A LTP (**Figura I-8**) é o termo utilizado para descrever a potenciação de longa duração (várias horas *in vitro*, vários dias ou semanas *in vivo*) da transmissão sináptica, que ocorre em várias sinapses do SNC após um pequeno surto (condicionante) de estimulação pré-sináptica, tipicamente em cerca de 100 Hz durante 1 segundo. A descoberta da potenciação a longo prazo (LTP, *long-term potentiation*) (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993; BENNET, 2000) e o papel central dos receptores de glutamato e de NMDA neste evento representam um grande avanço.



Fonte: RANG et al., 2004.

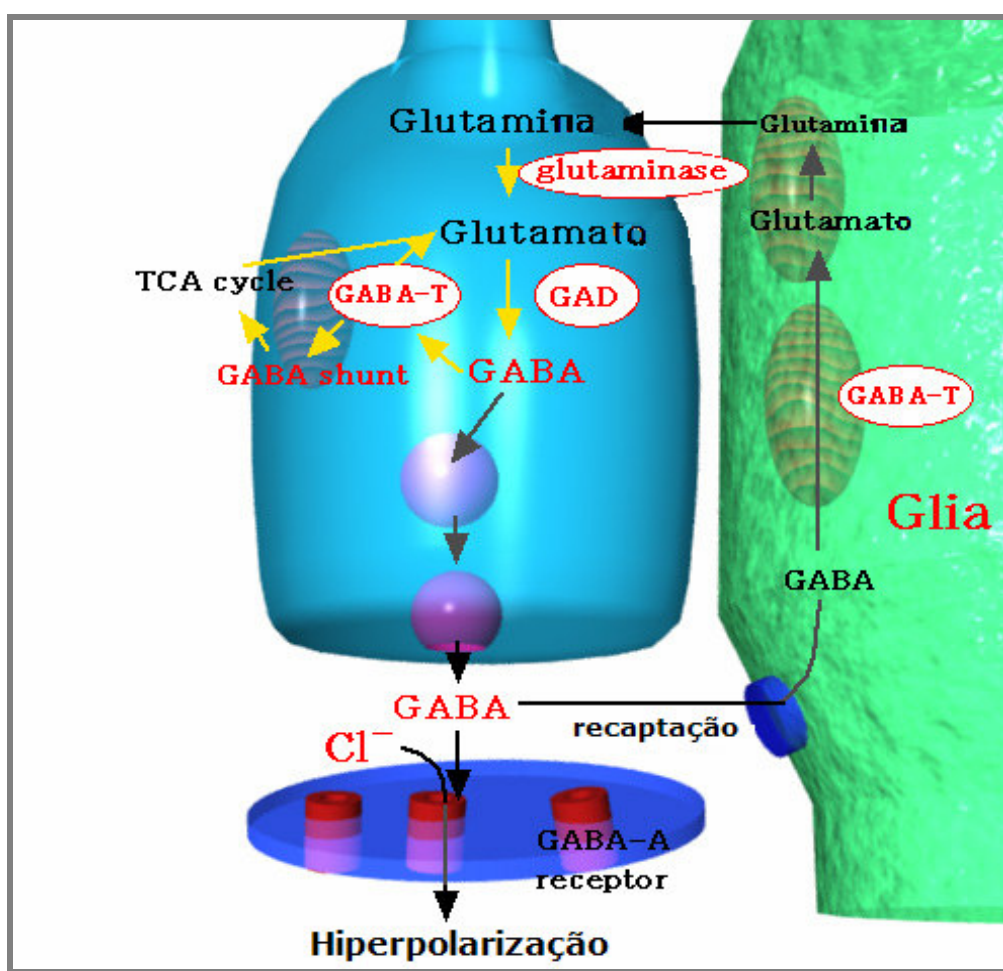
Figura I-8. Mecanismos da potenciação a longo prazo (LTP). A Com a atividade sináptica infreqüente, o glutamato ativa principalmente os receptores AMPA. Existe uma quantidade insuficiente de glutamato para ativar os receptores metabotrópicos (met) e os canais do receptor de NMDA são bloqueados pelo Mg^{2+} . B Após uma série condicional de estímulos, ocorre liberação de glutamato suficiente para ativar os receptores metabotrópicos, e os canais de NMDA são desbloqueados pela despolarização sustentada. O conseqüente aumento na concentração de $[Ca^{2+}]_i$ ativa a PKC e a NOS. A PKC fosforila diversas proteínas, incluindo os receptores de AMPA (produzindo facilitação da ação do transmissor) e outras moléculas de transdução de sinais que controlam a transcrição de genes (não-mostrada) nas células pós-sinápticas. A liberação de NO facilita a liberação de glutamato (sinalização retrógrada, também conhecida como retorno do NO). (G, glutamato; NMDA, N-metil-D-aspartato; AMPA, α -amino-3-hidróxi-5-metilisoxazol; PI, fosfatidilinositol; IP₃, inositol 1,4,5-trifosfato; DAG, diacilglicerol; PKC, proteína quinase; NO, óxido nítrico; NOS, óxido nítrico sintetase).

Para finalização da neurotransmissão glutamatérgica, proteínas carreadoras específicas transportam glutamato de volta ao neurônio pré-sináptico e para as células gliais circunvizinhas (NICHOLS, 1994). Além disso, para prevenir a excitação excessiva do neurônio pós-sináptico, este sistema de captação de glutamato recicla o *pool* de glutamato para utilização posterior. As moléculas do neurotransmissor são recaptadas para o neurônio pré-sináptico sendo transportadas diretamente para as vesículas sinápticas. O glutamato transportado para as células gliais é rapidamente convertido a glutamina, que eventualmente pode ser transportada de volta ao neurônio para agir como um precursor para o glutamato. Assim, as células gliais associadas com neurônios glutamatérgicos ajudam a regular o processo de sinalização por terminar o sinal sináptico e por assegurar um suprimento eficiente de moléculas precursoras. Esse papel das células gliais é único para a transmissão excitatória glutamatérgica: outros sistemas neurotransmissores aparentemente não requerem este suporte das células gliais (GONZÁLES & JANOWSKI, 1997).

Os neurotransmissores excitatórios e inibitórios (glutamato, aspartato, GABA e glicina) fazem a mediação de essencialmente toda comunicação rápida no SNC. O glutamato e aspartato são os mais abundantes neurotransmissores excitatórios no cérebro (WATKINS & OLVERMAN, 1987), e assim devido a suas altas concentrações e larga distribuição, estes aminoácidos influenciam todas as funções do SNC. Estes neurotransmissores (Ex.: glutamato) desempenham um papel importante no aprendizado e memória (NG et al., 1991; DAVIS et al., 1992; WILLNER et al., 1992), e estão envolvidos em processos patológicos, como epilepsia, assim como em lesões cerebrais característicos das ditúrbios neurodegenerativas tais como, doença de Huntington, doença de Alzheimer e doença de Parkinson, além de alterações associadas à isquemia cerebral, traumatismo cerebral e encefalopatia devido à síndrome da imunodeficiência humana adquirida (SIDA) (HAYES et al., 1992; LANCASTER, 1992).

O ácido γ -aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório no SNC e é formado por uma via metabólica denominada GABA *shunt*. O GABA *shunt* é um processo de alça fechada que tem como objetivo produzir e conservar o suplemento de GABA. Este neurotransmissor está presente em altas concentrações (milimolar) em muitas regiões cerebrais, concentrações estas que são cerca de 1.000 vezes maiores que aquelas dos

neurotransmissores clássicos monoaminérgicos nas mesmas regiões. Isto está de acordo com as ações poderosas e específicas dos neurônios GABAérgicos nestas regiões. A glicose é o principal precursor da produção do GABA *in vivo*, embora o piruvato e outros aminoácidos possam atuar como precursores. O GABA é formado a partir do glutamato (**Figuras I-7 e I-9**) pela ação da enzima ácido glutâmico descarboxilase (GAD), enzima encontrada apenas em neurônios que sintetizam este neurotransmissor no cérebro e é destruído por uma reação de transaminação, em que o grupo amino é transferido para o ácido α -oxoglutárico (produzindo glutamato), com formação de semi-aldeído succínico e, a seguir, ácido succínico. Esta reação é catalisada pela GABA transaminase (GABA-T). Os neurônios GABAérgicos e os astrócitos (células gliais) captam o GABA através de transportadores específicos, e é este mecanismo, melhor do que a GABA-T, que o remove após sua liberação.



Fonte: <http://pharma1.med.osaka-u.ac.jp/textbook/Anticonvulsants/Anticonvulsants.html>. Acesso: 05/05/2005

Figura I-9- Processo de síntese e recaptção do aminoácido GABA.

O GABA atua em dois tipos distintos de receptores: GABA_A e GABA_B. O receptor GABA_A consiste em um canal regulado por ligante, sensível ao cloreto, enquanto os receptores GABA_B são acoplados à proteína G e regulam canais de K⁺ que quando ativados reduzem a condutância ao Ca⁺⁺ e inibem a produção de AMPc. Recentemente, foi proposto o receptor GABA_C que se assemelha estreitamente ao receptor GABA_A e exibe ações farmacológicas ligeiramente diferentes, embora sua importância funcional permaneça desconhecida (RANG et al., 2004).

Os receptores do GABA de localização pós-sináptica, medeiam a inibição pós-sináptica rápida, sendo o canal seletivamente permeável ao Cl⁻. Como o potencial de membrana em equilíbrio para o Cl⁻ é, em geral, negativo em relação ao potencial de repouso da célula, o aumento da permeabilidade ao Cl⁻ hiperpolariza a célula, reduzindo, assim, sua excitabilidade. Os receptores GABA_B, apresentam localização pré- e pós-sináptica e assemelham-se aos receptores metabotrópicos do glutamato. Estes receptores foram clonados em 1997, e mais tarde, foi constatado serem incomuns, uma vez que o receptor funcional é um dímero constituído de duas subunidades diferentes. Exercem seus efeitos ao inibir os canais de cálcio regulados por voltagem (reduzindo, assim, a liberação do neurotransmissor) e ao abrir os canais de potássio (diminuindo, dessa maneira a excitabilidade pós-sináptica), resultando estas ações da inibição da adenilil-ciclase (RANG et al., 2004).

A glicina é encontrada em concentrações particularmente altas (5µmol/g) na substância cinzenta da medula espinhal. Quando aplicada iontoforicamente a motoneurônios ou a interneurônios, produz hiperpolarização inibitória, que é indistinguível da resposta sináptica inibitória. O efeito inibitório da glicina é muito distinto de seu papel na ativação facilitadora dos receptores de NMDA. O receptor da glicina é semelhante ao receptor GABA_A sendo um canal iônico multimérico regulado por ligante. Foram encontradas mutações nos receptores da glicina em alguns distúrbios neurológicos hereditários associados a espasmos musculares e hiperexcitabilidade reflexa (RANG et al., 2004).

2.4.2 Aminoácidos e seu envolvimento nos processos convulsivos

Aminoácidos excitatórios, como o ácido glutâmico (glutamato) e ácido aspártico (aspartato) estão envolvidos na indução, manutenção e propagação das convulsões e fazem a

mediação de efeitos neuropatológicos da hiperatividade neuronal (SLOVITER & DEMPSTER, 1985; PEÑA & TAPIA, 2000). A boa sintonia entre estes neurotransmissores é importante para o desenvolvimento do SNC e são responsáveis pela base fisiológica para o armazenamento de informações. Desequilíbrios entre respostas excitatórias e inibitórias podem ter conseqüências diversas, indo desde convulsões ou excitotoxicidade à depressão do SNC similar àquela observada com o uso de sedativos e hipnóticos estando estes neurotransmissores envolvidos em processos como epilepsia e isquemia (DINGLELINE & MCBAIN, 1999). Glutamato e aspartato são epileptogênicos e excitotóxicos para células nervosas tanto *in vitro* como *in vivo* (WHETSELL, 1996).

Todos os receptores ionotrópicos do glutamato estão envolvidos com os processos convulsivos, visto que a administração de agonistas destes receptores leva ao desenvolvimento de convulsões (MELDRUM & CHAPMAN, 1999). Com relação aos metabotrópicos uma revisão recente (MOLDRICH et al., 2003) mostra que agonistas dos receptores do grupo I, como (1S,3R)-ACPD, ((1S,3R)-1-aminociclopentano-1,3-ácido descarboxílico) são convulsivantes, enquanto agonistas dos receptores do grupo II e III, tais como (S)-4-carboxi-3-hidroxifenilglicina ((S)-4C3HPG) e L-(+)-2-amino-4-ácido fosfonobutírico (L-AP4), respectivamente são anticonvulsivantes em alguns modelos de convulsão após injeção focal. Embora o L-AP4 exiba também atividade pró-convulsivante em alguns modelos de convulsão.

O GABA é um neurotransmissor inibitório quantitativamente importante no SNC envolvido direta ou indiretamente na patogênese de muitas doenças neurológicas, principalmente nas convulsões. Por muitos anos acreditou-se que o principal fator patogênico nas epilepsias era a falha na neurotransmissão GABAérgica (MELDRUM, 1975). Dependendo da região cerebral, 20 a 50 % das sinapses usam GABA como transmissor. Foi descoberto mais tarde que a neurotransmissão inibitória pode ter um importante papel na geração e manutenção de certos tipos de convulsão no hipocampo e nos circuitos corticotalâmicos (AVOLI, 1996; ENGEL, 1996). O aumento da atividade da GABA-T no cérebro reduz as concentrações de GABA o que leva à convulsão, coma e morte. A inibição desta enzima eleva consideravelmente a concentração de GABA no cérebro, o que sendo alvo para o desenvolvimento das novas drogas anticonvulsivantes como a vigabatrina. Do receptores GABAérgicos o receptor GABA_A é um canal iônico operado pelo Cl⁻ e é alvo da ação de muitas drogas anticonvulsivantes que agem potencializando esta neurotransmissão. O

papel destes receptores GABA_B ainda é controverso no que se refere às convulsões em alguns modelos de convulsão agonistas deste receptor produzem ação anticonvulsivante, enquanto em outros a ação é proconvulsivante. Como no caso do baclofeno que tem ação proconvulsivante *per se* após infusão intraventricular em roedores e após uso de doses terapêuticas em humanos (SNODGRASS, 1992), mas atenuou o desenvolvimento do *kindling* induzido por PTZ em roedores (SNODGRASS, 1992; SNEAD, 1996; DE SARRO et al., 2000).

A glicina também está envolvida na convulsão, visto que drogas como a estriquina, um veneno com atividade convulsivante que atua principalmente sobre a medula espinhal, bloqueia tanto a resposta inibitória sináptica quanto a resposta à glicina (RANG et al., 2004).

3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é o resultado da excessiva produção de espécies químicas reativas, como os radicais livres. O termo radical livre faz referência a um átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990; HALLIWELL, 1992). É este não-emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas. Na verdade radical livre não é o termo ideal para designar os agentes reativos patogênicos, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada. Como em sua maioria estas substâncias são derivadas do metabolismo do O₂, o termo “espécies reativas do oxigênio” (ERO) torna-se mais apropriado. As ERO são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o O₂ sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H₂O. Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido (O₂^{•-}), hidroperoxila (H₂O[•]) e hidroxila (OH[•]) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Normalmente a redução completa do O₂ ocorre na mitocôndria, e a reatividade da ERO é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons.

As espécies químicas reativas podem também ser produzidas como um subproduto de outras vias bioquímicas, incluindo a síntese de óxido nítrico (NO) e o

metabolismo do ácido araquidônico (que estão implicados na excitotoxicidade), assim como o sistema de oxidase de função mista. Não controlados, os ERO atacam muitas moléculas importantes, incluindo enzimas, lipídios de membrana e DNA. Os mecanismos de defesa contra estas moléculas são fornecidos na forma de enzimas, como a superóxido dismutase (SOD), catalase, a glutathione peroxidase, glutathione reductase e outros antioxidantes como a albumina (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990), assim como em antioxidantes como o ácido ascórbico, glutatião e α -tocoferol (vitamina E) que normalmente mantêm essas espécies sob controle.

Clinicamente, o estresse oxidativo pode causar lesão tecidual relacionado com muitas desordens fisiopatológicas como a hipóxia, a inflamação e a isquemia tecidual e de reperfusão. Outras teorias afirmam que o estresse oxidativo pode estar relacionado com disfunção neurológica associada a doenças incluindo a doença de Parkinson, Alzheimer, epilepsias, dentre outras (BEYER et al., 1998).

4 Áreas cerebrais: corpo estriado e córtex pré-frontal

Os núcleos da base estão envolvidos com o controle motor, planejamento e execução de estratégias motoras complexas e também participam de comportamentos não relacionados aos movimentos, tais como função afetiva, humor e pensamento (CÔTÉ & CRUTCHER, 1991).

Estes núcleos consistem em vários núcleos subcorticais interconectados com projeções para o córtex, tálamo e certos núcleos do tronco encefálico. Eles recebem impulsos de entrada principalmente do córtex cerebral e tálamo e mandam impulsos de saída de volta para o córtex (via tálamo) e para o tronco encefálico. Desta forma, os núcleos da base são os principais componentes de um amplo circuito cortical-subcortical ligando o córtex e o tálamo (DELONG et al., 2000).

Os quatro núcleos principais dos núcleos da base são: o corpo estriado, o globo pálido, a substância negra (pars reticulata e pars compacta) e núcleos subtalâmicos. O corpo estriado consiste de três importantes subdivisões: o núcleo caudado, o putamen e o estriado ventral (o qual inclui o núcleo accumbens) (DELONG et al., 2000).

Dentro dos núcleos da base o corpo estriado é o principal receptor de impulsos de entrada provenientes do córtex cerebral, tálamo e tronco encefálico. Seus neurônios se projetam para o globo pálido e substância negra. Todas as áreas do córtex mandam projeções glutamatérgicas excitatórias para porções específicas do corpo estriado. Esta área também recebe projeções dopaminérgicas do mesencéfalo e impulsos de entrada serotonérgicos dos núcleos da rafe (DELONG et al., 2000).

Embora o corpo estriado contenha vários tipos celulares distintos, 90-95 % destas são projeções de neurônios GABAérgicos espinhais de tamanho médio. Estes neurônios dão origem a quase todos os impulsos de saída estriatais, como para o globo pálido e a substância negra, e são o principal alvo de impulsos de entrada excitatórios provenientes do córtex e tálamo de fibras dopaminérgicas originárias da substância negra e área tegmentar ventral, de axônios locais colaterais de outros neurônios espinhais, e de interneurônios estriatais (GERFEN, 1992).

O corpo estriado também contém dois tipos de interneurônios inibitórios: interneurônios colinérgicos grandes e células menores que contém somatostatina, neuropeptídeo Y ou óxido nítrico sintetase, que embora pequenos em número, são responsáveis pela maioria da atividade tônica do corpo estriado.

A neurotransmissão mediada por receptores glutamatérgicos excitatórios do tipo AMPA e pelo neurotransmissor inibitório GABA é considerado como sendo de uma natureza neurotransmissora rápida, enquanto os interneurônios colinérgicos, as projeções dopaminérgicas e os aferentes excitatórios dos receptores NMDA estão envolvidos em ações modulatórias nesta área cerebral (DI CHIARA et al., 1994).

Os neurônios colinérgicos têm um papel central no controle da atividade estriatal via receptores muscarínicos (BERNARD et al., 1993). Portanto, a interação entre impulsos de entrada dopaminérgicos, GABAérgicos e glutamatérgicos representam um importante aspecto da regulação funcional do núcleo accumbens.

A administração de cocaína aumenta os níveis extracelulares de dopamina no núcleo accumbens (HURD et al., 1988). Esta ação parece mediar os efeitos de recompensa

(DE WIT & WISE, 1977; ROBERTS et al., 1977). Como as lesões do núcleo accumbens pela 6-hidroxi-dopamina reduzem a auto-administração de cocaína (ROBERTS et al., 1977, 1980), foi amplamente assumido que o núcleo accumbens tem um importante papel nos efeitos de recompensa da cocaína.

A depleção de DA no córtex préfrontal medial (CPFm) em ratos é conhecida por prejudicar a atenção seletiva, aumentar a atividade motora espontânea, induzir comportamentos estereotipados e alterar estados emocionais, induzindo ansiedade (CARTER & PYCOCK, 1980; LE MOAL & SIMON, 1991; BUBSER & KOCH, 1994; ESPEJO, 1997; LACROIX et al., 1998). A depleção seletiva da DA no CPFm de ratos e macacos aumenta os níveis de DA no núcleo accumbens (CARTER & PYCOCK, 1978, 1980; PYCOCK et al., 1980; ROBERTS et al., 1994; SOKOLOWSKI & SALAMONE, 1994; KOLACHANA et al., 1995; KURACHI et al., 1995), o que levou à hipótese de que distúrbios comportamentais são principalmente causados por uma atividade frontal hipodopaminérgica juntamente com uma reatividade dopaminérgica aumentada no núcleo accumbens (GRACE, 1991).

Embora os estudos dos níveis de catecolaminas no núcleo accumbens estejam centralizados na DA e NA, a qual também apresenta aumento após prejuízo da DA no préfrontal (CHRISTIE et al. 1986), outras aminas biogênicas tais como adrenalina também podem ser afetadas. Estas alterações catecolaminérgicas no núcleo accumbens têm importantes implicações funcionais porque este núcleo é considerado como a interface principal entre os sistemas límbico e motor, portanto uma estrutura chave fazendo o fluxo entre motivação e ação (MOGENSON et al., 1980).

A maioria das pesquisas com cocaína aborda suas ações no sistema dopaminérgico mesolímbico, principalmente porque a cocaína atua bloqueando a captação de dopamina neste sistema (HEIKKILA et al., 1975; RAITERI et al., 1975; FISHER & CHAO, 1979). O sistema mesolímbico consiste de corpos celulares de neurônios dopaminérgicos localizados na área tegmentar ventral que se projetam para numerosas regiões límbicas incluindo o núcleo accumbens (OADES & HALLIDAY, 1987). Recentemente, o papel do sistema dopaminérgico mesocortical e em particular o do córtex préfrontal medial nas ações da cocaína (STEKETEE, 2002) tem sido investigado por causa das interações citadas anteriormente entre estas duas áreas cerebrais.

O córtex pré-frontal foi originalmente descrito como uma região cortical com uma interação recíproca forte com o núcleo mediodorsal do tálamo (KOLB, 1984; GROENEWEGEN et al., 1990). Esta área pode ser anatomicamente subdividida em regiões dorsolateral, medial e orbital. Destas três regiões o córtex pré-frontal medial é o mais envolvido em comportamentos de recompensa por drogas de abuso (SCHULTZ et al., 1998). Existem vários diferentes tipos celulares no córtex pré-frontal, incluindo neurônios piramidais excitatórios (glutamato), eferentes colinérgicos, interneurônios GABAérgicos inibitórios e interneurônios colinérgicos e esta área além do que já foi descrito recebe projeções de várias regiões cerebrais.

O CPFm recebe eferentes dopaminérgicos provenientes da ATV e envia projeções glutamatérgicas para a ATV e núcleo accumbens (SESACK & PICKEL, 1992). Com relação ao glutamato as terminações nervosas glutamatérgicas no CPFm nascem principalmente de projeções eferentes do núcleo mediodorsal do tálamo, do hipocampo e amígdala (BACON et al., 1996). O núcleo da rafe, área produtora de 5HT recebe inervação glutamatérgica proveniente do CPFm (SESACK et al., 1989).

O lobo frontal como um todo tem uma relação especial com os núcleos da base, pois é a principal parte do córtex cerebral que recebe os principais impulsos de entrada provenientes dos núcleos da base, através do tálamo (MIDDLETON & STRICK, 2000). Como o córtex frontal, o parietal, occipital e temporal, todos se projetam para os núcleos da base, em particular para o estriado, mas estes córtices localizados posteriormente não recebem informações de volta dos núcleos da base, com exceção do córtex ínfero temporal (MIDDLETON & STRICK, 1996). Partes específicas dos núcleos talâmicos (mediodorsal, ventromedial, ventral anterior e em menor escala o núcleo ventral lateral) formam a ligação essencial entre o pálido e substância negra pars reticulata, como estruturas que levam impulsos de saída dos núcleos da base (ABI-SAAB et al., 1999) e do córtex pré-frontal.

Estudos recentes de neuroimagem em ratos conscientes mostram que as projeções dopaminérgicas para o córtex pré-frontal, núcleo accumbens e amígdala são os sítios primários de ação da farmacológica da cocaína no SNC (FEBO et al., 2004).

5 Possíveis mecanismos da convulsão induzida por cocaína e neurotransmissores envolvidos

O mecanismo das convulsões induzidas por cocaína é complexo e envolve a interação da droga com vários sistemas neurotransmissores bem como canais de sódio voltagem dependente, porém não está completamente elucidado. Os primeiros trabalhos a cerca dos efeitos pró-convulsivantes da cocaína sugeriam que esta ação estaria ligada somente à inibição dos canais de sódio voltagem dependente e de vias inibitórias no córtex e hipocampo, pois esta atividade era também compartilhada por outros anestésicos locais. (DUNWIDDIE et al., 1988). Porém, a fenitoína, um bloqueador de canais de sódio voltagem dependente, mostrou pouca atividade contra as convulsões induzidas por cocaína (DERLET & ALBERTSON, 1990). Os bloqueadores de canais de Ca^{++} , como nifedipina e nimodipina também foram ineficientes na inibição das convulsões e mortalidade seguida à administração de cocaína em ratos (TELLA et al., 1992a; DERLET et al., 1994). Outros autores mostraram que estes antagonistas de canais de Ca^{++} tais como a nimodipina, nitrendipina e diltiazem inibiram a estereotipia induzida por cocaína, mas aumentaram as convulsões (ANSAH et al., 1992).

A cocaína tem sua ação baseada no aumento da neurotransmissão dopaminérgica e serotoninérgica, existindo um importante envolvimento destes neurotransmissores nas convulsões induzidas pela droga. A estimulação do receptor D_1 da dopamina, facilita as convulsões induzidas por cocaína (WITKIN et al., 1993). O'DELL et al. (2000) postularam que estas convulsões parecem ser mediadas pela neurotransmissão serotoninérgica, atuando principalmente nos receptores $5HT_2$, pois foram bloqueadas por antagonistas deste receptor, como a cinanserina e acentuadas por antidepressivos inibidores da recaptação de serotonina; como a fluoxetina.

A noradrenalina também parece estar envolvida desde que o propranolol, um antagonista β -adrenérgico potencializou as convulsões e letalidade induzidas por cocaína. Trabalhos recentes indicam um importante papel da neurotransmissão gabaérgica nestas convulsões (YE et al., 1999). O sistema glutamatérgico também parece ser importante nos efeitos tóxicos da cocaína. Estudos prévios mostraram que os antagonistas do receptor NMDA atenuam as convulsões e a letalidade induzidas por cocaína (ROCKHOLD et al.,

1991; WITKIN & TORTELLA, 1991; ITZHAK & STEIN, 1992; MATSUMOTO et al., 1997, 1998). Porém, o envolvimento de receptores não-NMDA nos efeitos convulsivos e letais da cocaína ainda não foi avaliado. Uma possível participação do sistema opióide através dos receptores sigma também foi proposta (BRAIDA et al., 1997). Além disso, modificações adaptativas em vários sistemas neuronais seguindo as convulsões estão sendo amplamente investigadas.

6 Relevância e justificativa

No início dos anos 80, milhares de pessoas iniciaram a procura por um tratamento que as fizesse parar de usar cocaína. Muitos especialistas que haviam passado parte de sua vida tratando o vício desencadeado pelo uso da heroína e álcool ficaram espantados com a idéia destas pessoas necessitarem de tratamento para pararem de usar esta substância. Para eles isto era uma novidade. Perguntas como: “Por que você precisa de tratamento? e Por que você simplesmente não para de usar?”, eram freqüentemente feitas por estes profissionais. Atualmente, muito já foi descoberto sobre a adição por cocaína e outros estimulantes e também em relação ao tratamento para este problema, mas muito ainda precisa ser elucidado, pois se trata de uma árdua tarefa para os pesquisadores e clínicos fazer com que os droga aditos parem de usar a droga e explicar porque eles necessitam de tratamento.

A epidemia da cocaína iniciou no começo dos anos 70, teve seu pico nos anos 80 e declinou na metade dos anos 90 (GOLUB & JOHNSON, 1997). O padrão era similar à primeira epidemia ocorrida quando o cloridrato foi isolado das folhas de coca em 1885. Durante a primeira epidemia os médicos usaram de forma errada as propriedades estimulantes da cocaína para a cura da depressão, vício pela morfina, tuberculose crônica e várias outras desordens. Os médicos e curandeiros prescreviam a droga para muitas doenças e a cocaína logo se tornou o principal ingrediente ativo de muitos medicamentos populares, tônicos e elixires.

Quando os efeitos adversos do uso freqüente e de altas doses foram descobertos começaram a vir as respostas legislativas. Desta forma em 1906 foi criado o Ato da droga e comida pura (*Pure Food and Drug Act*), em seguida o ato narcótico de Harrison em 1914, este segundo eliminando o uso de medicamentos à base de cocaína, proibindo sua fabricação e venda. Mesmo com estes atos a cocaína não foi banida da sociedade e nos anos 70 circunstâncias sociais e econômicas complexas conspiraram para seu retorno.

A epidemia da cocaína nos anos 80 e 90 afetou uma ampla camada da sociedade americana, ocorrendo também o advento do crack e da metanfetamina (MA) sendo esta última mais restrita a algumas localidades. Ao final do século 20 a cocaína e MA e outros derivados destas drogas acompanhavam os opiáceos e álcool como alvos primários dos esforços no combate ao abuso e dependência.

Atualmente nos deparamos com o aumento de casos de emergência envolvendo a cocaína. Este aumento é decorrente principalmente das impurezas existentes nas drogas de rua, que fazem com que os usuários aumentem a dose da droga para melhorar o efeito, ou estes próprios contaminantes podem potencializar os efeitos tóxicos da droga. Um dos principais sintomas responsáveis por estas visitas às emergências são as convulsões.

As convulsões induzidas por cocaína ocorrem tanto na *overdose* como no uso de doses mais baixas durante um certo período de tempo (*kindling*), ou até mesmo após uma única dose (KRAMER et al., 1990; DHUNA et al., 1991), e são de difícil controle, pois levam o indivíduo a uma situação de estado de mal epilético, que pode levar a lesões neuronais, até mesmo à morte se não houver uma manobra rápida, visando o controle desta convulsão. Cerca de 12 % dos pacientes admitidos em emergências hospitalares com intoxicação por cocaína requer terapia anticonvulsivante (DERLET & ALBERTSON, 1989; DHUNA et al., 1991). As convulsões podem ser resistentes aos anticonvulsivantes disponíveis, como benzodiazepínicos e barbitúricos, e são consideradas o principal determinante da morte relacionada ao uso da droga (DHUNA et al., 1991; BENOWITZ, 1993).

Como ponto positivo para esta epidemia de estimulantes e tratamento dos distúrbios que as acompanham temos o aumento incrível da pesquisa científica e clínica

envolvendo este assunto. Os resultados destas pesquisas ajudaram no conhecimento sobre o cérebro humano e das desordens produzidas pelas substâncias de abuso, mas muito ainda falta ser desvendado.

Com relação às convulsões induzidas por cocaína temos uma importante literatura, embora o mecanismo das convulsões não esteja completamente elucidado. Como se trata de uma droga que age em muitos sistemas, o estudo mais aprofundado de cada sistema neurotransmissor que possa estar envolvido com a mediação destas convulsões é de grande valia e pode ser usado posteriormente para o estudo de novas drogas para o tratamento dos efeitos colaterais que envolvem as drogas de abuso, bem como para o tratamento da *overdose*.

Neste estudo além dos receptores e neurotransmissores envolvidos na convulsão procurou-se também estudar uma possível dissociação entre as convulsões e morte induzidas por cocaína, visto que alguns trabalhos sugerem uma distinção entre estas duas condições, pois as drogas que inibem as convulsões não são as mesmas capazes de inibir a letalidade induzida por cocaína (RITZ & GEORGE, 1997b), portanto existem evidências de mecanismos neuronais distintos envolvendo estas duas entidades.

II- *OBJETIVOS*

OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho de tese são determinar quais as alterações neuroquímicas desencadeadas por duas situações conseqüentes à convulsão induzida por cocaína: estado de mal epiléptico e morte em duas áreas cerebrais importantes na ação da droga, corpo estriado e córtex pré-frontal. Para facilitar a leitura e compreensão do estudo este trabalho foi dividido nos capítulos listados a seguir:

Capítulo 1:

- Determinação da dose convulsivante e letal de cocaína em camundongos e estudo da ação de manipulações farmacológicas de diversos sistemas neurotransmissores nas convulsões induzidas por *overdose* de cocaína em camundongos.

Capítulo 2:

- Determinação dos níveis de monoaminas e seus metabólitos após as convulsões e morte induzidas por *overdose* de cocaína em corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos

Capítulo 3:

- Determinação da densidade de receptores dopaminérgicos (D₁ e D₂-símile), serotoninérgico (5HT₂), muscarínico M₁-símile e atividade da acetilcolinesterase após as convulsões e morte induzidas por *overdose* de cocaína em corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos.

Capítulo 4:

- Determinação da densidade de receptores GABAérgicos, glutamatérgicos e níveis de nitrito/nitrato após as convulsões e morte induzidas por *overdose* de cocaína em corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos.

Capítulo 5:

- Estudo da participação do estresse oxidativo nas convulsões e morte induzidas por *overdose* de cocaína em corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos

III- *MATERIAIS E MÉTODOS*

1 MATERIAL UTILIZADO NOS EXPERIMENTOS

Quadro III-1 Principais materiais utilizados nos experimentos

Material	Marca / Modelo
-Agitador de tubos	Modelo 251, FANEN, SP, Brasil
-Balança analítica	Modelo H5, Mettler, Suíça
-Banho Maria	Modelo 102/1, FANEN, SP, Brasil
-Bomba para HPLC	LC-10AD Shimadzu Corp., Japan
-Centrífuga refrigerada	Modelo Marathon 26 KMR, Fisher Scientific
-Contador de cintilação líquida	Modelo LS 6500, Beckman, Fullerton, Ca, USA
-Cubetas de plástico para leitura em espectrofotômetro	Sarstedt, Alemanha Oriental
-Degaseificador	DGU-2A Shimadzu Corp., Japan
-Detector de Fluorescência	Modelo RF 535, Shimadzu Corp., Japan;
-Detector eletroquímico	L-ECD-6 ^a , Shimadzu Corp., Japan;
-Equipamento de Millipore para filtração à vácuo	Millipore Apparatus, Bedford, MA, USA
-Espectrofotômetro	Modelo Beckman DU 640B, Fullerton, CA, USA
-Estufa para secagem	Modelo 315 SE FANEM, SP, Brasil
-Filtros de fibra de vidro	GF/B Whatman, Maidstone, England
-Frascos de vidro para contagem de cintilação	Vials Beckman, Fullerton, Ca, USA
-Freezer a – 70 °C	Modelo ULT 2586-3D14, Revco Scientific, Inc. Asheville, N.C. ,USA
-Homogeneizadores manuais	Bellico, USA
-Integrador C-R6A Chromatopac	Shimadzu Corp., Japan
-Medidor de pH, modelo B374	Micronal, SP, Brasil
-Micropipetas	H.E., Pedersen, Dinamarca
-Sonicador	Modelo PT 10-35. Brinkmann Instruments Inc. NY, USA

2 ANIMAIS

Foram utilizados aproximadamente 500 camundongos Swiss (25 - 30 g), machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, mantidos em ciclo de iluminação ambiental (claro/escuro) de 12 horas, com temperatura em torno de 25 °C, recebendo ração padrão tipo Purina e água *ad libitum*.

Os experimentos foram realizados de acordo com o guia de cuidados e usos de animais de laboratório do Departamento de saúde e serviços humanos dos Estados Unidos da América (EUA) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas Animais da Universidade Federal do Ceará (UFC).

3 PREPARO DAS DROGAS

Cocaína (cloridrato de cocaína, sempre do mesmo lote, foi fornecida pela Polícia Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil). A cocaína com pureza de 100 % por análise no Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará e as outras drogas utilizadas no capítulo 1 deste trabalho, foram dissolvidas em água bidestilada momentos antes da administração por via intraperitoneal em um volume final de 0,1 mL para cada 10 g de peso do animal. A gabapentina foi dissolvida em tween 80 2,5 % v/v.

As seguintes drogas foram utilizadas: diazepam (valium®, Roche), fenobarbital (gardenal®, Aventis Pharma), gabapentina (neurontin®), pimozida (Sigma), SCH 23390 (Sigma), Pirenzepina (Sigma), Fluoxetina (Prozac®, Eli Lilly), Buspirona (Buspar®, Bristol), Mianserina (Sigma), Imipramina (Tofranil®, Novartis), NMDA (Sigma), Cetamina (Ketamin®, Cristália), Naltrexone (Revia®, Cristália), Cloridrato de lítio (Sigma), Bupropiona (Zyban®, Glaxo-Wellcome).

4 DETERMINAÇÃO DA DOSE CONVULSIVANTE E LETAL DA COCAÍNA

Pelo menos cinco doses de cocaína expressas em mg/kg e administradas em um volume de 10 ml/kg foram usadas para determinar a curva dose-resposta. Após a administração os animais foram imediatamente acondicionados em gaiolas de acrílico de 30 x 30 cm. A latência (medida em segundos) de alguns dos sinais observados após administração de cocaína: corrida violenta, abalo clônico, abalo tônico e abalo clônico-tônico (RITCHIE & GREENE, 1990; GEORGE, 1991) foi registrada. Estudos iniciais (GEORGE, 1991) mostraram que a percentagem de convulsões que ocorriam entre 15 ou 60 min após a

administração da droga não eram diferentes, e as convulsões tipicamente ocorriam 2 a 4 min após a injeção. Com relação à morte (GEORGE, 1991), também foi observado que o número de mortes que ocorriam entre 15 - 60 min após a injeção não eram significativamente diferentes, e que sob as condições do estudo em questão, cerca de 95 % das mortes ocorriam em um período após injeção de 4 a 10 min. Portanto, partindo destas evidências os animais no presente estudo foram observados durante um período total de 30 min após a administração da cocaína para o registro da latência das convulsões e/ ou morte.

A dose usada nos experimentos foi aquela que produziu 100 % de convulsões e 40 % de morte nos animais. Partindo desta observação ocorreu a divisão dos grupos em: **estado de mal epilético e morte**, como posteriormente descrito.

5 DETERMINAÇÃO DOS SISTEMAS NEUROTRANSMISSORES ENVOLVIDOS NA CONVULSÃO INDUZIDA POR COCAÍNA (CAPÍTULO 1)

5.1 Procedimento experimental

Os animais foram divididos em grupos experimentais conforme apresentados no **Quadro III-2**, onde cada grupo recebeu seu respectivo tratamento. As doses das drogas foram determinadas por experimentos de curva dose-resposta, bem como a partir de dados da literatura pertinente. Todas as drogas foram administradas por via intraperitoneal e após o tratamento os animais foram imediatamente colocados em gaiolas de acrílico de 30 x 30 cm² onde foram observados por 15, 30, 45 ou 60 min (como apresentado no **Quadro III-2**) após a administração das drogas e antes da administração de cocaína. Estes períodos de observação foram determinados após rigoroso levantamento bibliográfico referente a cada droga. Os animais controle receberam solução salina em volume semelhante ao administrado em relação às drogas testadas. Todos os experimentos foram conduzidos entre 13:00 e 17:00.

Após o intervalo de tempo estabelecido para cada droga como mencionado no **Quadro III-2**, os animais receberam uma dose de cocaína previamente determinada (90 mg/kg) (**capítulo I**) que produzia convulsão em 100 % dos animais e morte em 40 % destes.

Estes animais depois de tratados com cocaína foram observados por 30 min para se determinar a latência para apresentação de alguns dos sinais observados após administração de altas doses de cocaína: corrida violenta, abalo clônico, abalo tônico e abalo clônico-tônico (RITCHIE & GREENE, 1990; GEORGE, 1991), a latência de morte e número de animais que morreram. A percentagem de animais que convulsionaram e a percentagem de sobrevivência dos mesmos foi calculada.

Quadro III-2 Grupos experimentais utilizados no teste das convulsões induzidas pela cocaína.

Sítio de ação da droga	Droga	Doses (mg/kg)	Via de adm.	Tempo de adm. antes da cocaína (min)
	Salina (controle)	-	IP	-
Neurotransmissão GABAérgica	Diazepam	3 e 10	IP	30
	Fenobarbital	10 e 50	IP	30
	Gabapentina	50, 100 e 150	IP	60
Neurotransmissão Serotonérgica	Fluoxetina	10 e 20	IP	15
	Bupirona	5 e 10	IP	30
	Mianserina	10, 20 e 40	IP	15
Neurotransmissão Dopaminérgica	Pimozide	10 e 20	IP	30
	SCH 23390	0,1	IP	30
Neurotransmissão Colinérgica	Pirenzepina	20 e 40	IP	30
Neurotransmissão Glutamatérgica	NMDA	20	IP	30
	Cetamina	20 e 30 mg/kg	IP	30
Antoxidante	Vitamina E	400 mg/kg	IP	45
Outras Drogas	Carbonato de lítio	56,3 e 112,5	IP	30
	Imipramina	5 e 10	IP	30
	Naltrexone	25 e 50	IP	30

6 SEPARAÇÃO DOS GRUPOS ESTADO DE MAL EPILÉPTICO (EME) E MORTE INDUZIDA POR COCAÍNA

Como descrito no item 4 desta seção, após administração de cocaína 90 mg/kg, i.p. 100 % dos animais entram em convulsão seguida de estado de mal epilético e destes 40 % morrem durante o episódio convulsivo cerca de 10 a 15 min após a administração da droga. Partindo desta observação foi feita uma segmentação, onde o grupo de animais que convulsionou e entrou em estado de mal epilético recebeu a denominação de **grupo estado de mal epilético (EME)** e os animais que morreram pela convulsão foram inseridos no **grupo morte**.

Sessenta minutos após a administração da *overdose* de cocaína os animais do grupo EME foram dissecados. Os animais que morreram após o tratamento foram prontamente dissecados. Os controles receberam solução salina e foram dissecados 60 min após a administração desta solução.

Neste estudo entende-se como animal em estado de mal epilético aquele que apresenta qualquer convulsão com duração acima de 5 min ou que apresente 2 ou mais episódios convulsivos entre os quais não ocorra recuperação da consciência neste intervalo de tempo (WARNER-SMITH, 2001). Embora esta seja a atual definição de Estado de Mal Epilético, os animais tratados com *overdose* de cocaína permaneceram em EME por no mínimo 30 min.

No **capítulo 5** foi feita uma pequena modificação nos grupos experimentais, onde foram introduzidos novos grupos como: animais tratados com baixas doses de cocaína, pré-tratados com diazepam 10 mg/kg e submetidos à *overdose* de bupropiona (um inibidor da recaptação de NA e DA), visto que havia a necessidade de um estudo mais aprofundado sobre o envolvimento do estresse oxidativo (enzima catalase) nas convulsões e morte induzidas por cocaína. Para estes experimentos grupos diferentes de animais receberam cocaína em baixas doses, 10 e 30 mg/kg, i.p. e foram decapitados 1 h após o tratamento. Para a determinação do efeito do pré-tratamento com o diazepam na *overdose* de cocaína (90 mg/kg), os camundongos foram tratados com diazepam 10 mg/kg, i.p. e 30 min após foram administrados cocaína. Um outro grupo de animais recebeu apenas diazepam 10 mg/kg. Os animais foram sacrificados 1 h após a administração de cocaína, ou diazepam sozinho. Outro

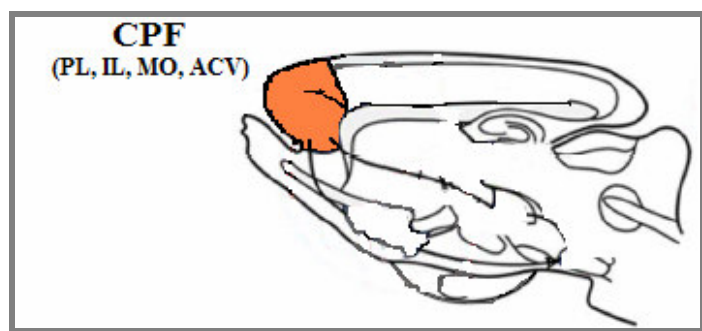
grupo de animais foi tratado com bupropiona em alta dose (150 mg/kg) e foram decapitados 1 h após a administração de bupropiona. Após os intervalos de tempo descritos as áreas cerebrais corpo estriado e córtex pré-frontal foram dissecadas.

7 DISSECAÇÃO DAS ÁREAS CEREBRAIS (CORPO ESTRIADO E CÓRTEX PRÉ-FRONTAL)

Após a convulsão os animais sobreviventes (grupo EME), bem como os animais controle (salina) foram mortos por estiramento cervical, os encéfalos foram retirados rapidamente e colocados sobre papel alumínio em uma placa de Petri com gelo. Os que morreram após a convulsão foram dissecados imediatamente após a morte.

Para a retirada do córtex pré-frontal (CPF), a porção anterior dos lobos frontais (em torno de 1,5 mm a partir do bulbo olfatório) foi removida e feita uma secção bilateral com o auxílio de uma tesoura de microdissecação (MACHADO, 1985) (**Figura III-1**).

Como as áreas corticais dos ratos/camundongos são geralmente menos evoluídas, menos diferenciadas e menos segregadas que o córtex cerebral de primatas, existia uma controvérsia na literatura se realmente primatas e roedores possuíam córtex frontal. A conclusão (UYLINGS et al., 2003) é que estes animais possuem um córtex frontal que pode ser definido anatomicamente e funcionalmente como córtex pré-frontal, o qual é subdividido em uma região orbital-símile e outra região que pode incluir as estruturas dorsolateral e anterior cingulado-símile.



Fonte: UYLINGS et al., 2003

Figura III-1 Representação da região anatômica no camundongo referente ao **córtex pré-frontal**. Nos roedores as áreas do cingulado anterior, pré-límbica e infralímbica formam o córtex pré-frontal. PL-área cortical pré-límbica; IL- área infralímbica cortical; MO – áreas cortical orbital medial; ACV- área anterior do cingulado ventral.

Após a retirada do CPF, acompanhando a fissura sagital mediana, a camada cortical cerebral foi retirada das leptomeninges com o auxílio de uma pinça reta de microdissecação, a qual, progredindo delicada e tangencialmente aos ventrículos laterais, divulsionou o córtex em toda a sua extensão fronto-occipital. O córtex já divulsionado foi rebatido para os lados, expondo parte do corpo estriado. O corpo estriado (CE) (**Figura III-2**) (caudado, putamen e núcleo accumbens) foi isolado das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma tesoura de microdissecação, sendo a sua retirada orientada pelo diâmetro da porção tuberosa visível desses núcleos, após o rebatimento lateral do córtex.

Terminada a dissecação, cada área (CPF e CE) foi colocada em papel alumínio sobre gelo devidamente identificada, pesada e conservada a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para uso posterior. Quando necessária a estocagem por um certo período de tempo (no máximo 6 meses a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) os tecidos foram considerados como tendo a mesma viabilidade para experimentação que os ensaiados imediatamente ou 24 h após a dissecação (BURKE & GREENBAUN, 1987).

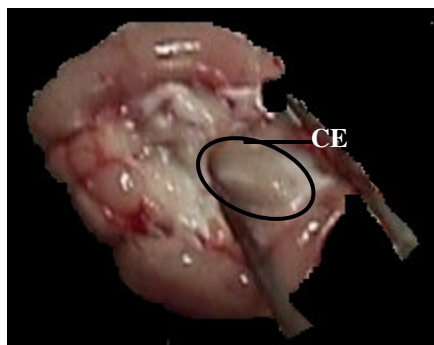


Figura III-2 Dissecção do corpo estriado (CE).

8 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MONOAMINAS E SEUS METABÓLITOS COM HPLC

- Método

Para a determinação dos níveis de catecolaminas foi utilizado o equipamento de HPLC (Cromatografia líquida de alta performance). Na cromatografia líquida clássica um

adsorvente (alumina ou sílica) é empacotado em uma coluna e é eluído por um líquido ideal (fase móvel). Uma mistura para ser separada é introduzida na coluna e é carregada através da mesma por um líquido eluente. Se um composto da mistura (soluto) é adsorvido fracamente pela superfície da fase sólida estacionária, ele atravessará a coluna mais rapidamente que um outro soluto que seja mais rapidamente adsorvido. Então, a separação dos solutos é possível se existem diferenças na adsorção pelo sólido. Os detectores eletroquímicos medem a condutância do eluente, ou a corrente associada com a oxidação ou redução dos solutos. Para ser capaz de detectar no primeiro caso, os solutos devem ser iônicos e no segundo caso, os solutos devem ter a característica de serem relativamente fáceis de se oxidarem ou reduzirem.

Detectores eletroquímicos que medem corrente associada com a redução ou oxidação de solutos são chamados detectores amperométricos ou coulométricos. Neste estudo foi utilizado o tipo amperométrico que reage com uma quantidade muito menor de soluto, em torno de 1 %. Todas as técnicas eletroquímicas envolvem a aplicação de um potencial para um eletrodo (geralmente de carbono vítreo), oxidação da substância que está sendo estudada próximo à superfície do eletrodo seguindo a amplificação e medida da corrente produzida. As catecolaminas são oxidadas nos grupos de anel hidroxil para produzir um derivado ortoquinona com a liberação de dois elétrons.

- Procedimento Experimental

Os animais foram decapitados 60 min após a injeção de cocaína e salina no caso dos grupos EME e controle, respectivamente ou imediatamente no caso dos animais do grupo morte e tiveram seus cérebros dissecados sobre gelo. O CE e CPF foram utilizados para preparar homogenatos a 10 %. Os tecidos cerebrais foram sonicados em ácido perclórico (HClO₄) por 30 s e centrifugados por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 15.000 rpm. Uma alíquota de 20 µl do sobrenadante foi, então, injetada no equipamento de HPLC, para a análise química.

Para a análise das catecolaminas, uma coluna CLC-ODS(M) com comprimento de 25 cm, calibre 4,6 mm e diâmetro da partícula de 3 µm, da Shimadzu, Japão, foi utilizada. A fase móvel utilizada era composta por tampão ácido cítrico 0,163 M, pH 3,0, contendo ácido octanosulfônico sódico, 0,69 M (SOS), como reagente formador do par iônico, acetonitrila 4

% v/v e tetrahidrofurano 1,7 % v/v. NA, DA, DOPAC, HVA, 5HT e 5HIAA foram eletronicamente detectados usando um detector amperométrico (Modelo L-ECD-6A da Shimadzu, Japan) pela oxidação em um eletrodo de carbono vítreo fixado em 0,85 V relativo a um eletrodo de referência de Ag-AgCl. (HALLMAN & JOSSON, 1984)

- Soluções Reagentes

⇒ Fase Móvel

Foram pesados 15,75 g de ácido cítrico (Grupo Química, R.J., Brasil) e completado para um volume de 400 mL com água puríssima (Milli-Q). Esta solução foi ajustada para pH 3,0 com hidróxido de sódio 12,5 M (Reagen, RJ, Brasil). A esta solução foi adicionado o SOS 75 mg (Sigma, MO, USA) e completado o volume para 471,5 ml com água Milli-Q. Em seguida, foi procedida a filtração e degaseificação, e posteriormente adição de 20 ml de acetonitrila (Carlo Erba Reagenti, MI, Itália) e 8,5 mL de tetrahidrofurano (Sigma, MO, USA) para um volume final de 500 mL.

⇒ Ácido Perclórico 0.1 M

Adicionou-se 1,8 mL de ácido perclórico (Sigma, MO, USA) em um balão volumétrico e o volume ajustado para 300 mL.

⇒ Padrões

Os padrões foram preparados em uma concentração final de 4 ng/20 µl de solução de NA, DA, 5HT, DOPAC, HVA e 5HIAA (Sigma, MO, EUA). A partir da área dos picos desses padrões, as concentrações das amostras foram calculadas utilizando o programa *Microsoft Excel*® e os resultados expressos em ng/g de tecido.

9 Determinação dos receptores que podem mediar a convulsão induzida por cocaína

Os animais controle, EME e morte foram sacrificados por rápida decapitação e seus cérebros depois de removidos foram lavados em salina gelada. As regiões cerebrais CE e

CPF foram dissecadas, congeladas e armazenadas a -70 °C até serem utilizadas para os ensaios de *binding* (no máximo 1 semana). No caso dos *bindings* dopaminérgicos e colinérgicos, foram feitos homogenatos com tampão tris-HCl ou fosfato a 10 %, respectivamente. No caso dos receptores serotoninérgicos, GABAérgicos e glutamatérgicos as membranas foram preparadas como descrito posteriormente nas seções pertinentes.

9.1 Determinação da densidade dos receptores colinérgicos muscarínicos M₁-símile

A densidade dos receptores colinérgicos muscarínicos foi determinada através de ensaios de *binding* executados em homogenatos cerebrais. Para a determinação de receptores muscarínicos M₁ foi utilizado o ligante inespecífico [³H]-N-metilescopolamina ([³H]-NMS, 85 Ci/mmol –Amersham Pharmacia Biotech), de acordo com o método previamente descrito (DOMBROWSKI et al., 1983) na presença de carbacol para bloqueio dos receptores M₂-símile.

- Método

O antagonista muscarínico marcado, [³H]-NMS, liga-se a sítios específicos dentre os quatro primeiros segmentos transmembrana dos receptores muscarínicos (WHEATLEY et al., 1988) que existem nos tecidos homogeneizados. Desse modo, o ligante tritiado marca os receptores presentes no tecido estudado. O carbacol é acrescentado ao ensaio com o intuito de bloquear os receptores M₂-símile para que o ligante radioativo se ligue apenas aos receptores M₁-símile.

A atropina é um outro antagonista clássico utilizado nos *brancos* dos experimentos para determinar a radioatividade de *background* ou ligações não-específicas. A atropina acrescentada em concentração muito maior do que a [³H]-NMS interage, seletivamente, com os mesmos sítios de ligação do receptor, deslocando e deixando livre toda a droga marcada, que é logo depois filtrada. A radioatividade contida no filtro é, então, determinada por cintilação líquida.

- Procedimento experimental

Terminada a dissecação das áreas cerebrais em gelo, como mencionado anteriormente, foram feitos homogenatos a 10 % em tampão fosfato de sódio, 150 mM, pH 7,4. Rapidamente, os homogenatos contendo 50 -100 µg de proteína foram incubados em tampão fosfato de sódio contendo entre 0,119 a 5,95 nM de [³H]-NMS para experimentos de saturação e 2,38 nM para experimentos de ponto único, na presença ou na ausência de sulfato de atropina 12,5 µM e carbacol 100 µM em um volume final de 0,2 mL.

Após incubação a 37 °C por 30 minutos, a reação foi terminada por filtração a vácuo através de filtros Whatman GF/B. Os filtros foram lavados três vezes com 4 mL de solução salina 0,9 % gelada, secos em estufa a 60 °C por no mínimo 2 h e colocados em frascos de vidro (*vials*) com 3 mL de um coquetel de cintilação líquida contendo tolueno.

A radioatividade foi medida em um contador de cintilação líquida Beckman LS-6500 com uma eficiência de 61 %. A ligação específica foi calculada como a ligação total menos a ligação não-específica feita na presença de atropina 12,5 µM os resultados foram expressos como femtomoles por miligrama de proteína. A concentração de proteína foi determinada segundo o método de LOWRY et al. (1951) utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

- Soluções reagentes

⇒ Solução estoque de [³H]-N-metil-escopolamina ([³H]-NMS)

Cloridrato de [³H]-NMS (85 Ci/mmol, *Amersham Biosciences*) foi dissolvido em tampão fosfato de sódio 150 mM, pH 7,4 para obter uma concentração de 23,52 nM.

⇒ Solução estoque de atropina

Sulfato de atropina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi dissolvido em água bidestilada, para obter uma concentração de 0,5 mM.

⇒ Carbacol

Carbacol, 2,92 mg (cloreto de carbamilcolina – Sigma, St. Louis, MO, USA) foi dissolvido em 2 ml água bidestilada para obtenção de uma concentração de 8 nM.

⇒ Tampão fosfato de sódio

NaH₂PO₄ (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) foi dissolvido em água bidestilada, para obter uma solução 150 mM e o pH foi ajustado para 7,4 com solução de HCl 1N (Merck, Rio de Janeiro, Brasil).

⇒ Coquetel de Cintilação

0,5 g de p-bis-2-(5-feniloxazolil) benzeno, POPOP (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 4,0 g de 2,5-difeniloxazol, PPO (Sigma, St. Louis, MO, USA) foram dissolvidos em 1000 mL de tolueno (Beckman, Fullerton, CA, USA).

9.2 Determinação da densidade dos receptores dopaminérgicos

A determinação dos receptores dopaminérgicos foi feita através de ensaios de *binding* executados em homogenatos cerebrais, variando os seguintes parâmetros:

- Receptores D₁-símile

Foi utilizado o ligante específico [³H]-SCH 23390 (87,0 Ci/mmol – Amersham Biosciences), de acordo com método previamente descrito (MELTZER et al., 1989).

- Receptores D₂-símile

Foi utilizado o ligante específico [³H]-espiroperidol (114,0 Ci/mmol – Amersham Biosciences), segundo uma adaptação do método previamente descrito por KESSLER et al. (1991) e MELTZER et al. (1989).

- Método

O [³H]-SCH 23390 é um antagonista dopaminérgico que possui alta afinidade pelos receptores D₁-símile. O ligante [³H]-espiroperidol é um antagonista dopaminérgico que

possui alta afinidade pelos receptores D₂-símile, possuindo também afinidade pelos receptores serotoninérgicos do tipo 5HT₂ (TERAI et al., 1989; KESSLER et al., 1991). Para bloquear os receptores serotoninérgicos foi utilizado um antagonista específico, a mianserina.

A dopamina, um agonista dopaminérgico, foi adicionada, na forma não marcada, nos *brancos* dos ensaios para receptor D₁ para determinar a radioatividade de *background* ou ligações não-específicas, em uma concentração elevada para interagir com os mesmos sítios de ligação do receptor, impedindo assim, a ligação do [³H]-SCH23390, que fica livre. O mesmo foi feito com relação ao receptor D₂, mas neste caso foi utilizado o butaclamol, um antagonista de receptores dopaminérgicos, também com o intuito de determinar as ligações não-específicas. Esses ligantes livres são retirados do filtro através de lavagens sucessivas, e a radioatividade é, então, contada por cintilação líquida.

- Procedimento experimental

Logo após a dissecação das áreas cerebrais em gelo, como mencionado anteriormente, foram feitos homogenatos a 10 % em tampão tris-HCl 50 mM, pH 7,4.

Os homogenatos contendo 50-100 µg de proteína foram incubados em tampão tris-HCl modificado (50 mM, pH 7,4). No caso dos receptores D₁-símile o tampão continha 0,1515 a 7,58 nM de [³H]-SCH 23390 para experimentos de saturação e 7,58 nM para experimentos de ponto único. No caso dos receptores D₂-símile o tampão continha 10 µM de mianserina (incubada por 30 minutos à temperatura ambiente) para bloquear os receptores serotoninérgicos e 0,2358 a 4,72 nM de [³H]-espiroperidol para experimentos de saturação e 3,77 para experimentos de ponto único. Em ambos os ensaios, os respectivos ligantes eram incubados na presença e na ausência de dopamina 100 µM (durante 10 minutos), no caso dos receptores D₁, ou butaclamol 10 µM, no caso dos receptores D₂ sendo o volume final do ensaio de 0,2 mL.

Após incubação a 37 °C durante 60 minutos, a reação foi terminada por filtração à vácuo através de filtros Whatman GF/B. Os discos de papel de filtro foram lavados três vezes

com 4 mL de solução salina 0,9 % gelada, secos a 60 °C por no mínimo 2 h e colocados em frascos de vidro (*vials*) contendo 3 mL de um coquetel de cintilação líquida contendo tolueno.

