

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

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS,
NEUROQUÍMICAS, HISTOPATOLÓGICAS E
BIOQUÍMICAS EM RATOS TRATADOS COM COCAÍNA E
ETANOL ISOLADAMENTE OU EM ASSOCIAÇÃO**

IRI SANDRO PAMPOLHA LIMA

**Fortaleza-CE
2003**

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

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS,
NEUROQUÍMICAS, HISTOPATOLÓGICAS E
BIOQUÍMICAS EM RATOS TRATADOS COM COCAÍNA E
ETANOL ISOLADAMENTE OU EM ASSOCIAÇÃO**

IRI SANDRO PAMPOLHA LIMA

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles

Fortaleza-CE
2003

Esta dissertação encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca da Faculdade de Medicina da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja de conformidade com as normas da ética científica.

Iri Sandro Pampolha Lima

Dissertação aprovada em

Banca Examinadora

Prof. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo

Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa

Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles
(Orientadora)

*A Deus por trilhar de maneira tão especial a minha
vida colocando nela somente pessoas especiais*

*Aos meus amados pais, Irimatines e Fátima,
incentivadores e amigos de todas as horas.*

*Aos meus irmãos, Alan e
Wallace pela presença e apoio constantes.*

*À minha noiva Érica, pelo apoio e
incentivo em todos os momentos*

Agradecimentos

À Profa. Marta Maria de França Fonteles, minha orientadora, pela paciência e sabedoria na transmissão de seus conhecimentos, essenciais para minha formação acadêmica.

À Profa. Glauce Socorro Barros Viana, pela recepção em seu laboratório e pelas importantes discussões que em muito contribuíram para a realização desta dissertação.

À Danielle Silveira Macedo, pelo constante apoio e incentivo, que em muito contribuíram nas horas difíceis.

Ao Amigo Hélio, pelos conselhos e ajuda em todos os momentos.

Aos amigos da pós-graduação: Silvânia, Lissiana, Rivelilson, Cícero e Vera, pela paciência e incentivos constantes.

Aos Profs. do curso de pós-graduação, pelos conhecimentos transmitidos e constante disponibilidade.

À Vilani Bastos, pela colaboração em todos os momentos.

A todos os bolsistas pelo companheirismo e dedicação na execução dos experimentos.

À todos que fazem parte do Laboratório de Neurofarmacologia, pela união, amizade e lealdade, que tornam o ambiente de trabalho produtivo, agradável e de fácil convivência.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde pelo apoio e cooperação.

Aos amigos do HUWC, pela ajuda e apoio durante o curso de mestrado.

Ao Prof. Dário, pela inestimável ajuda na realização das análises histológicas.

Ao Ivan, sempre companheiro e amigo, pela essencial colaboração no preparo das lâminas para análise histológica.

À Polícia Federal, em especial à Dra. Graça, pelo apoio incondicional e pela realização das análises necessárias.

À Dra. Gorete, do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, por sua colaboração nas análises bioquímicas.

À minha noiva, Érica, pelo companheirismo, apoio e incentivo nos momentos mais difíceis.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	xi
Lista de Figuras	xii
Lista de Abreviaturas	xiv
Resumo	xv
Abstract	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Drogas de Abuso	1
1.2 Cocaína	2
1.2.1 Histórico	2
1.2.2 Formas de Cocaína	7
1.2.3 Vias de Exposição	9
1.2.4 Biotransformação da Cocaína	11
1.3 Cocaína e Neurotransmissão	12
1.3.1 Dopamina	12
1.3.2 Distribuição dos Neurônios Dopaminérgicos	13
1.3.3 Papel da Dopamina no Comportamento	14
1.3.4 O Transportador de Dopamina	15
1.3.5 Efeito da Cocaína no Sistema Dopaminérgico	17
1.3.6 Sistema Colinérgico	19
1.3.7 Circuitos Encefálicos e Drogas de Abuso	21
1.4 Etanol	26
1.4.1 Considerações Gerais	26
1.4.2 Farmacocinética	28

1.4.3 Etanol e Neurotransmissores	30
1.5 Cocaína e Etanol	32
2. OBJETIVOS	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Animais	38
3.2 Material Utilizado nos Experimentos	39
3.3 Preparo das Drogas	41
3.3.1 Cocaína	41
3.3.2 Determinação do Grau de Pureza da Cocaína	41
3.3.3 Etanol	42
3.4 Tratamento dos Grupos Experimentais	43
3.5 Estudos Comportamentais	44
3.5.1 Teste da Atividade Locomotora	44
3.6 Dissecção das Áreas Cerebrais	44
3.7 Determinação da Densidade dos Receptores Muscarínicos	45
3.8 Determinação da Densidade dos Receptores Dopaminérgicos	47
3.9 Dosagem de Proteína	50
3.9.1 Método	50
3.9.2 Soluções Reagentes	51
3.10 Determinação de Monoaminas e Metabólitos com HPLC	52
3.11 Análise Bioquímica	55
3.11.1 Métodos Bioquímicos	55
4.0 Estudo Histopatológico	64
4.1 Procedimento Experimental	64
5.0 Análise Estatística	65
6. RESULTADOS	66
6.1 Teste de Atividade Locomotora Espontânea	66

6.2 Efeitos da Administração Repetida de Cocaína, Etanol e a Combinação Destes Sobre as Concentrações de DA, DOPAC, HVA, 5-HT E 5-HIAA em CE de Ratos.	70
6.3 Efeitos da Administração Repetida de Cocaína, Etanol e a Associação Destes Sobre os Receptores D ₂ -símile em CE de Ratos	74
6.4 Efeitos da administração repetida de cocaína, etanol e a associação destes sobre os receptores M1+M2 símile em corpo estriado e córtex motor	79
6.5 Efeitos da Administração Repetida de Cocaína, Etanol e a Associação Destes Sobre os Níveis de Enzimas Séricas	81
6.5 Análise Histopatológica de Animais Tratados com Cocaína, Etanol e a Associação Destes	85
7. DISCUSSÃO	89
8. CONCLUSÕES	104
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Efeitos da administração repetida de cocaína sobre a atividade locomotora de ratos	67
Tabela 2-	Efeitos da administração repetida de etanol sobre a atividade locomotora de ratos	68
Tabela 3-	Efeitos da administração repetida de cocaína + etanol sobre a atividade locomotora de ratos	69
Tabela 4-	Efeitos da administração de cocaína e etanol na densidade (Bmax) e Kd dos receptores dopaminérgicos D ₂ -símile em corpo estriado de ratos	75
Tabela 5-	Efeitos da administração de cocaína e etanol na densidade dos receptores colinérgicos em estriado de ratos	80
Tabela 6-	Efeitos da administração de cocaína, etanol e a associação destes nos níveis de TGO, TGP e Colesterol total	83
Tabela 7-	Efeitos da administração de cocaína, etanol e a associação destes nos níveis de Triglicérides e HDL	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Folhas da planta <i>Erythroxylon coca</i>	03
Figura 2-	Representação da estrutura da cocaína	04
Figura 3-	Vias dopaminérgicas	14
Figura 4-	Ações da cocaína na neurotransmissão dopaminérgica	17
Figura 5-	Representação do sistema dopaminérgico	19
Figura 6-	Representação das vias colinérgicas centrais	21
Figura 7-	Metabolismo do Etanol	29
Figura 8-	Representação estrutural do cocaetileno	33
Figura 9-	Cromatografia da cocaína em comparação com padrão da Polícia Federal	42
Figura 10-	Aparelho de HPLC com detecção de fluorescência e eletroquímica	53
Figura 11-	Concentrações de DA, DOPAC e 5-HT medidas em CE de ratos tratados com cocaína	71
Figura 12-	Concentrações de DA, DOPAC e 5-HT medidas em CE de ratos tratados com etanol	72
Figura 13-	Concentrações de DA, DOPAC e 5-HT medidas em CE de ratos tratados com cocaína + etanol	73
Figura 14-	Efeitos da cocaína nos receptores dopaminérgicos D ₂ -símile sobre os valores de B _{max} em estriado de ratos	77
Figura 15-	Efeitos do etanol nos receptores dopaminérgicos D ₂ -símile sobre os valores de B _{max} em estriado de rat	78
Figura 16-	Efeitos da associação cocaína + etanol nos receptores dopaminérgicos D ₂ -símile sobre os valores de B _{max} em estriado de ratos	79

Figura 17-	a) Músculo cardíaco normal de ratos tratados com salina. b e c) Músculo cardíaco de ratos tratados com cocaína 10 e 20mg respectivamente. d e e) Músculo cardíaco de ratos tratados com etanol 2 e 4g/kg respectivamente. f e g) Músculo cardíaco de animais tratados com interação baixas doses e altas doses respectivamente.	87
Figura 18-	a) Fígado normal de ratos tratados com salina. b e c) Fígado de ratos tratados com cocaína 10 e 20mg respectivamente. d e e) Fígado de ratos tratados com etanol 2 e 4g/kg respectivamente. f e g) Fígado de animais tratados com interação baixas doses e altas doses respectivamente.	88

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HIAA	Ácido-5-hidroxiindolacético
5-HT	Serotonina
ALE	Atividade locomotora espontânea
ATV	Área tegmentar ventral
Bmax	Densidade máxima de receptores
CE	Corpo estriado
COLE-T	Colesterol total
DA	Dopamina
DOPAC	Ácido diidroxifenilacético
HDL	High Density Lipoprotein
HVA	Ácido homovanílico
Kd	Constante de dissociação
NAc	Núcleo acumbente
NE	Noradrenalina
SNC	Sistema nervoso central
TGI	Triglicerídeos
ACh	Acetilcolina
ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina sérica bovina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPM	Erro padrão da média
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
i.p.	Intraperitoneal
v.o.	Via oral

RESUMO

Avaliação das alterações comportamentais, neuroquímicas, histopatológicas e bioquímicas em ratos tratados com cocaína e etanol isoladamente ou em associação. IRI SANDRO PAMPOLHA LIMA. Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2003.

No presente trabalho foram estudadas as alterações comportamentais, neuroquímicas (determinações dos níveis de monoaminas e metabólitos), histopatológicas e bioquímicas (lipoproteínas e transaminases) em corpo estriado de ratos tratados com cocaína e etanol isoladamente ou em associação. Foram utilizadas ratas Wistar (180-200 g), que foram tratadas durante 7 dias com cocaína (Coc 10 e 20 mg/kg, i.p.), etanol (Et 2 e 4g/kg, v.o.) e a associação destes (Coc 10 mg + Et 2g - interação baixas doses; Coc 20 mg + Etanol 4g - interação altas doses). Os resultados demonstraram que a atividade locomotora espontânea (ALE) foi aumentada após administração de cocaína em ambas as doses e diminuída após a administração de etanol em ambas as doses. Não foram observadas alterações na ALE na associação cocaína + etanol. O tratamento com cocaína e etanol causou um aumento de dopamina, sem alterações nos demais neurotransmissores e metabólitos. A associação cocaína + etanol em altas doses, promoveu aumento dos níveis de dopamina, diminuição de DOPAC e aumento dos níveis de 5-HT, sugerindo que essas drogas poderiam atuar diretamente nesses sistemas ou, indiretamente, através de um processo de modulação. A cocaína, etanol e a associação destes, após administração sub-crônica e em ambas as doses, causou uma *downregulation* em receptores D2-símile, não ocorrendo alterações nos valores de Kd. Os valores de Bmax e Kd dos receptores M₁ + M₂-símile não sofreram alterações. No estudo bioquímico, a administração de cocaína induziu um aumento nas concentrações de TGO e triglicerídeos, e diminuição das concentrações de TGP, colesterol total e HDL. O tratamento com etanol diminuiu os níveis de HDL, colesterol total e triglicerídeos. A associação cocaína + etanol promoveu em ambas as doses diminuição de triglicerídeos, HDL, TGP e colesterol total. Todos os tratamentos promoveram alterações histopatológicas em tecido cardíaco e hepático. Nossos resultados sugerem que a associação cocaína + etanol parece interferir de maneira mais intensa nos sistemas de neurotransmissão e nos parâmetros bioquímicos do que o uso das drogas isoladas.

ABSTRACT

Behavioral, neurochemical, histopatological and biochemical alterations in rats treated with cocaine and ethanol singly or in association. IRI SANDRO PAMPOLHA LIMA. Supervisor: Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles. Master's Dissertation. Course of Post-graduation in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, UFC, 2003.

In the present work, behavioral, neurochemical (determination of monoamines and metabolites levels rat in striatum), histopatological and biochemical (lipoproteins and transaminases) alterations produced by cocaine, ethanol and the association of these were analyzed. Females Wistar rats (180-200 g) were treated during 7 days with cocaine (Coc 10 and 20 mg/kg, i.p.), ethanol (Et 2 and 4g/kg, p.o.) and the association of these (Coc 10 mg + Et 2g - low interaction doses; Coc 20 mg + Ethanol 4g - high interaction doses). The results demonstrated that the spontaneous locomotor activity (SLA) was increased after cocaine administration and decreased after ethanol in both doses. It was not observed alterations in the SLA in the association cocaine + ethanol. The treatment with cocaine and ethanol caused an increase in dopamine level. The association cocaine + ethanol in higher doses caused an increase of dopamine and serotonin and decrease of DOPAC levels, suggesting that those drugs would can actuate directly in those systems or, indirectly, across a process of modulation. Cocaine, ethanol and the association of these, after subchronic administration and in both doses, caused a downregulation of D2-like receptors, not by recurring alterations in the values of Kd. The values of Bmax and Kd of the M1 + M2-like receptors have not already suffered alterations. In the biochemical study, the administration of cocaine induced an increase the concentrations of TGO and triglycerides, and decrease of the concentrations of TGP, total cholesterol and HDL. The treatment with ethanol decreases the levels of HDL, total cholesterol and triglycerides. The association cocaine + ethanol caused in both doses decrease of triglycerides, HDL, TGP and total cholesterol. All treatments did promote histopatological alterations in cardiac and hepatic woven. Ours results suggest that the association cocaine + ethanol appears to interfere more intense in the systems of neurotransmitters and in the biochemical parameters than the use of the isolated drugs.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 Drogas de Abuso

O aumento do uso de drogas de abuso tem levado a um crescimento do comportamento criminal, trazendo ainda conseqüências diretas para a saúde. Estes agentes estão relacionados diretamente com o crescimento do narcotráfico, destruição de lares, aumento da criminalidade e diminuição da capacidade produtiva do país (Leite et al., 1999). O principal componente lesivo destas drogas é o estado de dependência que estas promovem nos usuários. Em estudos científicos, a dependência física é definida como um estado adaptativo que se manifesta por intensos distúrbios fisiológicos quando a administração da droga é suspensa, enquanto que a dependência psíquica é caracterizada como uma condição na qual a droga produz uma sensação de satisfação que leva a uma necessidade periódica ou contínua de administração da droga para produzir prazer (Dupont et al., 1997). A dependência e o abuso de drogas representam um sério problema de saúde pública. Estima-se que mais de 2 milhões de pessoas são viciadas em cocaína só nos Estados Unidos (Robins et al., 1999).

O termo droga teve origem na palavra *droog* (holandês antigo) que significa folha seca. Atualmente a medicina define droga como sendo qualquer substância que é capaz de modificar funções dos organismos vivos, resultando em mudanças fisiológicas ou de comportamento (Leite et al., 1999).

Dependendo da ação que as drogas apresentam no SNC, podem ser divididas em três grupos. Um grupo é formado por aquelas drogas que diminuem a atividade cerebral, ou seja, deprimem o seu funcionamento, o que significa dizer que a pessoa que faz uso desse tipo de droga fica "desligada", "devagar", desinteressada pelas coisas. Em um segundo grupo estão aquelas que atuam aumentando a atividade do cérebro, ou seja, estimulam o seu funcionamento fazendo com que, a pessoa que se utiliza dessas drogas, fique "ligada", "elétrica", sem sono.

Há um terceiro grupo, constituído por aquelas drogas que agem modificando mais qualitativamente que quantitativamente a atividade do cérebro. O cérebro passa a funcionar de forma anormal e a sua atividade fica perturbada (Beedle et al., 1997).

As drogas de abuso são causadoras de muitos problemas comuns para várias sociedades do mundo. Antigos textos religiosos mostram que, em todas as épocas e lugares, os seres humanos deliberadamente usaram substâncias capazes de modificar o funcionamento do sistema nervoso, induzindo sensações corporais e estados psicológicos alterados. Essas drogas têm grande poder destrutivo não apenas para o indivíduo, mas também para sua família e a sociedade. Dentre as drogas de abuso hoje disponíveis, temos a cocaína e o etanol como os agentes mais utilizados, sendo estas drogas alvos de inúmeros estudos. Progressos substanciais têm sido realizados na elucidação das ações moleculares e celulares da cocaína e do etanol, entretanto, os sítios e mecanismos que participam nos seus efeitos não estão bem elucidados (Leite et al., 1999).

1.2 Cocaína

1.2.1 Histórico

A cocaína é uma substância naturalmente encontrada em dezenas de espécies vegetais do gênero *Erythroxylum* (figura 1), sendo a *Erythroxylum coca* e a *Erythroxylum novogranatense* as mais utilizadas no cultivo para a produção da droga.



Figura 1 – Folhas da planta *Erythroxylon coca*

O hábito de mascar as folhas de coca pelos indígenas da região dos Andes data de longo tempo. Com a chegada dos conquistadores espanhóis, esta forma de uso foi estimulada, pois o consumo da droga facilitava a exploração do trabalho escravo. Levada para a Europa pelos espanhóis, durante os séculos XVI e XVII, difundiu-se o uso das folhas de coca na terapia sob as mais diversas aplicações: os males do estômago, ulcerações de pele, doenças venéreas e dores de cabeça, musculares e de dente (Gold, 1993, Escotado, 1993).

A cocaína (figura 2), principal alcalóide ativo existente nas folhas da *Erythroxylum coca*, foi isolada em 1860 por Niemann, que constatou seu gosto amargo e o efeito peculiar que produzia na língua, tornando-a dormente e quase insensível. Por volta de 1880, a cocaína estava disponível comercialmente, sendo, logo, incorporada a diversas beberagens, entre essas, o famoso Vin Mariani, que era conhecido como o “vinho dos atletas”. Rapidamente relatos enfatizavam os poderes miraculosos da droga, bem como sua capacidade de eliminar a fadiga (Gold, 1993).

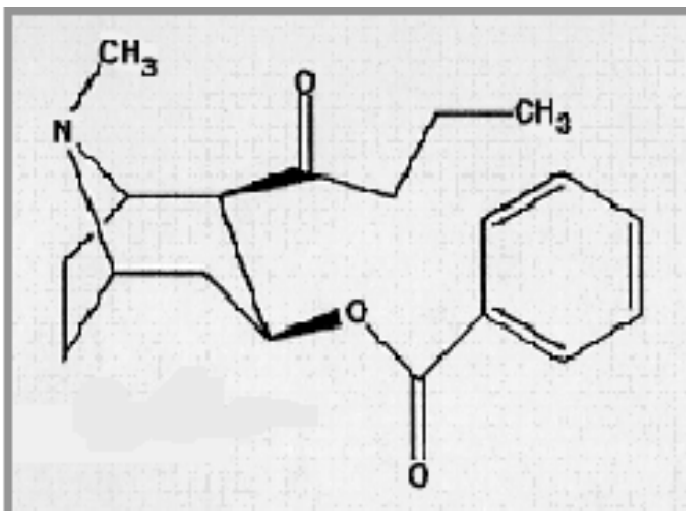


Figura 2 - Representação da estrutura da cocaína

Em 1884, Sigmund Freud fez o primeiro estudo pormenorizado dos efeitos fisiológicos da cocaína e no livro *Ueber Coca* sugeriu cinco possíveis aplicações da substância: aumentar a capacidade física, em doenças do aparelho digestivo, no controle da morfinomania, como estimulante sexual e anestésico local. Na mesma época, Carl Koller introduziu a cocaína na anestesia local da córnea, e Hall, na odontologia. A anestesia espinal verdadeira foi obtida por Augusto Bier, em 1898, ao injetar a substância em animais, em um assistente e nele mesmo (Musto, 1992).

Nos Estados Unidos, por volta de 1885, a cocaína foi adicionada – juntamente com a cafeína – em um remédio popular considerado como o protótipo da Coca-Cola, com indicações de uso contra dor de cabeça e como estimulante. Em 1892, Asa G. Chandler fundou a Coca-Cola Company e colocou a bebida no mercado como um tônico para pessoas debilitadas. Até meados deste século (1903-06), esta bebida continha aproximadamente 60mg de cocaína em 230 mL. A partir da sua extração, a cocaína passou a ser empregada em vários produtos. Nesta época, nos Estados Unidos, extratos de coca eram relatados como sendo a cura do alcoolismo e morfinismo, sendo que esses preparados pavimentaram o caminho para a cocaína em sua forma pura a partir de 1880. A cocaína foi distribuída na Europa, pelo laboratório Merck, a especialistas para realizarem experimentos com a droga.

Nesta época, Sigmund Freud dedicou-se ao estudo da cocaína. A euforia social relacionada à cocaína começou a se dissipar a partir da última década do século passado. Relatos detalhando a dependência à cocaína, comportamento psicótico induzido, convulsões e mortes causadas pelo consumo, gradativamente se acumularam na literatura. Freud, em 1887, publicava *Fissura e medo da cocaína*, descrevendo os sintomas paranóicos, as alucinações e deterioração física e mental associada ao consumo repetido (Musto, 1992).

Nas décadas que se seguiram à introdução da cocaína nos Estados Unidos, ela podia ser obtida em dois níveis diferentes: industrializado ou médico e por meio do comércio da droga pura nas ruas. Até a última década do século XIX não existia, naquele país, legislação sobre os atos médicos ou medicamentos em nível nacional. Mesmo as profissões médicas estavam se organizando naquela época, de forma que não existia controle sobre a propaganda da cocaína ou sobre os produtos que continham a substância. Leis passaram a ser decretadas para coibir o acesso fácil à substância acarretando um fortalecimento gradativo do mercado ilícito de cocaína, fazendo com que a droga ilícita ficasse muito mais acessível.

A partir de 1900, surgiram vários medicamentos e bebidas à base de cocaína ou de folhas de coca que permaneceram no mercado até 1914, quando foi editado o *Harrison Narcotic Act*, que tornou ilegal o uso e a venda de cocaína nos Estados Unidos da América. Em 1924, a Associação Americana de Medicina realizou um estudo que atribuiu a morte de 26 pacientes à utilização da cocaína como anestésico, o que restringiu o seu uso na clínica. O público, em resposta a estas informações, passava a pressionar as autoridades para tomada de uma posição contra a droga. A visão social da cocaína transformou-se em 30 anos (a partir de 1884); de um tônico anunciado sem efeitos colaterais para a droga com restrições mais severas da história atual; porém, no início do século XX, a droga continuava a ser permitida para propósitos médicos. O período seguinte foi caracterizado pela extinção quase total do consumo da droga. Os anos a partir de 1920 foram caracterizados pelo consumo de derivados opiáceos e *Cannabis*, como ocorria no período imediatamente anterior

à cocaína. No início da década de 30, a cocaína deixava de ser um problema social pela diminuição do uso. De 1914 a 1970, o consumo da droga, devido às suas propriedades eufóricas, ficou restrito a alguns segmentos da sociedade. A partir dos anos 70, com as restrições impostas à comercialização das anfetaminas, voltou o uso generalizado de cocaína nos Estados Unidos da América, e no início da década de 80, com a introdução do crack, o consumo aumentou de forma alarmante (Gold, 1993).

É muito difícil explicar a ressurreição da cocaína nos Estados Unidos a partir do início da década de 70. Esse ressurgimento implicou, também, no quadro de consumo de cocaína que pode ser observado desde a última década no Brasil. Um grande número de fatores, porém, convergiram para a mudança no hábito de consumo de drogas na população dos Estados Unidos; o primeiro deles refere-se a uma população que nasceu e cresceu consumindo drogas. O consumo de maconha e alucinógenos durante a década de 60 por um grande número de jovens norte-americanos resultou na ausência do temor das restrições legais, bem como das conseqüências médicas do assim chamado consumo *light* de drogas (Kendall, 1991).

Infelizmente, a cocaína, até o início da década de 80, ressurgiu envolta por uma reputação de ser incapaz de promover dependência, de ser segura em relação às conseqüências médicas e sociais e de ação ultracurta: a droga perfeita para interação social. Tornou-se, em princípio, a droga dos ricos e famosos; músicos cantavam suas virtudes, filmes mostravam o uso da cocaína como glamouroso, isento de riscos (Weiss, 1994). No Brasil, considerado o maior corredor de tráfico da droga do mundo, a cocaína trazia uma série de problemas que atingia as mesmas proporções nos países industrializados; o mascar das folhas de coca acarreta dependência semelhante à causada pela nicotina, sendo associada ao empobrecimento das funções mentais. Além do bem conhecido estado de anarquia e corrupção pública nos quais os países produtores se encontram, o imenso crescimento da produção, atividade das mais lucrativas, vem causando conseqüências sociais e ambientais incalculáveis (Negrete, 1992). Nenhuma outra planta conhecida causa níveis

similares de erosão, principalmente por seu cultivo junto às encostas andinas (Kendall, 1991). Uma respeitável parcela da população dos países produtores encontra-se envolvida em atividades relacionadas ao tráfico (Negrete, 1992).

No Brasil, a cocaína era livremente comercializada já no início do século, integrante de remédios ou em sua forma pura. Esta situação permaneceu até 1921, quando as leis começaram a restringir o seu consumo. Em 1962, no primeiro levantamento brasileiro sobre internações motivadas por consumo de drogas, observou-se que apenas quatro casos eram motivados pelo consumo da cocaína, enquanto neste mesmo ano 8.462 internações foram motivadas por álcool. Com o crescimento do consumo observado na última década, em 1992 houve 866 internações em hospitais psiquiátricos por intoxicação aguda ou dependência da droga. Em populações específicas, como as crianças de rua de grandes cidades, a cocaína é proporcionalmente muito mais consumida (relatos em 46,5% destas crianças na cidade de São Paulo). Com o surgimento do *crack* no estado de São Paulo durante esta década, porém, o consumo e as conseqüências têm crescido vertiginosamente (Leite et al., 1999).

1.2.2 Formas de cocaína

A cocaína é o único anestésico local que ocorre naturalmente, estando presente nas folhas da *Erythroxylum coca* na proporção de 0,5 a 1,0%. É um éster do ácido benzóico e da ecgonina (derivado da tropina) (Musto, 1992).

A *Erythroxylum coca* é a mais antiga das cocas cultivadas, sendo encontrada ainda em um estado semi-selvagem nos Andes peruanos e bolivianos. Sua cultura data de vários milênios e é responsável pela maior parte do suprimento mundial de cocaína. O processo de extração da cocaína para consumo ilícito é iniciado colocando-se as folhas e solventes orgânicos (querosene, gasolina) em recipientes (tanques); após um período de maceração, o extrato orgânico é separado das folhas e evaporado. O resíduo obtido, denominado pasta de coca, contém

cocaína juntamente com outros alcalóides e óleos essenciais. A droga pode ser obtida, também, por meio da secagem das folhas, digestão com ácido sulfúrico e posterior extração, após precipitação com bicarbonato de sódio. Este produto pode conter sulfato de cocaína (40-85%), além da cocaína na forma de base.

A pasta de coca é então tratada com ácido clorídrico (HCl) para formação de cloridrato de cocaína, que corresponde a forma usual de tráfico. É raro, contudo, encontrá-la na forma pura, sendo normalmente “diluída” com a adição de produtos que procuram mimetizar sua ação farmacológica, cor ou sabor. São utilizados para esta finalidade outros anestésicos locais (lidocaína), cafeína, efedrina, feniciclina, quinina, estricnina, manitol, sacarose, heroína, talco e outros.

O cloridrato de cocaína apresenta-se na forma de pó ou grânulos brancos, insolúveis em éter e solúveis em água, etanol e clorofórmio, apresentando ponto de fusão a 196°C. A partir do cloridrato é possível obter cocaína na forma de base, que é volátil e quimicamente mais estável. Essa transformação pode ser obtida pela adição de soluções alcalinas (bicarbonato) ao cloridrato, extração com éter dietílico e posterior evaporação do solvente orgânico pelo aquecimento. O produto obtido dessa maneira é a cocaína na forma de base livre, mas o aquecimento propicia a ocorrência de explosões devido às características do éter (Musto, 1992).

1.2.3 Vias de exposição

A cocaína pode ser utilizada por aplicação direta nas mucosas ou através das vias oral, respiratória (aspirada ou fumada) ou intravenosa. As vias de exposição mais utilizadas ocorrem por meio do sistema respiratório pela aspiração e absorção intranasal do cloridrato de cocaína ou pela inalação e absorção pulmonar da fumaça proveniente do ato de fumar a cocaína na forma básica. A cocaína pode ser consumida por várias vias e em uma grande variedade de doses (Jones, 1987). O uso intravaginal já foi reportado (Collins et al., 1994). A droga também pode ser aplicada por via retal (Schrank 1993). A cocaína apresenta ação equipotente quando fumada ou administrada endovenosamente em termos de pico plasmático (Fischman, 1988). Além disso, a cocaína fumada (incluindo o crack) não apresenta os riscos de infecção nem carrega o estigma (Johanson e Fischman, 1989).

A cinética de absorção intranasal é de extrema importância clínica, pelo fato da droga ser muito utilizada por esta via. Após utilização pela via intranasal, o pico máximo de concentração plasmática é observado entre 30 a 120 minutos após o uso. Essa variação ocorre pelo fato de a cocaína produzir diferentes graus de vasoconstrição, ocorrência de biotransformação no próprio local de administração (mucosa nasal), diferenças interindividuais de velocidade de hidrólise ou diferenças na prática da técnica de aspiração que leva à deglutição parcial da droga.

Quando a cocaína é utilizada na forma fumada (pasta, *crack* ou merla), sua velocidade de absorção pode ser comparada a da via endovenosa, levando alguns minutos para a droga atingir a circulação sistêmica e o cérebro. A absorção nesta via ocorre nos alvéolos pulmonares, sendo facilitada pela extensa superfície pulmonar e pelo tamanho das partículas produzidas na volatilização do *crack*. O aparecimento dos efeitos desejados depende da quantidade da droga liberada na corrente sanguínea, a qual está diretamente relacionada com a eficiência do ato de fumar. O pico máximo de concentração plasmática é obtido com 6 a 8 minutos após a tragada (Musto, 1992).