A radioatividade foi medida em um contador de cintilação líquida Beckman LS-6500 com a eficiência de 61 %. O *binding* específico foi calculado como *binding* total menos o *binding* não-específico feito na presença de dopamina 100 µM ou butaclamol 10 µM, respectivamente para os receptores D₁ e D₂, e os resultados foram expressos como fentomoles por miligrama de proteína. A concentração de proteína foi determinada segundo o método de LOWRY (1951), utilizando-se BSA como padrão.

- Soluções reagentes

⇒ [³H]-espiroperidol (114 Ci/mmol, Amersham Biosciences)

5 µL de [³H]-espiroperidol foram diluídos em tampão tris-HCl, pH 7,4, de forma a obter uma concentração final de 43,28 nM.

⇒ [³H]-SCH 23390 (87 Ci/mmol, Amersham Life Science)

5 µL de [³H]-SCH 23390 foram diluídos em tampão tris HCl, pH 7,4 de forma a obter uma concentração final de 11,5 nM

⇒ Tampão Tris-HCl

6 g de Tris-HCl (trizma base, Sigma, Brasil) foram diluídos em 1000 mL de água bidestilada, obtendo-se uma concentração de 50 mM. O pH foi ajustado com solução HCl 0,1 N (MERCK, Rio de Janeiro, Brasil) para pH 7,4.

⇒ Tris HCl modificado

NaCl 120 mM; KCl 1mM; CaCl₂ 2 mM; MgCl₂ 1 mM, NaEDTA 1 mM e ascorbato sódico 1 mM foram dissolvidos em tampão tris-HCl 50 mM pH 7,4

⇒ Mianserina

Mianserina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi diluída em tampão tris-HCl obtendo-se uma concentração final de 10 µM.

⇒ **Dopamina (cloridrato de dopamina)**

10 mg de dopamina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foram diluídas em 2 mL de tampão tris-HCl não modificado tendo uma concentração final de 5 mg/ml. A esta solução foi acrescentado ácido ascórbico 0,1 %.

⇒ **Butaclamol (Cloridrato de butaclamol (+)-)**

Butaclamol (RBI, MA, USA) foi dissolvido em ácido ascórbico a 0,1% de forma a se obter uma concentração final de 10 µM.

⇒ **Coquetel de cintilação**

0,5 g de p-bis-2-(5-feniloxazolil) benzeno, POPOP (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 4,0 g de 2,5-difeniloxazol, PPO (Sigma, St. Louis, MO, USA) foram dissolvidos em 1000 mL de tolueno (Beckman, Fullerton, CA, USA).

9.3 Determinação dos receptores serotoninérgicos 5HT₂

Método

O ligante [³H]-espiroperidol é um antagonista dopaminérgico que possui alta afinidade pelos receptores D₂-símile, possuindo também afinidade pelos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₂ (TERAI et al., 1989; KESSLER et al., 1991). Para bloquear os receptores dopaminérgicos foi utilizado um agonista, a dopamina.

A ciproheptadina, um antagonista serotoninérgico, foi adicionada na forma não marcada, nos *brancos* dos ensaios para receptor 5HT₂ para determinar a radioatividade de *background* ou ligações não-específicas, em uma concentração elevada para interagir com os mesmos sítios de ligação do receptor, impedindo assim, a ligação do [³H]-espiroperidol, que fica livre. Esses ligantes livres são retirados do filtro através de lavagens sucessivas, e a radioatividade é, então, contada por cintilação líquida

Procedimento experimental

Tecidos cerebrais de 3 animais formando um *pool* foram utilizados para experimentos de ponto único e saturação (*Scatchards*). O tecido foi homogeneizado em 2 ml de tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,4. O homogenato a 10 % foi centrifugado por 15 min a 20.000 X g a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o decantado foi lavado 3 vezes com o mesmo volume de tampão Tris-HCl 0,05 M. O decantado final foi ressuspensão em 0,3 ml do mesmo tampão para determinação subsequente da ligação do [³H]-espiroperidol. Como descrito anteriormente no método dos receptores D₂-símile, o referido ligante tem afinidade por receptores D₂ e 5HT₂ e foi utilizado para determinação destes últimos de acordo com o método descrito por PEROUTKA & SNYDER (1979), com algumas modificações. No ensaio as membranas (0,3–0,5 mg de proteína) são incubadas com tampão Tris- HCl (pH 7,4) com a seguinte composição: ácido ascórbico 0,1 %, NaCl 120 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM, na presença de [³H]-espiroperidol 4,72 nM e dopamina 100 µM para bloquear receptores D₂-símile. A ligação inespecífica foi definida pela adição de ciproheptadina 100 µM. O tempo de incubação foi 30 min a 37 °C, e o volume final de 0,2 ml. Para experimentos de saturação as concentrações usadas de [³H]-espiroperidol variaram de 0,5 a 5 nM.

Após incubação a reação foi terminada por filtração a vácuo através de filtros Whatman GF/B. Os filtros foram lavados três vezes com 4 ml de solução salina 0,9 % gelada, secos a 60 °C por no mínimo 2 h e colocados em frascos de vidro (*vials*) com 3 ml de um coquetel de cintilação líquida contendo tolueno.

A radioatividade foi medida em um contador de cintilação líquida Beckman LS-6500 com uma eficiência de 61 %. A ligação específica foi calculada como a ligação total menos a ligação não-específica feita na presença de ciproheptadina 100 µM. Os resultados foram expressos como fentomoles por miligrama de proteína. A concentração de proteína foi determinada segundo o método de LOWRY et al. (1951) utilizando-se BSA como padrão.

Soluções reagentes

⇒ [³H]-espiroperidol (114 Ci/mmol, Amersham Biosciences)

5 μ L de [3 H]-espiroperidol foram diluídos em tampão tris-HCl , pH 7,4, de forma a obter uma concentração final de 43,28 nM.

⇒ **Tampão Tris-HCl**

6 g de Tris-HCl (trizma base, Sigma, Brasil) foram diluídos em 1000 mL de água bidestilada, obtendo-se uma concentração de 50 mM. O pH foi ajustado com solução HCL 0,1 N (MERCK, Rio de Janeiro, Brasil) para pH 7,4.

⇒ **Tris HCl modificado**

NaCl 120 mM; KCl 1mM; CaCl₂ 2 mM; MgCl₂ 1 mM, NaEDTA 1 mM e ascorbato sódico 1 mM foram dissolvidos em tampão tris-HCl 50 mM pH 7,4.

⇒ **Dopamina (cloridrato de dopamina)**

10 mg de dopamina (Sigma) foram diluídas em 2 mL de tampão tris-HCl não modificado tendo uma concentração final de 5 mg/mL. A esta solução foi acrescentado ácido ascórbico 0,1 %.

⇒ **Ciproheptadina**

16,2 mg de ciproheptadina forma dissolvidos em 5 mL de água destilada para obtenção de uma solução de 1 mM.

⇒ **Coquetel de cintilação**

0,5 g de p-bis-2-(5-feniloxazolil) benzeno, POPOP (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 4,0 g de 2,5-difeniloxazol, PPO (Sigma, St. Louis, MO, USA) foram dissolvidos em 1000 mL de tolueno (Beckman, Fullerton, CA, USA).

9.4 Preparo das membranas para determinação dos receptores gabaérgicos e glutamatérgicos

Os homogenatos (*pool* de 3 animais) foram preparados em 2 mL de solução de sacarose 0,32 M de acordo com o método descrito por VOGEL & VOGEL (1997). Os homogenatos foram centrifugados a 20.000 Xg por 10 min a 4 °C e os decantados suspensos em água destilada, e centrifugados a 20.000 X g por 15 min a 4 °C. Os decantados resultantes

foram suspensos em tampão Tris-HCl 50 mM gelado e centrifugados a por mais 15 min a 4 °C, ressuspensos em Triton X-100 0.05%, e incubados por 15 min a 37 °C. Após incubação, a amostra foi lavada por 2 vezes em tampão Tris-HCl 50 mM a 4 °C e centrifugada a 20.000 Xg por 15 min. O decantado final foi, então suspenso em 0,3 ml de tampão Tris-HCl 50 mM.

9.5 Determinação dos receptores gabaérgicos e glutamatérgicos

Método

Para a determinação dos receptores GABAérgicos e glutamatérgicos foram utilizados os ligantes inespecíficos [³H]-GABA e [³H]-ácido glutâmico, respectivamente, os quais são agonistas de todos os receptores GABAérgicos e glutamatérgicos. Para os brancos dos experimentos foram utilizados o antagonista muscimol (no caso do receptor GABAérgico) e o agonista glutamato (no caso do receptor glutamatérgico).

Procedimento experimental

Receptores GABAérgicos e Glutamatérgicos

Para a detreminação dos receptores GABAérgicos homogenatos (0,05 mL) contendo 0,3-0,5 mg de proteína foram incubados em tampão tris-HCl contendo 50 nM de [³H]-GABA (4-amino-n-[2,3-³H]butyric acid - 81 Ci/mmol, Amersham pharmacia biotech) para os ensaios de ponto único e 10-200 nM para os experimentos de saturação na presença e na ausência de muscimol (100 mM) em um volume final de 0,1 mL.

No caso dos receptores glutamatérgicos o ensaio de ligação foi feito ao se incubar 0,05 mL das preparações de membrana (0,3-0,5 mg protein) com [³H]-ácido glutâmico (L-[G-³H] glutamic acid - 49 Ci/mmol, Amersham pharmacia biotech) 50 nM para experimentos de ponto único e 50-200 nM para experimentos de saturação em um volume final de 0,2 mL. O *binding* inespecífico foi determinado na presença de ácido glutâmico (1 mM) para o *binding* glutamatérgico. O tempo de incubação foi de 30 min a 37 °C.

Após os tempos de incubação, a reação foi terminada por filtração a vácuo através de filtros Whatman GF/B. Os filtros foram lavados três vezes com 4 mL de solução salina 0,9 % gelada, secos a 60 °C por no mínimo 2 h e colocados em frascos de vidro (*vials*) com 3 mL de um coquetel de cintilação líquida contendo tolueno.

A radioatividade foi medida em um contador de cintilação líquida Beckman LS-6500 com uma eficiência de 61 %. A ligação específica foi calculada como a ligação total menos a ligação não-específica feita na presença de muscimol 100 mM para os receptores GABAérgicos e ácido glutâmico (1 mM) para o binding glutamatérgico os resultados foram expressos como fentomoles por miligrama de proteína. A concentração de proteína foi determinada segundo o método de LOWRY et al. (1951) utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

Soluções reagentes

⇒ [³H]-GABA (4-amino-n-[2,3-³H]ácido butírico)

19 µL de [³H]-GABA foram diluídos em 381 µL de tampão tris-HCl, pH 7,4, de forma a obter uma concentração final no ensaio de 50 nM.

⇒ [³H]-ácido glutâmico (L-[G-³H] ácido glutâmico)

11 µL de [³H]-ácido glutâmico foram diluídos em 589 µL de tampão tris-HCl, pH 7,4, de forma a obter uma concentração final no ensaio de 50 nM.

⇒ Muscimol 100 µM

4,5 µl (88 mM) de muscimol foram diluídos em 400 µl de tampão tris-HCl.

⇒ Ácido glutâmico (1 mM)

1,471 mg de L-glutamato foram diluídos em 1 mL de tampão (0,01 M). Desta solução foram retirados 100 µl e rediluídos para 900 µl de tampão (solução 1 mM)

⇒ Sacarose 0,32 M

109,5 g de sacarose foram pesados e diluídos para 1000 mL de água destilada. A solução foi armazenada a 4 °C e usada nesta temperatura para o preparo dos homogenatos.

⇒ Triton – X 100 0,05 %

0,05 mL do triton X 100 foram diluídos em 99,95 mL de água destilada.

⇒ Tampão Tris-HCl

6 g de Tris-HCl (trizma base, Sigma, Brasil) foram diluídos em 1000 mL de água bidestilada, obtendo-se uma concentração de 50 mM. O pH foi ajustado com solução HCl 0,1 N (MERCK, Rio de Janeiro, Brasil) para pH 7,4.

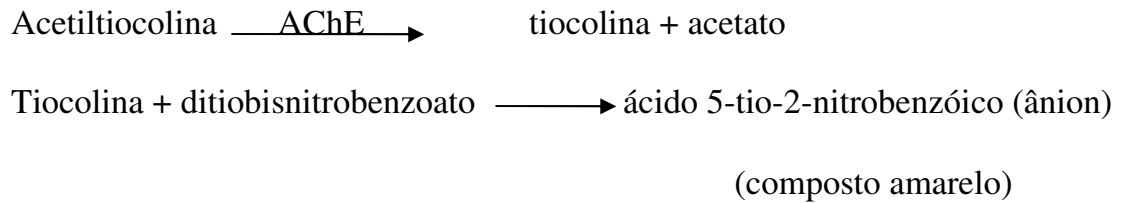
⇒ Coquetel de cintilação

0,5 g de p-bis-2-(5-feniloxazolil) benzeno, POPOP (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 4,0 g de 2,5-difeniloxazol, PPO (Sigma, St. Louis, MO, USA) foram dissolvidos em 1000 mL de tolueno (Beckman, Fullerton, CA, USA).

10 Determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase

Método

A atividade da acetilcolinesterase cerebral (AChE) foi medida de acordo com o método descrito por ELLMAN et al. (1961). O método é baseado na medida da velocidade de produção da tiocolina à proporção que a acetiltiocolina (ATC), utilizada como substrato, é hidrolisada. Isto é acompanhado pela reação contínua do tiol com o íon 5:5'-ditio-bis-2 nitrobenzoato, para produzir o ânion amarelo do ácido 5-tio-2nitrobenzóico. A atividade enzimática foi medida através da variação da absorbância, durante 3 minutos, sendo a reação linear durante pelo menos 10 minutos. As leituras das absorbâncias foram feitas em 412 nm. A atividade específica foi expressa em nmoles de ATC hidrolisado por miligrama de proteína por minuto.

Reação:**Procedimento experimental**

Os tecidos (CE e CPF) foram homogeneizados em tampão fosfato (pH 8,0; 0,1 M) 10 % e o homogenato (5 µL) foi adicionado a uma cubeta contendo 500 µL do tampão, 895 µL de água destilada e 50 µL de ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB) 0,01M e a absorbância zerada. Após a absorbância ser deixada em zero a cubeta foi retirada e acrescentado iodeto de acetiltiocolina 0,075 M e a absorbância foi registrada por 3 min em 412 nM. A atividade da enzima foi calculada como modificações na absorbância do minuto 3 para o minuto 0, relativo ao conteúdo de proteína contido no homogenato (Lowry et al., 1951). O procedimento completo foi feito em um espectrofotômetro Beckman DU 640B ajustado para um comprimento e onda de 412 nM.

Soluções reagentes

- ⇒ **Solução do ácido 5-tio-2 nitrobenzóico, DTNB** (Sigma, St Louis, MO, USA) em 10 mM de tampão fosfato de sódio

- ⇒ **Solução de iodeto de acetiltiocolina, ATC** (Sigma, St Louis, MO, USA) 75 mM em água bidestilada

- ⇒ **Tampão fosfato de sódio: NA_2HPO_4** (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 0,1 N em água bidestilada, pH 8,0.

Cálculo:

Δ densidade ótica (DO)/ 4 min

coeficiente de extinção do ânion amarelo formado – 0,0136 μ M

quantidade de tecido – determinação da proteína Lowry

volume final na cubeta – 1,5 mL

$$\frac{\Delta (\text{DO}) / 4 \text{ min}}{0,0136} \times 1,5 = \text{Atividade da AChE em nmoles/ mg de tecido/ min}$$

11 Determinação da atividade da catalase**Método**

A atividade da catalase foi medida pelo método que usa o peróxido de hidrogênio para gerar H₂O e O₂ (MAEHLI & CHANCE, 1954). Desta forma a atividade da catalase foi medida pelo grau desta reação de transformação.

Procedimento experimental

Imediatamente após dissecação das áreas cerebrais o corpo estriado e córtex pré-frontal foram homogeneizados em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,0 a 10 % (peso/volume). O primeiro passo para determinação da atividade da catalase é o preparo do meio de reação que é constituído por 9 mL de peróxido de hidrogênio diluído em água destilada (1/1000) em 0,5 mL de tampão tris-HCl 1 M EDTA 5mM, pH 8 e 0,5 mL de água destilada. A amostra (20 μ L) após centrifugada a 10.000 Xg por 5 min foi adicionada a 980 μ L do meio de reação. Após 1 min, a absorbância inicial foi registrada e a final foi lida após 6 min. O comprimento de onda utilizado foi de 230 nm. A curva padrão foi feita utilizando catalase purificada (Sigma, MO, USA) sob condições idênticas às do ensaio. As proteínas foram determinadas utilizando o método de LOWRY et al. (1951).

Soluções reagentes

⇒ H₂O₂ diluído

10 µL de peridol 30 % foram diluídos em água destilada q.s.p. 10 ml.

⇒ Tampão tris-HCl 1M EDTA 5mM

Foram pesados 12,11 g de trizma base e 0,1861 g de EDTA e diluídos para 100 mL de água destilada e o pH foi ajustado para 8,0 com ácido clorídrico

12 Dosagem de nitrito/nitrato (GREEN et al., 1981)

Método

O reativo de Griess (N-1-naftiletilenodiamina a 0,1 % em água, sulfanilamida 1 % em ácido fosfórico 5 %) revela a presença de nitrito em uma amostra (urina, plasma, homogenato tecidual) por uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor róseo, com um pico de absorbância em 560 nm.

Procedimento experimental

Para a realização do ensaio foram usados 100 µL do reagente de Greiss e adicionados 100 µL do sobrenadante (centrifugado) do homogenato a 10 % das áreas cerebrais dos camundongos em salina ou 100 µL dos padrões nas várias concentrações. Para o branco foram usados 100 µL do reagente de Greiss e adicionados 100 µL de salina. A leitura da absorbância foi feita em 560 nm por espectrofotometria. As leituras da absorbância dos padrões (y) foram plotadas contra as concentrações de cada padrão (x), então se determinou a equação da reta, que foi usada para a determinação da concentração de cada amostra.

Soluções reagentes

⇒ **NEED 0,1 % (N-1-naftiletilenodiamina)**

0,1 g de N-1-naftiletilenodiamina (Sigma, EUA) foram diluídos em 100 mL de água destilada.

⇒ **Ácido fosfórico 5 %**

5 ml do ácido fosfórico (Sigma, EUA) foram diluídos para um volume final de 100 mL em balão volumétrico.

⇒ **Sulfanilamida 1 % em ácido fosfórico 5 %**

1 g de sulfanilamida (Sigma, EUA) foram dissolvidos em um volume final de 100 mL de ácido fosfórico.

⇒ **Reagente de uso (Reagente de Greiss)**

Misturaram-se partes iguais de NEED 0,1 %, água bidestilada, sulfanilamida a 1 % e ácido fosfórico a 5 % (1:1:1:1).

⇒ **Padrão**

Foi preparada uma solução de NaNO_2 estoque (10 mM em tampão). Foram feitas diluições em série e usadas na obtenção da curva padrão (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 1,32, 0,75 μM).

13 Avaliação da peroxidação lipídica (dosagem de malonildialdeído)

Método

A peroxidação lipídica é uma das mais importantes expressões orgânicas do estresse oxidativo induzido pela reatividade de radicais livres do oxigênio. O método mais empregado para a determinação do MDA em amostras biológicas é baseado na sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Nesta reação, duas moléculas de TBA reagem

estequiometricamente com uma molécula de MDA para formar uma solução de cor rosa, que tem absorvância máxima em pH ácido em 532 a 535 nm. O coeficiente de extinção deste cromóforo num comprimento de onda de 535 nm e pH 1,0 é de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. O método utilizado neste experimento foi descrito por HUANG et al. (1998).

Procedimento experimental

As áreas cerebrais CE e CPF foram homogeneizadas a 10 % em uma solução de cloreto de potássio 1,19 % gelada.

Após obtenção dos homogenatos 125 µL de cada homogenato foi adicionado a 225 µL de tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,4 e a 125 µL de um sistema catalisador contendo sulfato ferroso e ácido ascórbico em um tubo de ensaio. Esta mistura foi incubada a 37 °C por 30 min. Esta reação foi interrompida pela adição de 250 µL de ácido tricloroacético 10 % e em seguida centrifugada a 3000 rpm por 15 min. Após centrifugação o sobrenadante foi separado e acrescido a este 250 µL de ácido tiobarbitúrico 0,8 %. Após agitação essa mistura foi mantida em Banho Maria com água fervente (100 °C) por 15 min e logo em seguida à retirada do Banho Maria foi colocada em um banho de gelo para o retorno da reação à temperatura ambiente. A leitura foi feita em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 532 nm. Como padrão foram utilizadas várias concentrações de MDA (0,627 a 16,77 µmol). Os resultados foram expressos como µmol/mg de proteína.

Soluções reagentes

⇒ Solução de Cloreto de Potássio (KCl) 1,15 %

2,3 g de cloreto de potássio (Reagen, RJ, Brasil) foram diluídos para um volume final de 200 mL de água destilada.

⇒ Tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM

1,36 mg de KH_2PO_4 (Reagen, RJ, Brasil) foram dissolvidos em 1000 mL de água destilada e o pH ajustado para 7,4.

⇒ Sistema catalisador

Este sistema é formado pela mistura de partes iguais de duas substâncias que são preparadas isoladamente. A- FeSO_4 0,01M foi preparada pela pesagem de 0,2780 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e dissolução em 100 ml de água destilada. B- Ácido ascórbico foi preparado pela dissolução de 1,761 mg de ácido ascórbico (Sigma, EUA) em 100 mL de água destilada.

⇒ Padrão

Foi preparada uma solução 0,1 mM de malonildialdeído (MDA) em tampão KCl 1,15 %. Diferentes volumes desta solução perfazendo concentrações entre 0,627 e 16,8 μmol foram utilizadas para a obtenção de uma curva padrão de MDA.

14 Dosagem de proteína (método de Lowry)

- Método

A quantidade de proteína em homogenatos de cérebro foi determinada a 25 °C utilizando albumina sérica bovina como padrão, de acordo com o método previamente descrito (LOWRY et al., 1951), que utiliza duas reações de formação de cor para analisar a concentração proteica fotometricamente. Inicialmente é feita uma reação biureto de baixa eficiência na qual os íons de cobre alcalino produzem uma cor azulada na presença de ligações peptídicas. Esta cor biureto é característica de todas as proteínas e fornece uma cor básica de fundo para a próxima etapa de ensaio. Depois o método emprega uma mistura complexa de sais inorgânicos, o reagente Folin-Ciocalteau que produz uma cor verde azulada intensa na presença de tirosina ou triptófano livres ou ligados a proteínas. Como as quantidades desses dois aminoácidos são geralmente constantes nas proteínas solúveis, com poucas exceções, a cor das reações (verde-azulada) é indicativa da presença de proteína e a intensidade da cor proporcional à concentração. Esta coloração foi medida em 750 nm, através de espectrofotômetro Beckman DU 640B.

- Soluções reagentes

⇒ **Reagente A:** Na_2CO_3 (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 2 % em NaOH (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) 0,1 N;

⇒ **Reagente B:** $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,5 % em $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Grupo Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 1 %;

⇒ **Reagente C:** Solução de cobre alcalino (24 mL do reagente A com 1 mL do reagente B, misturados no momento de usar);

⇒ **Reagente de Folin** - Ciocalteau - Fenol (Labordin, Piraquara, PR, Brasil), 1:1 em água bidestilada;

⇒ **Solução de albumina sérica bovina** (Sigma, St Louis, MO, USA) 1 mg/mL em água bidestilada.

15 Análises estatísticas

A análise dos *Scatchards* foi feita através do programa GraphPad InStat tm., GraphPad software V 2.05., Copyright (c). Os resultados que obedeciam a uma distribuição paramétrica foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) com teste de Student Newman Keuls (*post hoc*) pelo programa GraphPad Prism versão 3.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA. Copyright (c) 1994-1999 por GraphPad Software. Os dados não paramétricos (percentagens) foram analisados pelo mesmo programa utilizando o teste do qui-quadrado. O mesmo programa (GraphPad Prism©) foi utilizado para confecção dos gráficos apresentados neste trabalho. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas a partir de $p < 0,05$.

CAPÍTULO 1

DETERMINAÇÃO DA DOSE CONVULSIVANTE DE COCAÍNA E ESTUDO DAS MANIPULAÇÕES FARMACOLÓGICAS DE DIVERSOS SISTEMAS NEUROTRANSMISSORES NAS CONVULSÕES INDUZIDAS POR OVERDOSE DE COCAÍNA EM CAMUNDONGOS

Introdução

O uso da cocaína tem sido constantemente associado à ocorrência de efeitos tóxicos. Há relatos de convulsões associadas ao uso da droga por aproximadamente um século (BOSE, 1902; PULAY, 1922). Em particular, a incidência de convulsões associadas com a ingestão de grandes doses tem aumentado significativamente nos últimos anos (WETLI & MITTLEMAN, 1981; JONSSON et al., 1983; MYERS & EARNEST, 1984; LOWENSTEIN et al., 1987; ALLREDGE et al., 1989; CHONG-KWONG & LIPTON, 1989; FARRAR & KEARS, 1989; CONWAY et al., 1990; PASCUAL-LEONE et al., 1990).

A ação farmacológica central de drogas convulsivantes parece ser mediada primariamente por mecanismos envolvendo o complexo ionóforo benzodiazepina/GABA-Cl⁻ e/ou complexo ionóforo NMDA-Ca⁺⁺. Os efeitos tóxicos e algumas vezes fatais da cocaína são frequentemente relacionados à excitação do SNC, a qual é constantemente manifestada pela ocorrência de convulsões.

A cocaína produz efeitos tóxicos e uma variedade de outros efeitos fisiológicos e comportamentais através da sua interação com vários sítios receptores do SNC. É bem conhecido que a cocaína inibe a captação neuronal de dopamina (DA), noradrenalina (NA) e serotonina (5HT) e que os transportadores para estes neurotransmissores são marcados pela [³H]-cocaína (REITH et al., 1983; MADRAS et al., 1989). Além disso, outros estudos de receptores mostraram que a (-)-cocaína interage com receptores colinérgicos muscarínicos e sigma no cérebro (SHARKEY et al., 1988a,b). Finalmente, é amplamente reconhecido que os potentes efeitos anestésicos da cocaína são mediados primeiramente por interações com canais de sódio.

Trabalhos anteriores (RITZ & GEORGE, 1992) tentaram elucidar quais sítios de ligação estariam mais relacionados com a ação convulsivante da cocaína. Para isto utilizaram análise de sítios múltiplos procurando identificar entre os transportadores de DA, NA e 5HT, receptores sigma e receptores colinérgicos M₁ e M₂ quais os envolvidos com o início das convulsões induzidas por cocaína. Os resultados mostraram que o transportador de 5HT era o sítio primário da ação convulsivante da droga e observou-se que quanto maior a afinidade dos compostos relacionados testados à cocaína, como norcocaína (metabólito da droga),

tropococaína, procaína, cloroprocaína, dentre outros, pelo transportador de 5HT maior era a potência pró-convulsivante. Além disso, os achados deste estudo sugeriram que a ligação a sítios receptores sigma e muscarínicos atenuavam as propriedades convulsivantes da cocaína e dos compostos relacionados à droga (RITZ & GEORGE, 1992). Especialmente, quanto maior a ligação das drogas cocaína-símile aos receptores sigma, ou muscarínicos M₁ ou M₂, menos potentes eram estes compostos na produção das convulsões.

Assim, enquanto o início da atividade convulsivante poderia depender primariamente da afinidade da cocaína por sítios de ligação associados ao transportador de 5HT, a ocorrência eventual de uma convulsão parecia depender de uma soma final das interações da cocaína, não apenas com o sistema serotoninérgico, mas também com os sistemas neuronais sigma e muscarínico. Outros resultados de trabalhos anteriores também indicaram que as interações da cocaína com canais de sódio ou com sítios de ligação dopaminérgicos e noradrenérgicos não estavam associados com os efeitos convulsivantes de drogas psicoestimulantes (RITZ & GEORGE, 1992). Porém, estes achados prévios devem ser considerados com cautela, visto que foram derivados de análise correlacional entre estudos de *binding* e estudos comportamentais.

Apesar dos efeitos da cocaína sobre a captação da dopamina estarem bem estudados, os fatores fisiológicos que afetam a liberação e captação da DA nas terminações nervosas não estão claramente definidos. Por exemplo, existem evidências de uma variedade de experimentos que sugerem a participação de aminoácidos excitatórios no mecanismo de liberação de dopamina no corpo estriado (CHERAMY et al., 1986; CARTER et al., 1988; FREED & CANNON-SPOOR, 1990). Várias desordens no SNC, tais como convulsões e isquemia cerebral, são atribuídas a uma superestimulação do receptor NMDA por aminoácidos excitatórios. Isto promove uma concentração intracelular excessiva de íons cálcio o que pode culminar com morte celular (MAYER & MILLER, 1990; YOUNG & FAGG, 1990).

Neste capítulo procurou-se estudar a influência de manipulações farmacológicas na iniciação das convulsões induzidas por cocaína. Como algumas das drogas escolhidas também são utilizadas no tratamento de patologias associadas ao vício pela cocaína, também

neste capítulo é analisado a influência destas drogas nas convulsões e morte induzidas por cocaína.

OBJETIVOS

O presente capítulo tem como objetivo:

- Determinar a dose convulsivante e letal da cocaína a ser utilizada em todo o estudo;
- Investigar através de manipulações farmacológicas os possíveis sítios que possam estar relacionados à iniciação das convulsões induzidas por cocaína;
- Avaliar os possíveis riscos resultantes da exposição dos viciados a medicações utilizadas no tratamento de patologias causadas pelo abuso da cocaína, como antidepressivos, antipsicóticos, ansiolíticos e estabilizadores do humor.

RESULTADOS

1. DETERMINAÇÃO DA CURVA DOSE-RESPOSTA PARA AS CONVULSÕES E MORTE INDUZIDAS POR COCAÍNA

Cinco doses de cocaína foram utilizadas para a determinação da curva dose-resposta da droga para a indução de convulsões e morte. Após administração intraperitoneal de cocaína nas respectivas doses os animais foram observados por 30 min para a determinação da latência para o início das convulsões e incidência de morte. Este tempo de observação (30 min) foi escolhido baseado em trabalhos anteriores que mostraram que a percentagem de convulsões e letalidade que ocorre nos 15 ou até 60 min após a injeção da droga não é diferente (RITZ & GEORGE, 1992; 1997a,b). No presente estudo foi observado que 90 % das convulsões e morte ocorriam 4 - 15 min após a administração da droga. Desta forma o tempo de observação definido foi de 30 min para prover uma margem de segurança maior.

A **Tabela 1-1** mostra que as doses mais baixas de cocaína 10 e 30 mg/kg não foram hábeis na indução de convulsões. A dose de 60 mg/kg produziu convulsões em 40 % dos animais, porém nenhuma morte, enquanto doses mais altas como 90 e 120 mg/kg produziram convulsões em todos os animais (100 %). Assim, a dose de 90 mg/kg foi escolhida para realização deste trabalho pois esta induziu convulsões em 100 % dos animais dos quais 40 % morreram, o que se encaixava bem no objetivo geral do nosso trabalho, ou seja, estudar as convulsões e morte induzidas por cocaína. A dose de 120 mg/kg não foi escolhida porque induziu a morte em 100 % dos animais.

Tabela 1-1 Efeito da administração de diferentes doses de cocaína na indução das convulsões e morte em camundongos

Dose de cocaína (mg/kg de peso)	% Convulsão	% de morte
10	0	0
30	0	0
60	40	0
90	100	40
120	100	100

Os animais foram tratados de forma aguda, intraperitonealmente com as doses supracitadas e após administração observados durante 30 minutos para a ocorrência de convulsões e morte. A dose grifada em vermelho corresponde à que foi escolhida para uso durante todo o estudo. Foram utilizados uma média de 10 animais por dose testada.

2. MANIPULAÇÕES FARMACOLÓGICAS DAS CONVULSÕES E MORTE INDUZIDAS POR *OVERDOSE* DE COCAÍNA

Na segunda parte dos experimentos, uma série de estudos farmacológicos foram executados para a avaliação da potenciação ou antagonismo das convulsões induzidas por *overdose* de cocaína por drogas que interferem em diferentes sistemas neurotransmissores do SNC, com o objetivo de verificar um possível envolvimento destes nas convulsões e morte induzidas por cocaína.

A cocaína (90 mg/kg, i.p.) induziu a primeira convulsão $232,3 \pm 13,4$ segundos após a administração da droga. Dos 50 animais estudados todos apresentaram convulsões clônicas generalizadas com estado de mal epilético e 60 % destes sobreviveram a estas convulsões. Não foram observadas convulsões do tipo tônico. Todos os animais utilizados neste estudo foram observados por 15, 30 ou 60 min após o pré-tratamento com as drogas mencionadas no item 3 da Metodologia (dependendo de cada intervalo entre a administração da droga a ser estudada e a cocaína, como mencionado no **Quadro III-2**). Nenhum animal apresentou comportamento convulsão-símile antes da injeção de cocaína.

2.1 ESTUDO DO EFEITO DE DROGAS QUE INTERFEREM COM A NEUROTRANSMISSÃO GABAÉRGICA SOBRE AS CONVULSÕES E MORTE INDUZIDAS POR *OVERDOSE* DE COCAÍNA

Os resultados apresentados na **Tabela 1-2** indicam que estimulações na função neuronal GABAérgica atenuaram as convulsões e que doses mais altas interferiram com a morte induzida por cocaína. O pré-tratamento com diazepam na menor dose 3 mg/kg reduziu em 37,5 % ($p < 0,05$) a percentagem de animais que convulsionaram, não interferindo com a latência de convulsão (cocaína- $232,3 \pm 13,4$ seg; diazepam 3 mg/kg- $265,9 \pm 49,2$ seg). Os animais tratados com as doses mais altas de diazepam 10 e 15 mg/kg apresentaram aumentos na latência da primeira convulsão de 49,2 e 233 %, respectivamente (cocaína - $232,3 \pm 13,4$ seg; diazepam 10 mg/kg - $346,6 \pm 51,3$ seg; diazepam 15 mg/kg - $773,6 \pm 118,6$ seg), bem

como reduziram em 66,6 ($p < 0,05$) e 41,7 % ($p < 0,001$) a percentagem de animais que convulsionaram relativamente às doses de 10 e 15 mg/kg. Na sobrevivência só houve alteração na dose de 15 mg/kg onde foi observado que todos os animais sobreviveram com a administração desta dose de diazepam antes da cocaína.

O fenobarbital foi mais efetivo que o diazepam na inibição das convulsões induzidas por cocaína. Na dose de 10 mg/kg houve redução de 37,5 % do número de animais que convulsionaram, enquanto nenhum outro parâmetro foi alterado nesta dose. Entretanto a dose de 50 mg/kg mostrou ser a mais potente, visto que apenas um animal dos oito estudados apresentou convulsão e morte após administração da cocaína. Portanto os números apresentados na Tabela 1-2 fazem referência a este animal.

A gabapentina, um anticonvulsivante lançado mais recentemente no mercado não mostrou habilidade em alterar a latência das convulsões (cocaína- $232,3 \pm 13,4$ seg; gabapentina 50 mg/kg- $215,2 \pm 37,4$ seg; gabapentina 100 mg/kg- $239,4 \pm 14,6$ seg; gabapentina 150 mg/kg- $169 \pm 23,4$ seg), mas reduziu o número de animais que convulsionaram em 37,5 % ($p < 0,0001$), 45,5 % ($p < 0,001$) e 50 % ($p < 0,0001$), respectivamente em relação às doses de 50, 100 e 150 mg/kg, bem como aumentou a percentagem de sobrevivência em 27,5 % ($p < 0,05$) e 40 % ($p < 0,01$) com as doses de 50 e 100 mg/kg, respectivamente, efeito não observado com a maior dose (150 mg/kg).

Tabela 1-2 Efeito do pré-tratamento com drogas gabaérgicas sobre as convulsões induzidas por cocaína 90 mg/kg em camundongos.

Mecanismo de Ação	Droga	Dose mg/kg	Latência de convulsão (Seg)	% animais que convulsionam	% sobrevivência	Número de Animais / grupo
	Cocaína	90	232,3 ± 13,4	100	60	50
Agonista do Receptor BZD	Diazepam	3	265,9 ± 49,2	62,5 ^a	84,6	16
		10	346,6 ± 51,3*	44,4 ^a	70	15
		15	773,6 ± 118,6 ****	58,3 ^c	100 ^b	12
Análogo do GABA	Fenobarbital	10	146,6 ± 14,6	62,5 ^d	62,5	8
		50	-	12,5 ^d	87,5 ^a	8
		50	215,2 ± 34,7	62,5 ^d	87,5 ^a	8
	Gabapentina	100	239,4 ± 14,6	54,5 ^c	100 ^b	18
		150	169,0 ± 23,4	50 ^d	75	8

Os camundongos foram tratados agudamente com as drogas (via I.P.) nas dosagens mostradas na Tabela, e 30 ou 60 min (gabapentina) após foram administrados com cocaína 90 mg/kg, i.p. Após o tratamento com cocaína os animais foram observados por 30 min para a determinação da latência de convulsão e morte. Os resultados foram expressos como média ± EPM do número de animais/grupo mostrados na tabela. Os resultados da latência de convulsão estão expressos em segundos (seg) e os demais como percentagem (sobrevivência e animais que convulsionaram).

* p< 0,05 e ****p< 0,001, vs cocaína. Anova e teste de Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

^ap< 0,05, ^bp<0,01, ^cp< 0,001, ^dp< 0,0001 vs cocaína. Teste do Qui-quadrado.

2.2 ESTUDO DO EFEITO DE DROGAS QUE INTERFEREM COM AS NEUROTRANSMISSÕES DOPAMINÉRGICA E MUSCARÍNICA SOBRE AS CONVULSÕES E MORTE INDUZIDAS POR *OVERDOSE* DE COCAÍNA

A **Tabela 1-3** mostra que a pimozida, um antagonista do receptor dopaminérgico D₂ produziu uma exacerbação das convulsões induzidas por cocaína com a maior dose estudada (20 mg/kg), tendo variado apenas a latência para o início das convulsões com redução de 33,9 % (cocaína- 232,3 ± 13,4 seg; pimozida 10 mg/kg- 199 ± 18,5 seg; pimozida 20 mg/kg- 153,6 ± 12,4 seg). Ocorreu um aumento na percentagem de sobrevivência de 25,7 % com a dose de 10 mg/kg e uma redução de 22,5 % na percentagem de sobrevivência com a dose 20 mg/kg, mas não foi significativo.

O antagonista do receptor D₁ SCH 23390, produziu um aumento na latência de convulsão de 96,5 % em relação à cocaína (cocaína – 232,3 ± 13,4 seg; SCH 23390 0,1 mg/kg – 456,5 ± 55,2 seg). Esta droga também aumentou em 40 % (p< 0,05) a sobrevivência dos animais e reduziu em 16,7 % (p< 0,05) a percentagem de animais que convulsionou, na única dose estudada deste antagonista.

O antagonista do receptor M₁ pirenzepina reduziu a latência da convulsão nas duas menores doses estudadas em 39,8 e 43,5 %, respectivamente em relação às doses de 10 e 20 mg/kg (cocaína- 232,3 ± 13,4 seg; pirenzepina 10 mg/kg- 139,8 ± 19,4 seg; pirenzepina 20 mg/kg- 131,3± 3,2 seg; pirenzepina 40 mg/kg – 169,6 ± 8,1 seg) daqueles animais que convulsionaram. Esta droga, porém, reduziu a percentagem dos animais do grupo que convulsionaram em 45,5 % com a dose de 10 mg/kg (p< 0,0001), 27,3 % na dose de 20 mg/kg (p< 0,0001) e 37,5 % na dose de 40 mg/kg (p< 0,0001) e não interferiu com a percentagem de sobrevivência dos animais.

Tabela 1-3 Efeito do pré-tratamento com drogas dopaminérgicas e muscarínicas nas convulsões induzidas por cocaína 90 mg/kg em camundongos.

Mecanismo de Ação	Droga	Dose Mg/kg	Latência de convulsão (Seg)	% animais que convulsionam	% sobrevivência	Número de Animais / grupo
	Cocaína	90	232,3 ± 13,4	100	60	50
Antagonista D₂	Pimozida	10	199 ± 18,5	100	85,7	7
		20	153,6 ± 12,4*	100	37,5	8
Antagonista D₁	SCH 23390	0,1	456,5 ± 55,2*	83,3 ^a	100 ^a	12
Antagonista M₁	Pirenzepina	10	139,8 ± 19,4*	54,5 ^b	54,5	11
		20	131,3 ± 3,2*	72,7 ^b	63,6	11
		40	169,6 ± 8,1	62,5 ^b	50	8

Os camundongos foram tratados agudamente com as drogas (via I.P.) nas dosagens mostradas na Tabela, e 30 min após foram administrados com cocaína 90 mg/kg, i.p. Após o tratamento com cocaína os animais foram observados por 30 min para a determinação da latência de convulsão e morte. Os resultados foram expressos como média ± EPM do número de animais/grupo mostrados na tabela. Os resultados da latência de convulsão estão expressos em segundos (seg) e os demais como percentagem (sobrevivência e animais que convulsionaram).

*p < 0,05 vs cocaína. ANOVA com teste de Student Newman Keuls *post hoc*

^ap < 0,05, ^bp < 0,0001 vs cocaína. Teste do Qui-quadrado.

2.3 ESTUDO DO EFEITO DE DROGAS QUE INTERFEREM COM A NEUROTRANSMISSÃO SEROTONÉRGICA SOBRE AS CONVULSÕES E MORTE INDUZIDAS POR *OVERDOSE* DE COCAÍNA

A fluoxetina um inibidor da recaptção de serotonina, como mostrado na **Tabela 1-4** na menor dose estudada, 10 mg/kg reduziu em 40 % ($p < 0,0001$) a percentagem dos animais que manifestaram convulsões. O aumento da dose da fluoxetina, entretanto, causou uma redução na latência das convulsões em 43,2 % e 67 %, respectivamente em relação às doses de 20 e 40 mg/kg (cocaína- $232,3 \pm 13,4$ seg; fluoxetina 20 mg/kg- $131,9 \pm 17,2$ seg; fluoxetina 40 mg/kg- $76,6 \pm 4,6$ seg). A percentagem de sobrevivência também reduziu em 37,8 % ($p < 0,05$), chegando a zero com a dose de 40 mg/kg ($p < 0,01$). A buspirona, um agonista parcial do receptor $5HT_{1A}$ não interferiu com a latência das convulsões (cocaína- $232,3 \pm 13,4$ seg; buspirona 5 mg/kg- $257,7 \pm 18,9$ seg; buspirona 10 mg/kg- $222,6 \pm 32,1$ seg). A dose de 5 mg/kg aumentou a sobrevivência dos animais em 28,9 % ($p < 0,05$). Buspirona 10 mg/kg ao contrário da menor dose reduziu em 30 % a sobrevivência dos animais, porém este valor não foi significativo em relação aos animais tratados apenas com cocaína.

A mianserina (antagonista do receptor $5HT_2$) levou a uma redução significativa na latência das convulsões em torno de 33 % com as três doses estudadas (cocaína- $232,3 \pm 13,4$ seg; mianserina 10 mg/kg- $163,9 \pm 14,6$ seg; mianserina 20 mg/kg- $146,9 \pm 14,7$ seg; mianserina 40 mg/kg- $152,9 \pm 14,8$ seg). Porém na maior dose estudada dos 9 animais do grupo um não convulsionou (resultado não significativo). Esta droga nas menores doses (10 e 20 mg/kg) reduziu de forma significativa a percentagem de animais que sobreviveram.

A imipramina, um inibidor do transportador de noradrenalina e serotonina causou um aumento da sobrevivência dos animais de 27,5 % ($p < 0,05$) na dose de 5 mg/kg, entretanto com a maior dose (10 mg/kg) provocou uma redução na latência das convulsões em 41 % (cocaína- $232,3 \pm 13,4$ seg; imipramina 5 mg/kg- $212,3 \pm 30,1$ seg; imipramina 10 mg/kg- $137,3 \pm 13,1$ seg).

Tabela 1-4 Efeito do pré-tratamento com drogas serotoninérgicas nas convulsões induzidas por cocaína 90 mg/kg em camundongos.

Mecanismo de Ação	Droga	Dose mg/kg	Latência de convulsão (Seg)	% animais que convulsionam	% sobrevivência	Número de Animais / grupo
	Cocaína	90	232,3 ± 13,4	100	60	50
Transportador de 5HT	Fluoxetina	10	189,2 ± 37,9	60 ^c	60	10
		20	131,9 ± 17,2*	100	22,2 ^a	9
		40	76,6 ± 4,6***	100	0 ^b	8
Agonista 5HT_{1A}	Bupirona	5	257,7 ± 18,9	100	88,9 ^a	9
		10	222,6 ± 32,1	100	30	10
		10	163,9 ± 14,6*	100	20 ^a	15
Antagonista 5HT₂	Mianserina	20	146,9 ± 14,7*	100	26,3 ^a	24
		40	152,9 ± 14,8*	88,9	37,5	9
		5	212,3 ± 30,1	87,5	87,5 ^a	8
Transportador de NA e 5HT	Imipramina	10	137,3 ± 13,1*	100	42,9	7

Os camundongos foram tratados agudamente com as drogas (via I.P.) nas dosagens mostradas na Tabela, e 15 (mianserina e fluoxetina) ou 30 min após foram administrados com cocaína 90 mg/kg, i.p. Após o tratamento com cocaína os animais foram observados por 30 min para a determinação da latência de convulsão e morte. Os resultados foram apresentados como média ± EPM do número de animais/grupo mostrados na tabela. Os resultados da latência de convulsão estão expressos em segundos (seg) e os demais como percentagem (sobrevivência e animais que convulsionaram).

*p < 0,05, ***p < 0,001 vs cocaína. ANOVA com teste de Student Newman Keuls *post hoc*

^ap < 0,05, ^bp < 0,01, ^cp < 0,0001 vs cocaína. Teste do Qui-quadrado

2.4 ESTUDO DO EFEITO DE DROGAS QUE INTERFEREM COM A NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA (RECEPTORES NMDA) E OPIÓIDE SOBRE AS CONVULSÕES E MORTE INDUZIDAS POR *OVERDOSE* DE COCAÍNA

O N-metil-D-aspartato (NMDA) na dose de 20 mg/kg diminuiu a latência das convulsões em 32,7 % (cocaína- $232,3 \pm 13,4$ seg; NMDA 20 mg/kg- $156,3 \pm 18,5$ seg) como observado na **Tabela 1-5**. A droga também reduziu em 47,5 % a sobrevivência dos animais. O antagonista do receptor NMDA, cetamina, na dose de 20 mg/kg não interferiu com a latência das convulsões, mas reduziu em 60 % ($p < 0,001$) a percentagem dos animais que convulsionaram, bem como aumentou a sobrevivência em 40 % ($p < 0,001$), ou seja, todos os animais sobreviveram quando a cetamina 20 mg/kg foi administrada antes da cocaína. A dose de 30 mg/kg aumentou a latência para a primeira convulsão em 138 %, e também em 28,9 % a percentagem de sobrevivência dos animais (cocaína- $232,3 \pm 13,4$ seg; cetamina 20- $179,3 \pm 44$ seg; cetamina 30- $553,7 \pm 116,8$ seg).

O antagonista opióide naltrexone reduziu em torno de 38 % a latência da convulsão induzida por cocaína com as duas doses usadas, 25 e 50 mg/kg. Um outro parâmetro afetado pelo pré-tratamento com esta droga foi a sobrevivência dos animais. Na dose de 25 mg/kg ocorreu uma redução de 30 % porém não significativa estatisticamente na sobrevivência dos animais, enquanto a dose de 50 mg/kg provocou uma redução de 40 % ($p < 0,05$) na sobrevivência dos animais.

O pré-tratamento com a droga estabilizante do humor, lítio, não interferiu com a latência das convulsões (cocaína- $232,3 \pm 13,4$ seg; lítio 56,3 mg/kg- $156,2 \pm 31,7$ seg; lítio 112,5 mg/kg- $190 \pm 12,2$ seg), nem com a sobrevivência dos animais, mas reduziu de forma significativa, nas duas doses estudadas a percentagem de animais que convulsionaram.

Tabela 1-5 Efeito do pré-tratamento com drogas com ação nos receptores glutamatérgicos NMDA, sistema opióide e inositol nas convulsões induzidas por cocaína 90 mg/kg em camundongos

Mecanismo de Ação	Droga	Dose mg/kg	Latência de convulsão (Seg)	% animais que convulsionam	% sobrevivência	Número de Animais / grupo
	Cocaína	90	232,3 ± 13,4	100	60	50
Agonista NMDA	NMDA	20	156,3 ± 18,5*	100	12,5 ^a	8
Antagonista NMDA	Cetamina	20	179,3 ± 44	40 ^c	100 ^b	10
		30	553,7 ± 116,8***	88,9	88,9 ^a	9
Antagonista Opióide	Naltrexone	25	148,9 ± 14,7**	100	30	10
		50	140,7 ± 13,6**	100	20 ^a	10
Estabilizante do humor	Lítio	56,3	156,2 ± 31,7	71,4 ^b	71,4	7
		112,5	190 ± 12,2	86,1 ^a	47	36

Os camundongos foram tratados agudamente com as drogas (via I.P.) nas dosagens mostradas na Tabela, e 30 min após foram administrados com cocaína 90 mg/kg, i.p. Após o tratamento com cocaína os animais foram observados por 30 min para a determinação da latência de convulsão e morte. Os resultados foram apresentados como média ± EPM do número de animais/grupo mostrados na tabela. Os resultados da latência de convulsão estão expressos em segundos (seg) e os demais como percentagem (sobrevivência e animais que convulsionaram).

* p < 0,05, ** p < 0,001, *** p < 0,0001 vs cocaína. Anova e teste de Student Newman Keuls como teste *post hoc*

^a p < 0,05, ^b p < 0,001, ^c p < 0,0001 vs cocaína. Teste do Qui-quadrado.

DISCUSSÃO

As doses das drogas utilizadas neste capítulo foram determinadas por curva dose-resposta, no caso da cocaína (**Tabela 1-1**) e através de amplo levantamento bibliográfico, nos demais casos. Estas doses não são equivalentes àquelas utilizadas por humanos, visto que os camundongos têm taxas metabólicas mais altas. Porém, a dose de cocaína usada neste estudo resulta em níveis sanguíneos da droga que no camundongo são funcionalmente similares àqueles encontrados nas situações de *overdose* de cocaína em humanos, visto que os animais apresentaram comportamento semelhante aos humanos vítimas de *overdose*.

A escolha das drogas utilizadas neste capítulo foi baseada na necessidade de se determinar quais os principais sistemas relacionados às ações tóxicas da cocaína, neste caso, convulsões e morte. São drogas que interferem em diversos sistemas, visto que o mecanismo das convulsões induzidas por cocaína ainda não foi totalmente elucidado e parece ser multimediado. Outro motivo importante é que intervenções farmacológicas são de grande valia no tratamento do abuso da cocaína, particularmente para reverter efeitos agudos do uso da droga (tratamento da intoxicação por cocaína), tratamento das patologias associadas ao uso da droga ou para reduzir o desejo pela droga ou bloquear a euforia causada pela mesma. Neste capítulo, portanto foram testadas drogas que são utilizadas na clínica médica para o tratamento de patologias relacionadas ao abuso de cocaína, como depressão, ansiedade, mania, esquizofrenia, e desta forma, também foi objetivo secundário avaliar se a exposição de droga aditos em tratamento com estas drogas, à cocaína poderia levar a quadros de *overdose*. Os resultados relativos aos efeitos de drogas ansiolíticas, antidepressivas, antipsicóticas e estabilizantes do humor nas convulsões e morte induzidas por cocaína apresentados neste capítulo foram recentemente publicados (MACÊDO et al., 2004c).

As primeiras hipóteses atribuíam as propriedades convulsivas da cocaína aos efeitos desta nos canais de sódio voltagem dependente. Dando suporte a isto, foi mostrado que a administração repetida de lidocaína, um anestésico local ausente de ações psicoestimulantes, também leva ao desenvolvimento de convulsões e produz sensibilização cruzada com a cocaína (MARGOLIS et al., 1993). ZHAI et al. (1997) evidenciaram que a administração de doses subconvulsivas de cocaína pode alterar as propriedades funcionais de canais de sódio voltagem dependente em neurônios piramidais hipocampais. Apesar do

envolvimento dos canais de sódio nas convulsões induzidas por cocaína, trabalhos mostram que anticonvulsivantes como a carbamazepina que interferem com os canais de sódio não foram eficientes na inibição das convulsões induzidas por cocaína, pelo contrário até potencializaram estas convulsões (WEISS et al., 1989).

Face ao que foi exposto com relação aos bloqueadores dos canais de sódio, se optou por não estudar este grupo de drogas neste capítulo. Ao contrário dos bloqueadores dos canais de sódio, as drogas com ação na neurotransmissão GABAérgica têm sido amplamente utilizadas no tratamento das convulsões de diversas origens. Dados recentes indicam que a inibição mediada pelo GABA é o principal alvo da ação central da cocaína que pode resultar em convulsões. Estudos eletrofisiológicos em neurônios hipocampais isolados mostraram que a cocaína em altas concentrações micromolares deprimiu de forma não competitiva as correntes do GABA na ausência e presença de tetrodotoxina, indicando que este efeito não foi mediado através de canais de sódio voltagem-dependente (YE et al., 1997, 1999). Com respeito à ação de neurotransmissores inibitórios esta parece não estar restrita aos receptores GABA_A, desde que a cocaína também reduz a corrente de íons cloreto induzida pela glicina em neurônios hipocampais (REN et al., 1999). Dados recentes mostram o envolvimento de receptores GABA_B nesta ação (GASIOR et al., 2004).

Os resultados apresentados na **Tabela 1-1** mostram que as drogas com ação na neurotransmissão GABAérgica são muito ativas na inibição das convulsões induzidas por cocaína. Estes resultados corroboram com estudos farmacológicos anteriores que mostram uma proteção significativa das convulsões induzidas por cocaína em ratos após o pré-tratamento com diazepam, fenobarbital e SKF- 1000330A, um inibidor da captação do GABA (DERLET & ALBERTSON, 1990; GASIOR et al., 1997; GASIOR et al., 1999b). Outros moduladores positivos do receptor GABA_A tais como neuroesteróides e clormetiazol protegeram camundongos contra as convulsões e letalidade induzidas por cocaína e também suprimiram o *kindling* (GASIOR et al., 1999; GASIOR et al., 2000a). GASIOR et al. (1999) avaliaram a eficácia de novas drogas anticonvulsivantes aprovadas para uso na prevenção das convulsões induzidas por cocaína. Estes pesquisadores mostraram que drogas que aumentaram a inibição neuronal medida pelo GABA inibiram de maneira distinta dos barbitúricos e benzodiazepínicos e ofereceram o melhor perfil protetor/comportamental de efeitos colaterais. Nossos resultados ao contrário dos referidos anteriormente (GASIOR et al., 1999), mostraram uma melhor proteção das convulsões pelo fenobarbital e diazepam. Como

anticonvulsivante de última geração utilizamos a gabapentina que produziu efeitos benéficos elevando a percentagem de sobrevivência dos animais para 100 % com a dose de 100 mg/kg e reduzindo em 50 % a percentagem dos animais que convulsionaram, embora não tenha interferido com a latência das convulsões. Vale salientar que drogas como o diazepam têm sido amplamente usadas no tratamento da síndrome de abstinência (incluindo aqueles caracterizados por agitação severa e excesso de catecolaminas) associados com outras drogas de abuso. Com relação à intoxicação por cocaína o diazepam também apresentou efeitos protetores quando administrada antes ou após a exposição à cocaína em humanos (PLATT, 1997).

Trabalhos recentes dão mais ênfase na interação da cocaína com alguns sistemas de neurotransmissores cerebrais. Por exemplo, alguns estudos farmacológicos demonstraram que as convulsões induzidas por cocaína foram inibidas por antagonistas do receptor 5HT₂ (O'DELL et al., 2000), agonistas do receptor GABA_A (GASIOR et al., 2000b) e antagonistas do receptor NMDA (USHIJIMA et al., 1998; POUW et al., 1999; BRACKETT et al., 2000), enquanto bloqueadores de canal de sódio e cálcio foram ineficientes. Um envolvimento de receptores dopaminérgicos (USHIJIMA et al., 1998), muscarínicos (RITZ & GEORGE, 1992, 1997) e sigma (BRAIDA et al., 1997), também foi proposto. Além disso, modificações adaptativas em vários sistemas neuronais que ocorrem após as convulsões estão sendo amplamente investigados.

Com relação à neurotransmissão dopaminérgica neste estudo observamos que antagonistas do receptor dopaminérgico D₂ reduziram a latência das convulsões bem como também reduziram a sobrevivência dos animais (não significativo), enquanto o antagonista D₁ SCH 23390 produziu um efeito contrário (proteção) aumentando a latência e sobrevivência dos animais de forma bastante eficiente. Os primeiros trabalhos relacionados a este assunto não associavam as convulsões e morte com os receptores dopaminérgicos (DERLET & ALBERTSON, 1990a; JACKSON et al., 1990). Mais recentemente estes receptores foram implicados nas convulsões induzidas por cocaína (USHIJIMA et al., 1998), bem como na letalidade (RITZ & GEORGE, 1997b). O envolvimento dos receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ com funções opostas nas convulsões não ocorre somente nas convulsões e morte induzidas por cocaína, mas também em relação ao modelo lítio-pilocarpina (BARONE et al., 1991). Esta potencialização das convulsões produzida pelo pimozide também é de importância

clínica, visto que esta droga bloqueou as propriedades de reforço da cocaína em ratos (YOKEL & WISE, 1975) e primatas não humanos (WOOVERTON, 1986). Portanto, pode ser um importante risco o tratamento de viciados com pimozide podendo ocorrer uma potenciação dos efeitos tóxicos da cocaína.

Trabalhos anteriores indicaram que a ligação da cocaína e compostos relacionados a receptores muscarínicos M_1 e M_2 ou receptores sigma pareciam estar associados com a atenuação da atividade convulsivante da cocaína (RITZ & GEORGE, 1993). Em nossos experimentos vimos que o pré-tratamento com a pirenzepina, um antagonista do receptor muscarínico M_1 reduziu a percentagem de animais que convulsionaram após tratamento com cocaína, mas em contrapartida reduziu a latência das convulsões daqueles animais que convulsionaram. Esta droga não apresentou eficácia na reversão da mortalidade associada com a cocaína.

Pesquisas anteriores mostraram que a pirenzepina é equipotente nos subtipos de receptores M_1 e M_4 (FERRARI-DILEO et al., 1994). Sabe-se que uma das funções do receptor M_4 é o aumento da liberação de glicina (RUSSO et al., 1993), a qual é amplamente reconhecida como o principal neurotransmissor inibitório no SNC de vertebrados, especialmente na medula espinhal (MCGEER & MCGEER, 1989). Da mesma forma que o GABA a glicina inibe o disparo de neurônios pela abertura de canais de Cl^- . A inibição da liberação de glicina pelo bloqueio do receptor M_4 pode contrapor os efeitos atenuadores das ações antagonistas da pirenzepina nos receptores M_1 e assim, com a maior ocupação do receptor M_4 , pode ocorrer uma potenciação das convulsões. Este mecanismo pode provavelmente explicar a redução na latência das convulsões observada em alguns animais desde que a própria cocaína também reduz a corrente de íons cloreto induzida pela glicina em neurônios hipocâmpais (REN et al., 1999). Com doses bem mais baixas que as utilizadas neste trabalho (0,3 mg/kg), RITZ & GEORGE (1997b) observaram uma proteção da morte pelo pré-tratamento com pirenzepina. Com doses mais altas como 1 mg/kg e 10 mg/kg, esta proteção não foi vista.

Alguns trabalhos (RITZ & GEORGE, 1997a; O'DELL et al., 2000) têm relacionado as convulsões induzidas por cocaína a um estímulo primário na neurotransmissão serotoninérgica. Considerando este aspecto, nossos resultados mostraram que os animais que

convulsionaram por cocaína apresentaram um aumento da serotonina em córtex pré-frontal, o que possivelmente pode ter contribuído para a atividade pró-convulsiva (**ver capítulo 2, Figura 2-3 e MACÊDO et al., 2004b**). O envolvimento da 5HT foi evidenciado neste estudo, visto que a fluoxetina, um inibidor da recaptação de serotonina potencializou as convulsões induzidas por cocaína nas duas maiores doses estudadas, causando com a maior dose (40 mg/kg), 100 % de morte, após associação com a cocaína.

Altas doses de fluoxetina estão associadas a efeitos epileptogênicos em humanos sem história prévia de desordens convulsivas (WERNICKE, 1985; STEINER & FONTAINE, 1986; WARE & STEWART, 1989). De fato, esta droga na dose mais baixa utilizada em nossos experimentos causou uma redução de 40 % nas convulsões induzidas por cocaína, mostrando um efeito protetor. A fluoxetina também é utilizada no tratamento da depressão (TAYLOR et al., 1994), desordens obsessivo-compulsivas (TOLLEFSON et al., 1994), desordens alimentares (WOOD 1993) e está sendo estudada no tratamento do vício por álcool (GORELICK & PAREDES, 1992, NARANJO et al., 1994). Em relação ao tratamento do abuso por cocaína, estudos animais mostraram uma redução na sensibilidade cerebral para a recompensa (LEE & KONERTSKY, 1998), e em humanos alguns estudos relataram resultados promissores em relação ao desejo pela droga (PLATT, 1997).

Um outro ponto importante a ressaltar é que há relatos de casos de uso inadequado e até mesmo abuso de fluoxetina em usuários experientes de drogas de abuso (GOLDMAN et al., 1990; TINSLEY et al., 1994). Face ao que foi visto nos nossos resultados, é importante para a clínica considerar que o uso concomitante destas duas drogas pode contribuir para possíveis manifestações de efeitos tóxicos da cocaína. Assim deve-se ter controle no uso de inibidores da recaptação de serotonina em pacientes com história de convulsões ou uso de cocaína.

A buspirona, uma droga ansiolítica cujo mecanismo de ação é mediado por sua ação agonista parcial no receptor 5HT_{1A}, e que desta forma reduz os níveis de serotonina, mostrou ter uma boa ação contra os sintomas de retirada da cocaína (GIANINI et al., 1993), bem como contra o pânico induzido por cocaína (LOUIE et al., 1996). Em nosso estudo a buspirona na dose de 5 mg/kg aumentou o número de animais que sobreviveram às convulsões induzidas por cocaína, protegendo, portanto, especificamente da letalidade

associada à *overdose* de cocaína. Também foi observado durante os experimentos que os animais pré-tratados com bupiriona 5 mg/kg apresentaram uma menor ocorrência de estado de mal epiléptico, sugerindo que o receptor 5HT_{1A} pode desempenhar um papel na manutenção da convulsão induzida por cocaína. De forma inversa na dose de 10 mg/kg ocorreu uma redução de 30 % embora não estatisticamente significativa na sobrevivência.

Outros estudos (DAVIES et al., 1987; ARANEDA & ANDRADE, 1991; BRANDAO et al., 1991; STEVENS et al., 1992) mostraram que os receptores da serotonina do tipo 5HT₂ fazem a mediação de respostas neuronais excitatórias, enquanto os receptores 5HT_{1A} produzem efeitos inibitórios nos mesmos neurônios. Portanto o aumento da sobrevivência pode estar relacionado com o efeito inibitório mediado pela ativação do receptor 5HT_{1A} pela bupiriona, enquanto o efeito letal observado com a maior dose deve ter ocorrido pela ação antagonista desta droga em receptores dopaminérgicos D₂ (LIMA et al., 2002). De fato, o resultado observado foi bastante semelhante ao visto em relação ao pimozide, uma droga antagonista D₂ em sua maior dose (redução da sobrevivência em 22,5 % porém não significativo). Vale ressaltar que a bupiriona se liga aos receptores dopaminérgicos D₂ menos avidamente do que aos receptores 5HT_{1A} (GARATTINI et al., 1982; RIBLET et al., 1982).

O'DELL et al. (2000), atribuíram a convulsão por cocaína a um estímulo no receptor 5HT₂. Entretanto, em nossos resultados, a mianserina não bloqueou as convulsões induzidas por cocaína. Pelo contrário, esta droga potencializou alguns parâmetros avaliados, melhorando apenas na maior dose estudada e ainda de forma não significativa, a percentagem de animais que convulsionaram. Trabalhos anteriores utilizando cinanserina e cetanserina, outros bloqueadores do receptor 5HT₂ conseguiram observar uma melhora nas convulsões chegando a zero com a maior dose de cetanserina, apesar de não ter havido melhora na letalidade associada com a cocaína (RITZ & GEORGE 1997a,b). Pode ser que este efeito dependa das características específicas de cada droga, visto que cetanserina e cinanserina protegeram das convulsões, enquanto que em nosso estudo a mianserina não protegeu. No capítulo 3 foi observado um grande aumento do receptor 5HT₂, principalmente no corpo estriado dos camundongos após a *overdose* de cocaína, portanto pode ser que a dose de mianserina utilizada não tenha sido suficiente para bloquear o receptor, visto que com o aumento da dose o efeito protetor começou a aparecer (dos nove animais tratados com

mianserina 40 mg/kg 1 animal não convulsionou) ou a afinidade do receptor pela droga (mianserina) tenha reduzido com a administração da cocaína.

A imipramina é um antidepressivo tricíclico que vem sendo estudado e associado à melhora dos sintomas de retirada e redução do desejo pela cocaína, facilitando desta forma a abstinência (GAWIN & ELLINWOOD, 1988). Esta droga também diminui os sintomas depressivos de usuários crônicos de cocaína (GIANINI et al., 1986). O mecanismo de ação da imipramina envolve a inibição não seletiva da captação de NA e 5HT, sendo mais ativa, entretanto na inibição da captação de NA (RANG et al., 2004). De fato, os resultados apresentados no capítulo 2 do presente trabalho e recentemente publicados (MACÊDO et al., 2004b) mostram um aumento nos níveis de NA em CPF de camundongos após o EME induzido pela cocaína e no CE após a morte. Podemos especular desta forma, que altos níveis de NA, juntamente com 5HT contribuem para os efeitos tóxicos da cocaína, visto que a 5HT apresentou aumento no CPF após EME. A dose mais baixa de imipramina (5 mg/kg) causou ao contrário um aumento significativo na sobrevivência dos animais em 27,5 % , bem como dos 8 animais pré-tratados com esta droga um não convulsionou (resultado não significativo). Estes resultados também sugerem que até certo ponto o aumento de NA pode proteger das convulsões, resultados também observados nas convulsões desencadeadas por outros agentes convulsivantes (YAN et al., 1993).

Parece que apenas altos níveis destas monoaminas estão relacionados à potenciação das convulsões. Desta forma mecanismos noradrenérgicos podem estar envolvidos na regulação das convulsões induzidas por cocaína. Assim, o propranolol, antagonista do receptor β e ioimbina antagonista do receptor α_2 potencializam as convulsões induzidas por cocaína, bem como a letalidade. Por outro lado, a clonidina (agonista α_2) e prazosin (antagonista α_1) suprimem os efeitos convulsivantes da cocaína. Isto indica que o estímulo de receptores α_1 e α_2 facilitam e inibem, respectivamente as convulsões induzidas por cocaína (DERLET & ALBERTSON, 1990; TELLA et al., 1992). Estes dados sugerem um importante papel dos receptores α nas convulsões induzidas por cocaína. Embora altas doses de imipramina estejam por si só associadas à ocorrência de convulsões, as doses utilizadas neste trabalho foram as referidas na literatura quando desejado o efeito antidepressivo da droga. Também não foi vista nenhuma alteração comportamental dos animais no período de observação antes da administração da cocaína.

O sistema glutamatérgico foi também implicado nas propriedades aditivas da cocaína e parece ter um importante papel nos efeitos tóxicos da droga (ROCKHOLD et al., 1991; WITKIN & TORTELLA, 1991; ITZHAK & STEIN, 1992). Dentre os diferentes receptores glutamatérgicos, o receptor NMDA está de maneira importante envolvido com os sistemas cardiovascular, respiratório e neural (OLNEY, 1986; WEST & HUANG, 1994; BERGER et al., 1995), todos os quais estando seriamente comprometidos após a *overdose* de cocaína. USHIJIMA et al. (1998) contrariamente aos nossos resultados observaram que baixas doses de NMDA (10 e 20 mg/kg, i.p.) não afetaram a convulsão por cocaína, enquanto os antagonistas competitivos, CPP e não competitivos MK801, conseguiram reverter estas convulsões.

Em nosso caso, o NMDA reduziu a latência das convulsões e a sobrevivência dos animais, influenciando, portanto, tanto na convulsão como na morte. Sabe-se que o receptor NMDA contém vários antagonistas e sítios modulatórios que podem funcionar como alvos para farmacoterapias: o sítio de ligação do glutamato, sítio do co-agonista glicina, sítios com o ionóforo e sítios de moduladores alostéricos (BIGGE, 1993). Por esta complexidade do receptor, foi visto que moduladores positivos do receptor como as poliaminas, agravam as convulsões por cocaína (SHIMOSATO et al., 1997), enquanto bloqueadores do canal e antagonistas do sítio receptor de glicina do receptor NMDA atenuam a toxicidade comportamental induzida por cocaína (DERLET & ALBERTSON, 1990; ROCKHOLD et al., 1991; WITKIN & TORTELLA, 1991; ITZHAK & STEIN, 1992).

Considerando estes dados, no presente trabalho foi estudada a cetamina, um anestésico dissociativo que afeta a atividade glutamatérgica por bloqueio do receptor NMDA (ELLISON, 1995), nas convulsões induzidas por cocaína. A cetamina mostra afinidade similar pelo receptor NMDA, sítios de ligação D₂, com menor afinidade para os sítios 5HT₂. A cetamina no presente estudo melhorou alguns parâmetros relacionados à convulsão e letalidade induzidas por cocaína. Esta droga na menor dose estudada (20 mg/kg) elevou a sobrevivência dos animais para 100 %, reduzindo em 60 % o número de animais que convulsionaram. A maior dose estudada aumentou a latência das convulsões em 138 %, aumentando também a sobrevivência dos animais. Esta droga alterou também o padrão da

convulsão, visto que a maior parte dos animais não chegou a apresentar convulsão clônica propriamente dita, mas apenas a corrida selvagem (*wild running*) (dados não mostrados).

Dados anteriores (KOEK et al., 1989) mostraram que a cetamina também foi hábil em antagonizar as convulsões induzidas por NMDA e a dose que mostrou melhor efeito neste estudo foi a de 80 mg/kg, uma dose muito alta, que induziu convulsões em 20 % dos animais tratados durante o período de 15 min que antecedia a administração do NMDA. É importante ressaltar que as doses escolhidas para este trabalho de tese foram doses sub-anestésicas, que não produziram alterações comportamentais nos animais antes da administração da cocaína.

O naltrexone, uma antagonista opióide não-seletivo reduziu a latência das convulsões e a percentagem de sobrevivência dos animais em ambas as doses estudadas quando administrado de forma aguda antes da cocaína. Trabalhos anteriores mostram que o naltrexone quando administrado por via intracerebroventricular durante 9 dias atenuou os parâmetros observados nas convulsões (percentagem de animais que convulsionaram e latência para a primeira convulsão) a partir do terceiro até o último dia de administração (BRAIDA et al., 1997). Como em nosso caso a administração foi aguda isto pode ter influenciado nos resultados negativos observados. Os antagonistas de receptores opióides modificam os efeitos da cocaína em muitos paradigmas. Estes incluem, embora não sejam limitados a: auto-administração de cocaína (CARROLL et al., 1986), *place preference* condicionado (SHIPPENBERG & HEIDBREder, 1995), atividade locomotora (JONES & HOLTZMAN, 1994) e sensibilização comportamental induzida por cocaína (SALA et al., 1995). Os resultados destes estudos referidos anteriormente evidenciam o papel de opióides endógenos no desenvolvimento e/ou expressão de algumas ações da cocaína.

O carbonato de lítio foi introduzido neste estudo por ser o protótipo das drogas estabilizantes do humor usado para o tratamento do distúrbio bipolar. Em estudos anteriores esta droga se mostrou benéfica no tratamento do abuso da anfetamina (FLEMENBAUM, 1974) e da cocaína (CRONSON & FLEMENBAUM, 1978). Nossos resultados indicaram que o carbonato de lítio reduziu o número de animais que convulsionaram em ambas as doses estudadas de forma significativa, não alterando latência nem sobrevivência dos animais. Este resultado mostra um envolvimento do lítio com a inibição da promoção da convulsão e foi surpreendente, visto que o lítio potencializa as convulsões induzidas por pilocarpina, um

agonista muscarínico, reduzindo em até mais de 10 vezes a dose desta droga necessária para a indução de convulsões (CLIFFORD et al., 1987; PERSINGER et al., 1988).

O efeito benéfico do lítio quando administrado antes da cocaína pode ter ocorrido porque a cocaína, ao contrário da pilocarpina produz uma inibição (antagonismo) de receptores muscarínicos no coração e cérebro de ratos com maior afinidade para o receptor M_2 do que para o M_1 (SHARKEY et al., 1988; SOUSA et al., 1999). Além do mais tudo indica que o lítio reduz a afinidade da cocaína pelo transportador de serotonina, por uma ação direta neste transportador e de outros cátions, dentre os quais Na^+ , K^+ , Rb^+ e Cs^+ (NI et al., 2002). Vale ressaltar que neste estudo apenas o lítio produziu este efeito, o que pode justificar a ação protetora do lítio nas convulsões induzidas por cocaína.

De maneira geral tudo indica que as convulsões e letalidade induzidas por cocaína são multimediadas e, portanto envolvem diferentes sistemas de neurotransmissão, mas que nem sempre os mesmos sistemas estão envolvidas nas convulsões e letalidade. Neste trabalho vimos que drogas que interferem com as neurotransmissões GABAérgica, dopaminérgica, receptores NMDA e opióides interferem nas convulsões e morte. Considerando a neurotransmissão serotoninérgica tudo indica haver um envolvimento do receptor $5HT_{1A}$ apenas na letalidade associada à cocaína, enquanto a fluoxetina que aumenta níveis de 5HT mostrou interferir com convulsões e letalidade. Com relação ao lítio este parece interferir apenas com as convulsões.

Deste estudo se pode ressaltar a importância da cautela com o manuseio de drogas que são utilizadas no tratamento de psicopatologias associadas ao abuso da cocaína como fluoxetina, imipramina, pimozide e naltrexone e que interferiram com as convulsões e morte induzidas por cocaína. Vale salientar que o efeito maléfico (na maioria das vezes) apareceu com as doses mais altas das drogas, ou seja, o efeito foi dose-relacionado. Embora os resultados sejam provenientes de estudos com animais (camundongos) e as doses não sejam equivalentes às utilizadas por humanos, é de suma importância a realização de estudos específicos (clínicos) destas drogas em humanos. Enquanto isso não é feito, muito cuidado deve ser tomado quando da utilização destes medicamentos por usuários de cocaína em tratamento (abstinência), visto que uma recaída ao uso da droga poderá trazer prejuízos que podem ser fatais.

CAPÍTULO 2

DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MONOAMINAS E SEUS METABÓLITOS APÓS AS CONVULSÕES E MORTE INDUZIDAS POR OVERDOSE DE COCAÍNA EM CORPO ESTRIADO E CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE CAMUNDONGOS

INTRODUÇÃO

A literatura contém muitos estudos compreendendo os efeitos tóxicos da cocaína, mas apesar disso não existem ainda tratamentos disponíveis para a *overdose* da droga e dentro desta situação (*overdose*) as convulsões parecem ser o problema mais importante. Em ratos, convulsões (TELLA et al., 1992), ou a ação sinérgica de convulsões e depressão respiratória (TSENG et al., 1992) são as mais importantes causas da morte induzida pela cocaína. De acordo com RITZ & GEORGE (1992) a cocaína produz estes efeitos tóxicos e uma variedade de outros efeitos fisiológicos e comportamentais através de interação com vários e distintos sítios receptores no sistema nervoso central. Está bem estabelecido que a cocaína inibe a recaptação neuronal de monoaminas, como DA, NA e 5HT, e que os transportadores destes neurotransmissores parecem se ligar à [³H]-cocaína (CALLIGARO & ELDEFRAWI, 1988; MADRAS et al., 1989). A NA e DA estão implicadas no controle da excitabilidade neuronal durante o episódio epiléptico em modelos animais. WEINSHENCKER & SZOT (2002) chamaram atenção para o fato de que a NA é conhecida como modulador da suscetibilidade à convulsão em modelos animais de epilepsia por mais de 40 anos, e em alguns casos o seu efeito é dramático como aumento da imunorreatividade do Fos ou expressão do RNAm ligado a este fator, vista no Locus Ceruleus (LC) após a convulsão induzida por muitos estimulantes. Apesar disso, a NA não tem recebido destaque como outros neurotransmissores, tais como glutamato e GABA.

Vários estudos descreveram o envolvimento da neurotransmissão dopaminérgica no controle de convulsões generalizadas. A possibilidade do agravamento das convulsões pela modificação da atividade de estruturas dos núcleos da base foi observada por DERANSART et al. (2000). O corpo estriado dorsal está sob o controle de dois principais impulsos de entrada: um glutamatérgico proveniente principalmente do córtex cerebral e do tálamo, e um dopaminérgico proveniente da substância negra *pars compacta* e da área tegmental ventral. Em contraste, o *core* do núcleo *accumbens* recebe impulsos glutamatérgicos de entrada do córtex pré-frontal e tálamo, bem como de estruturas límbicas tais como hipocampo e amígdala, e impulsos dopaminérgicos de entrada principalmente da área tegmental ventral (HEIMER et al., 1995). Portanto, o corpo estriado e córtex pré-frontal são áreas que apresentam uma importante interação e merecem estudo com relação à convulsão. Além disso, o papel do corpo estriado na mediação da modulação dopaminérgica das convulsões

está de acordo com o efeito anticonvulsivante observado após injeções intraestriatais de agonistas D₂ em alguns modelos de convulsões (AL-TAJIR & STARR, 1991; TURSKI et al., 1988; WAHNSCHAFF & LOSCHER, 1991).

Em relação à 5HT, os resultados obtidos por RITZ & GEORGE (1997a,b) indicam que manipulações da função de neurônios serotoninérgicos podem potencializar ou atenuar o efeito convulsivante da cocaína, onde drogas que aumentam a neurotransmissão serotoninérgica, potencializam as convulsões induzidas por cocaína, enquanto drogas que bloqueiam o receptor 5HT₂ da serotonina inibem a convulsão (RITZ & GEORGE 1997a). Este sistema neurotransmissor parece, de acordo com alguns pesquisadores (RITZ & GEORGE, 1997a; O'DELL et al., 2000), ser o mais importante em relação às convulsões induzidas pela cocaína.

OBJETIVOS

Considerando a relevância das monoaminas (NA, 5HT e DA) nas ações da cocaína, e observando que estas também exercem um importante papel nas convulsões de um modo geral, e na convulsão induzida por cocaína, como visto no capítulo anterior (capítulo 1), o objetivo do presente capítulo foi investigar as alterações que ocorrem a nível de monoaminas (NA, 5HT e DA) e de seus metabólitos (DOPAC, HVA e 5HIAA) após o estado de mal-epiléptico (EME) e morte induzidos por *overdose* de cocaína em corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos.

RESULTADOS

1 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE DOPAMINA (DA) E SEUS METABÓLITOS (DOPAC E HVA), SEROTONINA (5-HT) E SEU METABÓLITO (5-HIAA) EM CORPO ESTRIADO DE CAMUNDONGOS APÓS ESTADO DE MAL EPILÉPTICO (EME) E MORTE INDUZIDOS POR *OVERDOSE* DE COCAÍNA.

A **Figura 2-1** mostra os efeitos do EME e morte induzida por cocaína sobre os níveis de DA e seus metabólitos em corpo estriado de camundongos. Nos animais EME ocorreu uma diminuição de 40 % nos níveis de DA (controle (n= 8): $2432 \pm 230,5$; EME (n= 8): $1455 \pm 96,5$ ng/g de tecido, $p < 0,01$), enquanto nada ocorreu nos animais morte, relativo a esta monoamina (controle (n= 8): $2432 \pm 230,5$; morte (n= 5): $2213 \pm 308,7$ ng/g de tecido). Um aumento de 92 % nos níveis de DOPAC (controle (n= 8): $533,2 \pm 66,8$; EME (n= 8): $565 \pm 56,4$; morte (n= 5): $1027 \pm 148,4$ ng/g de tecido, $p < 0,01$), ocorreu apenas nos animais que morreram após a convulsão, enquanto HVA aumentou (cerca de 140 %) em ambas condições estudadas (controle (n= 8): $245 \pm 27,7$; EME (n= 8): $602,8 \pm 63,7$; morte (n= 5): $584,3 \pm 67,1$ ng/g de tecido, $p < 0,01$).

Nem a 5HT, nem o seu metabólito (5HIAA) foram significativamente alterados no corpo estriado (5HT- controle (n= 8): $642,2 \pm 69,6$; EME (n= 8): $500,1 \pm 43,6$; morte (n= 5): $628,5 \pm 51,7$ ng/g de tecido; 5HIAA- controle (n= 8): $240,3 \pm 33,5$; EME (n= 8): $234,2 \pm 29,7$; morte (n= 5): $162 \pm 17,5$ ng/g de tecido). Uma redução de 52 % nos níveis de NA foi observada após EME (controle (n= 8): 1435 ± 179 ; EME (n= 8): $683,9 \pm 67,8$ ng/g de tecido, $p < 0,01$) e um aumento de 43 % ocorreu após a morte (43%) (controle (n= 8): 1435 ± 179 ; morte (n= 5): 2059 ± 144 ng/g de tecido, $p < 0,05$) (**Figura 2-2**).

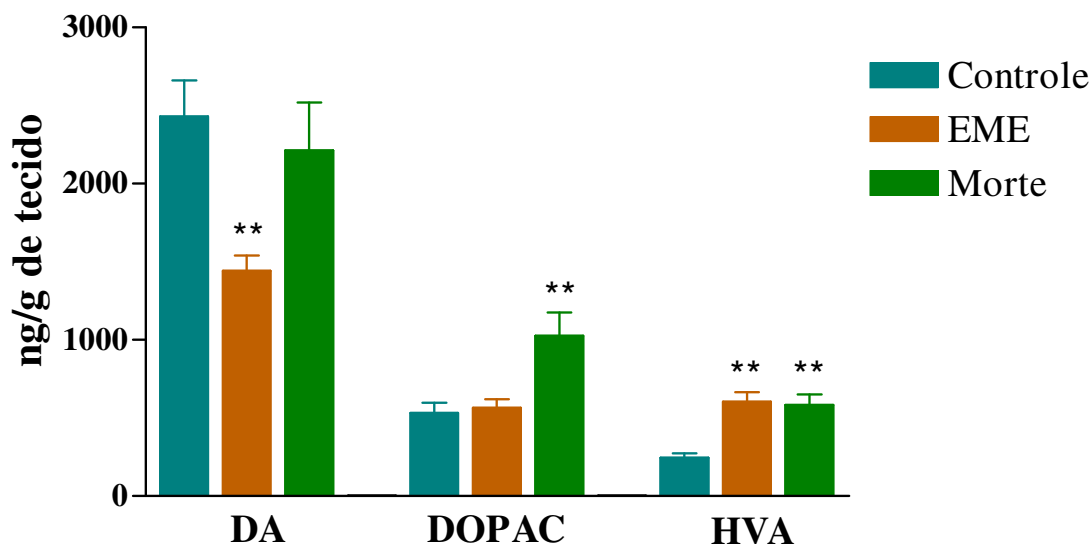


Figura 2-1 Determinação dos níveis de DA e seus metabólitos (DOPAC e HVA) em corpo estriado de camundongos após estado de mal epilético (EME) e morte induzidos por *overdose* de cocaína. Os camundongos foram tratados com salina ou cocaína 90 mg/kg, i.p. Os animais que morreram após administração da droga foram imediatamente dissecados, enquanto os que apresentaram estado de mal epilético (EME) e os controles foram sacrificados e dissecados 60 minutos após a administração da droga ou água destilada, respectivamente, para a retirada do corpo estriado. A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. DA= dopamina, DOPAC= ácido dihidroxifenilacético, HVA= ácido homovanílico. As barras representam média \pm EPM de 5 - 8 experimentos por grupo. **p < 0,01, ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

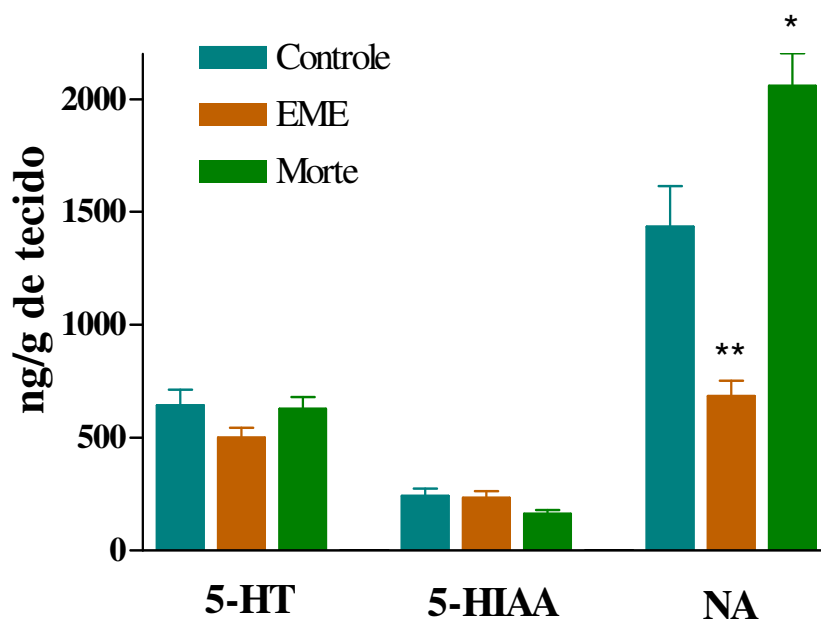


Figura 2-2 Determinação dos níveis de 5HT, 5HIAA e NA em corpo estriado de camundongos após estado de mal epilético (EME) e morte induzidas por *overdose* de cocaína. Os camundongos foram tratados com salina ou cocaína 90 mg/kg, i.p. Os animais que morreram após administração da droga foram imediatamente dissecados, enquanto os que apresentaram estado de mal epilético (EME) e os controles foram sacrificados e dissecados 60 minutos após a administração da droga ou água destilada, respectivamente, para a retirada do corpo estriado. A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. 5HT= serotonina, 5HIAA= ácido 5-hidroxiindolacético, NA= noradrenalina. As barras representam média \pm EPM de 5 - 9 experimentos por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

2 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE DOPAMINA (DA) E SEUS METABÓLITOS (DOPAC E HVA), SEROTONINA (5-HT) E SEU METABÓLITO (5-HIAA) EM CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE CAMUNDONGOS APÓS ESTADO DE MAL EPILÉPTICO (EME) E MORTE INDUZIDOS POR *OVERDOSE* DE COCAÍNA.

Na **Figura 2-3** pode-se observar que a 5HT no córtex pré-frontal aumentou de forma significativa (123 %) apenas após EME (controle (n= 5): $308,5 \pm 58,3$; EME (n= 5): $690,1 \pm 74,5$; morte (n= 8): $391,1 \pm 45,3$ ng/g de tecido, $p < 0,01$), enquanto 5HIAA diminuiu significativamente cerca de 47% em ambas condições estudadas (controle (n= 5): $298,3 \pm 44,7$; EME (n= 5): $145,3 \pm 17,9$; morte (n= 8): $132,7 \pm 17,7$ ng/g de tecido, $p < 0,01$). NA aumentou significativamente (56 %) após EME (controle (n= 5): $1328 \pm 175,4$; EME (n= 5): $2074 \pm 397,5$ ng/g de tecido, $p < 0,001$) e diminuiu (74 %) nos animais após a morte (controle (n= 5): $1328 \pm 175,4$; morte (n= 8): $340,2 \pm 38,2$ ng/g de tecido, $p < 0,05$). Não conseguimos detectar HVA no CPF.

Ainda em relação ao CPF (**Figura 2-4**) os níveis de DA aumentaram (125 %) nos animais EME (controle (n= 5): $80,4 \pm 7$; EME (n= 5): $180,9 \pm 14,1$ ng/g de tecido, $p < 0,001$) e reduziram após a morte (cerca de 38 %) (controle (n= 5): $80,4 \pm 7$; morte (n= 8): $49,6 \pm 5,5$ ng/g de tecido, $p < 0,05$). DOPAC aumentou apenas após EME (98 %) (controle (n= 5): $25,8 \pm 3,5$; EME (n= 5): $51,2 \pm 7,8$; morte (n= 8): $25,5 \pm 1,2$ ng/g de tecido, $p < 0,01$).

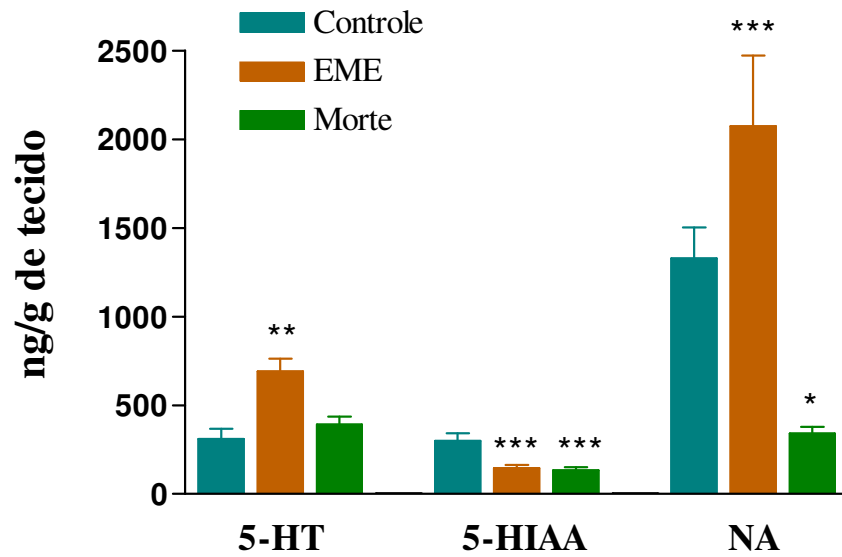


Figura 2-3 Determinação dos níveis de 5HT, 5HIAA e NA em córtex pré-frontal após estado de mal epiléptico (EME) e morte induzidas por *overdose* de cocaína. Os camundongos foram tratados com salina ou cocaína 90 mg/kg, i.p. Os animais que morreram após administração da droga foram imediatamente dissecados, enquanto os que apresentaram estado de mal epiléptico (EME) e os controles foram sacrificados e dissecados 60 minutos após a administração da droga ou água destilada, respectivamente, para a retirada do córtex pré-frontal (CPF). A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. 5HT= serotonina, 5HIAA= ácido 5-hidroxiindolacético, NA= noradrenalina. As barras representam média \pm EPM de 5 - 11 animais por grupo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

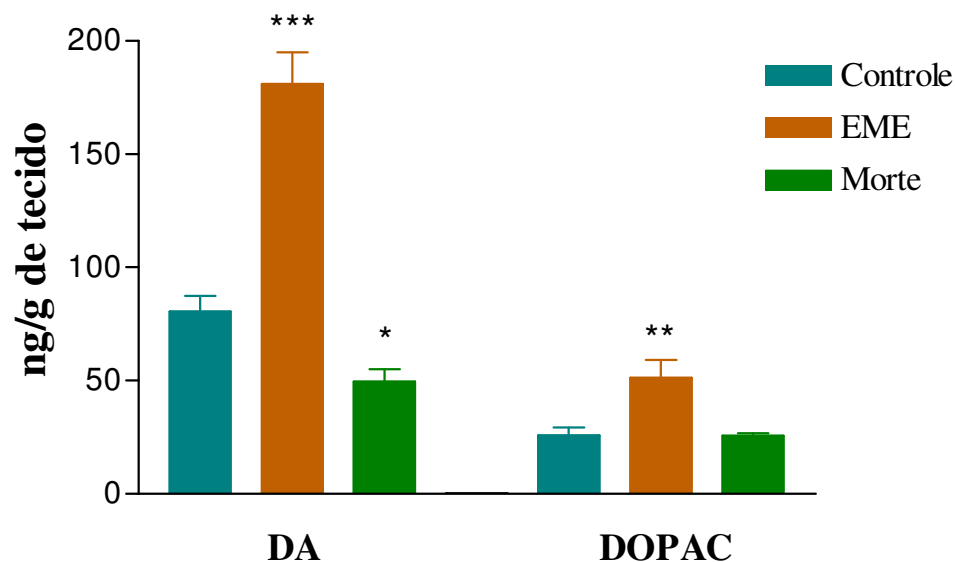


Figura 2-4 Determinação dos níveis de DA e DOPAC em córtex pré-frontal após estado de mal epilético (EME) e morte induzidas por *overdose* de cocaína em camundongos. Os camundongos foram tratados com salina ou cocaína 90 mg/kg, i.p. Os animais que morreram após administração da droga foram imediatamente dissecados, enquanto os que apresentaram estado de mal epilético (EME) e os controles foram sacrificados e dissecados 60 minutos após a administração da droga ou água destilada, respectivamente, para a retirada do córtex pré-frontal (CPF). A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. DA= dopamina, DOPAC= ácido dihidroxifenilacético. As barras representam média \pm EPM 5 - 7 animais por grupo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

3 DETERMINAÇÃO DAS TAXAS DE METABOLIZAÇÃO DOS NEUROTRANSMISSORES EM CORPO ESTRIADO E CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE CAMUNDONGOS APÓS ESTADO DE MAL EPILÉPTICO (EME) E MORTE INDUZIDOS POR *OVERDOSE* DE COCAÍNA

As Figuras 2-5 e 2-6 mostram as taxas de metabolização dos neurotransmissores a metabólitos em corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos, respectivamente. Em corpo estriado ocorreu aumento significativo da metabolização da dopamina a DOPAC e HVA tanto após EME (DOPAC 50 % e HVA 300 % de aumento) como após a morte dos animais (DOPAC 36,6 % e HVA 150 % de aumento) (DOPAC/DA- controle (n= 8): $0,256 \pm 0,026$; EME (n= 8): $0,384 \pm 0,04$; morte (n=5): $0,349 \pm 0,03$); HVA/DA- controle (n= 8): $0,107 \pm 0,014$; EME (n= 8): $0,43 \pm 0,05$; morte (n=5): $0,269 \pm 0,04$). Com relação à serotonina no corpo estriado ocorreu uma redução de 34 % na síntese do metabólito apenas após a morte induzida por *overdose* de cocaína (5HIAA/5HT- controle (n= 8): $0,374 \pm 0,036$; EME (n= 8): $0,476 \pm 0,06$; morte (n= 5): $0,25 \pm 0,027$).

Em CPF ocorreu aumento de 91 % da taxa de metabolização da dopamina em DOPAC apenas após morte induzida por cocaína, com relação à conversão da serotonina em 5HIAA ocorreu redução em torno de 70 % em ambas situações estudadas (DOPAC/DA- controle (n= 5): $0,29 \pm 0,05$; EME (n= 5): $0,25 \pm 0,02$; morte (n= 8): $0,55 \pm 0,08$; 5HIAA/5HT- controle (n= 5): $1,08 \pm 0,18$; EME (n= 5): $0,27 \pm 0,03$; morte (n= 8): $0,37 \pm 0,07$).

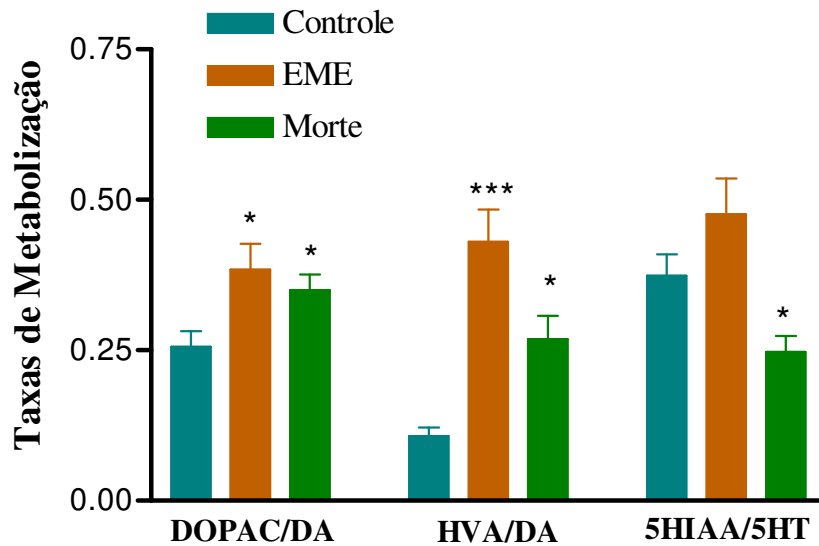


Figura 2-5 Determinação das taxas de metabolização dos neurotransmissores em corpo estriado de camundongos. Os camundongos foram tratados com salina ou cocaína 90 mg/kg, i.p. Os animais que morreram após administração da droga foram imediatamente dissecados, enquanto os que apresentaram estado de mal epilético (EME) e os controles foram sacrificados e dissecados 60 minutos após a administração da droga ou água destilada, respectivamente, para a retirada do córtex pré-frontal (CPF). A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. As taxas de metabolização foram calculadas pela divisão de cada resultado referente ao metabólito (ng/g de tecido) e o neurotransmissor (ng/g de tecido) do mesmo animal, depois sendo feita a média dos resultados e análise estatística. DA= dopamina, DOPAC= ácido dihidroxifenilacético, HVA= ácido homovanílico, 5HT= serotonina, 5HIAA= ácido 5-hidroxiindolacético. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

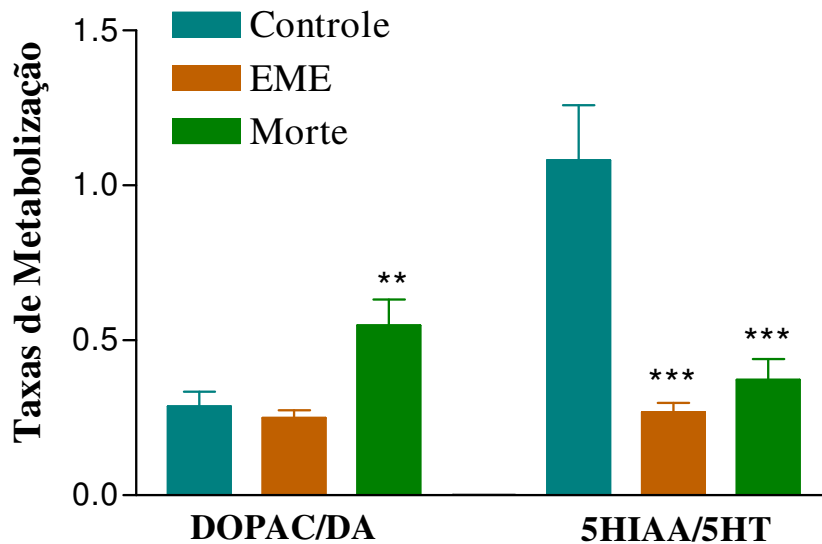


Figura 2-6 Determinação das taxas de metabolização dos neurotransmissores em córtex pré-frontal de camundongos. Os camundongos foram tratados com salina ou cocaína 90 mg/kg, i.p. Os animais que morreram após administração da droga foram imediatamente dissecados, enquanto os que apresentaram estado de mal epilético (EME) e os controles foram sacrificados e dissecados 60 minutos após a administração da droga ou água destilada, respectivamente, para a retirada do córtex pré-frontal (CPF). A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. As taxas de metabolização foram calculadas pela divisão de cada resultado referente ao metabólito (ng/g de tecido) e o neurotransmissor (ng/g de tecido) do mesmo animal, depois sendo feita a média dos resultados e análise estatística. DA= dopamina, DOPAC= ácido dihidroxifenilacético, 5HT= serotonina, 5HIAA= ácido 5-hidroxiindolacético.

p< 0,01, *p< 0,001. ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

DISCUSSÃO

Os resultados mostrados neste capítulo foram recentemente publicados (MACÊDO et al., 2004b) e demonstram que as duas áreas estudadas estão envolvidas de forma diferente no EME e morte induzidos por cocaína. Pode-se observar no corpo estriado (**Figuras 2-1 e 2-2**), que após EME ocorreu uma redução das duas monoaminas (NA e DA), enquanto nos animais que morreram após a convulsão induzida por cocaína apenas NA aumentou. O oposto foi visto em relação ao CPF (**Figuras 2-3 e 2-4**). Nesta área cerebral os animais EME mostraram um aumento nos níveis de monoaminas (DA, NA e 5HT), enquanto os animais morte apresentaram uma redução em DA e NA. Esta relação inversa observada nos níveis de monoaminas relativos a estas duas áreas cerebrais é interessante, ou seja, quando uma monoamina é alterada as outras também são afetadas.

Já foi descrito que a depleção seletiva de DA no córtex pré-frontal medial (CPFm) de ratos e macacos produz aumento dos níveis de DA no núcleo *accumbens* (CARTER & PYCOCK 1978, 1980; KOLACHANA et al., 1995; KURACHI et al., 1995; PYCOCK et al., 1980; ROBERTS et al., 1994; SOKOLOWSKI & SALAMONE, 1994), o que levou à hipótese de que distúrbios comportamentais seriam causados principalmente por uma hipoatividade dopaminérgica pré-frontal juntamente com um aumento do tônus dopaminérgico no núcleo *accumbens* (GRACE, 1991). Foi visto que a depleção de DA no córtex pré-frontal está relacionada com o prejuízo da atenção seletiva, aumento da atividade motora espontânea, estereotipia comportamental e alteração do estado emocional inclusive produzindo comportamentos ansiedade-símile, pois provocam aumento nos níveis de DA no CE (BUBSER & KOCH, 1994; CARTER & PYCOCK, 1980; ESPEJO, 1997, LACROIX et al., 1998; LE MOAL & SIMON, 1991). Neurônios dopaminérgicos na substância negra *pars reticulata* (SNpr) e área tegmental ventral (ATV) têm vias descendentes para o núcleo da rafe dorsal, o maior foco de neurônios serotoninérgicos, e para o *locus ceruleus* (LC), o maior foco de neurônios dopaminérgicos. Isto mostra que as três aminas biogênicas (DA, NA e 5HT) são interconectadas (GUERCE & MILON, 1983), sugerindo que a alteração de uma monoamina produz modificações nas outras na mesma direção. Por exemplo neste capítulo ocorreu aumento nas três monoaminas em CPF após EME.

Está bem estabelecido que o corpo estriado é o principal sítio de ação da cocaína no cérebro e que o CPF parece também ser importante para sua ação (STEKETEE, 2002). O CPF medial recebe uma forte inervação dopaminérgica da ATV (OADES & HALLIDAY, 1987), inervação noradrenérgica do LC (LEWIS & MORRISON, 1989), e inervação serotoninérgica principalmente dos núcleos da rafe dorsal e medial (MAMONAS et al., 1992).

De acordo com WEINSHENKER & SZOT (2002), o papel da DA e NA na mediação dos efeitos das convulsões induzidas por drogas psicoestimulantes é de considerável interesse, e a maioria das pesquisas com animais têm focalizado as convulsões induzidas por cocaína. Um dos primeiros estudos examinando esse assunto evidenciou nenhum efeito do dano dos sistemas noradrenérgico e dopaminérgico nas convulsões induzidas por cocaína, e concluiu que o mecanismo destas convulsões não era relacionado às catecolaminas (MASON & CORCORAN, 1979). A letalidade associada com as convulsões induzidas por cocaína pode ter componentes noradrenérgicos e dopaminérgicos, baseado nos estudos farmacológicos de RITZ & GEORGE (1997b). Estes pesquisadores mostraram que o antagonista do receptor α_1 , prazosin, reduziu significativamente a ocorrência de convulsões. Além disso, a letalidade induzida pela cocaína foi aumentada pela mesma droga e foi substancialmente de início mais rápido que os controles (RITZ & GEORGE, 1997b). Isto pode explicar os efeitos opostos vistos nesta pesquisa nos níveis de NA em animais EME e morte.

Em relação à DA, USHIJIMA et al. (1998), mostraram que agonistas D_2 como bromocriptina reduziram o efeito convulsivo da cocaína e protegeram contra doses letais da cocaína, enquanto agonistas D_1 como SKF38393 potencializaram as convulsões induzidas por cocaína. De modo semelhante, neste trabalho (**capítulo 1, tabela 1-3**), foi observado uma redução da latência (significativa) e sobrevivência (não significativa) dos animais com o pré-tratamento com pimizida, um antagonista dos receptores D_2 , quando administrado na dose de 20 mg/kg. Já o pré-tratamento com o SCH 23390, um antagonista dos receptores D_1 causou um aumento significativo na latência e sobrevivência dos animais, bem como uma redução no número de animais que convulsionaram.

Nada até agora havia sido determinado em relação aos níveis de monoaminas nas convulsões e morte induzidas por cocaína. Trabalho recente publicado por nosso grupo de pesquisa com os resultados apresentados neste capítulo (MACÊDO et al., 2004b) demonstra a

ocorrência de alterações nos conteúdos de NA e DA nas áreas cerebrais estudadas após EME e morte induzidos por cocaína. Este estudo também detectou alterações nos níveis de 5HT apenas no CPF de animais EME, mostrando que esta monoamina também está envolvida com as convulsões induzidas pela cocaína. De fato, drogas que inibem a recaptação de 5HT potencializam as convulsões, enquanto drogas antagonistas do receptor 5HT_{2C} são anticonvulsivantes (RITZ & GEORGE 1997a; O'DELL et al., 2000). Esta hipótese está embasada em estudos farmacogenéticos que demonstram que a densidade de receptores 5HT₂ parece mediar a sensibilidade genética para as convulsões induzidas por cocaína, e cinanserina de forma mais potente atenuou os efeitos da cocaína em camundongos exibindo uma densidade menor de receptores 5HT₂ (O'DELL et al., 2000). Apesar dos autores em questão apontarem um envolvimento dos receptores 5HT₂ nas convulsões induzidas por cocaína nosso trabalho como mostrado no **capítulo 1, tabela 1-4** não apresentou bloqueio das convulsões usando o antagonista 5HT₂, mianserina e fluoxetina, um inibidor de recaptação da 5HT potencializou os parâmetros relacionados à convulsão e morte induzidas por cocaína.

A mensuração dos níveis dos metabólitos das catecolaminas dá uma idéia da taxa de liberação e renovação destas catecolaminas no cérebro. Por exemplo, concentrações de HVA no corpo estriado dão idéia de renovação da DA nesta área cerebral. Concentrações de HVA diminuem, por exemplo na doença de Parkinson, onde há degeneração de neurônios DA. Neste estudo observamos que no corpo estriado ocorreu aumento dos metabólitos da DA (e redução do neurotransmissor), principalmente do HVA, que permaneceu alterado após EME e morte. Estes resultados sugerem um aumento da atividade das enzimas metabolizadoras MAO e COMT nesta área cerebral o que pode ser comprovado pelo aumento do metabolismo da dopamina em DOPAC e HVA como evidenciado na **Figura 2-5**.

Já no CPF que recebe uma importante inervação serotoninérgica, ocorreu aumento da 5HT e redução do metabólito 5HIAA, sugerindo uma importante inibição do metabolismo desta monoamina nesta área cerebral, portanto, um importante envolvimento da mesma nas convulsões (EME) induzidas por cocaína. Nesta área cerebral (CPF) também foi observado aumento da dopamina e seu metabólito intracelular (DOPAC), o que dá indícios da ocorrência de renovação desta monoamina no CPF e também seu possível envolvimento com as convulsões nesta área cerebral. Não podemos fazer a mesma discussão a respeito da NA pois não conseguimos detectar seu metabólito 3-MT através do método de detecção utilizado.

O aumento da DA e 5HT no CPF é importante e merece ser discutido com base nas interações entre estas monoaminas e os vários neurotransmissores. Estudos eletrofisiológicos levando em consideração o sistema de aminoácidos excitatórios sugeriram que a serotonina facilita a transmissão glutamatérgica via ação focal em dendritos apicais de neurônios piramidais nesta área cerebral (AGHAJANIAN & MAREK, 1997). Esta facilitação da transmissão glutamatérgica é o resultado de uma frequência aumentada de correntes pós-sinápticas excitatórias e pode ser prevenido pela aplicação de antagonistas 5HT_{2A} como o M100907 ou SR46549B (AGHAJANIAN & MAREK, 1997). Isto pode provar de certa forma porque alguns trabalhos na literatura mostram que os antagonistas do receptor 5HT₂ são efetivos no combate às convulsões induzidas por cocaína (RITZ & GEORGE, 1997a), pois estas drogas inibem a transmissão glutamatérgica. Foi proposto que a serotonina pode promover a liberação de glutamato de eferentes talâmicos mediodorsais para o CPFm, os quais podem então ativar neurônios piramidais (MAREK & AGHAJANIAN, 1998; MAREK et al., 2000).

Desta forma, de maneira geral, a serotonina agindo via receptores 5HT_{2A} potencia a transmissão glutamatérgica de neurônios piramidais por: 1) aumento da liberação de glutamato de aferentes do CPFm e 2) atenuação de correntes GABA_A de neurônios piramidais. Enquanto a serotonina é conhecida por modular diretamente os sistemas GABAérgico e glutamatérgico no CPF, sua ação na transmissão dopaminérgica nesta região é pouco esclarecida. A administração direta da serotonina via *probe* de microdiálise no CPFm aumenta as concentrações de dopamina (IYER & BRADBERRY, 1996). A infusão de fluoxetina no CPFm também aumentou significativamente o fluxo de dopamina (MATSUMOTO et al., 1999; POZZI et al., 1999). Portanto, este aumento de 5HT no CPF pode estar associada com a convulsão induzida por cocaína, visto que foi observado apenas no EME. Já a DA nesta área cerebral parece estar envolvida nas convulsões e morte. A noradrenalina (NA) da mesma forma que a DA teve seus níveis alterados no CPF em ambas condições estudadas. Trabalhos prévios mostram uma importante interação entre DA e NA no CPFm (TASSIN et al., 1994) e a estimulação do *locus ceruleus* aumenta a liberação de DA no CPFm. Isto sugere que a NA no CPFm estimula a liberação de DA nesta área (KAWAHARA et al., 2001).

Em conclusão, as convulsões induzidas por cocaína e morte estão associadas com modificações nos níveis de monoaminas e estas alterações dependem da área cerebral e condição (EME ou morte) estudada.

CAPÍTULO 3

DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DE RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS (D_1 E D_2 -SÍMILE), SEROTONÉRGICOS ($5HT_{2,,}$) MUSCARÍNICOS (M_1 -SÍMILE) E DA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE APÓS AS CONVULSÕES E MORTE INDUZIDAS POR OVERDOSE DE COCAÍNA EM CORPO ESTRIADO E CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE CAMUNDONGOS

INTRODUÇÃO

O mecanismo das convulsões induzidas por cocaína é complexo, como já descrito anteriormente (**capítulo 1**) e envolve a interação da droga com vários sistemas de neurotransmissores, bem como com canais de sódio voltagem dependente (LASON, 2001). A cocaína aumenta a atividade do sistema monoaminérgico através de bloqueio da recaptação de dopamina e serotonina e estas monoaminas estão envolvidas na suscetibilidade (WEINSHENKER & SZOT, 2002) e propagação (BARONE et al., 1990) das convulsões. Um aumento no disparo de neurônios dopaminérgicos durante convulsão relacionada ao *kindling* (BONHAUS et al., 1986), bem como um aumento transitório na tirosina hidroxilase e expressão do RNAm para o transportador de dopamina na SNpr/ATV após as convulsões induzidas por PTZ também foi observado (SZOT et al., 1997). De fato, projeções estriatais diretas e indiretas estão envolvidas no controle das convulsões epiléticas através da SNpr (DERANSART et al., 2000). Além disso, o córtex pré-frontal medial (CPFm) envia projeções glutamatérgicas para a ATV e núcleo accumbens, o qual é parte do estriado ventral, (SESACK & PICKEL, 1992; TABER et al., 1995) e a neurotransmissão glutamatérgica está amplamente relacionada às convulsões.

Os receptores dopaminérgicos parecem mediar funções opostas em alguns modelos de convulsão, como, por exemplo, aqueles induzidos por pilocarpina (BARONE et al., 1991). De forma similar nas convulsões induzidas por cocaína os agonistas dos receptores D₁ e D₂ também exercem ações opostas (**Ver capítulo 1, Tabela 1-3** e USHIJIMA et al., 1998). Desta forma agonistas do receptor D₁ como SKF 38393 potencializam as convulsões (USHIJIMA et al., 1998), que são revertidas por antagonistas D₁ como o SCH 23390 (**Ver capítulo 1**). De maneira oposta, a bromocriptina, um agonista D₂ reduziu as convulsões que são potencializadas por antagonistas deste receptor como o haloperidol e pimozide (**capítulo 1, Tabela 1-3** e USHIJIMA et al., 1998).

O sistema serotoninérgico também parece estar envolvido e ter um papel muito importante nas convulsões e letalidade induzidas por cocaína. Foi visto que drogas que interferem com a neurotransmissão serotoninérgica, aumentando seus níveis sinápticos

potencializam as convulsões induzidas por cocaína (**Ver capítulo 1, tabela 1-4**). Desta forma, alguns autores sugerem o transportador de 5HT como sítio primário de ação das convulsões produzidas por cocaína e compostos relacionados (RITZ & GEORGE, 1992). A neurotransmissão serotonérgica parece estar relacionada não somente com as convulsões induzidas por cocaína, mas também por uma ampla variedade de convulsivantes que estão envolvidos com o aumento da suscetibilidade às convulsões observado em roedores geneticamente epiléticos (KILIAN & FREY, 1973; BUTERBAUGH, 1978; PRZEGALINSKI, 1985; HIRAMATSU et al., 1987; DAILEY et al., 1992).

A neurotransmissão muscarínica também está envolvida na geração das convulsões. Sabe-se que drogas que potencializam a neurotransmissão colinérgica excitatória, como fisostigmina e agonistas dos receptores muscarínicos, como pilocarpina são convulsivantes químicos bem conhecidos (MELDRUM & CHAPMAN, 1999). Vale salientar que a cocaína também exerce seus efeitos em receptores muscarínicos, pois foi observado previamente em trabalhos do nosso laboratório que o tratamento com cocaína induz modificações nos receptores muscarínicos (SOUSA et al., 1999). Em relação às convulsões induzidas por cocaína, trabalhos mostram que a pirenzepina (um antagonista do receptor M₁-símile) reduziu de maneira significativa, enquanto a atropina não alterou a ocorrência das convulsões (RITZ & GEORGE, 1997a).

Estudos relacionados à letalidade induzida por cocaína (RITZ & GEORGE, 1997b) indicam que esta parece ser mediada por uma soma das interações da cocaína em receptores dopaminérgicos, muscarínicos M₁ e sigma, como observado em relação às convulsões, mas ambos fenômenos (convulsões e letalidade) parecem serem mediados por mecanismos distintos, baseado em estudos farmacológicos. Estes autores determinaram que a combinação de drogas como o SCH 23390 + pirenzepina ou SCH 23390 + SKF 10047 causaram uma redução da letalidade maior que com o uso das drogas isoladamente.

Desde que manipulações farmacológicas nos receptores D₁, D₂, serotonérgicos 5HT₂ e muscarínicos (**ver capítulo 1**) podem interferir com as convulsões e morte induzidas por cocaína, se faz importante o estudo mais aprofundado da participação destes receptores nestas duas condições associadas à *overdose* da droga.

OBJETIVO

Partindo do fato de que drogas que interferem nas neurotransmissões dopaminérgica, serotoninérgica e muscarínica, interferem nas convulsões e letalidade induzidas por cocaína, como evidenciado no **capítulo 1** deste estudo, o objetivo central do presente capítulo foi determinar as alterações a nível de receptores dopaminérgicos D₁ e D₂, serotoninérgicos 5HT₂ e muscarínicos M₁, bem como atividade da acetilcolinesterase produzidas pelas duas situações conseqüentes à *overdose* de cocaína (estado de mal epiléptico e morte), em duas áreas cerebrais de grande importância no que concerne às convulsões: corpo estriado e córtex pré-frontal, visto que estas alterações ainda não foram estudadas na literatura.

RESULTADOS

Neste capítulo foram examinadas as alterações que podem ocorrer em sítios de ligação de receptores dopaminérgicos (D₁ e D₂-símile), serotoninérgicos (5HT₂), muscarínicos (M₁-símile) as quais estão estreitamente relacionadas às convulsões e morte induzidas por cocaína, como visto no **capítulo 1**.

1 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE *OVERDOSE* DE COCAÍNA SOBRE O *BINDING* DE [³H]-SCH 23390 (RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D₁-SÍMILE) EM CÓRTEX PRÉ-FRONTAL (CPF) E CORPO ESTRIADO (CE) DE CAMUNDONGOS

A **Tabela 3-1** mostra uma redução significativa de cerca 46 % na ligação do [³H]-SCH 23390 apenas após o EME induzido pela cocaína em CPF e CE (CPF-Controle: 303,1 ± 36,5; EME: 145,8 ± 8,9 fmol/mg de proteína; CE–controle: 457,7 ± 52,5; EME: 270,3 ± 15,6 fmol/mg de proteína). Os resultados da análise de *Scatchard* corroboraram com os resultados de experimentos de ponto único, onde em CPF ocorreu uma redução de 30 % no Bmax após EME (controle: 280,2; EME: 195,1 fmol/mg de proteína), enquanto a constante de dissociação (Kd) apresentou uma redução de 81 % (controle: 2,81; EME: 0,53 nM) (**Figura 3-1**). Em CE ocorreu uma redução de 21,5 % no Bmax (controle: 352,6; EME: 276,7 nM), enquanto o Kd aumentou em 21 % (controle: 0,82; EME: 0,995 nM) (**Figura 3-2**).

TABELA 3-1 Efeito da administração de *overdose* de cocaína sobre o *binding* de [³H]-SCH 23390 (receptores dopaminérgicos D₁-símile) em córtex pré-frontal (CPF) e corpo estriado (CE) de camundongos

Grupos	CPF	CE
	(fmol/mg de proteína)	(fmol/mg de proteína)
Controle	303,1 ± 36,5 (8)	475,7 ± 52,5 (6)
EME	145,8 ± 8,9 (8)***	270,3 ± 15,6 (8)***
Morte	315,3 ± 28,3 (7)	504 ± 37,2 (7)

Os camundongos foram tratados com salina ou cocaína 90 mg/kg, i.p. Os animais que morreram após administração da droga foram imediatamente dissecados, enquanto os que apresentaram estado de mal epiléptico (EME) e os controles foram sacrificados e dissecados 60 minutos após a administração da droga ou água destilada, respectivamente, para a retirada do córtex pré-frontal (CPF) e corpo estriado (CE). A determinação dos receptores D₁ foi feita utilizando o antagonista específico [³H]-SCH 23390 como ligante radioativo. Os resultados (fmol/mg de proteína) foram expressos como média ± EPM do número de animais mostrados em parênteses.