A injeção de cocaína é utilizada mais comumente por viciados em relação aos usuários ocasionais. Quando administrada na forma injetável, até um grama da droga é adicionado, em cada ocasião, em uma colher. Adiciona-se então água, sendo a mistura resultante colocada em uma seringa e injetada. A euforia acontece imediatamente. O uso intravenoso de cocaína produz o pico de *high* (aumento da força, energia e sensação de autoconfiança) 10 a 15 minutos após a injeção, com duração de cerca de 30 a 45 minutos. Efeitos intensos podem ocorrer com doses muito menores do que aquelas administradas oralmente (Rowbotham e Lowenstein, 1990). A morte súbita pode ocorrer rapidamente como resultado de um colapso cardiorespiratório.

A administração intranasal é uma via comum de utilização da droga. A cocaína quando preparada para inalação é colocada em uma superfície translúcida, como um espelho, onde ela é finamente cortada com uma lâmina de barbear e organizada em *filas*. Uma fila de cocaína consiste em aproximadamente 20 a 30 mg (Commissaris, 1989; Cox et al., 1983). Seguindo a inalação, há uma rápida passagem da cocaína para corrente sanguínea através da mucosa nasal rica em capilares, e os níveis sanguíneos aumentam rapidamente (em 30 segundos a 2 minutos), com pico de 15 minutos a 1 hora após a inalação. (Higgins et al., 1990; Weiss et al., 1994). Efeitos no humor são evidentes em 15 a 30 minutos após a administração intranasal, e os efeitos cardiovasculares, incluindo elevação da pressão arterial, aparecem em 15 a 20 minutos. Estes efeitos geralmente desaparecem em 45 a 60 minutos, embora os metabólitos da cocaína ainda estejam presentes na circulação por 4 a 6 horas após a administração (Weiss et al., 1994).

A cocaína pode ser fumada tanto na forma de pasta de coca como de crack, forma mais frequentemente usada. O conteúdo de cocaína na fumaça inalada é rapidamente absorvido e a concentração sanguínea aumenta rapidamente. Efeitos subjetivos como euforia e bem-estar geral ocorrem logo no início do uso. Com o uso prolongado, porém, ocorre uma menor sensação de euforia, acompanhada de ansiedade, hostilidade e extrema depressão. No caso do crack, há uma intensa

euforia inicial acompanhada por severa depressão, agitação e desejo por cocaína, 10 minutos após o uso (Leite et al., 1999).

O cloridrato de cocaína pode ser aplicado topicamente (única via lícita de administração) como anestésico. Por causa de sua insuficiente absorção cutânea, não ocorrem efeitos psicotrópicos nesta via de administração (Brown, 1989; Ritchie e Greene, 1990).

1.2.4 BIOTRANSFORMAÇÃO DA COCAÍNA

A cocaína é convertida extensamente a produtos de biotransformação no organismo por meio de processos enzimáticos e químicos, sendo pouco excretada na urina na sua forma inalterada. Os principais produtos de biotransformação são a benzoilecgonina e, em menor proporção, a ecgonina, a norcocaína e a benzoilnorcocaína (Leite, 1999).

A benzoilecgonina corresponde a 29-45% da excreção urinária. Para sua formação, a cocaína sofre hidrólise espontânea (pH dependente) do grupo éster carboxílico. O éster metil ecgonina, maior produto de biotransformação depois da benzoilecgonina, resulta da hidrólise espontânea e degradação enzimática por ação das colinesterases plasmáticas e hepáticas. A hidrólise enzimática da benzoilecgonina e a espontânea do éster metil ecgonina resultam no aparecimento da ecgonina, que pode contribuir com 1 a 8% da excreção urinária de cocaína. Outro produto de biotransformação é a norcocaína, que ocorre apenas em pequena fração (2 a 6%), mas que é farmacologicamente ativa.

O uso combinado de cocaína e álcool produz uma substância farmacologicamente ativa, denominada cocaetilenol ou etilcocaína, encontrada no sangue e na urina de usuários de cocaína depois da administração simultânea de cocaína e álcool. O cocaetilenol pode ser metabolizado posteriormente em benzoilecgonina, norcocaína e éster metil ecgonina. A cocaína apresenta meia-vida de eliminação de aproximadamente 75 minutos quando administrada por via

intranasal e de 48 minutos por via oral (Wilkinson et al., 1980). A droga pode ser detectada na mucosa nasal até 3 horas após a administração (Van Dyke et al., 1982), enquanto que a cocaína metabolizada pelas colinesterases plasmáticas está presente no sangue por até 3 horas, podendo ser detectada até 24 horas no máximo (Kogan et al., 1977). O fumo da base de cocaína produz um produto pirolítico, o éster metil anidroecgonina, que pode ser detectado na urina e serve como um marcador do uso de cocaína por esta via (Ambre, 1988).

1.3 COCAÍNA E NEUROTRANSMISSÃO

1.3.1 – DOPAMINA

- Produção e distribuição no cérebro

O aminoácido tirosina é o precursor dos neurotransmissores aminérgicos que possuem estrutura química denominada de catecol. Estes neurotransmissores são denominados catecolaminas e compreendem a dopamina, noradrenalina e adrenalina. Neurônios catecolaminérgicos estão relacionados com a regulação do movimento, humor, atenção e das funções viscerais. Os neurônios dopaminérgicos (produtores de dopamina) apresentam a enzima tirosina hidroxilase (TH), um catalizador da conversão de tirosina em DOPA. O DOPA é convertido então no neurotransmissor dopamina pela dopa descarboxilase. Quando é gerado um potencial de ação (despolarização da membrana), ocorre a exocitose do neurotransmissor dopamina para a fenda sináptica. A dopamina atua então em receptores pré e pós-sinápticos para promoção de seus efeitos, sendo recaptada para o neurônio para o término do processo sinalizador (Bear, 2001; Connors 2001).

1.3.2 – DISTRIBUIÇÃO DOS NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS

Os neurônios dopaminérgicos têm origem em três grupos celulares localizados no cérebro. Estes são classificados em A8, A9 e A10 (Dahlstrom & Fuxe, 1964, Bjorklund & Lindvall, 1984), correspondendo às regiões cerebrais denominadas campo retrorubral (A8), substância negra pars compacta (A9) e área tegumentar ventral (A10) (Figura 3). Os axônios dos neurônios dopaminérgicos provenientes destes grupos celulares se estendem para regiões do mesencéfalo, formando três sistemas neuronais:

- Sistema nigroestriatal que compreende os neurônios dopaminérgicos originados no grupo de células A9 e que terminam na região denominada corpo estriado dorsal. Esta região contém o núcleo caudado e o putamen e esta envolvida com o aprendizado de movimentos complexos executados automaticamente sob comando voluntário.
- O segundo circuito, o sistema mesolímbico, é originado no grupo A10 e parte do grupo A9. Estes neurônios terminam no estriado ventral, o qual inclui o núcleo accumbens e tubérculo olfatório, o septo, a amígdala central e o núcleo profundo da formação reticular (Ungerstedt, 1971). O estriado ventral tem papel no aprendizado e na performance de certos comportamentos de motivação.
- O terceiro grupo de neurônios dopaminérgicos se origina nos grupos A9 e A10 e termina em várias regiões do córtex cerebral que são envolvidas na atenção e memória curta, formando o sistema mesocortical (Thierry et al., 1973).

VIAS DOPAMINÉRGICAS NO CÉREBRO

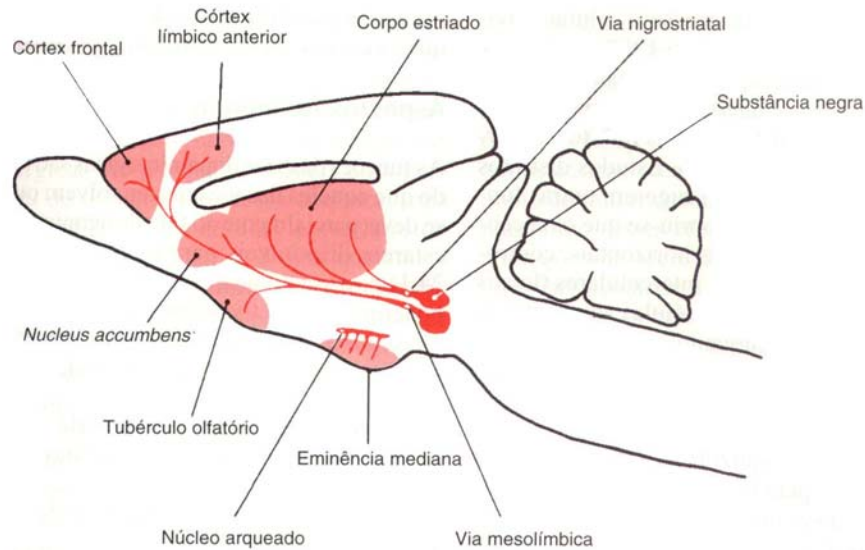


Figura 3 – Vias dopaminérgicas

1.3.3 – PAPEL DA DOPAMINA NO COMPORTAMENTO

Inúmeras evidências indicam que a dopamina exerce um importante papel na motivação e no reforço (Wise 1982; Robbins et al., 1989; Di Chiara 1995). A ação da dopamina no comportamento depende de três fatores principais: (1) o tipo de estímulo que ativa os neurônios dopaminérgicos, (2) a(s) área(s) cerebral(is) afetada(s) pela dopamina e (3) o modo de neurotransmissão dopaminérgica (se fásico-sináptico ou tônico-não-sináptico).

Os neurônios dopaminérgicos são ativados por estímulos encorajadores para os animais interpretarem ou repetirem um certo comportamento (estímulo motivacional). Estes estímulos convergem dos grupos celulares dopaminérgicos A8, A9 e A10 para várias áreas cerebrais onde ficam as terminações dos neurônios

dopaminérgicos. Assim, através da ativação destes neurônios, o estímulo motivacional pode influenciar a atividade de várias partes do cérebro que podem determinar diferentes funções comportamentais. Este mecanismo pode ser uma das razões do extenso papel da dopamina no comportamento.

1.3.4 – O TRANSPORTADOR DE DOPAMINA

A cocaína bloqueia a captação de dopamina, 5-hidroxitriptamina (5-HT) e norepinefrina (NE) no SNC (Figura 4), promovendo um acúmulo destes neurotransmissores na fenda sináptica. Porém, a determinação de qual destas ações está associada com os efeitos de reforço só foi elucidado recentemente. Existe uma correlação positiva significativa entre as potências da cocaína e alguns compostos relacionados, que bloqueiam a captação de dopamina e suas habilidades como reforçadores em situações de auto-administração em macacos rhesus (Ritz et al., 1987), sendo que correlações significativas entre os efeitos de reforço e o bloqueio da captação de NE e 5-HT não foram encontradas. Estes dados sugerem que o bloqueio da captação de dopamina é um passo essencial na mediação dos efeitos de reforço da cocaína. Um outro suporte desta hipótese dopaminérgica provém da evidência de que o receptor da cocaína e o transportador de dopamina são proteínas idênticas. Particularmente, fortes evidências provêm dos experimentos de clonagem. Outros estudos mostram que vários inibidores da captação de dopamina, como os análogos da cocaína de alta afinidade, mazindol e vários análogos do GBR12909, se ligam a um sítio comum e interagem competitivamente, o que leva à conclusão de que eles se ligam ao transportador de dopamina (Carroll et al., 1992; Reith et al., 1992). Além do mais, Grilli et al., 1991, mostraram que a expressão de sítios de ligação da cocaína e sítios de captação de dopamina ocorrem ao mesmo tempo durante o desenvolvimento celular *in vitro*.

Uma outra indicativa de que os sítios de ligação da cocaína e o transportador de dopamina estão intimamente relacionados é o fato de que os sítios de ligação da cocaína são distribuídos no SNC em áreas que apresentam altas concentrações de dopamina em terminais nervosos. Enquanto estes dados indicam um papel proeminente da dopamina, alguns trabalhos indicam que interações significativas entre diferentes sistemas mediadores neuroquímicos, como o serotoninérgico, gabaérgico e adrenergico, podem estar envolvidos na modulação das ações de reforço da cocaína e compostos relacionados.

Grandes progressos também foram alcançados na elucidação das características da estrutura da cocaína, que são significativas na ligação ao transportador de dopamina. As características estruturais importantes incluem a configuração levorotatória, um substituinte beta-orientado em C-2 e C-3, e o anel benzênico no carbono C-3 (Ritchie et al., 1990).

Além das características estruturais relevantes na ligação da cocaína, vários laboratórios estão envolvidos na caracterização da proteína transportadora de dopamina propriamente dita. Estes estudos levaram ao desenvolvimento de técnicas que eventualmente resultaram na clonagem e expressão do DNAc do transportador de dopamina cocaína-sensível (Kilty et al., 1991; Shimada et al., 1991). Este achado dá a oportunidade de elucidar a seqüência molecular que resulta na captação de dopamina e determinar como este processo é perturbado pela cocaína. Finalmente, este conhecimento pode ser útil no desenvolvimento de medicamentos para o tratamento da dependência pela cocaína. Pela alteração do transportador de dopamina através de mutações sítio-direcionadas, é possível determinar se as mudanças diferentemente alteram a ligação de cocaína e dopamina. O achado de que um resíduo de ácido aspártico encontrado em uma região particular parece ser crucial para ambos, transporte de dopamina e ligação da cocaína, enquanto outras áreas são importantes apenas para o transporte de dopamina, dá suporte à

possibilidade da capacidade do desenvolvimento de antagonistas da cocaína que não interfiram com o transporte normal de dopamina (Kitayama et al., 1992).

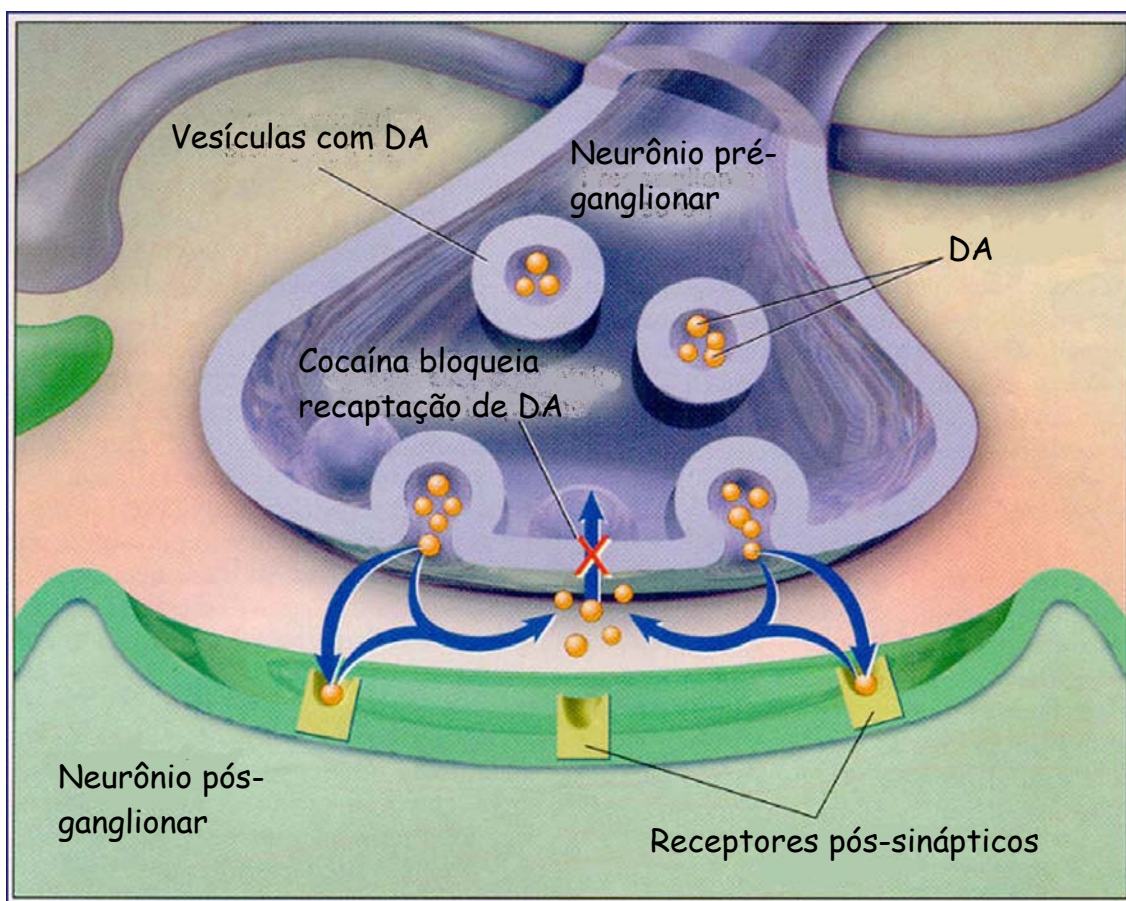


Figura 4 – Ações da cocaína na neurotransmissão dopaminérgica

1.3.5 – EFEITO DA COCAÍNA NO SISTEMA DOPAMINÉRGICO

A cocaína produz muitos efeitos neuroquímicos, mas seu principal mecanismo de ação envolve a monoamina dopamina. A cocaína produz um bloqueio na recaptação de dopamina, permitindo que esta fique na fenda sináptica por um período prolongado de tempo. O aumento deste neurotransmissor em certas áreas do cérebro, como por exemplo, no núcleo accumbens, é responsável pelos efeitos de reforço da cocaína (figura 4).

A ativação do sistema nervoso simpático também ocorre, explicando os efeitos ativadores simpáticos da cocaína, os quais incluem: taquicardia, aumento da pressão arterial sistólica, midríase e outros efeitos simpáticos (Ritchie e Greene, 1990). Mais especificamente, os receptores D₁, D₂ e D₃ podem estar envolvidos no efeito de reforço no sistema dopaminérgico mesolímbico. A atividade do receptor D₁ foi demonstrada predominantemente no *shell* do Núcleo accumbens, o qual está relacionado com aspectos motivacionais do vício promovido pela cocaína (Koob et al., 1997). Leshner 1996, também sugeriu que os receptores D₁ podem estar envolvidos na saciedade pela cocaína, visto que agonistas D₁ suprimem a auto-administração em ratos. Os receptores D₂ têm também importância nos efeitos de reforço da cocaína. De acordo com Leshner 1996, estes receptores têm um possível papel nos comportamentos motores envolvidos no vício por cocaína, considerando que agonistas D₂ induzem um comportamento de procura pela droga. Koob et al., 1997, sugeriram que isto é devido a um aumento na quantidade de receptores D₂ no corpo estriado, o qual está envolvido nos comportamentos motores. Os receptores D₃ também têm efeitos sobre a habilidade da cocaína em produzir reforço, mas o mecanismo de ação destes receptores ainda precisa ser elucidado (Koob et al., 1997). Semelhante aos receptores D₁, os receptores D₃ foram encontrados no *shell* do núcleo accumbens, mas não no *core*. (Koob et al., 1997). Em suma, os receptores D₁, D₂ e D₃ exercem um papel na habilidade da cocaína produzir reforço.

O bloqueio da recaptação de dopamina pode estar relacionado a um aumento na atividade locomotora com os dias de administração. Feldman et al., 1997 demonstraram que microinjeções de cocaína no núcleo accumbens resultavam em aumento na atividade locomotora. Porém, estes pesquisadores explicaram que o mecanismo pelo qual a cocaína produz seus efeitos comportamentais pode envolver mais do que um simples bloqueio na recaptação de dopamina.

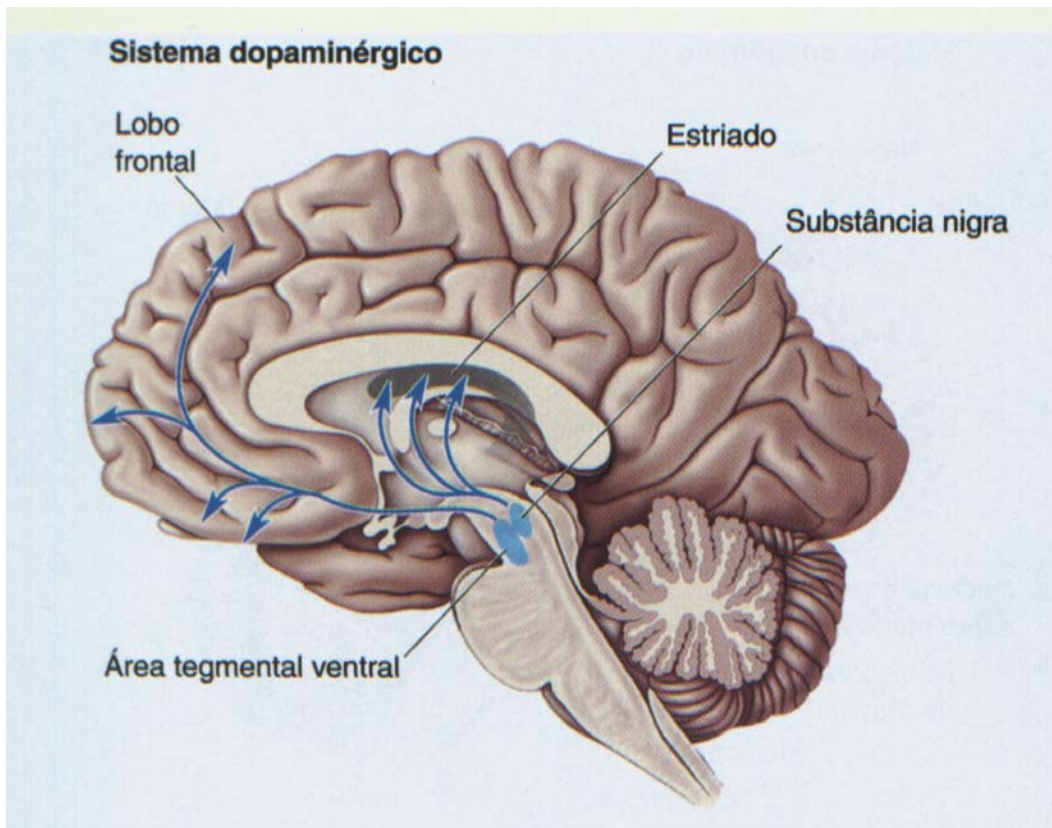


Figura 5 – Representação do sistema dopaminérgico

1.3.6 – SISTEMA COLINÉRGICO

A acetilcolina é o neurotransmissor responsável pela transferência de impulsos dos neurônios colinérgicos de células nervosas colinoceptivas para células de tecidos inervados (Tucek et al., 1993). Este sistema possui um importante papel nos processos de memória e aprendizado (Ohno et al., 1993). Os núcleos da base apresentam ampla inervação colinérgica, sendo esta mais intrínseca no corpo estriado, vindo de interneurônios colinérgicos (figura 6).

Dale, em 1914, dividiu as ações da acetilcolina em muscarínicas e nicotínicas. Estes efeitos são mediados por duas classes distintas de receptores que possuem pouca coisa em comum, a não ser a habilidade de se ligar a acetilcolina (Ehlert et al.,

1995). Os receptores muscarínicos são amplamente distribuídos em todo o corpo e exercem inúmeras funções vitais no cérebro e no sistema nervoso autonômico (Lefkowitz et al., 1996). No cérebro, os receptores muscarínicos são importantes na memória (Drachman e Leavitt, 1974; Safer e Allen, 1971) e na patofisiologia de doenças afetivas (Janowsky et al., 1972; Janowsky et al., 1973; Sitaram et al., 1980) e esquizofrenia (Davis et al., 1975; Karson et al., 1991; Tandon et al., 1991; Tandon et al., 1992). Devido ao seu possível papel na função cognitiva, os receptores muscarínicos são alvo de pesquisa no caso da doença de Alzheimer (Richelson, 1995).

A demonstração da existência de concentrações muito altas de dopamina e acetilcolina no corpo estriado, juntamente com numerosas observações comportamentais e clínicas de uma relação recíproca entre as ações das drogas dopaminérgicas e colinérgicas, levaram a um conceito geralmente aceito de que um balanço entre a atividade dopaminérgica e colinérgica é importante para a função normal desta estrutura (Tarsy, 1977). Um modelo no qual este balanço dopamina-acetilcolina é o resultado de uma ação inibitória da dopamina na produção de acetilcolina estriatal tem recebido muito suporte experimental. A estimulação de receptores dopaminérgicos pela administração sistêmica de agonistas diretos ou indiretos produziu aparentes diminuições na função colinérgica estriatal (Sethy e Van Woert, 1974; Guynet et al., 1975; Ladinsky et al., 1975; Mcgreer et al., 1975). Em contraste, o antagonismo direto ou indireto da função do receptor dopaminérgico pela administração sistêmica destes compostos produziu aumentos nos índices de utilização da acetilcolina estriatal (Beani et al., 1966; Stadler et al., 1973; Trabucchi et al., 1974; Consolo et al., 1975).

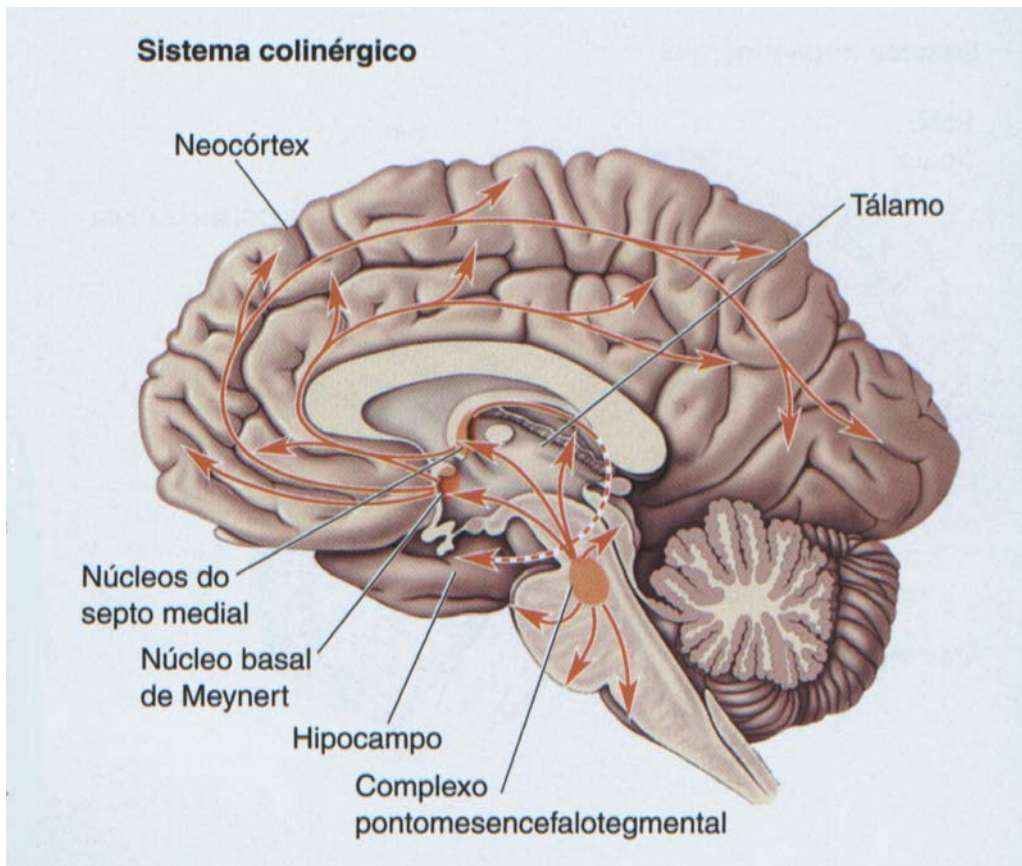


Figura 6 – Representação das vias colinérgicas centrais

1.3.7– CIRCUITOS ENCEFÁLICOS E DROGAS DE ABUSO

Os mediadores neurobiológicos das ações psicoestimulantes centrais da cocaína parecem ser as catecolaminas centrais, principalmente o neurotransmissor dopamina. Neurônios dopaminérgicos da área tegumentar ventral (ATV) que inervam o córtex límbico e frontal são necessários para as ações agudas de reforço promovidas pela cocaína.

As bases celulares para as ações da cocaína no sistema dopaminérgico começaram a ser elucidadas recentemente. Por meio da administração de ligantes marcados, White e Wang demonstraram que a dopamina deprime normalmente a atividade espontânea do núcleo accumbens inervado por neurônios dopaminérgicos da área tegumentar ventral, sendo esta ação três a dez vezes mais potente nesta em

relação ao núcleo accumbens. Embora a ação da dopamina no núcleo accumbens se dê através da interação com receptores das famílias D1 e D2, na ATV ocorre interação predominante com receptores D2-símile.

A cocaína atua alterando os sistemas de neurotransmissores endógenos. Centralmente, a cocaína atua na neurotransmissão catecolaminérgica incluindo tanto as vias noradrenérgicas como dopaminérgicas. A via noradrenérgica parece ser importante na mediação da ativação dos efeitos inespecíficos estimulantes, incluindo complicações cardiovasculares e o aparecimento dos sintomas que aparecem após a interrupção do uso dos estimulantes (Gawin e Ellinwood, 1988; Kosten, 1990). Os circuitos dopaminérgicos cerebrais parecem ser importantes na euforia e nos efeitos de reforço induzidos pelos estimulantes, os quais mantêm o abuso dos estimulantes (Shepherd, 1988).

A via serotoninérgica também tem um papel no abuso da cocaína, embora isto não tenha sido firmemente estabelecido (Kosten, 1990; Shepherd, 1988). A via dopaminérgica mesolímbica/mesocortical é importante para a auto-administração da cocaína (Wise, 1987).

Os neurônios dopaminérgicos da ATV são células que se originam das vias dopaminérgicas mesolímbica/mesocortical e promovem inervação dopaminérgica para o núcleo accumbens (Oades and Halliday, 1987). As propriedades de recompensa da cocaína podem ser devidas ao bloqueio da recaptção de dopamina no núcleo accumbens, o que incrementa e prolonga a liberação sináptica de dopamina (Ritz et al., 1987; Koob and Bloom, 1988).