***p < 0,001. ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

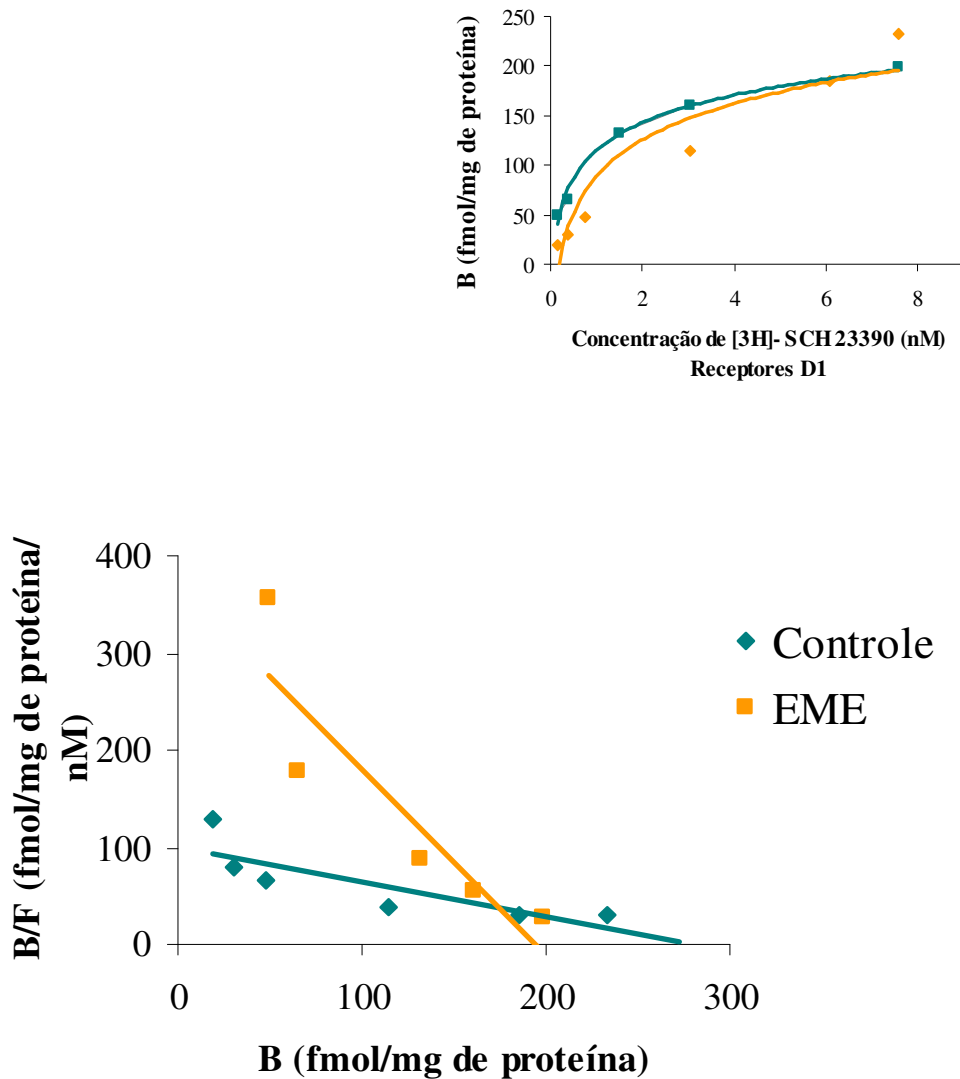


Figura 3-1 Plot de curva de saturação (gráfico menor) e Scatchard representativo (gráfico maior) para [³H]-SCH-23390 (receptores D₁-símile) em córtex pré-frontal de camundongos. No gráfico menor o eixo Y representa a ligação específica (B) e o X a concentração do ligante [³H]-SCH-23390 em nM. No gráfico maior o eixo Y representa a ligação específica (B) dividida pela concentração de ligante livre (F), enquanto o eixo X representa a ligação específica (B). Nestes gráficos só estão representados os resultados significativos (**Controle- Bmax= 280,2 Kd= 2,81, r= 0.8263; EME - Bmax= 195,1; kd= 0,53, r= 0.9008**). Bmax- ligação máxima, Kd- constante de dissociação.

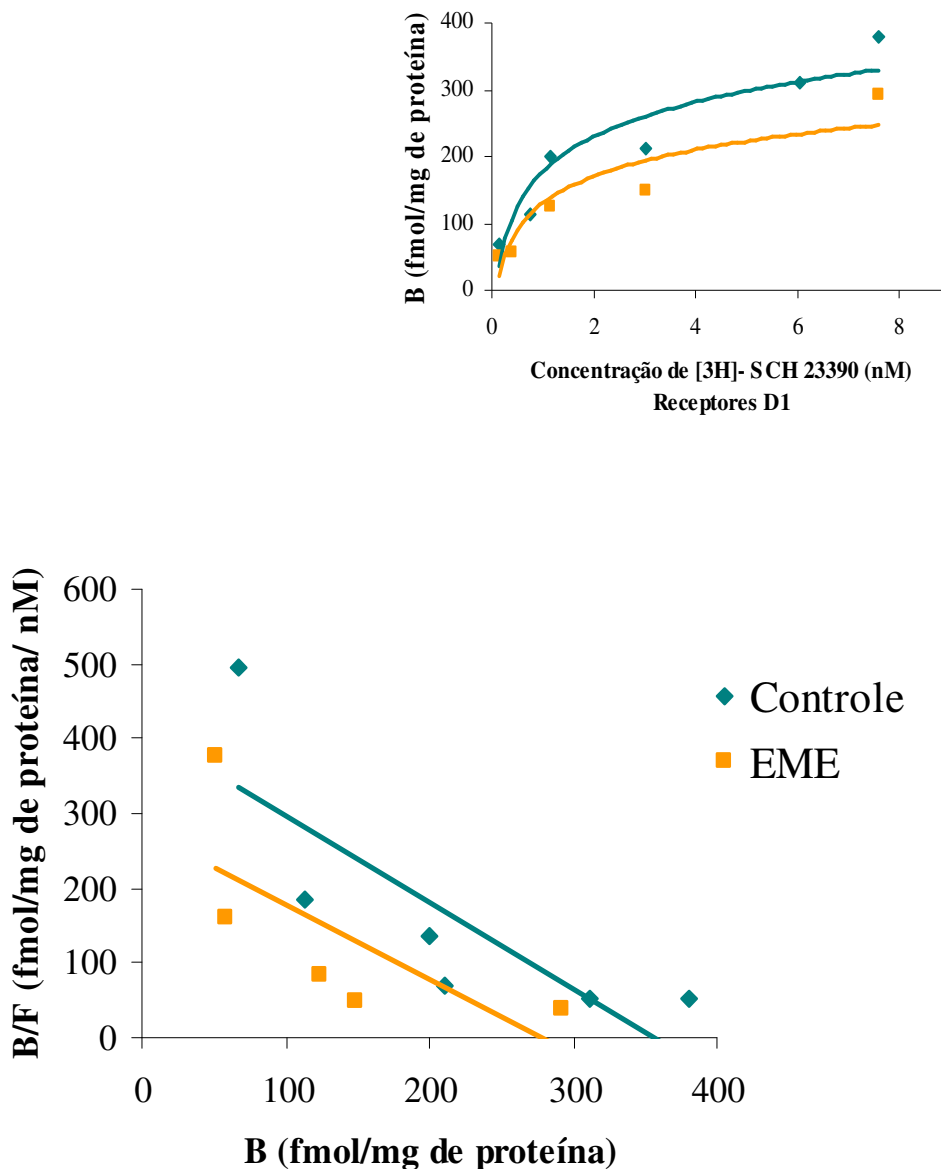


Figura 3-2 Plot de curva de saturação (gráfico menor) e Scatchard representativo (gráfico maior) para [³H]-SCH-23390 (receptores D₁-símile) em corpo estriado de camundongos. No gráfico menor o eixo Y representa a ligação específica (B) e o X a concentração do ligante [³H]-SCH-23390. No gráfico maior o eixo Y representa a ligação específica (B) dividida pela concentração de ligante livre (F), enquanto o eixo X representa a ligação específica (B). Nestes gráficos só estão representados os resultados significativos (**Controle- B_{max}= 352,6, K_d= 0,82, r= 0,8165; EME - B_{max}= 276,7; kd= 0,995, r= 0,8003**). B_{max}- ligação máxima, K_d- constante de dissociação.

2 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE *OVERDOSE* DE COCAÍNA SOBRE O *BINDING* DE [³H]-ESPIROPERIDOL NA PRESENÇA DE MIANSERINA (RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D₂-SÍMILE) EM CÓRTEX PRÉ-FRONTAL (CPF) E CORPO ESTRIADO (CE) DE CAMUNDONGOS

As modificações observadas na ligação do ligante inespecífico [³H]-espiroperidol (receptores dopaminérgicos D₂ e serotoninérgicos 5HT₂) em presença de mianserina (para bloquear os receptores serotoninérgicos 5HT₂) para determinação dos receptores D₂-símile estão apresentadas na **Tabela 3-2**. Ocorreu um aumento em torno de 48 % na ligação deste ligante radioativo aos receptores D₂ em CPF em ambas condições estudadas, EME e morte (controle: 258,9 ± 23; EME: 375,2 ± 41,4; morte: 392,2 ± 35,7 fmol/mg de proteína). Esta alteração foi confirmada pelos plots de *Scatchards* nesta área cerebral, onde foram evidenciados aumentos no Bmax (controle: 463,8; EME 509,2; morte: 561,5 fmol/mg de proteína), e redução no Kd em torno de 21 % após EME e morte (controle: 1,63; EME: 1,3; morte: 1,25 nM) (**Figura 3-3**). Em CE ocorreu um aumento bem maior, em torno de 82 %, apenas após a morte induzida por cocaína (controle: 260,7 ± 17; morte: 475,3 ± 30,2 fmol/mg de proteína). O plot de *Scatchard* para o receptor D₂ em CE mostrou um aumento no Bmax de 29 % apenas após a morte (controle: 377,04; morte: 486,5 fmol/mg de proteína), da mesma forma que no experimento de ponto único, enquanto o Kd apresentou um aumento de 60 % nesta área cerebral (controle: 1,1; morte: 1,77 nM) (**Figura 3-4**).

TABELA 3-2 Efeito da administração de *overdose* de cocaína sobre o *binding* de [³H]-espiroperidol na presença de mianserina (receptores dopaminérgicos D₂-símile) em córtex pré-frontal (CPF) e corpo estriado (CE) de camundongos

Grupos	CPF (fmol/mg de proteína)	CE (fmol/mg de proteína)
Controle	258,9 ± 23 (10)	260,7 ± 17 (13)
EME	375,2 ± 41,4 (8)*	315,3 ± 24,1 (8)
Morte	392,2 ± 35,7 (6)*	475,3 ± 30,2 (7)*

Os camundongos foram tratados com salina ou cocaína 90 mg/kg, i.p. Os animais que morreram após administração da droga foram imediatamente dissecados, enquanto os que apresentaram estado de mal epiléptico (EME) e os controles foram sacrificados e dissecados 60 minutos após a administração da droga ou água destilada, respectivamente, para a retirada do córtex pré-frontal (CPF) e corpo estriado (CE). A determinação dos receptores D₂ foi feita utilizando o antagonista inespecífico tritiado [³H]-espiroperidol em presença de mianserina para bloquear os sítios 5HT₂. Os resultados (fmol/mg de proteína) foram expressos como média ± EPM do número de animais mostrados em parênteses. *p < 0.05, ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

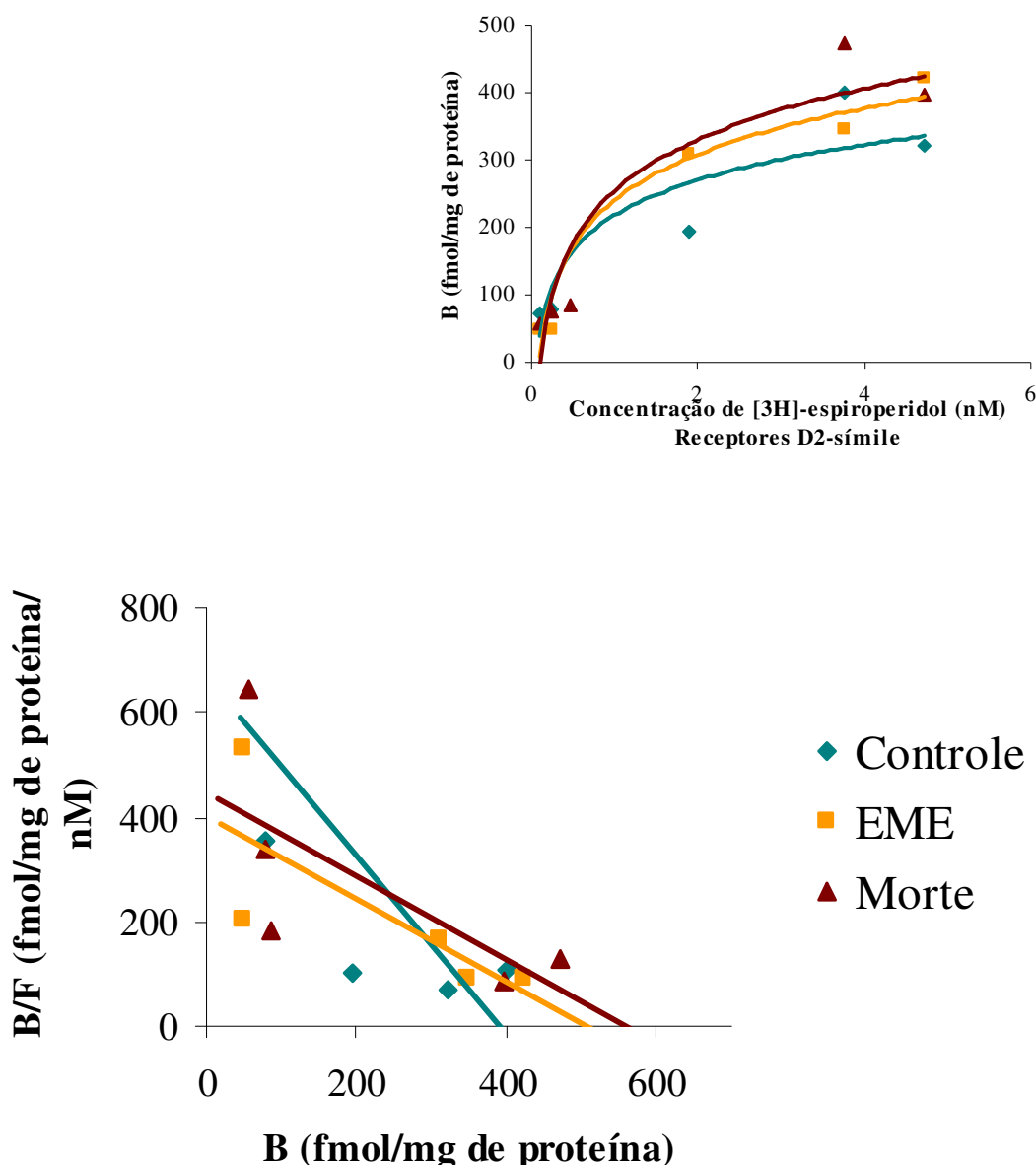


Figura 3-3 Plot de curva de saturação (gráfico menor) e Scatchard representativo (gráfico maior) para [³H]-espiroperidol em presença de mianserina (receptores D₂-símile) em córtex pré-frontal de camundongos. No gráfico menor o eixo Y representa a ligação específica (B) e o X a concentração do ligante [³H]-espiroperidol em nM. No gráfico maior o eixo Y representa a ligação específica (B) dividida pela concentração de ligante livre (F), enquanto o eixo X representa a ligação específica (B) (Controle- Bmax= 389,9, Kd=1,63, r= 0,8292; EME - Bmax= 509,2, kd= 1,3, r= 0,7647; morte - Bmax= 561,5, Kd = 1,25, r= 0,8071). Bmax- ligação máxima, Kd- constante de dissociação.

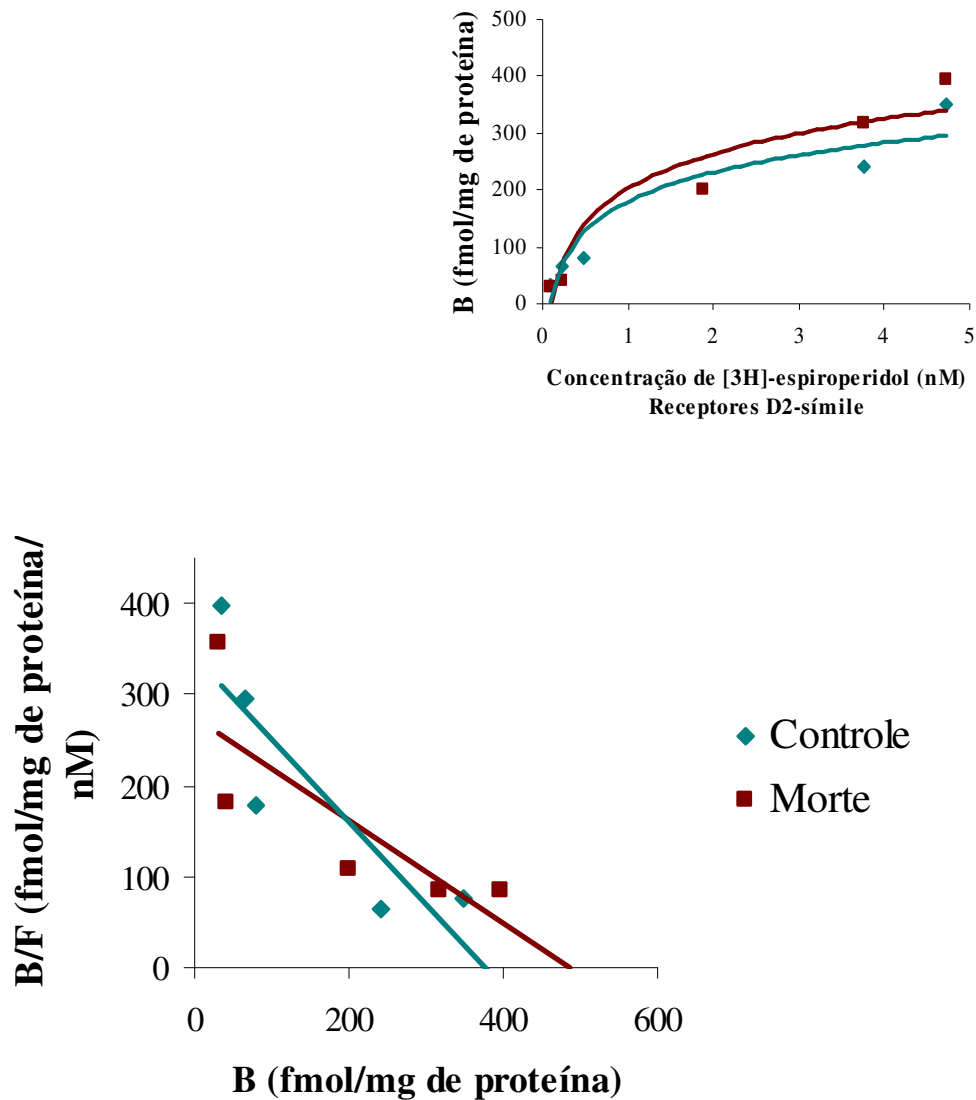


Figura 3-4 Plot de curva de saturação (gráfico menor) e Scatchard representativo (gráfico maior) para [³H]-espiroperidol em presença de mianserina (receptores D₂-símile) em corpo estriado de camundongos. No gráfico menor o eixo Y representa a ligação específica (B) e o X a concentração do ligante [³H]-espiroperidol em nM. No gráfico maior o eixo Y representa a ligação específica (B) dividida pela concentração de ligante livre (F), enquanto o eixo X representa a ligação específica (B). Nestes gráficos só estão representados os resultados significativos (Controle- Bmax= 377,04 Kd= 1,1, r=0,8569 ; morte - Bmax= 486,5; kd= 1,77, r= 0,8013). Bmax- ligação máxima, Kd- constante de dissociação.

3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE *OVERDOSE* DE COCAÍNA SOBRE O *BINDING* DE [³H]-ESPIROPERIDOL NA PRESENÇA DE DOPAMINA (RECEPTORES SEROTONÉRGICOS 5HT₂-SÍMILE) EM CÓRTEX PRÉ-FRONTAL (CPF) E CORPO ESTRIADO (CE) DE CAMUNDONGOS

Os resultados referentes às alterações na ligação do ligante inespecífico [³H]-espiroperidol (receptores dopaminérgicos D₂ e serotoninérgicos 5HT₂) agora em presença de dopamina (para bloquear os receptores dopaminérgicos) para a determinação dos receptores 5-HT₂ estão apresentados na **Tabela 3-3**. Este receptor teve uma variação significativa (aumento) no CPF em torno de 46 % tanto após EME como morte induzidas por cocaína (controle: 101,2 ± 9,1; EME 149 ± 18; morte 148,3 ± 13,5 fmol/mg de proteína). No CE ocorreu aumento em torno de 460 % nos sítios de ligação 5HT₂, tanto após EME como na morte por *overdose* de cocaína (controle: 44 ± 7,8; EME: 250,8 ± 26,4; morte: 245,5 ± 45 fmol/mg de proteína).

TABELA 3-3 Efeito da administração de *overdose* de cocaína sobre o *binding* de [³H]-espiroperidol na presença de dopamina (receptores serotoninérgicos 5HT₂-símile) em córtex pré-frontal (CPF) e corpo estriado (CE) de camundongos

Grupos	CPF (fmol/mg de proteína)	CE (fmol/mg de proteína)
Controle	101,2 ± 9,1 (6)	44 ± 7,8 (6)
EME	149 ± 18 (6)*	250,8 ± 26,4 (6)***
Morte	148,3 ± 13,5 (6)*	245,5 ± 15 (6)***

Os camundongos foram tratados com salina ou cocaína 90 mg/kg, i.p. Os animais que morreram após administração da droga foram imediatamente dissecados, enquanto os que apresentaram estado de mal epiléptico (EME) e os controles foram sacrificados e dissecados 60 minutos após a administração da droga ou água destilada, respectivamente, para a retirada do córtex pré-frontal (CPF) e corpo estriado (CE). A determinação dos receptores 5HT₂ foi feita utilizando o antagonista inespecífico tritiado [³H]-espiroperidol em presença de dopamina para bloquear os sítios D₂. Os resultados (fmol/mg de proteína) foram expressos como média ± EPM do número de animais mostrados em parênteses.

*p < 0,05, ***p < 0,001, ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

4 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE *OVERDOSE* DE COCAÍNA SOBRE O *BINDING* DE [³H]-N-METIL-ESCOPOLAMINA (³H-NMS) NA PRESENÇA DE CARBACOL (RECEPTORES MUSCARÍNICOS M₁-SÍMILE) E SOBRE A ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE EM CÓRTEX PRÉ-FRONTAL (CPF) E CORPO ESTRIADO (CE) DE CAMUNDONGOS

Também foi observada uma diminuição na ligação da [3H]-NMS aos receptores M₁-símile apenas no CPF de camundongos (**Tabela 3-4**) em ambas condições EME e morte (controle: 360,9 ± 26,4; EME: 171 ± 15,4; morte: 280 ± 24,7 fmol/mg de proteína). Não ocorreram alterações significativas no CE (controle: 368,3 ± 20,8; EME: 301,5 ± 18; morte: 356,1 ± 45,2 fmol/mg de proteína). Os dados de *Scatchard* corroboraram este resultado, mostrando uma redução no B_{max} no CPF (controle: 318,4; EME: 225,2; morte: 261 fmol/mg de proteína). O K_d nesta área cerebral para o receptor M₁ aumentou 216 % após EME e 76 % após a morte induzida por cocaína (**Figura 3-7**).

A atividade da acetilcolinesterase em CE como mostrado na **Figura 3-7** aumentou em 41 % após o EME e morte induzidos por cocaína. (controle (n-8): 92,3 ± 4,8; EME (n-7): 122,3 ± 12,7; morte (n-6): 139,7 ± 7,6 μmol/μg de proteína/min). O aumento em CPF só foi evidenciado após a morte induzida por cocaína, sendo este significativo em relação aos animais controle e EME (controle (n-6): 20,8 ± 2,2; EME (n-7): 23,1 ± 1,8; morte (n-6): 36 ± 3,1 μmol/μg de proteína/min) (**Figura 3-8**).

TABELA 3-4 Efeito da administração de *overdose* de cocaína sobre o *binding* de [³H]-N-metil-escopolamina (³H-NMS) na presença de carbacol (receptores muscarínicos M₁-símile) em córtex pré-frontal (CPF) e corpo estriado (CE) de camundongos

Grupos	CPF (fmol/mg de proteína)	CE (fmol/mg de proteína)
Controle	360,9 ± 26,4 (10)	368,3 ± 20,8 (12)
EME	171 ± 15,4 (8)***	301,5 ± 18 (8)
Morte	280 ± 24,7 (7)*	356,1 ± 45,2 (7)

Os camundongos foram tratados com salina ou cocaína 90 mg/kg, i.p. Os animais que morreram após administração da droga foram imediatamente dissecados, enquanto os que apresentaram estado de mal epilético (EME) e os controles foram sacrificados e dissecados 60 minutos após a administração da droga ou água destilada, respectivamente, para a retirada do córtex pré-frontal (CPF) e corpo estriado (CE). A determinação dos receptores M₁ foi feita utilizando o antagonista inespecífico tritiado [³H]-NMS em presença de carbacol para bloquear os sítios M₂. Os resultados (fmol/mg de proteína) foram expressos como média ± EPM do número de animais mostrados em parênteses.

***p < 0,001, *p < 0,05, ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

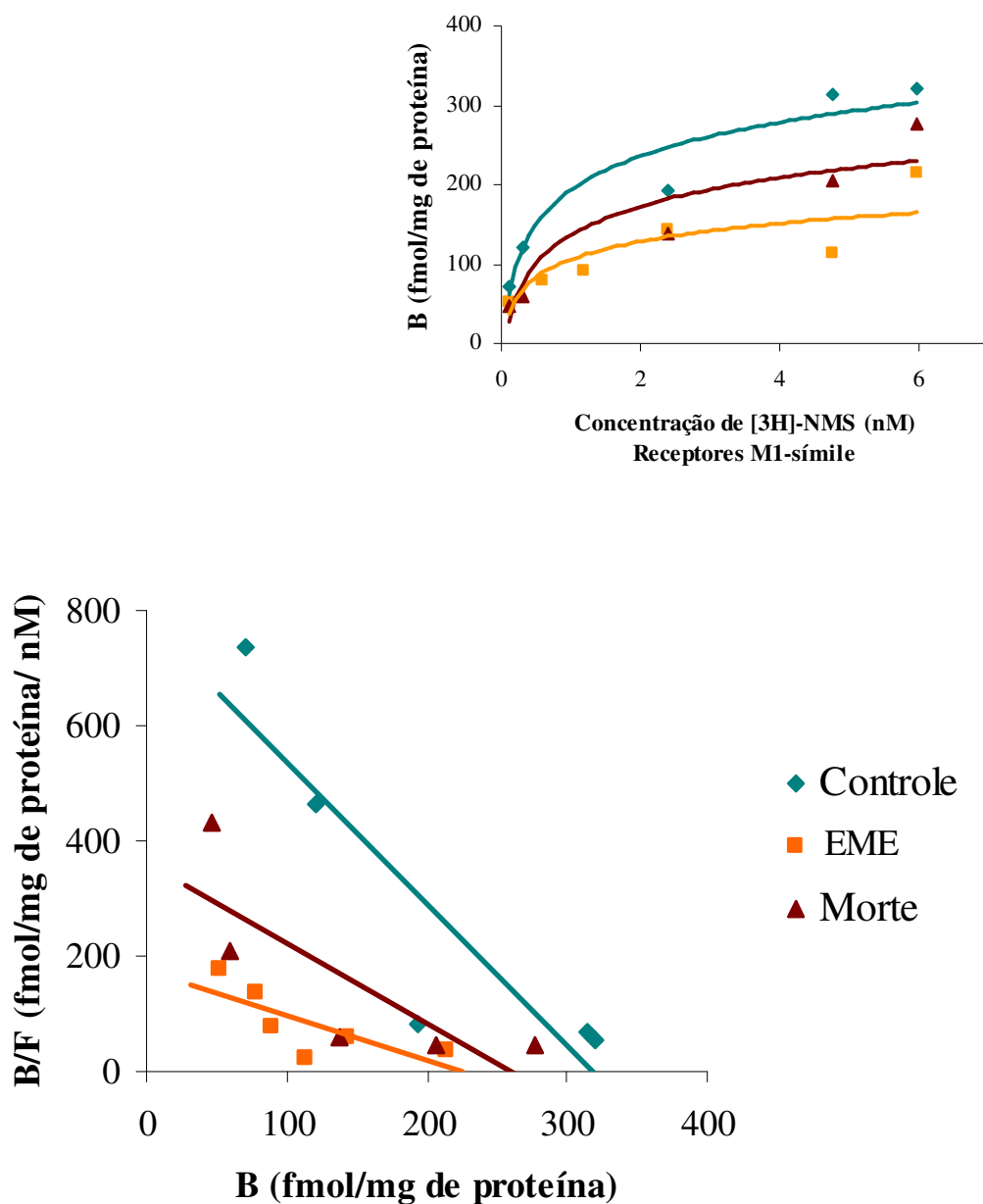


Figura 3-5 Plot de curva de saturação (gráfico menor) e Scatchard representativo (gráfico maior) para [³H]-NMS em presença de carbacol (receptores M₁-símile) em córtex pré-frontal de camundongos. No gráfico menor o eixo Y representa a ligação específica (B) e o X a concentração do ligante [³H]-espiroperidol em nM. No gráfico maior o eixo Y representa a ligação específica (B) dividida pela concentração de ligante livre (F), enquanto o eixo X representa a ligação específica (B) (Controle- B_{max}= 318,4; K_d= 0,407, r= 0,8966; EME - B_{max}= 225,2; kd= 1,29, r= 0,7520; Morte - B_{max}= 261; K_d= 0,72, r= 0,7962). B_{max}- ligação máxima, K_d- constante de dissociação.

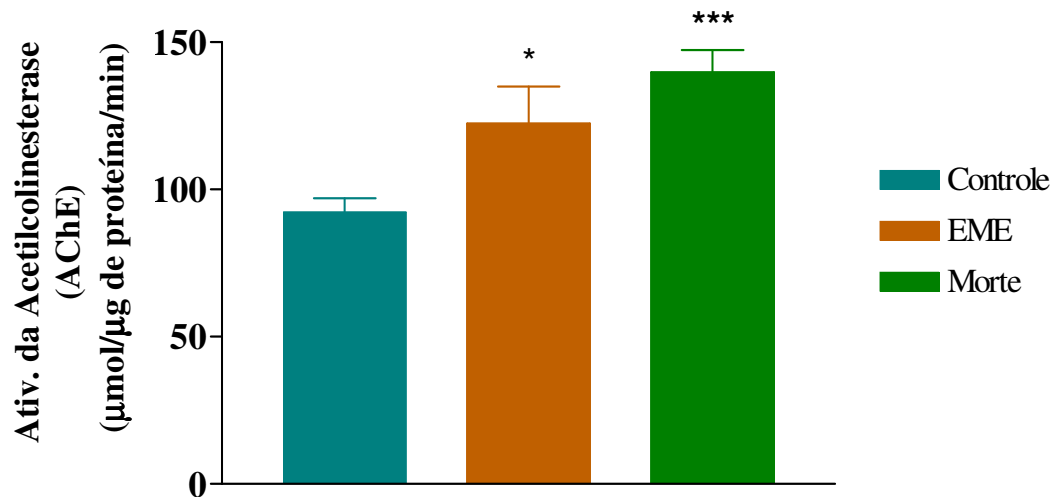


Figura 3-6 Determinação da atividade da acetilcolinesterase em corpo estriado de camundongos após EME e morte induzidos por cocaína. Os camundongos foram tratados com salina ou cocaína 90 mg/kg, i.p. Os animais que morreram após administração da droga foram imediatamente dissecados, enquanto os que apresentaram estado de mal epilético (EME) e os controles foram sacrificados e dissecados 60 minutos após a administração da droga ou água destilada, respectivamente, para a retirada do corpo estriado (CE). A atividade da acetilcolinesterase foi determinada por espectrofotometria. As barras representam média \pm EPM de 6-8 animais por grupo. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

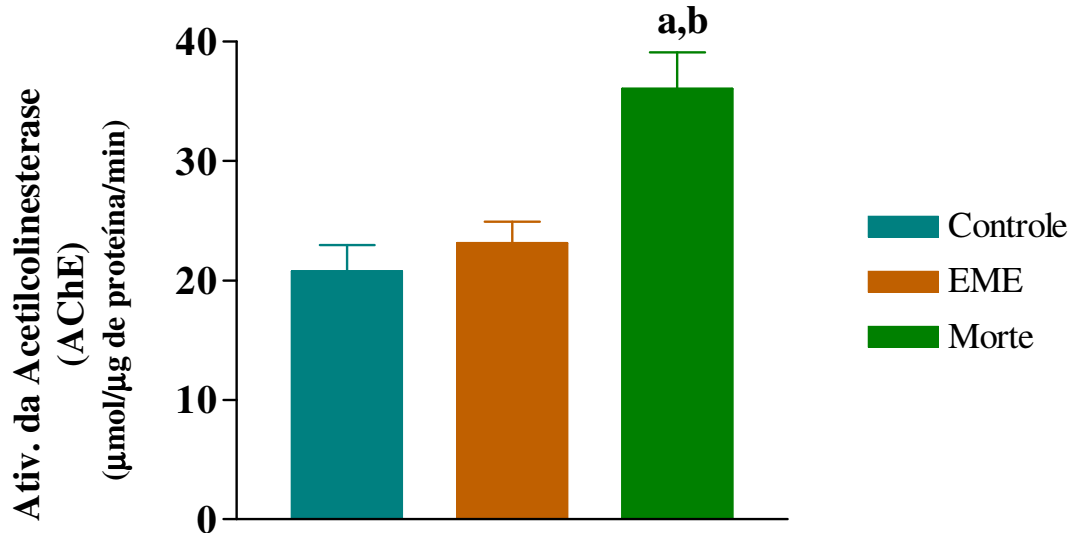


Figura 3-7 Determinação da atividade da acetilcolinesterase em córtex pré-frontal de camundongos após EME e morte induzidos por cocaína. Os camundongos foram tratados com salina ou cocaína 90 mg/kg, i.p. Os animais que morreram após administração da droga foram imediatamente dissecados, enquanto os que apresentaram estado de mal epilético (EME) e os controles foram sacrificados e dissecados 60 minutos após a administração da droga ou água destilada, respectivamente, para a retirada do córtex pré-frontal (CPF). A atividade da acetilcolinesterase foi determinada por espectrofotometria. As barras representam média \pm EPM de 6-7 animais por grupo. ^{a,b} $p < 0,01$ vs controle e EME, respectivamente. ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que o EME e morte induzidos por cocaína produzem modificações nos sítios de ligação dos receptores dopaminérgicos D₁-, D₂-símile, serotoninérgicos 5HT₂ e muscarínicos M₁-símile, bem como na atividade da acetilcolinesterase em CE e CPF de camundongos. Estas áreas cerebrais estão envolvidas na atividade convulsiva (DERANSART et al., 2000), bem como no mecanismo de ação de drogas psicoestimulantes (KUPFFERMAN et al., 2000; STEKETEE et al., 2003).

Foi observada uma redução na ligação do [³H]-SCH 23390, ou seja, receptores D₁-símile apenas após EME em ambas áreas estudadas. Esta redução, maior no CPF foi acompanhada por um aumento na afinidade do ligante pelo receptor (redução do K_d) nesta área cerebral, enquanto no CE ocorreu redução na afinidade (aumento desta constante). A literatura mostra que o estímulo de receptores D₁ facilita as convulsões induzidas por cocaína, enquanto antagonistas deste receptor como o SCH 23390 inibem a letalidade induzida por cocaína (**Ver capítulo 1, tabela 1-3**), mas não por lidocaína, ou seja, de uma maneira estereoseletiva (USHIJIMA et al., 1998; LASON, 2001). De fato, a redução dos receptores D₁ observada no presente estudo pode ter ocorrido devido à ligação da dopamina ao receptor, o que possivelmente impediu a ligação do ligante radioativo.

No **capítulo 2** foi detectado aumento da dopamina no CPF após EME induzido por cocaína (MACÊDO et al., 2004b). De fato, a DA em excesso deve ter se ligado aos receptores D₁ no CPF, e por este motivo ocorreu a redução na ligação do ligante radioativo. No entanto, em CE a redução observada pode ter ocorrido devido à perda da afinidade do ligante pelo receptor. Partindo do princípio de que houve ligação da DA ao receptor D₁ em CPF, e que drogas que bloqueiam o receptor D₁ podem bloquear a ligação do ligante endógeno este receptor, pode-se explicar a redução observada nas convulsões induzidas por cocaína pela administração de antagonistas do receptor D₁. Outra evidência é que este receptor (D₁) é abundante no caudado-putamen (partes do estriado dorsal) e SNpr (BOYSON et al., 1986, DAWSON et al., 1988), bem como no CPF (GASPAR et al., 1995), regiões cerebrais envolvidas no mecanismo da propagação das descargas epilépticas (IADAROLA & GALE, 1982; GALE, 1984; SACKEIN, 2004).

Um estudo recente demonstrou que o agonista do receptor D₁ da dopamina, SKF 38393, atua sinergicamente com agonistas do receptor glutamatérgico para aumentar a atividade de neurônios piramidais corticais (WANG & O'DONNELL, 2001). Em contraste a estes achados, estudos eletrofisiológicos sugerem que a ativação de receptores dopaminérgicos do CPF produz efeito bifásico (GOEDERS, 1991) com os receptores D₂ reduzindo as correntes inibitórias GABA_A e receptores D₁ aumentando correntes GABA_A em neurônios piramidais (SEAMAN et al., 2001). Esta inconsistência pode ser explicada por um trabalho que sugere que a ativação do receptor D₁ parece aumentar a atividade de células piramidais quando os neurônios estão em um estado hiperpolarizado (LAVIN & GRACE, 2001).

Os receptores D₁ estão distribuídos em áreas cerebrais muito próximas aos receptores glutamatérgicos ionotrópicos (NMDA e AMPA) em sinapses assimétricas e dendritos (SESACK et al., 1998). Estes receptores glutamatérgicos estão envolvidos na atividade convulsiva, pois o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC. A respeito das respostas sinápticas mediadas pelo NMDA, grande parte dos estudos têm descrito que a ativação de receptores D₁ aumenta as respostas mediadas pelo NMDA no corpo estriado (CÉPEDA & LEVINE, 1998; FLORES-HERNANDEZ et al., 2002), hipocampo (HUANG & KANDEL, 1995; YANG, 2000) e neurônios corticais (CHEN & YANG, 2002; SEAMANS et al., 2001). Antagonistas do receptor NMDA, incluindo MK-801, reduzem a incidência de convulsões e mortalidade causadas por uma única injeção de cocaína (ROCKHOLD et al., 1991), bem como abolem completamente o desenvolvimento de sensibilização para as convulsões e letalidade associadas à cocaína (ITZHAK & STEIN, 1992). Estes dados reforçam o envolvimento dos receptores NMDA neste processo. De fato, no **capítulo 1** deste trabalho foi mostrado que a cetamina um antagonista do receptor NMDA quando administrada agudamente na dose de 30 mg/kg (dose sub-anestésica) antes da cocaína aumentou de forma significativa a latência para a primeira convulsão, bem como aumentou a sobrevivência dos animais, apresentando um perfil protetor das convulsões e letalidade induzidas po cocaína, o que corrobora com os resultados de ITZHAK & STEIN (1992).

As convulsões induzidas por cocaína também parecem ter a participação dos receptores dopaminérgicos D₂-símile (USHIJIMA et al., 1998; MACÊDO et al., 2004c). De fato, agonistas deste receptor dopaminérgico inibiram convulsões desencadeadas pela infusão intravenosa de cocaína em camundongos. No presente trabalho, foi encontrado um aumento nos sítios de ligação D₂-símile após as convulsões e morte induzidas por cocaína em CPF, mas apenas após a morte em CE. O aumento na densidade dos receptores D₂ já foi demonstrado após o *kindling* elétrico no neocórtex e núcleo accumbens (JANOWSKY et al., 1991). Estes dados foram confirmados por estudos de hibridização *in situ*, mostrando também aumentos na expressão do RNAm para receptores dopaminérgicos D₂ nas mesmas estruturas (GELBARD & APPLGATE, 1994).

O aumento observado nos sítios de ligação dos receptores D₂ pode refletir um mecanismo compensatório contra as convulsões. Os receptores dopaminérgicos D₂-símile estão localizados principalmente em regiões anatômicas que dão origem a fibras dopaminérgicas, como a substância negra e área tegmental ventral, indicando que receptores D₂ têm localização pré-sináptica (GRANDY et al., 1991) e quando estimulados inibem a liberação de dopamina. Como é fato que a cocaína bloqueia o transportador de dopamina, e os receptores D₂ atuam como receptores pré-sinápticos, o aumento dos receptores D₂ pode ter ocorrido como mecanismo compensatório para reverter o bloqueio da cocaína no transportador da DA e, portanto, minimizar a participação desta monoamina na atividade convulsiva.

Trabalho recente (BOZZI et al., 2002) utilizando animais geneticamente modificados para não expressarem os receptores D₂, ou seja, camundongos D_{2R}^{-/-}, mostrou que os mesmos apresentaram um aumento de suscetibilidade às convulsões induzidas por pilocarpina e ácido cáínico. Isto claramente implica que a ativação dos mecanismos de transdução dos receptores D₂ pela ligação da dopamina eleva o limiar das convulsões. Trabalhos mostram que o mecanismo mediado pelos receptores D₂ é crucial para a generalização, mas não para o início das convulsões límbicas (BARONE et al., 1993). Trabalhos anteriores mostram que apesar da inibição mediada pelos receptores D₂ ocorre falha dos mesmos se o estímulo convulsivante é dado acima de um certo limiar (BOZZI et al., 2000).

Os receptores D₂, da mesma forma que os D₁ também têm uma importante interação com o sistema glutamatérgico. Em neurônios corticais de humanos ou neurônios estriatais de ratos, CÉPEDA et al. (1992, 1993) descobriram que o agonista D₂ quinpirole suprimiu a despolarização de membrana induzida pela aplicação iontoforética direta de quisqualato (agonista do receptor AMPA), sugerindo uma supressão pós-sináptica pelo receptor D₂ da função de receptores glutamatérgicos não-NMDA. A classe de receptores D₂ pré-sináptica localizada em terminações glutamatérgicas também foi implicada na supressão funcional da transmissão sináptica glutamatérgica não-AMPA em neurônios da área tegmental ventral, corpo estriado e núcleo parabraquial (LEVINE et al., 1996a,b; KOGA & MOMIYAMA, 2000). Assim, ambos receptores D₂, pré- e pós-sinápticos podem reduzir a liberação pré-sináptica de glutamato e suprimir as funções dos receptores não-NMDA pós-sinápticos, respectivamente. Receptores D₂ também estão envolvidos com a neurotransmissão GABAérgica, desde que agonistas D₂ quando administrados no CPF através de uma cânula de diálise aumentaram de maneira dose-dependente os níveis extracelulares de GABA (GROBIN & DEUTCH, 1998).

O papel dos receptores dopaminérgicos nas convulsões induzidas por cocaína é uma questão importante e merece estudos eletrofisiológicos para elucidar a função real destes receptores nestas convulsões. Nosso trabalho indicou que a redução da ligação do ligante radioativo ao receptor D₁ após as convulsões induzidas por cocaína pode estar associada com a ativação específica deste receptor pelo ligante endógeno. Por outro lado, o aumento dos receptores D₂ ocorreu provavelmente devido a um mecanismo compensatório para o excesso de excitação no SNC, visto que estes receptores potencializam a neurotransmissão GABAérgica inibitória e inibem a neurotransmissão glutamatérgica excitatória na tentativa de proteger os animais contra as convulsões e morte induzidas por cocaína. Em trabalho recente (MACÊDO et al., 2004b e **capítulo 2**) mostramos que os níveis das monoaminas estão alterados no EME e morte. Animais que apresentaram EME mostraram uma redução dos níveis de DA no CE e aumento no CPF, enquanto a morte não alterou o conteúdo de DA no CE, mas reduziu no CPF. Isto indica que diferentes mecanismos influenciam o envolvimento destas áreas cerebrais com as convulsões.

Um outro ponto importante que deve ser levado em conta é o mecanismo intracelular destes receptores. Assim, receptores D₂-símile são negativamente (inibitórios) e D₁-símile positivamente (excitatórios) acoplados à adenililciclase, reduzindo ou aumentando, respectivamente o monofosfato cíclico de 3',5'-adenosina (AMPc), o qual pode influenciar a atividade convulsivante. O AMPc é altamente implicado na geração das convulsões e tem sido extensivamente estudado em modelos *in vivo* e *in vitro* (HIGASHIMA et al., 2002). Uma elevação no conteúdo de AMPc acompanhando a atividade epiléptica quimicamente induzida foi relatado no córtex cerebral de ratos (FERREDELI et al., 1980). Em pacientes epiléticos, a concentração de AMPc no fluido cerebrospinal também está elevada após um ataque (MYLLYLA et al., 1975). Permanece incerto ainda, se a elevação do AMPc é consequência ou causa das convulsões. Evidências de que o conteúdo de AMPc não aumenta até a convulsão ter ocorrido sugere a possibilidade de que aumentos no AMPc podem estar envolvidos na atenuação das convulsões, mas não na indução das mesmas (FERREDELLI et al., 1980). Trabalhos mais recentes mostram que o sistema AMPc suprime a atividade de canais de potássio do tipo A (HOFFMAN & JOHNSTON, 1998). A inativação destes canais nos dendritos aumenta os potenciais de propagação de retorno o que resulta em um influxo maciço de cálcio nos dendritos (HOFFMAN et al., 1997). A excitação destes dendritos pode ter um importante papel na epileptogênese (JOHNSTON et al., 2000).

Trabalho anterior desenvolvido em nosso laboratório (MACÊDO et al., 2004a) mostrou que a administração de cocaína durante 7 dias nas doses de 20 e 30 mg/kg,i.p., também induz alterações nos receptores D₁- e D₂-símile em corpo estriado. A cocaína na dose de 30 mg/kg promoveu uma *upregulation* do receptor D₁, embora nas primeiras 24 horas após a retirada da droga tenha ocorrido uma redução dos níveis deste receptor. Estas alterações no receptor D₁ persistiram até um período de 30 dias de retirada. MAGGOS et al. (1998) usando a técnica de PET *scan* para verificar a densidade da ligação do [¹¹C]SCH23390 aos receptores D₁, no corpo estriado de ratos, observaram uma *downregulation* deste receptor no último dia após administração repetida de cocaína (três injeções ao dia por 14 dias).

Com relação ao receptor D₂ no trabalho anteriormente referido (MACÊDO et al., 2004a) foi mostrado uma *upregulation* deste receptor nas doses de 20 e 30 mg/kg, nas duas doses estudadas nos 4 períodos de retirada observados: 30 min, 1 dia, 5 dias e 30 dias, em

corpo estriado. Estes resultados mostram que a cocaína também em baixas doses produz alterações nestes receptores e que provavelmente estas estejam relacionadas ao efeito do *kindling*, também chamado de abrasamento, no qual a administração repetida de doses sub-convulsivantes de drogas com potencial convulsivante como a cocaína está associada com um aumento no risco do desenvolvimento de convulsões (POST & ROSE 1976, STRIPLING & ELLINWOOD 1977 a,b), inclusive em humanos. Um estudo feito por DHUNA et al., 1991 com 98 pacientes dos 945 admitidos, no *Hennepin County Medical Center*, vítimas de intoxicação por cocaína, concluiu que anos de abuso da droga podem resultar em *kindling* químico. Portanto, podemos imaginar que estas alterações observadas em baixas doses podem contribuir para o desenvolvimento de intoxicações relativas ao uso crônico ou em baixas doses da droga. Este fato pode ser comprovado através dos resultados vistos no **capítulo 1**, no qual antagonistas do receptor D₁ reduziram o número de animais que convulsionaram e aumentaram a sobrevivência dos mesmos. Sabe-se também que estas drogas atenuam o aumento da atividade locomotora induzida por cocaína, como também o desejo (*craving*) pela droga.

Com relação ao receptor 5HT₂ da serotonina, foi evidenciado no presente trabalho um aumento na sua densidade em ambas áreas e condições experimentais (EME e morte) estudadas. Estes receptores parecem ter um importante envolvimento nas convulsões induzidas por cocaína, visto que pesquisas anteriores mostram que o pré-tratamento com antagonistas 5HT₂ como cinanserina, cetanserina, pirenpirone, entre outros atenuam estas convulsões (RITZ & GEORGE, 1997a). No entanto, no presente trabalho a mianserina, (**capítulo 1**) falhou na inibição destas convulsões, e a fluoxetina, um inibidor de recaptção da 5HT potencializou as mesmas.

Trabalho recente (O'DELL et al., 2000) utilizando animais com sensibilidades diferentes às convulsões induzidas por cocaína, ou seja, animais 6J, geneticamente mais sensíveis às convulsões e animais 6ByJ, geneticamente mais resistentes, mostrou que os animais 6ByJ *naive* apresentaram uma maior densidade de receptores 5HT₂ que os 6J, e a variação maior ocorreu no córtex frontal, embora tenha ocorrido também no CE. Os autores justificaram este resultado baseado na afinidade do ligante pelo receptor, onde esta foi maior nos animais 6J que nos 6ByJ. Portanto, apesar dos animais 6ByJ apresentarem maior

resistência às convulsões e maior quantidade de receptores 5HT₂ este receptor parece estar menos disponível à ligação do ligante endógeno. Isto explica a maior resistência dos animais às convulsões induzidas por cocaína. De fato estes autores determinaram que nos animais 6ByJ que apresentaram uma maior quantidade de receptores 5HT₂, a quantidade de antagonista necessária para bloquear as convulsões era bem maior que a necessária para bloquear as convulsões nos animais 6J que possuem uma quantidade menor de receptores 5HT₂. A dose da cocaína necessária para induzir as convulsões também era diferente, sendo 61 mg/kg e 100 mg/kg, respectivamente para animais 6J e 6ByJ.

Se analisarmos a **Figura 2-5 do capítulo 2**, que representa as taxas metabólicas em CE, podemos observar uma redução significativa na metabolização da 5-HT após morte induzida por cocaína. Desta forma o aumento na 5-HT pode não ter ocorrido especificamente naquele momento no qual o animal foi sacrificado (60 min após injeção da cocaína), mas podia estar iniciando naquele período, o que sugere que esta monoamina, bem como seu receptor, estão realmente envolvidos nas convulsões e morte induzidas por cocaína nesta área cerebral estudada.

A liberação de 5HT foi descrita ser, em geral, inibitória para neurônios localizados no CPF (WANG et al., 1992). A 5HT produz suas ações mediante sua ligação com numerosos receptores (5HT₁₋₇), dos quais existem vários subtipos (HOYER & MARTIN, 1997). Vários receptores da 5-HT foram localizados no córtex, incluindo membros das famílias de receptores 5HT₁, 5HT₂ e 5HT₃. Desta forma, enquanto 5HT pode de forma geral ser um neurotransmissor inibitório no CPFm, receptores específicos podem produzir diferentes efeitos. Talvez o receptor da 5HT mais bem estudado tenha sido o 5HT₂. Evidências sugerem que a estimulação de receptores 5HT₂ pode alterar as transmissões dopaminérgicas, glutamatérgicas e GABAérgicas nesta área cerebral. Por exemplo, os receptores serotoninérgicos 5HT₂ estão localizados em interneurônios GABAérgicos (WILLINS et al., 1997) e a ativação destes receptores aumenta níveis extracelulares de GABA no córtex pré-frontal (ABI-SAAB, 1999). Contrapondo esta informação, o agonista do receptor 5HT_{2A/2C}, DOI[(-)-2,5-dimetoxi-4-iodoanfetamina] pode atenuar a inibição de neurônios piramidais mediada pelo receptor GABA_A, um efeito que pode ser bloqueado pelo antagonista do receptor 5HT₂, risperidona (FENG et al., 2001).

Considerando o sistema de aminoácidos excitatórios, estudos eletrofisiológicos sugerem que a 5HT facilita a transmissão glutamatérgica via ações focais em dendritos apicais de neurônios piramidais (AGHAJANIAN & MAREK, 1997). Esta facilitação na transmissão glutamatérgica é um resultado do aumento da frequência de correntes excitatórias pós sinápticas e pode ser prevenida pela aplicação de antagonistas do receptor 5HT_{2A} como o M100907 ou SR46549B (AGHAJANIAN & MAREK, 1997). Foi proposto que a 5HT pode promover a liberação assíncrona de glutamato de eferentes talâmicos mediodorsais para o CPFm, os quais podem ativar neurônios piramidais do CPFm (MAREK & AGHAJANIAN, 1998; MAREK et al., 2000). Além disso, agonistas dos autoreceptores metabotrópicos glutamatérgicos, mGlu_{2/3}, podem bloquear a facilitação induzida por 5-HT da transmissão glutamatérgica no CPF (MAREK et al., 2000).

Outros estudos têm demonstrado que a 5HT pode facilitar, em baixas concentrações, e inibir, em altas concentrações, a ativação induzida pelo NMDA de células piramidais via receptores 5HT_{2A} (ARVANOV et al., 1999). Surpreendentemente, o antagonista 5HT_{2A} M100907 também facilita a liberação de glutamato evocada pelo NMDA (ARVANOV & WANG, 1998). Portanto, de forma geral, a 5HT atuando via receptores 5HT_{2A} potencia a transmissão glutamatérgica de neurônios piramidais por: 1) aumentar a liberação de glutamato de aferentes do CPFm e; 2) atenuando as correntes GABA_A de neurônios piramidais. A facilitação da liberação do glutamato no CPFm promovida pelo receptor 5HT_{2A} pode ser suprimida pelos autoreceptores glutamatérgicos (mGLU_{2/3}). Estes eventos explicam o que foi visto neste trabalho.

Em resumo, no CPF (**capítulo 2, Figuras 2-3 e 2-6**) ocorreu aumento da 5HT após EME e redução na taxa de metabolização para este neurotransmissor após EME e morte. Também houve um aumento no receptor 5HT₂, como evidenciado neste capítulo após ambas condições estudadas, embora em menor proporção do que o aumento ocorrido com estes receptores em CE. Estes resultados sugerem uma importante participação da neurotransmissão serotoninérgica nas convulsões e morte induzidas por cocaína em CPF de camundongos, principalmente se partirmos do fato explorado anteriormente de que esta neurotransmissão pode estar associada a uma possível ativação da neurotransmissão glutamatérgica. De fato foi

observada uma redução dos receptores glutamatérgicos que pode estar associada a uma possível ativação destes receptores como demonstrado no **capítulo 4** deste trabalho.

Ocorreu uma redução na ligação do ligante radioativo aos receptores M₁-símile após EME e morte induzidos por cocaína, apenas no CPF. Esta área cerebral recebe inervação colinérgica do núcleo *basalis magnocellularis* (SATO & FIBIGER, 1986; GAYKEMA et al., 1990). Além dos impulsos aferentes para o córtex, a acetilcolina é também liberada de circuitos locais de neurônios nesta região (CUELLO & SOFRONIEW, 1984; HOUSER et al., 1985). Os receptores muscarínicos do tipo M₁ estão localizados em neurônios piramidais no CPFm (CHESSEL et al., 1993). Agonistas M₁, como PD 142505-0028 quando injetados no córtex frontal, ativam neurônios piramidais, como determinado pelo aumento nas concentrações de glutamato no dialisato de regiões estriatais (DIJK et al., 1995). Este efeito excitatório da ACh no CPF é projetado para o CE. Como os receptores M₁-símile estão correlacionados com a estimulação glutamatérgica, a redução da ligação do ligante radioativo aos receptores M₁-símile, como observado neste trabalho, pode indicar uma possível ocupação destes receptores pela ACh contribuindo para a atividade convulsiva ou posterior morte dos animais, via liberação de glutamato.

Com base em trabalhos anteriores (SANZ et al., 1997), que determinaram um aumento nos níveis de glutamato quando os receptores M₁ estão ativados, pode-se dizer que este aminoácido excitatório pode ter um papel importante na convulsão e morte induzidas por cocaína no CPF, quando liberado indiretamente após a ativação de receptores muscarínicos. Além disso, foi mostrado que o pré-tratamento com antagonistas seletivos do receptor M₁, como pirenzepina foi efetivo na inibição das convulsões, fato não observado com a atropina, um antagonista M₁/M₂, que apenas parcialmente preveniu a morte induzida por cocaína (RITZ & GEORGE 1997a,b). Trabalhos anteriores mostram uma redução dos receptores M₁ após convulsão induzida por eletrochoque e *kindling* elétrico no hipocampo de ratos (MINGO et al., 1998). Trabalho prévio de nosso laboratório mostrou que cocaína nas doses de 20 e 30 mg/kg administrada durante 7 dias (MACÊDO et al., 2004a) reduz o número de receptores muscarínicos M₁+M₂ em corpo estriado de ratos 30 min, 1, 5 e 30 dias após a retirada da cocaína. Trabalhando agora com as convulsões induzidas pela droga não vimos nenhuma alteração nos receptores M₁ a nível de corpo estriado, mas apenas no córtex pré-frontal. Pode

ser que o receptor M₂ tenha também um importante papel nas convulsões e morte induzidas por cocaína, como também foi visto recentemente na convulsão induzida por pilocarpina (OLIVEIRA et al., 2005).

Para melhor elucidar o papel da neurotransmissão colinérgica nas convulsões e morte induzidos por cocaína, foi determinada a atividade da acetilcolinesterase cerebral dos animais. Esta enzima tem um papel crucial na transmissão colinérgica, hidrolisando o neurotransmissor acetilcolina com o intuito de terminar a transmissão nervosa.

Esta enzima mostrou um comportamento diferente do observado em relação aos receptores M₁-símile, ou seja, ocorreu um aumento na atividade após EME e morte no CE e, um aumento apenas após a morte no CPF. Este resultado pode dar suporte à hipótese de que não apenas os receptores M₁-símile estejam envolvidos nas convulsões induzidas por cocaína após EME no CE, mas possivelmente receptores muscarínicos M₂-símile, ou até mesmo nicotínicos podem estar participando do mecanismo desta toxicidade induzida pela cocaína. A mensuração da atividade da acetilcolinesterase parece ser um bom indicador da função colinérgica, ou seja, a redução na atividade da mesma indica uma redução da transmissão colinérgica (SUDHA et al., 1995). Assim, o aumento na atividade da AChE vista após EME e morte no CE pode estar relacionado a um aumento no conteúdo de ACh nesta área cerebral, contribuindo para a atividade convulsiva.

Além do que foi descrito relativo à AChE cerebral, trabalhos na literatura mostram que a cocaína é fracamente metabolizada no soro de pacientes (total de oito pacientes) com sensibilidade à succinilcolina, uma droga bloqueadora neuromuscular, metabolizada pela colinesterase plasmática (JATLOW et al., 1979; STEWART et al., 1979). Este trabalho levou muitos autores a teorizar que pacientes com deficiência na colinesterase plasmática têm um risco aumentado para a ocorrência dos efeitos adversos da intoxicação por cocaína (CREGLER & MARK, 1986; ANTON, 1988; BUCHANAN, 1988; ELLENHORN & BARCELOUX, 1988; CREGLER, 1989; LEWIN et al., 1990).

Em conclusão, este protocolo experimental mostra que as convulsões e morte induzidas por cocaína produzem modificações nos receptores dopaminérgicos e muscarínicos

em CPF e CE, sugerindo uma importante participação destes receptores nestas áreas cerebrais estudadas nas convulsões e morte induzidas pela droga.

CAPÍTULO 4

DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DE RECEPTORES GABAÉRGICOS, GLUTAMATÉRGICOS E NÍVEIS DE NITRITO/NITRATO APÓS AS CONVULSÕES E MORTE INDUZIDAS POR OVERDOSE DE COCAÍNA EM CORPO ESTRIADO E CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE CAMUNDONGOS

Introdução

O sistema glutamatérgico foi na década passada implicado no vício por cocaína (MACGINTY, 1995; MASH et al., 1995; ITZHAK & ALI, 1998). O glutamato age através de receptores ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos são classificados como NMDA e não-NMDA (receptores AMPA e cainato). Estudos prévios mostraram que antagonistas dos receptores NMDA atenuam as propriedades psicoestimulantes e de reforço da cocaína (PULVIRENTI et al., 1994). Além disso, antagonistas dos receptores AMPA e cainato reduziram a sensibilização locomotora induzida pela cocaína (KARLER et al., 1994, LI et al., 1997, JACKSON et al., 1998), auto-administração (JACKSON et al., 1998) e preferência de lugar (CERVO & SAMANIN, 1995).

O glutamato também parece ter um importante papel nos efeitos tóxicos da cocaína. Estudos prévios mostraram que antagonistas do receptor NMDA atenuam as convulsões e letalidade induzidas por cocaína (ROCKHOLD et al., 1991; WITKIN & TORTELLA, 1991; ITZHAK & STEIN, 1992; MATSUMOTO et al., 1997, 1998). Entretanto, os antagonistas dos receptores não NMDA como o NBQX e GYKI foram ineficazes na atenuação dos efeitos convulsivos e letais da cocaína (POUW et al., 1999). Os receptores NMDA são importantes nos eventos finais que resultam da *overdose* de cocaína (convulsões, insuficiência respiratória e colapso cardiovascular). Assim, o complexo receptor NMDA é, desta forma, um alvo lógico para intervenções farmacológicas, mesmo que a cocaína não interaja diretamente com ele.

O receptor NMDA contém muitos sítios modulatórios e de ligação de antagonistas que podem servir como alvo de farmacoterapias: sítio de ligação glutamatérgico, sítio de ligação do co-agonista glicina e sítios moduladores alostéricos, entre outros. (BIGGE, 1993). Investigações prévias mostram que antagonistas competitivos, bloqueadores do canal e anatagonistas do sítio de ligação da glicina no receptor NMDA podem atenuar a toxicidade comportamental induzida por cocaína em animais (DERLET & ALBERTSON, 1990; ITZHAK & STEIN, 1992; ROCKHOLD et al., 1991; WITKIN & TORTELLA, 1991). Entretanto, muitos dos antagonistas testados em estudos iniciais apresentavam limitações, tais como eficácia marginal, problemas de biodisponibilidade e efeitos colaterais indesejáveis, que comprometiam seu potencial clínico (AUER, 1997; BIGGE, 1993; KORNHUBER &

WELLER, 1997; WITKIN & TORTELLA, 1991). Mais recentemente BRACKETT et al. (2000) estudaram antagonistas mais específicos do sítio NMDA/glicina como ACEA-1021, ACEA-1031, DCQX e observaram que estes compostos de maneira dose-dependente, atenuaram os efeitos letais da cocaína. No entanto, estas drogas em altas doses perderam o efeito protetor contra a letalidade induzida por cocaína (ACEA-1021 60 mg/kg, ACEA-1031 15 mg/kg, ACEA-1328 25 mg/kg, DCQX 90 mg/kg).

Em relação aos receptores metabotrópicos do glutamato, desde a clonagem e sequenciamento do mGlu₁ em 1991 (HOUAMED et al., 1991; MASU et al., 1991), sete outros receptores mGlu foram clonados e seqüenciados. Estes oito receptores estão agrupados em três grupos baseados na homologia de sua sequência, mecanismos de transdução e agonistas farmacológicos (**Quadro 4-1**). Os receptores metabotrópicos do glutamato também estão envolvidos com as convulsões, embora de maneira diferente. Os receptores do grupo I são encontrados predominantemente pós-sinápticamente, com localização adjacente às margens da fenda sináptica, e mGlu₅, mas não mGlu₁ é também encontrado na glia. A isoforma mGlu_{1α} é particularmente predominante em interneurônios GABAérgicos no hipocampo e cerebelo (SHIGEMOTO et al., 1997), enquanto o mGlu₅ é predominante no córtex límbico e núcleos da base.

Os receptores do grupo I são acoplados à proteína G estimulatória (G_q) e ativam a hidrólise do inositol, enquanto os receptores do grupo II são predominantemente pré-sinápticos. Os receptores do grupo III são também pré-sinápticos sendo localizados na área motora dos núcleos da base (MESSENGER et al., 2002) e apenas o mGlu₆ está presente em neurônios da retina. Os receptores dos grupos II e III agem via proteína G inibitória. Agonistas dos receptores do grupo I causam aumento na liberação do glutamato no neocórtex, corpo estriado e hipocampo, enquanto os do grupo II e III inibem a liberação do glutamato.

Face a este achado, pesquisas sugerem que agonistas dos receptores metabotrópicos dos grupos II e III por bloquearem a transmissão glutamatérgica são possíveis alvos para a síntese de novas drogas anticonvulsivantes. Também foi evidenciado que os receptores mGlu estão expressos em regiões epileptogênicas chave do cérebro incluindo o córtex cerebral, tálamo, amígdala, hipocampo, e até mesmo os núcleos da base os quais recebem impulsos de entrada provenientes destas regiões (ROUSE et al., 2000).

Quadro 4-1 Identificação dos receptores mGlu, sistemas de transdução e principais agonistas e antagonistas

Grupo	Subtipos	Transdução	Farmacologia
I	mGlu ₁	Gq	Agonistas: DHPG, CHPG, (1S,3R)-ACPD
	mGlu ₅	↑PLC, ↑Ca ²⁺ , ↓K ⁺ , ↓VOCC, ↑L-VOCC	Antagonistas: AIDA, CPCCOEt, BAY 36-720, SIB 1893, MPEP, LY367385, LY456236
II	mGlu ₂	Gi/o	Agonistas: APDC, NAAG, DCG-IV, LY354740, LY379268, LY389795
	mGlu ₃	↓AC, ↓VOCC, ↑K ⁺	Antagonistas: LY341495, EGlu
III	mGlu ₄	Gi/o ↓AC, ↓VOCC, ↑K ⁺	Agonistas: (R,S)-PPG, (S)-DCPG, L-AP4, L-SOP, ACPT-1
	mGlu ₆		Antagonistas: MAP4, MSOP, MPPG, MCPA, CPPG
	mGlu ₇		
	mGlu ₈		

Fonte: MOLDRICH et al., 2003

Símbolos: ↑ estimulação; ↓ inibição; AC, adenililciclase; Ca²⁺, concentração de cálcio intracelular; K⁺ concentração de potássio intracelular; Gi/o – proteína G inibitória; Gq – proteína G que estimula a fosfolipase C; VOCC, canais de cálcio operado por voltagem; L-VOCC, canais de cálcio operados por voltagem tipo L; PLC, fosfolipase C.

Evidências foram documentadas à cerca do papel principal da neurotransmissão GABAérgica na neuropatologia dos ataques convulsivos em humanos e animais experimentais (SNODGRASS, 1992; BRADFORD, 1995). De acordo com este fato existe a evidência de que o mecanismo de ação de muitas drogas anticonvulsivantes seja atribuído à habilidade das mesmas em aumentar a inibição mediada pelos receptores GABA_A (ROGAWSKI & PORTER, 1990). Visto que atualmente são reconhecidas outras classes de receptores GABA, procura-se o envolvimento dos receptores GABA_B nas convulsões. Tudo indica que o papel dos receptores GABA_B nas convulsões é mais complexo, pois agonistas e

antagonistas deste receptor podem produzir ações anticonvulsivantes e convulsivantes dependendo do estímulo indutor da convulsão.

O óxido nítrico (NO) é um transmissor gasoso, altamente difusível e amplamente presente no sistema nervoso, e está implicado em uma grande variedade de funções fisiológicas e fisiopatológicas (DAWSON & SNYDER, 1994; SNYDER et al., 1998). NO é sintetizado por 3 diferentes isoenzimas NO sintases (NOS), todas estando presentes no SNC. Em situações fisiológicas o NO se liga à guanilato ciclase solúvel ativando a produção de GMPc. O NO é rapidamente metabolizado em seus metabólitos estáveis, nitritos e nitratos, dependendo da disponibilidade de oxigênio (LIPTON et al., 1998). Além da sua ação como molécula mensageira fisiológica, o NO participa de muitos mecanismos fisiopatológicos no SNC. Várias formas de lesão neuronal estão freqüentemente associadas ao aumento da função ou expressão da NOS (VIZZARD et al., 1995; DAWSON & DAWSON, 1996; WU, 1996; LUMME et al., 1997; LEIST & NICOTERA, 1998; VANHATALO et al., 1998).

No SNC, quantidades excessivas de NO produzidas pelos neurônios induzem ataques límbicos e lesão neuronal hipocampal tardio devido ao aumento da liberação de glutamato pelo NO neuronal (JELENKOVIC et al., 2002). Com base em experimentos animais o NO vem sendo implicado em muitos mecanismos moleculares de convulsões epilépticas indo desde a mediação da cascata excitotóxica até a modulação do fluxo sanguíneo no SNC e finalmente participando da lesão neuronal subsequente (DALKARA et al., 1994; HERBERG et al., 1995; THEARD et al., 1995). No processo patológico com superprodução de NO, muitas destas novas moléculas de NO são convertidas a peroxinitrito, o qual é um potente radical livre (BOLANÕS et al., 1997; LIPTON et al., 1998). Esta substância subsequente interfere com o metabolismo energético mitocondrial, podendo causar morte neuronal por necrose ou apoptose (LEIST & NICOTERA, 1998). Por causa da sua meia-vida curta (< 30 s), sua produção no corpo só pode ser estimada pela determinação de seus metabólitos nitrito/nitratos (HEVEL & MARLETTA, 1994). Numerosos estudos demonstram níveis elevados de nitrito/nitrato no líquido cefalorraquidiano de pacientes com várias doenças neurológicas.

Dados recentes mostram a eficácia de substâncias com propriedades antioxidantes nas terapias das distúrbios convulsivos, o que fornece provas de um papel crucial dos radicais

livres na patogênese e lesão cerebral neurotóxica, ou seja, na epilepsia (CHAMPNEY et al., 1996; KABUTO et al., 1998). Existe um número crescente de trabalhos sobre o papel do NO, uma molécula considerada como mensageiro neuronal universal no SNC, na fisiopatologia de doenças como Alzheimer e Parkinson, acidente vascular cerebral, trauma, convulsões, entre outros (BOLANOS & ALMEIDA, 1999; CASTILL et al., 2000; PRAST & PHILIPPOU, 2001; WEISINGER, 2001). A epilepsia é uma das doenças onde o NO é considerado como importante nos mecanismos de indução e propagação das convulsões, mas alguns trabalhos mostram o NO com propriedades pro- e anticonvulsivantes (DE SARRO et al., 1993; CZUCZWAR et al., 1999). Modelos convulsivos em ratos, como do ácido caínico (MULSCH et al., 1994), eletrochoque máximo e convulsões induzidas por PTZ são acompanhados de aumento na geração de NO (BASHKATOVA et al., 1996, 2000).

O NO pode causar lesão neuronal em cooperação com outras espécies reativas do oxigênio. Um aumento nos processos de geração destas espécies, ou seja, radicais hidroxil, bem como produtos da peroxidação lipídica foi observado no córtex cerebral de ratos com convulsões induzidas por compostos químicos (BELLISSIMO et al., 2001; YAMAMOTO & TANG, 1996).

Em oposição ao que foi relatado anteriormente, alguns pesquisadores (JAYAKUMAR et al., 1999; PAUL et al., 2001) ao observarem as interações entre os sistemas GABA/glutamato/NO têm relacionado o NO a uma possível proteção das convulsões, propondo uma ação anticonvulsivante para esta substância.

OBJETIVOS

Visto que drogas que interferem com as neurotransmissões GABAérgica e glutamatérgica, como determinado no **capítulo 1** têm um importante envolvimento nas convulsões e morte induzidas por cocaína, principalmente aquelas que interferiram com a neurotransmissão GABAérgica, foi decidido aprofundar este estudo e verificar o que acontecia a estes receptores após o EME e letalidade induzidos por cocaína. Como estes dois sistemas (GABA e glutamato) estão intimamente relacionados ao óxido nítrico, também foi avaliada a participação deste nos dois processos estudados, através da determinação dos níveis de nitrito/nitrato.

RESULTADOS

1 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE *OVERDOSE* DE COCAÍNA SOBRE O *BINDING* DE [³H]-GABA (RECEPTORES GABAÉRGICOS) EM CÓRTEX PRÉ-FRONTAL (CPF) E CORPO ESTRIADO (CE) DE CAMUNDONGOS

A **Tabela 4-1** mostra uma redução significativa em torno de 48 % na ligação do [³H]-GABA após EME e morte no CPF e apenas após EME no CE (CPF-Controle: 361,3 ± 36; EME: 172,3 ± 15,3; morte: 195,7 ± 18,5 fmol/mg de proteína; CE – controle: 305,4 ± 31,9; EME: 165 ± 16,5 fmol/mg de proteína).

Com relação aos efeitos da *overdose* de cocaína sobre a ligação do [³H]-glutamato em CPF e CE de camundongos, ocorreu uma redução da ligação do receptor ao ligante radioativo no CPF, sendo esta de 53 % após EME e de 72 % após a morte (Controle: 3182 ± 370,8; EME: 1475 ± 143,1; morte: 896 ± 87,4 fmol/mg de proteína), enquanto no CE ocorreu redução apenas após EME (Controle: 1842 ± 214,7; EME: 699,5 ± 56,4; morte: 1829 ± 191,5 fmol/mg de proteína) (**Tabela 4-2**).

TABELA 4-1 Efeito da administração de *overdose* de cocaína sobre o *binding* de [³H]-GABA (receptores GABAérgicos) em córtex pré-frontal (CPF) e corpo estriado (CE) de camundongos

Grupos	CPF (fmol/mg de proteína)	CE (fmol/mg de proteína)
Controle	361,3 ± 36,0 (8)	305,4 ± 31,9 (7)
EME	172,3 ± 15,3 (9)***	165 ± 16,5 (8)**
Morte	195,7 ± 18,5 (6)***	250,2 ± 24,8 (8)

Os camundongos foram tratados com salina ou cocaína 90 mg/kg, i.p. Os animais que morreram após administração da droga foram imediatamente dissecados, enquanto os que apresentaram estado de mal epiléptico (EME) e os controles foram sacrificados e dissecados 60 minutos após a administração da droga ou água destilada, respectivamente, para a retirada do córtex pré-frontal (CPF) e corpo estriado (CE). A determinação dos receptores GABA foi feita utilizando o antagonista inespecífico tritiado [³H]-GABA. Os resultados (fmol/mg de proteína) foram expressos como média ± EPM do número de animais mostrados em parênteses.

***p < 0,001, **p < 0,01, ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

TABELA 4-2 Efeito da administração de *overdose* de cocaína sobre o *binding* de [³H]-glutamato (receptores glutamatérgicos) em córtex pré-frontal (CPF) e corpo estriado (CE) de camundongos

Grupos	CPF (fmol/mg de proteína)	CE (fmol/mg de proteína)
Controle	3182 ± 370,8 (7)	1842 ± 214,7 (6)
EME	1475 ± 143,1 (8)***	699,5 ± 56,4 (6)***
Morte	896 ± 87,4 (6)***	1829 ± 191,5 (7)

Os camundongos foram tratados com salina ou cocaína 90 mg/kg, i.p. Os animais que morreram após administração da droga foram imediatamente dissecados, enquanto os que apresentaram estado de mal epiléptico (EME) e os controles foram sacrificados e dissecados 60 minutos após a administração da droga ou água destilada, respectivamente, para a retirada do córtex pré-frontal (CPF) e corpo estriado (CE). A determinação dos receptores glutamatérgicos foi feita utilizando o antagonista inespecífico tritiado [³H]-glutamato. Os resultados (fmol/mg de proteína) foram expressos como média ± EPM do número de animais mostrados em parênteses.

***p < 0,001, ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

2. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE NITRITO/NITRATO EM CORPO ESTRIADO (CE) E CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE CAMUNDONGOS APÓS EME E MORTE INDUZIDOS POR *OVERDOSE* DE COCAÍNA

Os níveis de nitrito/nitrato variaram nas mesmas áreas e condições experimentais observadas em relação aos receptores GABAérgicos e glutamatérgicos (**Figuras 4-1 e 4-2**), ocorrendo aumento significativo nos níveis destes no CPF após EME (62,5 %) e morte (87,5 %) [Controle (n-7): $1,6 \pm 0,21$; EME (n-6): $2,6 \pm 0,26$; morte (n-6): $3 \pm 0,47$ mM].

Em CE o aumento significativo ocorreu apenas após EME (141%) [Controle (n-6): $3,1 \pm 0,47$; EME (n-6): $7,5 \pm 1,2$; morte (n-8): $2,3 \pm 0,3$ mM].

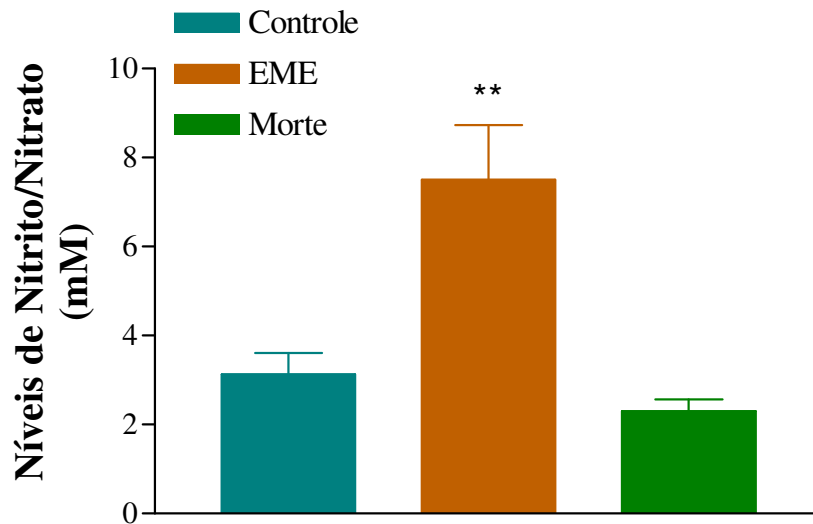


Figura 4-1 Determinação dos níveis de nitrito/nitrato em corpo estriado (CE) de camundongos após EME e morte induzidos por cocaína. Os camundongos foram tratados com salina ou cocaína 90 mg/kg, i.p. Os animais que morreram após a administração da droga foram imediatamente dissecados, enquanto os que apresentaram estado de mal epilético (EME) e os controles foram sacrificados e dissecados 60 minutos após a administração da droga ou água destilada, respectivamente para a retirada do corpo estriado. Os níveis de nitrito/nitrato foram determinados por espectrofotometria. As barras representam média \pm EPM de 7-10 animais por grupo. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao controle. ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

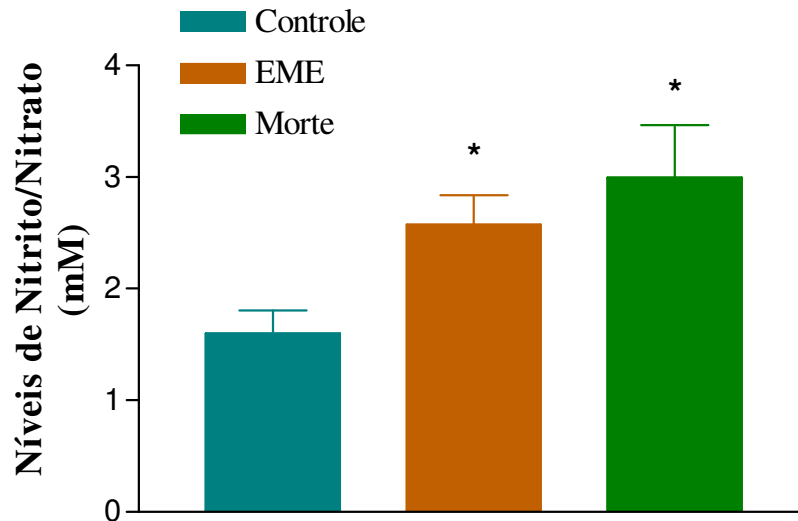


Figura 4-2 Determinação dos níveis de nitrito/nitrato em córtex pré-frontal de camundongos submetidos à convulsão e morte por *overdose* de cocaína. Os camundongos foram tratados com salina ou cocaína 90 mg/kg, i.p. Os animais que morreram após a administração da droga foram imediatamente dissecados, enquanto os que apresentaram estado de mal epiléptico (EME) e os controles foram sacrificados e dissecados 60 minutos após a administração da droga ou água destilada, respectivamente para a retirada do córtex pré-frontal. Os níveis de nitrito/nitrato foram determinados por espectrofotometria. As barras representam média \pm EPM de 7-10 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle. ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

DISCUSSÃO

Ocorreu uma redução na ligação dos ligantes radioativos aos receptores GABAérgicos e glutamatérgicos nas mesmas condições experimentais e áreas cerebrais, ou seja, a diminuição de ambos receptores ocorreu no CPF de camundongos, após EME e morte e a diminuição no CE ocorreu apenas após EME não sendo visualizada após a morte induzida por cocaína nesta área cerebral. Curiosamente o aumento nos níveis de nitrito/nitrato ocorreu, obedecendo à mesma variação observada em relação aos receptores GABA e glutamato, mostrando desta forma uma relação paralela entre estes dois sistemas de neurotransmissão e o NO nas convulsões e morte induzidas por cocaína.

A literatura vem dando atenção à interação entre estes sistemas (JAYAKUMAR et al., 1999; PAUL et al., 2001). Os anticonvulsivantes mais novos têm como mecanismo a inibição da enzima metabolizadora do GABA, a GABA transaminase (GABA-T). Os inibidores de GABA-T, como a vigabatrina, uma droga anticonvulsivante, produzem uma redução da atividade da GABA-T cerebral em 65-80 % comparado ao controle, com um aumento concomitante no conteúdo de GABA cerebral de 40-100 % (NEAL & SHAH, 1990). A liberação basal de GABA no hipocampo aumentou em 250-450 % dos níveis controle seguindo a administração de inibidores da GABA-T (QUME & FOWLER, 1997). Por outro lado, o glutamato (um neurotransmissor excitatório) no SNC tem um importante papel na manutenção dos níveis de GABA no cérebro pela sua conversão a GABA através da enzima ácido glutâmico descarboxilase (GAD) (ver **Figura I-6, INTRODUÇÃO**). Desta forma, a inibição desta enzima pode depletar a concentração de GABA no cérebro.

Contrapondo estes mecanismos, o NO foi proposto como uma substância anticonvulsivante endógena (BUISSON et al., 1993). O NO é sintetizado no cérebro à partir do aminoácido L-arginina através da atividade da enzima NOS e também por uma via independente da NOS (YAMADA & NABESHIMA, 1997). Trabalhos anteriores (BUISSON et al., 1993) mostram que convulsões induzidas pelo NMDA foram potencializadas por agentes que inibiram a síntese de NO. Dando suporte a esta evidência, foi visto que o efeito de inibidores da síntese do NO foi revertido pelo precursor do NO, L-arginina e o bloqueio da NO sintase aumentou o *kindling* da amígdala ou seja, a administração sistêmica de um inibidor da NO sintase facilitou o *kindling* (RONDOUIN et al., 1992).

Em outro estudo foi mostrado que a ausência da síntese do NO durante a epilepsia aumentou a severidade das convulsões e a morte neuronal (RONDOUIN et al., 1993; PENIX et al., 1994). Além disso, a inibição da síntese do NO aumentou a severidade das convulsões induzidas por ácido caínico e outros sugerindo que o NO age como um anticonvulsivante endógeno com a duração dos ataques dobrando quando a síntese do NO é inibida (RONDOUIN et al., 1993).

JAYAKUMAR et al. (1999) mostraram em seu trabalho a correlação existente entre NO e a atividade da GABA-T no cérebro de ratos. No estudo destes pesquisadores 10 min após a administração de L-Arginina, as concentrações de GABA e NO no córtex cerebral dos ratos aumentaram, enquanto a atividade da GABA-T diminuiu. Desta forma, o NO contribui para a liberação de GABA na fenda sináptica. Alguns pesquisadores relatam que este aumento na liberação do GABA provém do aumento nas concentrações de potássio (SEILICOVICH et al., 1995). Drogas como o nitroprussiato de sódio, um doador de NO, dobram a liberação de GABA. Interessantemente, em outro estudo, os autores sugeriram que o NO pode atuar diretamente nas terminações nervosas para inibir a liberação de aminoácidos excitatórios (KAMISAKI et al., 1995).

Estudos mais recentes (PAUL et al., 2001) relatam que o diazepam promove o aumento de NO sendo este acompanhado por aumento na atividade da NOS. Desta forma torna-se aparente que o diazepam promove a síntese do NO por aumento na atividade da NOS. O NO é produzido enzimaticamente em resposta à ativação dos receptores de aminoácidos excitatórios. A liberação do glutamato de terminais pré-sinápticos atua nos receptores NMDA e promove a atividade da NOS e a formação do NO a partir da L-arginina (GARTHWAITE et al., 1988). Recentemente, GABA e acetilcolina foram mostrados também influenciar a atividade da NOS no cérebro (FEDELE & RAITERI, 1999). Dando suporte ao envolvimento do GABA, WANG et al. (1997) referiram que neurônios GABAérgicos têm sinapses com neurônios NOS no núcleo dorsal da rafe. A co-existência de NOS e GABA também foi demonstrada no cérebro (VALTSCHANOFF et al., 1993).

Apesar de todas estas evidências a favor do NO, ITZHAK (1996) mostrou que a inibição da NOS neuronal pelo 7-nitroindazol (7-NI), considerado um inibidor seletivo da NOS neuronal preveniu a indução e expressão da sensibilização aos efeitos convulsivantes da

cocaína. Entretanto, o mesmo estudo mostrou que o 7-NI não foi efetivo na inibição da convulsão desencadeada por uma dose alta de cocaína, mostrando que o mecanismo do NO pode estar relacionado ao desenvolvimento do *kindling*, mas no caso da administração aguda o mesmo pode ter ação protetora.

Em face a esta interação relatada anteriormente podemos teorizar que pelos resultados apresentados neste capítulo o glutamato deve estar ativando seus receptores. De fato foi vista uma redução da ligação do ligante radioativo aos receptores. Esta ativação dos receptores glutamatérgicos pelo glutamato, principalmente os receptores NMDA provoca um aumento na atividade da NOS com produção de NO.

O NO no SNC pode ser produzido pela NOS endotelial (NOSe), uma enzima constitutiva e pela NOS neuronal (NOSn). BAGETTA et al. (2002) relataram que a expressão de NOSe no cérebro não está correlacionada com convulsões e lesão neuronal. Outra parte do NO é sintetizada pela NOS induzível (NOSi) que regula a resposta imune. O excesso de NOSi no cérebro, hipocampo CA₁, foi detectada em camundongos geneticamente epiléticos (MURASHIMA et al., 2002). Além disso, um aumento marcante na imunoatividade para a nitrção de proteína induzida pela NOSi e por produtos da peroxidação de ácidos graxos ocorre no hipocampo de camundongos injetados por cainato (PENKOWA et al., 2001). Os nossos resultados mostram um aumento dos níveis de nitrito/nitrato que poderiam estar relacionados a um aumento de NO cerebral, o qual pode ter ocorrido por ação da NOSi. O excesso de NO juntamente com o aumento do estresse oxidativo após EME e morte induzidos por cocaína (**Ver capítulo 5**) pode participar do mecanismo das convulsões e morte induzidos por cocaína e até mesmo ser responsável por uma possível lesão cerebral das áreas envolvidas.

Trabalho recente (ELLIOTT et al., 2003) mostrou que a administração aguda de cocaína nas doses de 7,5 a 30 mg/kg potencia de maneira dose-dependente a expressão da NOSi induzida por lipopolissacarídeo (LPS) até 3 vezes dos valores basais (animais tratados com salina) no baço, pulmão e fígado, da mesma forma que aumentou os níveis de nitrito/nitrato. Este aumento ocorreu principalmente na administração aguda, não sendo detectada após administração repetida. Provavelmente o mecanismo de aumento da NOSi e portanto, nitrito/nitrato, está acontecendo no cérebro como evidenciado por nossos resultados.

Esta ausência de alterações observadas por ELLIOTT et al. (2003) na administração repetida e as alterações vistas na administração aguda explicam pelo menos em parte porque a inibição da NOS previne a indução do *kindling*, enquanto na administração aguda não ocorre proteção por estas drogas.

O presente trabalho traz evidências de uma possível função exagerada dos receptores glutamatérgicos na toxicidade induzida por cocaína. No **capítulo 1**, vimos que o NMDA reduziu a latência das convulsões e aumentou a morte dos animais submetidos à *overdose* de cocaína, já a cetamina, um antagonista dos receptores NMDA aumentou a latência das convulsões, bem como reduziu significamente o número de animais que morreram pela administração de alta dose de cocaína. A ação destas drogas sugere que os receptores glutamatérgicos estão hiperativados durante as convulsões. Outras evidências para este mecanismo são provenientes de estudos recentes (PARK et al., 2002) que mostraram que o peroxinitrito (ONOO[•]), radical livre formado a partir do metabolismo do óxido nítrico, reduz a atividade do transportador de dopamina (DAT). Isto contribuiria ainda mais para a potencialização das convulsões induzidas por cocaína, visto que o mecanismo da mesma como anteriormente relatado envolve a inibição do DAT com aumento dos níveis de DA. Já a vitamina E, um importante antioxidante, foi hábil na proteção das convulsões e morte induzidas por cocaína (**Ver capítulo 5**). Portanto, existe uma importante participação destes sistemas (glutamato/NO) nas convulsões e morte induzidas por cocaína.

A redução da ligação do [³H]-GABA ao receptor GABA observada após EME e morte induzidas por cocaína deve evidenciar uma redução da afinidade do receptor pelo ligante e este evento já foi referido em outros modelos de convulsão (COSTA-LOTUFO, 2001). Portanto, no mecanismo da convulsão o receptor torna-se pouco ativo, o que explica os eventos vistos no **capítulo 1**, onde as drogas que interferem com a neurotransmissão GABAérgica foram as mais ativas na inibição das convulsões e morte induzidas por cocaína. Estas drogas apresentaram como mecanismo de ação a potencialização da neurotransmissão GABAérgica nos locais afetados, ou seja, naqueles locais onde a neurotransmissão GABAérgica está comprometida pela redução da afinidade do receptor. Das drogas que interferem na neurotransmissão GABAérgica estudadas, a mais ativa foi o fenobarbital, droga que além de potencializar a neurotransmissão GABAérgica também está relacionado à inibição da neurotransmissão excitatória. O pré-tratamento com fenobarbital fez com que dos 8 animais testados apenas 1 convulsionasse após administração de cocaína 90 mg/kg.

Existe uma evidente interação entre receptores benzodiazepínicos, GABA e NMDA com a neurotransmissão serotoninérgica. Dados anteriores mostram que a liberação *in vivo* da 5HT no hipocampo ventral pode ser inibida pela administração sistêmica ou local de agonistas benzodiazepínicos (ZETTERSTROM & FILLENZ, 1989). Registros intracelulares de neurônios serotoninérgicos no núcleo da rafe dorsal podem ser modulados por antagonistas do receptor GABA_A de receptores para aminoácidos excitatórios (PAN et al., 1989). Também é possível que interneurônios GABAérgicos presentes no córtex piriforme possam influenciar a atividade neuronal na amígdala associada com as convulsões induzidas por cocaína. Como os receptores 5HT₂ corticais são esparsamente distribuídos, existe alta densidade de receptores 5HT₂ localizada na banda compacta da camada II de células piramidais do córtex piriforme e terminando na junção mediana com o núcleo amigdalóide cortical (MORILAK et al., 1993). Também existem densidades moderadas de células imunopositivas levando impulsos desta área para a amígdala. Estudos farmacológicos mostraram que a bicuculina, um antagonista do receptor GABA_A pode bloquear a estimulação serotoninérgica destes neurônios GABAérgicos (GELLMAN & AGHAJANIAN, 1994; MAREK & AGHAJANIAN, 1994). Estes achados sugerem que a inibição da captação de 5HT pela cocaína pode afetar a influência cumulativa de receptores 5HT₂ na função dos interneurônios GABAérgicos no córtex piriforme e isto pode estar associado com o início da atividade convulsivante na amígdala. Além disso, a co-localização dos receptores 5-HT₂ nos interneurônios GABAérgicos no córtex piriforme sugere um importante mecanismo para a efetividade de compostos GABAérgicos e benzodiazepínicos na inibição das convulsões seguindo a administração aguda de cocaína.

Realmente nossos resultados mostram uma potencialização da neurotransmissão serotoninérgica após as convulsões e morte induzidas por cocaína. Neste trabalho ocorreu aumento nos níveis de 5HT em CPF com redução da taxa de metabolização para esta monoamina após EME no CPF e após morte nas duas áreas cerebrais. Também houve aumento nos receptores 5HT₂, e redução nos receptores GABAérgicos e glutamatérgicos. Embora pareça, como já discutido anteriormente, que a diminuição nestes dois últimos receptores seja proveniente de uma redução da afinidade dos receptores GABA, visto que existem evidências de sua hipofunção acompanhando as convulsões (necessitamos de estudos de *Scatchard* para confirmar esta hipótese), a redução dos receptores glutamatérgicos pode ao

contrário do que ocorreu com o GABA ser decorrente de uma estimulação mediada pelo glutamato deste receptor.

CAPÍTULO 5

***DETERMINAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NAS
CONVULSÕES E MORTE INDUZIDAS POR OVERDOSE DE COCAÍNA EM
CORPO ESTRIADO E CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE CAMUNDONGOS***

INTRODUÇÃO

O cérebro obtém quase toda a sua energia da fosforilação oxidativa mitocondrial, que gera ATP ao mesmo tempo em que reduz o oxigênio molecular em água. Sob certas condições as espécies reativas do oxigênio (ERO), por exemplo oxigênio e radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio podem ser gerados como subprodutos secundários deste processo.

Visto que participam de reações essenciais ao organismo as ERO são constantemente formadas e podem ser prejudiciais, quando sua produção foge do controle exercido pelos antioxidantes de defesa endógenos, como as enzimas superóxido dismutase, as catalases, glutathione peroxidase e outros antioxidantes como albumina (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990), e vitamina E (MULLER & GROSS-SAMPSON, 1990).

Todos os componentes da célula são suscetíveis à ação das ERO, porém a membrana é uma das mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na sua estrutura e permeabilidade (VAN DER KRAAIJ et al., 1988). Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular (HERSHKO, 1989). A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos (SHAN et al., 1990). Assim, como na formação das ERO, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido araquidônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990). Todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo (ROSS & MOLDEUS, 1991).

Em sistemas aeróbicos é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores (como as ERO) e o sistema de defesa antioxidante. Como estes agentes são gerados endogenamente, como conseqüência direta do metabolismo do O₂ e também em situações não-fisiológicas, para proteger-se a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause a lesão. Esta linha é constituída por glutathione reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathione-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de

reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px, entre outros. Com exceção da vitamina E (α -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (HEBBEL, 1986; ROSS & MOLDEUS, 1991).

A glutathiona reduzida (GSH, L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) está presente na maioria das células e o tiol (-SH) é mais abundante no meio intracelular (MEISTER & ANDERSON, 1983). A capacidade redutora da GSH é determinada pelo grupamento -SH, presente na cisteína. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro (GALLEANO & PUNTARULO, 1995), oxigênio hiperbárico, ozônio, radiação e luz ultravioleta (DENEKE & FANBURG, 1989). Além disto, diminui a suscetibilidade à lesão renal decorrente da isquemia e reperfusão (SHAN et al., 1990), atua como transportadora e reservatório da cisteína e participa da detoxicação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação. Ainda é requerida para a síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas (DENEKE & FANBURG, 1989).

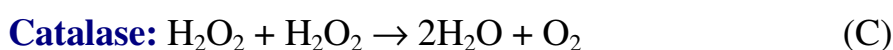
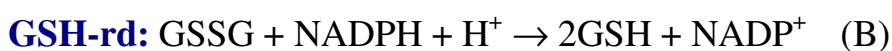
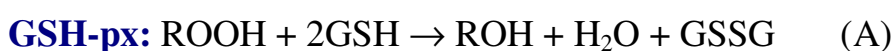
O poder antioxidante da GSH foi demonstrado pelo aumento da sobrevivência de 90 % de ratos submetidos à hiperóxia e tratados com instilação de eritrócitos na traquéia. Este resultado foi atribuído à GSH intra-eritrocitária, que protege contra o choque de pulmão induzido pelo estresse oxidativo resultante da hipóxia (VAN ASBECK et al., 1985).

Após a exposição da GSH ao agente oxidante ocorre sua oxidação a GSSG (HEBBEL, 1986). A recuperação da GSH é feita pela enzima GSH-Rd, uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular (GILBERT & LEAN, 1990). Uma outra enzima a GSH-Px catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peróxidos orgânicos para seus correspondentes álcoois às custas da conversão da GSH a GSSG (SHAN et al., 1990). Embora a GSH-Px tenha ação fundamentalmente citosólica, *in vitro* ela é capaz de reduzir hidroperóxidos de membrana (HEBBEL, 1986) (**Quadro 5-1 –A e B**).

A catalase é uma heme proteína citoplasmática que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 . É encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado (MAYES, 1990). Sua atividade é dependente de NADPH (SCOTT et al., 1991) (**Quadro 5-1- C**).

A suplementação da catalase exógena previne a oxidação da GSH mediada pelo H_2O_2 , em eritrócitos humanos normais (SCOTT et al., 1991). Em modelo de estresse oxidativo decorrente de agressão térmica, os eritrócitos exibem diminuição da atividade da catalase durante o processo hemolítico termodependente (HATHERILL et al., 1991).

Quadro 5-1 Reações catalisadas por diferentes enzimas antioxidantes

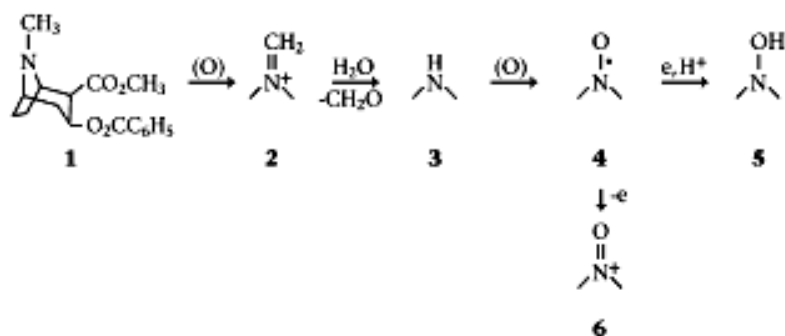


Fonte: MICHIELS et al., 1994.

O metabolismo da cocaína parece estar envolvido com a geração de estresse oxidativo, visto que este produz uma reação redox incomum na forma de nitroxido-hidroxilamina, dentre outras. O ciclo redox que ocorre *in vivo* com oxigênio e agentes transferidores de elétrons (TE) pode ocorrer dando origem ao EO através da geração de ERO, tais como peróxido, hidroperóxidos, alquilperóxidos, hiponitrito e diversos radicais (superóxido, hidroxil, alcóxil e alquilperoxil). Em alguns casos, a transferência de elétrons resulta em uma interferência com o transporte normal de elétrons ou efeitos elétricos, isto é, na respiração ou neuroquímica. Os TE e EO estão sendo cada vez mais relacionados com o mecanismo de ação de drogas e toxinas, tais como, agentes anti-infecciosos (KOVACIC & BECVAR, 2000) carcinógenos (KOVACIC & JACINTHO, 2001), neurotoxinas (JACINTHO & KOVACIC, 2003; BUTTERFIELD, 2003; SAYRE et al., 2001; ADAMS et al., 2001) e vários outros, inclusive doenças humanas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A cocaína é metabolizada principalmente por duas vias distintas em humanos (KOVACIC et al., 1988). A principal transformação consiste da hidrólise de grupamentos éster a qual parece não ser importante para as manifestações tóxicas da droga. A via

minoritária é oxidativa e envolve os grupamentos amina, os quais têm atraído muita atenção com relação às respostas tóxicas. Os possíveis metabólitos que participam dos efeitos da cocaína, além da própria droga, são a norcocaína, o nitróxido de norcocaína, N-hidroxinorcocaína, norcocaína nitrosonium, cocaína iminium e formaldeído (**Figura 5-2**).



Fonte: KOVACIC, 2005

Figura 5-1 Metabolismo da cocaína. 1- Cocaína, 2- cocaína *iminium*, 3- norcocaína, 4- nitróxido, 5- N-hidroxinorcocaína, 6- norcocaína *nitrosonium*.

O metabolismo oxidativo da cocaína leva à formação de norcocaína, evidentemente via derivado *iminium* (KOVACIC et al., 1988). Microsomas no cérebro e fígado oxidam esta substância a nitróxido. Este radical é estabilizado por deslocamento sobre O e N, e aparentemente por interação intramolecular com n-elétrons no éster substituinte.

Um outro metabólito é o derivado N-hidróxi (uma hidroxilamina) que provém da norcocaína. A norcocaína e nitróxido de norcocaína funcionam como um acoplamento redox (KOVACIC et al., 1988; LLOYD et al., 1993).

Existem numerosos exemplos considerando o envolvimento de *iminiums* nas ações de drogas e ações tóxicas com a participação dos TE e EO (KOVACIC et al., 2002). Aminas bioativas terciárias são consideradas as mais envolvidas com esta função (SAYRE et al., 1997). Atualmente especula-se que a exposição a longo prazo com aminas terciárias como a cocaína, pode resultar em lesões bioquímicas via metabólitos reativos, tipo *iminium*, que parecem ser os primeiros envolvidos na neurotoxicidade (RAPAKA et al., 1997).

Existem várias evidências do envolvimento dos metabólitos da cocaína no estresse oxidativo. A literatura mostra que a redução microsomal da norcocaína no cérebro gera radicais superóxido (KLOSS et al., 1984). A incubação de microsomas hepáticos com derivados nítróxi ou N-hidróxi levam a peroxidação lipídica, sendo esta mais pronunciada com os metabólitos que com a cocaína propriamente dita (KLOSS et al., 1983). O ciclo redox envolvendo os metabólitos parece ocorrer acompanhando a formação de superóxido e radicais de peroxidação lipídica (LLOYD et al., 1993).

Os trabalhos existentes na literatura até o presente momento em relação ao envolvimento do EO nas ações da cocaína só referem alterações nas enzimas antioxidantes após administração de cocaína em algumas situações como:

- **Fígado:** algumas ações da cocaína no fígado podem estar associadas à hepatotoxicidade da droga. Em animais expostos à droga sozinha foi evidenciado aumento de catalase (DEVI & CHAN, 1997) e inalteração nos níveis de GSH (MASINI et al., 1997). Quando em associação com o álcool (HOROWITZ et al., 1999), ocorreu uma supressão na atividade da catalase. Vários trabalhos revelaram a geração de ERO, incluindo peroxidação lipídica, na hepatotoxicidade relacionada à droga (TEAF et al., 1984; GOLDLIN & BOELSTERLI, 1994; DIEZ-FERNANDEZ et al., 1999; OZTEZCAN et al., 2000). Endotoxinas potenciam a toxicidade mediada pela cocaína via NO e ERO (LABIB et al., 2003). A norcocaína aumenta o ataque de peroxidases e aumenta a formação de MDA (TEAF et al., 1984).
- **SNC:** aumentos do estresse oxidativo induzido por cocaína pode levar à neurodegeneração (FANTEL & PERSON, 2002; SHARAN Et al., 2003). Estudos com doses baixas múltiplas de cocaína produziram ERO, tais como radicais hidroxil, sendo que alguns antioxidantes como salicilato podem oferecer proteção (CASTELLI et al., 2001). No cérebro de ratos a produção de MDA foi estimulada pela cocaína indicando a ocorrência de peroxidação lipídica. Na administração pré-natal da droga ocorreu uma redução dos níveis de glutathiona no cérebro fetal de ratos (LIPTON et al., 2003).
- **Outros sistemas:** no sistema cardiovascular foi evidenciada geração de ERO em células cardíacas (HARGRAVE et al., 2003). As patologias cardíacas relacionadas ao abuso da

cocaína estão associadas à lesão oxidativa e depleção da GSH (LEE et al., 2001). O uso de cocaína está associado à ocorrência de várias doenças renais, tanto nos adultos (inflamação glomerular), como no feto (anormalidades no trato urogenital) (NZERUE et al., 2000). Revisão recente relaciona esta toxicidade à geração de ERO e peroxidação lipídica via ciclo redox (KOVACIC et al., 2002). Os derivados da norcocaína como o nítróximo e derivados N-hidróxi parecem ter um papel chave neste processo.

OBJETIVOS

O objetivo principal deste capítulo foi investigar o possível envolvimento do estresse oxidativo nas convulsões e morte induzidas por *overdose* de cocaína. Para isto foram determinados:

- Atividade da catalase em diferentes grupos de animais submetidos ao tratamento com cocaína em baixas (10 e 30 mg/kg, i.p.) e altas doses (90 mg/kg, i.p.), pré-tratados com diazepam antes da administração da *overdose* de cocaína e submetidos à *overdose* de bupropiona, uma droga que apresenta mecanismo de ação semelhante ao da cocaína, ou seja, inibindo a recaptação da DA e NA;
- Níveis de GSH e peroxidação lipídica (malonildialdeído- MDA) em camundongos submetidos à *overdose* de cocaína;
- Se o pré-tratamento com vitamina E, um antioxidante, altera alguns dos parâmetros relacionados à convulsão induzida por *overdose* da droga, na tentativa de determinar um possível envolvimento do estresse oxidativo nas convulsões e morte induzidas por esta condição experimental.

RESULTADOS

1. ATIVIDADE DA CATALASE APÓS ADMINISTRAÇÃO DE COCAÍNA EM BAIXAS DOSES E NA *OVERDOSE* EM CORPO ESTRIADO E CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE CAMUNDONGOS

A atividade da catalase no corpo estriado como mostrado na **Figura 5-2A** foi reduzida em cerca de 60 % após a administração da cocaína na dose de 10 mg/kg ($p < 0,001$) e 30 mg/kg ($p < 0,001$) [controle (n=13): $73,9 \pm 6,8$; coc 10 (n=7): $29,8 \pm 2,7$; coc 30 (n=6): $28,4 \pm 2,8$]. Em córtex pré-frontal (**Figura 5-2B**) a atividade da catalase permaneceu inalterada após a administração de cocaína em baixas doses [controle (n=13): $41,6 \pm 4,7$; coc 10 (n=6): $39,4 \pm 4,9$; coc 30 (n=6): $34 \pm 1,9$]. Em ambas áreas cerebrais estudadas a atividade da catalase reduziu após estado de mal epilético e morte induzida por cocaína [**Corpo estriado** - controle (n=13): $73,9 \pm 6,8$; EME (n=10): $46,3 \pm 6$; Morte (n=9): $26,2 \pm 3,4$; **Córtex pré-frontal** - controle (n=13): $41,6 \pm 4,7$; EME (n=6): $16,7 \pm 2,4$; coc 30 (n=6): $24,2 \pm 3,9$].

O pré-tratamento com diazepam inibiu as convulsões induzidas por cocaína em 66,6 % dos animais. Para a determinação da atividade da catalase só foram utilizados animais que não apresentaram atividade convulsiva após o tratamento DZP + COC 90. O pré-tratamento com diazepam foi hábil em reverter a redução na atividade da catalase no corpo estriado [controle (n=13): $73,9 \pm 6,8$; DZP 10 + COC 90 (n=6): $51,3 \pm 4,1$] (**Figura 5-2A**) e córtex pré-frontal (**Figura 5-2B**) observado após a administração de cocaína em alta dose trazendo o resultado para os níveis dos animais controle [controle (n=13): $41,6 \pm 4,7$; DZP 10 + COC (n=6): $39,3 \pm 6,8$]. O diazepam quando administrado sozinho não alterou a atividade da catalase em nenhuma das áreas cerebrais estudadas [**Corpo estriado** - controle (n=13): $73,9 \pm 6,8$; DZP 10 (n=6): $50,9 \pm 7,8$; **Córtex pré-frontal** - controle (n=13): $41,6 \pm 4,7$; DZP 10 (n=6): $44,6 \pm 2,8$].

A bupropiona 150 mg/kg, i.p. causou convulsões clônicas e estado de mal epilético em 100 % dos animais que durou até o momento do sacrifício. A latência média para o início das convulsões foi de $4:14 \pm 0.31$ min. A atividade da catalase foi reduzida após

as convulsões induzidas por bupropiona (em 62 %) no corpo estriado [controle (n=13): $73,9 \pm 6,8$; BUP 150 (n=6): $27,8 \pm 5,2$] ($p= 0,0005$), como observado na **Figura 5-2A** e córtex pré-frontal em 51 % ($p= 0,01$) como mostrado na **Figura 5-2B** [controle (n=13): $41,6 \pm 4,7$; BUP 150 (n=6): $20,4 \pm 3,1$].

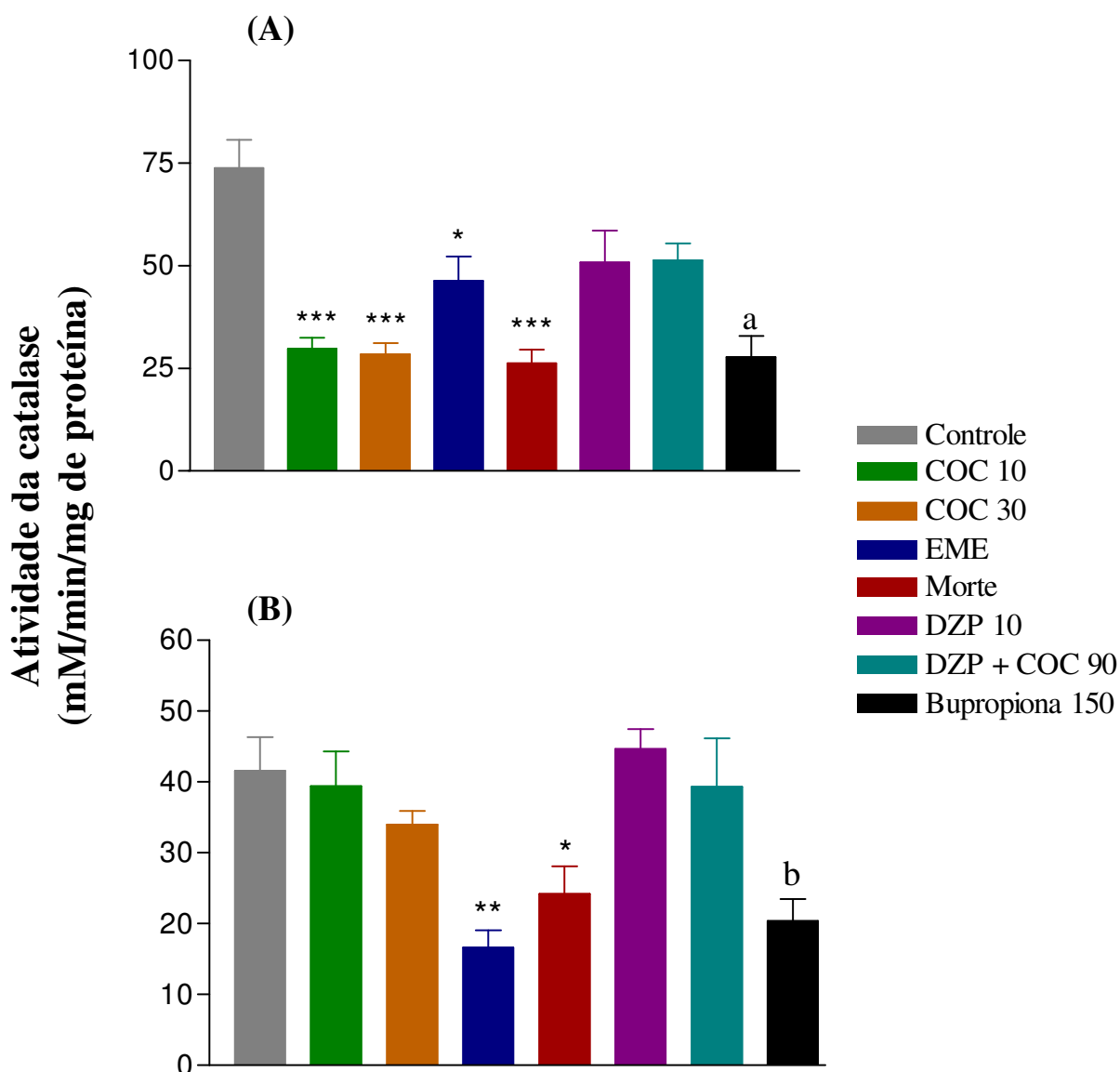


Figura 5-2 Atividade da catalase em corpo estriado (A) e córtex pré frontal (B) de camundongos. Diferentes grupos de camundongos foram tratados com: salina (controles), cocaína em baixas doses (COC 10 e 30 mg/kg, i.p.) e altas doses (COC 90 mg/kg, i.p. – separados em EME e morte, como descrito nos métodos), pré-tratados com a droga anticonvulsivante, diazepam 10 mg/kg, i.p (DZP 10) sozinho e 30 min antes da administração de COC 90, e submetidos à *overdose* de bupropiona (150 mg/kg). Uma hora após o pré-tratamento os animais tiveram o corpo estriado e córtex pré-frontal dissecados para determinação da atividade da catalase. A atividade da catalase foi determinada por espectrofotometria. As barras representam média \pm EPM de 6-10 animais por grupo.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ quando comparados aos animais controle (ANOVA e teste de Student Newman Keuls)

^a $p = 0,0005$, ^b $p = 0,01$ quando comparados aos animais controle (“teste - T”)

2. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) EM CORPO ESTRIADO E CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE CAMUNDONGOS APÓS *OVERDOSE* DE COCAÍNA

Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) tanto no corpo estriado (**Figura 5-3A**) como no córtex pré-frontal (**Figura 5-3B**) só apresentaram alteração significativa (aumento) após a morte induzida por cocaína (47 e 27 % de aumento, respectivamente no CE e CPF). Este resultado foi significativo quando comparado aos animais controle e EME em ambas áreas cerebrais (**CE** – controle (n= 6): $744,3 \pm 40,3$; EME (n= 6): $819,2 \pm 29,3$; morte (n= 6): $1101 \pm 75,8$ ng/g de tecido – **CPF** – controle (n= 6): $765,7 \pm 19,3$; EME (n= 6): $833,3 \pm 59$; morte (n= 6): $975,4 \pm 19,5$ ng/g de tecido).

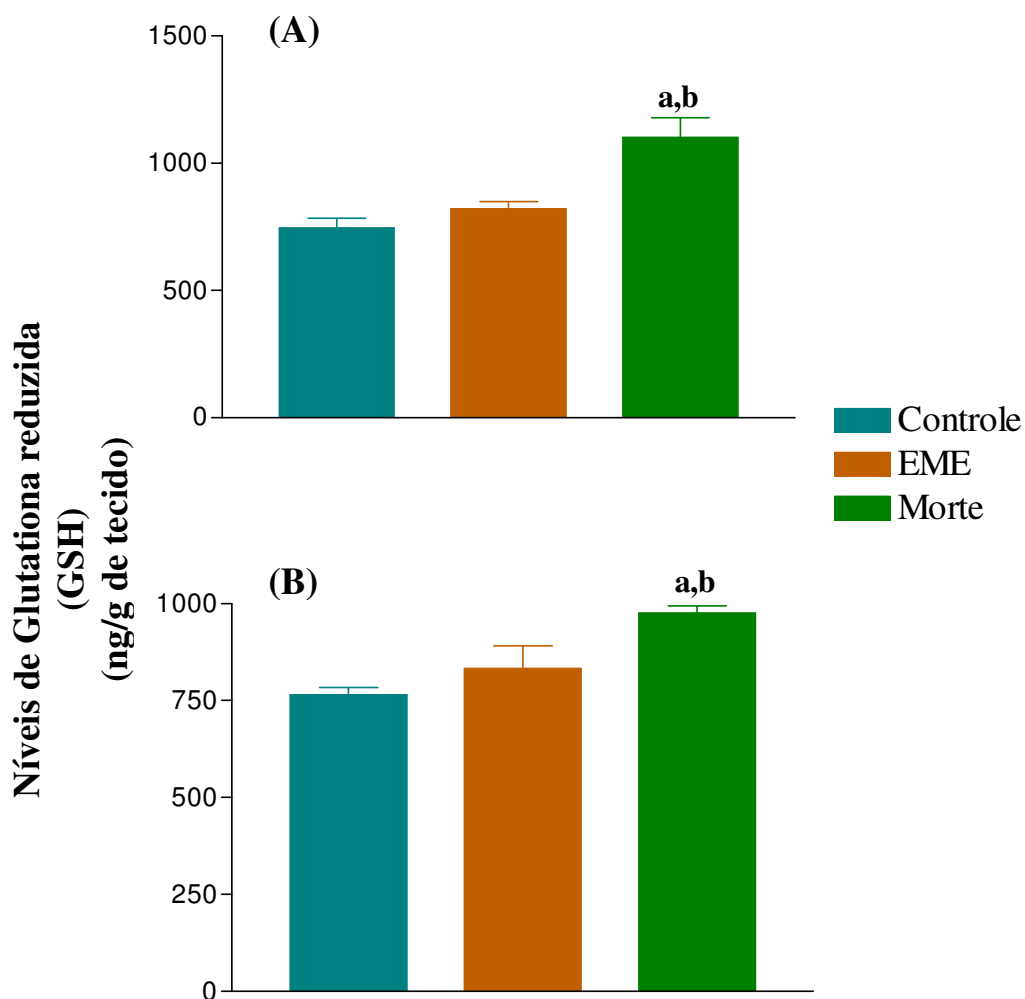


Figura 5-3 Níveis de glutaciona reduzida (GSH) em corpo estriado (A) e córtex pré-frontal (B) de camundongos após *overdose* de cocaína. Os camundongos foram tratados com salina ou cocaína 90 mg/kg, i.p. Os animais que morreram após a administração da droga foram imediatamente dissecados, enquanto os que apresentaram estado de mal epilético (EME) e os controles foram sacrificados e dissecados 60 minutos após a administração da droga ou água destilada, respectivamente para a retirada do corpo estriado e córtex pré-frontal. Os níveis de glutaciona reduzida (GSH) foram determinados por espectrofotometria. As barras representam média \pm EPM de 6 animais por grupo ^a $p < 0,001$ quando comparado ao controle; ^b $p < 0,05$ quando comparado aos animais EME. ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

3. DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA *OVERDOSE* DE COCAÍNA SOBRE A FORMAÇÃO DE MALONILDIALDEÍDO (MDA) EM HOMOGENATOS DE CORPO ESTRIADO E CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE CAMUNDONGOS

Os níveis de MDA, como mostra a **Figura 5-4A** só apresentaram aumento significativo no corpo estriado após a morte induzida por cocaína. No córtex pré-frontal (**Figura 5-4B**) nenhuma alteração foi detectada (CE- controle (n= 6): $1,5 \pm 0,14$; EME (n= 6): $1,6 \pm 0,3$; morte (n= 6): $2,2 \pm 0,2$ μmol de MDA/ mg de proteína; CPF- controle (n= 6): $5,4 \pm 0,5$; EME (n= 6): $4,4 \pm 0,4$; morte (n= 6): $6,3 \pm 0,7$ μmol de MDA/mg de proteína).