O mecanismo central de ação da cocaína e outros estimulantes com alto potencial de abuso parece ser a estimulação da via de recompensa dopaminérgica no cérebro (Gawin e Ellinwood, 1988; Goeders e Smith, 1983; Yokel e Wise, 1975). De acordo com Kosten 1990, as seguintes ações ocorrem na sinápsis durante a ação estimulatória: a liberação de catecolaminas dos terminais pré-sinápticos; o bloqueio da captação da dopamina, NE e 5-HT (principal mecanismo de inativação dos neurotransmissores) e alterações na sensibilidade

do receptor com o uso crônico. O uso crônico pode resultar em outros efeitos que não só os resultantes da disponibilidade aumentada de catecolaminas e 5-HT. Estes incluem sensibilização (tolerância reversa) e tolerância.

A sensibilização comportamental pode estar localizada no Núcleo accumbens, embora outros sistemas neurais possam mediar os efeitos motores agudos da cocaína (Kalivas e Duffy, 1990). Foi demonstrado que a sensibilização induzida por cocaína pode ser bloqueada pelo haloperidol (Weiss et al., 1989), enquanto a administração de apomorfina, um agonista do receptor dopaminérgico, previne o desenvolvimento de uma resposta de sensibilização à anfetamina em camundongos (Riffée et al., 1987), mas não previne a sensibilização induzida pela administração subcrônica de cocaína (Riffée et al., 1988); estes resultados sugerem que a sensibilização para estes dois estimulantes pode envolver diferentes processos.

A tolerância aos efeitos da cocaína pode se desenvolver através da redução da inibição da recaptação com o uso crônico, diminuindo a liberação dos neurotransmissores, talvez devido à depleção no terminal pré-sináptico (embora este mecanismo não tenha sido confirmado) ou alterações na sensibilidade do receptor nos seus sítios pré- e pós-sinápticos levando a uma auto inibição neuronal (Kosten, 1990).

A hipótese dopaminérgica procura explicar as propriedades de reforço da cocaína. Ela propõe que a cocaína se liga ao transportador de dopamina e inibe a recaptação do neurotransmissor. Como resultado, a neurotransmissão dopaminérgica é potencializada na via mesolímbocortical, levando ao reforço de eventos associados com a ligação da cocaína e inibição da entrada de dopamina a nível molecular (Kuhar, 1992). Como outras drogas, tais como nicotina e álcool, também ativam a via mesolímbica, isto pode servir como via comum final para numerosas substâncias psicoativas, tanto em seu sítio de ação como em outros locais no SNC (Kuhar et al., 1991).

Existem evidências substanciais da hipótese dopaminérgica em animais, mas poucas em humanos. Ritz et al., 1987, reportaram evidências em animais de que a inibição do transportador de dopamina é o mecanismo primário responsável pelos efeitos de reforço da cocaína e o sítio receptor, ou sítio de ação onde os eventos resultantes dos efeitos de reforço são iniciados, embora outros sítios não possam ser excluídos. Entre as linhas de evidência disponíveis em humanos para esta explicação, Kuhar et al., 1991, listam as seguintes: 1) estudos de tomografia emissora de pósitrons (TEP), que mostram similaridades no tempo de curso entre a ocupação do receptor de cocaína (receptor de dopamina) e os efeitos da cocaína; 2) a presença de paranóia e psicose em ambos usuários de cocaína de forma prolongada ou em altas doses e na esquizofrenia, uma desordem que envolve a via dopaminérgica límbica; 3) a ação de estimulantes indiretos do receptor de dopamina, tais como, metilfenidato ou bromocriptina em reduzir com sucesso o desejo inicial pela droga, sugerindo que o agente dopaminérgico pode influenciar o mesmo processo como a cocaína (Dackes et al., 1987; Khantzian et al., 1984); 4) a preferência mostrada por bloqueadores da captação de dopamina em estudos de escolha feitos com várias drogas (Chatt et al., 1987); 5) e a sugestão de que decanoato de flupentixol, um bloqueador do receptor de dopamina, pode diminuir o desejo pela droga (Giannini et al., 1986; Gawin et al., 1989).

A administração de drogas bloqueadoras de receptores dopaminérgicos, tais como clorpromazina ou haloperidol não reduziram a euforia induzida pela cocaína ou auto-administração, mas reduziram os sintomas psicóticos (Gawin 1986a). O haloperidol também falhou na tentativa de atenuar o rush (sensação de curta duração que ocorre imediatamente após a administração da droga e é caracterizada por uma sensação de poder e extremo prazer comparada a um orgasmo), apenas modestamente influenciando os efeitos subjetivos da cocaína e atenuando o aumento da pressão sistólica e diastólica induzido pela cocaína (Shere et al., 1989).

Estes achados sugerem que um bloqueio nos receptores D2 (subtipo de receptor dopaminérgico do qual o haloperidol é antagonista primário) não afetou

fortemente a euforia causada pela cocaína, embora o pré-tratamento com bloqueadores do receptor dopaminérgico tenham prevenido a euforia pela anfetamina. Estes resultados sugerem a possibilidade de que mecanismos dopaminérgico estejam envolvidos no início do uso da cocaína, mas não em fenômenos tardios como a dependência e o desejo. Usando um simples estudo de TEP, Pearlson et al., 1993 encontraram que a cocaína administrada endovenosamente produziu efeitos subjetivos (auto-limitados, como rush e high) correspondendo com diminuições regionais no fluxo sanguíneo cerebral para sítios ricos em terminais dopaminérgicos, sugerindo o envolvimento do sistema dopaminérgico na produção destes estados subjetivos.

Enquanto os efeitos da cocaína no sistema dopaminérgico neuronal no cérebro são possivelmente mediados pelo bloqueio de curto período na recaptção de dopamina, o uso prolongado resulta na depleção de dopamina nestes mesmos sítios (Volkow et al., 1990). Esta depleção pode resultar na interrupção da transmissão dopaminérgico, causando disforia e ânsia pela droga. No estudo de Volkow et al., 1990, porém, foi demonstrado uma recuperação na disponibilidade do receptor dopaminérgico pós-sináptico a níveis normais em usuários de cocaína detoxificados depois de um período de 1 mês livre da droga. Um outro estudo também examinou a possibilidade de que a exposição à cocaína altera o transportador de dopamina e concluiu que a regulação do transportador de dopamina é altamente sensível aos regimes de uso e intervalos de retirada da droga (Little et al., 1993).

Vários aspectos do mecanismo definem as bases das intervenções farmacológicas para o tratamento do abuso da cocaína. Por exemplo, quando as vias dopaminérgicas são antagonizadas por neurolépticos, os quais atuam como bloqueadores dopaminérgico (Phillips et al., 1983), ou quando estas vias são destruídas quimicamente ou retiradas cirurgicamente (Bozarth e Wise 1986; Roberts et al., 1977), os efeitos comportamentais da cocaína são eliminados. As qualidades eufóricas e de reforço da cocaína podem também ocorrer como um resultado do

efeito da droga no sistema 5-HT, embora os mecanismos envolvidos não sejam ainda conhecidos. A administração da cocaína aumenta a liberação do neurotransmissor 5-HT nos sítios sinápticos pela inibição da recaptação da 5-HT, como já descrito anteriormente, da mesma maneira pela qual afeta a dopamina e NE (Hall et al., 1990), resultando na redução do turnover de 5-HT. Desta forma, agentes que modulam a 5-HT também influenciam a ação da cocaína (Johnson e Vocci, 1993).

Também é conhecido que agonistas opióides como morfina e metadona estimulam a transmissão dopaminérgica no sistema mesolímbico, enquanto agonistas κ reduzem na mesma extensão. Desde que buprenorfina (um agonista parcial - μ) suprime a auto-administração de cocaína em macacos Rhesus na mesma extensão que suprime a auto-administração dos opióides, pode existir uma possível ligação entre o sistema opióide e os sistemas responsáveis pela produção dos efeitos de reforço da cocaína em primatas (Johnson e Vocci, 1993).

1.4 ETANOL

1.4.1 –CONSIDERAÇÕES GERAIS

A palavra álcool origina-se do árabe al-kuhul, que significa líquido. As bebidas alcoólicas representam as drogas mais antigas das quais se tem conhecimento. Obtidas pela fermentação de diversos vegetais, por meio de procedimentos no início primitivos e depois cada vez mais sofisticados, as bebidas alcoólicas já estavam presentes nas grandes culturas do Oriente Médio e são utilizadas em quase todos os grupos culturais, geralmente relacionadas a eventos festivos. Os mais antigos documentos da civilização egípcia descrevem o uso do vinho. A medicina egípcia usava essências alcoólicas para uma série de moléstias, como meio embriagador contra dores e como abortivo. O vinho era bebido entre os egípcios em honra à deusa Isis. O consumo de cerveja pelos jovens era comum;

muitos contos, lendas e canções de amor relatam os seus poderes afrodisíacos. O seu uso social e festivo era bem tolerado, embora, já no Egito, moralistas populares se levantassem contra o seu abuso "por desviar os jovens dos estudos". A embriaguez, no entanto, era tolerada apenas quando decorrente de celebrações religiosas, onde era considerada normal ou mesmo estimulada (Lieber et al., 1995). Na Babilônia 500 a.C., a cerveja era ofertada aos deuses. Nas culturas da Mesopotâmia, as bebidas alcoólicas existiram no final do segundo milênio a.C.; aos poucos, a cerveja à base de cereais foi substituída por fermentados à base de tâmaras. A fermentação da uva também é regularmente mencionada. O consumo de álcool nas civilizações gregas e romanas é bem conhecido, onde era utilizado tanto pelo seu valor alimentício, quanto para festividades sociais.

O consumo de bebidas alcoólicas é amplamente difundido no Brasil, onde se consome mais álcool *per capita* do que leite. Na década de 20, nos Estados Unidos, houve uma proposta de coibição legal do uso de bebidas alcoólicas chamada Lei Seca, a qual durou pouco tempo. As bebidas alcoólicas são elaboradas a partir da fermentação de produtos naturais: vinho (fermentação da uva), cerveja (fermentação de grãos de cereais) e outros (fermentação do mel, cana de açúcar, beterraba, mandioca, milho, pimenta, arroz etc.). Bebidas alcoólicas destiladas (como cachaça, rum, uísque ou gim) são obtidas através da destilação de bebidas fermentadas (Robbins, 1999).

O etanol é o agente mais utilizado em todo o mundo. Existem, nos Estados Unidos, 15 a 20 milhões de alcoólatras, e cerca de 100.000 mortes por ano são atribuídas ao abuso de álcool, com um custo econômico de 100 a 130 bilhões de dólares (Lieber et al., 1995). O etanol é ingerido por via oral, em bebidas alcoólicas como a cerveja, vinho e aguardentes. O álcool etílico é uma droga de abuso conhecida por alterar vários sistemas de neurotransmissores do SNC. Segundo Nevo & Hamon (1995), o consumo agudo e crônico do etanol interfere diferentemente com processos de transmissão no SNC, afetando muitos, se não todos os sistemas de neurotransmissores conhecidos. Entretanto, o mecanismo de

ação pelo qual o etanol altera esses sistemas ainda não foi totalmente esclarecido (Chandler et al., 1998). O etanol tem propriedades de reforço, causando tanto leve euforia como uma redução da percepção da ansiedade. A retirada do etanol é caracterizada por uma síndrome que varia de uma ressaca severa para ansiedade profunda, tremores, hiperatividade simpática, psicose e morte (Lewis et al., 1994).

1.4.2 - FARMACOCINÉTICA

O etanol é consumido por via oral, onde sofre rápida absorção no estômago (20%), no intestino delgado (75%) e no cólon (5%). O etanol na forma de vapor pode ser absorvido pelos pulmões, podendo também ser absorvido em menor escala pela via subcutânea (Ritchie 1987). Após ser absorvido, o etanol sofre distribuição uniforme para todos os tecidos e líquidos do corpo. Na maioria dos indivíduos o pico de concentração plasmática máxima ocorre entre 30 e 90 minutos após a ingestão (Oliveira & Pereira, 1994).

O etanol sofre rápida distribuição para todos os compartimentos aquosos do organismo, sendo sua concentração diretamente proporcional ao conteúdo de água do organismo. As membranas são sempre permeáveis a sua passagem e a sua concentração sanguínea é similar a do restante do organismo. O etanol penetra no SNC, devido ao amplo suprimento sanguíneo para essa região. A placenta também é permeável, tendo o etanol livre acesso à circulação fetal (Oliveira & Pereira, 1994; Rang et al., 2001).

Mais de 90% do etanol absorvido sofre metabolização hepática (Figura 7), sendo uma pequena parcela eliminada de forma inalterada pelos pulmões e pelos rins. A metabolização hepática do etanol difere da maioria das substâncias, exibindo uma cinética de saturação com concentrações relativamente baixas de etanol, de maneira que a fração de etanol removida do sangue sofre uma diminuição gradativa à medida que aumenta a concentração plasmática de etanol. Outro fator de grande

importância é a absorção, pois quando esta é rápida, ocorre elevação da concentração sanguínea, enquanto que quando a absorção é muito lenta, uma maior fração do etanol é removida pelo metabolismo de primeira passagem. Portanto, a ingestão de etanol com estômago vazio produz efeito farmacológico mais intenso (Lieber, 1994). O metabolismo do etanol é predominantemente hepático, sendo a principal via realizada por processos de oxidações sucessivas. A oxidação inicial do etanol promove a formação do acetaldeído pela enzima álcool desidrogenase.

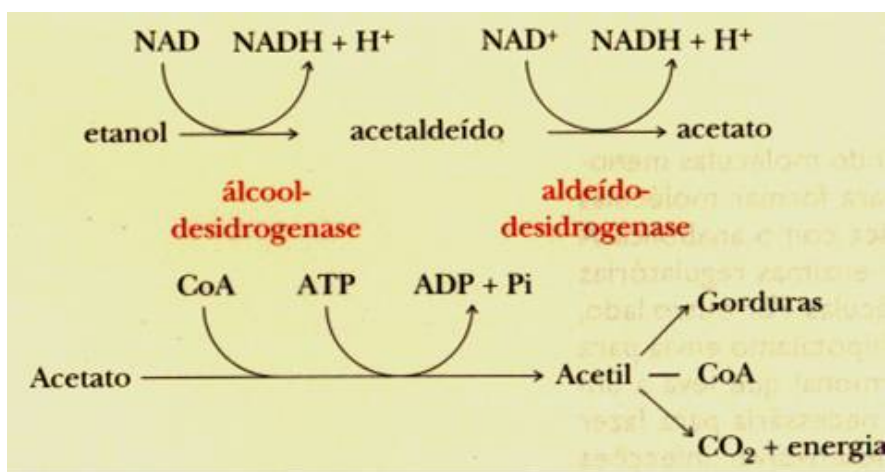


Figura 7 – Metabolismo do Etanol

O acetaldeído é então convertido em acetil coenzima A, que sofre oxidação através do ciclo ácido cítrico ou é utilizado em reações anabólicas que participam da síntese de colesterol, ácidos graxos e outros constituintes teciduais (Ritchie 1987). O acetaldeído é um composto tóxico, podendo contribuir para a hepatotoxicidade do etanol. Ocorre ainda um pequeno grau de esterificação do etanol com vários ácidos graxos nos tecidos, podendo estes contribuir para a toxicidade a longo prazo (Lieber, 2000). A álcool desidrogenase oxida o etanol e concomitantemente reduz a adenina dinucleotídeo (NAD) a NADH. O metabolismo do etanol resulta, portanto em queda do NAD, ocorrendo assim conseqüências metabólicas como aumento da produção de lactato e redução da velocidade do ciclo de Krebs.

Outras vias relacionadas com o metabolismo do etanol são a do sistema de metabolização microssomal do etanol e o sistema de catalase binária associada aos

peroxissomas, ambas tendo importância secundária. A tolerância de alcoólatras a várias drogas psicoativas tem sido atribuída geralmente a uma adaptação do SNC, mas adaptações metabólicas têm sido agora muito consideradas em virtude do *clearance* de muitas drogas no sangue estar aumentado nos alcoólatras (Lieber, 2000; Leo et al., 1992).

1.4.3 ETANOL E NEUROTRANSMISSORES

Pesquisas anteriores não são conclusivas quanto às alterações causadas pelo etanol nos sistemas de neurotransmissores. Assim, enquanto alguns estudos (Di Chiara & Imperato, 1985; O'Brien et al., 1995) mostram que a administração de etanol induz liberação de dopamina e serotonina no núcleo caudado e núcleo acumbente de ratos, outros (Rossetti et al., 1992) observaram que a retirada aguda de álcool reduz a concentração extracelular de dopamina no núcleo accumbens. Esses achados fortalecem a hipótese de que a dopamina é um neurotransmissor fundamental na mediação do efeito de reforço e recompensa de substância de abuso no cérebro (Koob et al., 1987).

Também, estudos clínicos indicam que inibidores de recaptação de 5-HT exibem alguma eficácia em reduzir o alcoolismo (Naranjo & Sellers, 1989). O sítio de ação dos inibidores de recaptação não é conhecido, porém é possível que eles atuem na via de reforço central no sentido de modificar a ação do etanol (Brodie et al., 1995).

As interações entre o etanol e os sistemas de transmissores monoaminérgicos são complexas. Mecanismos dopaminérgicos e noradrenérgicos, associados com o sistema dos opióides endógenos no cérebro, parecem estar implicados com o efeito de reforço do etanol via retroalimentação positiva (Nevo & Hamon, 1995), enquanto o sistema serotoninérgico medeia o reforço negativo (Selim & Bradberry, 1996). Outro fator relevante para o etanol alterar os neurotransmissores do SNC são as interações do tipo auto-modulatórias que ocorrem

entre esses sistemas. Assim, os níveis de dopamina podem ser modulados por peptídeos opióides endógenos, glutamato e 5-HT no SNC (Sershen et al., 2000; Nevo & Hamon, 1995).

Muitos estudos são realizados também em relação a ação do etanol como solvente lipídico em alterar a função geral das membranas neuronais através de alterações nos lipídios. Tais ações gerais nas membranas parecem ser incompatíveis com as ações neuropsicofarmacológicas do etanol, isto é, seus efeitos na coordenação motora, cognição, bem como nos efeitos euforigênicos e ansiolíticos, porém efeitos celulares seletivos do etanol têm sido reportados. Neurônios dopaminérgicos da ATV e substância negra são ativados em resposta a administração sistêmica de etanol. A ativação ocorre somente com doses relativamente baixas de etanol e o efeito pode ser deprimido pela anestesia. Como os neurônios da substância negra pars reticulata são deprimidos pelo etanol, o que pode ser um efeito GABA-mediado, a ativação de neurônios dopaminérgicos pelo etanol pode resultar em sua desinibição. No hipocampo e córtex cerebral, o etanol facilita o efeito depressor da somatostatina e aumenta os efeitos excitatórios das respostas colinérgicas muscarínicas.

1.5 COCAÍNA E ETANOL

O uso de cocaína nos Estados Unidos tem demonstrado proporções epidêmicas, com estimativas de que 15% da população já utilizou cocaína pelo menos uma vez na vida e 3 milhões de pessoas são usuárias crônicas (Abelson and Miller 1998). Mais recentemente foi estabelecido que 62 – 90% dos usuários de cocaína são também usuários concomitantes de etanol (Weis et al., 1988; Grant and Hardford 1990; Rounsaville et al., 1991) sendo, portanto o uso simultâneo comum. Pesquisas mostram que, nos Estados Unidos, houve um aumento de 2,4 a 6% na ingestão de drogas de abuso em associação, entre as quais, cocaína e o álcool.

O álcool em combinação com a cocaína é a associação mais freqüente de substâncias de abuso utilizada por viciados que se apresentam comumente para receber atendimento em emergências dos hospitais de grandes cidades. Os usuários de cocaína relatam que o uso de etanol durante a ação da cocaína prolonga as propriedades euforigênicas da cocaína em adição a uma diminuição dos efeitos físicos e psicológicos indesejáveis como a paranóia primária e agitação.

O uso da combinação de drogas promove em alguns indivíduos diminuição da disforia associada com a cocaína. O uso desta associação pode resultar não somente no aumento da euforia, mas também numa maior toxicidade. Embora estes efeitos possam ocorrer devido as propriedade inerentes do etanol, evidências recentes sugerem que a interação metabólica entre cocaína e etanol promove a formação de um metabólito ativo (Cami et al., 1991; Hearn et al., 1991; Jatlow et al., 1991).

O cocaetileno é um metabólito ativo da cocaína que é formado no fígado na presença de etanol (Figura 8). A formação do cocaetileno ocorre através da transesterificação da benzoilecgonina. Estudos sugerem uma maior letalidade do cocaetileno em comparação com a cocaína em animais e uma relação entre o cocaetileno e agitação violenta em humanos. De fato, muitos dos efeitos aumentados

observados quando etanol é utilizado em associação com cocaína podem resultar da formação do cocaetileno.

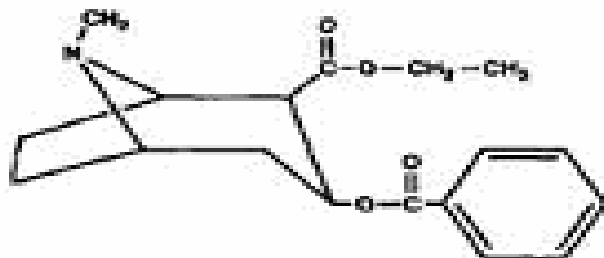


Figura 8 – Representação estrutural do cocaetileno

O cocaetileno parece produzir efeitos euforizantes mais intensos que os da cocaína isolada e tem demonstrado efeitos convulsivantes equipotentes aos da cocaína em estudos animais. Os efeitos tóxicos do cocaetileno podem decorrer da sua ação de bloqueio da recaptação de dopaminérgico na fenda sináptica, favorecendo assim a ação da cocaína. Esta ação pode também ser a base da alta incidência de abuso da combinação cocaína-etanol. Este metabólito tem sido detectado na urina de indivíduos com histórico de uso da associação entre cocaína e etanol (Rafla and Epstein 1979; Smith 1984).

Dados recentes têm demonstrado a presença de altos níveis de cocaetileno em amostras sanguíneas de vítimas fatais de overdose e de pacientes emergências que tinham ingerido recentemente cocaína e etanol (Hearn et al., 1991; Jatlow et al., 1991). Achados neuroquímicos e comportamentais sugerem que cocaetileno apresenta efeitos psicotrópicos em comum com a cocaína. Tem sido demonstrado que o cocaetileno, similarmente a cocaína, se liga ao transportador da dopamina, bloqueando a recaptação de dopamina no núcleo accumbens após administração sistêmica.

O cocaetileno promove ainda incremento da atividade locomotora em ratos, demonstrando ser equipotente em relação à cocaína para promover estes efeitos, o

que é característico de drogas psicoestimulantes com potencial de abuso (Jatlow et al., 1991). Diferentemente da cocaína, o cocaetilenol tem poucos efeitos no transportador de serotonina (Hearn et al., 1991; Bradberry et al., 1993).

A habilidade da cocaína em intensificar os efeitos euforizantes do etanol e o abuso comum de etanol por viciados em cocaína sugere uma interação entre as duas drogas. A via dopaminérgica mesolímbica está relacionada com alguns dos efeitos de reforço de drogas de abuso como o etanol e a cocaína.

Os corpos celulares dos neurônios dopaminérgicos são encontrados na área tegumentar ventral (ATV) e enviam projeções para duas regiões terminais separadas, o córtex pré-frontal e o núcleo accumbens. Cocaína e etanol promovem um aumento da concentração de dopaminérgico no Núcleo accumbens, atuando em pontos e por mecanismos diferentes na via mesolímbica.

A cocaína inibe a recaptação de dopaminérgico e serotonina no núcleo accumbens enquanto que o etanol aumenta a intensidade da liberação de dopaminérgico na ATV. Em adição, o etanol também ativa diferentes sistemas neurotransmissores incluindo o sistema opióide endógeno. O cocaetilenol, por sua vez, apresenta ações semelhantes às da cocaína, promovendo bloqueio da recaptação de dopamina.

A cocaína reverte alguns dos efeitos do etanol na performance psicomotora bem como incrementa alguns dos efeitos subjetivos prazerosos associados com o uso das drogas isoladamente. O uso da cocaína em combinação com o etanol pode resultar não só no aumento e prolongamento da euforia, como também em uma maior toxicidade.

Algumas respostas que resultam da interação entre o álcool ingerido oralmente e a cocaína cheirada incluem efeitos cardiovasculares (elevação do débito cardíaco e da pressão arterial) que não são observados com o seu uso isolado. A cocaína em combinação com etanol atenua a percepção subjetiva da sedação e o prejuízo da atividade locomotora resultantes do uso isolado do etanol. Estes efeitos subjetivos podem levar a um incremento do uso destas drogas em combinação. O uso da cocaína em associação com o etanol pode ainda incrementar significativamente o risco de reações adversas pela produção de cocaetileno pelo fígado, através do processo de transesterificação (conversão de um éster em outro) (Jatlow et al., 1991).

2 – OBJETIVOS

Como o mecanismo através do qual a cocaína produz sensibilização comportamental e reforço ainda não está bem determinado, e como também pouco se sabe sobre a maneira pela qual a associação cocaína-etanol promove aumento tanto do bem estar como da toxicidade, o objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da administração repetida de cocaína em associação com o etanol sobre os seguintes parâmetros:

- Atividade locomotora que foi conduzida nos dias de administração, para a determinação de diferenças entre o tratamento agudo (1 ° dia) e sub-crônicos (7 ° dia) com o intuito de se determinar se ocorreu uma sensibilização comportamental;

- Determinação dos níveis de dopamina (DA), 5- hidroxitriptamina (5-HT) e seus metabólitos: ácido 3, 4 dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA) e ácido 5- hidroxiindol- 3 acético (5-HIAA) em corpo estriado de ratos após um período de retirada de 24 h usando a técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com detecção eletroquímica;

- Densidade de receptores dopaminérgicos D1-símile, D2-símile e muscarínicos (M1+M2), dando ênfase aos valores de Bmax (densidade máxima de receptores) e Kd (constante de dissociação), em corpo estriado e hipocampo de ratos, sendo a determinação feita 24 h após a última injeção da droga;

- Efeito da droga sobre os níveis de enzimas séricas (TGO e TGP) em amostras sanguíneas coletadas entre o tratamento agudo (1º dia) e sub-crônicos (7º dia) com o intuito de se avaliar alterações bioquímicas promovidas pela associação destas drogas.

- Análise histopatológica de amostras de tecidos cerebrais, hepáticos e cardíacos, visando observar possíveis lesões microscópicas promovidas pelo uso destas drogas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar fêmeas, adultos-jovens, 2 - 4 meses, com peso variando entre 180 – 200 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará.

Durante todos os experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas com no máximo 6 animais, em condições ambientais semelhantes, com ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas, 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).

3.2 Material utilizado nos experimentos

- Agitador de tubos	Modelo 251, FANEM, SP, Brasil
- Balança analítica	Modelo H5, Mettler, Suíça
- Banho Maria	Modelo 102/1, FANEM, SP, BRASIL
- Bomba para HPLC	LC-10AD Shimadzu Corp., Japan
- Caixa de atividades	Cat. 7400 Ugo basile, Italy
- Degaseificador	DGU-2A Shimadzu Corp., Japan
- Detector eletroquímico	L-ECD-6A Shimadzu Corp., Japan
Equipamento de Millipore para filtração à vácuo	Millipore Apparatus, Bedford, MA, USA
- Centrífuga refrigerada	Modelo Marathon 26 KMR, Fisher Scientific
- Contador de cintilação líquida	Modelo Is 6500, Beckman, Fullerton, CA, USA
- Cubetas de plástico para leitura em espectrofotômetro	Sarstedt, Alemanha Oriental
- Espectrofotômetro	Modelo Beckman DU 640B, Fullerton, CA, USA
- Estufa para secagem	Modelo 315 SE FANEM, SP, Brasil

- Filtros de fibra de vidro	G/F Whatman, Maidstone, England
- Freezer	Modelo ULT 2586-3D14, Revco Scientific, Inc., USA
- Frascos de vidro para contagem de cintilação	Vials Beckman. Fullerton, Ca, USA
- Guilhotina	Harvard, USA
- Homogeneizadores manuais	Bellico, USA
- Integrador C-R6A Chormatopac	Shimadzu Corp., Japan
- Medidor de Ph	Modelo B374, Micronal, SP, Brasil
- Micropipetas	H.E., Pedersen, Dinamarca
- Sonificador	Modelo PT 10-35. Brinkmann Instruments Inc. NY, USA
- Unidade eletrônica (activity cage)	Cat. 7401 Ugo basile, Italy

3.3 PREPARO DAS DROGAS

3.3.1 COCAÍNA

Cocaína (cloridrato de cocaína, fornecido pela Polícia Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil) foi dissolvida em água bidestilada, obtendo-se a concentração de 10 e 20 mg/mL para ser administrada na dose de 10 e 20 mg/kg.

3.3.2 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE PUREZA DA COCAÍNA

Para determinação do grau de pureza, foram realizadas análises físico-químicas no Laboratório de Perícia da Polícia Federal. Entre os testes realizados, foram determinados o ponto de fusão e o comportamento da substância em cromatografia, sempre comparando os resultados com os valores de um padrão da Polícia Federal.

Com relação ao ponto de fusão, um parâmetro que nos permite estimar o grau de pureza da cocaína na amostra, o valor encontrado para a amostra utilizada nos experimentos assinalados nesta dissertação foi de 140°C em relação ao padrão que registrou um valor de 180°C. Essa proximidade de valores significa que a amostra apresenta um alto grau de pureza em relação às drogas comumente utilizadas por viciados (cocaína de rua).

Outro parâmetro avaliado foi o comportamento da amostra em cromatografia. Como observado na figura 9, a amostra se comportou da mesma maneira que o padrão, comprovando novamente se tratar de cocaína.

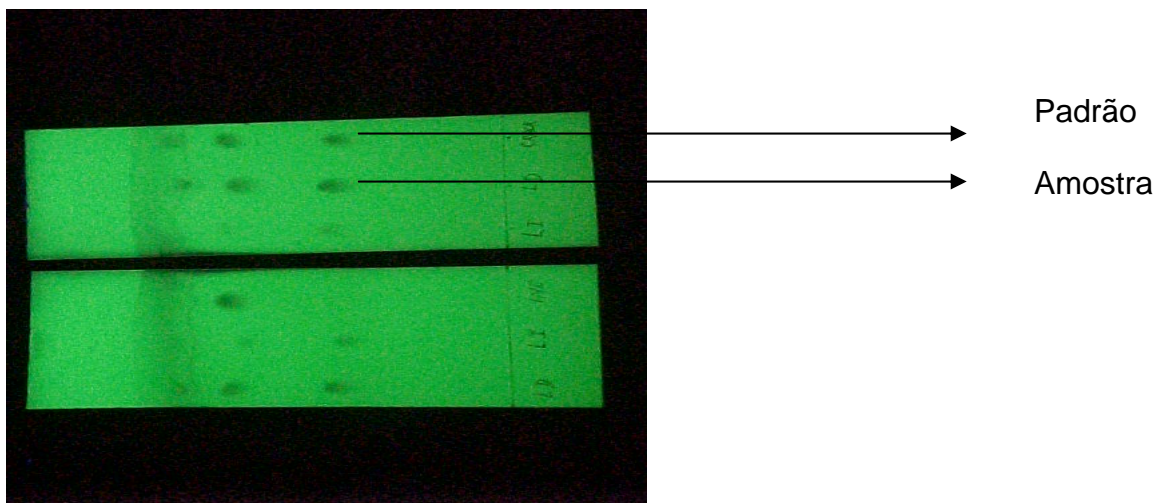


Figura 9 – Cromatografia da cocaína em comparação com padrão da Polícia Federal

3.3.3 ETANOL

O álcool etílico a 95%, P.A. (Lab. VETEC, Brasil) foi utilizado para o preparo de solução a 20% (em água bidestilada). Esta foi administrada em volume que variou conforme a concentração final desejada, obtendo-se as seguintes concentrações finais:

Droga	Concentração final	Volume administrado (animal de 200g)
Etanol 2 g/kg	0,2 g/mL	2 mL
Etanol 4 g/kg	0,2 g/mL	4 mL

3.4 TRATAMENTO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em grupos e tratados durante 7 dias com cocaína por via intraperitoneal (i.p.), etanol (por via oral, v.o.) e a combinação destes. Para o tratamento com etanol foi utilizada uma cânula intragástrica de polietileno. Trinta minutos após a última administração, os animais foram submetidos ao teste comportamental. Vinte e quatro horas após a última administração, os animais foram então sacrificados, seus cérebros removidos e a área cerebriil de interesse (corpo estriado) dissecada sobre gelo. Os animais controle foram tratados com solução salina 0,9%. Antes de sacrificar os animais, amostras de sangue (aproximadamente 2 mL) foram coletadas do plexo orbital em tubos siliconizados com gel separador para realização dos testes bioquímicos. O **Quadro 1** resume as drogas utilizadas com suas respectivas doses e vias de administração

Droga	Dose	Via de administração	Abreviatura
Etanol	2 g/kg	Oral	Et-2
	4 g/kg		Et-4
Cocaína	10 mg/kg	Intraperitoneal	Coc -10
	20 mg/kg		Coc -20

3.5 – ESTUDOS COMPORTAMENTAIS

3.5.1 TESTE DA ATIVIDADE LOCOMOTORA

Para realização do teste, foi utilizada a metodologia empregada por Shimada et al., (1997). Ratas foram acomodadas em caixas de atividade individuais, com 35 cm de comprimento, 23 cm de profundidade e 20 cm de altura (modelo 7400 Ugo Basile, Itália).

Durante todos os experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas com no máximo 6 animais, em condições ambientais semelhantes, em um ambiente livre de sons e com ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas. A atividade locomotora espontânea (ALE) foi determinada por 30 minutos nos períodos de pré e pós-administração, por uma unidade eletrônica (modelo 7401, Ugo basile). A ALE foi expressa como número de contagens/30 minutos, onde essa contagem representa o número de movimentos do animal.

3.6 DISSECAÇÃO DAS ÁREAS CEREBRAIS

Os animais foram decapitados com uma guilhotina (Harvard, USA), os encéfalos retirados rapidamente e colocados sobre papel alumínio em uma placa de Petri com gelo.

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 (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 (Zilles & Wree, 1985).

Terminada a dissecação, o corpo estriado foi colocado em papel alumínio previamente identificado e pesado, sendo então armazenado a -70°C para uso posterior. Quando necessária a estocagem por um certo período de tempo (no máximo 1 meses a -70°C), os tecidos foram considerados como tendo a mesma viabilidade para experimentação que os ensaiados imediatamente ou 24 horas após a dissecação (Burke & Greenbaun, 1987; Fielder et al., 1987).

3.7 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS

A densidade dos receptores muscarínicos foi determinada através de ensaios de ligação executados em homogenatos cerebrais. Para a determinação de receptores muscarínicos ($M_1 + M_2$)-símile foi utilizado o ligante não-específico [^3H]-N-metilescopolamina ([^3H]-NMS, 85 Ci/mmol – New England), de acordo com o método previamente descrito (Dombrowski et al., 1983).

- 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.

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 do estriado em gelo, como mencionado anteriormente, foram preparados homogenatos a 10% em tampão fosfato de sódio, 150mM, pH 7,4.

Rapidamente, os homogenatos contendo 50-100 µg de proteína foram incubados em tampão fosfato de sódio contendo entre 0,1282 a 6,41 nM de [³H]-NMS, na presença ou na ausência de sulfato de atropina 12,5 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 a 60°C por no mínimo 2 horas e colocados em frascos de vidro (*vials*) com 3 mL de um coquetel para 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, sendo os resultados expressos como fentomoles por miligrama de proteína. A concentração de proteínas 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-metilescopolamina ([³H]-NMS)

Cloridrato de [³H]-NMS (85 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, MA, USA), 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.

- 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).

3.8 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D₂-SÍMILE

A determinação da densidade dos receptores dopaminérgicos foi feita através de ensaio de *ligação* executados em homogenatos cerebrais:

- **Receptores D₂-símile**

Foi utilizado o ligante específico [3H]-espiroperidol (114,0 Ci/mmol - New England Nuclear, EUA), segundo uma adaptação do método previamente descrito (Kessler et al., 1991 e Meltzer et al., 1989).

- **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 (Kessler et al., 1991; Terai et al., 1989). Para bloquear os receptores serotoninérgicos foi utilizado um antagonista específico, a mianserina.

O butaclamol, um antagonista dopaminérgico, foi adicionado, na forma não marcada, nos *brancos* dos ensaios para receptor D₂ para determinar a radioatividade 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. O butaclamol acrescentado em concentração muito maior do que a [³H]-espiroperidol 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**

Logo após a dissecação do estriado em gelo, como mencionado anteriormente, foram feitos homogenatos a 10% em tampão tris-HCl 50mM, pH 7,4. Os homogenatdos contendo 50-100 µg de proteína foram incubados em tampão tris-HCl modificado (50 mM, pH 7,4) contendo 10 µM de mianserina

(incubada por 30 minutos à temperatura ambiente) para bloquear os receptores serotoninérgicos e 0,0952 a 7,616 nM de [³H]-espiroperidol para experimentos de saturação. No ensaio, o ligante foi incubado na presença e na ausência de butaclamol 10 µM, 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 horas e colocados em frascos de vidro (*vials*) com 3 mL de um coquetel para 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 butaclamol 10 µM, sendo os resultados expressos como fentomoles por miligrama de proteína. A concentração de proteínas foi determinada segundo o método de Lowry et al., 1951, utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

- Soluções reagentes

- [³H]-espiroperidol (114 Ci/mmol, Amersham Life Science, EUA)

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.

- **Tampão Tris-HCl**

Seis gramas 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**

Comprimidos de mianserina (Tolvon 30 mg, Organon, SP, Brasil) foram macerados e diluídos em tampão tris-HCl, obtendo-se uma concentração final de 10 µM.

- **Butaclamol (Cloridrato de butaclamol)**

Butaclamol (RBI, MA, EUA) 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, EUA) e 4,0 g de 2,5-difeniloxazol, PPO (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foram dissolvidos em 1000 mL de tolueno (Beckman, Fullerton, CA, EUA).

3.9 - DOSAGEM DE PROTEÍNA

3.9.1 MÉTODO

A quantidade de proteína em homogenatos cerebrais foi determinada a 25 °C, utilizando albumina sérica bovina como padrão, de acordo com o método previamente descrito (Lowry et al., 1951), que emprega duas reações de formação de cor para analisar a concentração protéica 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. Essa 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-Ciocalteu, que produz uma cor verde azulada intensa na presença de tirosina ou triptofano 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 comprimento de onda de 750 nm, através de um espectrofotômetro Beckam DU 640B.

3.9.2 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: Ciocalteu - Fenol (Labordin, Piraquara, PR, Brasil), 1:1 em água bidestilada;

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

3.10 DETERMINAÇÃO DE MONOAMINAS E SEUS METABÓLITOS COM HPLC

- MÉTODO

Para a determinação dos níveis de catecolaminas, foi utilizado o equipamento de HPLC (High Performance Liquid Chromatography). 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 24 h após a última injeção e, imediatamente, tiveram seus cérebros dissecados sob gelo. O CE foi utilizado para preparar homogenatos a 10 %. Os tecidos cerebrais foram sonicados em ácido perclórico (HClO_4) 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 (Figura 10), para a análise química.



Figura 10 - Aparelho de HPLC com detecção de fluorescência e eletroquímica

Para a análise das monoaminas, 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 foi 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 tetrahydrofurano 1,7 % v/v. Dopamina (DA), DOPAC (Ácido diidroxifenilacético (DOPAC), Ácido homovanílico (HVA), Serotonina (5-HT), Ácido 5-

hidroxiindolacético (5-HIAA) e Noradrenalina (NE) foram eletronicamente detectados usando um detector amperométrico (Modelo L-ECD-6A da Shimadzu, Japão) pela oxidação em um eletrodo de carbono vítreo fixado em 0,85 V relativo a um eletrodo de referência de Ag-AgCl.

- SOLUÇÕES REAGENTES

- **Fase Móvel**

Foram pesados 15,75 g de ácido cítrico (grupo química, RJ, 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, EUA) 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 10 mL de tetrahidrofurano (Sigma, MO, EUA) para um volume final de 500 mL.

- **Ácido Perclórico 0,1 M**

Foram adicionados 1,8 mL de ácido perclórico (Sigma, MO, EUA) em um balão volumétrico e completado o volume para 300 mL.

- **Padrões**

Os padrões foram preparados em uma concentração final de 4 ng de NE, dopaminérgico, 5-HT, DOPAC, HVA e 5-HIAA (Sigma, MO, EUA). A partir da altura ou área dos picos desses padrões, as amostras foram calculadas no

programa *Microsoft Excel* em um computador PC e os resultados expressos em ng/g de tecido.

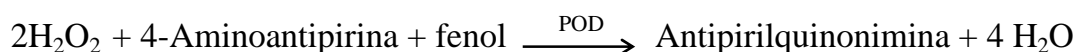
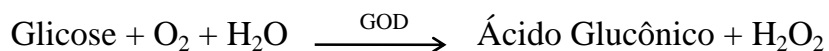
3.11 ANÁLISE BIOQUÍMICA

- **Obtenção das amostras:** As amostras de sangue foram coletadas do plexo orbital de ratos em tubos siliconados com gel separador, e submetidas a centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos para obtenção do soro.

3.11.1 MÉTODOS BIOQUÍMICOS

GLICOSE (TIESTZ, 1970)

- **Metodologia:** Enzimático - Glicose Oxidase
- **Princípio:** A glicose oxidase (GOD) catalisa a oxidação da glicose para ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. Através de uma reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase (POD), o peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, formando um complexo de cor vermelha (antipirilquinonimina), cuja absorbância é medida em 505 nm e a intensidade da cor é proporcional à concentração da glicose na amostra.



- **Reagentes:**
 - Reagente de Cor: Tampão Fosfato, fenol, Glicose Oxidase, Peroxidase, 4-Aminoantipirina, preservativos, estabilizadores e ativadores.
 - Padrão: 100 mg/dL;
 - conservação entre 2-8 °C;
 - armazenamento bem vedado para evitar evaporação;

- estável entre 15-25 °C.

- **Amostra:** Soro, plasma, líquido.
- **Técnica:** Foram utilizados 3 tubos e procedeu-se da seguinte maneira:

Tubos	Branco	Padrão	Teste
Amostra	-	-	0,01 mL
Padrão	-	0,01 mL	-
Reagente de cor	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Os reagentes foram misturados e colocados em banho-maria a 37 °C durante 15 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível do reagente nos tubos de ensaio. Foram determinadas as absorvâncias do teste e padrão em 505 nm, acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

- **Cálculo:**

➤ Método (1) – $\text{Abs do Teste} / \text{Abs do Padrão} \times 100 = \text{mg/dL}$

➤ Método (2) – $\text{Abs do Teste} \times \text{Fator de Calibração} = \text{mg/dL}$

$\text{Glicose (mg/dL)} = \text{Absorbância do teste} \times \text{fator}$

$\text{Fator de Calibração} = \text{Conc. do padrão} / \text{Abs do padrão}$

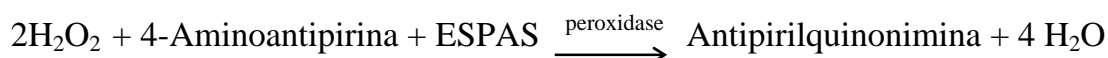
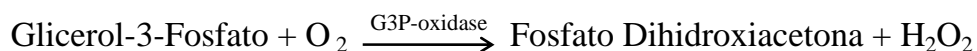
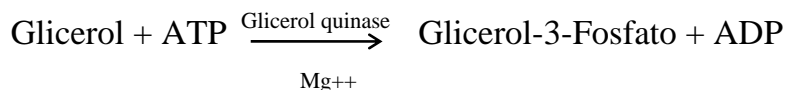
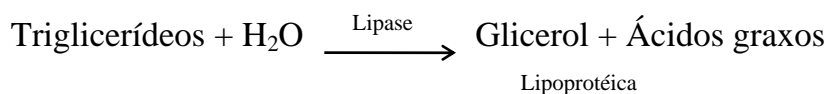
- **Linearidade:** A reação é linear até 400 mg/dL

TRIGLICÉRIDES (TONKS, 1970)

- **Metodologia:** Enzimático-Trinder

- **Princípio:** Os triglicerídes são hidrolisados pela lipase lipoprotéica e o glicerol liberado é fosforilado pela glicerol quinase, formando glicerol fosfato, que é oxidado a dihidroxiacetona, e água oxigenada por ação da glicerol-3-fosfato oxidase. Através da reação oxidativa catalisada pela peroxidase, a água oxigenada reage com

a 4-aminoantipirina e ESPAS, produzindo a antipirilquinonimina, cuja absorvância, medida em 540 nm, é diretamente proporcional à concentração de triglicerídios.



*ESPAS= N-etil-N(3-sulfopropil)-m-anisidina/surfatante

- **Reagentes:**

-Reagente de Cor: Tampão Fosfato, Lipase Lipoproteica, ATP, Glicerol Quinase, Mg⁺⁺, Glicerol-3-Fosfato Oxidase, 4-Aminoantipirina, Azida Sódica.

- Padrão: 100 mg/dL;

- conservação entre 2-8 °C;

- armazenamento bem vedado para evitar evaporação;

- estável entre 15-25 °C.

- **Amostra:** Soro.

- **Técnica:** Foram utilizados 3 tubos e procedeu-se como a seguir:

Tubos	Branco	Padrão	Teste
Amostra	-	-	0,01 mL
Padrão	-	0,01 mL	-
Reagente de cor	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturou-se e colocou-se em banho-maria a 37 °C, 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível do reagente nos tubos de ensaio.

Foram determinadas as absorvâncias do teste e padrão em 510 nm, acertando o zero com o branco.

- **Cálculo:**

- Método (1)– Abs do Teste/ Abs do Padrão x 100= mg/dL

- Método (2)– Abs do Teste x Fator de Calibração= mg/dL

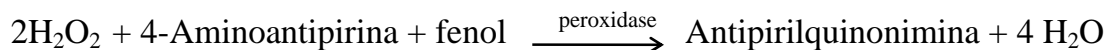
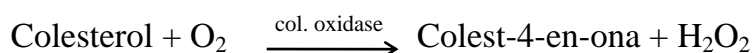
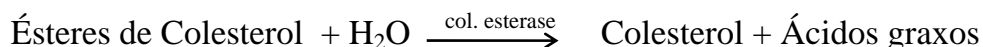
Triglicerídeos (mg/dL)= Absorbância do teste x fator

Fator de Calibração = Conc. do padrão / Abs do padrão

- **Linearidade:** A reação é linear até 800 mg/dL

- **Metodologia:** Enzimático-Trinder

- **Princípio:** Os ésteres do colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase formando colesterol livre que, após oxidação pela colesterol oxidase, forma peróxido de hidrogênio. Este, reagindo com o fenol e 4-aminoantipirina, através de copulação oxidativa catalisada pela peroxidase, produz uma quinonimina de cor vermelha, cuja absorvância, medida em 500 nm, é diretamente proporcional à concentração de colesterol da amostra.



- **Reagentes de Cor:** Tampão Fosfato, Colesterol Esterase, Colesterol Oxidase, Peroxidase, 4-aminoantipirina, Fenol, Azida Sódica.

- Padrão: 200 mg/dL .Conservar entre 2-8 °C.

- **Amostra:** Soro.

- **Técnica:** Foram utilizados 3 tubos e procedeu-se como a seguir:

Tubos	Branco	Padrão	Teste
Amostra	-	-	0,01 mL
Padrão	-	0,01 mL	-
Reagente de cor	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturou-se e colocou-se em banho-maria a 37 °C, 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível do reagente nos tubos de ensaio. Foram determinadas as absorvâncias do teste e padrão em 500 nm, acertando o zero com o branco.

- **Cálculo:**

- Método (1) – Abs do Teste/ Abs do Padrão x 200= mg/dL

- Método (2) – Abs do Teste x Fator de Calibração= mg/dL

Colesterol Total (mg/dL)= Absorbância do teste x fator

Fator de Calibração = Conc. do padrão / Abs do padrão

COLESTEROL HDL (TONKS, 1970)

- **Metodologia:** Enzimático-Trinder

- **Princípio:** As lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e os quilomícrons são quantitativamente precipitados com a mistura de ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio. Após centrifugação, o colesterol ligado as lipoproteínas de alta densidade (HDL) é determinado no sobrenadante por método colorimétrico enzimático.

- **Reagentes:**

- Reagente de cor: Tampão Fosfato, Colesterol Esterase, Colesterol Oxidase, Peroxidase, 4-aminoantipirina, Fenol, Azida Sódica;

- Sobrenadante;

- Padrão: 40 mg/dL;

- estável entre 15-25°C.

- **Amostra:** Soro.
- **Técnica:** Em um tubo de ensaio 12 x 75 foram colocados 0,25 mL de soro e 0,25 mL da solução precipitada. Agitou-se vigorosamente durante 30 segundos. Centrifugou-se a 3500 rpm durante 15 minutos.

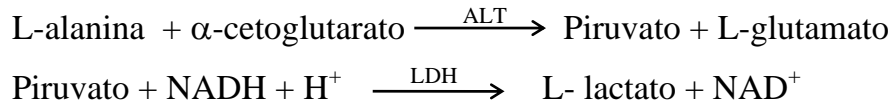
Tubos	Branco	Padrão	Teste
Sobrenadante	-	-	0,1 mL
Padrão	-	0,1 mL	-
Reagente de cor	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturou-se e colocou-se em banho-maria a 37 °C, 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível do reagente nos tubos de ensaio. Foram determinadas as absorvâncias do teste e padrão em 500 nm, acertando o zero com o branco.

- **Cálculo:**
 - Método (1) – Abs do Teste/ Abs do Padrão x 40= mg/dL
 - **Linearidade:** A reação é linear até 120 mg/dL

ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT/TGP/GPT) (TONKS, 1970; TIESTZ, 1970)

- **Metodologia:** Cinética-UV.
- **Princípio:** A ALT catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato, com a formação de glutamato e piruvato. Este é reduzido a lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto a coenzima NADH é oxidada a NAD⁺. A consequente redução da absorvância em 340 ou 365 nm, monitorizada espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.



- **Reagentes:**

- Reagente de Uso: Alfa-cetogluturato, L-alanina, Azida sódica, Tampão Tris pH 7.8, NADH e LDH. Conservar entre 2-8 °C.

- **Amostra:** Soro.

- **Técnica:** Foi pipetado 1,0 mL do Reagente de Uso, em um tubo de ensaio (12x75), e adicionou-se 0,1 mL de amostra. Homogeneizou-se e transferiu-se para a cubeta termostatizada e esperar 1 min. Foi feita a leitura da absorbância inicial (A_1), disparando simultaneamente o cronômetro. Repetiu-se a leitura após 2 minutos (A_2). Calculou-se a média das absorbâncias por minuto ($\Delta A/\text{min.}$) e esta foi utilizada no cálculo.

- **Cálculo:**

➤ Método (1) : 340 nm = $\Delta A/\text{min.} \times 1746 = \text{U/L}$

➤ Método (2) : 334 nm = $\Delta A/\text{min.} \times 1780 = \text{U/L}$

➤ Método (3) : 365 nm = $\Delta A/\text{min.} \times 3235 = \text{U/L}$

$\text{ALT (U/L)} = \Delta A (\text{Absorbância do teste}) / \text{min.} \times \text{fator}$

$\text{Fator de Calibração} = V_T \times 1000 / \epsilon \times V_A \times d$

V_T = volume total do ensaio

1000 = conversão de U/mL em U/L

ϵ = absortividade milimolar do NADH em nm

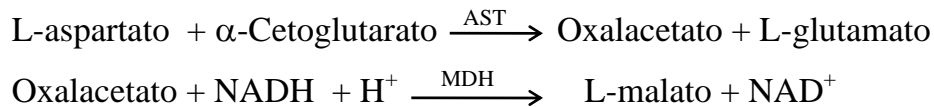
V_A = volume da amostra

d = espessura da solução

- **Linearidade:** A reação é linear até 500 U/L

ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST/TGO/GOT) (TONKS, 1970; TIESTZ, 1970)

- **Metodologia:** Cinética-UV.
- **Princípio:** A AST catalisa a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato, com formação de glutamato e oxalacetato. Este é reduzido a malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto a coenzima NADH é oxidada a NAD⁺. A consequente redução da absorvância em 340 ou 365 nm, monitorizada espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.



- **Reagentes:**
 - Reagente de Uso: Alfa-cetoglutarato, L-aspartato, Azida sódica, Tampão Tris pH 7.8, NADH, LDH e MDH. Conservar entre 2-8 °C.
 - **Amostra:** Soro, plasma.
 - **Técnica:** Pipetou-se 1,0 mL do Reagente de Uso, em um tubo de ensaio (12x75), e adiciono-se 0,1 mL de amostra. Homogeneizou-se e transferiu-se para a cubeta termostatizada e esperar 1 min. Foi feita a leitura da absorvância inicial (A₁), disparando simultaneamente o cronômetro. Repetiu-se a leitura após 2 minutos (A₂). Calculou-se a média das absorvâncias por minuto (ΔA/ min.) e esta utilizá-la no cálculo.
 - **Cálculo:**
 - Método (1) : 340 nm= ΔA/ min. x 1746= U/L
 - Método (2) : 334 nm= ΔA/ min. x 1780= U/L
 - Método (3) : 365 nm= ΔA/ min. x 3235= U/L
- AST (U/L)= ΔA (Absorvância do teste)/ min. x fator

$$\text{Fator de Calibração} = V_T \times 1000 / \epsilon \times V_A \times d$$

V_T = volume total do ensaio

1000= conversão de U/mL em U/L

ϵ = absortividade milimolar do NADH em nm

V_A = volume da amostra

d = espessura da solução

- **Linearidade:** A reação é linear até 500 U/L

4.0 – ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

4.1 – Procedimento experimental

Cérebros de ratos tratados e controles foram submetidos à análise histopatológica. Após 24 h da última injeção, os animais foram decapitados, os cérebros removidos e fixados em formalina a 10% por 72 horas. Cortes sagitais, feitos em intervalos de 1 mm, foram obtidos a partir de um corte inicial ao nível do quiasma óptico. Para dissecação de coração e fígado, foi feita uma incisão no externo para abertura da caixa torácica. Após a abertura, foi realizada a retirada de tais órgãos, seguindo-se a fixação em formalina a 10% durante 72 horas.

Para estudo micoscópico, secções de 10 µm foram feitas, coradas em Hematoxilina-Eosina e Nissl ou Violeta de Cresil, e analisadas com auxílio de um microscópio óptico. As áreas cerebrais foram observadas e classificadas de acordo com o Atlas de Paxinos & Watson (1986).

Para análise das lesões nas estruturas, foram observados os seguintes parâmetros: aspectos normais semelhantes aos controles ou a presença de células tumefietas, núcleos picnóticos, morte celular e vacuolização.

5.0 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi acompanhada por um computador PC, utilizando o programa *InsTat*. Para comparação de dados não paramétricos foram utilizados os testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney como testes *post hoc*. Já nos dados paramétricos, o teste “t” de Student foi utilizado para comparação de médias de dois grupos e Análise de Variância (Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*) para comparações múltiplas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas em $p < 0,05$.

6 - RESULTADOS

6.1 – Teste de atividade locomotora espontânea

Os resultados do teste de atividade locomotora espontânea (ALE) foram expressos como número de contagens/30 minutos. Como apresentado na Tabela 1 ocorreu um aumento na ALE no 7º dia de tratamento com cocaína nas doses de 10mg/kg e 20mg/kg, correspondendo a um aumento de 51,4 e 88,8% respectivamente, em relação à atividade registrada no grupo controle (Coc 10 = 611 ± 66 e Coc 20 = 762 ± 68 em relação ao controle = $403,5 \pm 20$). Não ocorreram alterações significativas em ambas as doses com relação às ações da cocaína no decorrer do tratamento com Coc 10mg (1º dia pós = 810 ± 49 ; 7º dia pós = 611 ± 44) e Coc 20mg (1º dia pós = 725 ± 71 ; 7º dia pós = 762 ± 68).

Os animais tratados com etanol apresentaram uma diminuição significativa da ALE no 7º dia de tratamento apenas com Etanol 2g em relação à atividade registrada no grupo controle, como visto na tabela 2. (Etanol 2g = $164,9 \pm 15,63$ e Etanol 4g = $402,2 \pm 25,06$ em relação ao controle = $403,5 \pm 20$). Com relação às ações do etanol no decorrer do tratamento, observou-se uma dessensibilização significativa da ALE com Etanol 4g no 7º dia em relação ao 1º dia (1º dia pós = $155,9 \pm 11,8$; 7º dia pós = $402,2 \pm 25,06$).

Na tabela 3, observa-se que a interação cocaína + etanol não promoveu alterações significativas na ALE no 7º dia de tratamento em ambas as doses em relação à atividade registrada no grupo controle (Interação baixas doses = $328,9 \pm 23,35$ e Interação altas doses = $324,6 \pm 10,3$ em relação ao controle = $403,5 \pm 20$).

Não foram observadas alterações significantes na ação da interação em ambas as doses no decorrer do tratamento.

Tabela 1 - Efeitos da administração repetida de cocaína sobre a atividade locomotora de ratos

GRUPO	30 minutos antecedentes a administração da droga		30 minutos posteriores a administração da droga	
	Dia 1	Dia 7	Dia 1	Dia 7
Controle	1025 ± 89	814 ± 94	399 ± 16,03	403 ± 20
Coc 10 mg/kg	1176 ± 83	867 ± 83	810 ± 49 ^a	611 ± 66 ^a
Coc 20 mg/kg	1075 ± 37	888 ± 47	725 ± 71 ^a	762 ± 68 ^a

A atividade locomotora espontânea foi medida por 30 minutos antes (pré) e por 30 minutos após a administração (pós) da cocaína nas doses de 10 e 20 mg/kg., i.p. Os valores representam média ± EPM (n= 14-18 ratos por grupo). **a** estatisticamente significante (p< 0,05. Anova e Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

Tabela 2 - Efeitos da administração repetida de etanol sobre a atividade locomotora de ratos

GRUPO	30 minutos antecedentes a administração da droga		30 minutos posteriores a administração da droga	
	Dia 1	Dia 7	Dia 1	Dia 7
Controle	1025 ± 89	814 ± 94	399 ± 16	403 ± 20
Etanol 2g/kg	1069 ± 73	704 ± 68	222 ± 24 ^a	164 ± 15 ^a
Etanol 4g/kg	1043 ± 84	814 ± 11	155 ± 11 ^a	402 ± 25 ^b

A atividade locomotora espontânea foi medida por 30 minutos antes (pré) e por 30 minutos após a administração (pós) de etanol 2 e 4g/kg, v.o. Os valores representam média ± EPM (n= 14-18 ratos por grupo). **a** estatisticamente significativa (p< 0,05. Anova e Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*) em relação ao controle do mesmo dia; **b** (Estatisticamente significativa (p< 0,05. Anova e Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*) em relação ao grupo tratado no primeiro dia.

Tabela 3 - Efeitos da administração repetida de cocaína + etanol sobre a atividade locomotora de ratos

GRUPO	30 minutos antecedentes a administração da droga		30 minutos posteriores a administração da droga	
	Dia 1	Dia 7	Dia 1	Dia 7
Controle	1025 ± 89	814 ± 94	399 ± 16	403 ± 20
Interação baixas doses	905 ± 66	670 ± 77	407 ± 68	328 ± 23
Interação altas doses	955 ± 76	957 ± 11	304 ± 16	324 ± 10

A atividade locomotora espontânea foi medida por 30 minutos antes (pré) e por 30 minutos após a administração (pós) de cocaína + etanol nas seguintes combinações de doses: Interação baixas doses (Cocaína 10mg/kg + etanol 2g/kg) e Interação altas doses (Cocaína 20mg/kg + etanol 4g/kg). Os valores representam média ± EPM (n= 14-18 ratos por grupo).