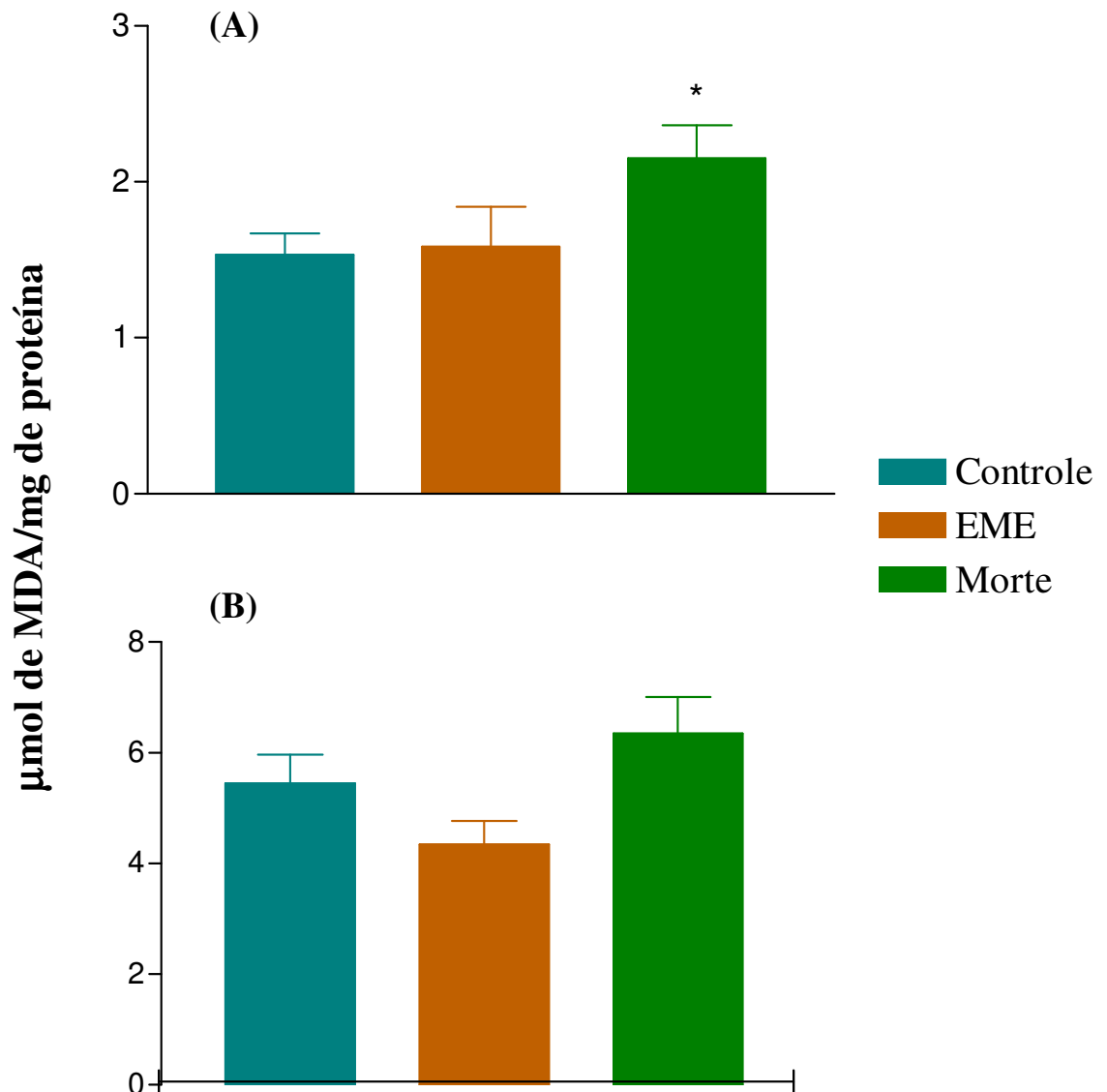


Figura 5-4 Efeito da *overdose* de cocaína sobre a formação de malonildialdeído (MDA) em corpo estriado (A) e córtex pré-frontal (B) de camundongos. Os camundongos foram tratados com salina ou cocaína 90 mg/kg, i.p. Os animais que morreram após a administração da droga foram imediatamente dissecados, enquanto os que apresentaram estado de mal epilético (EME) e os controles foram sacrificados e dissecados 60 minutos após a administração da droga ou água destilada, respectivamente para a retirada do corpo estriado e córtex pré-frontal. Os níveis de malonildialdeído (MDA) foram determinados por espectrofotometria. As barras representam média \pm EPM de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ ANOVA com Teste de Student Newman Keuls *post hoc*.

4. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM VITAMINA E SOBRE AS CONVULSÕES E MORTE INDUZIDAS POR COCAÍNA

O pré-tratamento com vitamina E, como mostrado na **Figura 5-7**, reduziu o número de animais que convulsionaram em 40 %, aumentando a sobrevivência dos mesmos em 26,7 %, mas não interferiu com a latência da convulsão [cocaína 90 (n= 50): $232,3 \pm 13,4$; Vitamina E 400 mg/kg (n= 15): $190,9 \pm 18,6$ seg].

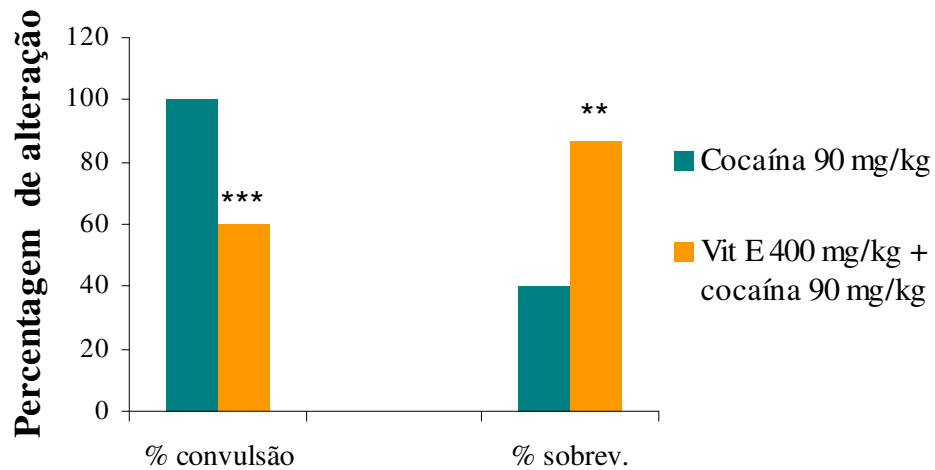


Figura 5-5 Efeito do pré-tratamento com vitamina E sobre as convulsões e morte induzidas por cocaína. Os camundongos foram tratados agudamente com cocaína 90 mg/kg, i.p. (n= 50) ou vitamina E 400 mg/kg, i.p. (n= 15) 45 minutos antes da administração de cocaína e foram observados por 60 min para a determinação da percentagem de animais que convulsionaram e morreram após a *overdose* de cocaína. As barras representam a percentagem de animais que convulsionaram e que sobreviveram após o tratamento com as drogas. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$ (teste do qui-quadrado) quando comparados com os animais tratados apenas com cocaína 90 mg/kg.

DISCUSSÃO

Os resultados deste capítulo mostram de forma inédita uma importante participação do estresse oxidativo (EO) nas convulsões e principalmente na morte induzida por cocaína. O presente estudo demonstra que a atividade da catalase reduziu após o tratamento com cocaína em baixas doses (apenas no corpo estriado) e após EME e morte induzidos pela *overdose* de cocaína em ambas áreas, corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos. Esta redução da atividade da catalase reflete um possível acúmulo de peróxido de hidrogênio, pois a catalase previne o organismo do acúmulo de peróxido, desde que a mesma converte peróxido a H₂O.

O EO é uma condição na qual as defesas celulares antioxidantes são inadequadas para detoxificar completamente os radicais livres gerados, devido à produção excessiva de ERO, perda das defesas antioxidantes ou ambas (DAVIES, 1995)

Esta condição pode ocorrer localmente, quando as defesas antioxidantes apresentam-se reduzidas em certas localizações subcelulares, enquanto permanecem intactas no todo, e seletivamente com relação à espécie de radical, visto que as defesas antioxidante são radical-específicas, por exemplo, superóxido dismutase (SOD) para o superóxido e catalase e glutatona para H₂O₂ (DUGAN & CHOI, 1999).

Uma conseqüência do EO é a destruição de macromoléculas celulares. Esta destruição pode ocorrer pela adição de grupamentos peroxil ou hidroxil em ácidos graxos insaturados. Alternativamente a cadeia de ácido graxo do carbono pode ser clivada durante a reação com o elétron livre para gerar um aldeído graxo, ambos processos sendo denominados peroxidação lipídica. Estes ácidos graxos aldeídicos podem reagir com cisteínas em proteínas produzindo tioésteres que podem afetar as funções e estabilidade das proteínas celulares (HALLIWELL, 1992).

É bem conhecido que o mecanismo de ação da cocaína envolve a inibição da recaptação da dopamina, resultando em aumento dos níveis extraneuronais desta monoamina. Fisiologicamente, H₂O₂ pode ser gerado à partir do metabolismo da dopamina, o qual produz subsequente o danoso radical hidroxil (HALLIWELL, 1992; EBADI et al., 1996).

Trabalho recente de nosso laboratório (MACÊDO et al., 2004b e Capítulo 2, Figura 2-5 deste trabalho) mostrou um aumento no HVA, um metabólito extracelular da dopamina, após EME e morte induzidos pela cocaína em CE, bem como um aumento nos níveis de DOPAC, um metabólito intracelular da dopamina, após morte e no CE e EME em CPF de camundongos. Em conjunto estes resultados sugerem um aumento no metabolismo da DA após a administração da cocaína em altas doses (**Ver capítulo 2**). Este aumento no metabolismo da DA pode ter acarretado uma elevação no conteúdo de H_2O_2 em ambas áreas cerebrais após a *overdose* induzida por cocaína e especificamente no CE após baixas doses da droga. Estes resultados estão provavelmente correlacionados com o aumento das ERO nestas áreas cerebrais.

Como a literatura não possuía informações a respeito do envolvimento da catalase nos efeitos da cocaína, resolvemos estudar de modo mais aprofundado a relação da cocaína com esta enzima, inclusive utilizando para isto a droga em baixas doses, bem como uma substância com o mecanismo de ação semelhante ao da cocaína, a bupropiona.

A bupropiona, um antidepressivo monocíclico conhecido por inibir a captação neuronal de DA e NA (ASCHER et al., 1995) causou uma redução na atividade desta enzima após o seu uso em altas doses, indicando provavelmente a existência de uma importante interação entre dopamina, atividade da catalase, H_2O_2 e convulsões.

Trabalhos prévios (HUANG et al., 2003) indicam que H_2O_2 inibe a atividade do transportador da dopamina de uma maneira reversível e que a super expressão da catalase alivia a inibição da captação da dopamina produzida pelo H_2O_2 . Também foi observado que a supressão da produção de radicais hidroxil à partir do H_2O_2 , pelo bloqueio da reação de Fenton usando um quelador de íons (mesilato de deferoxamina) reduziu efetivamente o efeito inibidor do H_2O_2 . Baseado nos dados destes autores (HUANG et al., 2003) podemos especular que a redução na atividade da catalase vista neste trabalho potencializou a inibição do transportador de dopamina mediada pela cocaína através do aumento do conteúdo de H_2O_2 nas áreas cerebrais estudadas.

O pré-tratamento com o anticonvulsivante diazepam antes da administração de cocaína 90 mg/kg reverteu a redução na atividade da catalase evidenciado após o EME e

morte induzidos por cocaína, enquanto o diazepam sozinho não alterou a atividade da referida enzima. A literatura mostra que ativação dos receptores GABA_A reduz os níveis basais, bem como a liberação de dopamina induzida pela cocaína em CE e núcleo accumbens (DEWEY et al., 1998) e córtex pré-frontal (STEKETEE, 2002). A neurotransmissão serotoninérgica que parece influenciar as convulsões induzidas por cocaína (RITZ & GEORGE, 1997a) também é inibida pela administração sistêmica e local de agonistas benzodiazepínicos (ZETTERSTRON & FILLENZ, 1989).

A administração de cocaína em baixas doses 10 e 30 mg/kg alterou a atividade da catalase apenas no CE, área cerebral que é a mais associada ao mecanismo de ação de drogas psicoestimulantes (STEKETEE, 2002). Sabe-se que convulsões generalizadas, como as induzidas por cocaína em altas doses, ativam o cérebro como um todo. Assim, as convulsões induzidas por cocaína por serem generalizadas, reduziram a atividade da catalase em ambas áreas cerebrais estudadas, CE e CPF. Vale ressaltar que estas áreas cerebrais também estão relacionadas à atividade convulsivante (DERANSART et al., 2000; LASON, 2001; SACKEIM, 2004).

Dados recentes (FREITAS et al., 2004) mostraram que a catalase está envolvida com a patogênese da epilepsia do lobo temporal induzida pela pilocarpina. No entanto, neste modelo de convulsão os autores observaram um aumento na atividade da catalase no cerebelo, hipocampo, CPF e CE. Comparando os resultados de FREITAS et al (2004) com os nossos, podemos observar que nem todas as drogas convulsivantes interferem com a atividade da catalase da mesma maneira.

O peróxido de hidrogênio também está envolvido com neurotoxicidade, desde que a super expressão dos genes para enzimas antioxidantes como catalase e glutathione peroxidase em culturas hipocámpais e corticais primárias de fetos de ratos, reduziu a neurotoxicidade induzida por ácido cáínico, glutamato, cianeto de sódio e deprivação cerebral de oxigênio/glicose, a qual foi acompanhada por reduções do acúmulo de peróxido de hidrogênio e da extensão da peroxidação lipídica (WANG et al., 2003).

Nossos resultados em relação à catalase demonstram uma importante participação desta enzima nas ações da cocaína no SNC, bem como nas convulsões e morte induzidas pela

droga. A redução da atividade da catalase pode estar associada a um aumento no conteúdo de H_2O_2 e possível geração de radicais hidroxil. Estes dados indicam uma possível participação do EO nas ações da cocaína no cérebro de camundongos.

A segunda enzima estudada, GSH apresentou aumento apenas após a morte induzida por cocaína em ambas áreas cerebrais estudadas, o que indica uma possível ação antioxidante desta enzima na tentativa de reverter ou evitar alguma lesão provocada pela *overdose* da droga nestas áreas cerebrais. No corpo estriado de animais que morreram após a convulsão induzida por cocaína houve um aumento nos níveis de MDA, o que mostra a ocorrência de peroxidação lipídica nesta área cerebral, ou seja, neurotoxicidade.

Trabalho recente (DIETRICH et al., 2005) mostra que os níveis de peróxido de hidrogênio e de peróxidos lipídicos estão aumentados após a administração aguda e crônica (10 dias) de cocaína 20 mg/kg, i.p. A glutatona é uma enzima especializada na remoção de peróxidos como é também a catalase, mas estas têm localizações distintas no SNC. A catalase é mais abundante nos astrócitos do que em neurônios e na substância branca, do que na cinzenta, mas pode ser induzida em neurônios pela ação das neurotrofinas. Os componentes do sistema da glutatona peroxidase, GPx, GSH, glutatona redutase e NAD(P)H estão presentes na mitocôndria, bem como no citoplasma dos neurônios. O aumento da glutatona reduzida pode ter ocorrido por um mecanismo gerenciado pelos neurônios para se livrar dos radicais gerados por pelo menos dois mecanismos após a *overdose* da cocaína: aumento do metabolismo da DA e inibição da atividade da catalase.

Evidências recentes (Kovacic, 2005) sugerem que a cocaína e seus metabólitos estão envolvidos na produção de ERO e estresse oxidativo, portanto, a toxicidade relacionada à cocaína pode ocorrer devido à produção de metabólitos oxidativos.

As ERO e a oxidação que é resultante de sua ação têm sido implicadas em doenças relacionadas à morte neuronal e neurodegeneração (HALLIWELL, 1992). Por exemplo, um aumento nos níveis de radicais livres é um dos principais fatores que contribuem para a perda de neurônios dopaminérgicos na doença de Parkinson. Estes radicais estão implicados também no desenvolvimento de convulsões sob certas condições patológicas e também ligadas à neurodegeneração associada à convulsão. Evidências considerando o papel

de radicais livres nas convulsões são as de que condições patológicas associadas com a formação aguda de radicais livres como trauma cerebral, hiperoxigenação e hipóxia (Jensen et al., 1991) apresentam uma alta incidência de convulsões (HALL, 1993; PEREZ VELAZQUEZ et al., 1997), bem como a existência de vários modelos experimentais de epilepsia com base na geração de radicais livres (WARD, 1972; WILLMORE & RUBIN, 1981; KATZ et al., 1987).

As convulsões aumentam o conteúdo de ERO e formação de superóxido no cérebro (ARMSTEAD et al., 1989; ESSMAN & WOLLMAN, 1989). A geração de radicais livres pode induzir a atividade convulsivante pela inativação direta da glutamina sintetase, permitindo desta forma o aumento do neurotransmissor excitatório glutamato. (para detalhes ver **Figura I-6, Introdução**) (OLIVER et al., 1990). O início das convulsões induzidas pelo oxigênio em animais está correlacionado a uma redução dos níveis cerebrais de GABA, como resultado da inibição da enzima glutamato descarboxilase pelas ERO (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1991). Desta forma parece que os radicais livres são responsáveis pelo desenvolvimento de convulsões. Além disso, os radicais livres também contribuem para a apoptose em vários níveis da cascata apoptótica, servindo como iniciadores, sinais recentes e possivelmente efetores tardios da morte neuronal apoptótica (DUGAN & CHOI, 1999).

Evidências sugerem que o transportador da dopamina (DAT), principal alvo da ação da cocaína seja regulado pelos ERO, possivelmente quinonas da dopamina (BERMAN et al., 1996). Em fatias estriatais, a peroxidação lipídica suprimiu a atividade do DAT (PAGE et al., 1998). Mais recentemente, PARK et al. (2002) relataram que o peroxinitrito (ONOO^-) reduz a atividade do DAT. Recentemente foi demonstrado (HUANG et al., 2003) que o H_2O_2 reduz a atividade do DAT através de oxidação mediada pelo radical hidroxil nos seus sítios intra e extracelulares. Esta inibição da atividade do DAT produzida pelo H_2O_2 foi revertida pela superexpressão da catalase, como comentado anteriormente. Estas evidências sugerem uma potenciação dos efeitos da cocaína pela geração de radicais livres, contribuindo desta forma para a exacerbação dos efeitos da droga e surgimento de efeitos tóxicos.

Como o cérebro contém relativamente baixos níveis de catalase e glutatona do que tecidos periféricos como o fígado (OLANOW, 1993) os ERO são mais perigosos para o cérebro do que para os tecidos periféricos. Neurônios da substância negra *pars compacta*,

onde existe uma quantidade grande de neurônios dopaminérgicos são particularmente vulneráveis ao estresse oxidativo porque o H_2O_2 pode ser gerado a partir do metabolismo da DA através da monoamina oxidase ou auto-oxidação. Além do mais, áreas cerebrais que contêm altos níveis de ferro, tais como o globo pálido e substância negra, produzem grande quantidade de radicais hidroxil citotóxicos através da reação entre H_2O_2 e ferro (OLANOW, 1993). O tratamento com anfetamina também aumenta os níveis de radicais hidroxil no corpo estriado de ratos (HUANG et al., 1997). Coletivamente, existe uma ampla evidência que sugere que o H_2O_2 e radicais hidroxil são importantes fatores na regulação fisiológica e patológica de várias atividades no cérebro.

Os resultados deste capítulo dão indícios de que ocorreu aumento de H_2O_2 após as convulsões e morte induzidas por cocaína, fato evidenciado pela diminuição da atividade da catalase observada em nossos resultados. Este aumento (H_2O_2) pode ter ocorrido através do aumento no metabolismo da dopamina, como evidenciado no **capítulo 2** deste trabalho. O H_2O_2 como mencionado anteriormente inibe a atividade do DAT (juntamente com a cocaína), o que contribui para um acúmulo de dopamina, acelerando a morte celular sob certas condições patológicas, como no caso das convulsões induzidas por cocaína, contribuindo para a morte induzida por cocaína observamos além deste mecanismo a geração de peróxido lipídico (MDA).

Dados anteriores (VOLTERRA et al., 1994) evidenciaram uma supressão da atividade do transportador de glutamato em cultura cortical de astrócitos de ratos pelo H_2O_2 , bem como pelo peroxinitrito, também contribuindo para o acúmulo de glutamato e conseqüentemente surgimento de convulsões.

Para se verificar o real envolvimento do estresse oxidativo nas convulsões e morte induzidas por cocaína resolvemos verificar se a vitamina E, um antioxidante que participa do sistema de defesa celular contra lesões induzidas por radicais livres tinha a propriedade de inibir as convulsões e morte induzidas por cocaína. Realmente, ocorreu uma proteção dos animais com o pré-tratamento agudo com vitamina E, ocorrendo uma redução do número de animais que convulsionaram e aumento da sobrevivência dos mesmos. A vitamina E, também denominada α -tocoferol é considerada a principal substância antioxidante no organismo humano pois interfere com o radical livre ROO^\bullet e também com o oxigênio nas membranas

celulares, atrapalhando a peroxidação lipídica (NAMIKI, 1990). O α -tocoferol é regenerado depois disso pela oxidação do ascorbato e glutathione (NAMIKI, 1990). A ação neuroprotetora do α -tocoferol contra o dano excitotóxico já foi descrita *in vivo* e *in vitro*.

Em conclusão, as alterações observadas neste capítulo mostram um acúmulo de H_2O_2 (pela redução da atividade da catalase) tanto após EME, como após a morte induzida por cocaína, e alterações em outros parâmetros estudados como glutathione e peroxidação lipídica apenas após a morte. Isto nos leva a acreditar que as convulsões e morte induzidas pela droga têm uma grande participação do estresse oxidativo nas áreas cerebrais estudadas, que estão intimamente relacionadas ao mecanismo de ação da cocaína.

V- CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que os efeitos tóxicos da cocaína, representados neste estudo pelas convulsões e morte, são eventos multimediados. De fato, como abordado no **capítulo 1**, drogas que interferem em diversos sistemas neurotransmissores podem alterar os parâmetros relacionados às convulsões e morte induzidas por cocaína. É consenso na literatura que os diferentes sistemas neurotransmissores apresentam uma importante interação entre si, a qual está relacionada ao bom funcionamento das áreas cerebrais por eles reguladas. Desta forma o descompasso entre estes neurotransmissores pode provocar problemas no SNC, como ocorre no caso das convulsões, que ocorrem tanto pelo excesso de excitabilidade como pela redução na inibição mediada por neurotransmissores inibitórios, principalmente o GABA. Sabendo que existem interações entre diferentes neurotransmissores, como discutido ao longo deste trabalho, podemos entender porque as convulsões e morte induzidas por cocaína são multimediadas.

No **capítulo 1** e **quadro 1** mostramos que entre as drogas utilizadas as mais eficazes foram as que interferiram na neurotransmissão GABAérgica. Dentre estas drogas podemos ressaltar o diazepam e o fenobarbital, este último inibindo quase completamente as convulsões e morte induzidas por cocaína. Ambas as drogas potencializam a neurotransmissão GABAérgica, sendo que o fenobarbital também tem efeitos inibitórios sobre a neurotransmissão excitatória.

No **capítulo 4** foi observada uma redução na ligação do ligante radioativo [^3H]-GABA aos receptores GABAérgicos, sugerindo que esta diminuição provavelmente tenha ocorrido pela redução da afinidade destes receptores pelo ligante radioativo, fato este já visto em outros modelos de convulsão como o da pilocarpina (COSTA-LOTUFO et al., 2002), o que intensificaria as convulsões. Esta alteração nos receptores GABAérgicos ocorreu em ambas áreas cerebrais após EME e apenas no CPF após a morte. A literatura mostra que existe uma evidente interação dos receptores benzodiazepínicos, GABA e NMDA com a neurotransmissão serotoninérgica esta última estando bastante associada às convulsões induzidas por cocaína (RITZ & GEORGE, 1997a,b; O'DELL et al., 2000). A liberação *in vivo* da 5HT no hipocampo ventral pode ser inibida pela administração sistêmica ou local de agonistas benzodiazepínicos (ZETTERSTROM & FILLENZ, 1989). No presente trabalho foi visto que a fluoxetina, um inibidor da recaptção de serotonina provocou uma exacerbação das convulsões e morte induzidas por cocaína nas duas maiores doses estudadas, embora

contrariamente ao observado por RITZ & GEORGE, 1997a, não vimos uma melhora nas convulsões e morte com o pré-tratamento com mianserina, uma droga antagonista do receptor 5-HT₂.

Foi detectado aumento na ligação do ligante radioativo aos receptores serotoninérgicos 5HT₂ no **capítulo 3** tanto após EME como na morte, nas duas áreas cerebrais estudadas. Os níveis de 5HT no CPF após EME também aumentaram com redução da taxa metabólica da 5HT (5HIAA/5HT) após a morte tanto no CE como no CPF e após EME apenas no CPF. Estes resultados sugerem um possível aumento desta monoamina também após a morte, visto que seu metabolismo encontrava-se reduzido. No presente trabalho foi evidenciada uma importante participação da 5HT via receptores 5HT₂ nas convulsões e morte induzidas por cocaína, resultados observados também em trabalhos anteriores demonstrados por RITZ & GEORGE (1997 a,b), assim como O'DELL et al. (2000). Analisando os dados referentes à neurotransmissão GABAérgica e serotoninérgica obtidos neste trabalhos podemos concluir que a neurotransmissão serotoninérgica encontra-se exacerbada, enquanto a GABAérgica reduziu o que favorece a um aumento da excitação, culminando com o surgimento de convulsões.

O aumento da DA e 5HT no CPF é importante e merece ser discutido com base nas interações entre estas monoaminas e outros neurotransmissores. Estudos eletrofisiológicos levando em consideração o sistema de aminoácidos excitatórios sugeriram que a 5HT facilita a transmissão glutamatérgica via ação focal em dendritos apicais de neurônios piramidais (AGHAJANIAN & MAREK, 1997). Esta facilitação da transmissão glutamatérgica é o resultado de uma frequência aumentada de correntes pós-sinápticas excitatórias e pode ser prevenida pela aplicação de antagonistas 5HT_{2A} como o M100907 ou SR46549B (AGHAJANIAN & MAREK, 1997). Isto pode provar de certa forma porque alguns trabalhos na literatura mostram que os antagonistas do receptor 5HT₂ são efetivos no combate às convulsões induzidas por cocaína (RITZ & GEORGE, 1997a), já que estas drogas inibem a transmissão glutamatérgica.

No **capítulo 1**, o carbonato de lítio reduziu significativamente o número de animais que convulsionaram em ambas doses estudadas. O lítio parece reduzir a afinidade da cocaína pelo transportador da serotonina, por uma ação direta da droga neste transportador

(NI et al., 2002). Assim, este efeito produzido pelo lítio pode justificar sua ação protetora sobre as convulsões induzidas por cocaína.

Os receptores glutamatérgicos, por sua vez apresentaram uma menor ligação ao ligante radioativo, possivelmente pela ligação do glutamato a estes receptores. Esta ativação dos receptores glutamatérgicos pelo glutamato, principalmente os receptores NMDA provoca um aumento na atividade da NOS com produção de NO. Este trabalho também mostrou um aumento dos níveis de nitrito/nitrato, o que está relacionado a um aumento do NO que no SNC pode ser produzido pela NOS endotelial (NOSe), uma enzima constitutiva e pela NOS neuronal (NOSn). Há relatos (BAGETTA et al., 2002) de que a expressão de NOSe no cérebro não está correlacionada com convulsões e lesão neuronal. A literatura mostra que outra parte do NO é sintetizada pela NOS induzível (NOSi) que regula a resposta imune. O excesso de NOSi no cérebro, hipocampo CA₁, foi detectado em camundongos geneticamente epiléticos (MURASHIMA et al., 2002). O excesso de NO juntamente com o aumento do estresse oxidativo após EME e morte induzidos por cocaína (**Ver capítulo 5**) pode participar do mecanismo das convulsões e morte induzidos pela droga e até mesmo ser responsável por uma possível lesão cerebral das áreas envolvidas.

Foram detectadas alterações também na neurotransmissão dopaminérgica. As convulsões por cocaína obedeceram ao que já era visto em outros modelos de convulsão como o da pilocarpina, no qual os receptores D₁ e D₂ apresentam papéis opostos, onde o estímulo do receptor D₁ potencializa e a ativação do receptor D₂ inibe as convulsões (BARONE et al., 1991). No **capítulo 1** do presente estudo o antagonista D₂, pimozide potencializou, enquanto o antagonista D₁, SCH 23390 inibiu as convulsões e morte induzidas pela cocaína. No **capítulo 2** foram observadas alterações opostas nos níveis de dopamina, dependendo da área cerebral estudada, bem como nos níveis de NA. De maneira geral ocorreu um aumento nas taxas metabólicas da DA (DOPAC/DA) em ambas áreas cerebrais na morte e em CE após EME e na relação HVA/DA no CE após EME e morte, sugerindo um aumento no metabolismo da dopamina em ambas condições estudadas. Este aumento no metabolismo da DA está relacionado à geração de estresse oxidativo que discutiremos adiante. Os efeitos nos receptores da dopamina também foram variados, onde foi encontrada uma redução nos receptores D₁-símile apenas no EME em ambas as áreas, enquanto os D₂-símile aumentaram no CPF após EME e na morte tanto no CPF como no CE. A redução da

ligação do [³H]-SCH23390 aos receptores D₁ foi discutida como uma possível ativação deste receptor pela DA, visto que os experimentos são conduzidos de forma aguda. O aumento nos receptores D₂ com aumento da afinidade dos mesmos pelo ligante em CPF, foi entendida como uma tentativa do organismo de contrabalançar o excesso de excitação gerada com a ativação dos receptores D₁ e possivelmente outros receptores excitatórios como os glutamatérgico, que da mesma forma que os D₁-símile tiveram sua densidade reduzida, talvez por uma possível ligação do ligante endógeno.

Existem interações recíprocas entre as neurotransmissões dopaminérgica, GABAérgica e glutamatérgica nos núcleos da base (MORARI et al., 1998) e córtex pré-frontal (SEAMANS & YANG, 2004). Trabalhos mostram que a DA agindo em receptores D₁ reduz os níveis extracelulares de GABA no CPF. Porém, outro estudo de microdiálise mostra que agonistas D₁ não alteram os níveis de GABA *in vivo*, mas agonistas D₂ liberados no interior do CPF via *probe* de diálise produzem um aumento dose-dependente dos níveis extracelulares de GABA. Isto mostra que o estímulo de receptores D₁ versus D₂ pode ter ações opostas nas respostas GABAérgicas. Existem evidências de que a dopamina agindo em receptores D₁ aumenta a excitabilidade dos neurônios do CPF *in vitro* (HENZE et al., 2000; WANG & O'DONNELL, 2001) e *in vivo* (NOGUEIRA et al., 2003) Estas interações são complexas, mas foi visto que a DA quando iontoforéticamente co-aplicada com glutamato ou GABA potencializou a excitação mediada pelo glutamato no corpo estriado, núcleo accumbens, substância negra *pars reticulata* e córtex somatosensorial (HU & WHITE, 1997).

Estes receptores (D₁- e D₂-símile) também interferem com a neurotransmissão excitatória. Os receptores D₁ estão distribuídos muito próximos aos receptores glutamatérgicos ionotrópicos (NMDA e AMPA) (SESACK et al., 1998b). Estudos em corpo estriado mostram que agonistas D₁ potencializam as correntes AMPA (CHAO et al., 2002a, b). Em relação aos receptores NMDA, a maioria dos estudos mostra que a DA via receptores D₁ aumenta as respostas mediadas pelo NMDA nesta área cerebral (FLORES-HERMANDEZ et al., 2002), hipocampo (YANG, 2000) e neurônios corticais (WANG & O'DONNELL, 2001; CHEN & YANG, 2002a). A aplicação de agonistas D₁ pode aumentar lentamente o potencial pós-sináptico excitatório nos neurônios hipocámpais CA1 para 140 % dos níveis da linha de base por um período maior que 3 h. Este efeito foi largamente eliminado na presença de antagonistas NMDA, indicando que a maior parte desta potenciação era devido ao componente NMDA. Desta forma podemos resumir que no caso das convulsões e morte

induzidas por cocaína a DA ao agir nos receptores D₁ ativa a neurotransmissão glutamatérgica, pois drogas como o NMDA potencializaram as convulsões e morte, e o antagonista NMDA, cetamina conseguiu aumentar a latência, sobrevivência e reduzir o número de animais que convulsionaram, principalmente, na maior dose estudada (30 mg/kg). Vale ressaltar que as doses de cetamina escolhidas para o estudo são doses sub-anestésicas não tendo, portanto, causado nenhum comprometimento motor nos animais estudados, mas sim, aumento na atividade locomotora quando da administração da cetamina na ausência da cocaína.

Trabalho anterior desenvolvido em nosso laboratório (MACÊDO et al., 2004a) demonstrou que a administração de cocaína durante 7 dias nas doses de 20 e 30 mg/kg, i.p. também induz alterações nos receptores D₁- e D₂-símile em CE. O receptor D₁ na dose de 30 mg/kg teve uma *upregulation* 30 min após a última administração da droga em CE, apresentando uma redução dos seus níveis apenas 24 h após a última administração. Estas alterações nos receptor D₁ persistiram até um período de 30 dias de retirada. MAGGOS et al. (1998) usando a técnica de PET *scan* para verificar a densidade da ligação do [¹¹C]SCH23390 aos receptores D₁, no corpo estriado de ratos, observaram uma *downregulation* deste receptor no último dia após administração repetida de cocaína (três injeções ao dia por 14 dias).

Com relação ao receptor D₂, o trabalho anteriormente referido (MACÊDO et al., 2004a) mostrou uma *upregulation* deste receptor nas doses de 20 e 30 mg/kg, nas duas doses estudadas nos 4 períodos de retirada observados: 30 min, 1 dia, 5 dias e 30 dias, em CE. Estes resultados mostram que a cocaína também em baixas doses produz alterações nos receptores dopaminérgicos semelhantes às encontradas na *overdose* e que provavelmente estas alterações estejam relacionadas ao *kindling*, também chamado de abrasamento, no qual a administração repetida de doses sub-convulsivantes de drogas com potencial convulsivante como a cocaína está associada ao aumento no risco do desenvolvimento de convulsões (POST & ROSE 1976, STRIPLING & ELLINWOOD 1977 a, b), inclusive em humanos. Um estudo feito por DHUNA et al. (1991) com 98 pacientes dos 945 admitidos no *Hennepin County Medical Center* vítimas de intoxicação por cocaína concluiu que anos de abuso da droga podem resultar em *Kindling* químico. Portanto, podemos imaginar que estas alterações observadas em baixas doses podem contribuir para o desenvolvimento de intoxicações relativas ao uso crônico ou em baixas doses da droga.

A neurotransmissão muscarínica também foi afetada pela *overdose* de cocaína. O antagonista do receptor muscarínico M_1 , pirenzepina conseguiu reduzir a percentagem dos animais que convulsionaram, embora tenha apresentado redução da latência daqueles animais que apresentaram convulsões. Ao estudar o receptor M_1 foi visto que ocorreu uma redução na ligação do ligante radioativo a estes receptores no EME e morte induzidos por cocaína, apenas no CPF. Esta área cerebral recebe inervação colinérgica do núcleo *basalis magnocellularis* (SATOH & FIBIGER, 1986; GAYKEMA et al., 1990). Além de ser liberada nos impulsos aferentes para o córtex, a acetilcolina também o é em circuitos locais de neurônios nesta região (CUELLO & SOFRONIEW, 1984; HOUSER et al., 1985). Os receptores muscarínicos do tipo M_1 estão localizados em neurônios piramidais no CPFm (CHESSEL et al., 1993).

Agonistas M_1 , como PD 142505-0028 quando injetados no córtex frontal, ativam neurônios piramidais, como determinado pelo aumento nas concentrações de glutamato no dialisato de regiões estriatais (DIJK et al., 1995) e este efeito excitatório da ACh no CPF é, portanto, projetado para o CE. Como os receptores M_1 -símile estão correlacionados com a estimulação glutamatérgica, a redução da ligação do ligante radioativo aos receptores M_1 -símile, como observado neste trabalho pode indicar uma possível ocupação destes receptores pela ACh contribuindo para a atividade convulsiva e posterior morte dos animais, via liberação de glutamato.

Para determinar o verdadeiro papel da neurotransmissão muscarínica nas convulsões e morte induzidos por cocaína foram verificados os níveis da acetilcolinesterase (AChE) cerebral. A enzima mostrou um comportamento diferente do observado em relação aos receptores M_1 -símile, ou seja, ocorreu um aumento na atividade após EME e morte no CE e, um aumento apenas após a morte no CPF. Este resultado pode dar suporte à hipótese que não apenas os receptores M_1 -símile estejam envolvidos nas convulsões induzidas por cocaína após EME no CE, mas que pode haver alguma participação de outros receptores da acetilcolina, como por exemplo os receptores M_2 -símile, ou até mesmo os nicotínicos. Acetilcolinesterase parece ser um bom indicador da função colinérgica, ou seja, a redução na atividade da AChE indica uma redução da transmissão colinérgica (SUDHA et al., 1995). Assim, o aumento na atividade da AChE vista após EME e morte no CE pode estar

relacionado a um aumento no conteúdo de ACh nesta área cerebral, contribuindo para a atividade convulsiva.

O **capítulo 5** mostra o envolvimento do estresse oxidativo nas convulsões e morte induzidas por cocaína. Até onde se saiba nenhum estudo como este foi ainda realizado, os primeiros dados sendo os nossos publicados recentemente (MACÊDO et al., 2005). As ERO e a oxidação que é resultante de sua ação têm sido implicadas em doenças relacionadas à morte neuronal e neurodegeneração (HALLIWELL, 1992). Em sistemas aeróbicos é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores (como os ERO) e o sistema de defesa antioxidante. Esta linha de defesa é constituída por glutathione reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathione-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. Este estudo mostrou que a atividade da catalase foi reduzida após o tratamento com cocaína em baixas doses (apenas no corpo estriado) e após EME e morte induzidos pela *overdose* de cocaína em ambas áreas, corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos. Esta redução da atividade da catalase reflete um possível acúmulo de peróxido de hidrogênio, pois esta enzima previne o organismo do acúmulo de peróxido, desde que a mesma converte peróxido a H₂O.

Fisiologicamente, H₂O₂ pode ser gerado à partir do metabolismo da dopamina, o qual produz subsequente o danoso radical hidroxil (EBADI et al., 1996; HALLIWELL, 1992). Nossos dados (MACEDO et al., 2004b e **Capítulo 2, Figura 2-5** deste trabalho) mostraram um aumento no metabolismo da DA após *overdose* da cocaína em CE e CPF (**ver capítulo 2**). Este aumento no metabolismo da DA pode ter acarretado uma elevação no conteúdo de H₂O₂ em ambas áreas cerebrais após a *overdose* induzida por cocaína, o que está provavelmente correlacionado com o aumento das ERO nas áreas cerebrais estudadas.

Trabalhos prévios (HUANG et al., 2003) indicam que H₂O₂ inibe a atividade do transportador da dopamina e do glutamato de uma maneira reversível e que a super expressão da catalase alivia a inibição da captação da dopamina e do glutamato produzida pelo H₂O₂. No pré-tratamento com a droga anticonvulsivante diazepam reverteu a redução na atividade da catalase provocada pela cocaína levando os valores para os níveis dos controles, o que mostrou o verdadeiro envolvimento da catalase com o mecanismo da convulsão e morte induzida por cocaína.

A GSH aumentou apenas após a morte induzida por cocaína em ambas áreas cerebrais estudadas, o que indica uma possível ação antioxidante desta enzima na tentativa de reverter ou evitar alguma lesão provocada pela *overdose* da droga nestas áreas cerebrais. No CE dos animais que morreram após convulsão induzida por cocaína houve um aumento nos níveis de MDA, o que mostra a ocorrência de peroxidação lipídica nesta área cerebral, ou seja, neurotoxicidade. Analisando os resultados de uma forma geral destacamos um maior envolvimento destas enzimas na morte induzida por cocaína, visto que apenas nesta condição ocorreu alteração nos níveis de GSH e de MDA.

O pré-tratamento com vitamina E reduziu o número de animais que convulsionaram, aumentando a sobrevivência dos mesmos. Além do citado anteriormente, os radicais livres inibem a glutamina sintase aumentando níveis de glutamato e reduzem também os níveis de GABA, pois inibem a enzima glutamato descarboxilase. Os resultados obtidos neste trabalho indicam um real envolvimento do EO nos eventos relacionados à *overdose* induzida por cocaína.

Quadro V-1 Ação de drogas agonistas e antagonistas de diversos sistemas neurotransmissores na proteção contra as convulsões e letalidade associadas à *overdose* de cocaína

Droga (mg/kg)	Convulsão		Morte
	Latência	% convulsão	% sobrevivência
Neurotransmissão GABAérgica			
Diazepam 3	-	+	-
Diazepam 10	+	+	-
Diazepam 15	+	+	+
Fenobarbital 10	-	+	-
Fenobarbital 50	+	+	+
Gabapentina 50	-	+	+
Gabapentina 100	-	+	+
Gabapentina 150	-	+	-
Neurotransmissão Dopaminérgica			
Pimozida 10	-	-	-
Pimozida 20	↑	-	-
SCH 23390 0,1	+	+	+
Neurotransmissão muscarínica			
Pirenzepina 10	↑	+	-
Pirenzepina 20	↑	+	-
Pirenzepina 40	-	+	-
Neurotransmissão Serotonérgica			
Fluoxetina 10	-	+	-
Fluoxetina 20	↑	-	↑
Fluoxetina 40	↑	-	↑
Bupiriona 5	-	-	+
Bupiriona 10	-	-	-
Mianserina 10	↑	-	↑
Mianserina 20	↑	-	↑
Mianserina 40	↑	-	-
Imipramina 5	-	-	+
Imipramina 10	↑	-	-
Neurotransmissão glutamatérgica			
NMDA 20	↑	-	↑
Cetamina 20	-	+	+
Cetamina 30	+	-	+
Neurotransmissão opióide			
Naltrexone 25	↑	-	-
Naltrexone 50	↑	-	↑
Outros Sistemas			
Lítio 56,3	-	+	-
Lítio 112,5	-	+	-
Vitamina E 400	-	+	+

Símbolos utilizados: +proteção; ↑ piora; - ausência de efeitos significativos

Quadro V-2 Resumo das alterações neuroquímicas encontradas após estado de mal epilético (EME) e morte induzidos por *overdose* de cocaína (90 mg/kg, i.p.) em corpo estriado (CE) e córtex pré-frontal (CPF) de camundongos.

	EME		Morte	
	CE	CPF	CE	CPF
Monoaminas metabólicas e				
DA	↓	↑	-	↓
DOPAC	-	↑	↑	-
HVA	↑	ND	↑	ND
5HT	-	↑	-	-
5HIAA	-	↓	-	↓
NA	↓	↑	↑	↓
Taxas metabólicas				
DOPAC/DA	↑	-	↑	↑
HVA/DA	↑	ND	↑	ND
5HIAA/5HT	-	↓	↓	↓
Densidade de Receptores				
Dopaminérgico D ₁ -símile	↓	↓	-	-
Dopaminérgico D ₂ -símile	-	↑	↑	↑
Muscarínico M ₁ -símile	-	↓	-	↓
Serotonérgico 5HT ₂	↑	↑	↑	↑
GABAérgicos	↓	↓	-	↓
Glutamatérgicos	↓	↓	-	↓
Enzima				
Acetilcolinesterase (AChE)	↑	-	↑	↑
Estresse Oxidativo				
Nitrito/Nitrato	↑	↑	-	↑
Glutaciona reduzida (GSH)	-	-	↑	↑
Catalase	↓	↓	↓	↓
Peroxidação lipídica (MDA)	-	-	↑	-

Símbolos: ↑ ou ↓ aumento ou diminuição, respectivamente em relação ao grupo controle quando estatisticamente significativo; –ausência de efeito significativo; ND, não detectado

VI-CONCLUSÕES

A análise dos resultados apresentados nos capítulos deste trabalho, nos permitiu concluir que:

- ✎ As convulsões e letalidade induzidas por cocaína são eventos multimediados envolvendo diferentes sistemas neurotransmissores, mas nem sempre os mesmos neurotransmissores estão envolvidas nas convulsões e letalidade;

- ✎ A redução dos receptores D₁-símile após EME no CPF ocorreu provavelmente pela ligação da DA a estes receptores. A diminuição do número de receptores D₁ no CE pode estar relacionada à redução da afinidade do receptor pelo ligante radioativo. O aumento dos receptores D₂ após EME no CPF e após a morte no CE e CPF pode refletir um mecanismo compensatório contra as convulsões;

- ✎ A redução da taxa de metabolização da 5HT no CE e aumento dos seus níveis no CPF, bem como o aumento do número de receptores 5HT₂ após EME e morte tanto no CE como no CPF, sugere uma potencialização da neurotransmissão serotoninérgica causada pela convulsão e morte induzida por cocaína. O estímulo desta neurotransmissão da mesma forma que os receptores D₁ está relacionada à facilitação da neurotransmissão glutamatérgica;

- ✎ A redução dos receptores M₁-símile após EME e morte induzidos por cocaína apenas no CPF pode ter ocorrido pela ligação da ACh a este receptor. O aumento da atividade da AChE sugere um possível envolvimento de outros receptores colinérgicos no mecanismo desta convulsão;

- ✎ A redução dos receptores glutamatérgicos ocorreu pelo estímulo destes receptores pelo seu ligante endógeno. A redução do número de receptores GABAérgicos pode ter ocorrido por uma redução da afinidade do receptor pelo ligante radioativo;

✎ Existe um importante envolvimento do estresse oxidativo nas convulsões e morte induzidas por cocaína, visto que:

- Ocorreu redução na atividade da catalase após EME e morte nas duas áreas cerebrais estudadas;
- O pré-tratamento com diazepam reverteu a redução na atividade da catalase induzida pela *overdose* de cocaína;
- A glutathione reduzida apresentou aumento dos seus níveis apenas após a morte em CE e CPF;
- O MDA aumentou apenas após a morte no CE;
- O aumento nos níveis de glutathione pode ter ocorrido como mecanismo compensatório à geração de peróxidos lipídicos (MDA);
- O pré-tratamento com vitamina E, um importante antioxidante, protegeu os animais das convulsões e morte induzidas pela cocaína, mostrando o real envolvimento do mecanismo do estresse oxidativo nesta neurotoxicidade.

VII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABI-SAAB, W.M.; BUBSER, M.; ROTH, R.H.; DEUTCH, A.Y. 5-HT₂ receptor regulation of extracellular GABA levels in the prefrontal cortex. **Neuropsychopharmacol.**, v. 20, p. 92-6, 1999.

ADAMS, J.D.; CHANG, M.L.; KLAIDMAN L. Parkinson's disease redox mechanisms. **Curr Med Chem.**, v. 8, p. 809-14, 2001

AGHAJANIAN, G.K.; MAREK, G.J. Serotonin induces excitatory post- synaptic potentials in apical dendrites of neocortical pyramidal cells. **Neuropharmacol.**, v. 36, p. 589-99, 1997.

ALLDREDGE, K.; LOWENSTEIN, D. H.; SIMON, R. P. Seizures associated with recreational drug abuse. **Neurology**, v. 39, p. 1037-1039, 1989.

AL-TAJIR, G.; STARR, M. S. Anticonvulsant effect of striatal dopamine D2 receptor stimulation: dependence on cortical circuits? **Neurosci.**, v. 43, p. 51-7, 1991.

AMARA, S. G.; KUHAR, M. J. Neurotransmitter transporters: Recent progress. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 16, p. 73-93, 1993.

ANSAH, T. A.; WADE, L. H.; SHOCKLEY, D. C. Effects of calcium channel entry blockers on cocaine and amphetamine- induced motor activities and toxicities. **Life Sci.**, v. 53, p. 1947-56, 1993.

ANTON, A. H. Unexpected cocaine-induced fatalities: A possible cause. **Drug Intell. Clin. Pharmacol.**, v. 22, p. 914, 1988.

APPLEGATE, C. D.; BURCHFIEL, J. L.; KONKOL, R.J. Kindling antagonism: after concurrent, alternate stimulation in rats. **Exp. Neurol.**, v. 94, p. 379-90, 1986.

APPLEGATE, C. D.; PRETEL, S.; PIEKUT, D. T. The substantia nigra pars reticulata, seizures and Fos expression. **Epilepsy Res.**, v. 20, p.31-9, 1995.

ARANEDA, R.; ANDRADE, R. 5-hydroxytryptamine₂ and 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. **Neurosci.**, v. 40, p. 399-412, 1991.

ARMSTEAD, W. M.; MIRRO, R.; LEFFLER, C. W.; BUSIJA, D. W. Cerebral superoxide anion generation during seizures in new born pigs. **J. Cereb. Blood Flow Metab**, v. 9, p. 175-9, 1989.

ARNOLD, P.S.; RACINE, R.J.; WISE, R.A. Effects of atropine, reserpine, 6-hydroxydopamine, and handling on seizure development in the rat. **Exp. Neurol.**, v. 40, p. 457-70, 1973.

ARVANOV, V.L.; WANG, R.Y. M100907, a selective 5-HT_{2A} receptor antagonist and a potential antipsychotic drug, facilitates *N*-methyl-*DD*- aspartate-receptor mediated neurotransmission in the rat medialprefrontal cortical neurons in vitro, **Neuropsychopharmacol.**, v. 18, p. 197-209, 1998.

ASCHER, J. A.; COLE, J. O.; COLIN, J. N.; FEIGHNER, J. P.; FERRIS, R. M.; FIBIGER, H. C.; GOLDEN, R. N.; MARTIN, P.; POTTER, W. Z.; RICHELSON, E. **J. Clin. Psychiatry**, v. 56, p. 395-401, 1995.

AUER, R. N. Structural neurotoxicologic investigation of the glycine antagonist 5-nitro-6,7-dichloroquinoxalinedione (ACEA-1021). **Neurotoxicol.**, v. 18, p. 53-62, 1997.

AVOLI, M. GABA-mediated synchronous potentials and seizure generation. **Epilepsia**, v. 37, p. 1035-42, 1996.

AXELROD, J. Noradrenaline: Fate and control of its biosynthesis. **Science**, v. 173, p. 598-606, 1971.

BACON, S. J.; HEADLAM, A. J.; GABBOTT, P. L.; SMITH, A. D. Amygdala input to medial prefrontal cortex (mPFC) in the rat: a light and electron microscope study. **Brain Res.**, v. 720, p. 211-19, 1996.

BAGETTA, G.; PAOLETTI, A. M.; LETTA, A.; DEL DUCA, C.; NISTICO, R.; ROTIROTI, D.; CORASANITI, M. T. Abnormal expression of neuronal nitric oxide synthase triggers limbic seizures and hippocampal damage in rat. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 291, p. 255-60, 2002.

BAPTISTA, T.; WEISS, S. R. B.; ZOCCHI, A.; SITCOSKE, M.; POST, R. Electrical kindling is associated with increases in amygdala acetylcholine levels: an in vivo microdialysis study. **Neurosci. Lett.**, v. 167, p. 113-36, 1994.

BARAT, S. A.; ABDEL-RAHMAN, M. S. Cocaine and lidocaine in combination are synergistic convulsants, **Brain Res.**, v. 742, p. 157-62, 1996.

BARONE, P.; MORELLI, M.; CICARELLI, G.; COZZOLINO, A.; DEJOANNA, G.; CAMPANELLA, G.; DICHIARA, G. Expression of c-fos protein in the experimental epilepsy induced by pilocarpine. **Synapse**, v. 14, p. 1–9, 1993.

BARONE, P.; PALMA, V.; DEBARTOMEIS, A.; TEDESCHI, E.; MUSCETTOLA, G.; CAMPANELLA, G. Dopamine D₁ and D₂ receptors mediate opposite functions in seizure induced by lithium-pilocarpine. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 195, p. 167-62, 1991.

BARONE, P.; PARASHOSS, S. A.; PALMA, V.; MARIN, C.; CAMPANELLA, G.; CHASE, T.N. Dopamine D₁ receptor modulation of pilocarpine-induced convulsions. **Neurosci.**, v. 34, p. 209, 1990.

BARRIO, G.; SAAVEDRA, P.; FUENTE, L.; ROYELA, L. Purity of cocaine seized in Spain, 1985–1993: Variations by weight province and year of seizure. **Forensic Sci. Int.**, v. 85, p. 15–28, 1997.

BASHKATOVA, V. G., MIKOYAN, V. D., KOSACHEVA, E. S., KUBRINA, L. N., VANIN, A. F., RAYEVSKY, K. S. The direct determination of nitric oxide content in rat brain cortex during epileptiform seizures of different origin. **Dokl. Acad. Nauk (Proc. Russian. Acad. Sci.)**, v. 348, p. 119–21, 1996.

BASHKATOVA, V. G.; VITSKOVA, G.; NARKEVICH, V. B.; VANIN, A. F.; MIKOYAN, V. D.; RAYEVSKY, K. S. Nitric oxide content measured by ESR-spectroscopy in the rat brain is increased during pentylenetetrazole- induced seizures. **J. Mol. Neurosci.**, v. 14, p. 183– 90, 2000.

BASILE, A. S.; FEDOROVA, I.; ZAPATA, A.; LIU, X.; SHIPPENBERG, T.; DUTTARROY, A.; YAMADA, M.; WESS, J. Deletion of the M₅ muscarinic acetylcholine receptor attenuates morphine reinforcement and withdrawal but not morphine analgesia. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 99, p. 11452–7, 2002.

BELISSIMO, M. I.; AMADO, D.; ABDALLA, D. S.; FERREIRA, F. C.; CAVALHEIRO, F. A.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. **Epilepsy Res.**, v. 46, p. 121-8, 2001.

BENZON, J.; KALEN, P.; LINDVALL, O. Evidence for long-term reduction of noradrenaline release after kindling in the rat hippocampus. **Brain Res.**, v. 535, p. 353-7, 1990.

BENNETT, A. D. Perinatal substance abuse and the drug-exposed neonate. **Adv Nurse Pract.**, v. 7, p. 32-6, 1990.

BENOWITZ, N. L. Clinical pharmacology and toxicology of cocaine. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 72, p. 3 – 12, 1993.

BERGER, I.; GILLIS, R. A.; VITAGLIANO, S.; PANICO, W. H.; MAGEE, S.; KELLY, M.; NORMAN, W. P.; MCMANIGLE, J. E.; TAVEIRA DA SILVA, A. M. NMDA receptors are involved at the ventrolateral nucleus tractus solitarii for termination of inspiration. **Eur J Pharmacol.**, v. 277, p. 195-208, 1995.

BERMAN, S. B.; ZIGMOND, M. J.; HASTINGS, T. G. Modification of dopamine transporter function: effect of reactive oxygen species and dopamine. **J. Neurochem.**, v. 67, p. 593–600, 1996.

BERMEJO-BARRERA, P.; MOREDA-PINERO, A.; MOREDA-PINERO, A.; BERMEJO-PARRERA, A.; BERMEJO-PARRERA, A. M. A study of illicit cocaine seizure classification by pattern recognition techniques applied to metal data. **J. Forensic Sci.**, v. 44, p. 270–75, 1999.

BERNARD, V.; DUMARTIN, B.; LAMY, E.; BLOCH, B. Fos immunoreactivity after stimulation or inhibition of muscarinic receptors indicates anatomical specificity for cholinergic control of striatal efferent neurons and cortical neurons in the rat. **Eur. J. Neurosci.**, v. 5, p. 1218—25, 1993.

BERNARDO, N. P.; SIQUEIRA, M. L. P. B; DE PAIVA, M. J. N.; MAIA, P. P. Caffeine and other adulterants in seizures of street cocaine in Brazil. **Int. J. Drug Policy**, v. 14, p. 331–4, 2003.

BEYER, C. E.; STEKETEE, J. D.; SAPHIER, D. Antioxidant properties of melatonin – an emerging mystery. **Biochem. Pharmacol.**, v. 56, p. 1265-72, 1998.

BIGGE, F. C. Structural requirements for the development of potent N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor antagonists. **Bioch. Pharmacol.**, v. 45, p. 1547-61, 1993.

BLEAKMAN, D.; LODGE, D. Neuropharmacology of AMPA and kainate receptors. **Neuropharmacol.**, v. 37, p. 1197-204, 1998.

BLISS, T.V.; COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, p. 31-9, 1993.

BOLANÕS, J.; ALMEIDA, A. Roles of nitric oxide in brain hypoxia– ischemia. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1411, p. 415– 36, 1999.

BOLANÕS, J. P.; ALMEIDA, A.; STEWART, V.; PEUCHEN, S.; LAND, J. M.; CLARK, J. B.; HEALES, S. J. R. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. **J. Neurochem.**, v. 68, p. 2227–40, 1997.

BONNER, T. I.; BUCKLEY, N. J.; YOUNG, A.; BRANN, M. R. Identification of a family of muscarinic receptor genes. **Science**, v. 237, p. 527–536, 1987.

BONHAUS, D. W.; WALTERS, J. R.; MCNAMARA, J. O. Activation of substantia nigra neurons: role in the propagation of seizures in kindled rats. **J. Neurosci**, v. 6, p. 3024-30, 1986.

BOSE, J. Cocaine intoxication and its demoralizing effects. **BMJ**, v. 2, p. 1020-2, 1902.

BOZZI, Y.; BORRELLI, E. Dopamine D₂ Receptor Signaling Controls Neuronal Cell Death Induced by Muscarinic and Glutamatergic Drugs. **Mol. Cell. Neurosci.** v. 19, p. 263–271, 2002.

BOZZI, Y.; VALLONE, D.; BORRELLI, E. Neuroprotective role of dopamine against hippocampal cell death. **J. Neurosci.**, v. 20, p. 8643– 9, 2000.

BOYSON, S. J.; MCGONIGLE, P.; MOLINOFF, B. P. Quantitative autoradiographic localization of the D₁ and D₂ subtypes of dopamine receptors in rat brain. **J. Neurosci.**, v. 6, p. 3177, 1986.

BRACKETT, R. L.; POUW, B.; BLYDEN, J. F.; NOUR, M.; MATSUMOTO, R. R. Prevention of cocaine-induced convulsions and lethality in mice: effectiveness of targeting different sites on the NMDA receptor complex. **Neuropharmacol.**, v. 39, p. 407-18, 2000.

BRADFORD, H. F. Glutamate, GABA and epilepsy. **Prog. Neurobiol.**, v. 47, p. 477–511, 1995.

BRADFORD, H. F.; THOMAS, A. J. Metabolism of glucose and glutamate by synaptosomes from mammalian cerebral cortex. **J. Neurochem.**, v. 16, p. 1495-504, 1969.

BRAIDA, D.; PALADINI, E.; GORI, E.; SALA, M. Naltrexone, naltrindole and CTOP block cocaine-induced sensitization to seizures and death. **Peptides**, v. 18, p. 1189-95, 1997.

BRANDAO, M. L.; LOPEZ-GARCIA, J. S.; GRAEFF, F. G.; ROBERTS, M. H. T. Electrophysiological evidence for excitatory 5-HT₂ and depressant 5HT_{1A} receptors on neurones of rat midbrain tegmentum. **Brain Res.**, v. 556, p. 259-66, 1991.

BROWN, B. S. A report on the Nacional AIDS Demonstration Research Program. In G. Buhninger, J. J. Platt (Eds.) **Drug addiction treatment research: German and American perspectives**. Malabar, Fla.: Krieger, 1992, p. 519-28.

BROWN, J. K.; MALONE, M. H. Status of a drug quality in the street-drug market-an update. **Clin. Toxicol.**, v. 9, p. 145-68, 1976.

BROWNING, R. A.; HOFFMAN, N. E.; SIMONTON, R. L. Changes in seizure susceptibility after intracerebral treatment with 5,7-dihydroxytryptamine: the role of serotonergic neurons. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 305, p. 437–56, 1978.

BUBSER, M.; KOCH, M. Prepulse inhibition of the acoustic startle response of rats is reduced by 6-hydroxydopamine lesions of the medial prefrontal cortex. **Psychopharmacol.**, v. 113, p. 487–92, 1994.

BUCHANAN, J. F. **Cocaine intoxication**. *Hosp. Phys.*, v. 24, p. 24-9, 1988.

BUISSON, A.; LAKHMECHE, N.; VERRECCHIA, C.; PLOTKINE, M.; BOULU, R. G. Nitric oxide: An endogenous anticonvulsant substance. **Neuroreport.**, v. 4, p. 444–6, 1993.

BURKE, R. E.; GREENBAUM, D. Effect of post-mortem factors on muscarinic receptor subtypes in rat brain. **J. Neurochem.**, v. 49, p. 529–96, 1987.

BUTERBAUGH, G. G.; LONDON, E. D. The relationship between magnitude of electroshock stimulation and the effect of digitoxigenin, pentylentetrazol and brain

monoamine reduction on electroshock convulsive threshold. **Neuropharmacol.**, v. 16, p. 617, 1977.

BUTERBAUGH, G. G. Effect of drugs modifying central serotonergic function response of extensor and nonextensor rats to maximal electroshock. **Life Sci.**, v. 23, p. 2393, 1978.

BUTTERFIELD, D. A. Amyloid b-peptide [1-42]-associated free radical-induced oxidative stress and neurodegeneration in Alzheimer's disease brain: mechanisms and consequences. **Curr Med Chem**, v. 10, p. 2651-9, 2003.

CALLAWAY, C. W.; CLARCK, R. F. Hyperthermia in psychostimulant overdose (review). **Ann. Emerg. Med.**, v. 24, p. 68-76, 1994.