6.2 – Efeitos da administração repetida de cocaína, etanol e a combinação destes sobre as concentrações de DA, DOPAC e 5-HT em CE de ratos.

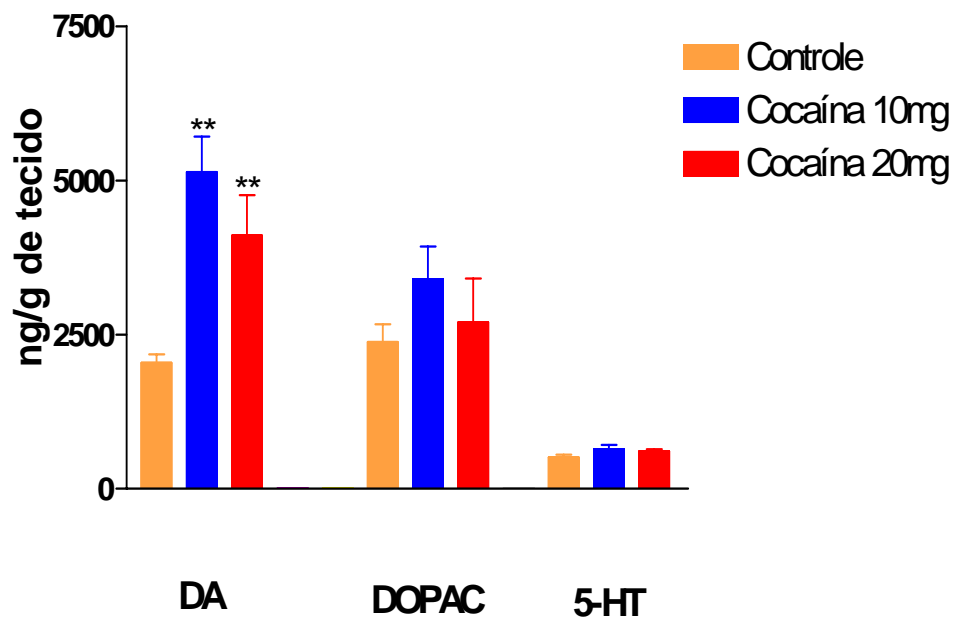
Os resultados da análise de monoaminas pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica foram expressos em ng/g de tecido. Os resultados das determinações

dos níveis de monoaminas em corpo estriado de ratos tratados por 7 dias com cocaína nas doses de 10 e 20 mg/kg, i.p. e sacrificados 24 h após a última administração mostraram um aumento expressivo (Figura 11) nos níveis de dopamina (controle = $2038 \pm 143,3$; coc 10 = $5135 \pm 572,6$ e coc 20 = $4102 \pm 660,2$). Os níveis de serotonina não foram alterados de maneira significativa quando comparados ao grupo controle.

A Figura 12 mostra que o etanol promoveu uma elevação dos níveis de dopamina (controle = $2038 \pm 143,3$; Etanol 2g = $3189 \pm 141,3$ e Etanol 4g = 3960 ± 273 , $p < 0,05$), enquanto seus metabólitos não sofreram alterações significantes. Por sua vez, no que se refere aos níveis de 5-HT, nenhuma alteração significativa foi observada quando comparados ao controle.

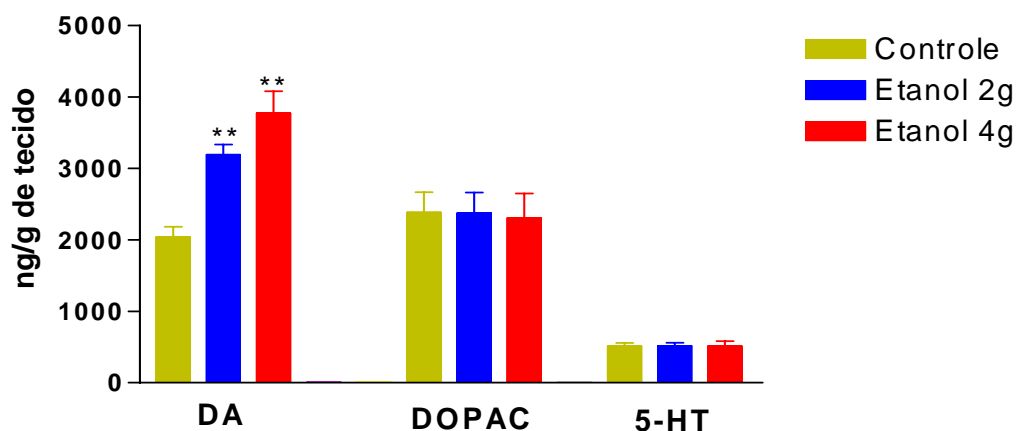
Com relação a associação entre cocaína e etanol, foi visto na figura 13 um aumento significativo dos níveis de dopamina em relação ao controle (controle = $2038 \pm 143,3$; Interação baixas doses = $4314 \pm 508,6$ e Interações altas doses = $4267 \pm 461,6$). Quanto aos metabólitos, a análise eletroquímica revelou uma diminuição nos níveis de DOPAC em ambas as doses, de forma dose-dependente (controle = $2380 \pm 283,6$; Interação baixas doses = $1979 \pm 296,3$ e Interação altas doses = $1121 \pm 92,13$). Já quanto a 5-HT, um aumento nos níveis foi detectado com a interação altas doses quando comparado ao controle ($510,0 \pm 46$), bem como a Interação baixas doses ($471,3 \pm 171,3$) e Interação altas doses ($813,7 \pm 18,81$).

Figura 11 - Concentrações de DA, DOPAC e 5-HT medidas em CE de ratos tratados com cocaína



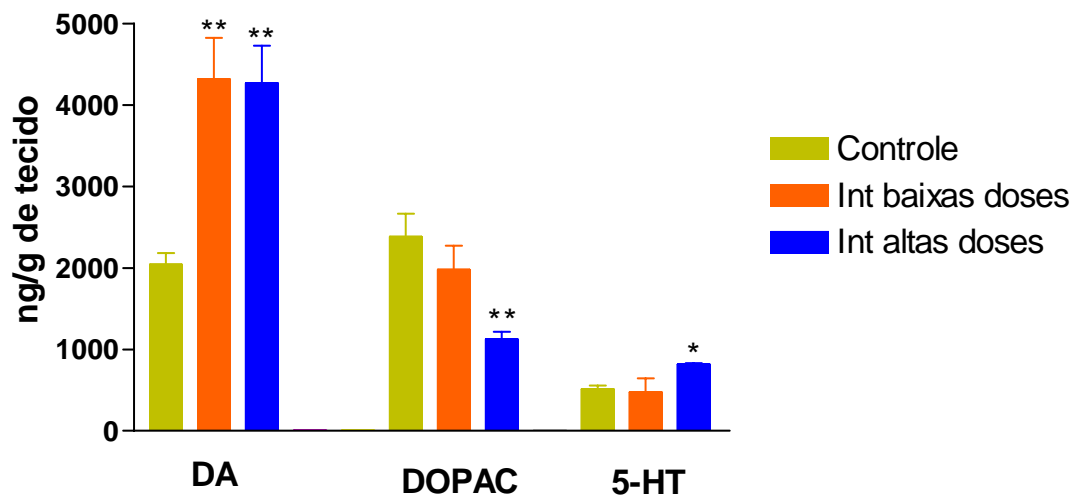
Os animais foram tratados diariamente por 7 dias com cocaína 10 e 20 mg/kg, i.p. e Etanol 2 e 4 g/Kg v.o., sendo decapitados 24 h após a última injeção. Os níveis dos neurotransmissores e metabólitos foram determinados em HPLC. Os valores representam a \bar{x} + EPM com (n) de 6 a 12 animais em cada grupo experimental. Para análise estatística, utilizou-se ANOVA e teste Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. * $p < 0,01$

Figura 12 - Concentrações de DA, DOPAC e 5-HT medidas em CE de ratos tratados com etanol



Os animais foram tratados diariamente por 7 dias com Etanol 2 e 4 g/Kg v.o., sendo decapitados 24 h após a última injeção. Os níveis dos neurotransmissores e metabólitos foram determinados em HPLC. Os valores representam a \bar{x} + EPM com (n) de 6 a 12 animais em cada grupo experimental. Para análise estatística, utilizou-se ANOVA e teste Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. * $p < 0,01$

Figura 13 - Concentrações de DA, DOPAC e 5-HT medidas em CE de ratos tratados com cocaína + etanol



Os animais foram tratados diariamente por 7 dias com cocaína 10mg + etanol 2g (interação baixas doses) e Cocaína 20 mg + etanol 4g (interação altas doses), sendo decapitados 24 h após a última injeção. Os níveis dos neurotransmissores e metabólitos foram determinados em HPLC. Os valores representam a \bar{x} + EPM com (n) de 6 a 12 animais em cada grupo experimental. Para análise estatística, utilizou-se ANOVA e teste Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*.

** VS controle $p < 0,01$ e * VS controle $p < 0,05$

6.3 – Efeitos da administração repetida de cocaína, etanol e a associação destes sobre os receptores D₂-símile em CE de ratos

Os resultados da determinação do número máximo de receptores (Bmax) e constante de dissociação (Kd) foram expressos em fmoles/mg de proteína e nM, respectivamente. Os valores representam média ± EPM com o número de experimentos feitos em duplicata em parênteses.

Os resultados da densidade de receptores D₂-símile em corpo estriado de ratos tratados com coc 10 e 20 mg/kg durante 7 dias são mostrados na Tabela 4 e Figura 14. Ocorreu uma diminuição no Bmax de 56,85 e 56,14% respectivamente com as doses de 10 e 20 mg/kg (controle = 312,4 ± 35; coc 10 = 134,8 ± 7 e coc 20 = 137,4 ± 6,7). Com relação ao Kd não foi observada nenhuma alteração (Controle = 0,55 ± 0,11; Coc 10 = 0,83 ± 0,02 ; Coc 20 = 1,12 ± 0,19).

O número de receptores D₂ estriatais dos animais tratados com etanol 2 e 4g v.o. pode ser visualizada na Tabela 4 e Figura 15. Foi vista uma diminuição significativa no Bmax somente com etanol 4g (Controle = 312,4 + 35; Etanol 2g = 239 + 18; Etanol 4g = 164 + 18), sem alterações no Kd (controle = 0,55 ± 0,11; Etanol 2g = 1,11 + 0,33; Etanol 4g = 1,7 ± 0,39).

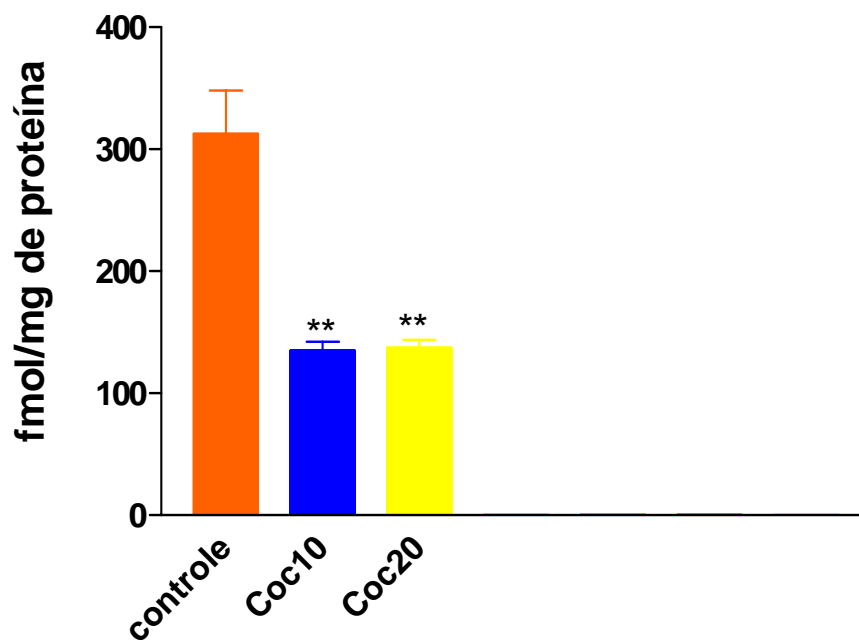
Com relação a associação cocaína + etanol, a Tabela 4 e figura 16 mostram uma diminuição significativa da densidade de receptores D₂-símile em corpo estriado de ratos tratados com a associação em ambas as doses (controle = 312,4 ± 35; Interação baixas doses = 161 ± 24 e Interação altas doses = 74 ± 4), não sendo observadas alterações nos valores de Kd.

TABELA 4 - Efeitos da administração de cocaína e etanol na densidade (Bmax) e Kd dos receptores dopaminérgicos D₂-símile em CE de ratos.

Grupos	D ₂ -SÍMILE	
	Bmax	Kd
Controle	312,4 ± 35 (7)	0,55 ± 0,11 (3)
Etanol 2g	239 ± 18 (5)	1,11 ± 0,33 (3)
Etanol 4g	164 ± 18 (7)**	1,7 ± 0,39 (3)
Cocaína 10mg	134,8 ± 7 (4)**	0,83 ± 0,023(3)
Cocaína 20mg	137,4 ± 6,7 (5)**	1,12 ± 0,19 (3)
Interação baixas doses	161 ± 24 (3)*	1,73 ± 0,82 (3)
Interações altas doses	74 ± 4 (3)**	1,73 ± 0,68 (3)

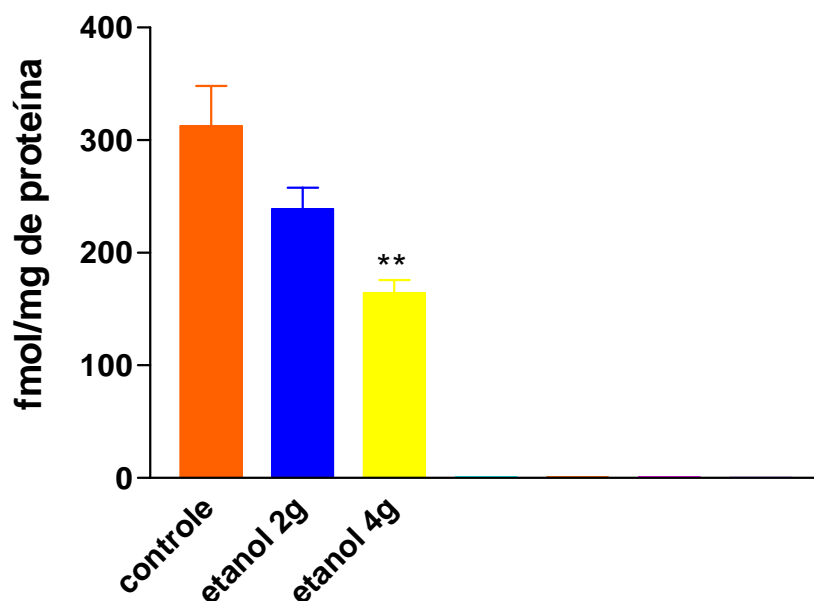
Animais foram tratados diariamente por 1 semana com cocaína 10 e 20 mg/kg, i.p., etanol 2 e 4 g/kg v.o. e interação cocaína 10mg + etanol 2g (baixas doses) e interação cocaína 20mg + etanol 4g (interação altas doses). O Scatchard dopaminérgico foi realizado com [³H]-spiroperidol e os resultados expressos em fmol/mg de proteína e nM em relação ao Bmax e Kd, respectivamente. Os valores representam as $x \pm$ EPM do número de experimentos mostrados em parênteses. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA e o Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. *p<0,05 comparado com o controle. **p< 0.01 comparado com controles.

Figura 14 - Efeitos da cocaína nos receptores dopaminérgicos D2-símile sobre os valores de Bmax em estriado de ratos



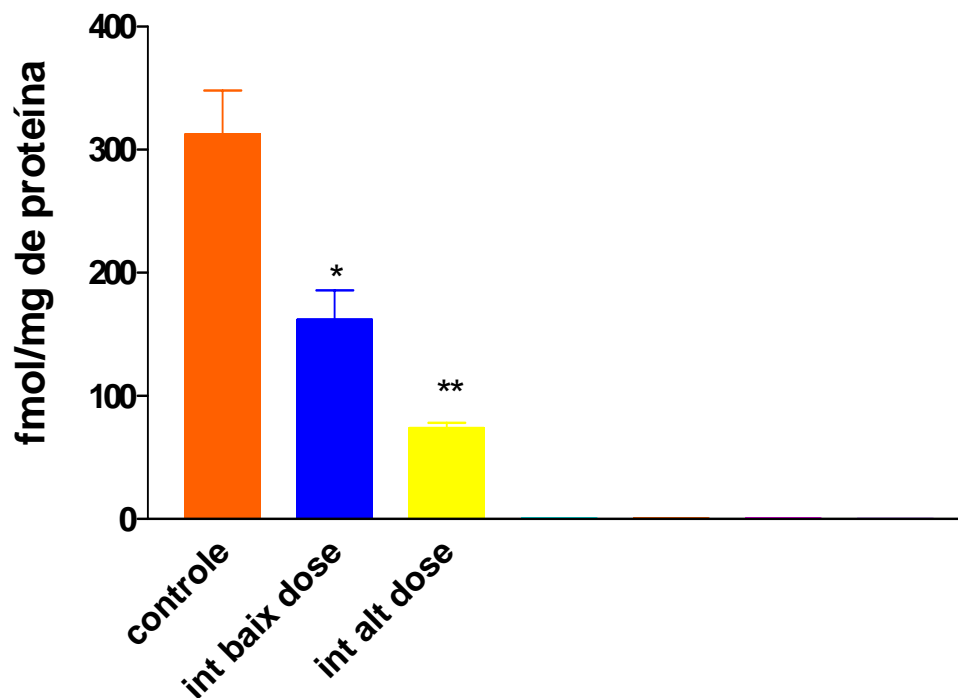
Os animais foram tratados diariamente por 7 dias com cocaína 10 e 20g/Kg i.p., sendo decapitados 24 h após a última injeção. O Scatchard dopaminérgico foi realizado com [³H]-spiroperidol e os resultados expressos em fmol/mg de proteína em relação ao Bmax. Os valores representam a x + EPM do n° de experimentos em cada grupo experimental. Para análise estatística, utilizou-se ANOVA e teste Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. **p<0,01

Figura 15 - Efeitos do etanol nos receptores dopaminérgicos D2-símile sobre os valores de Bmax em estriado de rat



Os animais foram tratados diariamente por 7 dias com Etanol 2 e 4 g/Kg v.o., sendo decapitados 24 h após a última injeção. O Scatchard dopaminérgico foi realizado com [³H]-spiroperidol e os resultados expressos em fmol/mg de proteína em relação ao Bmax. Os valores representam a \bar{x} + EPM do n^o de experimentos em cada grupo experimental. Para análise estatística, utilizou-se ANOVA e teste Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. **p<0,01

Figura 16 - Efeitos da associação cocaína + etanol nos receptores dopaminérgicos D₂-símile sobre os valores de Bmax em estriado de ratos



Os animais foram tratados diariamente por 7 dias com cocaína 10mg + etanol 2g (interação baixas doses) e cocaína 20mg + etanol 4 g (interação altas doses), sendo decapitados 24 h após a última injeção. O Scatchard dopaminérgico foi realizado com [³H]-spiroperidol e os resultados expressos em fmol/mg de proteína em relação ao Bmax. Os valores representam a \bar{x} + EPM do n^o de experimentos em cada grupo experimental. Para análise estatística, utilizou-se ANOVA e teste Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. *p<0,05. **p<0,01.

6.4 – Efeitos da administração repetida de cocaína, etanol e a associação destes sobre os receptores M1+M2 símile em CE

Os resultados da determinação do número máximo de receptores (Bmax) e constante de dissociação (Kd) foram expressos em fmoles/mg de proteína e nM, respectivamente. Os números mostrados nos resultados dos dados representam média \pm EPM e em parênteses está representado o número de experimentos feitos em duplicata.

A Tabela 5 mostra os resultados da densidade de receptores M1+M2 símile em corpo estriado de ratos tratados com coc 10 e 20 mg/kg, etanol 2 e 4 g/kg e a associação destes durante 7 dias. Não foram observadas alterações significativas nos valores de Bmax (controle = $427,33 \pm 56$; coc 10 = $410,1 \pm 10$; coc 20 = $399,1 \pm 43$; Et 2g = 450 ± 50 ; Et 4g = 400 ± 60 ; Int baixas doses = 397 ± 20 e Int altas doses = 402 ± 3) nem na constante de dissociação Kd nos grupos tratados em relação ao controle

TABELA 5 - Efeitos da administração de cocaína e etanol na densidade dos receptores muscarínicos em CE de ratos.

Grupos	(M ₁ + M ₂)-símile	
	Bmax	Kd
Controle	427,33 ± 56 (3)	1,29 ± 0,15 (3)
Etanol 2g	450 ± 50 (3)	1,34 ± 0,4 (3)
Etanol 4g	400 ± 60 (3)	1,1 ± 0,95 (3)
Cocaína 10mg	410,1 ± 10 (3)	1,23 ± 0,02 (3)
Cocaína 20mg	399,1 ± 43 (3)	1,10 ± 0,34 (3)
Interação baixas doses	397 ± 20 (3)	1,04 ± 0,40 (3)
Interações altas doses	402 ± 3 (3)	0,98 ± 0,52 (3)

Animais foram tratados diariamente por 1 semana com cocaína 10 e 20 mg/kg, i.p., etanol 2 e 4 g/kg v.o. e interação cocaína 10mg + etanol 2g (baixas doses) e interação cocaína 20mg + etanol 4g (interação altas doses), sendo as medidas realizadas 24 h após a última administração. O Scatchard muscarínico foi realizado com [3H]-NMS e os resultados expressos em fmol/mg de proteína e nM em relação ao Bmax e Kd, respectivamente. Os dados foram expressos como média ± EPM do número de experimentos mostrados em parênteses. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA e o teste Student-Newman-Keuls como teste *post hoc* quando $p < 0,05$.

6.5 – Efeitos da administração repetida de cocaína, etanol e a associação destes sobre os níveis de enzimas séricas

Os resultados da determinação dos níveis de enzimas séricas foram expressos em mg/dL ou U/L, respectivamente. Os números mostrados nos resultados representam média \pm EPM e em parênteses está representado o número de experimentos feitos.

A Tabela 6 mostra os resultados dos níveis séricos de TGO, TGP colesterol total em ratos tratados com coc 10 e 20 mg/kg, etanol 2 e 4 g/kg e a associação destes durante 7 dias. Os animais tratados com cocaína apresentaram em ambas as doses elevações dos níveis de TGO (controle = 106 ± 10 ; coc 10 = 131 ± 11 ; coc 20 = 144 ± 9) enquanto que os animais tratados com a associação altas doses apresentaram diminuição significativa (controle = 114 ± 7 ; Int altas doses = 101 ± 8).

Em relação aos níveis de TGP, a cocaína promoveu, em ambas as doses, diminuição significativa dos níveis séricos desta enzima (controle = 54 ± 7 ; coc 10 = 33 ± 3 ; coc 20 = 34 ± 2), o mesmo ocorrendo com os animais que receberam a associação altas doses (controle = 51 ± 7 ; int alt dose = 32 ± 3). Com relação ao colesterol total, ocorreu uma diminuição significativa dos níveis com os animais tratados com cocaína (controle = $66,8 \pm 3$; coc 10 = 53 ± 4 ; coc 20 = 43 ± 3), etanol 4g (controle = 69 ± 2 ; Et 4g = 43 ± 3) e a associação destes (controle = 69 ± 4 ; int baix dose = 52 ± 4 ; int alt dose = 52 ± 3).

A Tabela 7 mostra os resultados dos níveis séricos de TRI e HDL em ratos tratados com coc 10 e 20 mg/kg, etanol 2 e 4 g/kg e a associação destes durante 7 dias. Os animais tratados com Coc 10 (controle = 56 ± 3 ; coc 10 = 42 ± 4) apresentaram redução dos níveis de TRI, sendo que Coc 20 promoveu efeito contrario (controle = 36 ± 6 ; coc 20 = 51 ± 4). Os animais tratados com Et 4g apresentaram um aumento significativo dos níveis de TRI (controle = 46 ± 3 ; Et 4g

= 60 ± 3), enquanto que os animais tratados com a associação apresentaram diminuição dos níveis (controle = 74 ± 7 ; int bai dose = 53 ± 4 ; int alt dose = 49 ± 4). Em relação ao HDL, todos os grupos apresentaram diminuição significativa dos níveis séricos desta lipoproteína (controle = 29 ± 1 ; coc 10 = 22 ± 2 ; coc 20 = 21 ± 2 ; Et 2g = 24 ± 1 ; Et 4g = 20 ± 2 ; Int bai dose = 23 ± 2 ; Int alt dose = 23 ± 2).

Tabela 6 – Efeitos da administração de cocaína, etanol e a associação destes nos níveis de TGO, TGP e Colesterol total

Grupo		TGO	TGP	Col .T
Cocaína 10mg/kg	pré	106 ± 10(9)	54 ± 7(10)	66,8 ± 3(9)
	pos	131 ± 11(10)*	33 ± 3(10)*	53 ± 4(10)*
Cocaína 20mg/kg	pré	123 ± 9(11)	51 ± 7(9)	69 ± 3(10)
	pos	144 ± 9(10)**	34 ± 2(11)*	43 ± 3(10)***
Etanol 2g/kg	pré	139 ± 7(10)	43 ± 6(9)	60 ± 1(10)
	pos	133 ± 6(9)	47 ± 6(9)	51 ± 5(9)
Etanol 4g/kg	pré	142 ± 6(10)	48 ± 6(10)	69 ± 2(9)
	pos	127 ± 7(9)	45 ± 6(8)	43 ± 3(9)***
Interação Baixa dose	pré	111 ± 6(10)	40 ± 3(7)	69 ± 4(9)
	pos	110 ± 6(9)	40 ± 3(11)	52 ± 4(10)*
Interação Alta dose	pré	114 ± 7(10)	51 ± 7(10)	70 ± 4(11)
	pos	101 ± 8(9)*	32 ± 3(9)*	52 ± 3(9)*

Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com cocaína (10 e 20mg/kg, i.p.), etanol (2 e 4 g/kg, v.o.) e as associações cocaína 10mg + etanol 2g (interação baixas doses) e cocaína 20mg + etanol 4g (interação altas doses) ou água destilada. O sangue dos animais foi coletado 24 h após a última administração das drogas, pelo plexo orbital, para análise bioquímica. Os dados em mg/dL ou U/L são representados como média ± EPM do número de experimentos mostrado em parênteses. Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*.

*p<0,05;**p<0,01;***p<0,001

Tabela 7 – Efeitos da administração de cocaína, etanol e a associação destes nos níveis de Triglicerídeos e HDL

Grupos		Tri	HDL
Cocaína	pré	56 ± 3(8)	29 ± 1(10)
10mg/kg	pos	42 ± 4(8)**	22 ± 2(10)*
Cocaína	pré	36 ± 6(7)	29 ± 1(11)
20mg/kg	pos	51 ± 4(10)*	21 ± 2(10)*
Etanol	pré	60 ± 10(9)	31 ± 1(10)
2g/kg	pos	54 ± 5(8)	24 ± 1(10)*
Etanol	pré	46 ± 3(9)	29 ± 1(10)
4g/kg	pos	60 ± 3(8)**	20 ± 2(9)*
Interação	pré	74 ± 7(11)	28 ± 1(11)
Baixa dose	pos	53 ± 4(10)*	23 ± 2(10)*
Interação	pré	74 ± 5(7)	29 ± 1(10)
Alta dose	pos	49 ± 4(8)**	23 ± 2(9)*

Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com cocaína (10 e 20mg/kg, i.p.), etanol (2 e 4 g/kg, v.o.) e as associações cocaína 10mg + etanol 2g (interação baixas doses) e cocaína 20mg + etanol 4g (interação altas doses) ou água destilada. O sangue dos animais foi coletado 24 h após a última administração das drogas, pelo plexo orbital, para análise bioquímica. Os dados em mg/dL ou U/L são representados como média ± EPM do número de experimentos mostrado em parênteses. Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e o teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*.

*p<0,05;**p<0,01;***p<0,001

6.5 – Análise histopatológica de animais tratados com cocaína, etanol e a associação destes

Os animais tratados com cocaína (10 e 20mg/kg), etanol (2 e 4 g/kg) e as associações cocaína 10mg + etanol 2g (interação baixas doses) e cocaína 20mg + etanol 4g (interação altas doses) não apresentaram alterações nos estudos histopatológicos, feitos nas estruturas cerebrais.

Com relação ao músculo cardíaco, a cocaína em ambas as doses promoveu congestão e edema intersticial, mas sem necrose. Os animais tratados com etanol nas doses estudadas apresentaram alterações histopatológicas semelhantes ao grupo tratado com cocaína, porém estas alterações se mostraram mais intensas. Os animais tratados com a interação (em ambas as doses) também apresentaram no músculo cardíaco edema acompanhado de congestão, mas sem necrose evidente (figura 17).

O estudo histopatológico do fígado dos animais tratados com cocaína mostrou que, no grupo Coc 10mg ocorreu dilatação de sinusóides (congestão) acompanhada de uma ocorrência difusa de aglomerados linfóides em espaços portais. Já com o grupo Coc 20, foi observada uma intensificação da lesão, com edema, aglomerado de células inflamatórias (linfócitos) no interstício (necrose), células com citoplasma mais claro próximo a veia centrolobular e presença de microinfiltrados no interstício. No grupo tratado com etanol 2g/kg, foi observada microvesiculação com áreas de degeneração mais hidrófila, congestão e dilatação dos seios.

Os animais tratados com etanol 4g/kg apresentaram no tecido hepático intensificação da lesão com agregados linfóides, congestão e dilatação sinusóide e presença de área de degeneração hidrófita (perda de coloração do citoplasma) em estágio inicial. Quanto ao grupo tratado com as interações, ocorreu uma potencialização da promoção de lesões em relação aos tratamentos com as drogas individuais. Os animais tratados com a interação em baixas doses apresentaram congesta, hipertrofia e hiperplasia das células de Kupfer, microagregados de células

mononucleares em torno da veia centrolobular no interstício e congestão. Por sua vez, o grupo tratado com a interação em altas doses apresentou no tecido hepático Congestão nítida, degeneração mais acentuada dos hepatócitos que nos demais grupos estudados, alguns hepatócitos com núcleo hipercromático e áreas de degeneração hidrófita em torno da região centrolobilar (figura 18).

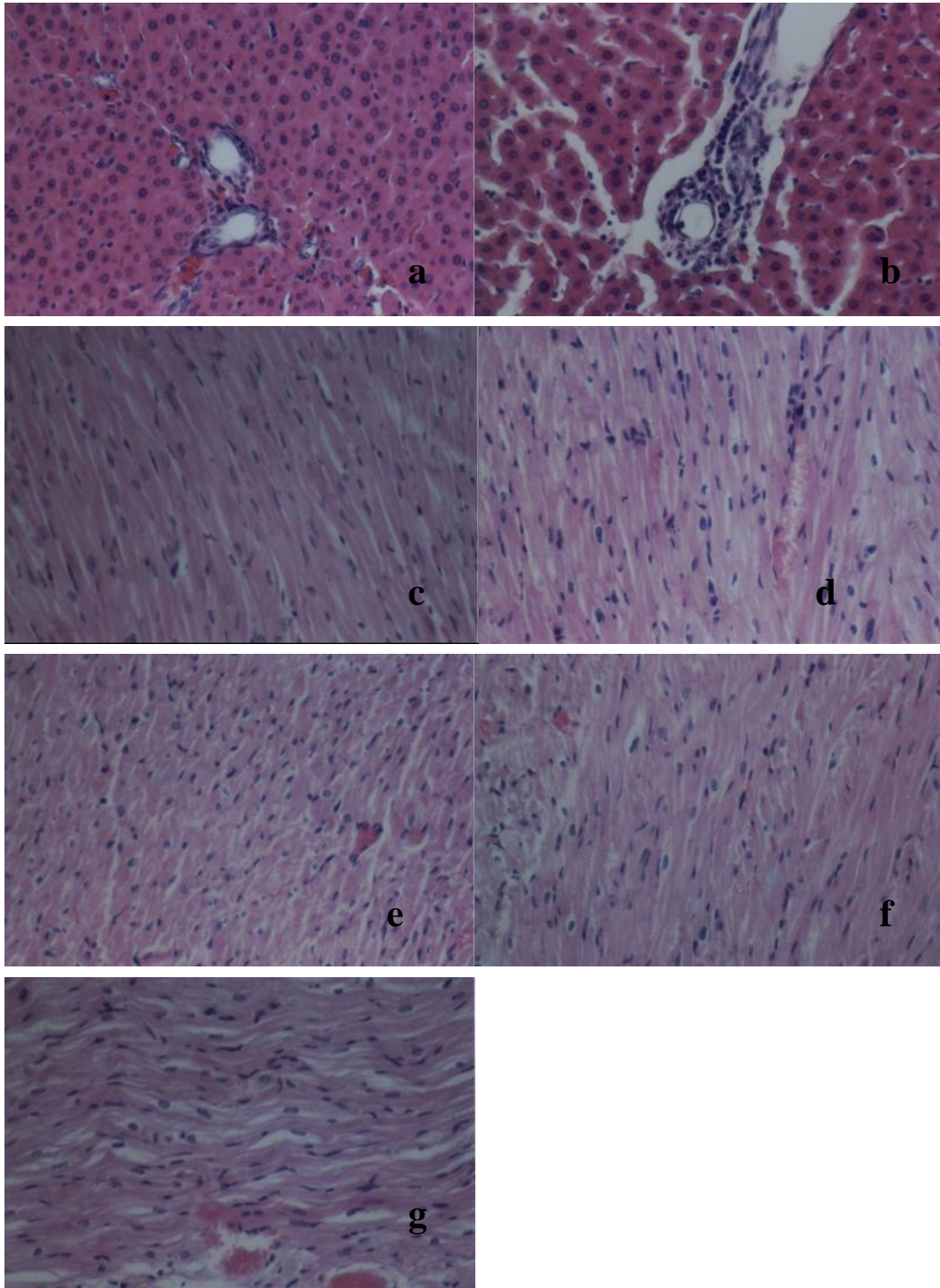


Figura 17 – **a)** Músculo cardíaco normal de ratos tratados com salina. **b e c)** Músculo cardíaco de ratos tratados com cocaína 10 e 20mg respectivamente. **d e e)** Músculo cardíaco de ratos tratados com etanol 2 e 4g/kg respectivamente. **f e g)** Músculo cardíaco de animais tratados com interação baixas doses e altas doses respectivamente (aumento de 200 x).

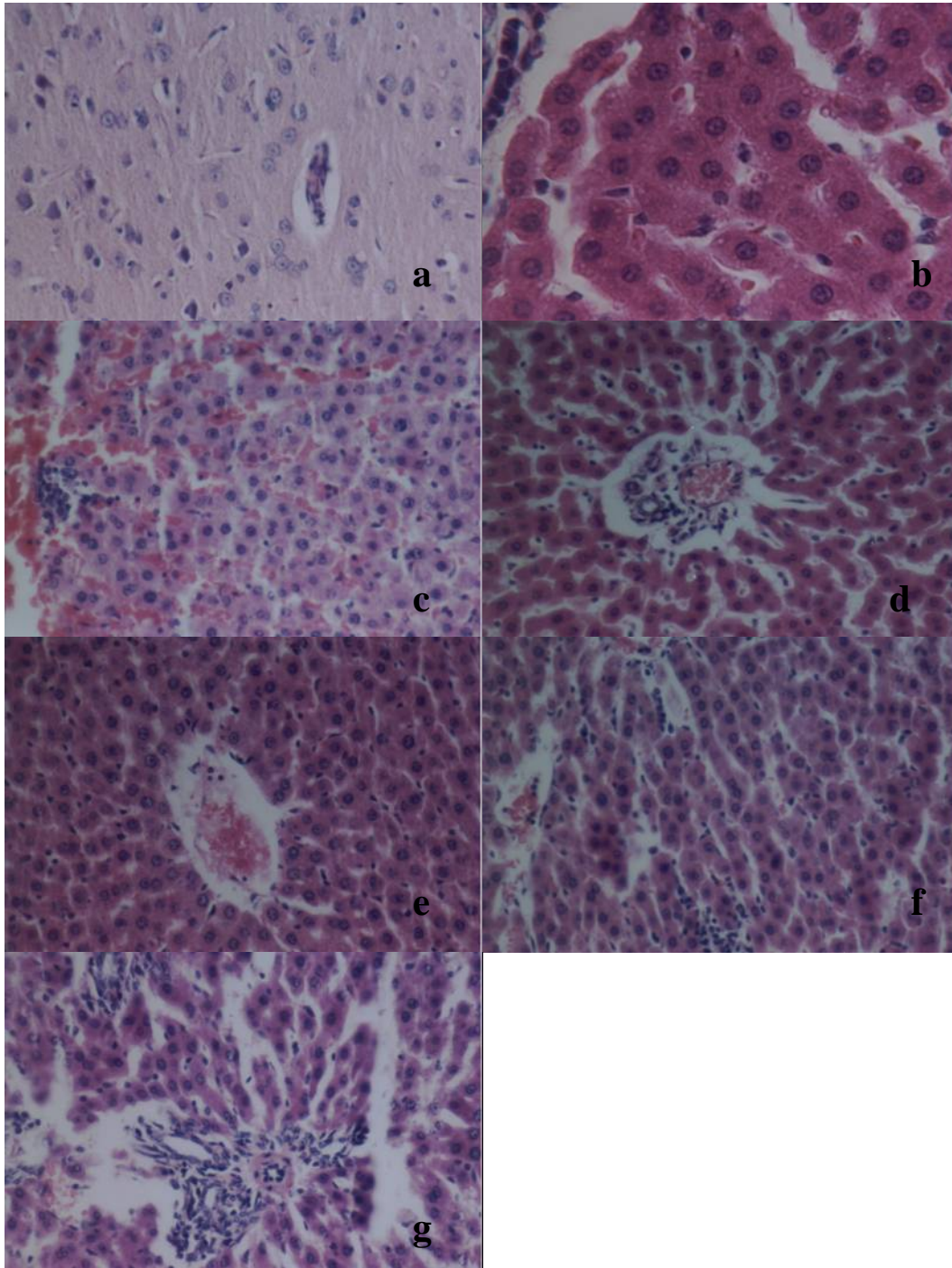


Figura 18 – a) Fígado normal de ratos tratados com salina. b e c) Fígado de ratos tratados com cocaína 10 e 20mg respectivamente. d e e) Fígado de ratos tratados com etanol 2 e 4g/kg respectivamente. f e g) Fígado de animais tratados com interação baixas doses e altas doses respectivamente (aumento de 200 x).

7 – DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo estudar as alterações neurobiológicas (níveis de monoaminas – DA, DOPAC e 5-HT, receptores muscarínicos e dopaminérgicos D₂), bioquímicas e histopatológicas desencadeadas pelo uso sub-crônico da cocaína, etanol e a associação destes em CE de ratos 24 h após a retirada das drogas em animais sensibilizados comportamentalmente.

Neurônios dopaminérgicos mesolímbicos que se originam na ATV e se projetam no Núcleo accumbens e outras áreas do mesencéfalo são substratos bem conhecidos para a recompensa e o reforço e são também importantes alvos para a ação da cocaína, cocaetileno e outros psicoestimulantes. Muitos estudos descrevem os efeitos da administração de drogas nesta via (Wise & Bozarth, 1987; Koob & Bloom, 1988; Kuhar et al., 1991) sendo que os mais recentes, feitos em animais, observaram os efeitos que ocorrem com a retirada após administração repetida de cocaína nos parâmetros bioquímicos associados com neurônios mesolímbicos. Os resultados mostraram mudanças importantes e prolongadas nos neurônios durante o período de retirada. Alterações nos neurotransmissores, receptores ou enzimas freqüentemente refletem algumas modificações gerais ou perturbações e isto pode criar um neurônio anormal. Estas mudanças podem ser similares àquelas que ocorrem em humanos durante a retirada após um uso crônico e, dessa forma, auxiliar no entendimento das bases ou alguns aspectos do desejo e recaída ao uso de drogas (Kuhar et al., 1996).

Nos nossos experimentos, o período de retirada foi de 24 h, período este que deve ser entendido como o tempo decorrido após o último dia de tratamento com cocaína, etanol e a associação destes, tendo o tratamento a duração de 7 dias, o que não implica necessariamente em uma síndrome de abstinência fisiológica ou comportamental.

A administração continuada de psicoestimulantes em roedores resulta em um aumento progressivo na resposta locomotora estimulante a uma subsequente dose adicional do psicoestimulante (Robinson e Becker 1986; Kalivas e Stewart 1991). Este fenômeno é referido como *sensibilização comportamental* e é utilizado como modelo animal para o aumento progressivo da disforia, ansiedade e paranóia que freqüentemente estão associados com o abuso crônico de psicoestimulantes (Segal e Weinstock 1983; Post e Weiss 1988). Esta sensibilização à cocaína pode ser produzida por uma única exposição à droga e é de longa duração (Post & Rose, 1976).

Os nossos resultados demonstraram que a cocaína apresentou uma atividade estimulante do sistema nervoso central, visto que houve um aumento na atividade locomotora produzida pela cocaína no 7º dia em relação ao aumento produzido no 1º dia. O aumento no 7º dia foi significativo em relação ao 1º dia de tratamento, não havendo diferenças entre os resultados do controle, sendo este um dos critérios para se determinar uma sensibilização comportamental. A literatura relata que esta sensibilização comportamental acarreta várias modificações principalmente no SNC. Neste trabalho em particular, o que se tentou avaliar, utilizando ratos tratados durante 7 dias e submetidos a um período de 24 h de retirada da droga, foi se tais modificações citadas na literatura persistem após este período de retirada.

O aumento observado na ALE, também foi observado por outros pesquisadores e usado como critério para determinação da sensibilização comportamental. Pierce et al., 1995, utilizando cocaína 15 mg/kg, observaram que a resposta comportamental à droga no 7º dia de tratamento foi aproximadamente o dobro daquela vista no 1º dia de administração. Shimada et al., 1997, estudaram a ALE durante 8 dias e notaram um aumento progressivo causado pela administração repetida da droga. No presente trabalho, observou-se que a associação cocaína + etanol em ambas as doses não promoveu diminuição significativa da ALE nos animias tratados em relação ao grupo controle. Este fato pode ser explicado pela associação da cocaína, revertendo a ação depressora do etanol, e pela possível

formação do cocaetileno, que também atuaria estimulando a atividade locomotora e diminuiria, assim, as ações depressoras do etanol.

A administração de cocaetileno em ratos promove alterações comportamentais tais como aumento da atividade locomotora, excitação das respostas ativas e sensibilização contexto-dependente (Katz et al., 1992; Prinssen et al., 1996; Schechter et al., 1995). Similarmente, o cocaetileno produz em humanos uma miríade de efeitos subjetivos, incluindo euforia, semelhante àquela produzida pela cocaína (McCance et al., 1995; Perez-Reyes et al., 1992). Trabalhos demonstram ainda que ratos Long-Evans LE apresentam menor sensibilidade comportamental para o cocaetileno em relação a ratos Sprague-Dawley SD (Horowitz et al., 1997). Este fato é particularmente intrigante pelo fato de não ocorrerem diferenças na sensibilidade de comportamento com a cocaína (Horowitz et al., 1997). Os fatores responsáveis pela variação de responsividade para o cocaetileno não são conhecidos, mas podem envolver: 1- diferenças na biodisponibilidade do cocaetileno ou, 2- diferenças na transmissão dopaminérgica e serotoninérgica em regiões discretas do cérebro mediando atividades comportamentais.

Muitas hipóteses foram sugeridas para justificar esta sensibilização, incluindo: aumento da liberação de dopamina (Robinson & Becker, 1986), dessensibilização de autoreceptores dopaminérgicos (Kalivas et al., 1988, Henry et al., 1989, Ackerman & White, 1990) e alterações dopaminérgicas pós-sinápticas (Memo et al., 1981). Usando medidas *in vivo* da transmissão dopaminérgica, foi mostrado que a resposta estimulatória motora aguda a psicoestimulantes é acompanhada por um aumento extracelular de dopamina na área tegumentar ventral, núcleo accumbens, corpo estriado e córtex pré-frontal (Sharp et al., 1987; Di Chiara e Imperato, 1988; Bradberry et al., 1989; Carboni et al., 1989; Kuczenski e Segal 1989; Moghaddam et al., 1990). Similarmente, a sensibilização da atividade locomotora produzida pela administração repetida de psicoestimulantes a roedores está associada com o aumento na concentração de dopamina extracelular observado na área tegumentar ventral, núcleo accumbens e corpo estriado após o uso de uma

dose extra do psicoestimulante (Robinson et al., 1988; Akimoto et al., 1990; Kazahaya et al., 1989; Pettit et al., 1990, Kalivas e Duffy 1990; 1993a,b; Patrick et al., 1991; Parsons e Justice 1993). A alteração pré-sináptica na liberação de dopamina é acompanhada por um aumento na responsividade do receptor D₁ no Núcleo accumbens (Higashi et al., 1989; Henry e White, 1991). Estas alterações pré e pós-sinápticas provêm de evidências primárias da hipótese de que o aumento da transmissão dopaminérgica no Núcleo accumbens e corpo estriado é um importante substrato na mediação da sensibilização comportamental a psicoestimulantes.

A sensibilização comportamental esta relacionada com alterações na plasticidade sináptica e, de fato, compartilha algumas propriedades com a potenciação que ocorre em longo prazo (*long-term potentiation*), o tipo de plasticidade sináptica mais bem conhecido. Muitas modificações associadas com a indução da sensibilização comportamental por estimulantes psicomotores, incluindo modificações neuroquímicas, eletrofisiológicas, moleculares e morfológicas foram identificadas. Além da importância para a neurociência básica, a sensibilização comportamental tem também relevância clínica. Várias evidências sugerem que a sensibilização exerce um importante papel no abuso humano da cocaína. Em particular, a sensibilização comportamental pode contribuir para o intenso desejo, alta taxa de recaída, e psicose paranóica associada com o abuso da cocaína.

A ação primária da cocaína é sua interferência com o transporte de dopamina, NE e 5-HT (Boja e Mell, 1998; Gawin, 1991; Feldman et al., 1997). A cocaína parece não produzir liberação, mas sim atuar aumentando os níveis intersinápticos dos neurotransmissores pelo bloqueio da sua recaptação (Boja e Mell, 1998; Gawin 1991; Feldman et al., 1997). Esta elevação nos níveis de neurotransmissores intersinápticos, especialmente a dopamina, pode produzir os efeitos de desejo pelo uso da droga. Boja e Mell, 1998 detalham os efeitos da cocaína no transportador de dopamina (DAT). O DAT consiste em uma estrutura que apresenta sítios de ligação para uma molécula de dopamina, cloreto e dois íons sódio. Quando estes compostos estão ligados, o transportador sofre uma alteração conformacional, liberando

dopamina dentro do neurônio pré-sináptico. Ao se ligar, tanto cocaína como cocaetileno promovem uma inibição deste transporte. Esta inibição do complexo DAT pode resultar em um aumento da concentração de dopamina no espaço extracelular de até 100 vezes (Carlson, 1998).

As propriedades de reforço podem ser mediadas por um aumento de dopamina no Núcleo accumbens (De Wit & Wise, 1977). Injeções sistêmicas e intracerebrais de cocaína aumentam a dopamina extracelular no Núcleo accumbens e no córtex pré-frontal (Bradberry & Roth, 1989; Church et al., 1987; Hernandez & Hoebel, 1988; Hernandez et al., 1988; Hurd & Ungerstedt, 1989; Moghaddam & Bunney, 1989). Estes efeitos parecem ser independentes das propriedades anestésicas locais da droga, pois injeções de lidocaína (um anestésico local) no accumbens não provocam a liberação de dopamina (Hernandez et al., 1991).

Neste trabalho foi observado que 24 h após a última administração de cocaína, os níveis de dopamina permaneceram elevados em ambas as doses administradas de cocaína, não ocorrendo alterações significantes nos seus metabólitos, DOPAC e HVA. Também não foram observadas alterações significantes nos níveis de serotonina (5-HT). O aumento da concentração de dopamina durante o tratamento com cocaína em homogenatos de corpo estriado é citado na literatura, entretanto, os resultados com relação à retirada da droga, ainda são controversos. Alguns pesquisadores encontraram uma persistência no aumento desta monoamina, enquanto outros observaram níveis diminuídos ou inalterados após 24 h de retirada.

Kalivas et al., (1993) mediram tanto o efluxo de dopamina como a atividade locomotora simultaneamente nos mesmos animais e encontraram uma correlação entre mudanças nestas duas medidas, onde aumentaram após um período de tratamento repetido com cocaína. Em um estudo posterior, sendo examinado mais cuidadosamente o tempo de curso dos dois efeitos, Kalivas e Duffy, 1993, demonstraram que, após um regime de tratamento de 5 dias com cocaína 15 mg/kg, a atividade locomotora foi aumentada e se observou uma persistência nos níveis

aumentados de dopamina 24 h após a administração da última dose do tratamento. Além disso, níveis similares de aumento de atividade locomotora foram observados 4, 10 e 20 dias após o tratamento com uma dose teste. Porém, níveis elevados de dopamina no Núcleo accumbens, em resposta à injeção de cocaína, foram observados apenas 10 e 20 dias no pós-regime, mas não nos primeiros dias de teste.

Um estudo feito por Koob et al., 1987, também observou mudanças no efluxo e nos níveis basais de dopamina induzidos pela droga, e níveis basais de dopamina seguindo o tratamento repetido com cocaína. Este estudo mostrou que os níveis basais da dopamina foram aumentados no 1º dia de tratamento seguindo um regime de administração de cocaína 10 e 30 mg/kg, por 10 dias, nos ratos. Sete dias após o término do regime de tratamento repetido com cocaína, os níveis de dopamina retornaram àqueles observados nos animais tratados com salina.

Em contraposição, Alburges et al., 1996, ao monitorarem a concentração de monoaminas no SNC de ratos usando a técnica de HPLC-EC, seguindo um esquema de tratamento de 5, 10, 15, 20 e 25 mg/kg, i.p., duas vezes ao dia, por 21 dias, encontraram que 12 horas após a última administração de cocaína, as concentrações de monoaminas corticais e estriatais e seus metabólitos não foram significativamente diferentes dos animais tratados com salina.

Com relação aos metabólitos DOPAC e HVA, nossos resultados não demonstraram alterações significantes nas suas concentrações. Estes achados estão de acordo com os de Yeh e De Souza, que ao tratarem animais com cocaína (20 mg/kg, 2 vezes ao dia, por 8 dias) ou salina observaram que 1, 8, 15 ou 48 dias após a última injeção de cocaína, as concentrações de NE, DA, 5-HT e seus metabólitos no córtex frontal, hipocampo, corpo estriado, hipotálamo, mesencéfalo, tronco encefálico e medula espinhal não foram significativamente diferentes daquelas encontradas nos animais tratados com salina em nenhum dos períodos de retirada examinados.

Pouco é conhecido sobre o exato mecanismo pelo qual a cocaína bloqueia a recaptação de outras monoaminas. Acredita-se que a molécula de cocaína pode

interagir com o transporte de serotonina no sítio de ligação da imipramina (Gawin, 1991). Foi mostrado que a cocaína tem uma afinidade similar para todos os três sistemas monoaminérgicos, embora existam algumas evidências de que a cocaína tenha uma menor afinidade pela 5-HT do que pela dopamina (Feldman et al., 1997), o que poderia explicar o fato do presente trabalho não ter visualizado alterações significativas nos níveis de serotonina (5-HT) e de seu metabólito 5-HIAA. Em oposição, a associação cocaína 20mg + etanol 4g (interação altas doses) promoveu uma elevação significativa dos níveis de serotonina (5-HT), o que provavelmente se explica pela formação *in vivo* do cocaetileno, que atuaria potencializando as ações da cocaína no bloqueio da recaptação deste neurotransmissor.

É sabido que tanto a cocaína como o cocaetileno atuam no mecanismo de recaptação mediado pela proteína transportadora de 5-HT (Akunne et al., 1992; Ritz et al., 1990; Rudnick & Wall, 1991). Este transportador de 5-HT foi clonado (Blakely et al., 1991; Hoffman et al., 1991) e sua atividade é inibida pela cocaína (Ramamoorthy et al., 1993).

Nossos resultados obtidos em relação aos níveis de monoaminas e metabólitos indicam que um período de retirada de 24 horas pode não ser suficiente para o início da síndrome de abstinência, pelo menos em ratos, pois o que foi visto neste período de retirada é que os neurotransmissores continuam com seus níveis elevados, o que é uma característica do uso repetido da droga e não da síndrome de abstinência, onde ocorrem sinais e sintomas indicativos de uma disfunção (diminuição) serotoninérgica e dopaminérgica. Portanto, parece que o que foi evidenciado neste estudo constitui indicativo de uma permanência no bloqueio da recaptação das monoaminas após 24 horas de retirada.

A administração simultânea de cocaína e etanol resulta na formação de um metabólito farmacologicamente ativo da cocaína, o cocaetileno (Rafla et al., 1979). Estudos mostram que o cocaetileno é sintetizado *in vivo* pelas ações de enzimas carboxilesterases presentes no fígado tanto em ratos como em humanos (Boyer et al., 1992; Dean et al., 1991). O cocaetileno, assim como a cocaína, se liga ao

transportador de dopamina no parênquima cerebral inibindo a recaptação de dopamina em neurônios pré-sinápticos (Hearn et al., 1991; Jatlow et al., 1991). Estes resultados corroboram com os resultados obtidos nos nossos experimentos, onde se observa um aumento significativo dos níveis de dopamina nos animais tratados com a associação cocaína + etanol em ambas as doses. Esta elevação dos níveis de dopamina pode estar relacionada tanto com as ações da cocaína como com a formação *in vivo* do cocaetileno.

Em contraste com a cocaína, o cocaetileno apresenta uma afinidade relativamente baixa pelo transportador de serotonina (5-HT), sendo, portanto, suas ações mais específicas no eixo dopaminérgico em relação ao composto original. No presente trabalho, a associação cocaína 20mg + etanol 4g promoveu um aumento dos níveis de serotonina (5-HT), o que não ocorreu com as drogas utilizadas isoladamente.

Neste trabalho foi observado que 24 horas após a retirada de cocaína, a densidade dos receptores D₂-símile apresentou-se diminuída no corpo estriado de ratos nas duas doses estudadas (10 e 20 mg/kg. Segundo Hamdi & Prasad (1993). A downregulation pode ser explicada pelo aumento da concentração dopamina no terminal sináptico, induzido pela cocaína.

O receptor D₂ parece ter um papel crucial no desenvolvimento da dependência. Acredita-se que ele tem uma importante função no desejo e na administração compulsiva da droga. O efeito da administração crônica da cocaína nos receptores D₂ é o aumento da densidade no tubérculo olfatório, núcleo accumbens rostral e caudado-putamen (Katz et al., 1999).

O receptor D₂ pode ser localizado pré e pós-sinápticamente, sendo que a densidade dos pós-sinápticos é maior que a dos pré-sinápticos. A dopamina normalmente interage com os receptores D₂, acelerando a velocidade do transportador de dopamina e aumentando o *clearance* de dopamina. Baseado no fato de que receptores D₂ abrem canais de potássio, os quais hiperpolarizam a membrana, aumentos nos níveis de dopamina extracelular podem produzir dois efeitos via

ativação de receptores D₂: inibição da liberação de dopamina e aceleração da captação de dopamina, que podem trabalhar em conjunto e limitar a ativação do receptor pós-sináptico (Staley et al., 1998).

Os resultados obtidos neste estudo em relação aos receptores D₂ estão de acordo com Pilotti, 1997, que demonstrou resultados semelhantes aos obtidos aqui ao utilizar técnicas de imagem para ajudar a identificar alterações ocorridas subsequentes ao uso repetido e retirada da droga, encontrou uma profunda deficiência no receptor D₂ nos neurônios dopaminérgicos mesoestriatais em humanos. Já Kunko et al., 1998, após tratamento por 7 dias com cocaína nas doses de 15, 30 e 50 mg/kg e 24 horas de retirada não observaram modificações nos valores de B_{max} nem de K_d para os receptores D₁ e D₂, no núcleo accumbens e caudado-putamen.

Nossos resultados sugerem que modificações pré-sinápticas na liberação de dopamina causadas pela administração de cocaína requerem ativação dos receptores D₂ ao invés de um simples bloqueio na captação de dopamina. Tentativas prévias de bloquear a sensibilização comportamental após injeções repetidas de cocaína com antagonistas dos receptores dopaminérgicos não-seletivos têm resultado em bloqueio completo ou parcial (Gale, 1984) dando suporte a esta relação. A ativação de receptores dopaminérgicos, a maioria dos quais localizados pós-sinápticamente, pode então, afetar mecanismos pré-sinápticos determinando a liberação de dopamina em *pools* susceptíveis a diferentes tipos de estimulação. Além disso, parece que as vias estriatonigral e nigroestriatal participam integralmente desta via de retroalimentação e são necessárias para a ocorrência deste aumento.

Quanto aos efeitos sobre os receptores D₂-símile observados após a administração de etanol durante 7 dias (2 e 4 g/kg, v.o.) e com tempo de retirada de 24 h, uma downregulation foi verificada. No que se refere à constante de dissociação, uma tendência a aumento foi observada nos valores de K_d nos receptores D₂ após o tratamento com etanol em ambas as doses praticadas. Os

resultados de downregulation encontrados neste trabalho concordam com os de Hamdi & Prasad (1993) que também observaram uma downregulation.

Não existe consenso quanto ao efeito do etanol nos receptores D2. Enquanto alguns trabalhos encontraram um aumento (Hruska et al., 1988) outros relataram não haver diferença (Lucchi et al., 1988) em receptores D2-símile. Um trabalho recente (Souza-Formigoni et al., 1999) observou aumento na densidade de receptores D2 no núcleo caudado-putamem ventrolateral somente em camundongos sensibilizados, e nenhuma diferença em outras regiões, incluindo Núcleo accumbens, bulbo olfatório e substância negra.

Esses resultados aparentemente contraditórios podem ser devidos a diferentes protocolos experimentais, tais como: dose de etanol, estado nutricional, idade e raças dos animais estudados (Lucchi et al., 1988; Hietala et al., 1990; Nevo & Hamon, 1995). Com relação aos receptores dopaminérgicos, períodos prolongados de tratamento levam a uma resposta específica de downregulation (Lucchi et al., 1988; Syvalahti et al., 1988) baseado na perda geral da função neuroreceptora. Segundo Hamdi & Prasad (1993) a downregulation também pode ser explicada: 1 - pelo aumento da síntese e liberação de dopamina no terminal sináptico, induzido pelo etanol; 2 - o etanol poderia modificar a estrutura da membrana (Deitrich et al., 1989), resultando em uma diminuição na incorporação da proteína receptora dentro do domínio da membrana e levando a uma downregulation; 3 - o etanol poderia modular a regulação do receptor na transcrição genética diminuindo a função do receptor.

Segundo Rilke et al., (1995), o efeito da auto-administração crônica de etanol também parece depender de envolvimento ambiental. Assim, esses autores mostraram que receptores D2 sofrem diminuição do número após tratamento crônico em ratos agrupados, mas não em animais isolados socialmente.

O presente trabalho demonstrou que a associação cocaína + etanol promoveu uma diminuição do número de receptores D2 – símile, sem alterações significativas nos valores de Kd. Esta downregulation foi mais intensa que a promovida pelos

tratamentos com cocaína e etanol isoladamente, principalmente com a interação altas doses (Cocaína 20mg + etanol 4g). Esta potencialização de efeito pode ser explicada pela somação de ações da cocaína e do etanol, já que os grupos tratados com estes agentes isoladamente apresentaram também uma diminuição.