CALLIGARO, D. O.; ELDEFRAWI, M. E. High affinity stereospecific binding of 3H-cocaine in striatum and its relationship to the dopamine transporter. **Membrane Biochem.**, v. 7, p. 87-106, 1988.

CAMPBELL, J. N. et al. Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury. **Pain**, v. 32, p. 89-94, 1988.

CARLINI, E. A.; GALDURÓZ, J. C. F.; NOTO, A. R.; NAPPO, S.A. **I Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas no Brasil – 2001**. Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas - Departamento de Psicobiologia da Escola Paulista de Medicina e SENAD – Secretaria Nacional Antidrogas, Presidência da República, Gabinete de Segurança Nacional, 2002, 480p.

CARROLL, M. E.; LAC, S. T.; WALKER, M. J.; KRAGH, R.; NEWMANN, T. Effect of naltrexone on intravenous cocaine self-administration in rats during food satiation and deprivation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 238, p. 1-7, 1986

CARTER, C. J.; L'HEUREUX, R.; SCATTON, B. Differential control by N-methyl- D-aspartate and kainate of striatal dopamine release in vivo: a transstriatal dialysis study. **J. Neurochem.**, v. 2, p. 462-8, 1988

CARTER, C. J.; PYCOCK, C. J. Differential effects of central serotonin manipulation on hyperactive and stereotyped behaviour. **Life Sci.**, v. 23, p. 953-60, 1978.

CARTER, C. J.; PYCOCK, C. J. Behavioral and biochemical effects of dopamine and noradrenaline depletion within the medial prefrontal cortex of the rat. **Brain Res**, v. 192, p. 163–76, 1980.

CARTMELL, J.; SCHOEPP, D. D. Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. **J. Neurochem.**, v. 75, p. 889–907, 2000.

CASTELLI, M. C.; VENTURINI, L.; SPARBER, S. B. Cocaine and salicylate: documentation of hydroxyl radical formation in hearts and brains of 18-day-old chick embryos and unexpected interactive toxicity. **Psychopharmacol.**, v. 156, p. 23–31, 2001.

CASTILL, J.; RAMA, R.; DAVALOS, A. Nitric-oxide related brain damage in acute ischemic stroke. **Stroke**, v. 31, p. 852-7, 2000.

CAULFIELD, M. P. Muscarinic receptors—characterization, coupling and function. **Pharmacol Ther.**, v. 58, p. 319–379, 1993

CAULFIELD, M. P., BIRDSALL, N. J. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. **Pharmacol Rev**, v. 50, p. 279-90, 1998.

CAVALHEIRO, E. A.; LEITE, J. P.; BORTOLOTTI, Z. A.; TURSKI, W. A.; IKONOMIDOU, C.; TURKI, L. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia** v. 32, p. 778–82, 1991.

CÉPEDA, C.; BUCHWALD, N. A.; LEVINE, M.S. Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 90, p. 976-80, 1993.

CÉPEDA, C.; LEVINE, M. S. Dopamine and N-methyl-D-aspartate receptor interactions in the neostriatum. **Dev. Neurosci.**, v. 20, p. 1-18, 1998.

CÉPEDA, C.; RADISAVLJEVIC, Z.; PEACOCK, W.; LEVINE, M. S.; BUCHWALD, N. A. Differential modulation by dopamine of responses evoked by excitatory amino acids in human cortex. **Synapse**, v. 11, p. 330–41, 1992.

CERVO, L.; SAMANIN, R. Effects of dopaminergic and glutamatergic receptor antagonists on the acquisition and expression of cocaine conditioning place preference. **Brain Res.**, v. 673, p. 242-50, 1995

CHAMPNEY, T. H.; HANNEMAN, W. H.; LEGARE, M. E.; APPEL, K. Acute and chronic effects of melatonin as an anticonvulsant in male gerbils. **J. Pineal Res.**, v. 20, p. 79–83, 1996.

CHEN, G.; ENSOR, G.R.; BOHNER, B. A facilitation action of reserpine on the central nervous system. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 86, p. 507–510, 1954.

CHEN, L.; YANG, C. R. Interaction of dopamine D₁ and NMDA receptors mediates acute clozapine potentiation of glutamate EPSPs in rat prefrontal cortex. **J. Neurophysiol.**, v. 87, p. 2324-36, 2002.

CHERAMY, A. R.; GODEHEU, R. G.; BARUCH, P.; GLOWINSKI, J. *In vivo* presynaptic control of dopamine release in the cat caudate nucleus-II. Facilitatory or inhibitory influence of L-glutamate. **Neuroscience**, v. 2, p. 1081- 90, 1986.

CHESEL, I. P.; FRANCIS, P. T.; PANGALOS, M. N.; PEARSON, R. C.; BOWEN, D. M. Localization of muscarinic (M₁) and other neurotransmitter receptor on corticofugal-projecting pyramidal neurons. **Brain Res.**, v. 32, p. 86-94, 1993.

CHONG-KWONG, M.; LIPTON, R. B. Seizures in hospitalized cocaine users. **Neurology**, v. 39, p. 425-7, 1989.

CHRISTIE, M. J.; ROWE, P. J.; BEART, P.M. Effect of excitotoxin lesions in the medial prefrontal cortex on cortical and subcortical catecholamine turnover in the rat. **J. Neurochem.**, v. 47, p. 1593–97, 1986

CLIFFORD, D. B.; OLNEY, J.W.; MANIOTIS, A.; COLLINS, R. C.; ZORUMSKI, CF. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. **Neuroscience**, v. 23, p. 953, 1987.

CONWAY, E. E.; MEZEY, A. P.; POWERS, K. Status epilepticus following the oral ingestion of cocaine in an infant. **Pediatr. Emerg. Care**, v. 6, p. 189-90, 1990.

CORCORAN, M. E.; FIBIGER, H. C.; MCCAUGHRAN, J. A.; WADA, J. A. Potentiation of amygdaloid kindling and metrazol-induced seizures by 6-hydroxydopamine in rat. **Exp. Neurol.**, v. 45, p. 118–133, 1974.

COSTA-LOTUFO, L. V.; FONTELES, M. M. F.; LIMA, I. S. P.; et al. Attenuating effects of melatonin on pilocarpine-induced seizures in rats. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. C 131, p. 521–529, 2002.

COSTA, E.; SANDLER, M. **Monoamine Oxidase: New Vistas**. New York: Raven, 1972

COTÊ, L.; CRUTCHER, M. D. The basal ganglia. In: **Principles of Neural Science**, 3rd edition (Kandel, E. R.; Schwartz, J. H.; Jessel, T. M. eds.) Elsevier, New York, 1991, p. 647-58.

CREGLER, L. L. Protracted elimination of cocaine metabolites. **Am. J. Med.** v. 86, p. 632, 1989.

CREGLER, L. L.; MARK, H. Medical complications of cocaine abuse. **N Engl J Med.**, v. 315, p. 1495–500, 1986.

CRONSON, A. J.; FLEMENBAUM, A. Antagonism of cocaine highs by lithium. **Am J Psychiat.**, v. 135, p. 856-7, 1978.

CUELLO, A. C.; SOFRONIEW, M. V. The anatomy of the CNS cholinergic neurons. **Trends Neurosci.**, v. 7, p. 74-8, 1984.

CUNNINGHAM, E. E.; VENUTO, R. C.; ZIELEZNY, M. A. Adulterants in heroin/cocaine: implications concerning heroin-associated nephropathy. **Drug Alcohol Dep.** v. 14, p. 19-22, 1984.

CZUCZWAR, S. J.; TUTKA, P.; KLONOWSKI, P.; KLEINROK, Z. N(G)-Nitro-Larginine impairs the anticonvulsive action of ethosuximide against pentylentetrazole. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 366, p. 137– 42, 1999.

DAILEY, J. W.; YAN, Q. S.; MISHRA, P. K.; BURGER, R. L.; JOBE, P.C. Effects of fluoxetine on convulsions and brain serotonin as detected by microdialysis in genetically epilepsy-prone rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 260, p. 533–40, 1992.

DALKARA, T.; YOSHIDA, T.; IRIKURA, K.; MOSKOWITZ, M. A. Dual role of nitric oxide in focal cerebral ischemia. **Neuropharmacology.**, v. 33, p. 1447–52, 1994.

DAVIDSON, A. F. An evaluation of the treatment and aftercare of a hundred alcoholics. **Brit. J. Addict.**, v. 71, p. 217-24, 1976.

DAVIES, M. F.; DEISZ, R. A.; PRINCE, D. A.; PEROUTKA, S. J. Two distinct effects of 5-hydroxytryptamine on single cortical neurons. **Brain Res.**, v. 423, p. 334-52, 1987.

DAVIS, G. G.; SWALWELL, C. I. The incidence of acute cocaine or methamphetamine intoxication in deaths due to ruptured cerebral aneurysms. **J. Forensic Sci.**, v. 41, p. 626–8, 1996.

DAVIS, S.; BUTCHER, S. P.; MORRIS, R. G. M. The NMDA receptor antagonist D-2 amino-5-phosphonopentanoate (DAP5) impairs spatial learning and LTP *in vivo* at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP *in vitro*. **J Neurosci.**, v. 12, p. 21–34, 1992.

DAVIES, K. J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. **Biochem. Soc. Symp.**, v. 61, p. 1–31, 1995.

DAWSON, T. M.; BARONE, P.; SIDHU, A.; WAMSIEY, J. K.; CHASE, T. N. The D₁ dopamine receptor in the rat brain: quantitative autoradiographic localization using an iodinated ligand. **Neuroscience**, v. 26, p. 83, 1988.

DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Free radicals and neuronal cell death. **Cell Death Differentiation**, v. 3, p. 71–8, 1996.

DAWSON, T. M.; SNYDER, S. H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **J. Neurosci.**, v. 14, p. 5147–59, 1994.

DELONG, M. R. The basal ganglia. In: KANDEL, E. R., SCHWARTZ, J. H., JESSELL, T. M. (eds.), **Principles of Neural Sciences**, McGraw-Hill, New York, 2000, p. 853-867.

DENEKE, S. M.; FANBURG, B. L. Regulation of cellular glutathione. **Am J Physiol.**, v. 257, p. L163-73, 1989.

DELORENZO, R. J.; PELLOCK, J. M.; TOWNE, A. R. Epidemiology of status epilepticus. **J Clin Neurophysiol.**, v. 12, p. 316-25, 1995.

DERANSART, C.; RIBAN, V.; LÊ, B. T.; MARESCAUX, C.; DEPAULIS, A. Dopamine in the striatum modulates seizures in a genetic model of absence epilepsy in the rat. **Neuroscience**, v. 100, p. 335-44, 2000.

DERLET, R. W.; ALBERTSON, T. E. Acute cocaine toxicity: antagonism by agents interacting with adrenoceptors. **Pharmacol. Biochem. Beh.**, v. 36, p. 225-31, 1990.

DERLET, R. W.; ALBERTSON, T. E.; RICE, P. The effect of haloperidol in cocaine and amphetamine intoxication. **J Emerg Med**, v. 7, p. 633-7, 1989.

DERLET, R. W.; ALBERTSON, T. E.; THARRAT, R. S. Lidocaine potentiation of cocaine toxicity. **Ann. Emerg. Med.**, v. 20, p. 135-8, 1991.

DERLET, R. W.; TSENG, C.; ALBERTSON, T. E. Cocaine toxicity and the calcium channel blockers nifedipine and nimodipine in rats. **Amer. J. Emerg. Med.**, v. 12, p. 1-4, 1994.

DE SARRO, J.; DI PAOLA, E. D.; DE SARRO, A.; VIDAL, M.J.; L-Arginine potentiates excitatory amino acid-induced seizures elicited in the deep piriform cortex. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 230, p. 151-8, 1993

DE SARRO, G.; PALMA, E.; COSTA, A.; MARRA, R.; GRATTERI, S.; DE SARRO, A.; ROTIROTI, D. Effects of compounds acting on GABAB receptors in the pentylenetetrazole kindling model of epilepsy in mice. **Neuropharmacol.**, v. 39, p. 2147-61, 2000.

DEVI, B. G.; CHAN, A. W. Cocaine-induced increase of Mn-SOD in adult rat liver cells. **Life Sci.**, v. 61, p. 1245-51, 1997.

DEWEY, S. L.; MORGAN, A. E.; ASHBY, C. R. J.; HORAN, B.; KUSHNER, S. A.; LOGAN, J.; VOLKOW, N. D; FOWLER, J. S.; GARDNER, E. L.; BRODIE, J. D. A novel strategy for the treatment of cocaine addiction. **Synapse**, v. 30, p. 119-129, 1998.

DE WIT, H.; WISE, R. A. Blockade of cocaine reinforcement in rats with the dopamine receptor blocker pimozide, but not with the noradrenergic blockers phentolamine or phenoxybenzamine. **Can. J. Psychol.**, v. 31, p. 195, 1977.

DHUNA, A.; PASCUAL-LEONE, A.; LANGENDORF, F.; ANDERSON, D. C. Epileptogenic properties of cocaine in humans. **Neurotoxicol.**, v. 12, p. 621-26, 1991.

DI CHIARA, G.; MORELLI, M.; CONSOLO, S. Modulatory functions of neurotransmitters in the striatum: acetylcholine/dopamine/ NMDA interactions. **Trends Neurosci.**, v. 17, p. 228-33, 1994.

DIETRICH, J.-B.; MANGEOL, A.; REVEL, M.-O.; BURGUN, C.; AUNIS, D.; ZWILLER, J. Acute or repeated cocaine administration generates reactive oxygen species and induces antioxidant enzyme activity in dopaminergic rat brain structures. **Neuropharmacol.**, v. 48, p. 965-74, 2005.

DIEZ-FERNANDEZ, C.; ZARAGOZA, A.; ALVAREZ, A. M.; CASCALES, M. Cocaine cytotoxicity in hepatocyte cultures from phenobarbital- induced rats; involvement of reactive oxygen species and expression of antioxidant defense. **Biochem Pharmacol.**, v. 58, p. 797–805, 1999.

DINGLELINE, R.; MCBAIN, C. Glutamate and Aspartate. In: Siegel, G. J.; Agranoff, B. W.; Albers, R. W.; Fisher, S. K.; Uhler, M. D. eds. **Basic Neurochemistry, molecular cellular and medical aspects**. 6th edition. Lippincott Williams & Wilkins, 1999, p. 315

DIJK, S. N.; FRANCIS, P. T.; STRATMANN, G. C.; BOWEN, D. M. Cholinomimetics increase glutamate outflow via an action on the corticostriatal pathway: implications for Alzheimer's disease. **J. Neurochem.**, v. 65, p. 2165-9, 1995.

DOMBROWSKI, A. M.; JERKINS, A. A.; KAUFFMAN, F. C. Muscarinic receptor binding and oxidative activities in the adult rat superior cervical ganglion: Effects of 6-hydroxy-dopamine on nerve growth factor. **J. Neurosci.**, v. 3, p. 1963–70, 1983.

DUGAN, L. L.; CHOI, D. W. Hypoxic-ischemic brain injury and oxidative stress. In: Siegel, G. J.; Agranoff, B. W.; Albers, E. W.; Fisher, S. K.; Uhler, M. D. (eds.), **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**, 6th ed., Lippincott Williams & Wilkins, 1999, p. 722-3.

DUNN, J. Usuários de cocaína: Seus perfis, padrões de uso e comportamentos de risco para transmissão do vírus HIV [**Cocaine users: Their profiles, patterns of use and HIV risk behaviour**]. Doctoral thesis, Federal University of Sao Paulo, Brazil, 1999.

DUNWIDDIE, T. V.; PROCTOR, W. R.; TYMA, J. Local anaesthetic actions of cocaine: effects on excitatory and inhibitory synaptic responses in the hippocampus in vitro. **Brit. J. Pharmacol.**, v. 95, p. 1117–24, 1988.

EBADI, M.; SRINIVASAN, S. K.; BAXI, M. D. Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. **Prog Neurobiol.**, v. 48, p. 1-19, 1996.

EELLS, J. B.; CLOUGH, R. W.; BROWNING, R. A.; JOBE, P. C. Fos in locus coeruleus neurons following audiogenic seizure in the genetically epilepsy-prone rat: comparison to electroshock and pentylenetetrazol seizure models. **Neurosci Lett.**, v. 12, p. 21-4, 1997.

EGLIN, R. M. Muscarinic receptors and gastrointestinal tract smooth muscle function. **Life Sci.**, v. 68, p. 2573-8, 2001.

ELLENHORN, M. J.; BARCELOUX, D. G. **Diagnosis and treatment of human poisoning.** New York: Elsevier., 1998

ELLIOTT, R. C.; MILES, M. F.; LOWENSTEIN, D. H. Overlapping microarray profiles of dentate gyrus gene expression during development- and epilepsy-associated neurogenesis and axon outgrowth. **J. Neurosci.**, v. 23, p. 2218–27, 2003

ELLISON, G. The N-methyl-D-aspartate antagonists phencyclidine, ketamine and dizocilpine as both behavioral and anatomical models of the dementias. **Brain Res Brain Res Rev.**, v. 20, p. 250-67, 1995.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, J. R. V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 7, p. 88-95, 1961.

ENGEL JR., J. Excitation and inhibition in epilepsy. **Can. J. Neurol. Sci.**, v. 23, p. 167–74, 1996.

ESPEJO, E. F. Selective dopamine depletion within the medial prefrontal cortex induces anxyogenic-like effects in rats placed on the elevated plus maze. **Brain Res.**, v. 762, p. 281-4, 1997.

FANTEL, A. G.; PERSON, R. E. Involvement of mitochondria and other free radical sources in normal and abnormal fetal development. **Ann NY Acad Sci.**, v. 959, p. 424-33, 2002.

FARRAR, H. C.; KEARNS, G. L. Cocaine: clinical pharmacology and toxicology. **J. Pediatr.** v. 115, p. 665-75, 1989.

FEBO, M.; SEGARRA, A. C.; TENNEY, J. R.; BREVARD, M. E.; DUONGA, T. Q.; FERRIS C. F. Imaging cocaine-induced changes in the mesocorticolimbic dopaminergic system of conscious rats. **J. Neurosci. Met.**, v. 139, p. 167–76, 2004.

FEDELE, E.; RAITERI, M. *In vivo* studies of the cerebral glutamate receptor/NO/cGMP pathway. **Prog Neurobiol.**, v. 58, p. 89-120, 1999.

FELDMAN, R. S.; MEYER, J. S.; QUENZER, L. F. **Catecholamines, Principles of neuropsychopharmacology**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc, 1997 p. 277–344.

FENG, J.; CAI, X.; YAN, Z. Serotonin receptors modulate GABA A receptor channels through activation of anchored protein kinase C in prefrontal cortical neurons. **J. Neurosci.**, v. 21, p. 6502–11, 2001.

FERRARI-DILEO, G.; WAELBROECK, M.; MASH, D. C.; FLYNN, D. D. Selective labeling and localization of the M4 (m4) muscarinic receptor subtype. **Mol Pharmacol.**, v. 46, p. 1028–35, 1994.

FERREDELI, J. A.; BLANK, A. C.; GROSS, R. A. Relationship between seizure activity and cyclic nucleotide levels in brain. **Brain Res.**, v. 200, p. 93-103, 1980.

FERRI, C. P.; DUNN, J.; GASSOP, M.; LARANJEIRA, R. Factors associated with adverse reactions to cocaine among a sample of long-term, high-dose users in São Paulo, Brazil. **Addict Behav.**, v. 29, p. 365-74, 2004.

FEUCHT, T. E. **Drug Use Forecasting Annual Report**. US Department of Justice, Washington DC, 1995.

FISCHMAN, M. W. Cocaine and the amphetamines. In: **Psychopharmacology: The third Generation of Progress**. Meltzer, H. Y. (ed), Raven Press, New York, 1987, p. 1543-53.

FISCHER, J.; CHAO, A. Chemical release of dopamine from striatal homogenates: evidence for an exchange diffusion model. **J. Pharmacol. Exper. Ther.**, v. 208, p. 203–9, 1979.

FLEMENBAUM, A. Does lithium block the effects of amphetamine? A report of three cases. **Am J Psychiat.**, v. 131, p. 820-1, 1974.

FLORES-HERNANDEZ, J.; CÉPEDA, C.; HERNANDEZ-ECHEAGARAY, E.; CALVERT, C. R.; JOKEL, E. S.; FIENBERG, A. A.; GREENGARD, P.; LEVINE, M. S. Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D₁ receptors and DARPP-32. **J. Neurophysiol.**, v. 88, p. 3010-20, 2002.

FRAZER, A.; HENSLER J. G. Serotonin. In: Siegel G.J., Agranoff, B. W., Albers R. W., Fisher S. K., Uhler M. D. (eds.), **Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects**, Lippincott Williams and Wilkins, USA, 1999, p. 758.

FREED, W. J.; CANNON-SPOOR, H. E. A possible role of AA2 excitatory amino acid receptors in the expression of stimulant drug effects. **Psychopharmacol.**, v. 101, p. 456-64, 1990.

FREITAS, R. M.; NASCIMENTO, V. S.; VASCONCELOS, S. M. M.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B; FONTELES, M. M. F. Catalase activity in cerebellum, hippocampus, frontal cortex and striatum after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats. **Neurosci. Lett.**, v. 365, p. 102-5, 2004.

FREERKING, M.; NICOLL, R. A. Synaptic kainate receptors. **Curr Opin Neurobiol.**, v. 10, p. 342-51, 2000.

FREUD, S. Uber Coca, Secundararzt im k.k. Allgemeinen krankenhouse in Wien. Centralblatt fur die Gesellschaft Therapie 2, 289-314; reimpresso em inglês (1984), **J. Subst. Abuse Treat.**, v. 1, p. 206-17, 1884.

FREUD, S. Contributions about the applications of cocaine, second series, 1: Remarks on craving and fear of cocaine with reference to a lecture by W. A. Hammond (1887), In: **Sigmund Freud, Cocaine Papers**, Byck, R. (ed.), New York, Stonebill, 1974, p. 171-6.

FUCCI, N.; GIOVANNI, N. Adulterants encountered in illicit cocaine market. **Forens. Sci. Int.**, v. 95, p. 247-52, 1998.

GALDURÓZ, J. C. F.; NOTO, A. R.; NAPPO, S. A.; CARLINI, E. A. **I levantamento domiciliar sobre o uso de drogas. Parte A: estudo envolvendo as 24 maiores cidades do Estado de São Paulo – 1999**. Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas. Departamento de Psicobiologia da Escola Paulista de Medicina, 2000, 143p.

GALE, K. Role of the substantia nigra in the anticonvulsant actions of GABAergic drugs. In: Fariell, R. G.; Morsel, P. L.; Lloyd, K. G.; Quesney, L. F.; Engel, J. (eds.). **Neurotransmitters, Seizures and Epilepsy**, Raven Press, New York, 1984, p. 57.

GALLEANO, M.; PUNTARULO, S. Effect of mild iron overload on liver and kidney lipid peroxidation. **Braz J Med Biol Res.**, v. 27, p. 349-58, 1994.

GARATTINI, S.; CACCIA, S.; MENNINI, T. Notes on buspirone's mechanisms of action. **J Clin Psychiatry.**, v. 43, p. 19-24, 1982.

GARTHWAITE, J.; CHARLES, S. L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature**, v. 336, p. 385–88, 1988.

GASIOR, M.; CARTER, R. B.; GOLDBERG, S. R.; WITKIN, J. M. Anticonvulsant and behavioral effects of neuroactive steroids alone and in conjunction with diazepam. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 282, p. 543-53, 1997.

GASIOR, M.; CARTER, R. B.; WITKIN, J. M. Neuroactive steroids: potential therapeutic use in neurological and psychiatric disorders. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 20, p. 107– 12, 1999a.

GASIOR, M.; KAMINSKI, R.; WITKIN, J. M. Pharmacological modulation of GABA_B receptors affects cocaine-induced seizures in mice. **Psychopharmacol.**, v. 174, p. 211-9, 2004.

GASIOR, M.; UNGARD, J. T.; BEEKMAN, M.; CARTER, R. B.; WITKIN, J. M. Acute and chronic effects of the synthetic neuroactive steroid, ganaxolone, against the convulsive and lethal effects of pentylenetetrazol in seizure-kindled mice: comparison with diazepam and valproate. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 1184– 96, 2000a.

GASIOR, M.; UNGARD, J. T.; WITKIN, J. M. Chlormethiazole: effectiveness against toxic effects of cocaine in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 295, p. 153– 61, 2000b.

GASIOR, M.; UNGARD, J. T.; WITKIN, J. M. Preclinical evaluation of newly approved and potential antiepileptic drugs against cocaine-induced seizures. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 290, p. 1148– 56, 1999b.

GASPAR, P.; CLOCK, B.; LE MOINE, C. D₁ and D₂ receptor gene expression in the rat frontal cortex: cellular localization in different classes of efferent neurons. **Eur. J. Neurosci.**, v. 7, p. 1050-63, 1995.

GAWIN, F. H.; ELLINWOOD, E. H. Cocaine and other stimulants: Actions, abuse and treatment. **New Engl J Med.**, v. 318, p. 1173-82, 1988.

GAY, G. R. Clinical management of acute and chronic cocaine poisoning. **Ann. Emerg. Med.**, v. 11, p. 562-572, 1982.

GAY, G. R. The deadly delights of cocaine. **Emergency Medicine**, v. 2, p. 67-81, 1983.

GAY, G. R. You've come a long way baby! Coke time for the new American lady of the eighties. **J. Psychoactive Drugs**, v. 13, p. 281-18, 1981.

GAYKEMA, R. P.; LUITEN, P. G.; NYAKAS, C.; TRABER, J. Cortical projection patterns of the medial septum-diagonal band complex. **J. Comp. Neurol.**, v. 293, p. 103-24, 1990.

GELBARD, H. A.; APPLGATE, C. D. Persistent increases in dopamine D₂ receptors mRNA expression in basal ganglia following kindling. **Epilepsy Res.**, v. 17, p. 23-9, 1994.

GELLMAN, R. L.; AGHAJANIAN, G. K. Serotonin₂ receptor-mediated excitation of interneurons in piriform cortex: antagonism by atypical antipsychotic drugs. **Neuroscience**, v. 58, p. 515-25, 1994.

GEORGE, F. R. Cocaine toxicity: genetic evidence suggests different mechanisms for cocaine-induced seizures and lethality. **Psychopharmacol.**, v. 104, p. 307-11, 1991.

GERBER, D. J.; SOTNIKOVA, T. D.; GAINETDINOV, R. R.; HUANG, S. Y.; CARON, M. G.; TONEGAWA, S. Hyperactivity, elevated dopaminergic transmission, and response to amphetamine in M1 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, p. 15312-7, 2001.

GERFEN, C. R. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. **Annu Rev Neurosci.**, v. 15, p. 285-320, 1992.

GIANNINI, A. J.; BILLET, W.; MALONE, D. A.; GIANNINI, J. C.; PRICE, W. A.; LOISELLE, R. H. Treatment of depression in chronic cocaine and phencyclidine abuse with desipramine. **J Clin Pharmacol.**, v. 26, p. 211-4, 1986.

GIANINI, A. J.; LOISELLE, R. H.; GRAHAM, B. H.; FOLTS, D. J. Behavioral response to bupirone in cocaine and phencyclidine withdrawal. **J Subst Abuse Treatment**, v. 10, p. 523-7, 1993.

GILBERT, H. F; LEAN, V. M. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.**, v. 63, p. 69-172, 1990.

GINGRICH, J. A.; CARON, M. G. Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. **Annu Rev Neurosci.**, v. 16, p. 299-321, 1993.

GOEDERS, N.E. Cocaine differentially affects benzodiazepine receptors in discrete regions of the rat brain: persistence and potential mechanisms mediating these effects. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 259, p. 574-81, 1991.

GOLDLIN, C.; BOELSTERLI, U. A. Dissociation of covalent protein adduct formation from oxidative injury in cultured hepatocytes exposed to cocaine. **Xenobiotica**, v. 24, p. 251-64, 1994.

GOLDMAN, M. J.; GRINSPOON, L.; HUNTER-JONES, S. Ritualistic use of fluoxetine by a former substance abuser. **Am. J. Psychiatry**, v. 147, p. 1377, 1990.

GOLUB, A.; JOHNSON, B. D. **Crack's decline: some surprises across US cities**. Research in brief . Washington, DC: US Department of Justice, National Institute of Justice, 1997.

GOMEZA, J.; SHANNON, H.; KOSTENIS, E.; FELDER, C.; ZHANG, L.; BRODKIN, J.; et al. Pronounced pharmacologic deficits in M2 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 96, p. 1692-7, 1999a.

GOMEZA, J.; ZHANG, L.; KOSTENIS, E.; FELDER, C.; BYMASTER, F.; BRODKIN, J.; et al. Enhancement of D1 dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M(4) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 96, p. 10483-8, 1999b.

GONZALES, R. A.; JAWORSKI, J. N. Alcohol and glutamate. **Alcohol. Health Res World.**, v. 21, p. 120-7, 1997.

GORELICK, D. A.; PAREDES, A. Effect of fluoxetine on alcohol consumption in male alcoholics. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 16, p. 261-5, 1992.

GRACE, A. A. Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. **Neuroscience**, v. 41, p. 1-24, 1991.

GRANDY, D. K.; ZHANG, Y. A.; BOUVIER, C.; ZHOU, Q. Y.; JOHNSON, R. A.; ALLEN, L.; BUCK, K.; BUNZOW, J. R.; SALON, J.; CIVELLI, O. Multiple human D5 dopamine receptor genes: a functional receptor and two pseudogenes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 88, p. 9175-9, 1991.

GREEN, L. C.; TANNEMBAUN, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, p. 56-8, 1981.

GROBIN, A. C.; DEUTCH, A. Y. Dopaminergic regulation of extracellular gamma-aminobutyric acid levels in the prefrontal cortex of the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 285, p. 350-7, 1998.

GROENEWEGEN, H. J.; BERENDSE, H. W.; WOLTERS, J. G.; LOHMAN, A. H. M. The anatomical relationship of the prefrontal cortex with the striatopallidal system, the thalamus, and the amygdala: evidence for a parallel organization. **Prog. Brain Res.**, v. 85, p. 95-118, 1990.

GUERCE, D. E.; MILON, A. H. Serotonin and dopamine afferents to the locus coeruleus: a biochemical study after lesioning of the ventral mesencephalic tegmental A-10 region and the raphe dorsalis. **Brain Res.**, v. 263, p. 344-7, 1983.

HALLIWELL B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J. Neurochem.**, v. 59, p. 1609-23, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol.**, v. 186, p.1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine**. 3th edition. Oxford University Press. New York, 1999

HALLMAN, H.; JOSSON, G. Neurochemical studies on central dopamine neurons-regional characterization of dopamine turnover. **Med. Biol.**, v. 62, p. 209, 1984.

HAMILTON, S. E.; LOOSE, M. D.; LEVEY, A. I.; HILLE, B.; MCKNIGHT, G. S. et al. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 94, p.13311-6, 1997.

HAMILTON, S. E.; NATHANSON, N. M. The M1 receptor is required for muscarinic activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in murine cerebral cortical neurons. **J Biol Chem**, v. 276, p. 15850–5, 2001.

HANSON, G. R.; JENSEN, M.; JOHNSON, M.; WHITE, S. Distinct features of seizures induced by cocaine and amphetamine analogs. **Eur. J. Pharmacol.** v. 377, p. 167-173, 1999.

HARGRAVE, B. Y.; TIANGCO, D. A; LATTANZIO, F. A; BEEBE, S. J. Cocaine, not morphine, causes the generation of reactive oxygen species and activation of NF-kappaB in transiently cotransfected heart cells. **Cardiovasc Toxicol**, v.3, p.141-51, 2003.

HATHERILL, J. R.; TILL, G. O.; WARD, P. A. Mechanisms of oxidant induced changes in erythrocytes. **Agents-Actions**, v. 32, p.351-8, 1991.

HAYES, S. N.; MOYER, T. P.; MORLEY, D.; BOVE, A. A. Intravenous cocaine causes epicardial coronary vasoconstriction in the intact dog. **Am Heart J.**, v. 121, p.1639-48, 1991.

HEBBEL, R. P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **J Lab Clin Med**, v.107, p. 401-4, 1986.

HEIKKILA, R. E.; ORLANSKY, H.; COHEN, G. Studies on the distinction between uptake inhibition and release of [3H] dopamine in rat brain tissue slices. **Biochem. Pharmacol.**, v. 24, p. 847-52, 1975.

HEIMER, L.; ZAHM, D. S.; ALHEID, G. F. Basal ganglia. In: Paxinos, G. (ed.), **The rat nervous system**. Academic Press, New York, 1995, p. 579-628.

HENZE, D. A.; GONZALEZ-BURGOS, G. R.; URBAN, N. N.; LEWIS, D. A, Barrionuevo G. Dopamine increases excitability of pyramidal neurons in primate prefrontal cortex. **J Neurophysiol.**, v. 84, p. 2799-809, 2000.

HERBERG, L. J.; GROTTICK, A.; ROSE, I.C. Nitric oxide synthesis, epileptic seizures and kindling. **Psychopharmacol.**, v. 119, p. 115–23, 1995.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Semin Hematol.**, v. 26, p.277-85, 1989.

HEVEL, J. M.; MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase assays. **Methods Enzymol.**, v. 233, p. 250–8, 1994.

HIGASHIMA, M.; OHNO, K.; KOSHINO, Y. Cyclic AMP-mediated modulation of epileptiform afterdischarge generation in rat hippocampal slices. **Brain Res.**, v. 949, p.157-61, 2002.

HIRAMATSU, M. K.; OGAWA, K.; KABUTO, H.; MORI, A. Reduced uptake and release of 5-hydroxytryptamine and taurine in the cerebral cortex of epileptic El mice. **Epilepsy Res.** 1, 40–44, 1987.

HOFFMAN, D. A.; JOHNSTON, D. Downregulation of transient K channels in dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons by activation of PKA and PKC. **J. Neurosci**, v. 18, p. 3521–3528, 1998.

HOFFMAN, D. A.; MAGEE, J. C.; COLBERT, C. M.; JOHNSTON, D. K channel regulation regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. **Nature**, v. 387, p. 869-75, 1997.

HOUAMED, K. M.; KUIJPER, J. L.; GILBERT, T. L.; HALDEMAN, B. A.; O'HARA, P. J.; MULVIHILL, E. R.; ALMERS, W.; HAGEN, F. S. Cloning, expression, and gene structure of a G protein-coupled glutamate receptor from rat brain. **Science**, v. 252, p.1318-21, 1991.

HOUSER, C. R.; CRAWFORD, G. D.; SALVATERRA, P. M.; VAUGHN, J. E. Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase in rat cerebral cortex: a study of cholinergic neurons and synapses. **J. Comp. Neurol.**, v.234, p. 17-34, 1985.

HOYER, D.; MARTIN, G. 5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome. **Neuropharmacol.**, v. 36, p. 419–28, 1997.

<http://cocaine.org/coca-cola/>. Acesso: 22/06/2005. Coca-Cola Bottling of Shreveport, Inc., et al., vs. The Coca-Cola Company, a Delaware Corporation, 769 F.Supp.671

<http://pharma1.med.osaka-u.ac.jp/textbook/Anticonvulsants/Anticonvulsants.html>. Data de acesso: 05/05/2005

<http://www.loc.gov/exhibits/freud/freud01.html>. Data de acesso: 23/09/2005.

HUANG, C. L.; HUANG, N. K.; SHYUE, S. K.; CHERN, Y. Hydrogen peroxide induces loss of dopamine transporter activity: a calcium-dependent oxidative mechanism. **J. Neurochem.**, v. 86, p. 1247-59, 2003.

HUANG, Y. Y.; KANDEL, E. R. D₁/D₅ receptor agonists induce a protein synthesis-dependent late potentiation in the CA₁ region of the hippocampus. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.92, p. 2446-50, 1995.

HUANG, S. H.; LEONARD, S.; SHI, X.; GOINS, M. R.; VALLYATHAN, V. Antioxidant activity of lazaroid (U-75412E) and its protective effects against crystalline silica-induced cytotoxicity. **Free Radic Biol Med.**, v. 24, p. 529-36, 1998.

HUANG, N.-K.; WAN, F. J.; TSENG, C. J.; TUNG, C. S. Amphetamine induces hydroxyl radical formation in the striatum of rats. **Life Sci.**, v. 61, p. 2219–29, 1997.

HURD, Y. L.; KEHR, J.; UNGERSTEDT, U. In vivo microdialysis as a technique to monitor drug transport: correlation of extracellular cocaine levels and dopamine overflow in the rat brain. **J. Neurochem.**, v. 51, p. 1314–6, 1988.

IADAROLA, M. J.; GALE, K. Substantia nigra: site of anticonvulsant activity mediated by GABA. **Science**, v. 218, p. 1237, 1982.

ITZHAK, Y.; ALI, S. F. Effect of ibogaine on the various sites of the NMDA receptor complex and sigma binding sites in rat brain. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 844, p. 245-51, 1998.

ITZHAK, Y. Attenuation of cocaine kindling by 7-nitroindazole, an inhibitor of brain nitric oxide synthase. **Neuropharmacol.**, v. 35, p.1065-73, 1996.

ITZHAK, Y.; STEIN, I. Sensitization to the toxic effects of cocaine in mice associated with regulation of N-methyl-D-aspartate receptors in the cortex. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 262, p. 464-70, 1992.

IYER RN, BRADBERRY CW. Serotonin-mediated increase in prefrontal cortex dopamine release: Pharmacological characterization. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 277, p. 40–7, 1996.

JACINTHO, J. D.; KOVACIC, P. Neurotransmission and neurotoxicity by nitric oxide, catecholamines, and glutamate: unifying themes of reactive oxygen species and electron transfer. **Curr Med Chem**, v. 10, p.2693-703, 2003.

JACKSON, H. C.; BALL, D. M.; NUTT, D. J. Noradrenergic mechanisms appear not to be involved in cocaine-induced seizures and lethality. **Life Sci.** v. 47, p. 353-9, 1990.

JACKSON, A.; MEAD, A. N.; ROCHA, B. A.; STEPHENS, D. N. AMPA receptors and motivation dor drug: effect of the selective antagonist NBQX on behavioral sensitization and on self-administration in mice. **Behav. Pharmacol.** v. 9, p. 457-67, 1998.

JANOWSKY, A.; NEVE, K. A.; O'TOOLE, L. A.; BELKNAP, J. K.; APPLGATE, C. D. Amygdala kindling alters striatal and extrastriatal dopamine D₂ receptors regulation unilaterally. **Abstr-Soc. Neurosci.**, v. 17, p. 611, 1991.

JATLOW, P.; BARASH, P. G.; VAN DYKE, C.; RADDING, J.; BYCK, R. Cocaine and succinylcholine sensitivity: A new caution. **Anesth. Analg.** v. 58, p. 235-8, 1979.

JAYAKUMAR, A. R.; SUJATHA, R.; PAUL, V.; PUVIARASAN, K.; JAYAKUMAR, R. Involvement of nitric oxide and nitric oxide synthase activity in anticonvulsive action. **Brain Res. Bull.**, v. 48, p.387-94; 1999.

JELENKOVIC, A.; JOVANOVIC, M.; NINKOVIC, M.; MAKSIMOVIC, M.; BOKONJIC, D.; BOSKOVIC, B.. Nitric oxide (NO) and convulsions induced by pentylentetrazol. **Ann N Y Acad. Sci.**, v. 962, p. 296-305, 2002.

JOHNSTON, D.; HOFFMAN, D. A.; POOLOS, N. P. Potassium channels and dendritic function in hippocampal pyramidal neurons. **Epilepsia**, v. 41, p. 1072-3, 2000.

JONES, D. N. C.; HOLTZMAN, S. G. Influence of naloxone upon motor activity induced by psychomotor stimulant drugs. **Psychopharmacol.**, v. 114, p. 215-24, 1994.

JONSSON, S.; O'MEARA, M.; YOUNG, J. B. Acute cocaine poisoning: Importance of treating seizures and acidosis. **Am. J. Med.**, v. 75, p. 1061-4, 1983.

KABUTO, H.; YOKOI, I.; OGAWA, N. Melatonin inhibits iron-induced epileptic discharges in rats by suppressing peroxidation. **Epilepsia**, v. 39, p. 237-43, 1998.

KAMISAKI, Y.; WADA, K.; NAKAMOTO, K.; ITOH, T. Nitric oxide inhibition of the depolarization-evoked glutamate release from synaptosomes of rat cerebellum. **Neurosci Lett.**, v.194, p. 5-8, 1995.

KARLER, R.; CALDER, L. D.; BEDINGFIELD, J. B. Cocaine behavioral sensitization and excitatory amino acids. **Psychopharmacol.**, v. 115, p. 305–10, 1994.

KAWAHARA, H.; KAWAHARA, Y.; WESTERINK, B. H. The noradrenaline–dopamine interaction in the rat medial prefrontal cortex studied multi-probe microdialysis. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 418, p. 177-86, 2001.

KERWIN, R.; NAYLOR, R.; TRAVIS, M. J.; SIMONS, O.; MOORE, P. K. As drogas e o sistema nervoso. In: Page, C. P., Curtis, M. J., Sutter, M. C., Walker, M. J. A., Hoffman, B. B. (eds) **Farmacologia Integrada**, Editora Manole, 1999, p. 103.

KESSLER, R. M.; ANSARI, M. S.; SCHMIDT, D. E.; DE PAULIS, T.; CLANTON, J. A.; INNIS, R.; TIKRITI, M.; MANNING, R. G.; GILLESPIE, D. High affinity dopamine D₂ receptors. **Life Sci.**, v. 49, p. 617-29, 1991.

KILIAN, M.; FREY, H. H. Central monoamines and convulsive thresholds in mice and rats. **Neuropharmacol.**, v. 12, p.681, 1973.

KLOSS, M. W.; ROSEN, G. M.; RAUCKMAN, E. U. Biotransformation of norcocaine to norcocaine nitroxide by rat brain microsomes. **Psychopharmacol.**, v. 84, p.221-4, 1984.

KLOSS, M. W.; ROSEN, G. M.; RAUCKMAN, E. J. Evidence of enhanced in vivo lipid peroxidation after acute cocaine administration. **Toxicol Lett**, v. 15, p. 65-70, 1983.

KOEK, W.; COLPAERT, F. C.; WOODS, J. H.; KAMENKA, J. M. The phencyclidine (PCP) analog N-[1-(2-benzo(B)thiophenyl) cyclohexyl]piperidine shares cocaine-like but not other characteristic behavioral effects with PCP, ketamine and MK-801. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 250, p. 1019-27, 1989.

KOGA, E.; MOMIYAMA, T. Presynaptic dopamine D₂-like receptors inhibit excitatory transmission onto rat ventral tegmental dopaminergic neurones. **J. Physiol.**, v. 523, p. 163-73, 2000.

KOLACHANA, B. S.; SAUNDERS, R. C.; WEINBERGER, D. R. Augmentation of prefrontal cortical monoaminergic activity inhibits dopamine release in the caudate nucleus: an in vivo neurochemical assessment in the rhesus monkey. **Neuroscience**, v. 69, p. 859–68, 1995.

KOLB, B. Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. **Brain Res. Rev.**, v. 8, p. 65-98, 1984.

KOOB, G. F. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. **Trends Pharmacol Sci**, v. 13, p. 177-84, 1992.

KOOB, G. F.; BLOOM, F. E. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. **Science**, v. 242, p. 715-23, 1988.

KORF, J.; VENEMA, K. Amino acids in rat striatal dialysates: methodological aspects and changes after electroconvulsive shock. **J Neurochem.**, v. 45, p. 1341-8, 1985.

KORNHUBER, J.; WELLER, M. Psychotogenicity and N-methyl-D-aspartate receptor antagonism: Implications for neuroprotective pharmacotherapy. **Biological and Psychiatry**, v. 41, p. 134-44, 1997.

KOVACIC, P. Role of oxidative metabolites of cocaine in toxicity and addiction: oxidative stress and electron transfer. **Med Hypotheses**, v. 64, p. 350-6, 2005.

KOVACIC, P.; AMES, J. R.; JAWDOSIUK, M.; RYAN, M. D. Electron transfer mechanism for cocaine action. In: Dryhurst G, Niki K, editors. **Redox chemistry and interfacial behavior of biological molecules**. New York: Plenum Press; 1988. p. 323–31.

KOVACIC, P.; BECVAR, L. E. Mode of action of anti-infective agents: focus on oxidative stress and electron transfer. **Curr Pharma Des.**, v. 6, p. 143-67, 2000.

KOVACIC, P.; JACINTHO, J. D. Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer. **Curr Med Chem**, v. 8, p. 733-96, 2001.

KOVACIC, P.; SACMAN, A.; WU-WEIS, M. Nephrotoxins: widespread role of oxidative stress and electron transfer. **Curr Med Chem**, v. 9, p. 823-47, 2002.

KRAMER, L. D.; LOCKE, G. E.; AGUNYEMI, A.; NELSON, L. Cocaine related seizures in adults. **Am. J. Drug Alcohol Abuse**, v. 16, p. 309-17; 1990.

KUHAR, M. J.; COUCEYRO, P. R.; LAMBERT P. D. Catecholamines. In: Siegel, G. J., Agranoff, B. W., Albers, R. W., Fisher, S. K., Uhler, M. D. (eds.) **Basic Neurochemistry**.

Molecular, Cellular and Medical aspects. 6th edition. Lippincott Williams & Wilkins, 1999, p. 243.

KUPFERMANN, I.; KANDEL, E. R.; IVERSEN, S. Motivational and addictive states. In: KANDEL, ER, SCHWARTZ, JH, JESSELL, T. M. (eds.), **Principles of Neural Sciences**, McGraw-Hill, New York, pp. 998–1013, 2000.

KURACHI, M.; YASUI, S.; KURACHI, T.; SHIBATA, R.; MURATA, M.; HAGINO, H.; TANII, Y.; KURATA, K.; SUZUKI, M.; SAKURAI, Y. Hypofrontality does not occur with 6-hydroxydopamine lesions of the medial prefrontal cortex in rat brain. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v. 5, p. 63–8, 1995.

LABIB, R.; TURKALL, R.; ABDEL-RAHMAN, M. S. Endotoxin potentiates cocaine-mediated hepatotoxicity by nitric oxide and reactive oxygen species. **Int J Toxicol**, v. 22, p. 305-16, 2003.

LACROIX, L.; BROERSEN, L. M.; WEINER, I.; FELDON, J. The effects of pyramidal cells of the medial prefrontal cortex on latent inhibition, prepulse inhibition, food hoarding, elevated plus maze, active and locomotor activity in the rat. **Neuroscience**, v. 88, p. 431-42, 1998

LANCASTER, F. E. Alcohol, nitric oxide, and neurotoxicity: is there a connection? A review. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 16, p. 539-41, 1992.

LANG, A. E.; LOZANO, A. M. Parkinson's disease. First of two parts. **N Engl J Med.**, v. 339, p. 1044-53, 1998.

LANG, A. E.; LOZANO, A. M. Parkinson's disease. Second of two parts. **N Engl J Med**, v. 339, p. 1130-43, 1998.

LASON, W. Neurochemical and pharmacological aspects of cocaine-induced seizures. **Pol J Pharmacol**, v. 53, p. 57-60, 2001.

LAVIN, A.; GRACE, A. A. Stimulation of D1-type dopamine receptors enhances excitability in prefrontal cortical pyramidal neurons in statedependent manner. **Neuroscience**, v. 104, p. 335-46, 2001.

LEE, Y. W.; HENNIG, B.; FIALA, M.; KIM, K. S.; TOBOREK, M. Cocaine activates redox-regulated transcription factors and induces TNF- α expression in human brain endothelial cells. **Brain Res.**, v. 920, p. 125-33, 2001.

LEE, K.; KORNETSKY, C. Acute and chronic fluoxetine treatment decreases the sensitivity of rats to rewarding brain stimulation. **Pharmacol. Biochem. Beh.**, v. 60, p. 539-44, 1998.

LEIST, M.; NICOTERA, P. Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. **Exp. Cell Res.**, v. 239, p. 183-201, 1998.

LE MOAL, M.; SIMON, H. Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. **Physiol Rev.**, v. 71, p. 155-234, 1991.

LEVINE, M. S.; ALTEMUS, K. L.; CÉPEDA, C.; CROMWELL, H. C.; CRAWFORD, C.; ARIANO, M. A.; DRAGO, J.; SIBLEY, D. R.; WESTPHAL, H. Modulatory actions of dopamine on NMDA receptor-mediated responses are reduced in D1A-deficient mutant mice. **J. Neurosci.**, v. 16, p. 5870–82, 1996a.

LEVINE, M. S., LI, Z., CÉPEDA, C., CROMWELL, H.C., ALTEMUS, K. L., 1996b. Neuromodulatory actions of dopamine on synaptically-evoked neostriatal responses in slices. **Synapse**, v. 24, p. 65–78, 1996b.

LEWIN, N. A.; GOLDFRANK, L. R.; WEISMAN, R. S. Cocaine. In: Goldfrank's **Toxicology Emergencies**, ed. by L. R. Goldfrank, N. E. Flomenbaum, N. A. Lewin, R. S. Weisman, M. A. Howland 4th ed., Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1990, p. 499-508.

LEWIS, D. A.; MORRISON, J. H. Noradrenergic innervation of monkey prefrontal cortex: a dopamine β -hydroxylase immunohistochemical study. **J. Comp. Neurol.**, v. 282, p. 371-73, 1989.

LI, Y.; VARTANIAN, A. J.; WHITE, F. J.; XUE, C. J.; WOLF, M. E. Effects of the AMPA receptor antagonist NBQX on the development and expression of behavioral sensitization to cocaine and amphetamine. **Psychopharmacology**, v. 134, p. 266-76, 1997.

LIBET, B.; GLEASON, G. A.; WRIGHT, E. W., FEINSTEIN, B. Suppression of an epileptiform type of electrical activity in the rat by stimulation of the locus coeruleus. **Epilepsia**, v.18, p. 451-62, 1977.

LIMA, V. T.; MACÊDO, D. S.; NOGUEIRA, C. R.; VASCONCELOS, S. M.; VIANA, G. S.; SOUSA, F. C. F. Buspirone increases D2-like dopaminergic receptors density in rat corpus striatum. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 60, p. 38-40, 2002.

LIPTON, S.A.; CHOI, Y.-B.; SUCHER, N. J.; CHEN, H.-S.V. Neuroprotective versus neurodestructive effects of NO-related species. **BioFactors**, v. 8, p. 33–40, 1998.

LIPTON, J. W.; GYAWALI, S.; BORYS, E. D.; KOPRICH, J. B.; PTASZNY, M.; MCGUIRE, S. O. Prenatal cocaine administration increases glutathione and alpha-tocopherol oxidation in fetal rat brain. **Develop. Brain Res.**, v. 147, p. 77– 84, 2003.

LLOYD, R. V.; SHUSTER, L.; MASON, R. P. Reexamination of the microsomal transformation of N-hydroxynorcocaine to norcocaine nitroxide. **Mol Pharmacol**, v. 43, p. 645-8, 1993.

LOPES-ARTIGUEZ, M.; CAMEÁN, A.; REPPETO, M. Unequivocal identification of several common adulterants and diluents in street samples of cocaine by infrared spectrophotometry. **J. Forensic Sci.**, v. 40, p. 602–10, 1995.

LOUIE, A. K.; LANNON, R. A.; RUTZICK, E. A.; BROWNE, D.; LEWIS, T. B.; JONES, R. Clinical features of cocaine-induced panic. **Biol Psychiatry**, v. 40, p. 938-40, 1996.

LOWENSTEIN, D. H.; BASSA, S. M.; ROWBOTHAM, M. C, et al. Acute neurologic and psychiatric complications associated with cocaine abuse. **Am J Med**, v. 83, p. 841-6, 1987.

LOWENSTEIN, D. H.; BLECK, T.; MACDONALD, R. L. It's time to revise the definition of status epilepticus. **Epilepsia**, v. 40, p. 120-2, 1999.

LOWRY, H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurements with the folin phenol reagent. **J. Biol Chem.** 1951;193: 265–275.

LUMME, A.; VANHATALO, S.; SADENIEMI, M.; SOINILA, S. Expression of nitric oxide synthase in hypothalamic neurons following axonal injury or colchicine treatment. **Exp. Neurol.**, v. 144, p. 248–57, 1997.

MACÊDO, D. S.; CORREIA, E. E.; VASCONCELOS, S. M. M.; AGUIAR, L. M. V.; VIANA, G. S. B.; SOUSA, F. C. F. Cocaine treatment causes early and long-lasting changes in muscarinic and dopaminergic receptors. **Cell Molec Neurobiol**, v. 24, p. 129-36, 2004a.

MACÊDO, D. S.; SANTOS, R. S.; BELCHIOR, L. D.; ANDRADE-NETO, M.; VASCONCELOS, S. M. M.; LIMA, V. T. M.; FONTELES, M. M. F.; VIANA, G. S. B.; SOUSA, F. C. F. Effect of anxiolytic, antidepressant and antipsychotic drugs on cocaine-induced seizures and mortality. **Epilepsy Beh.** v. 5, p. 852-6, 2004c.

MACÊDO, D. S.; SOUSA, F. C. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; LIMA, V. T. M.; VIANA, G. S. B. Different times of withdrawal from cocaine administration cause changes in muscarinic and dopaminergic receptors in rat premotor cortex. **Neurosci Lett**, v. 312, p. 129-32, 2001.

MACEDO, D. S.; VASCONCELOS, S. M. M.; BELCHIOR, L. D.; SANTOS, R. S.; VIANA, G. S. B.; SOUSA, F. C. F. Alterations in monoamine levels after cocaine-induced status epilepticus and death in striatum and prefrontal cortex of mice. **Neuroscienc Lett**, v. 362, p. 185-8, 2004b.

MACGINTY, J. F. Introduction to the role of excitatory amino acids in the action of abused drugs: a symposium presented at the 1993 annual meeting of the College on problem of drug dependence. **Drug Alcohol Depend.**, v. 37, p. 91-4, 1995.

MACHADO, A. B. M. **Neuroanatomia funcional**. 2^a ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

MADRAS, B. K.; FAHEY, M. A.; BERGMAN, J.; CANFIELD, D. R.; SPEALMAN, R. D.; Effects of cocaine and related drugs in nonhuman primates: I. [³H]cocaine binding sites in caudate-putamen. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 251, p. 131-41, 1989.

MAEHLY, A. C.; CHANCE, B. The assay of catalases and peroxidases. **Methods Biochem Anal.**, v. 1, p. 357-424, 1954.

MAGGOS, C. E.; TSUKADA, H.; KAKIUCHI, T.; NISHIYAMA, S.; MYERS, J. E.; KREUTER, J.; SCHLUSSMAN, S. D.; UNTERWALD, E. M.; HO, A.; KREEK, M. J. Sustained withdrawal allows normalization of in vivo [¹¹C]N-methylspiperone dopamineD2 receptor binding after chronic binge cocaine: A positron emission tomography study in rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 19, p. 146-53, 1998.

MAMONAS, L. A.; WILSON, M. A.; AXT, K. J.; MOLLIVER, M. E. Morphological aspects of serotonergic innervation. In P. B. Bradley, S. L. Handley, S. J. Cooper, B. J. Key, N. M. Barnes, J. H. Coote (Eds.), **Serotonin, CNS Receptors and Brain Function**, vol. 85, Pergamon, Oxford, 1992, pp. 97-118.

MAREK, G. J.; AGHAJANIAN, G. K. Excitation of interneurons in piriform cortex by 5-hydroxytryptamine: blockade by MDL 100,907, a highly selective 5-HT_{2A} receptor antagonist. **Eur J Pharmacol.**, v. 259, p. 137-41, 1994.

MAREK, G. J.; AGHAJANIAN, G. K. 5-Hydroxytryptamine-induced excitatory postsynaptic currents in neocortical layer V pyramidal cells: suppression by mu-opiate receptor activation, **Neuroscience**, v. 86, p. 485-97, 1998.

MAREK, G. J.; WRIGHT, R. A.; SCHOEPP, D. D.; MONN, J. A.; AGHAJANIAN, G. K. Physiological antagonism between 5-hydroxytryptamine and group II metabotropic glutamate receptors in prefrontal cortex. **J. Pharmacol. Exper. Ther.** v. 292, p. 76-87, 2000.

MARGOLIS, R.; CHUANG, D.-M.; DICK, D.; WEISS, S. R. B.; POST, R. M.. Effect of cocaine, lidocaine kindling and carbamazepine on batrachotoxininduced phosphoinositide hydrolysis in rat brain slices. **Brain Res**, v. 614, p. 185–90, 1993.

MASH, D. C.; STALEY, J. K.; PABLO J. P.; HOLOHEAN, A. M.; HACKMAN, J. C.; DAVIDIFF, R. A. Properties of ibogaine and its principal metabolite (12-hydroxyibogamine) at the MK-801 binding site of the NMDA receptor complex. **Neurosci. Lett**, v. 192, p. 53-6, 1995.

MASINI, E.; DI BELLO, M. G.; CAPPUGI, P.; BERNI, L.; MIRABELLA, C.; MANNAIONI, P. F. Platelet aggregation and platelet histamine release by immunological stimulation in atopic patients: modulation by nitric oxide. **Inflamm Res.**, v. 46, p. S81-2, 1997. Errata em: **Inflamm Res**, v. 46, p. 373, 1997.

MASON, S.T.; CORCORAN, M.E. Catecholamines and convulsions. **Brain Res.**, v. 170, p. 497-507, 1979.

MASSOULIÉ, J.; PEZZEMENTI, L.; BON, S.; KREJCI, E.; VALLETE, F. M. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Prog. Neurobiol.** v. 41, p. 31-91, 1993.

MASU, M.; TANABE, Y.; TSUCHIDA, K.; SHIGEMOTO, R.; NAKANISHI, S. Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. **Nature**, v. 349, p. 760- 5, 1991.

MATSUI, M.; MOTOMURA, D.; KARASAWA, H.; FUJIKAWA, A. T.; JIANG, J.; KOMIYA, Y. et al. Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M₃ subtype. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 97, p. 9579-84, 2000.

MATSUMOTO, R. R.; BRACKETT, R. L.; KANTHASAMY, A. G. Novel NMDA/glycine site antagonists attenuate cocaine-induced behavioral toxicity. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 338, p. 233-242, 1997.

MATSUMOTO, M.; TOGASHI, H.; MORI, K.; UENO, K.; MIYAMOTO, A.; YOSHIOKA, M. Characterization of endogenous serotonin-mediated regulation of dopamine release in the rat prefrontal cortex. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 383, p. 39-48, 1999.

MATSUMOTO, M.; YOSHIOKA, M.; TOGASHI, H.; MORI, K.; UENO, K.; SAITO, H. Effects of idazoxan on dopamine release in the prefrontal cortex of freely moving rats. **Eur J Pharmacol**, v. 343, p. 165-170, 1998

MAYER, M. L.; MILLER, R. J. Excitatory amino acid receptors, second messengers and regulation of intracellular Ca^{+2} in mammalian neurons. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 11, p. 254-60, 1990

MAYES, P. A. Biologic oxidation. In: Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayes, P. A.; Rodwell, V. W. (eds): **Harper's biochemistry**. San Mateo, Appleton & Lange, 1990; 105-11.

MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G. Amino acid neurotransmitters. In: G. Siegel, B. Agranoff, R. W. Albers, P. Molinoff (eds.), **Basic Neurochemistry**, 4th ed. New York: Raven Press, 1989, p. 311-332.

MCNAUGHT, K. S.; BROWN, G. C. Nitric oxide causes glutamate release from brain synaptosomes. **J Neurochem.**, v. 70, p. 1541-6, 1998.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annu Rev Biochem**, v. 52, p. 711-60, 1983.

MELDRUM, B. S. Epilepsy and gamma-aminobutyric acid-mediated inhibition. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 17, p. 1-36, 1975.

MELDRUM, B.; CHAPMAN, A. Epileptic seizures and epilepsy. In: Siegel G.J.; Agranoff, B. W.; Albers R. W.; Fisher S. K.; Uhler M. D. (eds.), **Basic Neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects**, Lippincott Williams and Wilkins, United States of America, p. 758, 1999.

MELTZER, H. Y.; MATSUBARA, S.; LEE, J. C. Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D_1 - and D_2 - and serotonin 2 pK1 values. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 251, p. 238-46, 1989.