A cocaína inibe diretamente os receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos (Platt, 1995). Sharkey et al., 1988 mostraram que a cocaína era capaz de exibir afinidade micromolar por receptores muscarínicos e seus resultados sugerem que a mesma não atua como agonista dos receptores muscarínicos, pois quando na presença de cocaína o coeficiente de Hill não é diferente de 1. No caso da administração de drogas agonistas o coeficiente de Hill é < 1 (ex.: carbacol). Portanto, o referido autor demonstrou pela 1ª vez que a cocaína inibia os receptores colinérgicos cerebrais, ou seja, se comporta como antagonista.

Vários trabalhos reportam que as propriedades de reforço da cocaína são mediadas via inibição do transporte de dopamina (Ritz et al., 1987). Porém, deve ser lembrado que a atropina, aparentemente antagoniza a auto-administração de cocaína, sugerindo que, mecanismos colinérgicos podem estar envolvidos nas propriedades de reforço comportamental da cocaína (Wilson e Schuster, 1973). Sharkey et al., 1988 esclareceram que a possibilidade das propriedades anticolinérgicas da cocaína podiam interferir com a auto-administração da droga através de um mecanismo indireto, visto que a concentração de (-) cocaína requerida para inibir os receptores muscarínicos foi de aproximadamente 20 vezes mais alta do que as concentrações plasmáticas que produzem euforia em voluntários humanos (Fischman et al., 1976, 1983). Vale salientar que altas concentrações sanguíneas de drogas anticolinérgicas estão associadas com déficits cognitivos e delírio (Tune et al., 1981).

Nossos experimentos não mostraram alterações significativas na densidade dos receptores muscarínicos no corpo estriado nem no Kd nos animais tratados com cocaína, etanol e a associação destes em ambas as doses. De fato, não existe um consenso acerca das ações promovidas na densidade dos receptores colinérgicos. Consolo et al., 1992, através da técnica de microdiálise, demonstraram que a

administração de cocaína estimula a produção de acetilcolina estriatal. Assim, possivelmente este aumento da acetilcolina pode levar a uma diminuição compensatória do número de receptores.

Heidbreder e Shippenberg, 1996, ao tratar animais por 5 dias com escopolamina (3,0 mg/kg, s.c.), um antagonista muscarínico em combinação com cocaína (20 mg/kg, i.p.), observaram que a sensibilização comportamental desenvolvida quando a cocaína é administrada sozinha era prevenida, sugerindo um importante papel do sistema colinérgico na mediação da sensibilização comportamental da cocaína.

Resultados contrários aos nossos com relação ao corpo estriado, foram vistos por Lipton et al., 1995, que observaram que administrações de cocaína por 5 dias através de implante subcutâneo e 12 horas de retirada promoviam um aumento de 24 % nos receptores muscarínicos. Nos experimentos feitos após 48 horas de retirada foi observado que após este período os receptores voltavam a níveis normais (controle). Após 3 dias de administração contínua de cocaína através de implante subcutâneo e 21 dias de retirada, houve apreciável redução (26 %) na ligação do (3H)-QNB no corpo estriado, enquanto que após a administração por 5 e 21 dias de retirada houve uma redução de 45 % no *ligação* do (3H)-QNB.

No que se refere às alterações bioquímicas, analisando os resultados do presente trabalho, pode-se observar que o tratamento durante 7 dias com cocaína, em ambas as doses, causou alterações significativas nos níveis de TGO, TGP, colesterol total, triglicérides e HDL.

Já o tratamento durante 7 dias com etanol promoveu alterações significativas nos níveis de triglicérides, HDL e colesterol total. A associação entre cocaína e etanol também foi efetiva em promover alterações em todos os parâmetros enzimáticos analisados.

O aumento nos níveis de TGO observado nos animais tratados com cocaína, em ambas as doses, sugere uma alteração hepática produzida pela cocaína nos animais tratados.

A cocaína e o etanol são conhecidos por suas capacidades de causar lesões hepáticas, que podem ser determinadas através da análise de variações nas concentrações de enzimas hepatocelulares, como TGO e TGP (Smith et al., 1991; Enomoto et al., 1999). Essas enzimas são marcadores clássicos, pois refletem danos hepatocelulares, sendo que a TGO se localiza tanto no citosol como na mitocôndria, sendo sua elevação característica de uma lesão mais grave e mais profunda, enquanto que a TGP se localiza somente no citosol e sua elevação representa uma lesão menos profunda.

Alguns trabalhos mostram que o uso crônico do etanol parece ter um efeito protetor em doenças coronarianas, decorrente de sua ação que aumenta os níveis de apolipoproteínas APO A1 e colesterol HDL (Kiechl et al., 1998). Neste trabalho, em contrapartida, tanto cocaína e etanol isoladamente como a combinação destes, mostrou-se efetiva em reduzir os níveis de triglicerídeos, HDL e colesterol total, revelando uma ação protetora da função cardiovascular no que diz respeito ao aparecimento de doenças cardiovasculares relacionadas com o aparecimento de trombos e placas ateroscleróticas.

Evidências clínicas e experimentais têm mostrado que a cocaína apresenta efeitos hepatotóxicos em animais de laboratório e em humanos (Perino et al., 1987; Wanless et al., 1991; Kanel et al., 1990; Silva et al., 1991). O mecanismo proposto para a ação hepatotóxica da cocaína envolveria espécies reativas de oxigênio, as quais seriam produzidas durante o metabolismo da cocaína para norcocaína pelo citocromo p-450 (Boelsterli et al., 1993). Estudos patológicos têm implicado o estresse oxidativo gerado pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio como o responsável pela lesão hepática gerada pela cocaína. Nossos experimentos demonstraram em estudos histopatológicos a presença de alterações inflamatórias no tecido hepático dos animais tratados com cocaína em ambas as doses. O abuso de cocaína em humanos está associado tipicamente com o aparecimento de zonas de necrose hepática (Wanless et al., 1990). Tratamentos crônicos com cocaína em camundongos promovem morte mitocondrial e necrose centrolobular (Gotfried et

al., 1986). Estudos *in vitro* demonstram também a ação hepatotóxica da cocaína. Hepatócitos de ratos expostos a 1 ou 10 mM de cocaína em cultura por 24 horas apresentam perda substancial de viabilidade celular como indicado pela liberação de LDH (Robert et al., 1990).

Os efeitos do etanol no fígado são numerosos e variados. Jover et al., 1991, demonstraram que o etanol aumenta a hepatotoxicidade induzida pela cocaína em camundongos e humanos. Isto estaria de acordo com nossos resultados, que mostraram que o etanol isoladamente promoveu alterações histopatológicas leves, mas quando associado à cocaína, se mostrou muito mais eficiente em promover lesões hepáticas, o que é reforçado pelo fato de que a necrose só foi observada no fígado dos animais tratados com a interação em altas doses de cocaína e etanol. O mecanismo preciso de como ocorre esta potencialização não está totalmente esclarecido, mas alguns trabalhos implicam a formação do cocaetileno a partir da interação entre cocaína e etanol no fígado como o fator responsável (Boelsterli et al., 1993).

O fato é que mais estudos devem ser feitos para proporcionar um maior conhecimento de como essas substâncias atuam, em diferentes níveis, no organismo humano, contando com a investigação em animais. É sabido que o uso de drogas de abuso tem crescido muito na última década, sendo que o abuso de combinações de drogas como a estudada em nossos ensaios tem sido preferida em relação ao uso isolado. Uma das associações de uso mais prevalente é a combinação cocaína + etanol (Leite et al., 1999). Em nossos experimentos, realmente, evidenciou-se uma interação entre o uso de cocaína e etanol, o que sugere a importância clínica do estudo desta associação para a total elucidação de seus efeitos em sistemas neurotransmissores e parâmetros bioquímicos e histopatológicos.

8 – CONCLUSÕES

O estudo das alterações comportamentais, neuroquímicas, histopatológicas e bioquímicas ocorridas em ratos após administração repetida de cocaína, etanol e a associação destes permitiu as seguintes conclusões:

1. Foi observado um aumento da atividade locomotora nos animais tratados com Coc em ambas as doses. O Et promoveu, nas doses estudadas, diminuição da atividade locomotora, sendo que no grupo tratado com a maior dose, ocorreu uma dessensibilização a este efeito, o que demonstra que a Coc atua como um estimulante do SNC e o Et, na maior dose, pode promover uma tolerância aos seus efeitos depressores.
2. A associação cocaína + etanol, nas doses estudadas, não promoveu alteração na atividade locomotora, o que sugere que na associação ocorre uma diminuição dos efeitos depressores do etanol pela cocaína e pelo cocaetileno, o que estimula o uso da combinação.
3. Na determinação dos níveis de DA, 5-HT e seus metabólitos ocorreu aumento nos níveis de DA em CE de ratos tratados com coc em ambas as doses, não sendo observadas alterações nos níveis de DOPAC e 5-HT. Nos animais tratados com Et, ocorreu um aumento nos níveis de DA no CE, sem alterações nos demais neurotransmissores e seus metabólitos. Com relação às associações, a int baixas doses promoveu aumento dos níveis de DA, sem alterações nos demais neurotransmissores e metabólitos. Já na int altas doses, observou-se um aumento de DA e 5-HT, e diminuição nos níveis de DOPAC, o que mostra que nos protocolos estudados todos os agentes foram efetivos em aumentar os níveis de DA, neurotransmissor fortemente relacionado com o vício.

4. Ocorreu uma diminuição na densidade máxima dos receptores D_2 – símile, sem alterações nos níveis de K_d em todos os grupos tratados em ambas as doses, sendo esta diminuição mais intensa na interação altas doses, demonstrando uma ação potencialização da combinação cocaína + etanol em promover alterações em receptores dopaminérgicos, o que pode estar relacionado com o poder viciante maior da combinação em relação aos agentes isolados. Não foram observadas alterações nos receptores muscarínicos estriatais nem nos valores de K_d nos protocolos experimentais utilizados.
5. A administração de Coc promoveu em ambas as doses utilizadas elevação dos níveis de TGO e diminuição dos níveis de colesterol total, triglicerídeos e HDL. O Et promoveu aumento dos níveis de triglicerídeos e diminuição do HDL. Com relação às interações, foi observada uma diminuição dos níveis de TGO, TGP, triglicerídeos e HDL, levando a crer que a associação apresenta um componente hepatotóxico, o que alteraria o perfil enzimático sérico.
6. As análises histopatológicas evidenciaram o aparecimento de alterações inflamatórias em tecidos cardíacos e hepáticos de ratos tratados com Coc, Et e a associação destes em ambas as doses. As alterações observadas nas associações foram mais intensas, com quadros de necrose tecidual, demonstrando assim o maior potencial tóxico da combinação cocaína + etanol, especialmente em relação a lesão hepática. Não foi observada alteração em tecidos cerebrais.

7. Nossos experimentos evidenciaram importantes efeitos na interação entre o uso de cocaína e etanol, que foi mais efetiva em promover alterações nos receptores dopaminérgicos e se mostrou também mais lesiva para alguns tecidos estudados, suscitando a importância clínica do estudo desta associação para a total elucidação de seus efeitos comportamentais, nos sistemas neurotransmissores e em parâmetros bioquímicos e histopatológicos.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELSON HI, MILLER JD A decade of trends in cocaine use in the household population. **NIDA Res Monogr.**, v. 61, p. 35-49, 1988.

- ACKERMAN. J. M.; WHITE, F. J. A 10 somatodendritic dopamine autoreceptor sensitivity following withdrawal from repeated cocaine treatment. **Neurosci. Lett.**, v. 177, p. 181-187, 1990.

- AKIMOTO, K.; HAMAMURA, T.; KAZAHAYA, Y.; AKIYAMA, K.; OTSUKI, S. Enhanced extracellular dopamine level may be the fundamental neuropharmacological basis of cross-behavioral sensitization between methamphetamine and cocaine - na in vivo dialysis study in freely moving rats. **Brain Res.**, v. 507, p. 344-346, 1990.

- AKUNNE, H. C.; DE COSTA, B. R.; JACOBSON, A. E.; RICE, K. C.; ROTHMAN, R. B. (H-3) cocaine labels a *binding*-site associated with the serotonin transporter in guinea-pig brain: Allosteric modulation by paroxetine. **Neurochem. Res.**, v. 17, p. 1275-1283, 1992.

- ALBURGES, M. E.; CROUCH, D. J.; ANDRENYAK, D. M.; WAMSLEY, J. K. Lack of long-term changes in cocaine and monoamine concentrations in rat CNS following chronic administration of cocaine. **Neurochem. Int.**, v. 28, p. 51-57, 1996.

- AMBRE, I.; RUO, T.I.; NELSON, I.; SELKNAP, S. Urinary excretion of cocaine, benzoylecgonine and eegonine methyl ester in humans. **J. Anal Toxicol.**, Niles, n.12, p. 301-306, 1988.

- B.F. GRANT, T.C. HARDFORD, Concurrent and simultaneuos use os alcohol with cocaine: results of national survey. **Drug Alcohol Depend.**, v. 25, p. 97-104, 1990.

- BEANI, L.; LEDDA, F.; BIANCHI, C.; BALDI, V. Reversal by 3,4-dihydroxyphenylalanine of reserpine-induced regional changes in acetylcholine content in guinea-pig brain. **Biochemical Pharmacol.**, v.15, p. 779-784, 1966.

- BEAR, M. F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. 2. ed. Porto Alegre, Artmed, p. 140-147, 2001.

- BEEDLE, D. Differential diagnosis of substance abuse and dependence. In: MILLER, N.S. The principles and practice of addictions in psychiatry. Philadelphia: **W.B. Saunders Company**, p.113-118, 1997.

- BERTORELLI, R.; CONSOLO, S. D1 and D2 dopaminergic regulation of acetylcholine release from striata of freely moving rats. **J. Neurochem.**, v. 54, p. 2145-2148, 1990.

- BJORKLUND, A.; LINDVALL, O. Dopamine containing systems in CNS. In: BJORKLUND, A., HOKFELT, T. (Ed). **Handbook of chemical neuroanatomy.**, v.2, pt.1, p.55-122, 1984.

- BLAKELY, R. D.; BERSON, H. E.; FREMEAU, JR., R. T.; CARON, M. G.; PEEK, M. M.; PRINCE, H. K.; BRADLEY, C. C. Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain. **Nature.**, v. 354, p. 66-70, 1991.

- BOELSTERLI, U.A., WOLF, A., GOLDIN, C.R., Oxygen free radical production mediated by cocaine and its ethanol-derived metabolite, cocaethylene, in rat hepatocytes. **Hepatology.**, v. 18, p. 1154-1161, 1999.

- BOZARTH, M. A.; WISE, R. A. Involvement of the ventral tegmental dopamine system in opioid and psychomotor reinforcement. In: HARRIS, L. S. (Ed.). **Problems of drug dependence.** Washington, D. C.: NIDA, p. 190-196. (NIDA Research Monograph, nº 67), 1986.

- BRADBERRY, C. W.; ROTH, R. H. Cocaine increases extracellular dopamine in rat nucleus accumbens and ventral tegmental area as shown by inj vivo microdialysis. **Neurosci. Lett.**, v. 103, p. 97-102, 1989.

- BRADBERRY, C.W., NOBILETTI, J., ELSWORTH, J.D., MURPHY, B., JATLOW, P. AND ROTH, R.H.; Cocaine and cocaethylene: Microdialysis comparison of brain drug levels and effects on dopamine and serotonin. **J. Neuroche.** 60: 1429-1435, 1993.

- BRODIE, M.S., PESOLD, C., APPEL, S.B., Ethanol directly excites dopaminergic ventral tegmental area reward neurons, **Alcohol Clin. Exp. Res.** 23, p. 1848-1852, 1999.

- BRODIE, M. S.; TRIFUNOVIC, R. D.; SHEFNER, S. A. Serotonin potentiates ethanol-induced excitation of ventral tegmental area neurons in brain slices from three different rat strains. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 273, p. 1139-1146, 1995.

- BROWN, R. M. Pharmacology of cocaine abuse. In: REDDA, K. K.; WALKER, C. A.; BARNETT, G. (Eds.). Cocaine, marijuana, designer drugs: chemistry, pharmacology and behavior. **Boca Raton, Fla.:** CRC Press, p. 39-52, 1989.

- BURKE, R. E.; GREENBAUN, D. Effect of post-mortem factors on muscarinic receptor subtypes in rat brain. **J. Neurochem.**, v. 49, p. 592-596, 1987.

- C.S. BOYER, D.R. PETERSEN, Enzymatic basis for the transesterification of cocaine in the presence of ethanol: evidence for the participation of microsomal carboxylesterases, **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 260 p. 939-946, 1992.

- CAMI, J., DE LA TORRE, R., FARRÉ, M., ORTUNO, J., SEGURA, J., Cocaine-alcohol interaction in healthy volunteers: Plasma metabolic profile including cocaethylene. **CPDD Annual Scientific Meeting Abstracts.** 1991.

- CARBONI, E.; IMPERATO, A.; PEREZZANI, L.; DI CHIARA, G. Amphetamine, cocaine, phencyclidine and nomifensine increase extracellular dopamine concentrations preferentially in the nucleus accumbens of freely moving rats. **Neuroscience**, v. 28, p. 653-661, 1989.

- CARROLL, F. I.; LEWIN, A.H.; BOJA, J. W.; KUHAR, M. J. Cocaine receptor: biochemical characterization and structure-activity relationships of cocaine analogues as the dopamine transporter. **J. Med. Chem.**, v. 35, p. 969-981, 1992.

- CHAIT, L. D.; UHLENHUTH, E. H.; JOHANSON, C. E. Reinforcing and subjective effects of several anorectics in normal human volunteers. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 242, p. 777-783, 1987.

- CHANDLER, L. J.; HARRIS, R. A.; CREWS, F. T. Ethanol tolerance and synaptic plasticity. **TIPS**, v. 19, p. 491-495, 1998.

- CHURCH, W. H.; JUSTICE, J. B.; BYRD, L. D. Extracellular dopamine in rat striatum following uptake inhibition by cocaine, nomifensine and benztropine. **Eur. J. Pharmacol.** , v. 39, p. 345-348, 1987.

- CIVELLI, O.; BUNZOW, J. R.; GRANDY, D. K. Molecular diversity of dopamine receptors. **Ann. Ver. Pharmacol. Toxicol.**, v.32, p. 281-307, 1993.

- COLLINS, K. A.; DAVIS, G. J.; LANTZ, P. E. An unusual case of maternal-fetal death due to vaginal insufflation of cocaine. **Am. J. Forensic Med. Pathol.**, v. 15, p. 335-339, 1994.

- COMMISSARIS, R. L. Cocaine pharmacology and toxicology. In: REDDA, K. K.; WALKER, C. A.; BARNETT, G. (Ed.). Cocaine, marijuana, designer drugs, chemistry, pharmacology and behavior. **Boca Raton, Fla.:** CRC Press, p. 71-82, 1989.

- CONSOLO, S.; LANDINSKY, H.; PUGNETTI, P.; FUSI, R.; CRUNELLI, V. Increase in rat striatal acetylcholine content by bromocriptine: Evidence for an indirect dopaminergic action. **Life Sci.**, v. 29, p. 457-465, 1981.

- CONSOLO, S.; LANDINSKY, H.; BIANCHI, S. Decreased in rat striatal acetylcholine levels by some direct- and indirect-acting dopaminergic antagonist. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 33, p. 345-351, 1975.

- CONSOLO, S.; WU, C.F.; FUSI, R. D1-receptor-linked mechanism modulates cholinergic neurotransmission in rat striatum. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 242, p. 300-305, 1987.

- COX, T.; JACOBS, M.; LEBLANC, A.; MARSHMAN, J. (Ed.). **Drugs and drug abuse: a reference text**. Toronto: Addiction Research Foundation Press, 1983.

- D.A. GORELICK, Alcohol and cocaine. Clinical and pharmacological interactions, **Recent Dev. Alcohol** 10, p. 37-56, 1992.

- DAHLSTROM, K. FUXE, Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. Demonstration of monoamine-containing neurons in the cell bodies of brainstem neurons, **Acta Physiol. Scand.** 62 (Suppl. 232) (1964) 231 / U. UNGERSTEDT, Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain, **Acta Physiol. Scand.** Suppl 367, p. 1-48, 1971.

- DACKIS, C. A.; GOLD, M. S.; SWEENEY, D. R.; BYRON, J. P. Jr.; CLIMKO, R. Single-dose bromocriptine reverses cocaine craving. **Psychiatr. Res.**, v. 20, p. 261-264, 1987.

- DAHLSTROM, A.; FUXE, K. Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. **Acta Physiol. Scand.**, v. 62, p. 1-55, 1964

- DAMSMA, G.; DEBOER, P.; WESTERINK, B.H.C.; FIBIGER, H.C. Dopaminergic regulation of striatal cholinergic interneurons: a in vivo microdialysis study. **Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.**, v. 342, p. 523-527, 1990a.

- DAVIS, K.L.; HOLLISTER, L.E.; BERGER, P.A.; BARCHAS, J.D. Cholinergic imbalance hypotheses of psychoses and movement disorders: strategies for evaluation. **Psychopharmacol. Commun.**, v. 1, p.533-543, 1975.

- DEITRICH, R.A.; DUNWIDDIE, T.V.; HARRIS, R.A.; ERWIN, V.G. Mechanism of action of ethanol: initial central nervous system actions. **Pharmacol. Rev.**, v. 41, p. 489-537, 1989.

- DI CHIARA, G. The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation. **Drug Alcohol Depend.**, v. 38, p. 95-137, 1995.

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

- DI CHIARA, G.; IMPERATO, A. Ethanol preferentially stimulates dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 10, p. 115-132, 1985.

- 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-hydroxydopamine and nerve growth factor. **J. Neurosci.**, v. 3, p. 1963-1970, 1983.

- DRACHMAN, D.A.; LEAVITT, J. Human memory and cholinergic system. A relationship to aging? **Arch. Neurol.**, v.30, p.113-121, 1974.

- DUPONT, R. Psychotherapy in addictive disorders. In: MILLER, N.S. The principles and practice of addictions in psychiatry. **Philadelphia: W.B. Saunders**, 1997.

- E.F. MCCANCE, L.H. PRICE, T.R. KOSTEN, P.I. JATLOW, Cocaine: pharmacology, physiology and behavioral effects in humans, **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 274 1995 215–223.

- E.P.M. PRINSEN, M.S. KLEVEN, W. KOEK, Repeated administration of cocaine induces context-dependent sensitization to its locomotor effects, **Psychopharmacology**, 124, p. 300–305, 1996.

- EHLERT, F.J.; ROESKE, W.R.; YAMAMURA, H.I.; Molecular biology and brain distribution of subtypes of the muscarinic receptor. In BLOOM, F.E.; KUPFER, D.J.; **Psychopharmacol.** New York: Raven Press, cap. 10, p. 111-124, 1995.

- ESCOHOTADO, A. A história das drogas. 3. ed. Madrid: Alianza Editorial, p. 94-135, 1996.

- F.K. RAFLA, R.L. EPSTEIN, Identification of cocaine and its metabolites in human urine in the presence of ethyl alcohol, **J. Anal. Toxicol.** 3 p. 59-63, 1979.

- FARRÉ, M., LLORENTE, M., UGENA, B., LAMAS, X., AND CAMI, J. Interaction of cocaine with ethanol. In L. Harris (Ed.), Problems of drug dependence, 1990. (NIDA Research Monograph No. 105). Rockville, Md.: **NIDA**, pp. 570-571, 1991.

- FELDMAN, D. J.; FRANK, R. A.; KEHNE, J. H.; FLANNERY, R.; BROWN, D.; SONI, S.; BYRD, G.; SHAH, S. Mixed D₂/5-HT₂ antagonism differentially affects apomorphine- and amphetamine-induced stereotyped behavior. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 58, p. 565-572, 1997.

- FIELDER, E. P.; MARKS, M. J.; COLLINS, A. C. Postnatal development of cholinergic enzymes and receptors in mouse brain. **J. Neurochem.**, v. 49, p. 983-990, 1987.

- FISCHMAN, M. W.; SCHUSTER, C.R.; HATANO, Y. A comparison of the subjective and cardiovascular effects of cocaine and lidocaine in humans. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 18, p. 123-127, 1983.

- FOLTIN, R.W. AND FISCHMAN, M.W., PIPPE, P.A., AND KELLY, T.H. Behavioral effects of cocaine alone and in combination with ethanol or marijuana in humans. **Drug and Alcohol Dependence**, 32, p. 93-106, 1993.

- G. DI CHIARA, A IMPERATO, Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats, **Proc. Nad. Acad. Sci. USA** 85, p. 5274-5278, 1988.
- GAWIN, F. H. Cocaine addiction: psychology and neurophysiology, **Science**, v. 251, p. 1580-1586, 1991.
- GAWIN, F. H. New uses of antidepressants in cocaine abuse. **Psychosomatics**, v. 27, p. S24-S29, 1986.
- GAWIN, F. H., ELLINWOOD, E. H. Cocaine and other stimulants: actions, abuse and treatment. **N. Engl. J. Med.**, v. 318, p. 1173-1182, 1988.
- GIANNINI, A. J; 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. 211-214, 1986.
- GOEDERS, N. E.; SMITH, J. E. Cortical dopaminergic involvement in cocaine reinforcement. **Science**, v. 221, p. 773-775, 1983.
- GOLTFRIED, M.R., KLOSS, M.W., GRAHAM, D., RAUKMAN, E.J., and ROSEN, G.M. Ultrastructure of experimental cocaine hepatotoxicity. **Hepatology** 6, 299-304, 1986.
- GRANT, B.F., HARDFORD, T.C. Current and simultaneous use of alcohol with cocaine: results of a national survey. **Drug Alcohol Depend** 25, p. 97-104, 1990.
- GRILLI, M.; WRIGHT, A. G.; HANBAUER, I. Characterization of (3H)-dopamine uptake sites and (3H)-cocaine recognition sites in primary cultures of mesencephalic neurons during in vivo development. **J. Neurochem.**, v. 56, p. 2108-2115, 1991.

- GUYENET, P.G.; AGID, Y.; JAVOY, F.; BEAUJOUAN, J.C.; ROSSIER, J.; GLOWINSKI, J. Effects of dopamine receptor agonist and antagonist on the activity of the neo-striatal cholinergic system. **Brain Res.**, v. 84, p. 227-244, 1975.

- HALL, W. C.; TALBERT, R. L.; ERESHEFSKY, L. Cocaine abuse and its treatment. **Pharmacotherapy**, v. 10, p. 47-65, 1990.

- HAMDI, A.; PRASAD, C. Bidirectional changes in striatal D1-dopamine receptor density during chronic ethanol intake. **Life Sci.**, v. 52, p. 251-257, 1993.

- HEARN, W.L., FLYNN, D.D., HIME, G.W., ROSE, S., COFINO, J.C., MANTERO-ATIENZA, E., WETLI, C., MASH, D.C. Cocaethylene: a unique cocaine metabolite displays high affinity for the dopamine transporter. **J Neurochem** 56, p. 698-701, 1991.

- HEARN, W.L., ROSE, S., WAGNER, J., CIARLEGLIO, A., AND MASH, D.C. Cocaethylene is more potent than cocaine in mediating lethality. **Pharmacology, Biochemistry and behavioral**, 39, p. 531-533, 1991.

- HENRY, D. J.; GREENE, M. A.; WHITE, F. J. J. Electrophysiologic effects of cocaine in the mesopaccumbens dopamine system: repeated administration. **J. Exp. Ther.**, v. 251, p. 833-839, 1989.

- HENRY, D. J.; WHITE, F. J. Repeated cocaine administration causes persistent enhancement of D₁ dopamine receptor sensitivity within the rat nucleus accumbens. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 258, p. 882-890, 1991.

- HERNANDEZ, L.; GUZMAN, N. A.; HOEBEL, B. G. Bidirectional microdialysis in vivo shows differential dopaminergic potency of cocaine, procaine and lidocaine in the nucleus accumbens using capillary eletrophoresis for calibration of drug outward diffusion. **Psychopharmacology**, v. 105, p. 264-268, 1991.

- HERNANDEZ, L.; HOEBEL, B. G. Food reward and cocaine increase extracellular dopamine in the nucleus accumbens as measured by microdialysis. **Life Sci.**, v. 42, p. 1705-1712, 1988.

- HERNANDEZ, L.; LEE, F.; HOEBEL., B. G. Microdialysis in the nucleus accumbens during feeding or drugs of abuse: amphetamine, cocaine, phencyclidine. **Ann. N. Y. Acad. Sci. USA**, v. 537, p. 508-511, 1988.

- HIETALA, J.; SALONEN, I.; LAPPALAINEN, J.; SYVALAHTI, E. Ethanol administration does not alter dopamine D1 and D2 receptor characteristics in rat brain. **Neurosci. Lett.**, v. 108, p. 289-294, 1990.

- HIGASHI, H.; INANAGA, K.; NISHI, S.; UCHIMURA, N. E. Enhancement of dopamine actions on rat nucleus accumbens neurones in vitro after methamphetamine pretreatment. **J. Physiol.**, v. 408, p. 587-603, 1989.

- HIGGINS, S. T.; BICKEL, W. K.; HUGHES, J. R.; LYNN M.; CAPELESS, M. A.; FENWICK J. W. Effects of intranasal cocaine on humans learning, performance and physiology. **Psychopharmacology**, v. 102, n. 4, p. 451-458, 1990.

- HOFFMAN, B. J.; MEZEY, E.; BROWNSTEIN, M. J. Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants. **Science**, v. 254, p. 579-580, 1991.

- HOROWITZ, J.M., KRISTAL, M.B., TORRES, G., Differential behavioral responses to cocaethylene of Long–Evans and Sprague–Dawley rats: role of serotonin, **Synapse** 26, p. 11–21, 1997.

- HRUSKA, R.E. Effect of ethanol administration of striatal D1 and D2 dopamine receptors. **J. Neurochem.**, v. 50, p. 1929-1933, 1988.

- HURD, Y. L.; UNGESTEDT, U. Cocaine: An in vivo microdialysis evaluation of its acute action on dopaminergic transmission in rat striatum. **Synapse**, v. 3, p. 48-54, 1989.