MERRIAM, A. E.; MEDALIA, A.; LEVINE, B. Partial complex status epilepticus associated with cocaine abuse. **Biol Psychiatry**, v. 23, p. 515-8, 1988.

MESSENGER, M. J.; DAWSON, L.G.; DUTY, S. Changes in metabotropic glutamate receptor 1 – 8 gene expression in the rodent basal ganglia motor loop following lesion of the nigrostriatal tract. **Neuropharmacology**, v. 43, p. 261– 71, 2002.

MICHIELS, C.; RAES, M.; TOUSSAINT, O.; REMACLE, J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 17, p. 235-48, 1994.

MIDDLETON, F. A.; STRICK, P. L. Basal-ganglia ‘projections’ to the prefrontal cortex of the primate. **Cereb Cortex**, v. 12, p. 926-35, 2000.

MIDDLETON, F. A.; STRICK, P. L. The temporal lobe is a target of output from the basal ganglia. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93, p. 8683-7, 1996.

MINGO, N. S.; COTTRELL, G. A.; MENDONÇA, A.; GOMBOS, Z.; EUBANKS, J. H.; BURNHAM, W. H. Amygdala-kindled and electroconvulsive seizures alter hippocampal expression of the m1 and m3 muscarinic cholinergic receptor genes. **Brain Res.**, v. 810, p. 9– 15, 1998.

MISHRA, P. K.; BURGER, R. L.; BETTENDORF, A. F.; BROWNING, R. A.; JOBE, P. C.; Role of norepinephrine in forebrain and brainstem seizures: chemical lesioning of locus coeruleus with DSP-4. **Exp. Neurol.**,v. 125, p. 58-64, 1994.

MITTLEMAN, R. E.; WETLI, C. V. Death caused by recreational cocaine use: an update. **JAMA**, v. 252, p.1889–93, 1984.

MIYAKAWA, T.; YAMADA, M.; DUTTARROY, A.; WESS, J. Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M1 muscarinic acetylcholine receptor. **J Neurosci.**, v. 14, p. 5239– 50, 2001.

MOGENSEN, G. J.; JONES, D. L.; YIM, C. Y. From motivation to action: functional interface between limbic and motor systems. **Prog. Neurobiol.**, v. 14, p. 69– 97, 1980.

MOLDRICH, R. X.; CHAPMAN, A. G.; DE SARROC, G.; MELDRUM, B. S. Glutamate metabotropic receptors as targets for drug therapy in epilepsy. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 476, p. 3– 16, 2003.

MORARI, M.; MARTI, M.; SBRENNNA, S.; FUXE, K.; BIANCHI, C.; BEANI, L. Reciprocal dopamine-glutamate modulation of release in the basal ganglia. **Neurochem Int.**, v. 33, p. 383-97, 1998.

MORILAK, D. A.; GARLOW, S. J.; CIARANELLO, R. D. Immunocytochemical localization and description of neurons expressing serotonin₂ receptors in the rat brain. **Neuroscience**, v. 54, p. 701–17, 1993.

MULSCH, A.; BUSSE, R.; MORDVINTCEV, P.; VANIN, A.; NIELSEN, E.; SCHEEL-KRUGER, J.; OLESEN, S.P. Nitric oxide promotes seizure activity in kainate-treated rats. **NeuroReport**, v. 5, p. 2325–8, 1994.

MURASHIMA, Y. L.; YOSHII, M.; SUZUKI, J. Ictogenesis and epileptogenesis in EL mice. **Epilepsia**, v. 5, p. 130-5., 2002.

MYERS, J. A.; EARNEST, M. P. Generalized seizures and cocaine abuse. **Neurology**, v. 34, p. 675-6, 1984

MYLLYLA, V. V.; HEIKKINEN, E. R.; VAPAATALO, E; HOKKANEN, E. Cyclic AMP concentration and enzyme activities of cerebrospinal fluid in patients with epilepsy or central nervous system damage. **Eur. Neurol.**, v. 13, p. 123–130, 1975.

NARANJO, C. A.; POULOS, C. X.; BREMMER, K. E.; LANCTOT, K. L. Fluoxetine attenuates alcohol intake and desire to drink. **Int Clin Psychopharm.**, v. 9, p. 163-72, 1994.

NEAL, M. J.; SHAH, M. A. Development of tolerance to the effects of vigabatrin (gamma-vinyl-GABA) on GABA release from rat cerebral cortex, spinal cord and retina. **Br J Pharmacol.**, v. 100, p. 324-8., 1990.

NEGRESS, J. C. L. Cocaine problems in the coca-growing countries in South America. In: **Cocaine: scientific and social dimensions**. Wiley chichester-Ciba Foundation Symposium, v. 166, p. 40-56, 1992.

NG, J.; HUBERT, G. W.; JUSTICE, JR., J. B. Increased uptake and enhanced release of dopamine in nucleus accumbens after chronic cocaine administration as measured by in vivo voltammetry. **J. Neurochem.**, v. 56, p. 1485-92, 1991.

NI, Y. G.; CHEN, J. G.; ANDROUTSELLIS-THEOTOKIS, A.; HUANG, C. J.; MOCZYDLOWSKI, E.; RUDNICK, G. A lithium-induced conformational change in

serotonin transporter alters cocaine binding, ion conductance, and reactivity of Cys-109. **J Biol Chem.**, v. 276, p. 30942-7, 2001.

NICHOLS, D. E. Medicinal chemistry and structure-activity relationships. In: **Amphetamine and Its Analogs** (Cho AK and Segal DS eds) pp 3–41, Academic Press, San Diego, 1994.

NZERUE, C. M.; HEWAN-LOWE, K.; RILEY JR, L. J. Cocaine and the kidney: a synthesis of pathophysiologic and clinical perspectives. **Am J Kidney Dis.**, v. 35, p. 783-95, 2000.

OADES, R. D.; HALLIDAY, G. M. Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. **Brain Res.**, v. , p. 117-65, 1987.

O'DELL, L. E.; GEORGE F. R.; RITZ, M. C. Antidepressant drugs appear to enhance cocaine-induced toxicity. **Exp. Clin. Psychopharmacol.**, v. 8, p. 133–41, 2000.

O'DELL, L. E.; KREIFELDT, M. J.; GEORGE, F. R.; RITZ, M. C. The role of serotonin(2) receptors in mediating cocaine- induced convulsions. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 65, p. 677-81, 2000.

O'DELL, L. E.; LI, R.; GEORGE, F. R.; RITZ, M. C. Molecular serotonergic mechanisms appear to mediate genetic sensitivity to cocaine-induced convulsions. **Brain Res.**, v. 863, p. 213-24, 2000.

OGREN, S. O.; PAKH, B. Effects of dopamine D1 and D2 receptor agonists and antagonists on seizures induced by chemoconvulsants in mice. **Pharmacol Toxicol**, v. 72, p. 213-20, 1993.

OLANOW, C. W. A radical hypothesis for neurodegeneration. **Trends Neurosci.**, v. 16, p. 439–44, 1993.

OLIVEIRA, A. A.; NOGUEIRA, C. R. A.; NASCIMENTO, V. S.; AGUIAR, L. M. V.; FREITAS, R. M.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B.; FONTELES, M. M. F. Evaluation of levetiracetam effects on pilocarpine-induced seizures: Cholinergic muscarinic system involvement. **Neurosci. Lett.**, v. 385, p. 184-8, 2005.

OLNEY, J. W. Inciting excitotoxic cytocide among central neurons. In: **Advances in experimental medicine and biology**, v. 203 (Schwarcz R, Ben-Ari Y, eds), New York: Plenum Press, 1986, p 632–45.

OLSON, K. R.; KEARNEY, T. E.; DYER, J. E.; BENOWITZ, N. L.; BLANC, P. D. Seizures associated with poisoning and drug overdose. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 12, p. 392-5, 1994.

OZTEZCAN, S.; DOGRU-ABBASOGLU, S.; MUTLU-TURKOGLU, U.; CALAY, Z.; AYKAC-TOKER, G.; USAL, M. The role of stimulated lipid peroxidation and impaired calcium sequestration in the enhancement of cocaine induced hepatotoxicity by ethanol. **Drug Alcohol Depend.**, v. 58, p. 77–83, 2000.

PAGE, G.; BARRIER, L.; MOREL, P.; SCHULZBER, G. M.; PIRIOU, A.; HUGUET, F. Possible relationship between changes in [3H]DA uptake and autoxidation in rat striatal slices. **Exp. Neurol.**, v. 152, p. 88–94, 1998.

PAN, Z. Z.; WILLIAMS, J. T. GABA- and glutamate-mediated synaptic potentials in rat dorsal raphe neurons in vitro. **J Neurophysiol.**, v. 61, p. 719-26, 1989.

PARK, W. K.; BARI, A. A.; JEY, A. R.; ANDERSON, S. M.; SPEALMAN, R. D.; ROWLETT, J. K.; PIERCE, R. C. Cocaine administered into the medial prefrontal cortex reinstates cocaine-seeking behavior by increasing AMPA receptor-mediated glutamate transmission in the nucleus accumbens. **J Neurosci**, v. 22, p. 2916-25, 2002.

PARSONS, L. H.; JUSTICE JR., J. B. Perfusate serotonin increases extracellular dopamine in the nucleus accumbens as measured by in vivo microdialysis. **Brain Res.**, v. 606, p.195–9, 1993.

PASCUAL-LEONE, A.; DHUNA, A.; AHAFULLAH, I.; ANDERSON, D. C. Cocaine-induced seizures. **Neurology**, v. 40, p. 404-17, 1990

PASINI, A.; TORTORELLA, A.; GALE, K. Anticonvulsant effect of intranigral fluoxetine. **Brain Res.**, v. 593, p. 287-90, 1992.

PAUL, V.; SUBRAMANIAN, E. H.; RAJASEKARAN, K. Pharmacological evidence for a role of γ -aminobutyric acid A receptor mechanism in modulating nitric oxide synthase activity in rat brain. **Neurochem. Int.**, v. 38, p. 209-11, 2001.

PEÑA, F.; TAPIA, R. Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo: role of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission and of ion channels. **Neuroscience**, v. 101, p. 547–61, 2000.

PENIX, L. P.; DAVIS, W.; SUBRAMANIAM, S. Inhibition of NO synthase increases the severity of kainic acid-induced seizures in rodents. **Epilepsy Res.**, v. 18, p. 177-84, 1994.

PENKOWA, M.; MOLINERO, A.; CARRASCO, J.; HIDALGO, J. Interleukin-6 deficiency reduces the brain inflammatory response and increases oxidative stress and neurodegeneration after kainic acid-induced seizures. **Neuroscience.**, v. 102, p. 805-18, 2001.

PEREZ VELAZQUEZ, J. L.; FRANTSEVA, M. V.; CARLEN, P. L. *In vitro* ischemia promotes glutamate-mediated free radical generation and intracellular calcium accumulation in hippocampal pyramidal neurons. **J Neurosci.**, v. 17, p. 9085-94, 1997.

PERKINTON, M. S.; SIHRA, T. S. A high-affinity presynaptic kainate-type glutamate receptor facilitates glutamate exocytosis from cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes). **Neuroscience**, v. 90, p. 1281-92, 1999.

PEROUTKA, S. J.; SNYDER, S. H. Differential binding of [3H]5-hydroxytryptamine, [3H]lysergic acid and diethylamide and [3H] spiroperidol. **Mol. Pharmacol.** v. 16, p. 687-99, 1979.

PERSINGER, M. A.; MAKAREC, K.; BRADLEY, J. C. Characteristics of limbic seizures evoked by peripheral injections of lithium and pilocarpine. **Physiol. Behav.**, v. 44, p. 27, 1988.

PETERSON, S. L.; TRZECIAKOWSKI, J. P.; MARY, J. S. Chronic but not acute treatment with antidepressants enhances the electroconvulsive seizure response in rats. **Neuropharmacology.**, v. 24, p. 941-6, 1985.

PLATT, J.J. **Cocaine addiction: theory, research and treatment.** 1st ed. Harvard University Press; 1997. p. 269.

POLLOCK, D. A.; HOLMGREEN, P.; LUI, K. J.; KIRK, M. L. Discrepancies in the reported frequency of cocaine-related deaths, United States, 1983 through 1988. **JAMA**, v. 266, p. 2233-7, 1991.

POST, R. M.; KOPANDA, R. T. Cocaine, kindling and psychosis. **Am. J. Psych.**, v. 133, p. 627-34, 1976.

POST, R.M.; KOPANDA, R. T.; BLACK, K. E. Progressive effects of cocaine on behavior and central amine metabolism in the rhesus monkey: Relationship to kindling and psychosis. **Biological Psychiatry**, v. 11, p. 403-19, 1976.

POST, R. M.; ROSE, H. Increasing effects of repetitive cocaine administration in the rat. **Nature**, v. 260, p. 755–60, 1976.

POTTIEGER, A. E.; TRESSELL, P. A.; INCIARDI, J. A.; ROSALES, T. A. Cocaine use patterns and overdose. **J. Psychoactive Drugs**, v. 24, p. 399-410, 1992.

POUW, B.; NOUR, M.; MATSUMOTO, R. R. Effects of AMPA/kainate glutamate receptor antagonists on cocaine-induced convulsions and lethality in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 386, p. 181-6, 1999.

POZZI, L.; INVERNIZZI, R.; GARAVAGLIA, C.; SAMANIN, R. Fluoxetine increases extracellular dopamine in the prefrontal cortex by a mechanism not dependent on serotonin: a comparison with citalopram, **J. Neurochem.**, v. 73, p. 1051-7, 1999.

PRAST, H.; PHILIPPOU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Prog. Neurobiol.**, v. 64, p. 51-68, 2001

PRENDIVILLE, S.; GALE, K. Anticonvulsant effect of fluoxetine on focally evoked limbic motor seizures in rats. **Epilepsia**, v. 34, p. 381-4, 1993.

PRZEGALINSKI, E. Monoamines and the pathophysiology of seizure disorders. In: Frey, H.H., Janz, D. Eds. **Handbook of Experimental Pharmacology**. Springer Verlag, Berlin, v. 74, p. 101–37, 1985.

PSARROPOULOU, C.; BEAUCHER, J.; HARNOIS, C. Comparison of the effects of M1 and M2 muscarinic receptor activation in the absence GABAergic inhibition in immature rat hippocampal CA3 area. **Dev. Brain Res.**, v. 107, p. 285- 90, 1998.

PSARROPOULOU, C.; DALLAIRE, F. Activation of muscarinic receptors during blockade of GABAA-mediated inhibition induces synchronous epileptiform activity in immature rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 82, p. 1067-77, 1998.

PULAY, E. Cocaine poisoning. **JAMA**, v. 78, p. 1855, 1922

PULVIRENTI, L.; BERRIER, R.; KREIFELDT, M.; KOOB, G.F. Modulation of locomotor activity by NMDA receptors in the nucleus accumbens core and shell regions. **Brain Res.**, v. 664, p. 231–6, 1994.

PYCOCK, C. J.; CARTER, C. J.; KERWIN, R. W. Effect of 6-hydroxydopamine lesions of the medial prefrontal cortex on neurotransmitter systems in subcortical sites in the rat. **J Neurochem**, v. 34, p. 91-9, 1980.

QUME, M.; FOWLER, L. J. Effect of chronic treatment with the GABA transaminase inhibitors gamma-vinyl GABA and ethanolamine O-sulphate on the in vitro GABA release from rat hippocampus. **Br J Pharmacol.**, v. 122, p. 539-45, 1997.

RAITERI, M.; BERTOLLINI, A.; FRANCESCO, F.; LEVI, G. d-Amphetamine as a releaser or uptake inhibitor of biogenic amines in synaptosomes. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 34, p. 189-95, 1975.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5ª edição, Elsevier, Rio de Janeiro, Elsevier, 2004.

RAPAKA, R. S.; CHIANG, N.; MARTIN, B. R. Introduction. Pharmacokinetics, metabolism, and pharmaceutics of drugs of abuse. National Institute of Drug Abuse, v. 173, p. 1-5, 1997.

REITH, M. E. A.; SHERSHEN, H.; ALLEN, D. L.; LAJTHA, A. A portion of [3H]cocaine binding in brain is associated with serotonergic neurons. **Mol Pharmacol.**, v. 23, p. 600–6, 1983

REN, J.; YE, J. H.; LIU, P. L.; KRNJEVIC, K.; MCARDLE, J. J. Cocaine decreases the glycine-induced Cl₋ current of acutely dissociated rat hippocampal neurons. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 367, p. 125-30, 1999.

RIBLET, L. A.; TAYLOR, D. P.; EISON, M. S.; STANTON, H. C. Pharmacology and neurochemistry of buspirone. **J Clin Psychiatry.**, v. 43, p. 11-8, 1982.

RITCHIE, JM, GREENE NM: Local anesthetics. In Gilman AG, Goodman LS, Rail TW, Murad F (eds): The Pharmacological Basis of Therapeutics (ed 7). New York, NY, Macmillan, 1996, pp 309-310

RITZ, M. C.; GEORGE, F. R. Cocaine-induced convulsions: pharmacological antagonism at serotonergic, muscarinic and sigma receptors. **Psychopharmacol**, v. 129, p. 299-310, 1997a.

RITZ, M. C.; GEORGE, F. R. Cocaine-induced seizures and lethality appear to be associated with distinct central nervous system binding sites. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 264, p. 1333-43, 1992.

RITZ, M. C.; GEORGE, F. R. Cocaine toxicity: concurrent influence of dopaminergic, muscarinic and sigma receptors in mediating cocaine-induced lethality. **Psychopharmacol.**, v. 129, p. 311-21, 1997b.

ROBERTS, A. C.; DE SALVIA, M. A.; WILKINSON, L. S.; COLLINS, P.; MUIR, J. L.; EVERITT, B. J.; ROBBINS, T. W. 6-Hydroxydopamine lesions of the prefrontal cortex in monkeys enhance performance on an analog of the Wisconsin Card Sort Test: possible interactions with subcortical dopamine. **J. Neurosci.**, v. 14, p. 2531-44, 1994.

ROBERTS, D. C. S.; CORCORAN, M. E.; FIBIGER, H. C. On the role of ascending catecholaminergic systems in intravenous self-administration of cocaine. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 6, p. 615-20, 1977.

ROBERTS, D. C. S.; KOOB, G. F.; KLONOFF, P.; FIBIGER, H. C. Extinction and recovery of cocaine self-administration following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens. **Pharmacol Biochem Beh.**, v. 12, p. 781-7, 1980.

ROBERTS, J. R.; QUATTROCCHI, E.; HOWLAND, M. A. Severe hyperthermia secondary to intravenous drug abuse. **Am J Emerg Med.**, v. 2, p. 373, 1984.

ROCKHOLD, R. W.; ODEN, G.; HO, I. K.; ANDREW, M.; FARLEY, J. M. Glutamate receptor antagonists block cocaine-induced convulsions and death. **Brain Res. Bull.**, v. 27, p. 721-3, 1991.

ROGAWSKI, M. A.; PORTER, R. J. Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. **Pharmacol Rev.**, v. 42, p. 223-86, 1990.

RONDOUIN, G.; BOCKAERT, J.; LERNER-NATOLI, M. L-nitroarginine, an inhibitor of NO synthase, dramatically worsens limbic epilepsy in rats. **Neuroreport.**, v. 4, p. 1187-90, 1993.

RONDOUIN, G.; LERNER-NATOLI, M.; MANZONI, O.; LAFON-CAZAL, M.; BOCKAERT, J. A nitric oxide (NO) synthase inhibitor accelerates amygdala kindling. **Neuroreport**, v. 3, p. 805- 8, 1992.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. *In* Vigo-Pelfrey C (ed): **Membrane lipid oxidation**. 1st ed. Boca Raton, CRC Press, 1991;151-70.

ROUSE, S. T.; MARINO, M. J.; BRADLEY, S.; R.; AWAD, H.; WITTMANN, M.; CONN, P.J. Distribution and roles of metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit: implications for treatment of Parkinson's Disease and related disorders. **Pharmacol. Ther.**, v. 88, p. 427–35, 2000.

ROTH, D.; ALARCON, F. J.; FERNANDEZ, J. A.; PRESTON, R. A.; BOURGOIGNIE, J. J. Acute rhabdomyolysis associated with cocaine intoxication. **New England Journal of Medicine**, v. 319, p. 673-7, 1988.

RUMENAPP, U.; ASMUS, M.; SCHABLOWSKI, H.; WOZNICKI, M.; HAN, L.; JAKOBS, K. H.; FAHIMI-VAHID, M.; MICHALEK, C.; WIELAND, T.; SCHMIDT, M. The M3 muscarinic acetylcholine receptor expressed in HEK-293 cells signals to phospholipase D via G12 but not Gq-type G proteins. Regulators of G proteins as tools to dissect pertussis toxin resistant G proteins in receptor-effector coupling. **J Biol Chem**, v. 276, p. 2474– 9, 2001.

RUSSO, C.; MARCHI, M.; ANDRIOLI, G. C.; CAVAZZINA, P.; RAITERI, M. Enhancement of glycine release from human cortex synaptosomes by acetylcholine acting at M4 Muscarinic receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 266, p. 142-6, 1993.

SACKEIN, H. A. Convulsant and anticonvulsant properties of electroconvulsive therapy: towards a focal form of brain stimulation. **Clin Neurosci Res.**, v. 4, p. 39-57, 2004.

SALA, M.; BRAIDA, D.; COLOMBO, M.; GROPPETTI, A.; SACCO, S.; GORI, E.; PARENTI, M. Behavioral and biochemical evidence of opioidergic involvement in cocaine sensitization. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 274, p. 450–7, 1995.

SALGADO, D.; ALKADHI, K.A., Inhibition of epileptiform activity by serotonin in the rat CA1 neurons. **Brain Res.**, v. 669, p. 176-82, 1995.

SANZ, B.; EXPOSITO, I.; MORA, F. M₁ Acetylcholine receptor stimulation increases the extracellular concentrations of glutamate and GABA in the medial prefrontal cortex of the rat. **Neurochem. Res.**, v. 22, p. 281-6, 1997.

SATOH, K.; FIBIGER, H. C. Cholinergic neurons of the laterodorsal tegmental nucleus: efferent and afferent connections. **J. Comp. Neurol.**, v. 253, p. 277-302, 1986.

SAYRE, L. M.; ENGELHART, D. A.; NADKARNI, D. V.; MANO, J.; BABU, M. K.; FLAMMANG, A. M.; MCCOY, G. D. The role of iminium–enamine species in the toxication and detoxication of cyclic tertiary amines. Pharmacokinetics, metabolism, and pharmaceutics of drugs of abuse. **NIDA**, v. 173, p. 106-27, 1997.

SAYRE, L. M.; SMITH, M. A.; PERRY, G. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. **Curr Med Chem.**, v. 8, p. 721-38, 2001.

SCHRANK, K. S. Cocaine-related emergency department presentations. In: H. Sorer (ed.) **Acute cocaine intoxication: Current methods of treatment** (NIDA Researchj monograph n° 123). Rockville, Md.: NIDA, pp. 110-128, 1993

SCHULTZ, W.; TREMBLAY, L.; HOLLERMAN, J. R. Reward prediction in primate basal ganglia and frontal cortex. **Neuropharmacol.**, v. 37, p. 421-9, 1998.

SCOTT, M. D.; LUBIN, B. H.; ZUO, L.; KUYPERS, F. A. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. **J Lab Clin Med.**, v. 118, p. 7-16, 1991.

SEAMANS, J. K.; DURSTEWITZ, D.; CHRISTIE, B.; STEVENS, C. F.; SEJNOWSKI, T. J. Dopamine D₁/D₅ receptor modulation of excitatory synaptic inputs to layer V prefrontal cortex neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 98, p. 301-6, 2001.

SEAMANS, J. K.; YANG, C. R. The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Prog Neurobiol.*, v. 74, p. 1-58, 2004. Review. Erratum in: *Prog Neurobiol.*, v. 74, p. 321, 2004.

SEGAL, M.; BLOOM, F. E. The action of norepinephrine in the rat. hippocampus. I. Iontophoretic studies. **Brain Res.**, v. 72, p. 79-97, 1974.

SEILICOVICH, A.; LASAGA, M.; BEFUMO, M.; DUVILANSKI, B. H.; DEL CARMEN, DIAZ, M.; RETTORI, V.; MCCANN, S. M. Nitric oxide inhibits the release of norepinephrine and dopamine from the medial basal hypothalamus of the rat. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 92, p. 11299-302, 1995.

SERRA, M.; DAZZI, L.; CAGETTI, E.; CHESSA, M. F.; PISU, M. G.; SANNA, A.; BIGGIO, G. Effect of pentylentetrazole-induced kindling on acetylcholine release in the hippocampus of freely moving rats. **J. Neurochem.**, v. 68, p. 313–8, 1997.

SESACK, S. R.; DEUTCH, A. Y.; ROTH, R. H.; BUNNEY, B. S. Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. **J. Comp. Neurol.**, v. 290, p. 213-42, 1989.

SESACK, S. R.; HAWRYLAK, V. A.; MATUS, C.; GUIDO, M. A.; LEVEY, A. I. Dopamine axon varicosities in the prelimbic division of the rat prefrontal cortex exhibit sparse immunoreactivity for the dopamine transporter. **J. Neurosci.**, v. 18, p. 2697-708, 1998.

SESACK, S. R.; PICKEL, V. M. Prefrontal cortical efferents in the rat synapse on unlabeled neuronal targets of catecholamine terminals in the nucleus accumbens septi and on dopamine neurons in the ventral tegmental area. **J. Comp. Neurol.**, v. 320, p. 145-60, 1992.

SHAN, X.; AW, T. Y.; JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther.**, v. 47, p. 61-71, 1990.

SHANK, R. P.; APRISON, M. H. Glutamine uptake and metabolism by the isolated toad brain: evidence pertaining to its proposed role as a transmitter precursor. **J Neurochem.**, v. 28, p. 1189-96, 1977.

SHANNON, M. Clinical toxicity of cocaine adulterants. **Ann Emerg Med**, v. 17, p. 1243-47, 1988.

SHARAN, N.; CHONG, V. Z.; NAIR, V. D.; MISHRA, R. K.; HAYES, R. J.; GARDNER, E. L. Cocaine treatment increases expression of a 40 Kda catecholamine-regulated protein in discrete brain regions. **Synapse**, v. 47, p. 33-44, 2003.

SHARKEY, J.; GLEN, K. A.; WOLFE, S.; KUHAR, M. J. Cocaine binding at sigma receptors. **Eur J Pharmacol**, v. 149, p. 171-4, 1988b.

SHARKEY, J.; RITZ, M. C.; SCHENDEN, J. A.; HANSON, R. C.; KUHAR, M. J. Cocaine inhibits muscarinic cholinergic receptors in heart and brain. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 246, p.1048-52, 1988a.

SHIGEMOTO, R.; KINOSHITA, A.; WADA, E.; NOMURA, S.; OHISHI, H.; TAKADA, M.; FLOR, P. J.; NEKI, A.; ABE, T.; NAKANISHI, S.; MIZUNO, N. Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. **J Neurosci.**, v. 17, p. 7503-22, 1997.

SHIMOSATO, K.; WATANABE, S.; KATSURA, M.; OHKUMA, S. Role of cerebral spermidine in the development of sensitization to convulsant activity of cocaine and lidocaine. **Brain Res.** v. 775, p. 198-202, 1997.

SHINNAR, S.; BERG, A. T.; MOSHE, S. L. How long do new-onset seizures in children last? **Ann Neurol.**, v. 49, p. 659-64, 2001.

SHIPPENBERG, T. S.; HEIDBREDE, C. The d-opioid receptor antagonist naltrindole prevents sensitization to the conditioned rewarding effects of cocaine. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 280, p. 55-61, 1995.

SHORVON, S. **Status Epilepticus: Its Clinical Features and Treatment in Children and Adults.** Cambridge University Press; 1994.

SHORVON, S. The classification of status epilepticus. **Epileptic Disord.**, v. 7, p. 1-3, 2000.

SIEGEL, K. K. Cocaine smoking. **J Psychoactive Drugs**, v. 14, p. 271, 1982.

SILVEIRA, D. C.; LIU, Z.; LACALLE, S.; LU, J.; KLEIN, P.; HOLMES, G. L.; HERZOG, A. G. Activation of the locus coeruleus after amygdaloid kindling. **Epilepsia** v. 39, p. 1261-4, 1998a.

SILVEIRA, D. C.; LIU, Z.; HOLMES, G. L.; SCHOMER, D. L.; SCHACHTER, S. C. Seizures in rats treated with kainic acid induce Fos-like immunoreactivity in locus coeruleus. **Neuroreport** v. 9, p. 1353-7, 1998b.

SILVEIRA, D. C.; SCHACHTER, S. C.; SCHOMER, D. L.; HOLMES, G. L. Flurothyl-induced seizures in rats activate Fos in brainstem catecholaminergic neurons. **Epilepsy Res.** v. 39, p. 1-12, 2000.

SLOVITER, R. S.; DEMPSTER, D. W. "Epileptic" brain damage is replicated qualitatively in the rat hippocampus by central injection of glutamate or aspartate but not by GABA or acetylcholine. **Brain Res. Bull.**, v. 15, p. 39-60, 1985.

SMART, R. G.; ANGLIN, L. Do we know the lethal dose of cocaine? **Journal of Forensic Sciences**, v. 32, p. 303-12, 1987.

SNEAD III, O. C. Antiabsence seizure activity of specific GABAB and gamma-hydroxybutyric acid receptor antagonist. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 53, p. 73-9, 1996.

SNORDGRASS, S. R. GABA and epilepsy: their complex relationship and the evolution of our understanding. **J. Child Neurol.** v. 7, p. 77-86, 1992.

SNYDER, G. L.; FIENBERG, A. A.; HUGANIR, R. L.; GREENGARD, P. A dopamine/D1 receptor/protein kinase A/dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein Mr 32 kDa/protein phosphatase-1 pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor. **J. Neurosci.**, v. 18, p. 10297-303, 1998.

SOKOLOWSKI, J. D.; SALAMONE, J. D. Effects of dopamine depletions in the medial prefrontal cortex in DRL performance and motor activity in the rat. **Brain Res.**, v. 642, p. 20-8, 1994.

SOUSA, F. C. F.; GOMES, P. B.; MACÊDO, D. S.; MARINHO, M. M. F.; VIANA, G. S. B. Early withdrawal from repeated cocaine administration upregulates muscarinic and dopaminergic D₂-like receptors in rat neostriatum. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 62, p. 15-20, 1999.

SULLIVAN, H. C.; OSORIO, I. Aggravation of penicillin-induced epilepsy in rats with LC lesion. **Epilepsia**, v. 32, p. 591-5, 1991.

SZOT, P.; REIGEL, C. E.; WHITE, S. S.; VEITH, R. C. Alterations in mRNA expression of systems that regulate neurotransmitter synaptic content in seizure-naive genetically epilepsy-prone rat (GEPR): transporter proteins and rate-limiting synthesizing enzymes for norepinephrine, dopamine and serotonin. **Brain Res Mol Brain Res.**, v. 43, p. 233-45, 1996.

STEINER, W.; FONTAINE, R. Toxic reaction following the combined administration of fluoxetine and L-tryptophan: five case reports. **Biol. Psychiatry**, v. 21, p. 1067-71, 1986.

STEKETEE, J. D. Neurotransmitter systems of the medial prefrontal cortex: potential role in sensitization to psychostimulants. **Brain Res. Brain Res. Rev.**, v. 41, p. 223-8, 2002.

STEVENS, D. R.; MCCARLEY, R. W.; GREENE, R. W. Serotonin-1 and serotonin-2 receptors hyperpolarize and depolarize separate populations of medial pontine reticular formation neurons in vitro. **Neuroscience**, v. 47, p. 545-53, 1992.

STEWART, J. K. Drugs and crime in America. In: **1988 Drug Use Forecasting Annual Report**. US Department of Justice, Washington, DC, 1990.

STEWART, D. J.; INABA, T.; LUCASSEN, M.; KALOW, W. Cocaine metabolism: Cocaine and norcocaine hydrolysis by liver and serum esterases. **Clin. Pharmacol. Ther.** v. 25, p. 464-8, 1979.

STRIPLING, J. S.; ELLINWOOD, E. H. Augmentation of the behavioral and electrophysiologic response to cocaine by chronic administration in the rat. **Exp Neurol.**, v. 54, p. 546-64, 1977a.

STRIPLING, J. S.; ELLINWOOD, E. H. Potentiation of the behavioral and convulsant effects of cocaine by chronic administration in the rat. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 6, p. 571-9, 1977b.

Substance abuse and mental health services administration (1997) **Year-end preliminary estimates from 1996 drug abuse warning network**. US Department of Health Human Services Publication No. (SMA) 98-3175, Rockville, M.D.

Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Office of Applied Studies. **Emergency Department Trends From the Drug Abuse Warning Network, Final Estimates 1995-2002**, DAWN Series D-24, DHHS Publication No. (SMA) 03-3780, Rockville,MD, 2003.

SUDHA, S.; LAKSHMANA, M. K.; PRADHAN, N. Chronic phenytoin induced impairment of learning and memory with associated changes in brain acetylcholine esterase activity and monoamine levels. **Pharmacol. Biochem. Beh.**, v. 52, p. 119-124, 1995.

SULLIVAN, H. C.; OSORIO, I. Aggravation of penicillin-induced epilepsy in rats with LC lesion. **Epilepsia**, v. 32, p. 591-5, 1991.

SZOT, P.; RIEGEL, C. E.; WHITE, S. S.; VEITH, R. C. Alterations in mRNA expression of systems that regulate neurotransmitter synaptic content in seizure-naive genetically epilepsy-prone rat (GEPR): transporter proteins and rate-limiting synthesizing enzymes for norepinephrine, dopamine and serotonin. **Mol. Brain Res.**, v. 43, p. 233-45, 1997.

TABER, M. T.; DAS, S.; FIBIGER, H. C. Cortical regulation of subcortical dopamine release: mediation via the ventral tegmental área. **J. Neurochem.**, v. 65, p. 1407-10, 1995.

TASSIN, J. P.; TROVERO, F.; BLANC, G.; HERVE, D.; GLOWINSKI, J. Interactions between noradrenaline and dopamine neurotransmission in the rat prefrontal cortex and their consequences on dopaminergic subcortical function, in: F. Colpaert (Ed.). **Noradrenergic Mechanisms in Parkinson's Disease**, CRC Press, Inc, Boca Raton, 1994, pp. 107–124.

TAYLOR, P.; BROWN, J. H. Acetylcholine. In: Siegel, G. J., Agranoff, B. W., Albers, R. W., Fisher, S. K., Uhler, M. D. (eds.) **Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical aspects**. 6th edition. Lippincott Williams & Wilkins, 1999, p. 214.

TAYLOR, P.; RADIC, Z. The cholinesterases: from genes to proteins. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, v. 34, p. 281-320, 1994.

TAYLOR, A. T.; WAGNER, P. J.; PRITCHARD, D. C.; TOLLISON, J. W. Fluoxetine in family practice patients. **J Fam Practice**, v. 39, p. 45-9, 1994.

TEAF, C. M.; FREEMAN, R. W.; HARBISON, R. D. Cocaine-induced hepatotoxicity: lipid peroxidation as a possible mechanism. **Drug Chem Toxicol**, v. 7, p. 383-96, 1984.

TELLA, S. R.; KORUPOLU, G. R.; SCHINDLER, C. W.; GOLDBERG, S. R. Pathophysiological and pharmacological mechanisms of acute cocaine toxicity in conscious rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 262, p. 936–46, 1992a.

TELLA, S. R.; SCHINDLER, C. W.; GOLDBERG, S. R. Cardiovascular effects of cocaine in conscious rats: Relative significance of central sympathetic stimulation and peripheral neuronal monoamine uptake and release mechanisms. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 262, p. 602–10, 1992b.

TERAI, M.; HIDAKA, K.; NAKAMURA, Y. Comparison of [3H]YM-009151-2 with [3H]spiperone and [3H]raclopride for dopamine d-2 receptor binding to rat striatum. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 173, p. 177-82, 1989.

THEARD, M. A.; BAUGHMAN, V. L.; WANG, Q.; PELLIGRINO, D. A.; ALBRECHT, R.F. The role of nitric oxide in modulating brain activity and blood flow during seizure. **Neuroreport**, v. 6, p. 921–4, 1995.

TINSLEY, J. A.; OLSEN, M. W.; LAROCHE, R. R.; PALMEN, M. A. Fluoxetine abuse. **Mayo Clinic Proc.**, v. 69, p. 166-8, 1994.

TOLLEFSON, G. D.; BIRKETT, M.; KORAN, L.; GENDUSO, L. Continuation treatment of OCD: Double-blind and open-label experience with fluoxetine. **J Clin Psychiat.**, v. 55, p. 69-76, 1994.

TROTTIER, S.; LINDVALL, O.; CHAUVEL, P.; BJORKLUND, A. Facilitation of focal cobalt-induced epilepsy after lesions of the noradrenergic. LC system. **Brain Res.**, v. 454, p. 308-14, 1988.

TSENG, C. C.; DERLET, R. W.; ALBERTSON, T. E. Cocaine-induced respiratory depression and seizures are synergistic mechanisms of cocaine induced death in rats. **Ann. Emerg. Med.**, v. 21, p. 486-93, 1992.

TURSKI, L.; CAVALHEIRO, E. A.; BORTOLOTTI, Z. A.; IKONOMIDOU-TURSKI, C.; KLEINROK, Z.; TURSKI, W. A. Dopamine-sensitive anticonvulsant site in the rat striatum. **J. Neurosci.**, v. 8, p. 4027-37, 1988.

TURSKI, L. C.; LKONOMIDOU, W. A.; TURSKI, Z. E.; BORTOLOTTI; CAVALHEIRO, E. A. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpina. **Synapse**, v. 3, p. 154, 1989.

US Department of Health and Human services. Institute of Laboratory Animal resources. **Guide for the care and use of laboratory animals**. Washington, D.C. National Reasearch Council; 1985.

USHIJIMA, I.; KOBAYASHI, T.; SUETSUGI, M.; WATANABE, K.; YAMADA, M.; YAMAGUCHI, K. Cocaine: evidence for NMDA-, β -carboline- and dopaminergic-mediated seizures in mice. **Brain Res.**, v. 797, p. 347-50, 1998.

UYLINGS, H. B. M.; GROENEWEGEN, H. J.; KOLB, B. Do rats have a prefrontal cortex? **Behavioural Brain Research**, v. 146, p. 3-17, 2003.

VALTSCHANOFF, J. G.; WEINBERG, R. J.; KHARAZIA, V. N.; SCHMIDT, H. H.; NAKANE, M.; RUSTIONI, A. Neurons in rat cerebral cortex that synthesize nitric oxide: NADPH diaphorase histochemistry, NOS immunocytochemistry, and colocalization with GABA. **Neurosci Lett.**, v. 157, p. 157-61, 1993.

VAN ASBECK, B. S.; HOIDAL, J.; VERCELLOTTI, G. M. et al. Protection against lethal hyperoxia by tracheal insufflation of erythrocytes: role of red cell glutathione. **Science**, v. 277, p. 756-9, 1985.

VAN DER KRAAIJ, A. M. M.; MOSTERT, L. J.; VAN EIJK, H. G.; KOSTER, J. F. Ironload increases the susceptibility of rat hearts to oxygen reperfusion damage. **Circulation**, v. 78, p. 442-9, 1988.

VANHATALO, S.; LUMME, A.; SOINILA, S. Colchicine differentially induces the expressions of nitric oxid synthases in central and peripheral catecholaminergic neurons. **Exp. Neurol.**, v. 150, p. 107–114, 1998.

VIZZARD, M. A.; ERDMAN, S. L.; DE GROAT, W.C. Increased expression of neuronal nitric oxide synthase (NOS) in visceral neurons after nerve injury. **J. Neurosci.**, v. 15, p. 4033–45, 1995.

VOGEL, H.G.; VOGEL, W.H. **Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays**. Springer–Verlag, Berlin, 1997.

VOLTERRA, A.; TROTTI, D.; TROMBA, C.; FLORIDI, S.; RACAGNI, G. Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. **J. Neurosci.**, v. 14, p. 2924–32, 1994.

WADA, J. A. Pharmacological prophylaxis in the kindling model of epilepsy. **Arch. Neural.**, v. 34, p. 389-95, 1977.

WAHNSCHAFTE, U.; LOSCHER, W. Anticonvulsant effects of ipsilateral but not controlateral microinjections of the dopamine D2 agonist LY 171555 into the nucleus accumbens of amygdala-kindled rats. **Brain Res.**, v. 553, p. 181-7, 1991.

WANG, R. Y.; ASHBY JR., C. R.; ZHANG, J. Y. Functional Roles of 5-HT – 3 like receptors in the medial prefrontal cortex, in: P.B. Bradley, S.L. Handley, S.J. Cooper, B.J. Key, N.M. Barnes, J.H. Coote (Eds.), **Serotonin, CNS Receptors and Brain Function**, v. 85, Pergamon, Oxford, 1992, pp. 81–96.

WANG, H.; CHENG, E.; BROOKE, S.; CHANG, P.; SALPOSKY, R. Overexpression of antioxidant enzymes protects cultured hippocampal and cortical neurons from necrotic insults, **J. Neurochem.**, v. 3, p. 1527–34, 2003.

WANG, J.; O'DONNELL, P. D(1) dopamine receptors potentiate NMDA-mediated excitability increase in layer V prefrontal cortical pyramidal neurons. **Cereb. Cortex**, v. 11, p. 452–62, 2001.

WARE, M. R.; STEWART, R. B. Seizures associated with fluoxetina therapy. **DICP Ann Pharmacother**, v. 23, p. 428, 1989.

WARNER-SMITH, M.; DARKE, S.; LYNSKEY, M.; HALL, W. Heroin overdose: causes and consequences. **Addiction**, v. 96, p. 1113–25, 2001.

WATKINS, J. C.; OLVERMAN, H. J. Agonists and antagonists for excitatory amino acid receptors. **Trends Neurosci.**, v. 10, p. 265-72, 1987.

WEINSHENKER, D.; SZOT, P. The role of catecholamines in seizure susceptibility: new results using genetically engineered mice. **Pharmacol Ther.**, v. 94, p. 312-33, 2002.

WEISINGER, H. Arginine metabolismArginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. **Prog. Neurobiol.** v. 64, p. 365-91, 2001.

WEISS, S. R. B.; POST, R. M.; PERT, A.; WOODWARD, R.; MURMAN, D. Context dependent cocaine sensitization: Differential effect of haloperidol on development versus expression. **Pharmacol. Biochem. Beh.** v. 34, p. 655-61, 1989.

WERNICKE, J. F. The side effect profile and safety of fluoxetina. **J. Clin. Psychiatry**, v. 46, p. 59-67, 1985.

WESTBROOK, G. L. Seizures and Epilepsy. In: KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J. H., JESSELL, T. M. (eds.) **Principles of Neural Science** 4th edition McGraw Hill, 2000, p. 911

WEST, M.; HUANG, W. Spinal cord excitatory amino acids and cardiovascular autonomic responses. **Am J Physiol.**, v. 267, p. H865-73, 1994.

WETLI, C. V.; MITTLEMAN, R. E. The body packer syndrome-toxicity following ingestion of ollicit drugs packaged for transportation. **J. Forens Sci.** v. 26, p. 492-500, 1981.

WETLI, C. V.; FISHBAIN, D. A. Cocaine-induced psychosis and sudden death in recreational cocaine users. **J. Forens. Sci.**, v. 30, p. 873-80, 1985.

WHEATLEY, M.; HULME, E. C.; BIRDSALL, N. J.; CURTIS, C. A.; EVELEIGH, P.; PEDDER, E. K.; POYNER, D. Peptide mapping studies on muscarinic receptors: receptor structure and location of the ligand binding site. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 2, p. 19-24, 1988.

WHETSELL JR., W. O. Current concepts of excitotoxicity. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 55, p. 1–13, 1996.

WHITE, L. E.; PRICE, J. L. The functional anatomy of limbic status epilepticus in the rat. II. The effects of focal deactivation. **J Neurosci.**, v. 13, p. 4810-30, 1993.

WILLIAMSON, S.; GOSSOP, M.; POWIS, B.; GRIFFITHS, P.; FOUNTAIN, J.; STRANG, J. Adverse effects of stimulant drugs in a community sample of drug users. **Drug Alcohol Depend.**, v. 44, p. 87-94, 1997.

WILLINS, D. L.; DEUTCH, A. Y.; ROTH, B. L. Serotonin 5-HT_{2A} receptors are expressed on pyramidal cells and interneurons in the rat cortex. **Synapse**, v. 27, p. 79–82, 1997.

WILLNER, J.; GALLAGHER, M.; GRAHAM, P. W.; CROOKS JR., G. B. N-Methyl- D-aspartate antagonist D-APV selectively disrupts taste potentiated odor aversion learning. **Behav Neurosci.**, v. 106, p. 315-23, 1992.

WILLMORE, L. J.; RUBIN, J. J. Antiperoxidant pretreatment and iron-induced epileptiform discharges in the rat: EEG and histopathologic studies. **Neurology.**, v. 31, p. 63-9, 1981.

WITKIN, J. M.; TORTELLA, F. C. Modulators of N-methyl-D-aspartate protect against diazepam- or phenobarbital-resistant cocaine convulsions. **Life Sci.**, v. 48, p. 51-6, 1991.

WITKIN, J. M.; NEWMAN, A. H.; NOWAK, G.; KATZ, J. L. Role of dopamine D1 receptors in the lethal effects of cocaine and a quaternary methiodide analog. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 267, p. 266-74, 1993.

WOOD, A. Pharmacotherapy of bulimia nervosa – experience with fluoxetine. **Int Clin Psychopharm.**, v. 8, p. 295-9, 1993.

WOOVERTON, W. L. Effects of a D1 and a D2 dopamine antagonist on the self-administration of cocaine and piribedil by rhesus monkeys. **Pharmacol Biochem and Beh.**, v. 24, p. 531-5, 1986.

World Drug Report 2004. http://www.unodc.org/pdf/WDR_2004/volume_1.pdf. Data de Acesso: 27/06/2005.

WU, W. Potential roles of gene expression change in adult rat spinal motoneurons following axonal injury: a comparison among c-jun, off-affinity nerve growth factor receptor (LNGFR), and nitric oxide synthase (NOS). **Exp. Neurol.**, v. 141, p. 190–200, 1996.

WU, D.; HERSCH, L. B. Choline acetyltransferase: Celebrating its fiftieth year. **J. Neurochem.** v. 62, p. 1653-63, 1994.

www.ac-rouen.fr/pedagogie/equipos/svt/perso/synapse-dopamine/synapse.html Data de acesso: 24/05/05

YAMADA, M.; LAMPING, K. G.; DUTTARROY, A.; ZHANG, W.; CUI, Y.; BYMASTER, F. P.; MCKINZIE, D. L.; FELDER, C. C.; DENG, C.-X.; FARACI, F. M.; WESS, J. Cholinergic dilation of cerebral blood vessels is abolished in M5 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, p. 14096– 101, 2001.

YAMAMOTO, H. A.; TANG, H.W. Melatonin attenuates L-cysteine-induced seizures and lipid peroxidation in the brain of mice. **J. Pineal Res.**, v. 21, p. 108–13, 1996.

YAN, Q. S.; JOBE, P. C.; DAILEY, J. W. Thalamic deficiency in norepinephrine release detected via intracerebral microdialysis: a synaptic determinant of seizure predisposition in the genetically epilepsy-prone rat. **Epilepsy Res.**, v. 14, p. 229-36, 1993.

YANG, S. N. Sustained enhancement of AMPA receptor- and NMDA receptor-mediated currents induced by dopamine D₁/D₅ receptor activation in the hippocampus: an essential role of postsynaptic Ca²⁺. **Hippocampus**, v. 10, p. 57-63, 2000.

YE, J. H.; LIU, P. L.; WU, W. H.; MCARDLE, J. J. Cocaine depresses GABA current of hippocampal neurons. **Brain Res.**, v 770, p. 169-175, 1997.

YE, J. H.; REN, J.; KRNJEVIC, K.; LIU, P.L.; MCARDLE, J. J. cocaine and lidocaine have additive inhibitory effects on the gaba a current of acutely dissociated hippocampal pyramidal neurons. **Brain Res.**, v. 821, p. 26-32, 1999.

YOKEL, R. A.; WISE, R. A. Increased lever pressing for amphetamine after pimozide in rats: Implications for a dopamine theory of reward. **Science**, v. 187, p. 547-9, 1975.

YOUNG, A. B.; FAGG, G. E. Excitatory amino acid receptors in brain: membrane binding and receptor autoradiographic approaches. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 11, p. 126-33, 1999.

ZETTERSTROM, Q. P. T.; FILLENZ, M. Both systemic and local administration of benzodiazepine agonists inhibit the in vivo release of 5-HT from ventral hippocampus. **Neuropharmacol.**, v. 28, p. 1061-6, 1989.

ZHAI, J.; WIELAND, S. J.; SESSLER, F. M. Chronic cocaine intoxication alters hippocampal sodium channel function. **Neurosci Lett.**, v. 229, p. 121–4, 1997.

ZIEN OWICZA, M.; WISŁOWSKA, A.; LEHNERB, M.; TARACHAB, E.; SKORZEWSKAB, A.; MACIEJAKA, P.; PŁAZNIK, A. The effect of fluoxetine in a model of chemically induced,seizures—behavioral and immunocytochemical study. **Neurosci. Lett.**, v. 373, p.226-31, 2004.

VIII-APÊNDICES

APÊNDICE 1

Trabalho aceito em setembro/2005 para publicação na revista "CELLULAR AND MOLECULAR NEUROBIOLOGY".

Differential effects of cocaine-induced seizures and lethality on M₁-like muscarinic and dopaminergic D₁- and D₂-like binding receptors in mice brain.

Danielle Silveira Macêdo, Silvânia Maria Mendes Vasconcelos, Manoel Andrade-Neto, Marta Maria França Fonteles, Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar, Glauce Socorro Barros Viana, Francisca Cléa Florenço de Sousa.

Abstract

This work was designed to study the changes produced by cocaine-induced seizures and lethality on dopaminergic D₁- and D₂-like receptors, muscarinic M₁-like binding sites, as well as acetylcholinesterase activity in mice prefrontal cortex (PFC) and striatum (ST). Binding assays were performed in brain homogenates from the PFC and ST and ligands used were [³H]-N-methylscopolamine, [³H]-NMS, (in the presence of carbachol), [³H]-SCH 23390 and [³H]-spiroperidol (in presence of mianserin), for muscarinic (M₁-like), D₁- and D₂-like receptors, respectively. Brain acetylcholinesterase (AChE) activity was also determined in these brain areas. Cocaine-induced SE decreased [³H]-SCH 23390 binding in both ST and PFC areas. A decrease in [³H]-NMS binding and an increase in [³H]-spiroperidol binding in PFC was also observed. Cocaine-induced lethality increased [³H]-spiroperidol binding in both areas and decreased [³H]-NMS binding only in PFC, while no difference was seen in [³H]-SCH 23390 binding. Neither SE, nor lethality altered [³H]-NMS binding in ST. AChE activity increased after SE in ST while after death the increase occurred in both PFC and ST. In conclusion, cocaine-induced SE and lethality produces differential changes in brain cholinergic and dopaminergic receptors, depending on the brain area studied suggesting an extensive and complex involvement of these ones with cocaine toxicity in central nervous system.

Keywords: acetylcholinesterase activity, brain receptors, cocaine-induced lethality, cocaine-induced seizures, dopaminergic binding sites, muscarinic binding sites, prefrontal cortex, striatum.

APÊNDICE 2



1: Neurosci Lett. 2005 Oct 14;387(1):53-6.

[Related Articles](#), [Links](#)



Cocaine alters catalase activity in prefrontal cortex and striatum of mice.

[Macedo DS](#), [de Vasconcelos SM](#), [dos Santos RS](#), [Aguiar LM](#), [Lima VT](#), [Viana GS](#), [de Sousa FC](#).

Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceara, Rua Cel. Nunes de Melo 1127, 60431-970 Fortaleza, Ceara, Brazil. daniellesm2000@yahoo.com

Catalase is one of the enzymes that convert hydrogen peroxide (H₂O₂) to H₂O presenting a protective role against free radicals. In this study, catalase activity was determined in homogenates of striatum (ST) and prefrontal cortex (PFC) in order to examine the participation of oxidative stress (OS) on cocaine actions in mice brain. Male Swiss mice were injected (i.p.) with cocaine at low (10 and 30 mg/kg) and high doses (90 mg/kg), and observed for 1 h. After cocaine overdose (90 mg/kg) some animals presented only status epilepticus (SE) while others died after seizures. These animals were dissected and divided in two groups, SE and death. Catalase activity was also determined after pretreatment with the anticonvulsant drug, diazepam, alone or injected before cocaine 90 mg/kg, and after seizures induced by a high dose of bupropion, a known inhibitor of NE and DA reuptake used for comparison. Results showed a decrease in catalase activity of the PFC and ST after SE and death induced by cocaine and bupropion overdoses. Cocaine at low doses decreased the enzyme activity only in ST. Diazepam treatment alone and before cocaine overdose did not interfere with catalase activity. This reduction in catalase activity may reflect an increase in H₂O₂ content in PFC and ST. Previous data reports that H₂O₂ inhibits dopamine transporter activity, suggesting that the decrease in catalase activity may potentiate the toxic mechanism of drugs that inhibit monoamines reuptake. As far as we know, this is the first report showing an involvement of OS in the cocaine's central mechanism of action.

PMID: 16085363 [PubMed - in process]

APÊNDICE 3



1: *Epilepsy Behav.* 2004 Dec;5(6):852-6.

[Related Articles](#), [Links](#)

ELSEVIER
FULL-TEXT ARTICLE

Effect of anxiolytic, antidepressant, and antipsychotic drugs on cocaine-induced seizures and mortality.

[Macedo DS](#), [Santos RS](#), [Belchior LD](#), [Neto MA](#), [Vasconcelos SM](#), [Lima VT](#), [Fonteles MM](#), [Viana GS](#), [de Sousa FC](#).

Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceara, Ceara, Brazil.

Cocaine abuse may lead to overdose (related to seizures and/or status epilepticus) and to diseases (schizophrenia, depression, and anxiety). This work was designed to study the influence of drugs used to treat psychopathologies associated with cocaine abuse on cocaine-induced seizures and mortality in mice. Fluoxetine (10, 20, 40 mg/kg), imipramine and buspirone (5, 10 mg/kg), pimozide (10, 20 mg/kg), lithium (56.3, 112.5 mg/kg), and naltrexone (25, 50 mg/kg) were administered intraperitoneally, 30 minutes prior to cocaine (90 mg/kg, ip). The animals were observed (30 minutes) to determine: latency to first seizure, number of seizures, and number of deaths after cocaine overdose. Fluoxetine, imipramine, buspirone, and pimozide had pro- or anticonvulsant effects depending on the dose. Smaller doses protected and higher doses increased cocaine-induced seizures and/or mortality. Naltrexone worsened and lithium protected against seizures. Thus, these results suggest that caution should be taken in the selection of pharmacotherapy and dosages for patients with cocaine addiction because of the possibility of potentiating cocaine toxicity.

PMID: 15582832 [PubMed - indexed for MEDLINE]

APÊNDICE 4



1: Neurosci Lett. 2004 May 27;362(3):185-8.

[Related Articles](#), [Links](#)



Alterations in monoamine levels after cocaine-induced status epilepticus and death in striatum and prefrontal cortex of mice.

[Macedo DS](#), [Vasconcelos SM](#), [Belchior LD](#), [Santos RS](#), [Viana GS](#), [Sousa FC](#).

Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceara, Rua Cel. Nunes de Melo 1127, Fortaleza 60431-970, CE, Brazil.

Seizures and death are the more important toxic consequences related to cocaine overdose. Some reports have shown that pharmacological manipulations in dopaminergic, serotonergic and noradrenergic systems alter the occurrence of cocaine-induced convulsions and death. Based on this fact, this work was performed to determine the changes in monoamine levels (DA, 5-HT and NE) and their metabolites (DOPAC, HVA and 5-HIAA) after cocaine-induced status epilepticus (SE) and death in striatum and prefrontal cortex (PFC). The monoamines and their metabolites were assayed by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Animal SE in striatum presented a decrease in DA and NE levels and an increase in HVA although in PFC there was an increase in DA, 5-HT and NE. Animals that died from cocaine-induced seizures in striatum showed an increase only in NE levels, but on the other hand in PFC a decrease occurred in DA and NE levels. Taken together these results indicated that cocaine-induced SE and death altered monoamine levels in different ways depending on the brain area studied, suggesting that different mechanisms are involved. Copyright 2004 Elsevier Ireland Ltd.

PMID: 15158010 [PubMed - indexed for MEDLINE]

APÊNDICE 5



1: Cell Mol Neurobiol. 2004 Feb;24(1):129-36.

[Related Articles](#), [Links](#)



Cocaine treatment causes early and long-lasting changes in muscarinic and dopaminergic receptors.

[Macedo DS](#), [Correia EE](#), [Vasconcelos SM](#), [Aguiar LM](#), [Viana GS](#), [Sousa FC](#).

Laboratory of Neuropharmacology, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceara, Fortaleza, Brazil.

1. The study of changes that persist after drug discontinuation could be fundamental to understand the mechanisms involved in craving and relapse. 2. In this work the changes occurring in muscarinic, D1- and D2-like receptors after 30 min (immediate), 1 day (early), 5 and 30 days (late) withdrawal periods were studied, in the striatum of rats treated once a day for 7 days with cocaine 20 and 30 mg/kg, i.p. 3. Binding assays were performed in 10% homogenates and ligands used were [3H]-N-methylscopolamine, [3H]-SCH 23390, and [3H]-spiroperidol for muscarinic (M1 + M2-like), D1-, and D2-like receptors, respectively. 4. Muscarinic receptors presented a downregulation at all doses and discontinuation times, while the dissociation constant (Kd) for this receptor decreased after 30 min, 5 and 30 days abstinence times. In relation to D1-like receptors we found an antagonistic effect with 100% increase in receptor number 30 min after the last cocaine injection, but after 1-day withdrawal a downregulation was observed with both doses that persisted up to 30 days, only with the higher dose. The dissociation constant value (Kd) for this receptor showed a decrease only with 5 and 30 days withdrawal. An increase occurred with D2-like receptors at all doses and withdrawal periods studied, while Kd increased in 30-min, 5, and 30 days withdrawal. 5. In this work we found that the subchronic cocaine treatment produces early and long-lasting modifications in cholinergic muscarinic as well in dopaminergic receptors that persist up to 30 days of cocaine withdrawal.

PMID: 15049517 [PubMed - indexed for MEDLINE]

APÊNDICE 6



1: Neurosci Lett. 2001 Oct 26;312(3):129-32.

[Related Articles](#), [Links](#)

ELSEVIER
FULL-TEXT ARTICLE

Different times of withdrawal from cocaine administration cause changes in muscarinic and dopaminergic receptors in rat premotor cortex.

[Macedo DS](#), [Sousa FC](#), [Vasconcelos SM](#), [Lima VT](#), [Viana GS](#).

Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceara, Rua Cel. Nunes de Melo 1127, Fortaleza 60431-970, CE, Brazil.

The present work studied neurochemical changes in rat premotor cortex 30 min, 1 and 5 days after withdrawal from cocaine repeated administration (20 and 30 mg/kg, intraperitoneally, daily for 7 days). Binding assays were performed in 10% homogenates, and ligands used were [(3)H]-N-methylscopolamine, [(3)H]-SCH 23390, and [(3)H]-spiroperidol for muscarinic, D(1)- and D(2)-like receptors, respectively. Levels of cyclic AMP (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) were determined using a commercial kit. Scatchard analyses of muscarinic receptors showed an upregulation after 1 and 5 days withdrawal. While D(2)-like receptors were upregulated at all withdrawal periods, D(1)-like receptors were upregulated only at the 30 min withdrawal, and returned to normal levels after 1 day of the last injection. In relation to cAMP levels, the repeated cocaine administration, 1 day after the last injection produced a decrease (around 26%) with both doses, while a 67% increase was seen in cGMP levels with the 30 mg/kg dose. These findings indicate lasting neurochemical changes in premotor cortex caused by cocaine which remained after different withdrawal periods.

PMID: 11602327 [PubMed - indexed for MEDLINE]