- IMPERATO, A.; OBINU, M.C.; CASU, M.A.; MASCIA, M.S.; DAZZI, L.; GESSA, G.L. Evidence that neuroleptics increase striatal acetylcholine release through stimulation of dopamine D1 receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 266, p. 557-562, 1993.

- JANOWSKY, D.S.; EL-YOUSEF, M.K.; DAVIS, J.M.; SERERKE, H.J. A cholinergic-adrenergic hypothesis of mania and depression. **Lancet**, v. 1, p. 632-635, 1972.

- JANOWSKY, D.S.; EL-YOUSEF, M.K.; DAVIS, J.M.; SERERKE, H.J. Parasympathetic suppression of maniac symptoms by physostigmine. **Arch. Gen. Psychiatr.**, v. 28, p. 542-545, 1973.

- JATLOW P, ELSWORTH JD, BRADBERRY CW, WINGER G, TAYLOR JR, RUSSELL R, ROTH RH Cocaethylene: a neuropharmacologically active metabolite associated with concurrent cocaine-ethanol ingestion. **Life Sci** 48, p. 1787, 1974.

- JATLOW, P. Cocaethylene inhibits uptake of dopamine and can reach high plasma concentrations following combined cocaine and ethanol use. In L. Harris (Ed.), *Problems of Drug Dependence*, 1990 (NIDA Research Monograph No. 105). Rockville, Md.: **NIDA**, pp. 572-573, 1990.

- JATLOW, P. Cocaethylene: Pharmacologic activity and clinical significance. **Therapeutic Drug Monitoring**, 15, 533-536, 1993.

- JATLOW, P., ELSWORTH, J.D., BRADBERRY, C.W., WINGER, G., TAYLOR, J.R., RUSSELL, R., ROTH, R.H., Cocaethylene: a neuropharmacologically active metabolite associated with concurrent cocaine-ethanol ingestion, **Life Sci**. 48, p. 1787-1794, 1991.

- JOHANSON, C. E.; FISCHMAN, M. W. The pharmacology of cocaine related to its abuse. **Pharmacol. Rev.**, v. 41, n. 1, p. 3-52, 1989.

- JOHNSON, D. N., VOCCI, F. J. Medications development at the National Institute on Drug Abuse: Focus on cocaine. In: TIMS, F. M.; LEUKEFELD, C. G. (Eds.) *Cocaine treatment: research and clinical perspectives* Rockville, Md.: **NIDA**, p. 57-70, 1993.

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

- JOVER, R., PONSODA, X., GOMEZ-LECHON, J.M., HERRERO, C., DEL PINO, J., CASTELL, J.V. Potentiation of cocaine hepatotoxicity by ethanol in human hepatocytes. **Toxicology and Applied Pharmacology** 107, 526-534, 1991.

- KALIVAS, P. W.; DUFFY, P. D1 receptors modulate glutamate transmission in the ventral tegmental area. **J Neurosci.**, v. 15, n. 7 pt 2, p. 5379-5388, 1995.

_____. Effect of acute and daily cocaine treatment on extracellular dopamine in the nucleus accumbens. **Synapse**, v. 5, p. 48-58, 1990.

_____. Time course of extracellular dopamine and behavioral sensitization to cocaine. I. Dopamine axon terminals. **J. Neurosci.**, v. 13, p. 266-275, 1993a.

_____. Time course of extracellular dopamine and behavioral sensitization to cocaine. II. Dopamine perikarya. **J. Neurosci.**, v. 13, p. 276-284, 1993b.

- KALIVAS, P. W.; BARNES, C. D. (Ed.) **Sensitization in the nervous system**. Caldwell, N. J.: Telford , p. 175-205, 1988.

- KALIVAS, P. W.; DUFFY, P. Effect of acute and daily cocaine treatment on extracellular dopamine in the nucleus accumbens. **Synapse**, v. 5, p. 48-58, 1990.

- KALIVAS, P. W.; SORG, B. A.; HOOKS, M. S. The pharmacology and neural circuitry of sensitization to psychostimulants. **Behav. Pharmacol.**, v. 4, p. 315-334, 1993.

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

- KALIVAS, P. W.; STRIPLIN, C. D.; STEKETEE, J. D.; KLITENICK, M. A.; DUFFY, P. Cellular mechanisms of behavioral sensitization to drugs of abuse. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 654, p. 128-135, 1992.

- KANEL, G.C., CASSIDY, W., SHUSTER, L., REYNOLDS, T.B. Cocaine-induced liver cells injury: comparison of morphological features in man and in experimental models. **Hepatology** 11, 646-651, 1990.

- KARSON, C.N.; GARCIA-RILL, E.; BIEDERMANN, J. The brain stem reticular formation in schizophrenia. **Psychiatry Res. Neuroimaging**, v. 40, p. 31-48, 1991.

- KATZ, J.L., TERRY, P., WITKIN, J.M., Comparative behavioral pharmacology and toxicology of cocaine and its ethanol-derived metabolite, cocaine ethyl-ester cocaethylene, **Life Sci.** 50, p. 1351-1361, 1992.

- KAZAHAYA, Y.; AKIMOTO, K.; SABURO, O. Subchronic methamphetamine treatment enhances methamphetamine or cocaine-induced dopamine efflux in vivo. **Biol. Psychiatry**, v. 25, p. 903-912, 1989.

- KEBABIAN, J. W.; CALNE, D. B. Multiple receptors for dopamine. **Nature**, v. 277, p. 93-96, 1979.

- KENDALL, S. Cocaine. Austin, Texas: **Steck-Vaughan Library**, 1991.

- KESSLER, R. M.; ANSARI, M. S.; SCHMIDT, D. E.; DE PAULIS, T.; CLANTON, J. A.; INNIS, R.; AL TIKRITI, M.; MANNING, R. G.; GILLESPIE, D. High affinity dopamine D₂ receptors. **Life Sci.**, v. 49, n. 8, p. 617-628, 1991.

- KHANTZIAN, E. J.; KHANTZIAN, N. J. Cocaine addiction: is there a psychological predisposition? **Psychiat. Ann.**, v. 14, n. 10, p. 753-759, 1984

- KILTY, J. E.; LORANG, D.; AMARA, S. G. Cloning and expression of a cocaine-sensitive rat dopamine transporter. **Science**, v. 254, p. 578-579, 1991

- KITAMAYA, S.; SHIMADA, S.; XU, H.; MARKHAM, L.; DONOVAN, D. M.; UHL, G. R. Dopamine transporter site-directed mutations differentially alter substrate transport and cocaine *binding*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 9, p. 7782-7785, 1992.

- KOGAN, M.J., VEREBEY, K.G., DEPACE, A.C., RESNICK, R.B., AND MULÉ, S.J. Quantitative determination of benzoylecgonine and cocaine in human biofluids by gas-liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, 49(13), 1965-1968, 1997.

- KOOB, G. F.; WALL, T. L.; SCHAFER, J. Rapid induction of tolerance to the antipunishment effects of ethanol. **Alcohol**, v. 4, p. 481-484, 1987.

- KOOB, G. F.; BLOOM, F. E. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. **Science**, v. 242, p. 715-723, 1988.

- KOOB, G. F.; LE H. T.; CREESE, I. The dopamine receptor antagonist SCH 23390 increases cocaine self-administration in the rat. **Neurosci. Lett.**, v. 79, p. 315-320, 1997.

- KOSTEN, T. R. Neurobiology of abused drugs: Opioids and stimulants. **J. Nerv. Ment. Dis.**, v. 178, n. 4, p. 217-227, 1990.

- KUCZENSKI, R.; SEGAL, D. S. Concomitant characterization of behavioral and striatal neurotransmitter response to amphetamine using in vivo microdialysis. **J. Neurosci.**, v. 9, p. 2051-2065, 1989.

- KUHAR, M. J. apud PLATT, J. J. **Cocaine** addiction: theory, research, and treatment: Cambridge: Harvard University Press, 1996

- KUHAR, M. J.; RITZ, M. C.; BOJA, J. W. The dopamine hypothesis of the reinforcing properties of cocaine. **Trends Neurosci.**, v. 14, n. 7, p. 299-302, 1991.

- LARDINSKY, H.; CONSOLO, S.; BIANCHI, S.; SAMANIN, R.; GHEZZI, D. Cholinergic-dopaminergic interaction in the striatum: The effect of 6-hydroxydopamine or pimozide treatment on the increased striatal acetylcholine

levels induced by apomorphine, piribet and D-amphetamine. **Brain Res.**, v. 84, p. 221-226, 1975.

- LEFKOWITZ, R.J.; HOFFMAN, B.B.; TAYLOR, P. The autonomic and somatic motor nervous systems. In: GILMAN, A.G.; RUDDON, R.W.; MOLINOFF, P.B.; LIMBIRD, L.E.; HARDMAN, J.G. (Ed.). **The pharmacological basis of therapeutics**. New York: MacGraw-Hill, p. 105-139, 1996.

- LEHMANN, J.; LANGER, S. Z. The striatal cholinergic interneurons: Synaptic target of dopaminergic terminals? **Neuroscience**, v. 10, p. 1105-1120, 1983.

- LEITE, M. C. Cocaína e crack: dos fundamentos ao tratamento. Porto Alegre, Editora Artes Médicas Sul Ltda, 1999.

- LEO, M.A.; KIM, C.I.; LOWE, N., LIEBER, C.S. Interaction of ethanol with β -carotene: Delayed blood clearance and enhanced hepatotoxicity. **Hepatology**, v. 15, p. 883-891, 1992.

- LEWIS, D.D.; WOODS, S.E.; Fetal alcohol syndrome. **Am Fam Physician** 50, p.1025, 1994.

- LIEBER, C.S. Hepatic and metabolic effects of ethanol: pathogenesis and prevention. **Ann. Med.**, v. 26, p. 325-230, 1994.

- LIEBER, C.S. Hepatic, metabolic, and nutritional disorders of alcoholism: from pathogenesis to therapy. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, v. 37, p.551-584, 2000.

- LIEBER, C.S., Medical disorders of alcoholism. **N. England J. Med.** 333, p.1058, 1995.

- LITTLE, K. Y.; KIRKMAN, J. A.; CARROLL, F. I.; CLARK, T. B.; DUNCAN, G. E. Cocaine use increases (3H)WIN 35428 *binding* sites in human striatum. **Brain Res.**, v. 628, n. 1-2, p. 17-25, 1993.

- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with follin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

- LUCCHI, L.; MORESCO, R.M.; GOVONI, S.; TRABUCCHI, M. Effect of chronic ethanol treatment on dopamine receptor subtypes in rat striatum. **Brain Res.**, v. 449, p. 347-351, 1988.

- MELTZER, H. Y.; MATSUBARA, S.; LEE, J. C. Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D₁- and D₂- and serotonin pK_i values. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 251, p. 238-246, 1989.

- MICGREER, E.G.; MCGREER, P.L.; GREWAAL, D.S.; SINGH, V.K. Striatal cholinergic and their relation to dopaminergic nerve ending. **J. Pharmacol.**, v.6, p. 143-152, 1975.

- MOGHADDAM, B.; BUNNEY, B. S. Differential effect of cocaine on extracellular dopamine levels in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens: Comparison to amphetamine. **Synapse**, v. 4, p. 156-161, 1989.

- MOGHADDAM, B.; ROTH, R. H.; BUNNEY, B. S. Characterization of dopamine release in the rat medial prefrontal cortex as assessed by in vivo microdialysis: comparison to the striatum. **Neuroscience**, v. 36, p. 669-676, 1990.

- MUSTO, D.F. Cocaine's history, especially the American experience. In: CIBA FOUNDATION SYMPOSIUM. Cocaine: scientific and social dimensions. **Chichester: John & Sons**, 1992, p.7-19.

- MUSTO, D.F. Opium, cocaine and marijuana in american history. **Scient. Am.**, n.27, p.40-47, 1991.

- N.B. EDDY, H. HALBACH, H. ISBELL, M.H. SEEVERS, BULL. WHO 32, 723 (1965) NARANJO, C. A.; SELLERS, E. M. Serotonin uptake inhibitors attenuate ethanol intake in problem drinkers. **Recent Dev. Alcohol**, v. 7, p. 255-266, 1989

- NEGRETE, J.C. Cocaine problems in the coca-growing countries of South America. Cocaine: scientific and social dimension. **Chichester: John Wiley & Sons**, 1992.

- NEVO, I.; HAMON, M. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism. **Neurochem. Int.**, v. 26, p. 337-342, 1995.

- O'BRIEN, C. P. Dependência e uso abusivo de drogas. In Hardman, J.G.; Limbird, L.E.; Molinoff, P.B.; Ruddon, R.W.; Gilman, A.G. **Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da terapêutica**. 9 edição. Ed McGraw Hill, p. 405-420, 1996.

- O'BRIEN, C. P.; ECKARDT, M. J.; LINNOILA, V. M. I. Pharmacotherapy of alcoholism. In F. E. Bloom & D. J. Kupfer (Eds.), **Psychopharmacology: The fourth generation of progress** New York: Raven Press. p.1745-1755, 1995.

- OADES, R.D., HALLIDAY, G.M. Ventral tegmental (A10) system: Neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. **Brain Res Rev**, 12, p.117-165, 1987.

- OHNO, M.; YAMAMOTO, T.; WATANABE, S. Blockade of hippocampal nicotinic receptors impairs working memory but not reference memory in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 45, p. 89-93, 1993.

- OLIVEIRA, I.R.; PEREIRA, E.L. Farmacologia do álcool etílico. Tratamento farmacológico do alcoolismo. In: Silva, P. **Farmacologia**, 4^o ed., Ed. Guanabara Koogan, p. 60, 1994.

- PARSONS, L. H.; JUSTICE, J. B., JR. Serotonin and dopamine sensitization in the nucleus accumbens, ventral tegmental area and dorsal raphe nucleus following repeated cocaine administration. **J. Neurochem.**, v. 61, p. 1611-1619, 1993.

- PATRICK, S. L.; THOMPSON, T. L.; WALKER, J. M.; PATRICK, R. L. Concomitant sensitization of amphetamine-induced behavioral stimulation and in vivo dopamine release from rat caudate nucleus. **Brain Res.**, v. 538, p. 343-346, 1991.

- PEARLSON, G. D.; JEFFERY, P. J.; HARRIS, G. J.; ROSS, C. A.; FISCHMAN, M. W.; CAMARGO, E. E. Correlation of acute cocaine-induced changes in local cerebral blood flow with subjective effects. **Am. J. Psychiatry**, v. 150, n. 3, p. 495-497, 1993.

- PERINO, L.E., WARREN, G.H., LEVINE, J.S. Cocaine-induced hepatotoxicity in humans. **Gastroenterology** 93, p. 176-180, 1987.

- PETTIT, H. O.; PAN, H-T.; PARSONS, L. H.; JUSTICE, J. B. Extracellular concentrations of cocaine and dopamine are enhanced during chronic cocaine administration. **J. Neurochem.**, v. 55, p. 798-804, 1990.

- PHILLIPS, A. G.; BROEKKAMP, C. L. E.; FIBIGER, H. C. Strategies for studying the neurochemical substrates of drug reinforcement in rodents. **Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 7, p. 585-590, 1983.

- PIERCE, R. C.; DUFFY, P.; KALIVAS, P. W. Sensitization to cocaine and dopamine autoreceptor subsensitivity in the nucleus accumbens. **Synapse**, v. 20, p. 33-36, 1995.

- POST, R. M.; ROSE, H. Increasing effects of repetitive cocaine administration in the rat. **Nature**, v. 260, p. 731-732, 1976.

- POST, R. M.; WEISS, S. R. B. Sensitization and kindling: implications for the evolution of psychiatric symptomatology. In: KALIVAS, P. W.; BARNES, C. D. (Ed.). **Sensitization in the nervous system**. Caldwell, N.J.: Telford, p. 257-292, 1988.

- R. PICKENS, R. A. MEISCH, J. A. DOUGHERTY, *Psychol. Rep.* 23, 1267 (1968); R. A. Yokel and R. A. Wesl, *Science* 187, 542 (1975); **Psychopharmacology** 48, p. 311, 1976.

- R.A. DEAN, C.D. CHRISTIAN, R.H.B. SAMPLE, W.F. BOSRON, Human liver cocaine esterases: ethanol-mediated formation of ethylcocaine, **FASEB J.** 5 p. 2735–2739, 1991.

- RAFLA FK, EPSTEIN RL Identification of cocaine and its metabolites in human urine of ethyl alcohol. **J Anal Toxicol** 3, p.59-63, 1979.

- RAMAMOORTHY, S.; BAUMAN, A. L.; MOORE, K. R.; HAN, H.; YANG-FENG, T.; CHANG, A. S.; GANAPATHY, V.; BLAKELY, R. D. Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: Molecular cloning, expression and chromosomal localization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 2542-2546, 1993.

- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4 ed. Ed. Guanabara Koogan, p.515-528, 2001.

- REITH, M. E. A.; DE COSTA, B.; RICE, K. C.; JACOBSON, A. E. Evidence for mutually exclusive *binding* of cocaine, BTCP, GBR 12935, and dopamine to the dopamine transporter. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 227, p. 417-425, 1992.

- RICHELSON, E. Cholinergic transduction. In: BLOOM, F.E.; KUPFER, D.J. **Psychopharmacol.** New York: Raven Press, cap. 11, p. 125-134, 1995.

- RIFFEE, W. H.; WANEK, E.; WILCOX, R. E. Apomorphine fails to inhibit cocaine-induced behavioral hypersensitivity. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 29, p. 239-242, 1988.

- RILKE, O.; MAY, T.; OEHLER, J.; WOLFFGRAMM. J. Influences of housing conditions and ethanol intake on binding characteristics of D2, 5-HT1A,

and benzodiazepine receptors of rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 52, p. 23-28, 1995.

- RITCHIE, J. M.; GREENE, N. M. Local anesthetics. In: GILMAN, A. G.; RALL, T. W.; NIES, A. S.; TAYLOR, E. P. (Ed.). **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 8th ed. Elmsford, N. Y.: Pergamon, p. 311-313, 1990.

- RITZ MC, LAMB RJ, GOLDBERG SR AND KUHAR MJ Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. **Science** (Wash DC) 237, p.1219-1223, 1987.

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

- RITZ, M. C.; LAMB, R. J.; GOLDBERG, S. R.; KUHAR, M. J. Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. **Science**, v. 237, p. 1219-1223, 1987.

- ROBBINS, T. W.; CADOR, M.; TAYLOR, J. R.; EVERITT, B. J. Limbic striatal interactions in reward-related processes. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 13, p. 155-162, 1989.

- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T.; Robbins Pathologic of disease. 6^a edição, p. 369-371, 1999.

- 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. 615-620, 1977.

- ROBERTS, S.M., POUNDS, L.G., JAMES, R.C. Cocaine toxicity in culture rat hepatocytes. **Toxicology Letters.**, 50, 283-288, 1990.

- ROBERTSON, G. S.; THAM, C.S.; WILSON, C.; JAKUBOVIC, A.; FIBIGER, H.C. In vivo comparison of the effects of quinpirole and the putative presynaptic dopaminergic agonists B-TH 920 and SND 919 on striatal dopamine and acetylcholine release. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 264 , p. 1344-1351, 1993.

- ROBINSON, T. E. Stimulant drugs and stress: factors influencing individual differences in the susceptibility to sensitization. In: KALIVAS, P. W.; BARNES, C. D. (Ed.). **Sensitization in the nervous systems**. Caldwell, N. J: Telford, p.145-173, 1988.

- ROBINSON, T. E.; BECKER, J. B. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. **Brain Res.**, v. 11, p. 157-198, 1986.

- ROSSETTI, Z.L.; LONGU, G.; MERCURO, G.; HMAIDAN, Y.; GESSA, G.L. Biphasic effect of ethanol on noradrenaline release in the frontal cortex of awake rats. **Alcohol** , v. 27, p. 477-480, 1992.

- ROUNSAVILLE, B.J., ANTON, S.F., CARROL, K., BUDDE, D., PRUSOFF, B.A., GAWIN, F., Psychiatric diagnoses of treatment-seeking cocaine abusers. **Arch Gen Psychiatry** 48, p. 43-51, 1991.

- ROWBOTHAM, M .C.; LOWENSTEIN, D. H. Neurologic consequences of cocaine use. **Ann. Rev. Med.**, v. 41, p. 417-422, 1990.

- RUDNICK, G.; WALL, S. C. *Binding* of the cocaine analog 2-beta-(3H) carboxymethoxy-3-beta-(4-fluorophenyl)tropane to the serotonin transporter. **Mol. Pharmacol.**, v. 40, p. 421-426, 1991.

- SAFER, D.J.; ALLEN, R.P. The central effects of scopolamine in man. **Biol. Psychiatr.**, v.3, p. 347-355, 1971.

- SCATTON, B. Effects of dopamine agonists and neuroleptic agents on striatal acetylcholine transmission in the rat: evidence against dopamine receptor multiplicity. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 220, p. 197-202, 1982a.

- SCATTON, B. Further evidence for the involvement of D2 but not D1 dopamine receptors in dopaminergic control of striatal cholinergic transmission. **Life Sci.** v. 31, p. 2883-2890, 1982b.

- SCHRANK, K. S. Cocaine-related emergency department presentations. In: SORER, H. (Ed.). Acute cocaine intoxication: current methods of treatment. Rockville, Md.: NIDA, p. 110-128, 1993. (**NIDA Research Monograph n° 123**).

-SEGAL, M.; WEINSTOCK, M. Differential effects of 5-hydroxytryptamine antagonists on behaviors resulting from activation of different pathways arising from the raphe nuclei. **Psychopharmacology**, v. 79, n. 1, p. 72-78, 1983.

- SELIM, M.; BRADBERRY, C.W. Effect of ethanol on extracellular 5-HT and glutamate in the nucleus accumbens and prefrontal cortex: comparison between the Lewis and Fischer 344 rat strains. **Brain Res.**, v. 716, p. 157-164, 1996.

- SERSHEN, H.; HASHIM, A.; LAJTHA, A. Serotonin-mediated striatal dopamine release involves the dopamine uptake site and the serotonin receptor. **Brain Res. Bull.**, v. 53, p. 353-357, 2000.

- SETHY, V.H.; VAN WOERT, M.H. Regulation of striatal acetylcholine concentration by dopamine receptors. **Nature**, v. 251, p. 529-530, 1974.

- SHARP, T.; ZETTERSTROM, T.; LJUNGBERG, T.; UNGERSTEDT, U. A direct comparison of amphetamine-induced behaviors and regional brain dopamine release in the rat using intracerebral dialysis. **Brain Res.**, v. 401, p. 322-330, 1987.

- SHEPHERD, G. M. **Neurobiology**. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1988.

- SHERER, M. A.; KUMOR, K.; JAFFE, J. H. Effects of intravenous cocaine are partially attenuated by haloperidol. **Psychiatry Res.**, v. 27, p. 117-125, 1989.
- SHIMADA, A.; YAMAGUCHI, K.; YANAGITA, T. Neurochemical analysis of the psychotoxicity of methamphetamine and cocaine by microdialysis in the rat brain. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 801, p. 361-370, 1997.
- SHIMADA, S., KITAYAMA, S., LIN, C-L ETAL. Cloning and expression of a cocaine-sensitive dopamine transporter complementary DNA. **Science**, v. 254, p. 576-577, 1991.
- SILVA, M.O., ROTH, D., REDDY, K.R., FERNANDEZ, J.A., ALBORES-SAAVEDRA, J., SCHIFF, E.R. Hepatic dysfunction accompanying acute cocaine intoxications. **J. Hepatol.** 12, 312-315, 1991.
- SITARAM, N.; NURBERGER, J.I.; GERSHON, E.S.; GILLIN, J.C. Faster cholinergic REM sleep induction in euthymic patients with primary affective illness. **Science**, v. 208, p. 200-202, 1980.
- SMITH, R.M., Ethyl esters of arylhydroxy- and arylhydroxymethoxycocaines in the urine of simultaneous cocaine and ethanol users. **J Anal Toxicol** 8, p.38-42, 1984.
- SOUZA-FORMIGONI, M.L.; DE LUCCA, E.M.; HIPOLIDE, D.C.; ENNS. S.C.; OLIVEIRA, M.G.; NOBREGA, J.N. Sensitization to ethanol's stimulant effect is associated with region-specific increases in brain D2 receptor binding. **Psychopharmacology**, v. 146, p. 262-267, 1999.
- SCHECHTER, M.D., Cocaethylene produces discriminative stimulus properties in the rat: effect of cocaine and ethanol coadministration, **Pharmacol. Biochem. Behav.** 51, p. 285-289, 1995.
- STADLER, H.; LLOYD, K. D.; GADEA-CIRIA , M.; BARTHOLINI, G. Enhanced striatal acetylcholine release by chlorpromazine and its reversal by apomorphine. **Brain Res.**, v. 55, p. 476-480, 1973.

- STOOFF, J. C.; DRUKARCH, B.; DE BOER, P.; WESTERINK, B. H. C.; GROENEWEGEN, H. J. Regulation of the activity of striatal cholinergic neurons by dopamine. **Neuroscience**, v.47, p. 755-770, 1992.

- SYVALAHTI, E.K.; HIETALA, J.; ROYTТА, M.; GRONROOS, J. Decrease in the number of rat brain dopamine and muscarinic receptors after chronic alcohol intake. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 62, p. 210-216, 1988.

- TANDO, R.; DEQUARDO, J.R.; GOODSON, J.; MANN, N.A.; GREDEΝ, J.F. Effects of anticholinergics on positive and negative symptoms in schizophrenia. **Psychopharmacol. Bull.**, v.28, p. 297-302, 1992.

- TANDO, R.; SHIPLEY, J.E.; GREDEΝ, J.F.; MANN, N.A.; EISNER, W.H.; GOODSON, J. Muscarinic cholinergic hyperactivity in schizophrenia – relationship to positive and negative symptoms. **Schizophrenia Res.**, v.4, p. 23-30, 1991

- TARCY, D. Dopamine-acetylcholine interaction in the basal ganglia. In: **FIELDS, W.S.** Neurotransmitter function: basic and clinical aspect. New York, 1977.

- TERAИ, M.; HIOAKA, K.; NAKAMURA, Y. Comparison of 3H-YM-09151-2 with 3H-spiperone and 3H-raclopride for dopamine receptor *binding* to rat striatum. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 173, n. 2, p. 177-182, 1989.

- TRABUCCHI, M.; CHENEY, D.; RACAGNI, G.; COSTA, E. Involvement of brain cholinergic mechanisms in the action of chlorpromazine. **Nature**, v. 249, p. 664-666, 1974.

- TUCEK, S. Short-term control of the synthesis of acetylcholine. **Prog. Biophys. Molec. Biol.**, v. 60, p.59-69, 1993

- VAN DYKE, C. AND BYCK, R. Cocaine. **ScientificAmerican**, 246, 128-141, 1982.

- VOLKOW, N. D.; FOWLER, J. S.; WOLF, A. P.; SCHLYER, D.; SHIUE, C. Y.; ALPERT, R.; DEWEY, S. L.; LOGAN, J.; BENDRIEM, B.; CHRISTMAN, D.; HITZEMANN, R.; HENN, F. Effects of chronic cocaine abuse on postsynaptic dopamine receptors. **Am. J. Psychiatry**, v. 147, n. 6, p. 719-724, 1990.

- WANLESS, I.R., DORE, S., GOPINATH, N., TAN, N., CAMERON, R., HEATHCOTE, E.J., BLENDIS, L.M., LEVY, G. Histopathology of cocaine hepatotoxicity. **Gastroenterology** 98, 497-501, 1990.

- W.L. HEARN, D.D. FLYNN, G.W. HIME, S. ROSE, J.C. COFINO, E. MANTERO-ATIENZA, C.V. WETLI, D.C. MASH, Cocaethylene: a unique cocaine metabolite displays high affinity for the dopamine transporter, **J. Neurochem.** 56, p. 698–701, 1991.

- WEISS, R.D., MIRIN, S.M., GRIFFIN, M.L., MICHAEL, J.L. Psychopathology in cocaine abusers – changing trends. **J Nerv Ment Dis** 176, p. 386-394, 1988.

- WEISS, R.D.; MIRIN, S.M; BARTEL, R.L. Cocaine, 2. ed. Washington, D.C.; **American Psychiatric Press**, p. 1-14, 1994.

- WEISS, S. R. B.; POST, R. M.; WOODWARD, R.; MURMAN, D. Context-dependent cocaine sensitization: Differential effect of haloperidol on development versus expression. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 34, p. 655-661, 1989.

- WHEATLEY, M.; HULME, E. C.; BIRDSALL, N. J. M.; CURTIS, C. A. M.; 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. Suppl.**, p. 19-24, 1988.

- WILKINSON, P., VAN DYKE, C., JATLOW, P., BARASH, P., AND BYCK, R.. Intranasal and oral cocaine kinetics. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, 27(3), p. 386-394, 1980.

- WISE, R.A. The role of reward pathways in the development of drug dependence. **Pharmacol. Ther**, 35: p. 227-263, 1987.

- WISE, R. A. Neural mechanisms of the reinforcing action of cocaine. In: GRABOSKI, J. (Ed.). Cocaine: effects and treatment of abuse. **Washington, D. C.: NIDA**, pp. 15-33, p. 15-33, 1984.

- WISE, R. A.; BOZARTH, M. A. A psychomotor stimulant theory of addiction. **Psychol. Rev.**, v. 94, p. 469-492, 1987.

- WONG, D.T; BYMASTER, F.P.; REID, L.R; FULLER, R.W.; PERRY, K.W. KORNELD, E.C. Effects of stereospecific D2 dopamine agonist on acetylcholine concentration in corpus striatum on rat brain. **J. Neural. Transm.**, v. 58, p.55-67, 1983.

- YEH, S.Y.; DE SOUSA, E. B. Lack of neurochemical evidence for neurotoxic effects of repeated cocaine administration in rats on brain monoamine neurons. **Drug Alcohol Depend.**, v. 27, p. 51-61, 1991.

- 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. 547-549, 1975.

- ZILLES, K.; WREE, A. apud SOUSA, F. C. F. Interação dopamina-acetilcolina - ação de drogas que atuam nos sistemas dopaminérgico e colinérgico em cortex motor e corpo estriado de rato. Fortaleza, 1997. Tese (**Doutorado em Farmacologia**) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará.