

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

CAMILLA NICOLUCCI

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA QUERCETINA COMO
POTENCIAL AGENTE PSICOTERAPÊUTICO EM MODELO
ANIMAL DE EXPOSIÇÃO AGUDA POR COCAINA**

Bragança Paulista

2019

CAMILLA NICOLUCCI – R.A. 001201708948

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA QUERCETINA COMO
POTENCIAL AGENTE PSICOTERAPÊUTICO EM MODELO
ANIMAL DE EXPOSIÇÃO AGUDA POR COCAINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientadora: Prof(a) Dr(a) Denise Gonçalves Priolli

Co-orientadora: Prof(a) Dr(a) Ana Cristina Santos

Bragança Paulista

2019

QV 325
N558a

Nicolucci, Camilla

Avaliação funcional da quercetina como potencial agente psicoterapêutico em modelo animal de exposição aguda por cocaína / Camila Nicolucci. - Braçançã Paulista, 2019.

91 p.

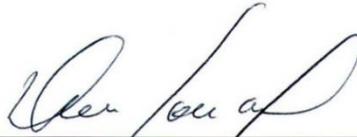
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Denise Gonçalves Priolli.

Co-orientação de: Ana Cristina Santos.

1. Flavonoides. 2. Quercetina. 3. Exposição aguda. 4. Cocaína. 5. Dependência. I. Priolli, Denise Gonçalves. II. Santos, Ana Cristina. III. Título.

NICOLUCCI, Camilla. *“Avaliação Funcional da Quercetina como Potencial Agente Psicoterapêutico em Modelo Animal de Intoxicação Aguda de Cocaína”*, Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 02 de Agosto de 2019 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Denise Gonçalves Prioli
Universidade São Francisco



Carlos Tadeu Parisi de Oliveira
Universidade São Francisco



Thalita Rocha
Universidade São Francisco

Dedico este trabalho à minha mãe Denise, minha estrela guia, grande inspiração e maior incentivadora, ao meu namorado pela paciência e pela ajuda e aos meus avós pela torcida de sempre.

Agradecimentos

Nesses anos de mestrado houve muito estudo, muita dedicação e muita pesquisa e nada teria saído do papel se não fosse o incentivo, a paciência e a raça de encarar um desafio que seria, sabidamente, difícil para ambas. Ela que foi uma professora tão querida na graduação e que felizmente pode ser uma professora e orientadora incrível (e muito exigente) na pós-graduação. Dra Denise Gonçalves Priolli, meu muito obrigada pela companhia nas noites em claro, pela ajuda com as pesquisas e estatísticas, pela paciência com o meu desentendimento com tecnologias e ferramentas do Office e pelo colo nos momentos de desespero.

Essa jornada não seria tão completa se não fosse pelos meus colegas de mestrado, nossos seminários, grupos de discussão, desesperos antes das provas e apoio, sempre. Pelos professores que contribuíram com conhecimentos essenciais para o avanço da pesquisa e por aumentar nosso interesse na área acadêmica e pelos alunos da Iniciação Científica, Marina Zecchini e Maycon Giovani Santana, pela colaboração com a pesquisa, além de todos os demais alunos pelo apoio e suporte nas apresentações.

À Universidade de Coimbra e à Universidade São Francisco, pelo acolhimento e pela possibilidade de realizar esse projeto, aprimorar o conhecimento e enriquecer todo o aprendizado.

Por fim e, absolutamente não menos importante, aos professores e colegas que contribuíram e enriqueceram infinitamente essa pesquisa em Portugal, fazendo com que qualquer madrugada no laboratório fosse muito mais leve e menos estressante. Professoras Dra. Filomena Botelho, Dra Ana Cristina Santos e Dr. Frederico Pereira e colegas Fabiana Ribeiro, Inês Pitta, Carlos Ramos, Mariana Lapo Paes, Julie Reis e Arianna Parma que participaram ativamente da minha jornada, além dos demais colegas e professores que, de várias maneiras, deram suporte para nossos experimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Pode parecer clichê, entretanto é a mais pura verdade: sem essas pessoas, essa pesquisa não seria possível. Meus sinceros agradecimentos e meu eterno carinho.

RESUMO

Perante o atual consumo e diante das complicações neurovasculares decorrentes do elevado índice de morbidade e mortalidade e, sem que exista tratamento específico para a dependência de cocaína, há uma urgente necessidade no desenvolvimento de alternativas terapêuticas para a população de usuários, com o intuito de promover proteção do encéfalo contra as lesões vasculares, neurológicas e cognitivas decorrentes do uso abusivo e, assim, melhorar a qualidade de vida dos indivíduos que desejam cessar o uso e reduzir o impacto que as suas sequelas trazem para o indivíduo e a saúde pública. Atualmente são utilizados psicofármacos, principalmente benzodiazepínicos e anticonvulsivantes, para amenizar os sintomas de abstinência e a impulsividade, respectivamente, entretanto sem ação protetora das lesões cerebrais. Por outro lado, os flavonoides, classe de compostos da qual pertence a quercetina, têm sido amplamente estudados por sua ação antioxidante, por bloquear a toxicidade neuronal e as alterações neurovasculares, além de promover melhora da coordenação motora e redução da ansiedade. O uso da quercetina como antidepressivo, anticonvulsivante, ansiolítico e na melhora da cognição é conhecido e atrai atenção por apresentar bases farmacológicas de medicamentos semelhantes aos utilizados para tratamento da drogadição, com ação GABAérgica e benzodiazepínica. Este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade funcional da quercetina em modelo animal de exposição aguda única à cocaína em baixa dose. Para tanto foi realizada administração de cocaína (0,5 mg/kg) e quercetina (50 mg/kg) em camundongos Balb-c, em monoterapia ou de forma associada. Realizou-se Tomografia Computadorizada por Emissão de Póstron (PET) para a análise funcional, *Open Field Maze* (OF) e *Elevated Plus Maze* (EPM) para os testes comportamentais e análise anatomopatológica por microscopia ótica dos encéfalos extraídos, após eutanásia, para detecção de alterações morfológicas. Observou-se que os animais que receberam quercetina ou cocaína apresentaram comportamentos globais semelhantes entre si e diferentes do controle aos 60 minutos, enquanto o grupo que recebeu cocaína associada à quercetina se assemelhou ao controle em parâmetros que identificam nível de ansiedade ou esquiva. A análise histológica demonstrou que não houve alterações no cerebelo, entretanto, nos núcleos da base, principalmente hipocampo, e no córtex pré-frontal houve gliose leve no grupo quercetina, gliose intensa no grupo cocaína e melhora dos parâmetros no grupo de cocaína associada à quercetina. A intensidade de captação da quercetina e cocaína estiveram aumentadas principalmente no tálamo, enquanto o grupo cocaína associado à quercetina assemelhou-se ao controle. Desta forma, a partir do estabelecimento de modelo animal de exposição aguda a cocaína foi possível observar o comportamento, as regiões cerebrais metabolicamente ativas e as modificações estruturais encefálicas dos animais submetidos agudamente à cocaína, quercetina e ambos, no qual a quercetina demonstrou atividade funcional como potencial psicofármaco protetor na adicção de cocaína.

Palavras-chave: Flavonoides. Quercetina. Exposição aguda. Cocaína. Dependência.

ABSTRACT

Given the current consumption and the neurovascular complications resulting from cocaine use, with high morbidity and mortality rates, and due to no specific treatment for addiction, there is an urgency in the development of alternative treatments for the users' population. The therapeutic will be to protect the encephalon from vascular, neurological and cognitive injuries resulting from addiction, thus improving the quality of life people who wish to cease use and reduce the impact of their sequelae bring to the individual and public health. Currently, psychotropic drugs, benzodiazepines and anti-convulsants are used to soften withdrawal symptoms such as impulsivity, however without brain lesions protection. On the other hand, flavonoids, a class of compounds of which Quercetin belongs to, have been extensively studied for their antioxidant activity, blocking neuronal toxicity and neurovascular changes, improving motor coordination and reducing anxiety. The quercetin acting is well known as an antidepressant, anticonvulsant, anxiolytic, improving cognition. It attracts attention since it has similar pharmacological bases of drugs used to treat drug addiction, with GABAergic and benzodiazepine activity. This study aimed to evaluate the functional quercetin activity in an animal model of acute low dose cocaine. For this purpose cocaine administration (0.5 mg/kg) and quercetin (50 mg/kg) were administered to Balb/c mice, alone or in association. Positron Emission Computed Tomography (PET) was used for functional analysis, Open Field Maze (OF) and Elevated Plus Maze (EPM) for behavioral tests and anatomopathological analysis for the detection of morphological changes. The animals that received quercetin or cocaine had similar global behaviors among themselves. They are different from the control at 60 minutes. The group that received cocaine associated with quercetin resembled to the control and presented anxiety-like or avoidance levels. Histological analysis showed no alterations in the cerebellum, however, in the nuclei of the base, mainly the hippocampus, and in the prefrontal cortex there was minor gliosis in the quercetin group, intense gliosis in the cocaine group that decreased when both, quercetin and cocaine, are associated. The intensity of uptake in quercetin and cocaine was increased mainly in the thalamus, whereas the cocaine group associated with quercetin resembled the control. Thus, after the establishment of an animal model of acute cocaine exposure, it was possible to observe the behavior, the metabolically active brain regions and the encephalic structures, in which quercetin showed functional activity as potential psychoactive drug in cocaine addiction.

Keywords: Flavonoids. Quercetin. Acute Intoxication. Cocaine. Dependence.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Δ FosB	Fator de transcrição delta FosB
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
AMY	Amígdala
ATP	Adenosina trifosfato
BLA	Corpo amigdalóide basolateral
BA	Braço Aberto
BF	Braço Fechado
Bs	Tronco cerebral
CBL	Cerebelo (lateral)
CBV	Cerebelo (vermis)
CC	Colículo caudal
CPF	Córtex pré-frontal
CRF	Fator de liberação de corticotrofina
EPM	Labirinto em cruz elevada, tradução livre do inglês <i>Elevated plus maze</i>
ERK	Proteína quinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FC	Córtex Frontal
FDG	Fluordesoxiglicose
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
HA	Glândulas Haiderianas
HC	Hipocampo
HE	Hematoxilina- Eosina
HG	Glândulas Harderianas
HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal

HT	Hipotálamo
ID	Dose Injetada
IN	Infundíbulo
LF	Fissura longitudinal
m	Metros
M	Medula oblonga
MB	Corpos mamilares
mPCF	Córtex Pré-frontal medial
mRNA	RNA mensageiro
NAc	Núcleo <i>accumbens</i>
OB	Bulbo Olfatório
OC	Córtex occipital
OF	Campo aberto, tradução livre do inglês <i>Open field</i>
OlfT	Túbérculo olfatório
ORBEA	Órgão Europeu Responsável pelo Bem-Estar dos Animais
P	Ponte
PC	Córtex parietal
PET	Tomografia por Emissão de Pósitrons
PiC	Córtex piriforme
PKC	Proteína quinase C
Pyr	Pirâmide
RC	Colículo rostral
RNA	Ácido Ribonucleico
s	Segundos
SPECT	Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único
St	Estriado

STV	Valor de captação padronizado, tradução livre do inglês <i>Standardized Uptake Value</i>
T	Tempo
TC	<i>Tuber cinereum</i>
TH	Tálamo
VF	Fissura mediana ventral
VTA	Área tegmental ventral
VOI	Volume de Interesse, tradução livre do inglês <i>Volum of Interest</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural da cocaína.....	17
Figura 2: Histórico sobre descoberta e utilização da Cocaína.....	18
Figura 3: Sistema de recompensa cerebral.....	21
Figura 4: Fórmula estrutural da quercetina.....	31
Figura 5: Grupos de animais e procedimentos utilizados.....	35
Figura 6: Protocolo das análises comportamentais.....	36
Figura 7: Labirinto em Cruz Elevado.....	37
Figura 8: Labirinto em Campo Aberto.....	38
Figura 9: <i>EasyPET-3D</i>	39
Figura 10: Protocolo do processo de captação de imagens.....	40
Figura 11: Representação dos cortes coronal, axial e sagital em imagem de PET (A) e atlas anatômico (B).....	45
Figura 12: <i>EasyPET-3D-¹⁸F-FDG</i> Tálamo.....	46
Figura 13: <i>EasyPET-3D-¹⁸F-FDG</i> Corpus amigdalóides.....	47
Figura 14: <i>EasyPET-3D-¹⁸F-FDG</i> Cerebelo.....	48
Figura 15: <i>EasyPET-3D-¹⁸F-FDG</i> Hipocampo.....	49
Figura 16: <i>EasyPET-3D-¹⁸F-FDG</i> Córtex.....	50
Figura 17: Aspecto macroscópico do cérebro.....	52
Figura 18: Microfotografias do cerebelo de animais com ou sem exposição aguda a cocaína e quercetina.....	53
Figura 19: Microfotografias da região hipocampal de animais com ou sem exposição aguda a cocaína e quercetina.....	54
Figura 20: Microfotografias do encéfalo de animais com ou sem exposição aguda a cocaína e quercetina.....	55
Figura 21: Microfotografias do encéfalo de animal exposto de forma aguda à cocaína.....	57
Figura 22: Mecanismo de regulação de GABA sob ação da cocaína e quercetina.....	74

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Teste do Labirinto em Cruz Elevado (EPM).....	43
Gráfico 2: Labirinto em Campo Aberto (OF).....	45
Gráfico 3: PET- ¹⁸ F- FDG.....	51
Gráfico 4: Correlação entre o PET- ¹⁸ F- FDG e os grupos de animais submetidos a diferentes compostos.	51
Gráfico 5: Dados anatomopatológicos mostrando as áreas mais afetadas pela cocaína.....	56
Gráfico 6: Correlação entre o PET- ¹⁸ F- FDG e as alterações histológicas encontradas.....	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Critérios diagnósticos de dependência de substâncias.....	24
Quadro 2: Caracterização da quercetina como fitoterápico.	32
Quadro 3: Principais associações entre as variáveis estudadas.	58
Quadro 4: Achados comparativos entre os animais dos grupos que receberam agudamente cocaína, quercetina e ambas.	75

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Dependência de Cocaína	16
1.1.1. Histórico e epidemiologia	16
1.1.2. Fisiopatologia do abuso de cocaína	19
1.1.3. Estágios da dependência de cocaína	22
1.1.4. Sintomas de dependência de cocaína	23
1.1.5. Tratamento da adicção por cocaína	26
1.2. Flavonóides	28
1.2.1. Quercetina	31
2. OBJETIVO GERAL	33
2.1. Objetivos específicos	33
3. MÉTODO	34
3.1. Adequação do projeto	34
3.2. Grupos	34
3.3. Caracterização do modelo animal de exposição aguda	36
3.3.1 Análise comportamental	36
3.3.2 Avaliação por Tomografia Computadorizada por Emissão de Pósitrons (easy-PET 3D) de áreas envolvidas na drogadição	38
3.4 Técnica de eutanásia dos animais	41
3.5 Análise anatomopatológica	41
3.6 Análise estatística dos resultados	41
4. RESULTADOS	42
4.1. Análise Comportamental	42
4.2. Avaliação por Tomografia Computadorizada por Emissão de Pósitrons (PET- ¹⁸ F-FDG)	45

4.3. Análise anatomopatológica	52
4.3.1. <i>Análise macroscópica</i>	52
4.3.2. <i>Análise microscópica</i>	53
4.4. Correlação entre atividade cerebral e histologia	57
5. DISCUSSÃO	59
5.1. Considerações Finais	72
6. CONCLUSÕES	75
7. FINANCIAMENTOS.....	76
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
9. ANEXO:.....	90

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dependência de Cocaína

1.1.1. Histórico e epidemiologia

A dependência química é considerada uma condição física e psicológica que acarreta doença crônica e recidivante, em que o uso continuado de substâncias psicoativas provoca mudanças na estrutura e no funcionamento do cérebro (RIBEIRO; LARANJEIRA, 2012). Várias são as substâncias que podem levar a dependência química por seu uso constante, como tabaco, opióides, canabinóides, psicoestimulantes, entre outros.

A cocaína é uma das drogas mais utilizada no mundo. Na Europa, a previsão para 2017 era de que cerca de 3,5 milhões de pessoas entre 15 e 64 anos faziam uso de cocaína e 17 milhões tinham consumido ao menos uma vez na vida (EMCDDA, 2013; UNODC, 2015). Segundo dados do Ministério da Saúde entre 2005 e 2015, 604.965 internações por uso de substâncias foram realizadas no Brasil e, em levantamento feito pelo IBGE em 2016, o número de jovens que já tiveram algum contato com drogas ilícitas era de 236,8 mil (EMCDDA, 2013; UNODC, 2015). Seu consumo atinge cerca de 0,4% da população mundial e a maior parte dos usuários (70%) concentra-se nas Américas (NEGRETI, 1992; APA, 2012; FERIGOLO, 2007), sendo que o Brasil consome quatro vezes mais cocaína (1,75%) que a população mundial (UNODC, 2015).

O cultivo e consumo da coca iniciaram na civilização Inca, para aumento da capacidade de trabalho, devido à sua ação psicoativa. A cocaína (FIGURA 1) é originária *Erythroxylum coca* (OLIVEIRA et al., 2009). Em 1855, Friedrich Gaedecke extraiu o ingrediente ativo da sua folha e, em 1859, Albert Niemann isolou o alcaloide denominando de cocaína. A partir de 1880 a cocaína foi empregada em vários produtos e utilizada amplamente (BAHLS, 2002).

No Brasil, foi legalmente comercializada no início do século XX, como formulação de remédios ou em sua forma pura. Em 1914, a sua disponibilidade à população foi restringida e seu consumo entrou em declínio (BAHLS, 2002).

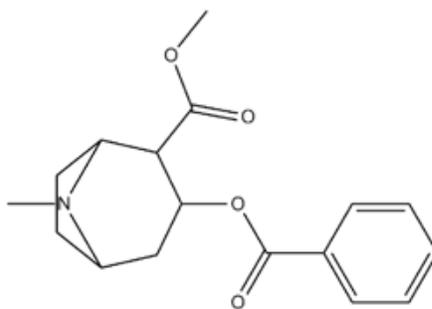


Figura 1: Fórmula estrutural da cocaína. Fonte: Oliveira et. al, (2009, p78).

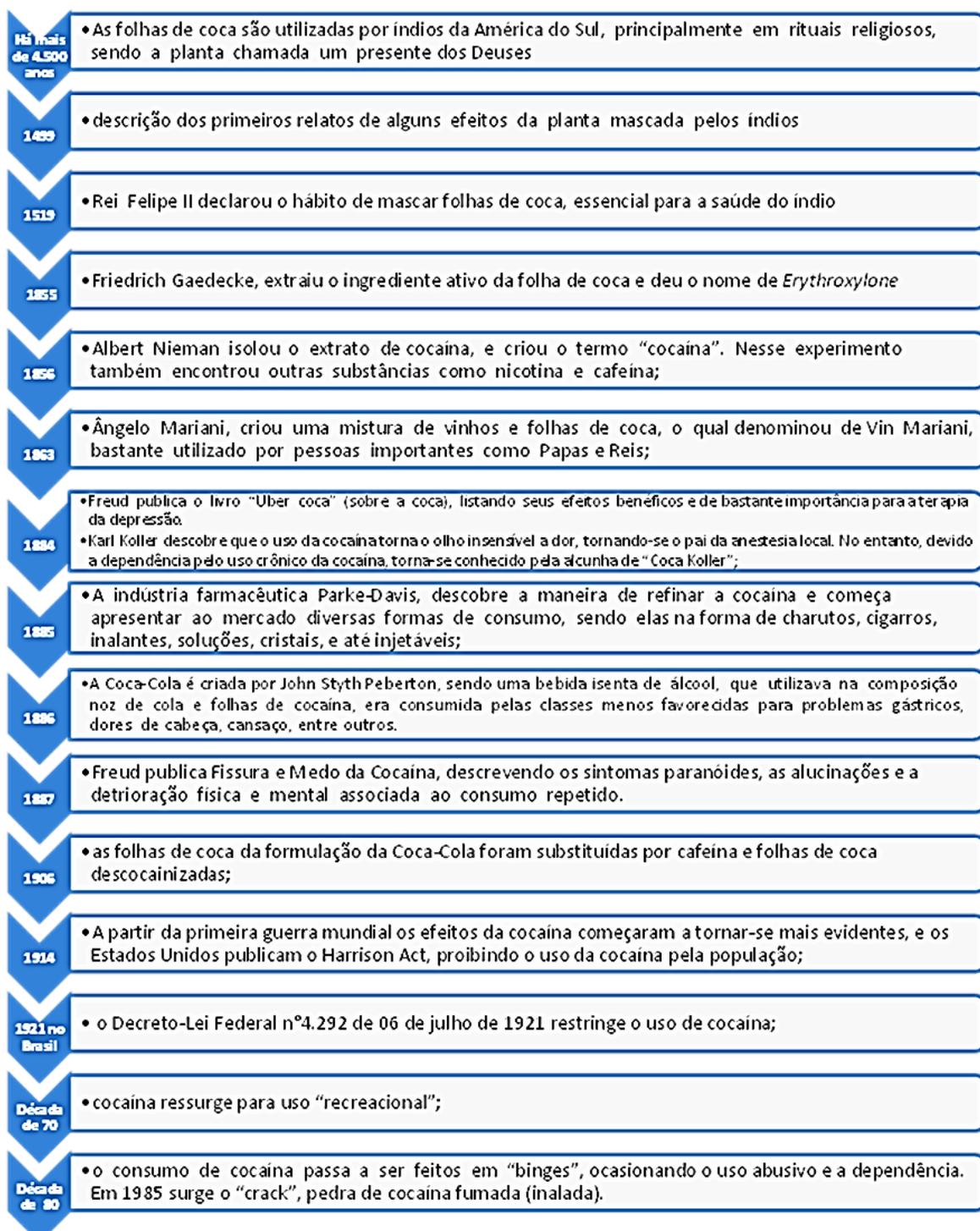


Figura 2: Histórico sobre descoberta e utilização da Cocaína. Fonte: dados retirados de Bahls (2002).

Em 1962 foi feito o primeiro levantamento brasileiro sobre internação por dependência de drogas que contou com 4 casos de internação por uso de cocaína, em contraste aos mais de 8 mil casos de internação por dependência de álcool (CARLINI et al.,1996). Entretanto, observou-se o ressurgimento de sua disponibilidade e consumo em 1970 nos Estados Unidos, e no final de

1980, e no Brasil, no início de 1990 (BAHLS, 2002) (FIGURA 2). Desde então, novos padrões de consumo e apresentações da substância foram introduzidos.

O envolvimento dos usuários com atividades ilegais, roubos, sequestros, tráfico e outros crimes aumenta a predisposição de mortes por causas externas, o que justifica a alta taxa de homicídio nesta população. O uso concomitante de múltiplas substâncias é comum e tem pior prognóstico. O início é comumente associado ao tabaco, álcool e maconha, a mais comum das associações (RIBEIRO; LARANJEIRA, 2012).

1.1.2. Fisiopatologia do abuso de cocaína

Segundo o Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V), todas as drogas consumidas em excesso promovem a ativação direta do sistema de recompensa do cérebro envolvido no reforço de comportamentos e na produção de memórias, sendo esta ativação intensa a ponto de fazer atividades rotineiras serem negligenciadas (APA, 2014).

Ao invés de atingir a ativação do sistema de recompensa por meio de comportamentos adaptativos, as drogas de abuso ativam diretamente as vias mesolímbica e mesocortical. Apesar da diferença entre a produção de recompensa de cada substância, elas geralmente ativam o sistema e produzem sensações de prazer, frequentemente denominadas de "barato" ou "viagem" (APA, 2014).

A cocaína tem como ação cerebral a inibição de recaptção de vários neurotransmissores, sendo que a principal ação está na inibição da recaptção de dopamina, consequentemente gerando a sensação de bem-estar e euforia (PLANETA, 2013). Entretanto, a grande concentração da dopamina pode levar a processos neurodegenerativos e, por conseguinte, à morte celular. Isso acontece porque gera neurotoxicidade decorrente da auto-oxidação, do estresse oxidativo e de apoptose celular (RIBEIRO; LARANJEIRA, 1998; ARAUJO et al., 2008; PLANETA, 2013). O estresse oxidativo se dá não apenas pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), mas também pela redução da atividade antioxidante (ZAPARTE, 2014; SORDI, 2015).

Outro neurotransmissor envolvido na dependência de cocaína é o GABA, principal neurotransmissor inibitório do cérebro, sintetizado a partir do glutamato, que é excitatório. O GABA vem sendo analisado como alvo potencial no tratamento para dependência de cocaína. Estudo pré-clínico demonstrou que neurônios GABAérgicos modulam o sistema dopaminérgico e os efeitos recompensadores da cocaína (LARANJEIRA; DIEHL, 2015).

A ativação do sistema de recompensa cerebral é o elemento comum ao uso de todas as substâncias psicoativas, gerando reforço positivo, ou seja, sensação agradável e prazerosa, que leva à intensificação do consumo.

O sistema de recompensa (FIGURA 3) é formado pela via mesolímbica, uma das vias dopaminérgicas cerebrais, que está relacionada a impulsos, instintos e emoções e às sensações subjetivas e motivacionais devido ao uso da substância. Além da via mesolímbica também é estimulada a via mesocortical, responsável pela experiência consciente dos efeitos da droga e pela capacidade de controlar o seu uso, desta forma, se relacionando à compulsão ao consumo da substância. Esse sistema também chamado de mesolímbico-mesocortical é composto pela substância nigra, área ventral tegmental, corpo amigdalóide, hipocampo, hipotálamo, tálamo, estriado ventral (núcleo *accumbens*), estriado (núcleo caudado, *putamen* e globo pálido) e córtex pré frontal (CPF) (KALIVAS; VOLKOW, 2005).

O descontrole se manifesta na incapacidade de gerenciar e controlar o impulso de consumir a droga, ou em forte impulso subjetivo para usar a substância (SILVEIRA e DOERING-SILVEIRA, 2016). A via dopaminérgica do sistema de recompensa se projeta na área ventral tegmental (VTA) para as áreas desse circuito, mesolímbica e mesocortical (KALIVAS; VOLKOW, 2005; KOOB; LE MOAL, 2001).

Por outro lado, o hipocampo também está envolvido na memória aversiva e de repulsa. Lesões estruturais nessa área podem inibir as reações de medo desencadeadas por determinado estímulo. Essa resposta relacionada ao medo envolve também o corpo amigdalóide basolateral (BLA) (KANDEL et al.,2014). As projeções do VTA para a concha do NAc (Núcleo *accumbens*) e para a amígdala basolateral e central têm papel na modulação da motivação, ou seja, na aprendizagem de associação entre estímulos. Já os comportamentos como a escolha, agem não apenas pelas vias dopaminérgicas, mas também por vias glutamatérgicas e da interação entre elas. Sendo assim, conexões dopaminérgicas e glutamatérgicas podem modular as respostas adaptativas aprendidas (KELLEY, 2004).

O condicionamento clássico, conhecido como condicionamento pavloviano ou respondente é um processo que descreve a modificação de alguns comportamentos baseados nos efeitos do binômio estímulo-resposta, descritos em experimentos realizados pelo fisiólogo Ivan Pavlov (1849-1936). Um estímulo incondicionado decorre de uma resposta natural e automática, como por exemplo, cheiro de comida leva à sensação de fome. Um estímulo condicionado é a introdução de um estímulo externo, por exemplo, um som. Um estímulo condicionado (som) executado repetidas vezes e associado com o estímulo incondicionado,

cheiro de comida, faz com que o indivíduo passe a apresentar uma resposta (fome) relacionada ao estímulo condicionado (som à sensação de fome). Esse condicionamento está relacionado à memória associativa e estudos demonstram que lesões em estruturas cerebrais profundas foram associadas à perda da reação ao estímulo não condicionado em resposta ao estímulo condicionado, sugerindo que essas estruturas possam estar relacionadas a esse tipo de aprendizado (PAVLOV in ALVAREZ, 1976; KENDEL et al.,2014).

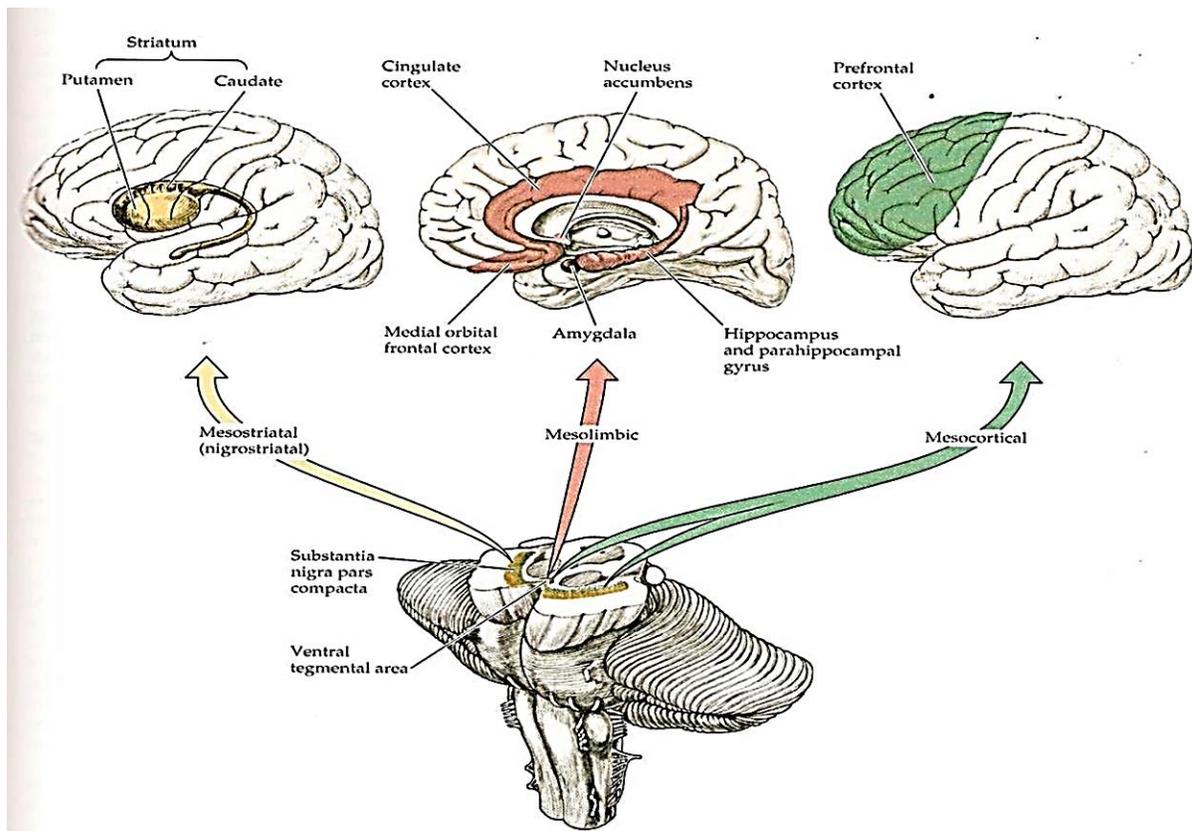


Figura 3: Sistema de recompensa cerebral. Fonte: Ciências e Cognição (2016, parte 3).

Sabe-se que as projeções do VTA para o NAc e para a amígdala basolateral e central têm papel fundamental na modulação motivacional de estímulos, isto é, na eficácia reforçadora ou eliciadora e na aprendizagem de associação entre estímulos neutros e incondicionados, enquanto os comportamentos mais complexos, como escolha, parecem depender não apenas de vias dopaminérgicas, mas também de vias glutamatérgicas e da interação entre elas. Assim, as interconexões dopaminérgicas e glutamatérgicas entre o NAc e o CPF modulam a emissão e intensidade das respostas adaptativas aprendidas, quando na presença de estímulos que predizem eventos motivacionais relevantes (KELLEY, 2004), enquanto a atividade dos neurônios

no NAc eliciada por estímulos condicionados é específica ao estímulo incondicionado com o qual foi associado (CARELLI; WONDOLOWSKI, 2003).

O circuito córtico-estriado-talâmico parece estar envolvido no processo do comportamento de busca de drogas devido ao seu papel na impulsividade e compulsividade, já bem estabelecido em outras doenças psiquiátricas como o Transtorno Obsessivo-Compulsivo. Isso ocorre porque sinais excitatórios glutamatérgicos ativam o estriado e aumentam os sinais inibitórios Gabaérgicos, reduzindo a ação do tálamo, que, uma vez desinibido, promove uma hiperexcitação do córtex, que levaria aos comportamentos repetitivos (PETERS; DUNLOP; DOWNAR, 2016).

O envolvimento do cerebelo nas alterações decorrentes do uso de cocaína tem sido observado em alguns estudos (JIMÉNEZ-RIVERA et al.,2000; ANDERSON et al.,2005; SIM et al.,2007; LÓPEZ-PEDRAJAS et al.,2015). É conhecido o papel do cerebelo na função executiva e de sua relação com o córtex pré-frontal e o sistema límbico e, se acredita que esteja relacionado à manutenção e recuperação de memórias relacionadas às drogas, entretanto, apesar da evidência de uma maior ativação cerebelar em estudos relacionados à cocaína, esse mecanismo ainda não está completamente explicado (CARBO-GAS et al.,2013; LÓPEZ-PEDRAJAS et al.,2015; VAZQUEZ-SANROMAN et. al, 2015).

1.1.3. Estágios da dependência de cocaína

Três estágios (KALIVAS; VOLKOW, 2005; GARCIA-MIJARES, 2006) estão descritos no desenvolvimento da dependência em humanos:

- primeiro estágio ou exposição aguda. Relacionado aos efeitos agudos da droga. São produzidas alterações transitórias na expressão gênica de algumas proteínas das células dopaminérgicas do circuito da motivação, entre elas as quinases reguladas por sinal extracelular (ERK) (TORRES; HOROWITZ, 1999). A duração das alterações pode ser de algumas horas ou até alguns dias e, ainda que possam intermediar a repetição da autoadministração de drogas, não se associa diretamente às alterações comportamentais de longo prazo observadas no dependente (GARCIA-MIJARES, 2006).

- segundo estágio ou tolerância. Denominado de “transição à dependência”. Ocorrem mudanças moleculares como produto da administração repetida da droga ou de seu uso intermitente que produz uma superregulação da via AMPc e o aumento na expressão da proteína Δ FosB (fator de transcrição de gene que está envolvido nos vícios comportamentais). Esse

aumento se dá gradualmente e sugere mudanças que ocorrem em longo prazo, na regulação da expressão gênica da célula (CHAO; NESTLER, 2004; GARCIA-MIJARES, 2006).

- terceiro estágio. É o último e ocorre pelo aumento da proteína G no CPF promovendo alterações permanentes de neurotransmissão dopaminérgica entre ele e o NAc e na neurotransmissão pré e pós-sináptica do NAc, pela inibição dos receptores D2, levando ao aumento do sinal dos receptores D1 (GARCIA-MIJARES, 2006).

Desta forma pode-se dizer que a regulação pela dopamina da neurotransmissão glutamatérgica no CPF depende do tipo de receptor dopaminérgico que é preferencialmente estimulado (SEAMANS; YANG, 2004). O estado 1 é mediado por D2 e se caracteriza pela diminuição de inibição sináptica, a qual permite o acesso de várias entradas excitatórias posteriormente projetadas do CPF para o NAc. Já o estado 2 é mediado por D1 e se caracteriza por aumento da inibição sináptica, fazendo com que apenas estimulações particularmente fortes no CPF sejam transmitidas para o NAc. Sendo assim, enquanto no estado 1, exposição aguda, o comportamento ocorre pela concorrência entre diferentes estimulações produzidas por vários estímulos, no estado 2, tolerância, o comportamento é decorrente de poucas estimulações suficientemente fortes (GARCIA-MIJARES, 2006).

Quando ocorre o período de abstinência, a regulação dopaminérgica no CPF é mediada pelo receptor D1 (estado 2), fazendo com que apenas estímulos ambientais associados repetidamente com o efeito da droga, conhecidos como gatilhos, sejam capazes de ativar a neurotransmissão entre o CPF e NAc, enquanto outros estímulos não promovem efeito reforçador, mas produzem aumento do controle dos estímulos relacionados à droga (KALIVAS; VOLKOW, 2005). Com a transmissão glutamatérgica potencializada no NAc e a liberação aumentada de glutamato nos terminais pré-sinápticos, ocorre um aumento do sinal excitatório produzido pelos estímulos associados à droga (KALIVAS; VOLKOW, 2005). Quando estímulos reforçadores naturais (sexuais, por exemplo) são apresentados, observa-se uma ativação do CPF significativamente menor do que aquela produzida pelos estímulos associados à droga e do que a observada em sujeitos não dependentes (GARAVAN et al., 2000).

1.1.4. Sintomas de dependência de cocaína

A característica essencial da dependência é a presença de agrupamento de sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos indicando que o indivíduo continua utilizando a substância apesar de problemas significativos relacionados a ela, sendo assim, é definida por

três ou mais dos sintomas que ocorrem a qualquer momento, no período de 12 meses ou mais (QUADRO 1).

Quadro 1. Critérios diagnósticos de dependência de substâncias. Fonte: Referência APA (2014, p. 484).

Critérios Diagnósticos	Tolerância
	Abstinência
	Uso em grande quantidade ou por período maior que o intencionado
	Desejo persistente ou esforço se sucesso de diminuir ou controlar a ingestão
	Grandes períodos de tempo utilizados em atividades necessárias para obter a substância, usá-la ou recuperar-se de seus efeitos
	Reduzir ou abandonar atividades sociais, recreacionais ou ocupacionais por causa do uso da substância ou uso continuado da substância, apesar do conhecimento de ter um problema físico ou psicológico recorrente que tenha sido casado ou exacerbado pela mesma

Os sintomas gerais agudos aparecem imediatamente após uma única dose e desaparecem dentro de poucos minutos ou horas. A cocaína apresenta, em humanos, um início de ação de 120 a 180 segundos quando inalada em pó e de 30 a 45 segundos quando injetada. Seus efeitos apresentam duração de 30 a 45 minutos quando inalada, com biodisponibilidade de 20 a 30%. Quando injetada, a sua duração é de 10 a 20 minutos com 100% de biodisponibilidade (FERIGOLO, 2007). A cocaína pode ser detectada no plasma até 12 horas e na urina de 48 a 72 horas (VERSTRAETE, 2004).

Em camundongos, a cocaína atinge valores máximos no cérebro após 5 minutos da administração intraperitoneal e a concentração de cocaína no cérebro costuma ser maior do que no plasma (BENUK et al.,1985). Nestes animais, apesar de ter uma meia vida de aproximadamente 60 minutos, o tempo de duração dos seus efeitos e o tempo de excreção também irão depender da dose e da via de administração (VERSTRAETE, 2004; FERIGOLO, 2007).

Na intoxicação aguda, em humanos, são descritos euforia, sensação de bem estar, autoconfiança elevada, aceleração do pensamento, distúrbios do sono, excitação motora, aumento da libido, agressividade, inquietação, anorexia leve e aumento das percepções sensoriais além de sintomas crônicos decorrentes do uso prolongado de cocaína como

irritabilidade e distúrbios do humor, alucinação, delírio, hostilidade, ansiedade, medo, paranoia, abstinência, extrema energia ou exaustão, compulsão motora estereotipada, diminuição da libido, violência, anorexia, tolerância e dependência (FERIGOLO 2007).

A tolerância é caracterizada quando é necessária a utilização de dose acentuadamente maior da substância para obtenção do efeito desejado ou quando o efeito é acentuadamente reduzido após o consumo da dose habitual. O grau em que a tolerância se desenvolve apresenta grande variação individual, assim como de uma substância para outra, e pode envolver uma variedade de efeitos sobre o sistema nervoso central.

O binge é o padrão de consumo mais recorrente, caracterizado por uso compulsivo com duração de vários dias e, muitas vezes, múltiplos episódios intercalados por crimes aquisitivos devido à falta de dinheiro para a compra de droga e por interrupção condicionada à exaustão física e psíquica (RIBEIRO e LARANJEIRA, 2012).

Em alguns casos de dependência todas as atividades da pessoa giram em torno da substância. As atividades sociais, ocupacionais e recreativas podem ser abandonadas ou reduzidas, em virtude do uso da droga de abuso, e o indivíduo pode se afastar de atividades familiares e passatempos a fim de usá-la em segredo ou para passar mais tempo com amigos usuários da substância. Apesar de admitir a sua contribuição para um problema psicológico ou físico, como severos sintomas depressivos ou danos aos sistemas orgânicos, a pessoa continua fazendo seu uso (APA, 2014).

O *craving*, também conhecido como fissura, é o desejo ou necessidade intensa de consumir a droga e pode ocorrer a qualquer momento, mas com maior probabilidade quando em ambiente onde a droga foi obtida ou usada anteriormente. Esse desejo intenso está associado a intensão de repetir a experiência dos seus efeitos (UNODC e OMS, 2015), sendo, geralmente, acompanhado de alterações do humor, do comportamento e da cognição (ARAÚJO et al., 2008).

Os tipos de *craving* dividem-se em: somático, em que o desejo e o impulso estão localizados no corpo; cognitivo, na qual o desejo e o impulso estão localizados no pensamento ou imaginação; e afetivo, em que o desejo e o impulso estão localizados na emoção (NIDA, 2012). O *craving* ocorre quando, diante de estímulos internos - ansiedade ou depressão - ou externos - presenciar pessoas em uso da droga - são ativadas crenças centrais ("sou frágil") e crenças adictivas ("a droga me fortalece"). O usuário precisa estar ciente dos gatilhos e um trabalho terapêutico pode facilitar este entendimento e reduzir recaídas (LARANJEIRA, 2012; GIGLIOTTI et al., 2016).

A abstinência é uma síndrome que ocorre quando as concentrações de uma substância no sangue ou nos tecidos diminuem em um indivíduo que manteve uso intenso prolongado. A sua característica essencial é o desenvolvimento de uma alteração comportamental mal adaptativa e específica à substância, com concomitantes fisiológicos e cognitivos, devidos à cessação ou redução do uso intenso e prolongado de uma substância; causa sofrimento ou prejuízo clinicamente significativo no funcionamento social, ocupacional ou em outras áreas importantes. Após desenvolver sintomas de abstinência, o indivíduo tende a consumir a substância para aliviá-los. Os sintomas de abstinência apresentam grande variação entre as diferentes classes de substâncias, e conjuntos distintos de critérios para abstinência são fornecidos para as classes de drogas (APA, 2014).

O quadro da adicção pode ser descrito como trifásico sendo que a primeira fase, "crash", tem duração de poucas horas a cinco dias e se caracteriza pelo *craving* intenso no início, irritabilidade e agitação, evoluindo para hipersonolência, depressão, anedonia e exaustão, acompanhados da redução da fissura. A abstinência é a segunda fase e se inicia com o reaparecimento do *craving* e de sintomas depressivos e ansiosos, podendo durar até dez semanas. Por fim, se inicia a terceira fase, caracterizada por redução gradativa do *craving* e tendência à normalização do humor, sono e ansiedade (LEITE et al., 1999; LARANJEIRA, 2012).

Várias complicações estão associadas ao abuso de cocaína. As mais frequentes incluem efeitos cardiovasculares, respiratórios, neurológicos e gastrintestinais (FERIGOLO 2007). Dentre as causas neurológicas decorrentes do uso de cocaína estão os transtornos do movimento, como tiques, distonias e coréias, devido ao acúmulo de dopamina nos núcleos da base; cefaleia e atrofia cerebral, sendo as causas multifatoriais e pouco estabelecidas; crises convulsivas, devido à intensa estimulação serotoninérgica; além do comprometimento neurovascular, como AVCs e vasculite cerebral, de causa ainda pouco clara, mas associado, possivelmente a vasoespasmos e provocado por aumento da dopamina e seu papel no controle do fluxo sanguíneo cerebral (RIBEIRO e LARANJEIRA, 2009).

1.1.5. Tratamento da adicção por cocaína

Atualmente os pacientes dependentes químicos encontram grande dificuldade em relação ao seu tratamento: a ausência de medicamentos específicos para a dependência e a existência de medicações, como os benzodiazepínicos, que auxiliam apenas na diminuição dos sintomas

iniciais de abstinência, mas não na sua manutenção, já que o *craving* pode acontecer em qualquer momento da vida do paciente, mesmo que esteja medicado.

O tratamento do dependente químico visa a redução da vontade da substância, a supressão do *craving*, alívio dos sintomas de abstinência e diminuição/inibição do comportamento de busca, além de reinserção do usuário na sociedade. Entre as técnicas para evitar e enfrentar o *craving* estão a evitação de gatilhos, distração do paciente com outras atividades, contatar pessoas sóbrias (apoio de amigos e familiares, por exemplo), relaxamento, refocalização, substituição da imagem positiva da droga por imagem negativa, ou seja, não pensar em prejuízos, mas sim em motivos para não ter uma recaída, e visualização de domínio sobre a droga (LARANJEIRA, 2012).

Apesar de não haver tratamento medicamentoso específico, alguns medicamentos têm se mostrado eficazes para usuários de cocaína. Entre eles:

a) os agonistas dopaminérgicos, indicados no tratamento da fase aguda de abstinência pela suposta depleção dopaminérgica que ocorre no uso crônico, e na fase inicial da abstinência, a fim de aliviar sintomas decorrentes dessa alteração (LEITE, 1999; LARANJEIRA e RIBEIRO, 2012; DIHEL e LARANJEIRA, 2015);

b) os neurolépticos, com a finalidade de bloquear os receptores dopaminérgicos, tornando necessárias doses maiores de cocaína para a obtenção dos efeitos anteriores, mas que não têm ação no sistema de recompensa (LEITE, 1999; LARANJEIRA e RIBEIRO, 2012; DIHEL e LARANJEIRA, 2015);

c) os antidepressivos, para o alívio dos sintomas de humor, tanto durante a desintoxicação quanto na manutenção da abstinência (LEITE, 1999; LARANJEIRA e RIBEIRO, 2012; DIHEL; LARANJEIRA, 2015);

d) os estabilizadores de humor/anticonvulsivantes, utilizados em quadros de irritabilidade e impulsividade possivelmente pela ação dopaminérgica que levaria à diminuição do *craving* (LEITE, 1999; LARANJEIRA e RIBEIRO, 2012; DIHEL; LARANJEIRA, 2015);

e) antagonistas opióides, que ainda apresentam estudos escassos e contraditórios para o mecanismo de ação na dependência de cocaína (VOCCI, 2005; SOFUOGLU; KOSTEN, 2006; DIHEL; LARANJEIRA, 2015);

f) outras substâncias, como o dissulfiram, que além de inibir a aldeído-desidrogenase também inibe a conversão de dopamina em noradrenalina, reduzindo o gatilho e modulando os efeitos de recompensa e, o modafinil, que apresenta mecanismo de ação ainda não totalmente

compreendido, com possível inibição da recaptação de dopamina e noradrenalina e aumento da atividade do sistema glutamato, levando ao bloqueio do efeito euforizante e prevenindo a reinstalação do comportamento de busca (RIBEIRO, et al., 1998; LEITE, 1999; LARANJEIRA; RIBEIRO, 2012; DIHEL; LARANJEIRA, 2015).

O tratamento sintomático se faz com a clonidina, agonista α 2-adrenérgico, que reduz a atividade simpática, e, conseqüentemente, a taquicardia, a hipertensão e os tremores; com o propranolol, β -bloqueador adrenérgico, que proporciona remissão dos sintomas decorrentes do aumento da ação simpática e; com os benzodiazepínicos, utilizados na fase inicial da abstinência para reduzir os sintomas de ansiedade, como insônia, inquietação, sensação de medo e/ou angústia (RIBEIRO, et al., 1998; LARANJEIRA, 2012; RIBEIRO et al., 2013).

1.2. Flavonóides

Flavonóides compreendem uma das várias classes de compostos polifenólicos. Estão presentes em frutas e vegetais, bebidas derivadas de plantas, medicamentos orientais tradicionais e suplementos dietéticos contendo ervas. São conhecidos pelos seus efeitos antioxidantes e, portanto, por sua ação no estresse oxidativo (FLAMBÓ, 2013; BOMBARDI et al., 2018). São biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e podem ser encontrados sob diversas formas estruturais (HARBORNE, 1994). A maioria apresenta 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, comumente dispostos na forma tricíclica (anéis A, B e C). A posição do anel B e o grau de oxidação do anel C permitem classifica-los como: flavanos, flavonas, flavanonas, isoflavonas, isoflavanonas, antocianos, auronas e chalconas (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

Vários estudos sobre os flavonoides têm sido publicados e demonstram sua ação sobre o atraso no declínio cognitivo, diminuição da morte celular neuronal e melhora da memória relacionados aos efeitos neuroprotetores, à propriedade anti-oxidante e anti-inflamatória (SPENCER, 2010; BOMBARDI et al., 2018), assim como têm demonstrado potencial atividade ansiolítica (MARDER; PALADINI, 2002; KANAZAWA, 2016) devido à sua afinidade e seletividade determinada pela ação em sítios receptores benzodiazepínicos e ações em receptores GABA (GRALLERT, 2006).

Apesar das inúmeras atividades biológicas descritas para os flavonóides, até o início da década de 1980 não havia muitos dados disponíveis sobre a ação destas substâncias no Sistema Nervoso Central. Em 1983 foi feita a primeira referência aos flavonóides como ligantes do sítio

benzodiazepínico, no complexo receptor GABAA, quando foram isoladas três isoflavonas com afinidade pelo sítio benzodiazepínico. A partir destes resultados outras três isoflavonas foram sintetizadas, sendo uma delas idêntica à formononetina, uma isoflavona natural. Porém, todos os compostos apresentaram baixa afinidade pelo receptor e não apresentaram atividade *in vivo* (LUCK et al., 1983).

A primeira molécula sem átomos de nitrogênio com alta afinidade pelo sítio benzodiazepínico foi descrita em 1988, por Nielsen. Trata-se de um biflavonol da mesma classe da quercetina, a amentoflavona, isolada a partir de uma tintura comercial usada no tratamento de ansiedade e epilepsia. A amentoflavona se liga a receptores benzodiazepínicos tipos I e II, nas membranas de células do cerebelo e hipocampo. De forma distinta, quando a amentoflavona foi administrada via peritoneal, não apresentou efeito, sugerindo que seja rapidamente transformada em metabólitos que não possuem afinidade pelo sítio benzodiazepínico ou que não seja capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica (NIELSEN et al., 1988). De fato, a permeabilidade da amentoflavona em células de capilar cerebral porcino é inferior a 2% (GUTMAN et al., 2002). Estes dados corroboram estudos anteriores em que a amentoflavona não apresentou nenhuma atividade central, quando testada *in vivo*, tanto em ratos quanto em camundongos (CHAKRAVARTHY et al., 1981). A amentoflavona foi também identificada em outras espécies vegetais como o *Hypericum perforatum* (NAHRSTEDT; BUTTERWECK, 1997). Por sua afinidade pelo sítio benzodiazepínico acredita-se que ela possa ser responsável, ao menos em parte, pelo efeito ansiolítico relatado para *H. perforatum*. Estudos eletrofisiológicos demonstraram que a amentoflavona exerce ação moduladora negativa moderada em receptores $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ GABAA (HANRAHAN et al., 2003). No entanto, este efeito não parece ser mediado pelo sítio benzodiazepínico, pois não foi afetado pela presença de flumazenil (antagonista benzodiazepínico) ou pelo diazepam. (BUTTERWECK et al., 2002).

A pesquisa fitoquímica realizada com *Passiflora incarnata* levou ao isolamento de vários metabólitos bioativos como crisina, apigenina, homoorientina, vitexina, luteolina, kaempferol, isovitexina, orientina, isoorientina, schaftósido, isoschaftósido, harman, harmol, harmina, harmalol, harmalina e quercetina. Vários efeitos depressivos do SNC de *Passiflora incarnata* foram explorados experimentalmente e sugeriram que o flavonóide crisina age agonizando o receptor benzodiazepínico (DINIZ et al., 2015).

O primeiro monoflavonóide específico benzodiazepínico e com atividade *in vivo* foi a crisina, isolada de *Passiflora caerulea*. Apresentou também efeito anticonvulsivante e ansiolítico. Ambos os efeitos foram abolidos pela co-administração de flumazenil, indicando que estes efeitos estão vinculados à modulação do complexo receptor GABAA via ligação com sítio

benzodiazepínico (MEDINA et al., 1990; WOLFMAN et al., 1994; ZANOLI et al., 2000). Foi verificado que a quercetina e a crisina atuam de modo distinto dos benzodiazepínicos clássicos, uma vez que não potencializam as correntes iônicas induzidas por GABA em receptores $\alpha 1\beta 2\gamma 2s$ GABAA e GABAC expressos em oócitos de *Xenopus leavis* (GOUTMAN et al., 2003). Em concentrações mais altas, a crisina apresentou ação não vinculada ao sítio benzodiazepínico, uma vez que não foi afetada pela presença de flumazenil e, além disso, a ação inibitória foi mais pronunciada sobre os receptores $p1$ GABAC, que não expressam o sítio benzodiazepínico.

Estudo de fracionamento do extrato de *Matricaria recutita* identificou diversas frações com afinidade pelo sítio benzodiazepínico. De uma dessas frações foi isolada a apigenina que, de forma semelhante à crisina, apresentou afinidade pelo sítio benzodiazepínico e efeito ansiolítico em camundongos. Um discreto efeito sedativo foi observado em doses elevadas. Não foram observados efeitos miorelaxante, anticonvulsivante ou amnésico (VIOLA et al., 1994a; SALGUEIRO et al., 1997). Foi estudado o efeito ansiolítico da apigenina em dois modelos animais de ansiedade: labirinto em cruz elevado (do inglês *Elevated Plus Maze*) e discriminação claro-escuro, não sendo verificado efeito ansiolítico. Esta flavona apenas reduziu a atividade motora espontânea, indicando possível efeito sedativo que não foi bloqueado pela pré-administração de flumazenil. Este resultado indica que o efeito não é mediado pela modulação alostérica exercida via interação com sítio benzodiazepínico. (AVALLONE et al., 2000; ZANOLI et al., 2000).

Estudos eletrofisiológicos revelaram que a apigenina inibiu as correntes de cloreto induzidas por GABA em receptores $\alpha 1\beta 2\gamma 2s$ GABAA, $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ GABAA e $p1$ GABAC, sendo seu efeito mais pronunciado sobre o receptor GABAC. De forma semelhante à crisina, o efeito inibitório não foi afetado pela presença de flumazenil (CAMPBELL et al., 2004).

Os flavonóides das plantas medicinais como valeriana (*Valeriana officinalis*), camomila (*Matricaria recutita*) e kava-kava (*Piper methysticum*) também têm efeitos sedativos-hipnóticos baseados na modulação alostérica positiva de receptores GABAA e inibem, em graus variados, enzimas (quinases) que fosforilam proteínas críticas de fosforilato (fosfatases), as quais sinalizam caminhos de transdução e regulam o estresse oxidativo, inflamação e sobrevivência celular.

Alguns flavonoides, assim como seus metabólitos, também foram relatados como tendo atividade anticonvulsivante (PROVESI, 2007). As evidências experimentais demonstraram claramente que os flavonóides exercem atividade antiepiléptica modulando o complexo do canal GABAA-Cl, pois são estruturalmente semelhantes aos benzodiazepínicos (DINIZ et al., 2015).

Evidências sugerem que os alimentos ricos em flavonóides podem ser capazes de prevenir muitas formas de doença cerebrovascular, incluindo as associadas ao AVC e demência. Eles podem afetar a função endotelial e o fluxo sanguíneo periférico e esses efeitos vasculares são potencialmente significantes, já que o aumento da função cerebrovascular facilita a neurogênese do adulto que ocorre no hipocampo, na camada granulosa. De fato, novas células do hipocampo estão agrupadas perto de vasos sanguíneos, os quais proliferam em resposta a fatores de crescimento vascular e podem influenciar a memória (SPENCER, 2010).

1.2.1. Quercetina

A quercetina é um flavonol caracterizado por uma estrutura derivada de fenil-benzo-(y)-pirona (FIGURA 4) (KUHNAU, 1976; MORAND et al., 1998).

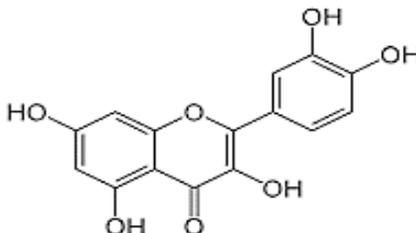


Figura 4: Fórmula estrutural da quercetina. Fonte: Yang et al. (2016, p. 3).

A quercetina apresenta uma meia vida de 20 a 72 horas (COSTA, 2005; YANG et al., 2016), e sua ação cerebral se inicia logo nos primeiros 5 minutos, com estabilização do pico entre 4 e 12 horas (YANG et al., 2016).

Comercialmente a quercetina é produzida da extração do glicosídeo, rutina, de plantas. A rutina é posteriormente submetida a hidrólise para produzir sua forma aglicona, a quercetina. Em sua forma de alta pureza foi reconhecida como Geralmente Segura (GRAS) pela FDA em 2009, consistente com a Seção 201 (s) da Lei Federal de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos, nos termos 21 CFR s170.35 (USA). Esta determinação baseia-se em procedimentos científicos, nas condições de seu uso pretendido e na opinião de consenso de um painel independente de especialistas qualificados. Para a ANVISA, a quercetina é considerada um fitoterápico (QUADRO 2).

Quadro 2: Caracterização da quercetina como fitoterápico. Fonte: dados retirados de ANVISA (2003)

Padronização/Marcador	Padronização/Marcador
Formas de uso	Infuso, tintura, extratos
Indicações / Ações terapêuticas	Cicatrizante Anti-inflamatório Antisséptico
Dose Diária	Infusão 1 a 2g/150 ml Tintura 1:5 (g/ml): 5 a 10 ml Extrato fluido 1:1, 1-2 ml
Restrição de uso	Venda sem prescrição médica

A relação da quercetina como antidepressivo, anticonvulsivante, ansiolítico atrai atenção pois apresenta as mesmas bases farmacológicas de medicamentos utilizados para o tratamento de abstinência e *craving*, ou seja, ação GABAérgica e benzodiazepínica (GRALLERT, 2006). Por outro lado, os flavonoides têm sido amplamente estudados por sua ação antioxidante, com bloqueio da toxicidade neuronal, atuando como neuroprotetores, e reduzindo, assim, o estresse oxidativo e as alterações neurovasculares com proteção contra a degeneração cerebral (SPENCER, 2010; BOMBARDI et al., 2018). A quercetina age reduzindo a resposta neuroinflamatória (BOMBARDI et al., 2018). Apresenta atividade na coordenação motora e na melhoria da cognição (GRALLERT, 2006; DINIZ et al., 2015; BOMBARDI et al., 2018; KARIM et al., 2018).

A ação da quercetina como neuroprotetor e no estresse oxidativo ocorre pelo acúmulo celular de EROs, por excesso da produção ou insuficiência de neutralização, o que promove dano tecidual, depleção de ATP e, assim, morte celular (KALE et al., 2018). Também inibe a peroxidação lipídica, em que os ácidos graxos insaturados são convertidos em radicais livres pela captação de hidrogênio, por interferir nos radicais formados (KALE et al., 2018; HAQ; ALAMRO, 2019).

Estudos recentes sugerem que a quercetina promove redução da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) pela supressão da expressão de mRNA do fator de liberação de corticotrofina (CRF) no hipotálamo (BHUTADA et al., 2010; KAWABATA; KAWAI; TERAQ,

2010). Ativação anormal do eixo HPA durante uma condição de estresse é um fator de risco para depressão e ansiedade e é ativado pelo CRF, hormônio liberado pelo hipotálamo, que leva à liberação de hormônios do estresse, como adrenalina e cortisol pelas glândulas supra-renais (BHUTADA et al., 2010). Também tem ação como antidepressivo e anticonvulsivante (PROVESI, 2007; DINIZ et al., 2015), bem como atividade ansiolítica devido à sua ação sobre os receptores GABAérgicos e benzodiazepínicos (GRALLERT, 2006; DINIZ et al., 2015).

A quercetina antagoniza as respostas mediadas pelos receptores GABAA e GABAC observadas por meio das alterações na ativação e desativação das correntes GABA_{p1} (GOUTMAN et al., 2003), produz desativação das correntes GABA_{p1}, sugerindo que seu antagonismo não é competitivo (BIANCHI & MACDONALD, 2001). Ela inibe a proteína quinase C (PKC), uma substância descrita como chave reguladora de respostas celulares neuronais (GAMET-PAYRASTRE et al., 1999; KANAZAWA, 2016).

Recentemente a quercetina foi apresentada como regulador da neurotransmissão serotoninérgica e colinérgica e por produzir efeito ansiolítico, antidepressivo e melhorar a memória, em estudo com animais submetidos a estresse (SAMAD et al., 2018).

A quercetina interfere na transmissão GABAérgica cortical pré-frontal e alivia a hiperatividade induzida pelo antagonista do receptor N-metil-d-aspartato glutamatérgico MK-801, reduzindo acentuadamente as correntes ativadas por GABA de uma maneira não competitiva em neurônios corticais cultivados além disto, inibe na corrente pós-sináptica inibitória GABAérgica evocada espontaneamente e eletricamente em cortes corticais pré-frontais de camundongo (FAN et al., 2018).

Perante o atual consumo de cocaína pela população mundial, aliado à não existência de tratamento específico ao seu consumo, há necessidade de novas alternativas terapêuticas para tratamento de sua adicção. Baseado na ação ansiolítica, anticonvulsivante e neuroprotetora da quercetina, justifica-se este estudo que pretende avaliar sua ação funcional na exposição aguda à cocaína.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade funcional da quercetina na exposição aguda à cocaína.

2.1. Objetivos específicos

- Desenvolver modelo de exposição aguda por cocaína;

- Observar o comportamento de animais submetidos agudamente a: a) cocaína; b) quercetina; c) cocaína associada à quercetina;
- Determinar qual a região cerebral metabolicamente ativa por meio de *easyPET-3D* de animais submetidos agudamente a: a) cocaína; b) quercetina; c) cocaína associada à quercetina;
- Identificar quais as alterações histológicas de encéfalo de animais submetidos agudamente a: a) cocaína; b) quercetina; c) cocaína associada à quercetina.

3. MÉTODO

3.1. Adequação do projeto

O estudo foi desenvolvido na Universidade São Francisco, Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa, Bragança Paulista em conjunto a Universidade de Coimbra, nos Laboratórios de Biofísica e de Farmacologia e Terapêutica Experimental.

Todas as orientações da Sociedade Portuguesa de Ciência em Animais de Laboratório (SPCAL), a Diretiva 2010/63/EU foram cumpridas sempre na perspectiva dos 3R's - *Reduction* (redução, tradução livre); *Refinement* (refinamento, tradução livre); *Replacement* (substituição, tradução livre) - em pesquisa com animais. O trabalho foi aprovado pelo ORBEA da Universidade de Coimbra (#1248).

Os animais estiveram alojados em isoladores, em *rack* ventilado, com controle de temperatura, umidade e luminosidade, obedecendo ao ciclo claro-escuro de 12 horas. Receberam água e ração *ad libitum*.

3.2. Grupos

Foram utilizados camundongos Balb-c, machos, com média de idade de 6 semanas e peso médio de 24,7g.

Os animais (n=48) foram divididos, de forma aleatória, por sorteio, em 4 grupos de acordo com o recebimento de Salina (Controle), Cocaína (Exposição aguda), Quercetina ou Quercetina e Cocaína associadas, sendo no total 12 animais por grupo de experimentação. Para a avaliação de imagem foram utilizados 8 animais por grupo e para as análises comportamentais foram utilizados 4 animais por grupo, sendo os mesmos animais utilizados para a avaliação

morfológica (FIGURA 5). A escolha da ordem de administração se deu a partir da meia vida das substâncias já referidas anteriormente (VERSTRAETE, 2004; COSTA, 2005; YANG et al.,2016; FERIGOLO, 2007).

As administrações foram feitas por via intraperitoneal em uma dose única de 0,5 mg/kg de cocaína, com volume total de 0,5 ml e, 50 mg/kg de quercetina diluída em 0,15 ml de metanol e 0,35 ml de PBS argonado com $\text{pH} = 7,2$, volume final de 0,5 ml. A dose da cocaína foi escolhida levando em consideração a menor dose que demonstrou ação dopaminérgica visível na Tomografia por Emissão de Positron (PET) em avaliação de imagem em humanos voluntários e ação da cocaína em uso crônico nos neurotransmissores cerebrais (VOLKOW et al, 1997; HEARD et al, 2008).

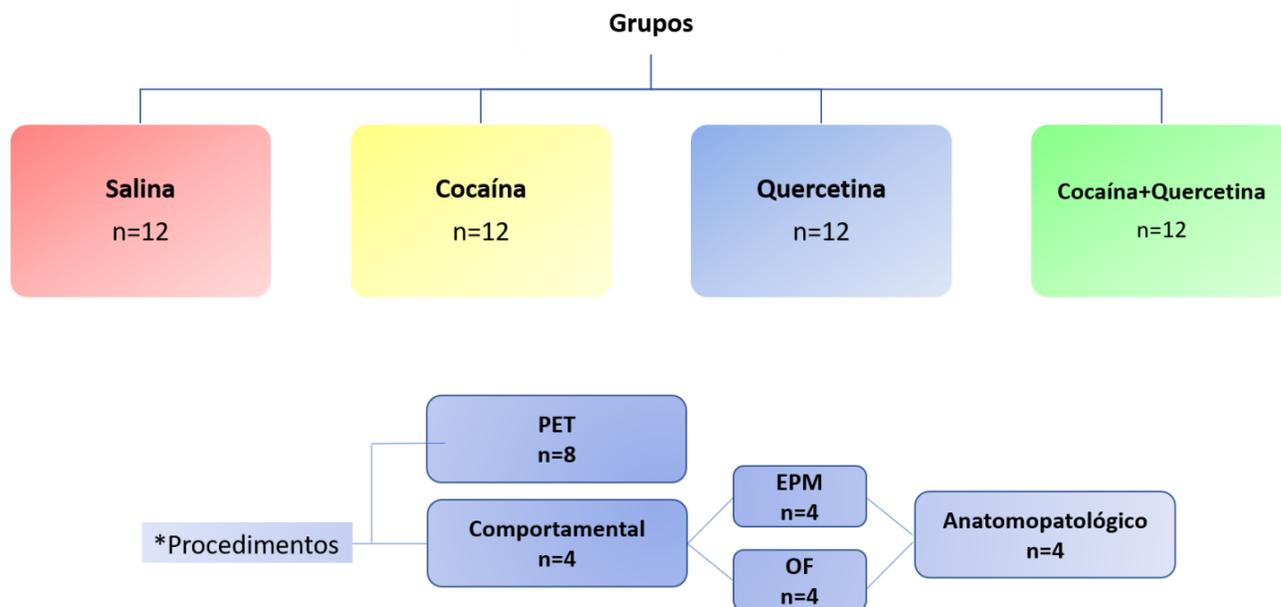


Figura 5: Grupos de animais e procedimentos utilizados. Foram utilizados 12 animais por grupo de experimentação, sendo que para a avaliação de imagem foram utilizados 8 animais e para as análises comportamentais e análises anatomopatológicas foram utilizados 4 animais. Fonte: arquivo pessoal.

3.3. Caracterização do modelo animal de exposição aguda

3.3.1 Análise comportamental

Os testes Elevated Plus Maze (EPM) e Open Field Maze (OF) foram utilizados para avaliar as alterações comportamentais nos animais buscando marcadores para a exposição aguda de cocaína.

Foi utilizada sala de testes à prova de som e o nível de iluminação foi mantido em 100 lux. O animal permaneceu na sala de testes por 1 hora para a sua ambientação antes de se proceder aos testes comportamentais. Após os primeiros 30 minutos de ambientação foi realizada a administração da primeira dose, via intraperitoneal (Animal A: solução salina 0,5ml, Animal B: solução salina 0,5ml, Animal C: quercetina 0,5ml e; Animal D: quercetina 0,5ml). Trinta minutos depois foi administrada a segunda dose (Animal A: solução salina 0,5ml, Animal B: cocaína 0,5ml, Animal C: solução salina 0,5ml e, Animal D: cocaína 0,5ml) e em seguida os animais foram colocados nos aparatos de testes (FIGURA 6).

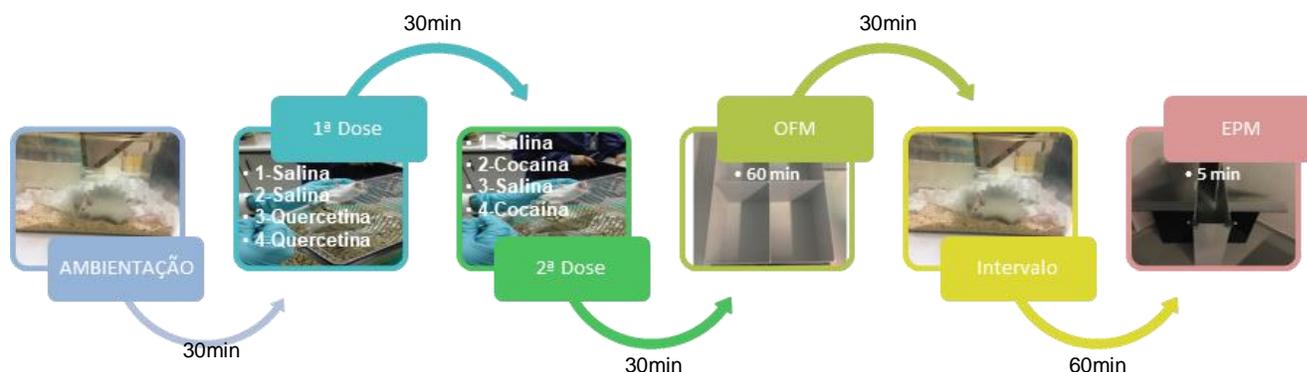


Figura 6: Protocolo das análises comportamentais. Fonte: arquivo pessoal.

3.1.1.a. Labirinto em cruz elevado

Em modelos de dependência ou tolerância, o grau de ansiedade está relacionado à esquivas do braço aberto (BA) e uma maior permanência nos braços fechados (BF) e em relação à atividade locomotora, considera-se o total de entradas nos braços (PELLOW et al., 1985).

Trata-se de aparato elevado do chão com dois braços abertos e dois fechados (FIGURA 7), que envolve a exploração espontânea do ambiente. O animal é colocado na área central do labirinto com a cabeça voltada para um dos braços abertos. O teste é gravado usando uma câmera de vídeo conectada a um computador que é controlada por um dispositivo remoto e o teste é realizado durante 5 minutos e posteriormente analisado pelo software Anymaze 4.99m (Stoelting Co., Illinois, EUA). O número de entradas em cada braço, uma entrada é definida quando as quatro patas do animal entram no braço, e o tempo gasto nos braços abertos são registrados. Essas medições servem como um índice de comportamento ansiedade-*like*.

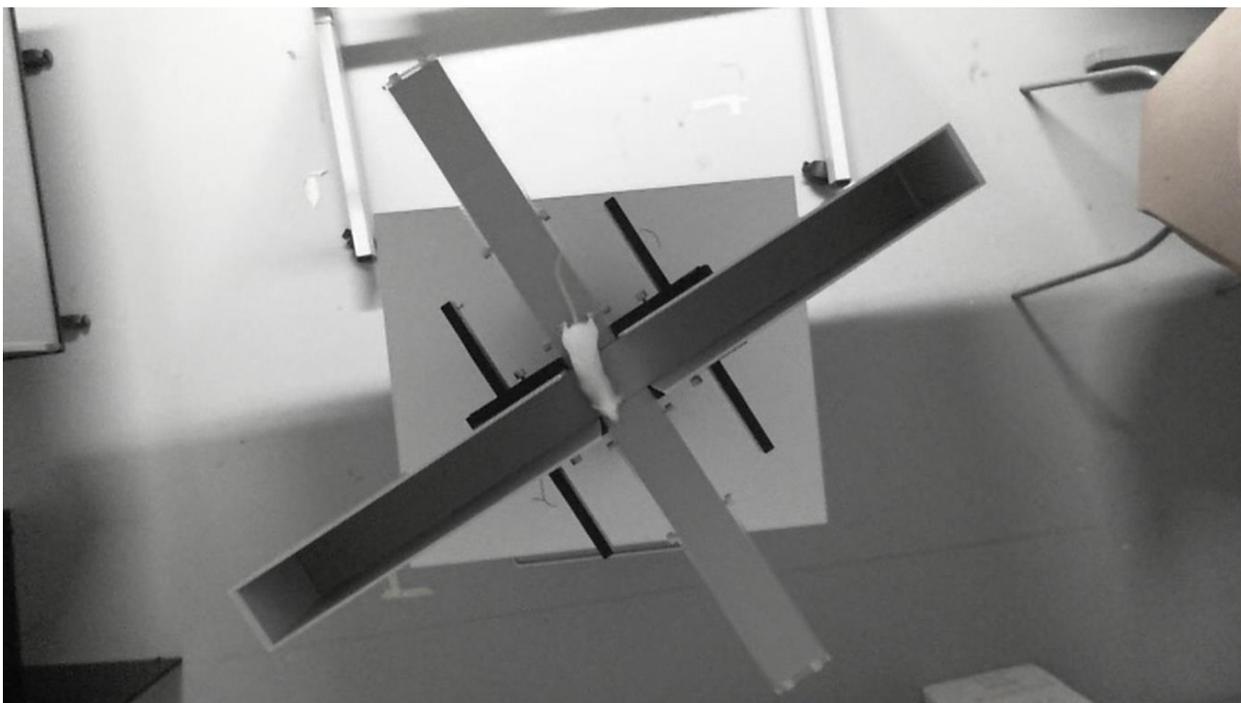


Figura 7: Labirinto em Cruz Elevado. Equipamento utilizado para avaliação de ansiedade e esquiva. Fonte: arquivo pessoal.

3.1.1.b. *Labirinto de campo aberto*

O labirinto em campo aberto é um teste para avaliação de ansiedade que consiste em uma caixa dividida em quatro câmaras de atividade (FIGURA 8). Em modelos de dependência ou tolerância, o grau de ansiedade está relacionado à esquiva do centro e uma maior permanência nas periferias. A atividade locomotora é avaliada pela distância total percorrida. Considera-se que quanto menor a locomoção, maior o nível de ansiedade (BONUTI, 2014).

O animal é colocado no meio do campo do labirinto enquanto, simultaneamente, é ativado o software Anymaze 4.99m (Stoelting Co., Illinois, EUA) para analisar atividade motora. É

esperado que o animal se mova imediatamente para as paredes periféricas do labirinto. O movimento livre e ininterrupto do animal ao longo do respectivo quadrante do labirinto deve ser permitido por um período único de 10 minutos durante o qual o software de rastreamento registra o movimento.

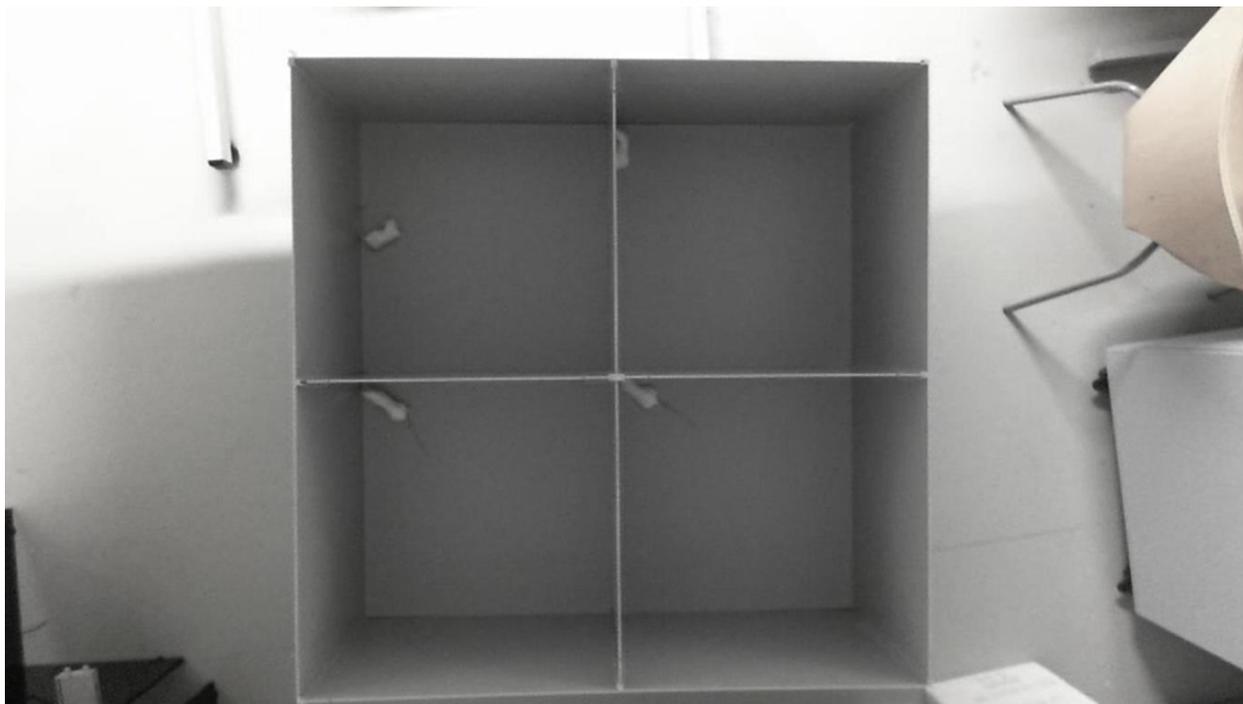


Figura 8: Labirinto em Campo Aberto. Equipamento utilizado para avaliação de ansiedade e esquia. Fonte: arquivo pessoal.

3.3.2 *Avaliação por Tomografia Computadorizada por Emissão de Pósitrons (easy-PET 3D) de áreas envolvidas na drogadição*

O PET tem como finalidade comparar áreas cerebrais ativadas ou não com diferentes estímulos. A captação de imagens ocorre por meio da identificação de radiação por câmaras que contém cristais sensíveis a essa radiação, dispostos em anéis. Raios- γ percorrem a câmara em sentidos opostos e são detectados ao colidirem com os cristais opostos do anel detector (CAMARGO, 2005).

Existem vários tipos de radiofármacos que podem ser utilizados no PET, entre eles o ^{18}F Fluorodeoxiglicose (^{18}F -FDG) muito usado por sua meia vida longa (110 minutos) e por seu papel biológico bem definido no metabolismo glicolítico.

O ^{18}F -FDG é um análogo da glicose ligado ao flúor radioativo transportado para a membrana celular por difusão. Dentro da célula, é fosforilado pela hexoquinase e pode ser lentamente desfosforilado pela glicose 6-fosfatase, o que gera acúmulo do radiofármaco no tecido. Uma vez que a membrana é impermeável ao FDG metabolizado, após liberar a glicose, o marcador se acumula nas células metabolicamente ativas, permitindo a captação de imagens (ALAVI; REIVICH, 2002; FELIX et al.,2014).

A avaliação das áreas cerebrais na exposição aguda à cocaína, utilizou o equipamento *EasyPET- 3D* (Patente, Universidade de Aveiro: PCT/IB2016/051487) (FIGURA 9).



Figura 9: EasyPET-3D. Equipamento utilizado para avaliação da atividade metabólica de áreas cerebrais de pequenos animais. Fonte: arquivo pessoal.

O ^{18}F -FDG foi colocado em seringa para a administração, sob câmara de proteção de radioatividade, para aferição da atividade do radioisótopo e injetado via intraperitoneal no animal. A radioatividade na seringa correspondente a dose a ser administrada ao animal sempre foi igual ou superior a $200\mu\text{Ci}$ diluída em solução salina de $0,2\text{ml}$ (DELEYE et al., 2016). O animal foi colocado na máquina, devidamente posicionado (posição ventral) e mantido aquecido por dispositivo de aquecimento (Heat Therapy Pump, Adroit Medical Systems, Loudon, TN 37774, USA) anexado ao túnel de manutenção do animal, fixado com fita adesiva na região abaixo da cabeça e no tórax. Após fixação foi iniciada a captação das imagens até completar 1 milhão de contagens, demorando entre 30 a 50 minutos, no máximo. Depois de captadas, as imagens foram processadas pelo software acoplado ao equipamento.



Figura 10: Protocolo do processo de captação de imagens. O ^{18}F -FDG foi administrado em injeção intraperitoneal em volume final de $0,2\text{ml}$ com $200\mu\text{Ci}$. Após aguardar 30 minutos para distribuição do radiofármaco foi realizado um estímulo com luz branca contínua por 10 segundos, seguida de um estímulo sonoro, repetidos após 5 minutos. Em seguida, foi administrada a anestesia. Os animais foram levados ao easyPET-3D 60 minutos após a administração do FDG.

Após 30 minutos foram realizados os estímulos luminoso e sonoro, White Noise a 80dB contínuo por 10 segundos, repetidos em intervalo de 5 minutos. Procedeu-se a anestesia com Ketamina (50mg/ml) e Clorpromazina (5mg/ml) na proporção de 3:1 em volume de $0,2\text{ml}$ em via intraperitoneal, e seguiu-se a injeção da droga teste, em acordo ao grupo. Assim, após 60 minutos da administração do radioisótopo, iniciou-se a captação das imagens no easyPET-3D (FIGURA 10).

Os estímulos de luz e som são normalmente utilizados nos modelos de dependência, uso crônico ou abstinência para condicionamento do animal nos aparatos de autoadministração (condicionamento pavloviano). Apesar de não ser objetivada a análise da dependência crônica, no presente estudo, é importante utilizar os mesmos estímulos, para que se possa comparar com análises que utilizam a caixa de autoadministração.

Após a reconstrução da imagem, foi feita a análise qualitativa/visual das áreas captantes onde se observaram as estruturas cerebrais de interesse. Como referência utilizou-se o corte axial para localização dos corpos amigdalóides, tálamo, hipotálamo e hipocampo e o corte sagital para localização do cerebelo. Levando-se em conta que se trata de sistema em desenvolvimento, e assim ainda não sendo possível fazer a análise quantitativa por meio da dose injetada (ID) ou do SUV (*standardized uptake value*).

Desta forma, a intensidade de captação visual, nas diferentes áreas, foi interpretada pela escala de cores (fatiamento em arco-íris ou espectro de cores em arco-íris), sendo tradicionalmente seguida a escala que variou do preto - ausência de coloração, ao vermelho – mais alta captação, segundo a sequência preto, roxo, azul, verde, amarelo, laranja, vermelho.

3.4 Técnica de eutanásia dos animais

Depois de anestesiados, conforme descrito anteriormente, os animais foram submetidos à eutanásia. A profundidade da anestesia foi observada testando o reflexo córneo-palpebral. Após eutanásia foi iniciada exérese do encéfalo do animal.

3.5 Análise anatomopatológica

A análise anatomopatológica foi realizada observando-se a presença de alterações macroscópicas e microscópicas.

Todos os espécimes previamente fixados em solução de formalina a 10% foram incluídos em blocos de parafina. Três cortes de 4 um foram obtidos de cada bloco, sendo corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) para diagnóstico anatomopatológico, a fim de avaliar as estruturas morfológicas de modo convencional. A análise microscópica das lâminas foi realizada com o auxílio de microscópio óptico comum, com magnificação final de 40x para observação de alterações morfológicas.

3.6 Análise estatística dos resultados

Os dados individuais foram inseridos em planilha eletrônica (Excel). A análise dos resultados obtidos foi realizada adotando-se nível de significância menor que 5% ($p \leq 0,05$) para

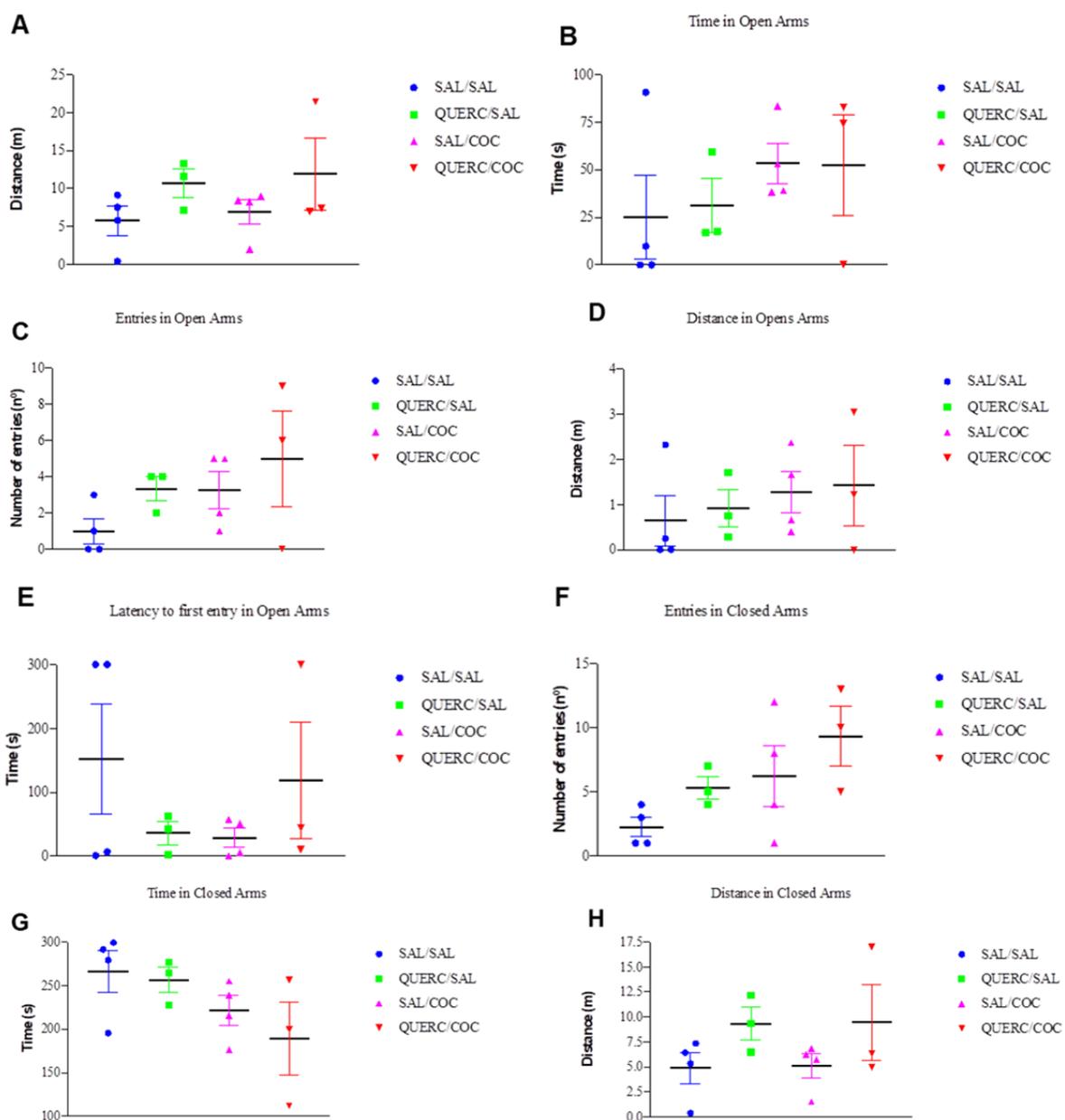
rejeição da hipótese de nulidade, mediante os seguintes modelos: estatística descritiva; medidas de tendência central; teste de normalidade; análise de variância, teste de correlação. Foi feita análise amostral para determinação do “n” mínimo a ser utilizado. Para análise estatística dos resultados foi utilizado o programa de análise estatística SPSS for Windows, versão 20.0.

4. RESULTADOS

Os resultados estão apresentados sob a forma de figuras e gráficos e serão discutidos no capítulo apropriado.

4.1. Análise Comportamental

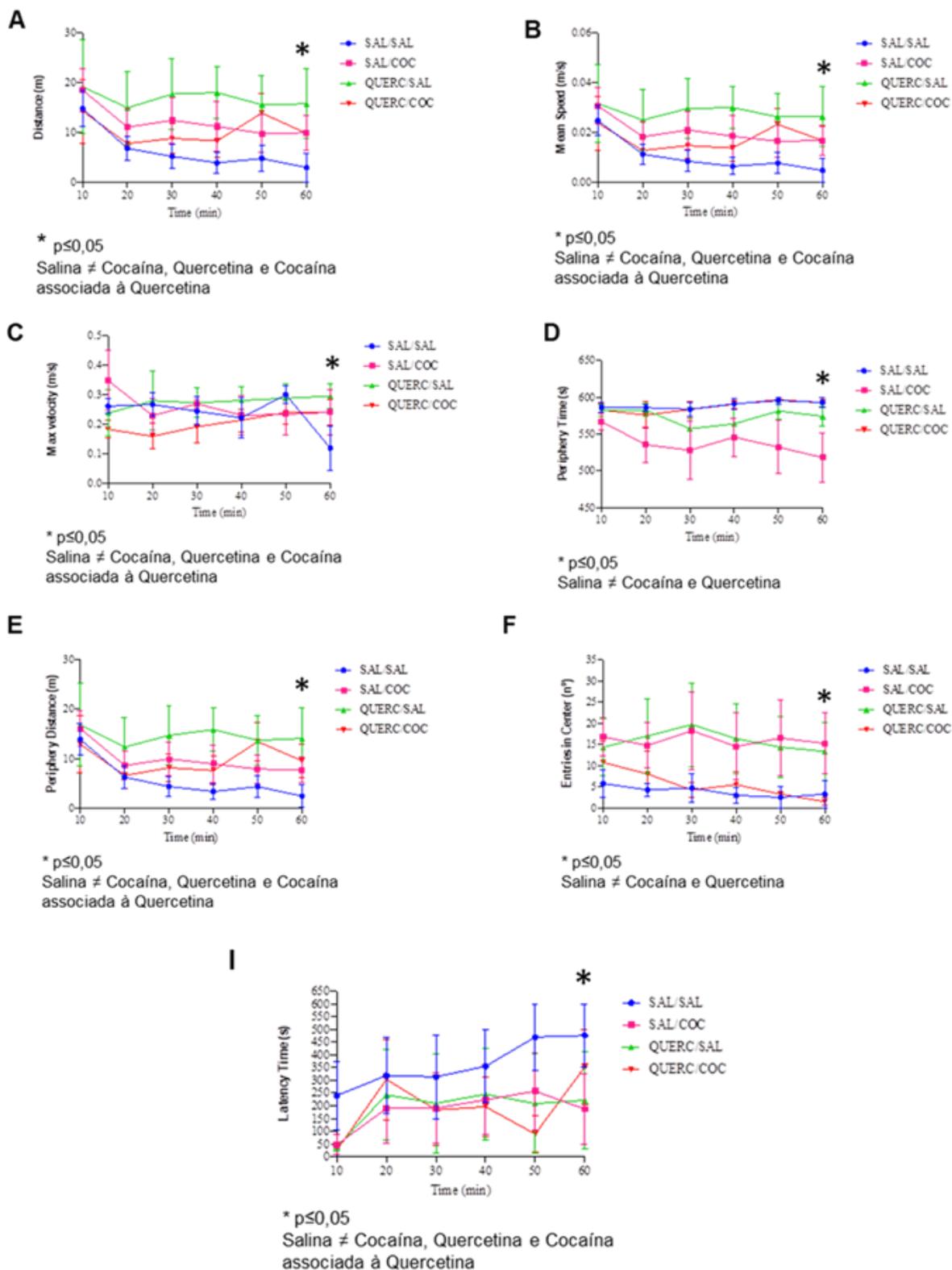
4.1.1. Labirinto em cruz elevado



*EPM: Elevated Plus Maze; CTL: controle; Querc: Quercetina; BA: Braço Aberto; s: segundos; M: metros; BF: Braço Fechado.

Gráfico 1: Teste do Labirinto em Cruz Elevado (EPM). Note que o não há diferença na análise de cada um dos parâmetros do grupo controle quando comparado com os demais grupos.

4.1.2. Labirinto em campo aberto



*OFT: Open field test; CTL: controle; Coc: Cocaína; Querc: Quercetina; s: segundos; M: metros; p = significância

Gráfico 2: Labirinto em Campo Aberto (OF). Note que, ao final dos 60 minutos do teste, os animais dos grupos cocaína, quercetina e cocaína associada à quercetina apresentam comportamentos diferentes quando comparados ao controle quanto a distância percorrida (A), velocidade média (B), velocidade máxima (C), distância percorrida na periferia (E) e no tempo de latência da primeira entrada no centro (I). O tempo na periferia do aparato (D), número de entradas no centro (F) e distância percorrida no centro (H), os grupos cocaína e quercetina apresentam comportamentos diferentes ao do grupo controle, enquanto o grupo cocaína associada à quercetina apresenta comportamento semelhante. Os grupos cocaína e cocaína associada à quercetina apresentam comportamentos semelhantes na análise da distância percorrida (A), velocidade média (B), velocidade máxima (C). O grupo cocaína associada à quercetina assemelha-se ao grupo controle em tempo na periferia do aparato (D), número de entradas no centro (F), tempo no centro do aparato (G) e distância percorrida no centro (H). Os grupos cocaína e quercetina são semelhantes quanto à latência na primeira entrada no centro (I).

4.2. Avaliação por Tomografia Computadorizada por Emissão de Pósitrons (PET-¹⁸F- FDG)

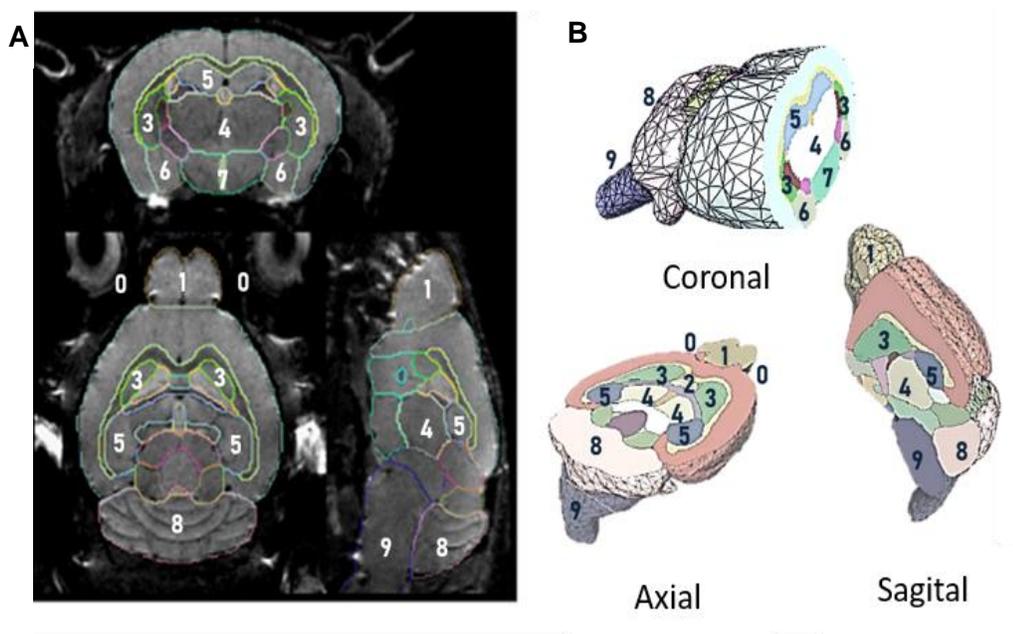


Figura 11: Representação dos cortes coronal, axial e sagital em imagem de PET (A) e atlas anatômico (B), onde é possível identificar as estruturas cerebrais: 0- Glândulas Harderianas (HG), 1- Bulbo Olfatório (OB), 2- Prosencéfalo Basal e Septo, 3- Estriado (St), 4- Tálamo (TH), 5- Hipocampo (HC), 6- Corpo Amigdalóide (AMY), 7- Hipotálamo (HT), 8- Cerebelo, 9- Tronco cerebral. Fonte: Ma (2008, p. 5).

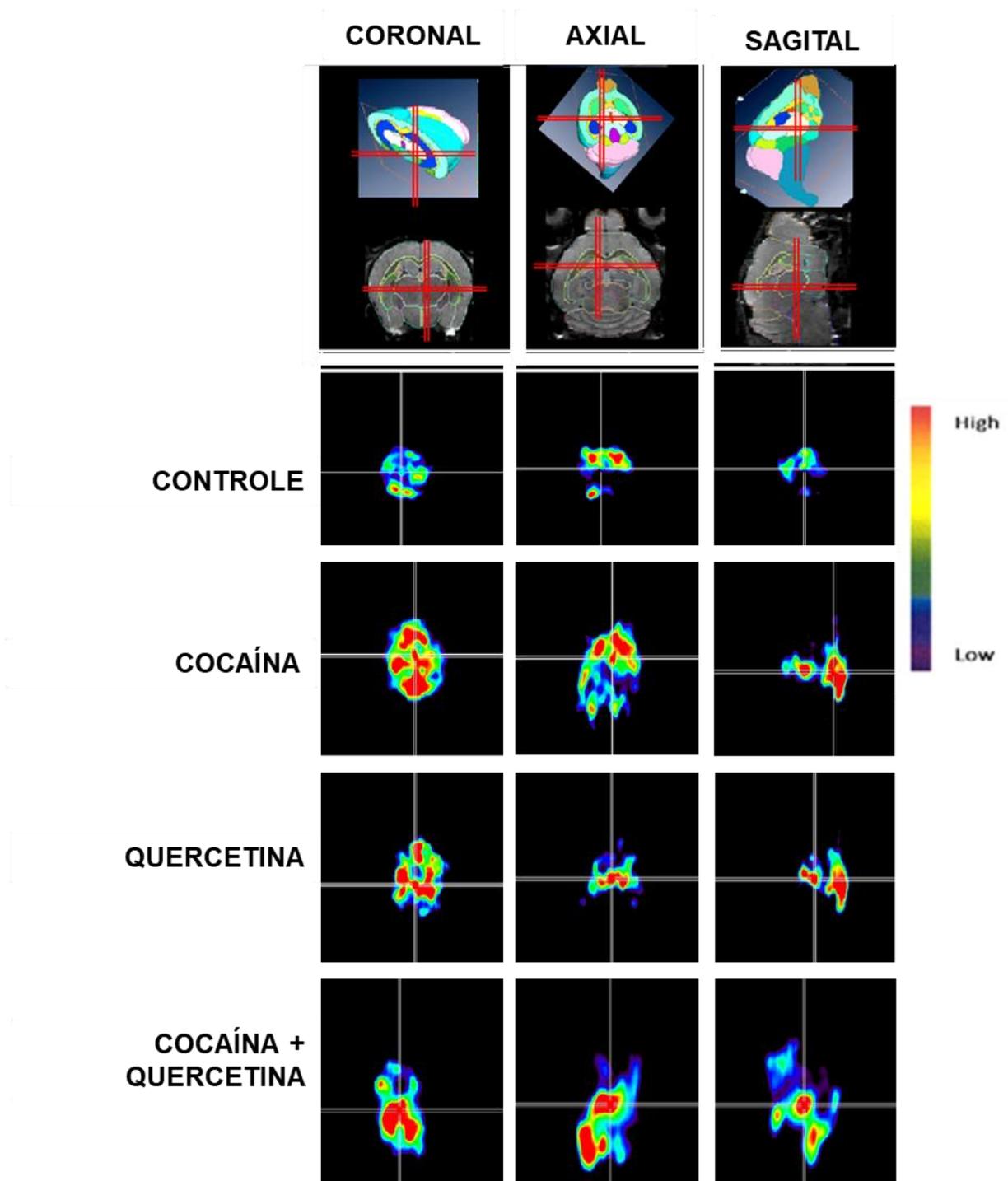


Figura 12: EasyPET-3D-¹⁸F-FDG Tálamo. Imagem comparativa dos grupos controle, cocaína, quercetina e cocaína associada à quercetina. As imagens demonstram a captação comparativa de cada grupo no Tálamo. Note a intensa captação talâmica nos grupos cocaína, quercetina e cocaína associada à quercetina.

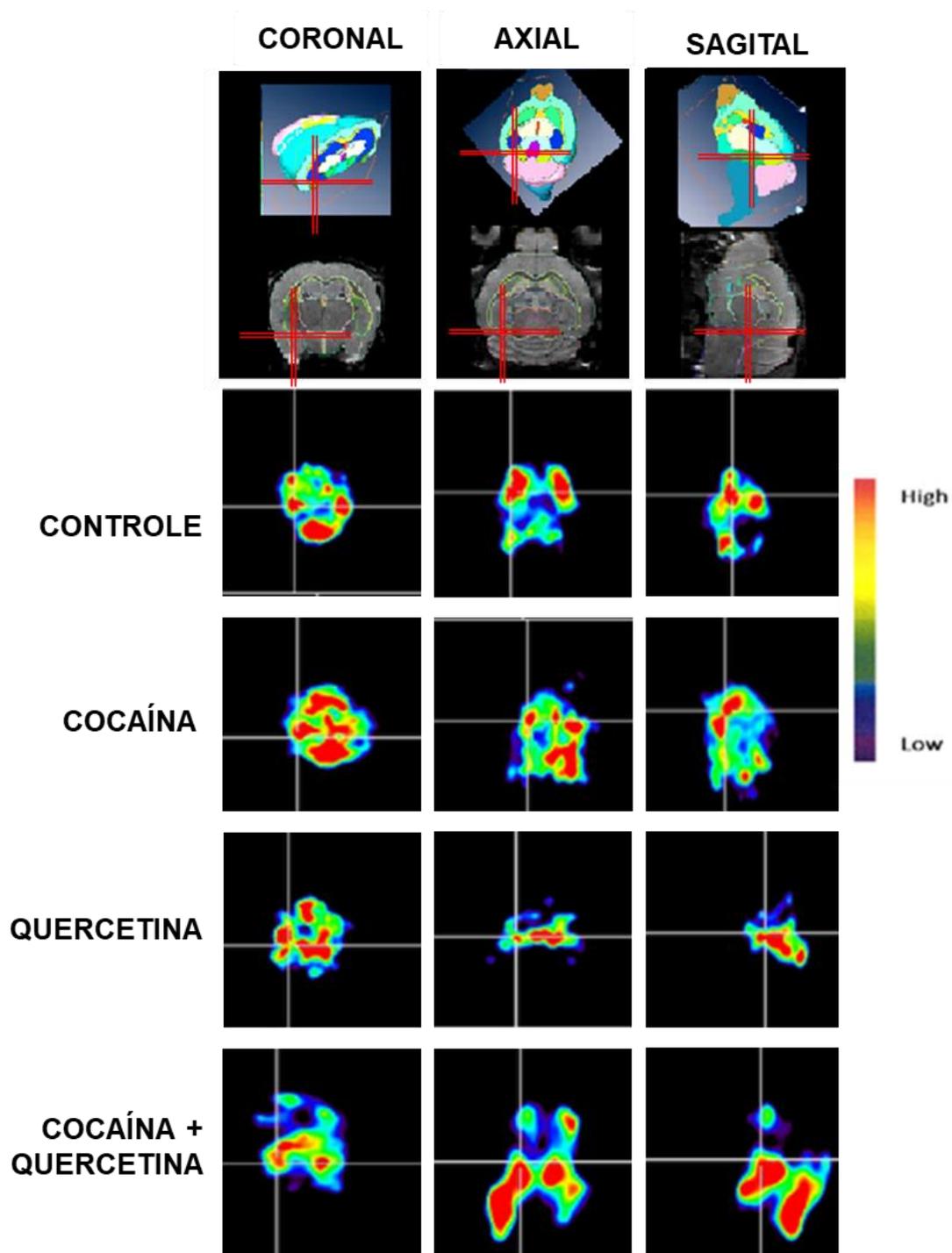


Figura 13: EasyPET-3D-¹⁸F-FDG Corpus amigdalóides. Imagem comparativa dos grupos controle, cocaína, quercetina e cocaína associada à quercetina. As imagens demonstram a captação comparativa de cada grupo no Corpo amigdalóide. Note a forte captação em todos os grupos.

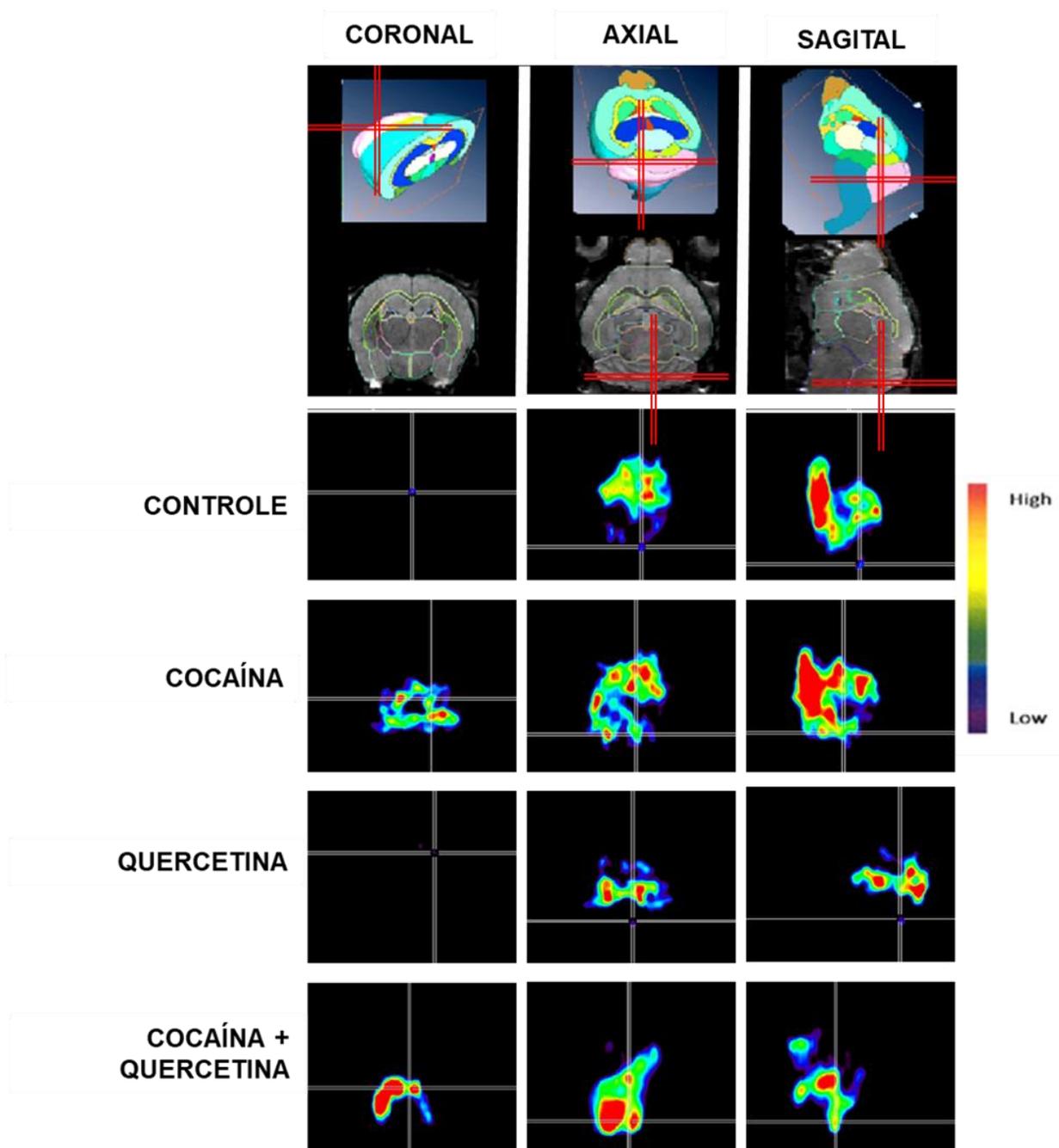


Figura 14: EasyPET-3D-¹⁸F-FDG Cerebelo. Imagem comparativa dos grupos controle, cocaína, quercetina e cocaína associada à quercetina. As imagens demonstram a captação comparativa de cada grupo no cerebelo. Note a baixa captação no grupo controle, a maior captação nos grupos cocaína e cocaína associada à quercetina e a ausência de captação no grupo quercetina.

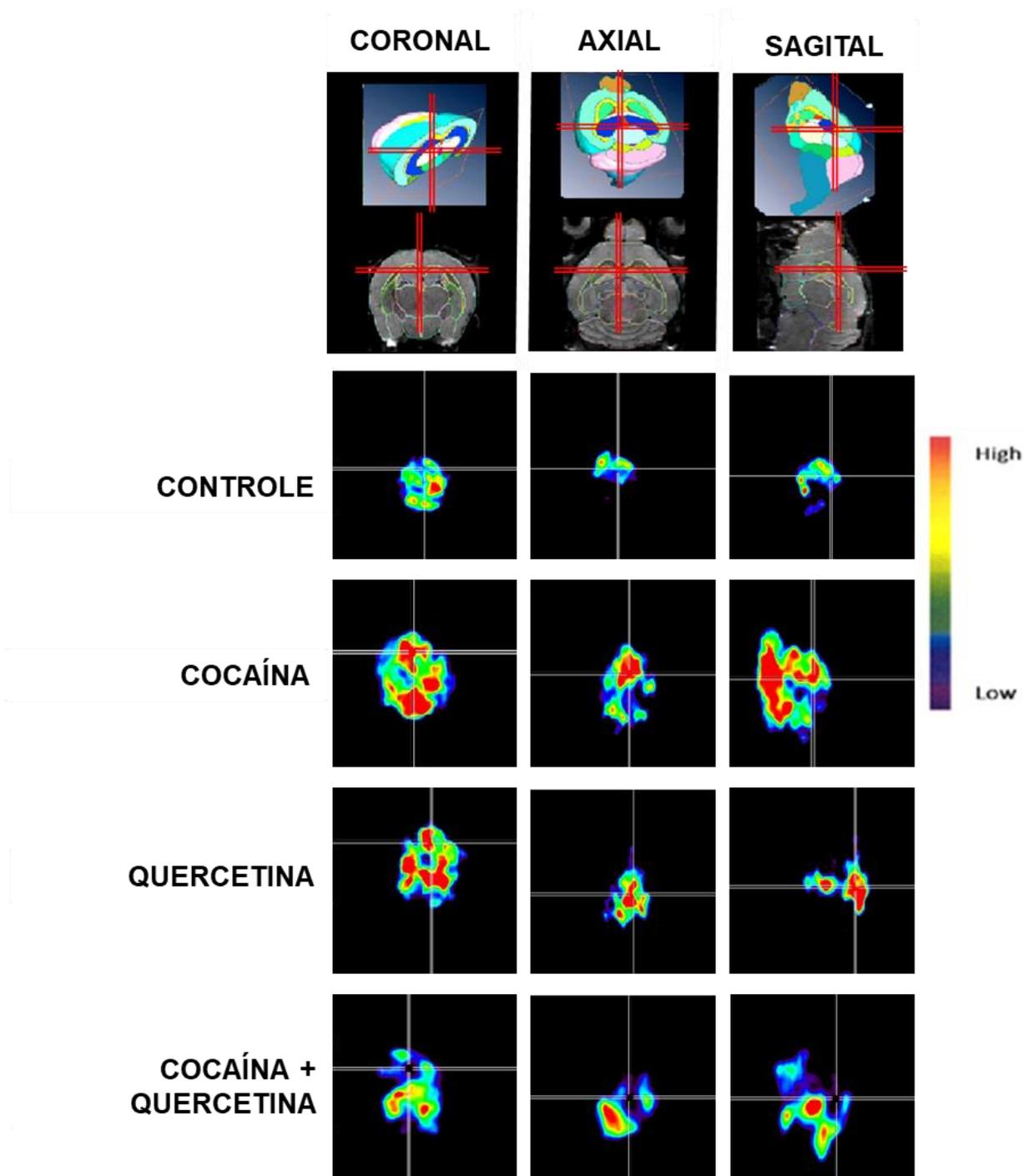


Figura 15: EasyPET-3D-¹⁸F-FDG Hipocampo. Imagem comparativa dos grupos controle, cocaína, quercetina e cocaína associada à quercetina. As imagens demonstram a captação comparativa de cada grupo no hipocampo. Note uma maior captação nos grupos cocaína e quercetina.

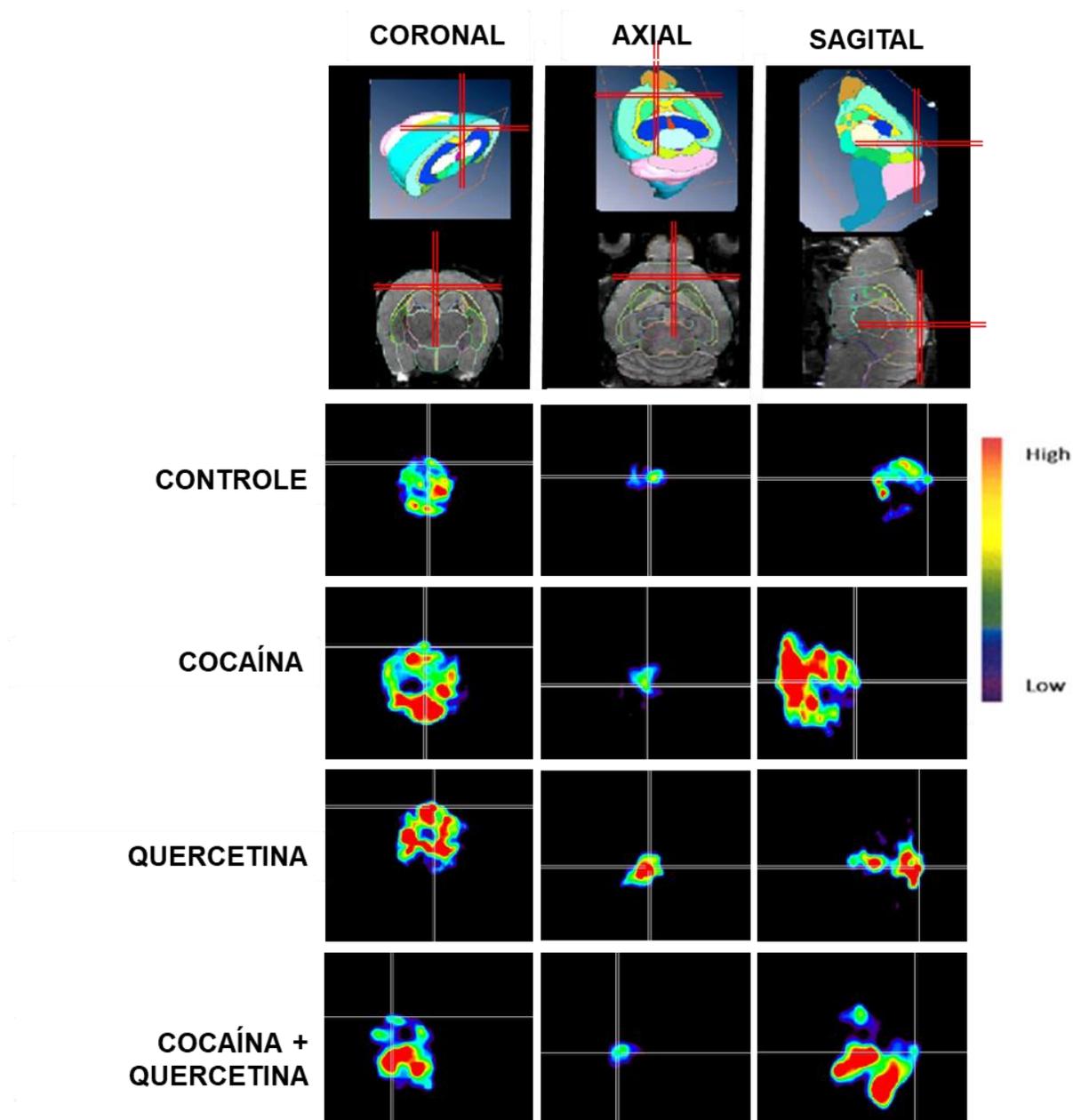
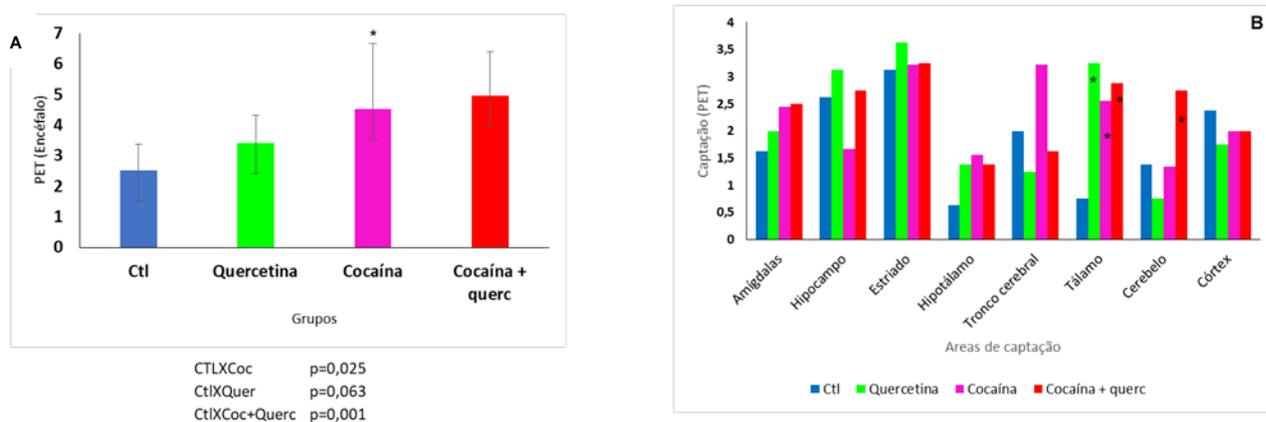


Figura 16: EasyPET-3D-¹⁸F-FDG Córtex. Imagem comparativa dos grupos controle, cocaína, quercetina e cocaína associada à quercetina. As imagens demonstram a captação comparativa de cada grupo no córtex. Note uma maior captação nos grupos cocaína e quercetina.



		Amígdalas	Hipocampo	Estriado	Hipotálamo	Tronco cerebral	Tálamo	Cerebelo
CTLXCoc	p=	0,26	0,2	0,87	0,24	0,1	0,01	0,94
CtIXQuer	p=	0,58	0,37	0,4	0,22	0,27	0,001	0,15
CtIXCoc+Querc	p=	0,23	0,82	0,83	0,24	0,6	0,009	0,02

*PET: Tomografia por Emissão de Pósitrons; CTL: controle; Coc: cocaína; Quer: Quercetina; p= significância

Gráfico 3: EasyPET-3D-¹⁸F-FDG. Note que não há diferença na captação do encéfalo dos animais que receberam quercetina quando comparado ao controle, entretanto os grupos cocaína e cocaína associado à quercetina apresentaram diferença (A). Há diferença na captação do tálamo de todos os grupos em relação ao controle e do cerebelo do grupo cocaína associado a quercetina (B) (Teste de Dunnett's).

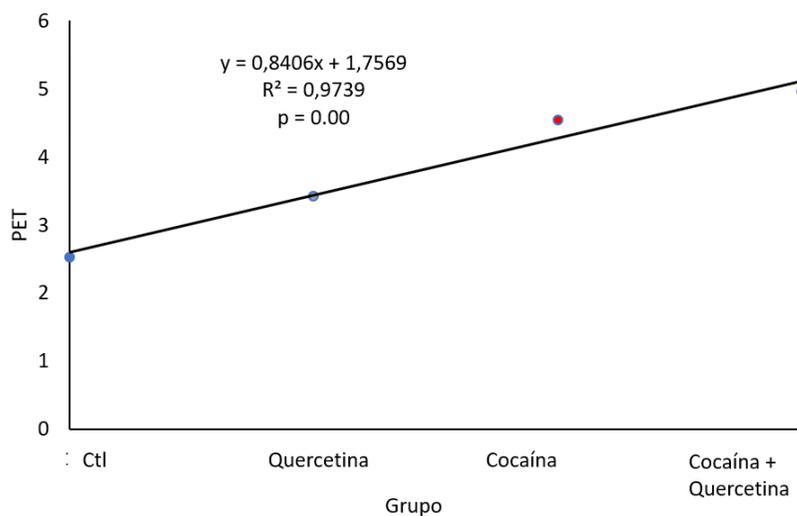
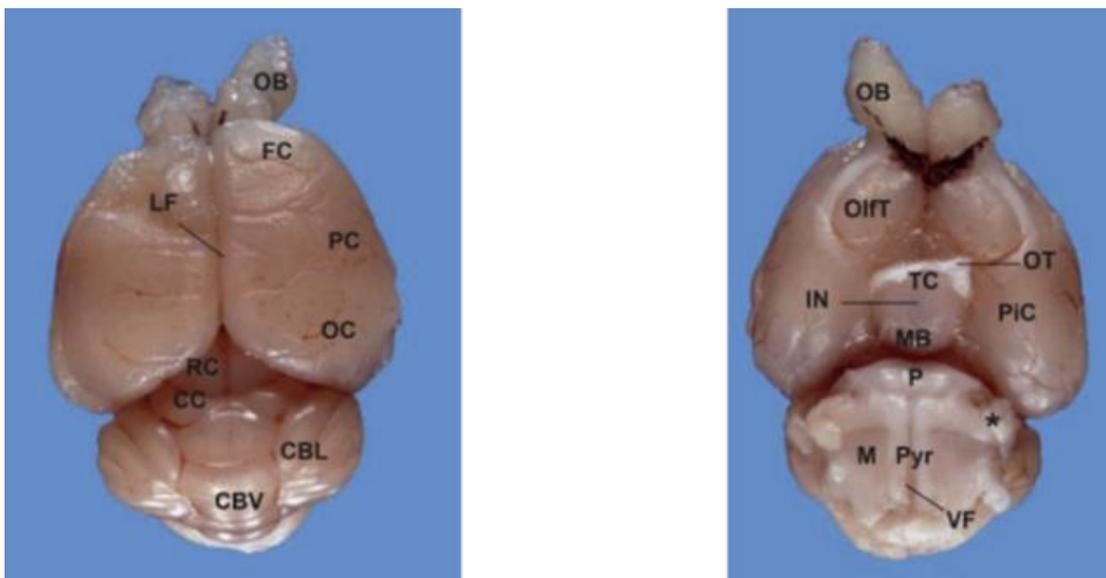


Gráfico 4: Correlação entre o EasyPET-3D-¹⁸F-FDG e os grupos de animais submetidos a diferentes compostos. Notar a correlação linear entre o aumento da captação e os diferentes grupos. Há maior captação no grupo que recebeu cocaína associada à quercetina.

4.3. Análise anatomopatológica

4.3.1. Análise macroscópica

Não foram encontradas alterações macroscópicas em nenhum dos espécimes e grupos analisados.



* OB: Bulbo Olfatório; FC: córtex frontal; LF: fissura longitudinal; PC: córtex parietal; OC: córtex occipital; RC: colículo rostral; CC: colículo caudal; CBL: cerebelo (lateral); CBV: cerebelo (vermis); OlfT: tubérculo olfatório; TC: *tuber cinereum*; OT: trato óptico; IN: infundíbulo; PiC: córtex piriforme; MB: corpos mamilares; P: ponte; M: medula oblonga; Pyr: pirâmide; VF: fissura mediana ventral

Figura 17: Aspecto macroscópico do cérebro. Note a ausência de alterações macroscópicas. Na figura: encéfalo de um animal controle, com as áreas cerebrais demarcadas.

4.3.2. Análise microscópica

4.3.2.a. Quanto ao cerebelo

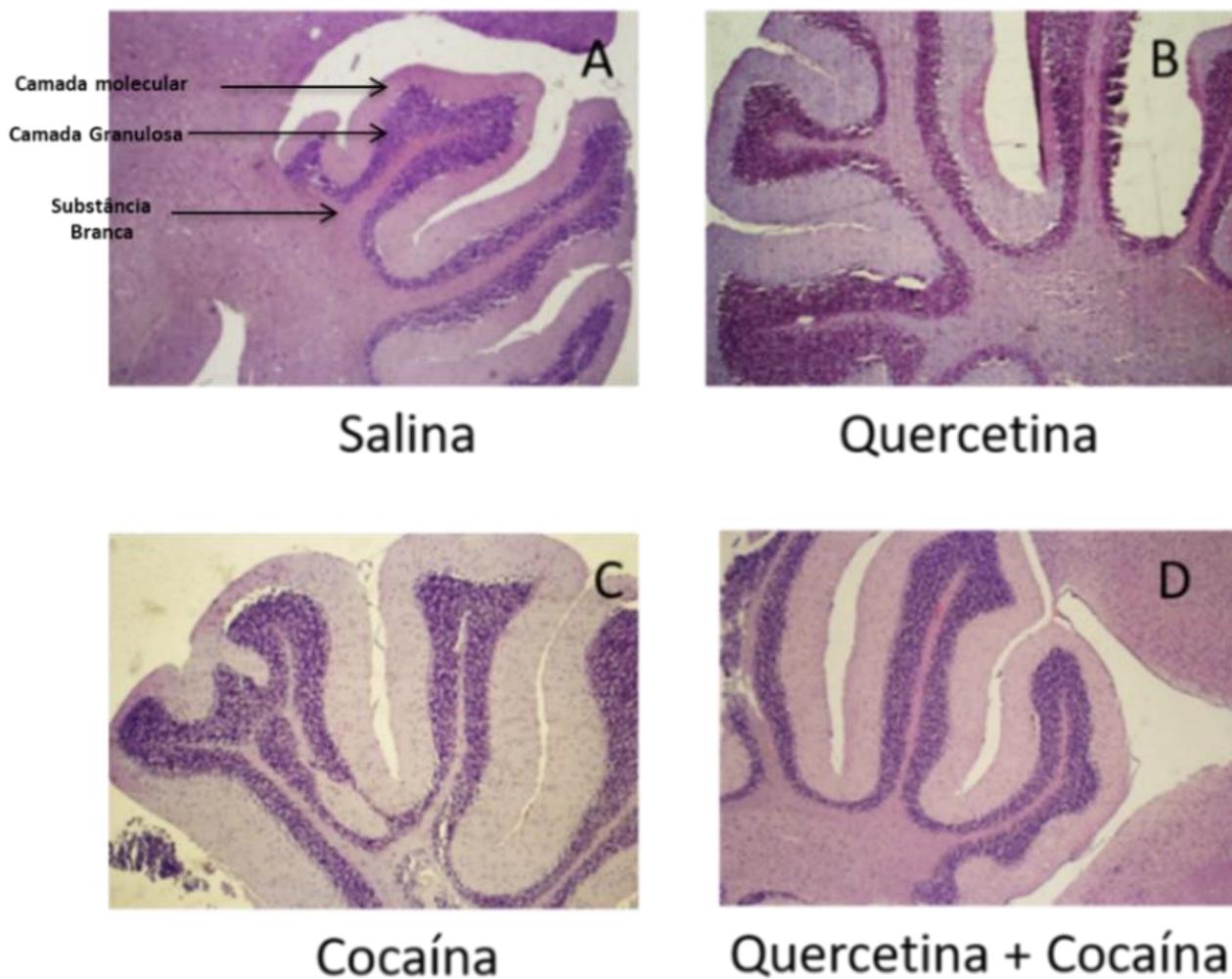


Figura 18: Microfotografias do cerebelo de animais com ou sem exposição aguda a cocaína e quercetina. Notar ausência de alterações histopatológicas no cerebelo normal (A); ou com utilização de quercetina (B), Cocaína (C) e Quercetina associada à cocaína (D) [H&E], 40x.

4.3.2.b. Quanto ao hipocampo

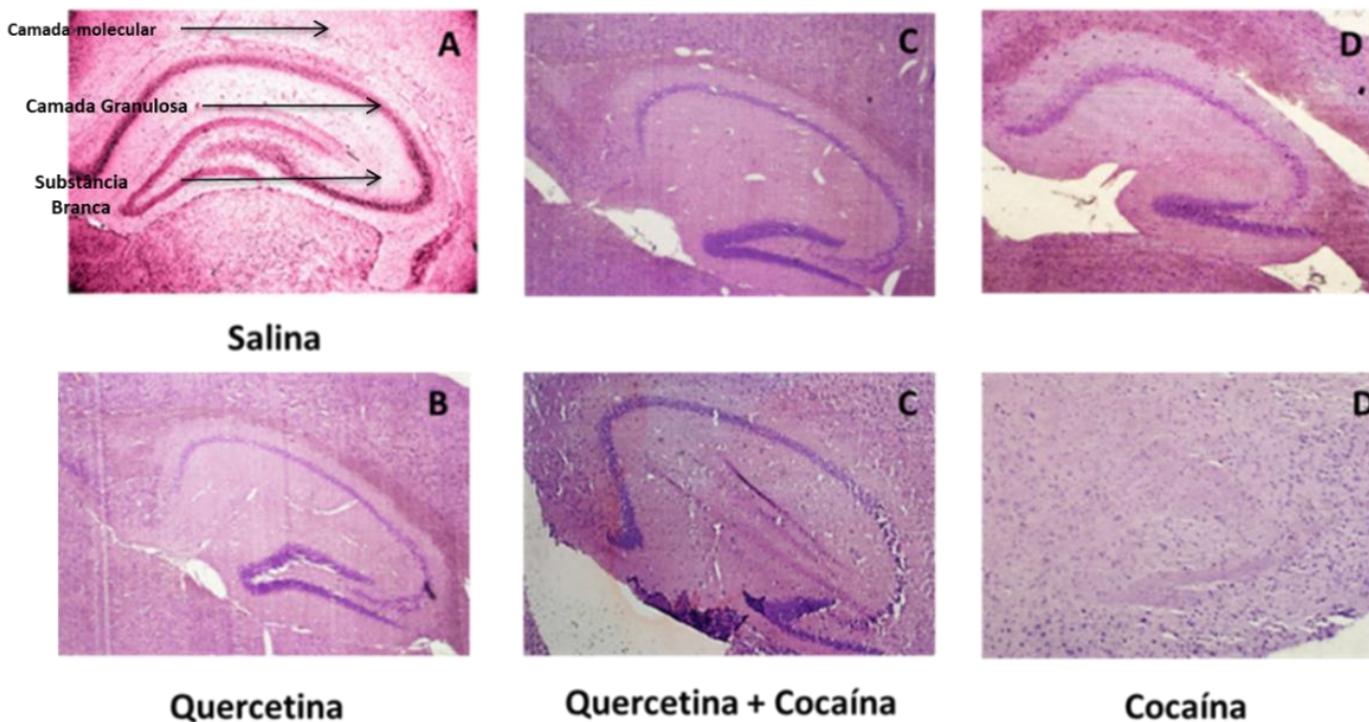


Figura 19: Microfotografias da região hipocampal de animais com ou sem exposição aguda a cocaína e quercetina. Notar ausência de alterações histopatológicas em no grupo normal (A), quercetina (B) e na associação quercetina e cocaína (C) e as alterações histológicas nos animais que receberam cocaína (D), da mais leve (fotografia superior), a mais intensa (fotografia inferior). Há deterioração morfológica intensa da camada granulosa com uso de cocaína (D inferior), com descaracterização quase completa da morfologia da região, que pode ser preservada na associação com quercetina [H&E], 40x.

4.3.2.c. Quanto ao córtex pré-frontal

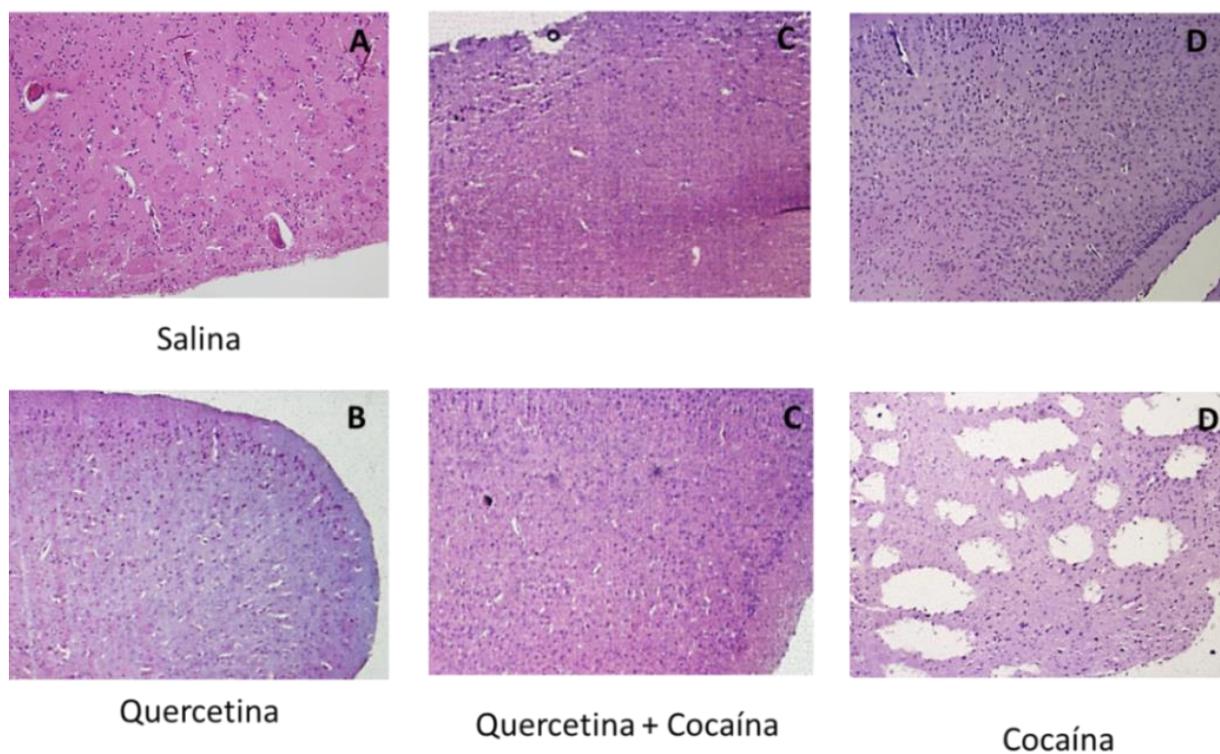
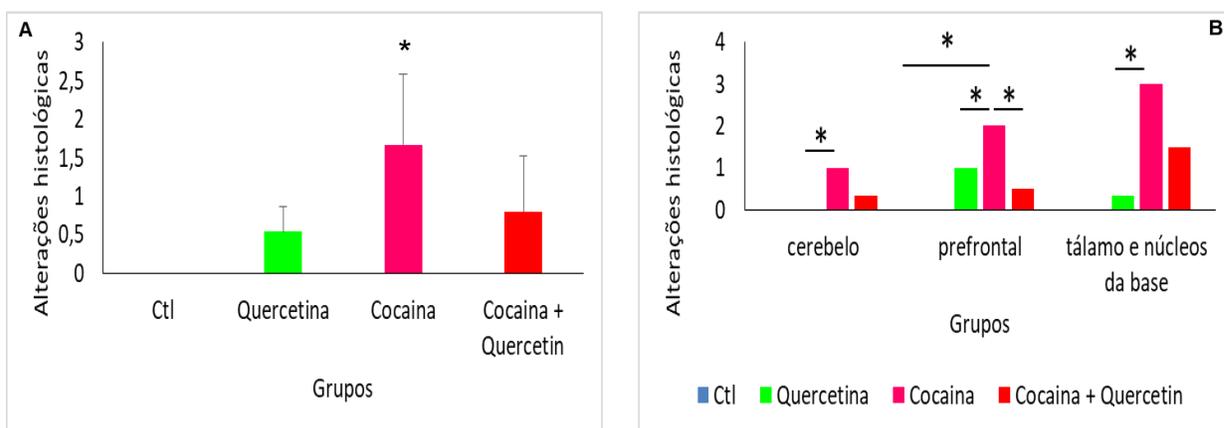


Figura 20: Microfotografias do encéfalo de animais com ou sem exposição aguda a cocaína e quercetina. Notar ausência de alterações histopatológicas em córtex pré-frontal nos animais normais (A) e quercetina (B), da mais leve (fotografia superior), a mais intensa (fotografia inferior). Há gliose reacional nos animais que receberam cocaína associada à quercetina (C) mais intensa no grupo cocaína, associada à necrose (D) [H&E], 4x.



Cerebello	Cocaina X Quercetina	p = 0.04
Cortex Pre-frontal	Cocaina X Ctl	p = 0.00
	Cocaina X Quercetina	p = 0.04
	Cocaina X Cocaina+Quercetina	p = 0.02
Tálamo e Núcleos da Base	Cocaina X Quercetina	p = 0.00

* CTL: controle; p= significância

Gráfico 5: Dados anatomopatológicos mostrando as áreas mais afetadas pela cocaína. Note que o pré-frontal sofre alterações histológicas importantes, diferenciando-se de todas as demais regiões e que o uso associado de quercetina previne a lesão pré-frontal (A). Há uma diferença entre quercetina e cocaína, no cerebello e tálamo e núcleos da base. Na análise do CPF, houve diferença de todos os grupos quando comparados à cocaína (B).

4.4. Correlação entre atividade cerebral e histologia

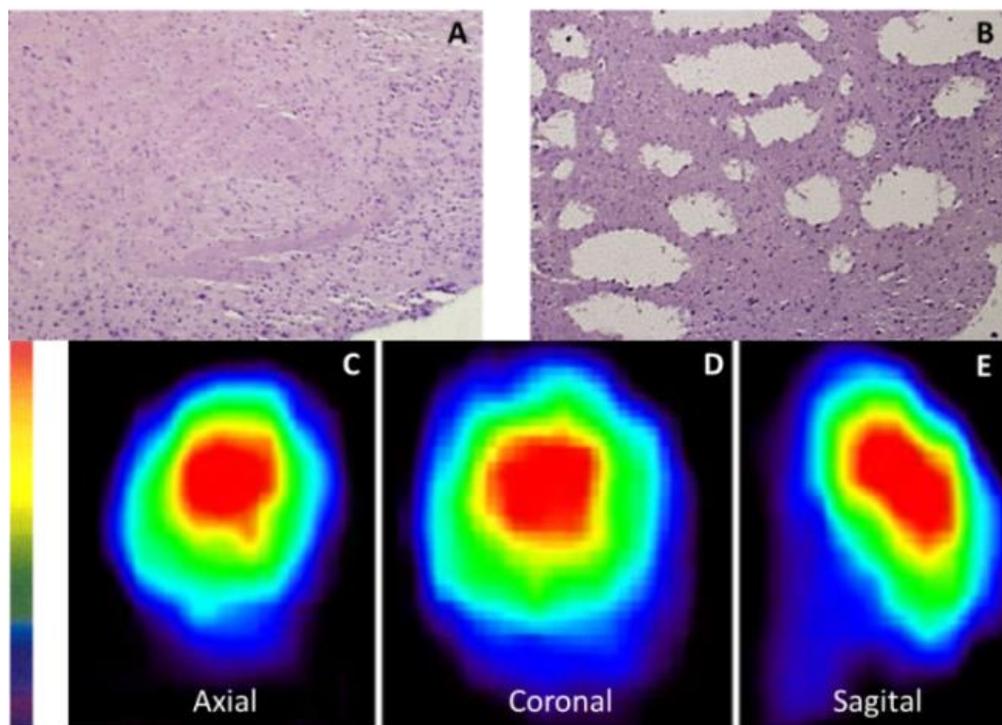


Figura 21: Microfotografias do encéfalo de animal exposto de forma aguda à cocaína. Notar a gliose reacional (A) associada a vacuolização em córtex pré-frontal (B) [H&E], 4x. No *EasyPET-3D* pode-se observar captação difusa cerebral, sem possibilidade de localização da atividade nos cortes axial (C), coronal (D) e sagital (E), mostrando a correlação morfofuncional do *EasyPET-3D*.

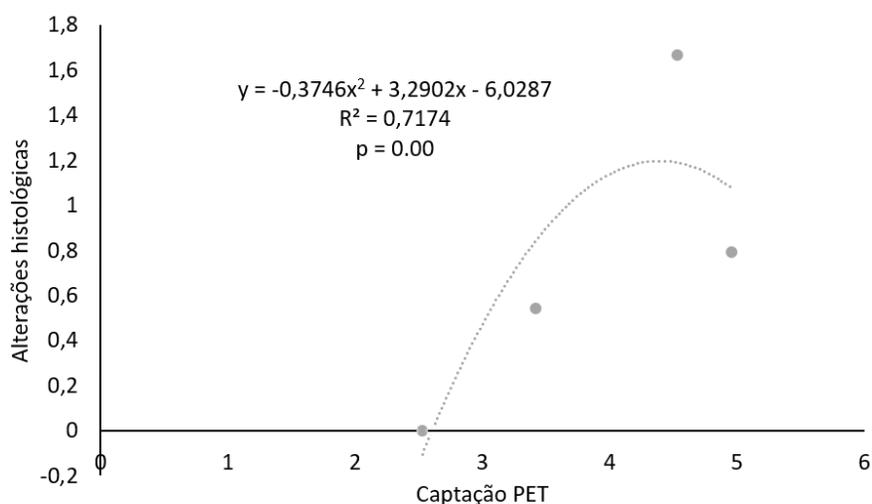


Gráfico 6: Correlação entre o *EasyPET-3D*- ^{18}F -FDG e as alterações histológicas encontradas. Notar o aumento de atividade inicial até que em certo grau de lesão histológica há decaimento da captação, demonstrando a correlação entre características morfológicas e atividade metabólica cerebral.

Quadro 3: Principais associações entre as variáveis estudadas.

	PET Cerebelo	Histologia CPF	Histologia	Corpo amigdalóide	Grupo	Estriado	Histologia Tálamo
Corpo amigdalóide (PET)	0,510 (0.04)						
PET		0,707** (0.00)	0,634** (0.00)	0,760 (0.00)	0,516 (0.00)		
T imóvel						-0,544 (0.02)	
OF						-0,523 (0.03)	
EPM			0,512 (0.04)			-0,516 (0.04)	0,888** (0.00)
Distância BF							0,760 (0.00)
Distância BA					0,601 (0.03)		
T neutro					0,599 (0.01)		0,690 (0.00)
Histologia Cerebelo		-0,684 (0.00)					
Velocidade máxima		-0,770 (0.00)					

*CPF: córtex pré-frontal; PET: tomografia computadorizada por emissão de pósitrons; T: tempo; OF: open field maze; EPM: elevated plus maze; BF: braço fechado; BA: braço aberto

5. DISCUSSÃO

As limitações para se investigar uma doença humana podem envolver aspectos éticos ou inerentes à própria doença e no modo de investigação. Uma das maiores limitações é a de ordem ética, pois exige uma série de requisitos para resguardar a integridade física e psicoemocional dos investigados. Atualmente, os modelos animais são usados quando não é possível realizar a investigação em humano e quando não se tem um método alternativo ao uso de animais, como em experimentos que envolvem comportamento, aprendizagem e memória. Existe legislação e ética na qual esse tipo de experimentação está inserida para garantir que não haja o uso de número de animais maior do que o necessário e para a redução do sofrimento, seguindo o princípio dos 3Rs, a saber *Reduction, Refinement, Replacement* (RUSSELL e BURSCH, 1959). Ainda é necessário levar em consideração o tamanho da amostra para haver representatividade estatística, sendo assim, existe outra dificuldade quando, por exemplo, trata-se de doença com baixa incidência. Além disso, é necessário acompanhar a amostra pelo período de investigação para evitar viés, o que é bastante trabalhoso e nem sempre possível, em doenças com alta taxa de não adesão terapêutica. Por último e não menos importante é a escolha do tratamento padrão e do controle. Todas essas limitações fazem com que muitas vezes seja necessário modelo de estudo alternativo que pode ser por levantamento de dados, técnicas físico-químicas, modelos matemáticos ou computacionais, *ship*, sistemas *in vitro*, uso de organismos inferiores e modelos animais, como o aqui proposto (ANDRADE, 2002; FAGUNDES, 2004; CASTRO, 2013).

O modelo animal é usado em todos os campos da pesquisa biológica. A escolha do modelo deve ser criteriosa e é ponto fundamental do planejamento da pesquisa. Um modelo é um objeto de imitação, algo que represente alguma coisa ou alguém, algo que seja semelhante ou imagem de outro. Ele deve ter características suficientes para ser semelhante ao objeto imitado e ter a suficiente capacidade de ser manipulado sem as limitações do objeto imitado (FAGUNDES, 2004). Um modelo inadequado implicará em restrições comprometedoras na análise e interpretação dos resultados e no processo de indução destes resultados para os seres humanos. Desta forma, é necessária a correspondência entre o modelo proposto e a situação de vida da espécie alvo (ANDRADE, 2002).

A literatura é bastante limitada quando se fala em modelo animal de dependência a cocaína e seu tratamento. A maior parte dos estudos está relacionada à exposição crônica, dependência; ao processo de retirada, abstinência e *craving* e à intoxicação, sintomas relacionados com altas doses (PELLOW et al., 1985; MÜLLER, 2008; BONUTI, 2014). Os modelos existentes envolvem a autoadministração voluntária da droga pelos animais, assim

como acontece nos humanos. Incluem ainda a discriminação de estímulos, dentre eles o condicionamento de lugar, e a autoestimulação intracraniana, e procuram avaliar diversos aspectos da dependência, desde o processo de aquisição do uso de drogas, como o potencial de reforço positivo, o potencial de reforço negativo da abstinência, o potencial de geração de escalada no uso da droga e aspectos associados à recaída. Modelos são usados para estudar os efeitos crônicos das drogas (GARCIA-MIJARES, 2006; NEGUS; MILLER, 2014).

Martin-Garcia et. al., em 2014, utilizaram modelo animal para estudar a recaída ao uso de cocaína após abstinência, pois os fundamentos neurobiológicos permaneciam hipotéticos, apesar da ingestão de alta frequência e alta procura induzida por drogas estarem associadas à dependência de cocaína, tanto em seres humanos quanto em animais. Isso ocorre porque o córtex pré-frontal medial (mPFC), a amígdala basolateral (BLA) e o NAc parecem ter papel na busca de cocaína, como descrito anteriormente. Animais que se autoadministram em alta frequência, intervalos curtos permitidos por curto período de tempo, apresentam maior procura induzida por cocaína do que administrados em baixa frequência, ou seja, longos intervalos impostos por longo tempo. Assim, a ingestão de alta frequência promove controle pré-límbico exercendo efeito facilitatório, o que pode ser uma fonte de vulnerabilidade para a busca e/ou consumo de cocaína. Para se obter modelo animal de drogadição os animais são mantidos em gaiola onde podem se autoadministrar cocaína, sendo analisada a frequência e o tempo dessa autoadministração a fim de identificar um padrão de consumo compulsivo, semelhante aos episódios de *craving* em humanos.

A intoxicação aguda está relacionada ao uso esporádico e também pode induzir à ativação do sistema de recompensa em humanos (LARANJEIRA, 2012). A expressão intoxicação aguda refere-se à exposição recente à droga que pode ou não estar associada ao uso crônico ou à dependência química (AMARAL, 2013). Conforme observado após revisão de estudos de drogadição em modelos animais, a administração única de substância de abuso em animais é chamada de exposição aguda e a administração única diária, porém, em dias consecutivos é chamada de sensibilização, enquanto em humanos, usa-se o termo intoxicação. Estudos comportamentais de exposição aguda com dose única de cocaína em animais ainda são escassos (DARMANI et al., 1997; UNGLESS et al., 2001; FOURGEAUD et al., 2004; ALVARENGA et al., 2010). Maluf em 2011, em estudo de sensibilização, observou que a administração aguda de cocaína em camundongos leva ao aumento de níveis proteicos no CPF, enquanto a administração prolongada cursa com diminuição dessas proteínas, o que poderia ter relação com uma piora da ansiedade. Outro estudo sugere que a cocaína pode apresentar efeitos

ansiolíticos temporários após a primeira exposição (MÜLLER, 2008). Pouco se sabe sobre as nuances que diferenciam exposição aguda, intoxicação aguda, reexposição, recaída e *craving* e menos ainda sobre a fase de adicção que o paciente se encontra, assim como se a dose utilizada é determinante da adicção. Todas as informações são importantes para a proposta terapêutica adequada e devem ser consideradas e investigadas. Estudos realizados com exposição aguda à cocaína, sensibilização e administração de baixas doses são importantes para avaliar os prejuízos que estão relacionados às dosagens menores, tanto sob o ponto de vista comportamental, como nas alterações cerebrais, ou mesmo no potencial para desencadear a dependência e a evolução da doença.

As doses variam bastante entre os estudos em animais, tendo sido descritas doses a partir de 5mg/kg, mas variando de 15mg/kg (binge) a 40mg/kg (SHUSTER et al, 1977; ROCHA et al., 1998; ZHANG et al., 2002) quando o propósito é o estudo da intoxicação aguda. Embora pesquisas sobre modelos animais de exposição aguda à cocaína sejam escassos, permanecendo este assunto como lacuna na compreensão da drogadição, foi relatado que doses entre 0,3 a 0,6 mg/kg apresentam ação dopaminérgica visível em PET *Scan* em humanos (VOLKOW et al, 1997; HEARD et al, 2008). Desta forma, foi escolhida dose baixa, de 0,5 mg/Kg no presente estudo, em busca de modelo de exposição aguda de cocaína, ou seja, qual o papel da primeira exposição, “recreativa”, costumeiramente em baixa dose, no processo de drogadição e a partir dele foram desenvolvidos os estudos e análises.

Independente da fase em que se encontra o paciente, o principal marcador e identificador da doença é o comportamento adquirido pelo adicto. Na exposição aguda a alteração comportamental ocorre logo após a administração da cocaína, sendo que os sintomas iniciais diferem dos sintomas do uso crônico. Os sintomas agudos aparecem após um único uso e incluem excitação motora, agressividade e/ou inquietação, aumento das percepções sensoriais, euforia, além de autoconfiança elevada com desinibição, em acordo ao encontrado no presente estudo. Já os sintomas crônicos, se iniciam após o uso prolongado e se manifestam por ansiedade, hostilidade, medo e estereotipias motoras (FERIGOLO, 2007; DSM-V, 2014). Da mesma forma que os sintomas da exposição aguda, em uso único ou esporádico, diferem do quadro de tolerância e dependência em humanos, o comportamento em animais nas diferentes fases também tem diferentes apresentações. Para a melhor compreensão das alterações apresentadas em animais são utilizados testes comportamentais. Entre outros, os testes *ansiedade-like* como o OF e EPM, que são os mais descritos em estudos de dependência química.

As avaliações de ansiedade nos animais relacionam-se geralmente ao medo do ambiente desconhecido e são bons métodos para comparar substâncias ansiolíticas e ansiogênicas (HANDLEY & MITHANI, 1984; PELLOW et al., 1985; CRUZ et al., 1994; OLIVEIRA, 2012). Apesar de cada teste ter vários parâmetros para serem analisados, é preferível utilizar mais de um teste que envolva diferentes tipos de estímulos para que haja uma avaliação mais completa (SOUZA et al., 2018). Tanto o EPM quanto o OF avaliam a ansiedade e esquiva em comparação com o comportamento exploratório normal do animal. Nos primeiros estudos, os pesquisadores acreditavam que a aversão aos braços abertos do EPM se relacionava ao medo da altura (HANDLEY; MITHANI, 1984), entretanto análises subsequentes demonstraram que a aversão era decorrente da tigmotaxia, ou seja, à tendência de roedores de se esquivarem de áreas abertas, desconhecidas e potencialmente perigosas (LISTER, 1987; LACERDA, 2006). Esta descrição aplica-se também à maior permanência dos animais nas periferias em comparação ao centro do aparato, no OF. Nos testes em OF com uso crônico de cocaína, a locomoção periférica está relacionada à ansiedade e ao medo, enquanto a locomoção central representa a diminuição do grau de ansiedade e de esquiva (LISTER, 1987; RAMOS et al., 1997; BELZUNG et al., 2001).

No EPM (FIGURA 7) os animais não estimulados apresentam comportamento exploratório espontâneo por todo o aparato, tendem a explorar o ambiente como um todo, naturalmente, entretanto com menor entrada nos braços abertos quando comparado com os fechados, demonstrando evitação de ambiente aversivo (PELLOW et al., 1985; LISTER, 1987; OLIVEIRA, 2012). Drogas ansiolíticas, como os benzodiazepínicos, promovem diminuição da esquiva, fazendo com que os animais passem mais tempo nos braços abertos, enquanto as drogas ansiogênicas ou psicoestimulantes como a cocaína, levam ao aumento da esquiva (HANDLEY; MITHANI, 1984; PELLOW et al., 1985; CRUZ et al., 1994; OLIVEIRA, 2012), sendo assim o EPM evidencia que as drogas psicoestimulantes levam ao comportamento de esquiva dos braços abertos com tendência a maior tempo de permanência nos braços fechados, indicando aumento da ansiedade (LISTER, 1987; RAMOS et al., 1997; BELZUNG et al., 2001). Além disso, pode gerar aumento da atividade locomotora, avaliado pelo número total de entradas nos braços (LISTER, 1987; RAMOS et al., 1997). Portanto, animais normais tendem a apresentar maior tempo de permanência nos braços fechados e menor tempo de permanência nos braços abertos em comparação com os outros grupos com utilização de droga, com menor tempo de latência para a entrada nos braços abertos, o que demonstra o comportamento normal, em que, evitam a permanência nos braços abertos (local de perigo que gera ansiedade) e não demoram em entrar e explorar esse compartimento do aparato (curiosidade) (PELLOW et al., 1985; OLIVEIRA, 2012). Distintamente do relatado na literatura, no presente estudo os animais que receberam quercetina,

cocaína ou cocaína associada à quercetina (FIGURA 5) apresentaram comportamentos globais semelhantes quando comparados ao grupo controle (GRAFICO 1) no EPM. Esses dados podem relacionar-se com o fato da avaliação ter sido realizada após o OF, ou seja, 120 minutos após a administração da cocaína e da quercetina. Considerando o tempo de meia vida da cocaína os animais não estavam mais sob o efeito da substância e, portanto, já apresentavam comportamento normal.

A avaliação do OF (FIGURA 8) foi feita pela análise da distância total percorrida no aparato, da velocidade, do tempo de permanência imóvel, do tempo de permanência na periferia e do número de entradas na periferia, do tempo de permanência no centro e do número de entradas no centro. A análise demonstra que, ao final dos 60 minutos no aparato, houve diferença no comportamento dos grupos cocaína, quercetina e cocaína associada à quercetina quando comparados ao controle quanto à distância percorrida (GRAFICO 2A), velocidade média (GRAFICO 2B), velocidade máxima (GRAFICO 2C), distância percorrida na periferia (GRAFICO 2E) e tempo de latência da primeira entrada no centro (GRAFICO 2I), sendo que a atividade da quercetina foi maior que a da cocaína quanto à distância percorrida, a velocidade média, a velocidade máxima e distância percorrida na periferia (A, B, C e E) e semelhante à cocaína no tempo de latência da primeira entrada no centro (I). O grupo cocaína associada à quercetina assemelha-se ao grupo controle em relação ao tempo na periferia do aparato (GRAFICO 2D), número de entradas no centro (GRAFICO 2F), tempo no centro do aparato (GRAFICO 2G) e distância percorrida no centro (GRAFICO 2H), com maior tempo na periferia, menor tempo de permanência, entradas e distâncias percorridas no centro sugerindo que, em relação aos parâmetros que demonstram ansiedade, o grupo cocaína associada à quercetina retoma o comportamento normal, ou seja, mais evitativo nas áreas aversivas, enquanto os grupos cocaína e quercetina não demonstram esse comportamento, mantendo-se, portanto, mais tempo no centro (comportamento ansiolítico-*like*).

A latência de primeira entrada no centro é maior nos grupos controle e cocaína associada à quercetina demonstrando o comportamento exploratório demonstrando hesitação. Para a avaliação da atividade locomotora, os parâmetros observados são distância total percorrida, velocidade média e velocidade máxima. Nos primeiros 10 minutos de experimento observa-se que, em relação a distância percorrida e a velocidade média, o grupo cocaína associada à quercetina assemelha-se ao grupo controle, enquanto ao final dos 60 minutos assemelha-se à cocaína, com uma atividade locomotora mediana quando comparada ao controle (menor atividade) e a quercetina (maior atividade) (GRAFICOS 2A, B e C). Quanto à ansiedade, os

parâmetros analisados são relacionados ao comportamento nas periferias e centro do aparato, sendo que mais tempo no centro indica diminuição da ansiedade, aumento da autoconfiança e desinibição. Ao final dos 10 minutos foi possível observar comportamento semelhante entre os grupos controle, quercetina e quercetina associada à cocaína quanto ao tempo na periferia (GRAFICO 2D). Houve, ao final dos 60 minutos, comportamento semelhante entre controle e cocaína associada à quercetina quanto ao tempo no centro, sendo que o grupo cocaína apresentou tempo de permanência no centro maior que os demais, demonstrando maior desinibição, em relação aos outros grupos. Distintamente do que ocorre com os testes realizados com animais em uso crônico e prolongado da cocaína, que apresentam esquiva e ansiedade (LISTER, 1987; RAMOS et al., 1997; BELZUNG et al., 2001), a resposta dos animais com baixa dose de cocaína em exposição aguda demonstrou que o comportamento do grupo quercetina e do grupo cocaína são semelhantes, com diminuição da esquiva e da ansiedade. Este parece indicar uma diminuição da ansiedade por uma ação ansiolítica-*like*, ou mesmo um aumento da autoconfiança pela ação psicoestimulante.

O comportamento da exposição aguda em humanos inclui euforia, autoconfiança elevada, excitação motora, inquietação e aumento das percepções sensoriais, e sugerem que a cocaína poderia apresentar efeitos distintos aos descritos para o uso crônico, que cursa com ansiedade, medo, paranoia e esquiva (MÜLLER, 2008).

O mapeamento das funções cerebrais pode ser realizado por exames de imagens da área da medicina nuclear, não invasivos, a partir da distribuição de um radiofármaco marcado. Essa marcação pode ser por meio da Tomografia Computadorizada por Emissão de Pósitron (PET) ou por Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único (SPECT) (COSTA et al., 2001; FELIX et al., 2014). A Tomografia por Emissão de Pósitron (PET) é um exame cuja finalidade é identificar imagens funcionais do cérebro de forma não invasiva, além de ter aplicação na descoberta e avaliação de novos fármacos por definir com facilidade a farmacocinética e demonstrar comportamentos farmacodinâmicos (COSTA et al., 2001).

A tomografia por emissão de pósitrons tem sido amplamente utilizada em diversos países não só no campo da cardiologia, mas também na oncologia e neurologia. No Brasil há limitações para o desenvolvimento desta tecnologia devido à dificuldade de produção dos traçadores e/ou a distância de centros que os produzam. Para essa produção são utilizados aceleradores de partículas do tipo ciclotron, que geram principalmente traçadores de meia vida bastante reduzida. A meia vida física curta dificulta a distribuição, transporte e comercialização destes traçadores.

Uma exceção é a fluordesoxiglicose, ^{18}F -FDG, com uma meia-vida relativamente mais longa, de 120 minutos (MENEGETTI; CHALELA, 2002).

O exame com PET é uma modalidade diagnóstica não invasiva que usa radiofármacos para apreender e medir processos bioquímicos tissulares. Como outras técnicas de medicina nuclear, o exame demarca a doença em termos de uma química regional quantitativamente anormal. Ela mede a atividade metabólica das células corporais, permitindo a investigação da perfusão, dos caminhos metabólicos e dos processos biomoleculares em estados normais e patológicos (PEREGRINO et al., 2004).

O exame fornece imagens da função e da bioquímica corporais. Essa tecnologia utiliza derivados de compostos biologicamente ativos ou fármacos. No presente estudo, a quercetina, marcada com emissor de pósitrons, ^{18}F -FDG, processada internamente de uma maneira virtualmente idêntica às suas contrapartidas não radioativas, fornecem o mecanismo para registrar a atividade metabólica *in vivo*.

A distribuição dos compostos pode ser medida com um tomógrafo PET que produz imagens e índices quantitativos dos tecidos e órgãos corporais. Dessa maneira, o metabolismo da glicose, o transporte de aminoácidos, a síntese de proteínas, a divisão celular, o consumo de oxigênio, o fluxo sanguíneo e o status dos diversos neurorreceptores podem ser determinados. Processos bioquímicos como esses podem estar alterados em várias doenças e traçadores desses processos podem ser usados para detectar sua presença, na ausência de alterações estruturais grosseiras ou o avanço das mesmas (PEREGRINO et al., 2004).

As vantagens do seu uso estão na facilidade de realização, ausência de dor, não se tratar de procedimento invasivo, além do bom resultado das imagens. No entanto, trata-se ainda de exame de alto custo e complexidade, com limitação de acesso na maior parte dos centros que trabalham com pesquisa pré-clínica baseada em modelos animais de doenças. Esse exame tem se mostrado útil na área da neurologia e da psiquiatria.

Recentemente, para reduzir custos e facilitar o acesso, foi desenvolvido pela Universidade de Aveiro o equipamento *EasyPET-3D* (RIBEIRO et al, 2018) tendo seus resultados sido validados na Universidade de Coimbra, onde foram executadas as análises do presente estudo (FIGURAS 9 e 10).

O marcador utilizado para a aquisição de imagens foi o radioisótopo ^{18}F -FDG que é uma molécula análoga da glicose marcada com flúor 18, um emissor de pósitrons que atravessa a membrana celular por difusão com transportadores de glicose. A quantidade que se acumula nos

tecidos ao longo de um período de tempo específico permite o cálculo da taxa de absorção de glicose em um tecido. Trata-se de radiofármaco com finalidade diagnóstica que é transportado via membrana celular, mas passa apenas pela primeira etapa da glicólise, resultando na formação de Fluorodeoxiglicose-18F-6-fosfato que não é metabolizado. Passa por uma lenta desfosforilação, o que faz com que permaneça no tecido por muitas horas. A ¹⁸F-FDG atravessa a barreira hematoencefálica. Aproximadamente 7% da atividade injetada acumulam-se no cérebro (Cyclobras Indústria Comércio e Serviços Laboratoriais Ltda).

Estudos demonstram que pacientes dependentes de cocaína apresentam irregularidades do fluxo cerebral e esse tipo de irregularidade é melhor percebido em exames de PET (NICASTRI et al. 2000; SILVEIRA, 2001). Estudo caso-controle com quatorze pacientes dependentes de cocaína, do sexo masculino e sem co-morbidades foram selecionados e submetidos, assim como os pacientes controle, a estudos de PET cerebral. A proporção de exames considerados alterados foi significativamente maior no grupo de pacientes comparados ao controle, sendo que nove dos quatorze pacientes (63%), em contraste com apenas dois, dentre os quatorze controles (14,3%), apresentaram alterações. Esses dados sugerem que os pacientes dependentes de cocaína apresentam irregularidade no fluxo sanguíneo cerebral (NICASTRI et al., 2000).

Em outro estudo, composto por amostra de 30 indivíduos do sexo masculino, observou, após a realização dos exames de PET/SPECT que 20% pacientes apresentavam exame tomográfico normal, 36,7% apresentavam alterações de grau leve, 36,7% apresentavam alterações de grau moderado, e 6,7% pacientes apresentavam alterações graves da perfusão cerebral; não foi observado padrão característico de localização das alterações (SILVEIRA, 2001).

A administração crônica de cocaína está associada com a redução global no metabolismo cerebral de glicose e do fluxo sanguíneo cerebral, além dos efeitos subjetivos da droga e a sensação de *craving* relaciona-se com o aumento do metabolismo regional de glicose no córtex pré-frontal dorsolateral, na amígdala e no cerebelo (NICASTRI, 2001). Uma importante vasoconstrição arterial cerebral induzida pela cocaína, mesmo em doses relativamente baixas, pode ser uma explicação para essa contradição. Em alguns estudos realizados comparando cocaína e placebo foram descritas várias áreas de ativação rápidas e transitórias localizadas em regiões que incluíram cíngulo, córtex pré-frontal dorsolateral, prosencéfalo basal, núcleo caudado, tegmento ventral e ponte, ao passo que foi observada ativação mais gradual e mantida no núcleo accumbens (LONDON et al.,1990; PEARLSON et al.,1993; WALLACE et al.,1996;

NICASTRI, 2001). Os autores relataram que as ativações iniciais e tardias se correlacionaram, respectivamente, com a euforia e com a sensação de "*craving*" pela droga (NICASTRI, 2001).

Complicações neurovasculares decorrentes do uso de cocaína podem ser responsabilizadas pelos elevados índices de morbidade e mortalidade deste grupo. Os estudos com o PET/SPECT demonstram a existência de alterações de perfusão cerebral na maioria dos dependentes de cocaína (SILVEIRA, 2001), entretanto estudos clínicos são bastante enviesados e a análise em animais de experimentação pode trazer bastante benefício sobre o mecanismo associado a uso de cocaína.

A captação cerebral por meio de PET com ^{18}F -FDG é evidenciada pelo aumento de metabolismo regional de glicose. No caso da cocaína, autores relataram a captação de distintas áreas cerebrais, entre elas, o córtex pré-frontal dorsolateral e na amígdala, além do cerebelo, relacionadas à sensação de *craving* em indivíduos dependentes, o que não se observa em controles normais (NICASTRI, 2001). Investigação semelhante, utilizando Ressonância Magnética Funcional encontrou ativações no cíngulo anterior e no córtex pré-frontal dorsolateral esquerdo em grupo de usuários de cocaína, havendo correlação com a intensidade de *craving* relatada (MAAS et al., 1998; NICASTRI, 2001). Mais recentemente, o PET permitiu a demonstração de aumento de fluxo sanguíneo em áreas límbicas, particularmente o cíngulo anterior e a amígdala, durante a *craving*, em usuários de cocaína (CHILDRESS et al., 1999; NICASTRI, 2001). Outros estudos também demonstraram a captação de áreas cerebrais como cíngulo, córtex pré-frontal dorsolateral, prosencéfalo basal, núcleo caudado, tegmento ventral, cerebelo e ponte em usuários de cocaína (LONDON et al., 1990; PEARLSON et al., 1993; WALLACE et al., 1996; NICASTRI et al., 2000; SILVEIRA, 2001; SEAMANS; YANG, 2004; KALIVAS; VOLKOW, 2005; GARCIA-MIJARES, 2006), entretanto não há estudos em PET sobre a exposição aguda em baixa dose de cocaína nem em humanos nem em animais, do melhor do nosso conhecimento.

A análise por PET traz grandes benefícios aos estudos relacionados às substâncias químicas, pois torna possível avaliar as alterações cerebrais imediatamente após o uso e compará-las ao longo do tempo de adicção, além de avaliar as peculiaridades que possam diferir as respostas em cada indivíduo, em cada dosagem e ao longo da sua exposição, e assim, ter uma melhor compreensão dos transtornos relacionados à dependência química. As regiões cerebrais ativadas pelo uso de substâncias psicoativas são conhecidas, entretanto, a confirmação das similaridades das áreas ativadas em modelos animais é útil para caracterizar e validar os modelos na pesquisa.

A análise global da imagem demonstrou uma captação das áreas como o córtex, corpos estriados, tálamo, hipotálamo, amígdalas e cerebelo, demonstrando a identidade funcional entre homem e o modelo animal proposto, além de uma maior captação no grupo que recebeu cocaína associada à quercetina (GRÁFICO 4).

A quercetina utilizada de maneira isolada manteve a intensidade de captação igual ao controle (GRÁFICO 3A) ($p=0,06$), enquanto a cocaína diferiu do controle ($p=0,02$) tal qual a associação de cocaína com quercetina ($p=0,001$). Quando observada área por área, notou-se que a captação talâmica diferiu do controle em todos os grupos (cocaína $p=0,01$, quercetina $p=0,00$ e quercetina associada à cocaína $p=0,00$), enquanto a captação do cerebelo foi diferente apenas nos animais que receberam quercetina associada à cocaína ($p=0,02$) (FIGURAS 11 e 12, GRÁFICO 3B).

No modelo de exposição aguda a cocaína, aqui apresentado, as análises no *EasyPET-3D* demonstraram que as principais áreas de captação estão relacionadas ao sistema límbico (FIGURAS 11-16).

O tálamo é uma das estruturas que compõe o sistema límbico e está relacionado à reatividade emocional. É responsável por projetar as informações sensitivas e sensoriais que orquestram reações e respostas. Essas reações são mais elaboradas quando coordenadas pelo CPF e, mais impulsivas, rápidas e intensas quando projetadas sobre os corpo amigdalóides (RIBAS, 2007), portanto, o tálamo tem como função organizar os estímulos para desencadear a resposta mais adequada.

A diferença encontrada em todos os grupos na captação talâmica quando comparada ao normal poderia decorrer das diferentes formas de modulação dos neurônios talâmicos, que pode ocorrer de forma direta ou indireta e promover ação sobre os neurônios GABAérgicos. Embora as áreas de captação sejam as mesmas, a modulação é diferente. Na via indireta, ocorre uma inibição glutamatérgica com conseqüente diminuição da inibição do núcleo subtalâmico, o que leva ao aumento da inibição talâmica, e a diminuição da atividade cortical. Em contrapartida, na via direta, a dopamina diminuiu a inibição do tálamo levando ao aumento da atividade cortical (SCALZO; TEIXEIRA-JÚNIOR, 2009).

No período de abstinência, a regulação dopaminérgica no CPF é mediada pelo receptor D1, fazendo com que apenas estímulos ambientais associados repetidamente com o efeito da droga, os gatilhos, sejam capazes de ativar a neurotransmissão entre o CPF (KALIVAS; VOLKOW, 2005), sendo assim, as interconexões do CPF modulam as respostas adaptativas aprendidas na presença de estímulos que predizem eventos motivacionais relevantes (KELLEY,

2004), portanto, em uma exposição aguda e única, ainda não houve condicionamento do estímulo e efeito reforçador, o que poderia justificar o fato de não haver diferenças na captação do CPF entre os grupos. Além disso, ação da quercetina pode estar relacionada à via direta, pois promove aumento da concentração de dopamina, o que leva à diminuição da inibição do tálamo (portanto uma maior captação deste), enquanto a cocaína pode estar envolvida na via indireta, pois, um aumento do glutamato acarreta em um aumento da inibição subtalâmica e consequente diminuição da inibição do tálamo (GARCIA-MIJARES, 2006; SCALZO; TEIXEIRA-JÚNIOR, 2009).

Desta forma, pode-se sugerir que a Quercetina em associação com a Cocaína, promova uma ativação dopaminérgica, com consequente aumento da atividade do tálamo e possível inibição da resposta emocional à cocaína. Além disso, a Quercetina pode promover uma modulação dos receptores dopaminérgicos mediados pela ativação de GABA, reduzindo a ação euforizante e psicoestimulante da cocaína e promovendo uma ação ansiolítica pela redução da atividade do complexo amigdalóide.

O cérebro é formado por diferentes estruturas com unidades histológicas distintas e o circuito nervoso por neurônios e células da glia que conduzem estímulos para os impulsos nervosos e realizam as sinapses.

A neurogênese, formação do sistema nervoso que ocorre nessas estruturas, relaciona-se à formação dos processos cognitivos como memória e aprendizagem. Fatores neurotóxicos, como a cocaína, podem promover prejuízo na estrutura ou na função do sistema nervoso. Como dito anteriormente, as principais áreas afetadas na dependência química são o CPF, o NAc, os corpos amigdalóides e o hipotálamo. Esse prejuízo pode ser reparado pelo processo de regeneração celular pela ativação de células estaminais, localizadas principalmente na camada granulosa, entretanto, uma exposição a doses elevadas de drogas de abuso pode ser responsável pela destruição de células estaminais existentes, comprometendo a neurogênese (COSTA, 2012).

A neurotoxicidade das drogas psicoestimulantes ocorre pela produção de radicais livres e do estresse oxidativo e consequentemente pela neuroinflamação e alteração das propriedades da barreira hematoencefálica permitindo a passagem de moléculas nocivas para o cérebro (COSTA, 2012). O uso de cocaína pode levar a destruição da mielina com formação de vacúolos, como descrito no presente estudo, além da associação do seu uso com lesões vasculares (BIMBATO et.al., 2015). A diminuição da recaptção leva ao aumento da concentração da dopamina circulante, que por ser neurotóxica quando em grandes quantidades, acarreta em processo neurodegenerativo (PLANETA, 2013). Associado a isso, há um aumento do glutamato

e dos receptores NMDA que apresentam toxicidade celular. Não há relatos sobre a dose específica de cocaína que desencadeie essas alterações cerebrais, visto que a maior parte dos estudos são de altas doses e/ou uso crônico, mas é importante ressaltar que, no presente estudo, em dose “recreativa” as lesões degenerativas morfológicas puderam ser observadas. Os flavonoides são apontados como moduladores de dopamina e, especificamente a quercetina, pode afetar a função endotelial e o fluxo sanguíneo periférico, por redução da peroxidação lipídica e de espécies reativas de oxigênio e da ativação de enzimas antioxidantes, induzindo a neuroproteção (BEHLING, 2004; SPENCER, 2010; DINIZ, 2015; GRALERT, 2016; BOMBARDI et al., 2018).

A análise macroscópica dos encéfalos dos animais não evidenciaram alterações (FIGURA 17).

A análise histológica do cerebelo demonstra que não há diferença entre cocaína e quercetina (FIGURA 18). Em relação ao CPF, há diferença entre controle e cocaína ($p=0,00$), cocaína e quercetina ($p=0,04$) e cocaína com quercetina associada à cocaína ($p= 0,00$) (FIGURA 20). Nota-se que o CPF no grupo quercetina associada à cocaína há diminuição da gliose, sugerindo que a quercetina pode prevenir a lesão do CPF e/ou diminuir sua progressão (FIGURA 20), corroborando com as evidências de que alimentos ricos em flavonóides previnem muitas formas de doença cerebrovascular, pelo aumento da função cerebrovascular que facilita a neurogênese do adulto na camada granulosa do hipocampo, onde, novas células estão agrupadas perto de vasos sanguíneos, os quais proliferam em resposta a fatores de crescimento vascular e podem influenciar a memória (SPENCER, 2010).

No grupo que recebeu cocaína foram vistas desde lesão responsiva representada por gliose até degeneração cerebral intensa do tipo degeneração espongiiforme (necrose de tecido cerebral). A cocaína induziu gliose no hipocampo e CPF nos animais expostos (FIGURAS 19 e 20), enquanto que em região de hipocampo, houve diferença entre os grupos cocaína e quercetina ($p=0,00$) (FIGURA 19; GRAFICO 5B).

Foi possível observar apagamento da camada granular do hipocampo (FIGURA 13), responsável pela área sensitiva, do tipo neurônio glutamatérgico excitatório e pela restauração de tecido cerebral (JOCA et al.,2003). No animal onde houve degeneração intensa do tecido cerebral o *EasyPET-3D* mostrou captação difusa sem possibilidade de localização da atividade funcional cerebral (FIGURA 21, GRÁFICO 6).

O estudo de correlação mostrou que as alterações funcionais do *EasyPET-3D* estão relacionadas às alterações morfológicas cerebral, até que em casos de lesões muito extensas há,

obviamente, decaimento da captação (GRÁFICO 6). Uma vez que a quercetina apresenta ação na função endotelial e no fluxo sanguíneo cerebral (SPENCER, 2010), seu uso pode diminuir a progressão das lesões vasculares provocadas pela cocaína, conforme observado nas análises histológicas. Do melhor do nosso conhecimento nunca tinha sido relatada alteração estrutural com uso de cocaína em dose única e baixa, anteriormente. Alertando para esta possibilidade, este resultado, entretanto, deve ter seu número de análises aumentado para determinar seu verdadeiro significado clínico, mas indica que a quercetina apresenta papel promissor de proteção cerebral para a população usuária.

No presente estudo foi observada correlação entre a captação em cerebelo e corpo amigdalóide (QUADRO 3), corroborando com o proposto por Nicastri em 2001 que aponta para a administração crônica de cocaína associada ao aumento do metabolismo regional de glicose na amígdala e no cerebelo (NICASTRI, 2001). Há escassez de estudos experimentais em animais visando o envolvimento do cerebelo em memórias associadas a drogas. Até o momento, o cerebelo não foi considerado como parte do circuito que sustenta o comportamento aditivo (CARBO-GAS et al.,2013) apesar de evidências sugerirem que a ativação cerebelar possa estar envolvida em funções relacionadas à cognição, previsão, aprendizado e memória (MORENO-RIUS, MIQUEL, 2017).

O envolvimento do cerebelo nas alterações decorrentes do uso de cocaína tem sido observado em alguns estudos, apontando para a relação com a manutenção e recuperação de memórias relacionadas às drogas, entretanto, apesar da evidência de uma maior ativação cerebelar em estudos relacionados à cocaína, esse mecanismo ainda não está bem explicado (JIMÉNEZ-RIVERA et al.,2000; ANDERSON et al.,2005; SIM et al.,2007; CARBO-GAS et al.,2013; LÓPEZ-PEDRAJAS et al.,2015; VAZQUEZ-SANROMAN et. al, 2015). O aumento da captação foi especificamente encontrado no cerebelo em animais que receberam cocaína associada à quercetina. A inibição pela quercetina da vasoconstrição arterial cerebral induzida pela cocaína, mesmo em doses relativamente baixas, pode ser uma explicação para sua captação apenas no grupo em associação.

A ação do CPF e do NAc na dependência de cocaína modulada por estímulos dopaminérgicos e glutamatérgicos está relacionada às respostas reforçadoras e adaptativas da adicção (gatilhos) (CARELLI e WONDOLOWSKI, 2003; KELLEY, 2004). O CPF é responsável pela tomada de decisões e quanto maior a exposição à droga, maior o desejo de uso. Sendo assim, estão diretamente ligadas ao condicionamento da dependência química, tal qual aos gatilhos de recaída e *craving* no uso crônico e continuado, portanto, a ausência de captação nas

regiões que correspondem a estas estruturas pode estar relacionada à exposição aguda, ou seja, sem a ação do CPF.

Isso pode relacionar-se com o fato de que uma única exposição à droga, não levaria à modulação das respostas adaptativas da adição do CPF, porém ativaria diferentes áreas cerebrais, individualmente, como o caso do cerebelo, que tem seu papel envolvido na memória e aprendizagem motoras, e do tálamo, uma das estruturas relacionadas à reorganização, modulação e distribuição de estímulos do sistema límbico, com envolvimento nas respostas emocionais elaboradas ou impulsivas, para o córtex cerebral.

5.1. Considerações Finais

O desenvolvimento de modelo de exposição aguda a cocaína é factível e permitiu avaliar alteração comportamental, prejuízos estruturais e analisar possíveis ações farmacológicas das drogas testadas, muito embora não seja capaz de avaliar fatores socioculturais, o que é uma limitação inerente aos modelos animais.

Quando comparada a resposta em testes comportamentais, tanto a cocaína quanto a quercetina demonstraram uma redução do medo e da ansiedade em uma única e primeira administração, entretanto, a associação de ambas permitiu o retorno ao comportamento normal.

Pode sugerir que a cocaína promova uma inibição de GABA na substância negra, ocasionando a ação de dopamina no núcleo accumbens e conseqüentemente, no aumento da atividade em complexo amigdalóide e assim, aumento da ansiedade, enquanto a quercetina, pela sua afinidade com o sítio benzodiazepínico, estimula GABA, regulando a liberação dopaminérgica, diminuindo a atividade do complexo amigdalóide e diminuindo a ansiedade (FIGURA 22). A diminuição de dopamina em D1 e D2 pode desativar as vias direta e indireta do circuito córtico-talâmico, promovendo a regulação da dopamina circulante. O aumento controlado de dopamina no cérebro promove bem-estar, sensação de motivação, prazer e melhora do humor, entretanto, seu aumento desregulado, como no uso de substâncias de abuso, faz com que haja excesso da substância na fenda sináptica promovendo sintomas como agitação, ansiedade, hiperatividade, insônia, alta energia e libido, estresse, ações impulsivas e agressividade. Desta forma, sua regulação reduz os sintomas de agitação e euforia, diminui o estresse oxidativo e a apoptose celular que ocorrem pela neurotoxicidade da dopamina em excesso, pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), decorrentes do metabolismo oxidativo, além de diminuir a progressão da degeneração celular.

A quercetina pode ser considerada responsável pela dessensibilização das áreas envolvidas na dependência de cocaína, pela modulação dos receptores dopaminérgicos que estão aumentados durante o uso de cocaína, o que poderia reduzir a busca pela droga e consequentemente reduzir a fissura, por atuar amenizando os efeitos da cocaína no sistema límbico, ou seja, nas áreas envolvidas no reforço do consumo.

Além da ação nos neurotransmissores, soma-se o potencial de neuroproteção da quercetina com redução ou inibição da progressão da lesão cerebral, especialmente no CPF, provocada pela cocaína, o que melhoraria na tomada de decisão e diminuiria a impulsividade. Entretanto, é importante salientar que mesmo em uma única administração de cocaína, em dose baixa, a cocaína pode gerar lesões histológicas em área relacionada ao comportamento, como o CPF, e relacionada ao centro de punição e respostas aversivas, como o hipocampo, demonstrando que não há dose segura para o uso da substância.

A avaliação das ações da cocaína no comportamento e na estrutura cerebral deve ser considerada independente da dosagem utilizada, sendo imprescindível prevenir a população de qualquer tipo de contato e, não menosprezar a exposição aguda e recreativa, uma vez que o uso, ainda que em dose pequena, pode gerar prejuízos estruturais. A quercetina, por sua vez, demonstrou ser capaz de prevenir ou diminuir a progressão de lesões corticais, gliose frontal, decorrente do uso de cocaína e determinou o retorno ao comportamento normal do animal apontando para o potencial psicofarmacológico substitutivo da quercetina na adicção a cocaína.

Mais estudos são necessários para compreender o papel da utilização aguda da cocaína na drogadição, entre outras perguntas estão: o tempo de latência para que existam respostas terapêuticas na abstinência e no *craving* com o uso da quercetina, que poderiam representar grandes avanços na terapêutica da população usuária.

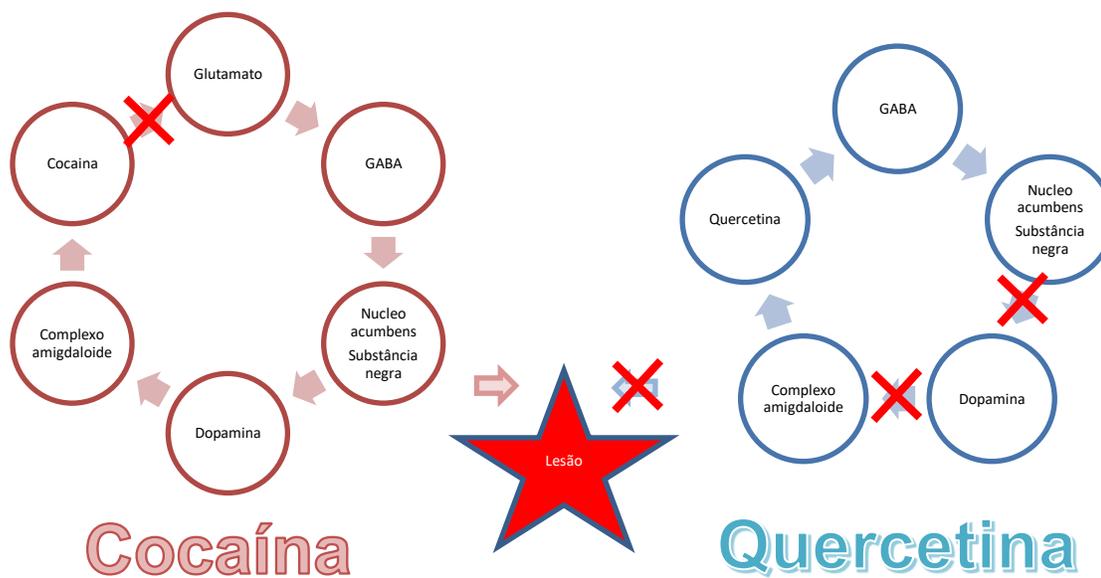


Figura 22: Mecanismo de regulação de GABA sob ação da cocaína e quercetina. A cocaína inibe GABA na substância negra, ocasionando a ação de dopamina no núcleo accumbens e consequentemente, no aumento da atividade em complexo amigdalóide e assim, aumento da ansiedade. A quercetina, pela sua afinidade com o sítio benzodiazepínico, estimula GABA, regulando a liberação dopaminérgica, diminuindo a atividade do complexo amigdalóide e diminuindo a ansiedade.

6. CONCLUSÕES

Diante dos achados do presente estudo, foi possível observar o comportamento, a região cerebral metabolicamente ativa por meio de PET, assim como as lesões estruturais encefálicas em modelo animal de exposição aguda à cocaína, à quercetina e à cocaína associada à quercetina, demonstrando que a quercetina apresenta atividade funcional reguladora, como potencial psicofármaco protetor na adicção à cocaína.

Quadro 4: Achados comparativos entre os animais dos grupos que receberam agudamente cocaína, quercetina e ambas.

	Controle	Quercetina	Cocaína	Cocaína associada à Quercetina
Atividade cerebral avaliada pelo ^{18}F -FDG-PET	Normal	Tálamo	Tálamo	Tálamo e Cerebelo
Comportamento	Normal	Desinibição no OF	Desinibição no OF	Normal
Receptores	-	Ativação de Gaba Benzodiazepínico	Dopamina (inibição da recaptação) Inibição de Gaba Aumento de glutamato	Dopamina (modulação)
Atividade	Normal	Diminuição da ansiedade e do medo O aumento da liberação de dopamina ativa o sistema de recompensa e promove uma sensação de prazer e bem-estar, reduzindo a ansiedade e o medo. As ações em Gaba e em receptor Benzodiazepínico promovem efeito calmante.	Aumento do prazer e diminuição da via de aversão A inibição da recaptção da dopamina aumenta a sua concentração ativando o sistema de recompensa. Há ainda, um aumento de glutamato promovendo ativação de tálamo. As lesões histológicas em hipocampo inibem a via de aversão, reduzindo o medo.	Normal Há um aumento da dopamina circulante com aumento da atividade talâmica. Ativação cerebelar que pode estar envolvida em funções relacionadas à cognição, previsão, aprendizado e memória. A ação antiinflamatória, antioxidante da Quercetina reduz o dano tecidual, regulando as respostas neurológicas.
Histologia	Normal	Gliose leve	Gliose intensa Vacuolização em CPF e Hipocampo	Gliose leve

7. FINANCIAMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e apoiado parcialmente por POCI-01-0145-FEDER-016855 e PTDC/BBB-IMG/4909/2014, o projeto *easyPET* CENTRO-01-0247-FEDER-017823, CENTRO2020, COMPETE, FEDER, POCI e programa FCT (Lisboa).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹⁸F- FDG: Fluorodeoxiglicose-18F [bula de medicamento]. Responsável técnico: Sibila Roberta Marques Grallert. Campinas, SP: Cyclobras Indústria Comércio e Serviços Laboratoriais Ltda.

ABDALLA, F. H. **Efeito da Quercetina na atividade de ectoenzimas e da acetilcolinesterase em sinaptossomas do córtex cerebral de ratos expostos ao cádmio**. 2012. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

ALAVI, A.; REIVICH, M. Guest editorial: The conception of FDG-PET imaging. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 32, n. 1, p. 2–5, 2002.

ALVARENGA, T. A.; ANDERSEN, M. L.; RIBEIRO, D. A.; ARAÚJO, P.; HIROTSU, C.; COSTA, J. L.; BATTISTI, M. C.; TUFIK, S. Single exposure to cocaine or ecstasy induces DNA damage in brain and other organs of mice. **Addiction Biology**, v. 15, n. 1, p. 96–99, 2010.

AMARAL, R. A.; MALBERGIER, A.; ANDRADE, A. G. Manejo do paciente com transtornos relacionados ao uso de substância psicoativa na emergência psiquiátrica. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 32, n. 2, p. S104-S111, 2013.

ANDERSON, C. M; MAAS, L.C; FREDERICK, B. D; BENDOR, J. T; SPENCER, T. J; LIVNI, E.; LUKAS, S. E; FISCHMAN A. J; MADRAS, B. K; RENSHAW, P. F; KAUFMAN, M. J. Cerebellar Vermis Involvement in Cocaine-Related Behaviors. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 6, p. 1318–1326, 2005.

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S., orgs. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002. 388 p.

ANTUNES, H. K. M.; STELLA, S. G.; SANTOS, R. F.; BUENO, O. F. A.; MELLO, M. T. Depression, anxiety and quality of life scores in seniors after an endurance exercise program. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 27, n. 4, p. 266-271, 2005.

ANVISA. **AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA**. Consulta Pública nº 94, de 6 de novembro de 2003.

ARAUJO, R. B; OLIVEIRA, M. S.; PEDROSO, R. S.; MIGUEL, A. C.; CASTRO, M. G. T. *Craving* e dependência química: conceito, avaliação e tratamento. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, Rio de Janeiro, v. 57, n. 1, p. 57-63, 2008.

ARRUDA-CARVALHO, M. ERK: uma proteína responsável pelo desejo por cocaína. **Ciências & cognição**, v. 5, n. 1, p. 95-97, 2005.

ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE PSIQUIATRIA. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**, DSM V. 5ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 992 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PSIQUIATRIA. Abuso e dependência: crack. **Revista ABP-APAL**, v. 58, n. 2, p. 138-140, 2012.

AVALLONE, R.; ZANOLI, P.; PUIA, G.; KLEINSCHNITZ, M.; SCHREIER, P.; BARALDI, M. Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, p. 1387-1394, 2000.

BAHLS, F. C., BAHLS, S. C. Cocaína: origens, passado e presente. **Interação em Psicologia**, v. 6, n. 2, p. 177-181, 2002.

BEDENDO, A.; ANDRADE, A. L. M.; NOTO, A. R. Prática esportiva e uso de substâncias entre estudantes do ensino médio: diferentes perspectivas dessa relação. **SMAD - Revista Eletrônica Saúde Mental Álcool e Drogas**, v. 11, n. 2, p. 85-96, 2015

BEHLING, E.B.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H.D.C.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Flavonoid quercetin: general aspects and biological actions. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. **Behavioural Brain Research**, v. 125, n. 1-2, p. 141–149, 2001.

BENUCK, M.; LAJTHA, A.; REITH, M. E. Pharmacokinetics of systemically administered cocaine and locomotor stimulation in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 243, n. 1, p. 144-149, 1987.

BHUTADA, P.; MUNDHADA, Y.; BANSOD, K.; UBGADE, A.; QUAZI, M.; UMATHE, S.; MUNDHADA, D. Reversal by quercetin of corticotrophin releasing factor induced anxiety- and depression-like effect in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 6, p. 955–960, 2010.

BIMBATO, E. M.; CARVALHO, A. G.; REIS, F. Toxic and metabolic encephalopathies: iconographic essay. **Radioliologia Brasileira**, v. 48, n. 2, p. 121–125, 2015.

BOMBARDI DUARTE, A. C., SANTANA, M. G., ORFALI G. C., PARISI, C. T., PRIOLLI, D. G. Literature Evidence and ARRIVE Assessment on Neuroprotective Effects of Flavonols in Neurodegenerative Diseases` Models. **CNS & Neurological Disorders Drug Targets**, v. 17, n. 1, 2018.

BONUTI, R. C. **Um estudo do comportamento social de duplas de ratos (*Rattus norvegicus*)**. 2014. 136f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2014.

BOTEGA, N. J. **Prática Psiquiátrica em Hospital Geral (Interconsulta e Emergência)**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 720p.

BUTTERWECK, V.; NAHRSTEDT, A.; EVANS, J.; HUFSEISEN, S.; RAUSER, L.; SAVAGE, J.; POPADAK, B.; ERNSBERGER, P.; ROTH, B.L. In vitro receptor screening of pure constituents of St. John's wort reveals novel interactions with a number of GPCRs. **Psychopharmacology**, v. 162, n. 2, p. 193-202, 2002.

CAMPBELL, E.L.; CHEBIB, M.; JOHNSTON, G.A. The dietary flavonoids apigenin and (-)-epigallocatechin gallate enhance the positive modulation by diazepam of the activation by GABA of recombinant GABA(A) receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n. 8, p.1631-1638, 2004

CARBO-GAS, M.; VAZQUEZ-SANROMAN, D.; AGUIRRE-MANZO, L.; CORIA-AVILA, G. A.; MANZO, J.; SANCHIS-SEGURA, C.; MIGUEL, M. Involving the cerebellum in cocaine-induced memory: pattern of cFos expression in mice trained to acquire conditioned preference for cocaine. **Addiction Biology**, v. 19, n. 1, p. 61–76, 2013.

CARLINI, E.A., NOTO, A. R., GALDUROZ, J. C. F., NAPPO, S. A. Visão histórica sobre o uso de drogas: passado e presente. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 45, n. 4, p 227-236, 1996.

CASTRO, V. L. S. S. de. **Uso de animais de experimentação e legislação correlata: orientações sobre estudos com peixes e roedores**. Embrapa Meio Ambiente (Documentos / Embrapa Meio Ambiente; 94). 2013. 27f.

CHAKRAVARTHY, B.K.; RAO, Y.V.; GAMBHIR, S.S.; GODE, K.D. Isolation of amenthoflavone from *Selaginella rupestris* and its pharmacological activity on CNS, smooth muscles and isolated frog heart preparations. **Planta Médica**, v. 43, p. 64- 70, 1981.

CHAO, J.; NESTLER, E. J. Molecular neurobiology of drug addiction. **Annual Review of Medicine**, v. 55, n. 1, p. 113-132, 2004.

CHAVES, T. V; SANCHEZ, Z. M; RIBEIRO, L. A.; NAPPO, S. A. Fissura por crack: comportamentos e estratégias de controle de usuários e ex-usuários. **Revista de Saúde Pública** [online], v. 45, n.6, p.1168-1175. 2011.

CHEIK, N.C.; REIS, I. T.; HEREDIA, R. A. G.; VENTURA, M. L.; TUFIK, S.; ANTUNES, H. K. M.; MELLO, M. T. Efeitos do exercício físico e da atividade física na depressão e ansiedade em indivíduos idosos. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 11, n. 3, p 45-52, 2003.

CHILDRESS, A. R.; MOZLEY, P. D.; MCELGIN, W.; FITZGERALD, J.; REIVICH, M. O'BRIEN, C.P. Limbic Activation During Cue-Induced Cocaine Craving. **American Journal of Psychiatry**, vol. 156, n. 1, p. 11–18, 1999.

COLEMAN, A. L. T. **Efeitos de diferentes tipos de estresse social sobre modelos animais de aprendizado, memória, ansiedade e depressão**. 2006. 195f. Dissertação (Mestrado) - UNIFESP/EPM, São Paulo, 2006.

COSTA, D.C., OLIVEIRA, J.M. A. P, BRESSAN, R. A. PET e SPECT em neurologia e psiquiatria: do básico às aplicações clínicas. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23, n. 1, p. 4-5, 2001.

COSTA, I. M. **Estudo de pré-formulação com o composto polifenólico quercetina**. 2005. 198 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

COSTA, J. B. C. **Efeitos dos psicoestimulantes na neurogênese do cérebro adulto**. 2012. 52f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2012.

CRUZ, A.P.M, LADEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. In: LADEIRA-FERNANDEZ, J.; FUKUSIMA, S. (org). **Métodos em psicopatologia**, Cap 13.; São Paulo: Manole, 2012. p. 192-217.

DARMANI, N. A.; SHADDY, J.; ELDER, E. L. Prolonged deficits in presynaptic serotonin function following withdrawal from chronic cocaine exposure as revealed by 5-HTP-induced head-twitch response in mice. **Journal of Neural Transmission**, v. 104, n. 11-12, p. 1229–1247, 1997.

DELEYE, S., WALDRON, A.-M., RICHARDSON, J. C., SCHMIDT, M., LANGOIS, X., STROOBANTS, S., & STAELENS, S. The Effects of Physiological and Methodological Determinants on ¹⁸F- FDG Mouse Brain Imaging Exemplified in a Double Transgenic Alzheimer Model. **Molecular Imaging**, v. 15, 2016.

DIEHL, A; LARANJEIRA, R. **Tratamento farmacológico da síndrome da dependência de cocaína – crack**. Porto Alegre: Artmed; revisado em 2015.

DINIZ, T. C., SILVA, J. C. ; LIMA-SARAIVA, R. S. G.; RIVEIRO F. P. R. A.; PACHECO, A. G. M.; FREITAS, R. M.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; QUINTANS, J. S. S.; MENDES, R. L.; ALMEIDA, J. R. G. S. The Role of Flavonoids on Oxidative Stress in Epilepsy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, Article ID 171756, 9f, 2015.

ELKIS, H; GATTAZ, W. F.; Algumas recomendações para estudos com placebo. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. São Paulo, v. 22, n. 4, p. 153-154, 2000.

EMCDDA. (4692). European Monitoring Centre of Drugs and Drugs addiction. **European Drugs Report**; Trend and Developments 2013.

Escritório das Nações Unidas Sobre Drogas e Crime (UNODC) - **Normas Internacionais Sobre a Prevenção do uso de Drogas**, 2015.

FAGUNDES, D.J, TAHA, M.O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirurgica Brasileira** [serial online], v. 19, n. 1, 2004.

FAN, H.R.; DU, W.F.; ZHU, T.; WU, Y.J.; LIU, Y.M.; WANG, Q.; WANG, Q.; GU, X.; SHAN, X.; DENG, S.; ZHU, T.; XU, T.L.; GE, W.H.; LI, W.G.; LI, F. Quercetin Reduces Cortical GABAergic Transmission and Alleviates MK-801-Induced Hyperactivity. **EBioMedicine**. v. 34, p. 201-213, 2018.

FELIX, R. C. M.; GOUVEA, C. M.; CARNEIRO, M. P.; MESQUITA, C. T. Tomografia computadorizada por emissão de pósitrons nas doenças cardiovasculares inflamatórias. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 27, n. 4, p. 249-259, 2014.

FERIGOLO, M., SIGNOR, L. **Cocaína**. Versão 1.0: 30/08/2007.

FLAMBÓ, D.F.A.L.P. **Atividades biológicas dos flavonoides**: Atividade antimicrobiana. p. 1-53. 2013. Disponível em: <<https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/3979/1/Projeto%20final.pdf>>. Acessado em 03 de agosto de 2018.

FOURGEAUD, L. A. MATO, S.; BOUCHET, D.; HÉMAR, A.; WORLEY, P.F.; MANZONI, O.J. Single In Vivo Exposure to Cocaine Abolishes Endocannabinoid-Mediated Long-Term Depression in the Nucleus Accumbens. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 31, p. 6939–6945, 2004.

- GAMET-PAYRASTRE, L.; MANENTI, S.; GRATACAP, M.P.; TULLIEZ, J.; CHAP, H.; PAYRASTRE, B. Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 32, n. 3, p. 279–286, 1999.
- GARAVAN, H., PANKIEWICZ, J., BLOOM, A., CHO, J. K., SPERRY, L., ROSS, T. J.; SALMERON, B. J.; RISINGER, R.; KELLEY, D.; STEIN, E. A. Cue-induced cocaine craving: Neuroanatomical specificity for drug users and drug stimuli. **American Journal of Psychiatry**, v. 157, n. 11, p. 1789-1798, 2000.
- GARCIA-MIJARES, M; SILVA, M. T. A. Dependência de drogas. **Psicologia USP** [online], v. 17, n. 4, p. 213-240, 2006.
- GARZON, E. Estado do Mal Epiléptico. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 14, n. 2, p. 7-11, 2008.
- GATTAZ, W. F. Algumas recomendações para estudos com placebo. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 22, n. 4, p. 153-154, 2000.
- GIGLIOTTI, A., MALBERGIER, A., MARQUES, A.C.P.R., MARQUES, R., ARAÚJO, M.R., ANDRADA, N.C., LARANJEIRA, R., BUZZINI, R.F., BERNARDO, W.M. **Abuso e Dependência de Cocaína**, ABP. 2016.
- GOSMANN, G.; PROVENSIL, G.; COMUNELLO, L.N. & RATES, S. M. K. Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* L. (*Passifloraceae*). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 1, p. 88-99, 2001.
- GOUTMAN J.D.; WAXEMBERG M.D.; DONATE-OLIVER F.; POMATA P.E.; CALVO D.J. Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABA(A) and GABA(C) receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 461, p. 79–87, 2003.
- GRALLERT, S. R. M. **Flavona e análogos como radioligantes para imageamento cerebral. Síntese, marcação com radioiodo e estudo in vivo frente a sítios receptores benzodiazepínicos**. 2006, 183f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - USP, São Paulo, 2006.
- GUTMAN, H.; BRUGGISSER, R.; SCHAEFFNER, W.; BOGMAN, K.; BOTOMINO, A.; CRENE, J. Transport of amentoflavone across the blood-brain barrier in vitro. **Planta Medica**, v. 68, p. 804-807, 2002
- HANDLEY, S L and MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 327, p. 1-5, 1984.
- HANRAHAN, J. R.; CHEBIB, M.; JOHNSTON, G. A. Interactions of Flavonoids with Ionotropic GABA Receptors. Diversity and Functions of GABA Receptors: A Tribute to Hanns Möhler. **Advances in Pharmacology**, v. 72, p. 189–200, 2015.
- HAQ, S. H.; ALAMRO, A. A. Neuroprotective effect of quercetin in murine cortical brain tissue cultures. **Clinical Nutrition Experimental**, v. 23, p. 89–96, 2019.
- HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. **The Flavonoids: Advances in research since 1986**. 1ª edição. London. Ed. Chapman & Hall, 1994. 676p.

HAUSEMBLAS, H.A., DOWNS, D. Exercise dependence: a systematic review. **Psychology of Sport & Exercises**, v. 3, p. 89-123, 2002.

HEARD, K, PALMER, R, ZAHNISER, N.R. Mechanisms of acute cocaine toxicity. **Open Pharmacology Journal**, v. 2, n. 9, p. 70-78, 2008.

HORTÊNCIO, R.F.H.; FEITOSA, W. G.; MACHADO, A. A. N.; ELLERY, E. H. G. **Exercícios físicos no combate a depressão: percepção dos profissionais de psicologia**. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Curso de Educação Física) - Universidade Estadual do Ceará.

INGRAM, D. K. Age-related decline in physical activity: generalization to nonhumans. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 32, n. 9, p. 1623–1629; 2000.

JIMÉNEZ-RIVERA, C. A; SEGARRA, O.; JIMÉNEZ, Z.; WATERHOUSE, B. D. Effects of intravenous cocaine administration on cerebellar Purkinje cell activity. **European Journal of Pharmacology**, v. 407, n. 1-2, p. 91–100, 2000.

JOCA, S. R. L.; PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Estresse, depressão e hipocampo. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, n. 2, p. 46–51, 2003.

JOHNSON, B.; LAMKI, L.; FANG, B.; BARRON, B.; WAGNER, R.; WELLS, L.; KENNY, P.; OVERTON, D.; DHOTHER, S.; ABRAMSON, D.; CHEN, R.; KRAMER, L. Demonstration of Dose-Dependent Global and Regional Cocaine-Induced Reductions in Brain Blood Flow Using a Novel Approach to Quantitative Single Photon Emission Computerized Tomography. **Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 5, p. 377–384, 1998.

KALE, A., PISKIN, Ö., BAS, Y., AYDIN, B. G., CAN, M., ELMAS, Ö., & BÜYÜKUYSAL, Ç. Neuroprotective effects of Quercetin on radiation-induced brain injury in rats. **Journal of radiation research**. v. 59, n. 4, p. 404–410, 2018.

KALIVAS, P. W.; VOLKOW, N. D. The neural basis of addiction: A pathology of motivation and choice. **American Journal of Psychiatry**, v. 162, n. 8, p. 1403-1413, 2005.

KANAZAWA; SALES, L. K. **Efeito da quercetina em modelos animais de mania**. Dissertação (Mestrado em farmacologia) - Universidade Federal do Paraná, 2016, 90f.

KANDEL, E. R.; MACK, S.; JESSEL, T. M.; SIEGELBAUM, S. A.; HUDSPETH, A. J. **Princípios de Neurociências**. 5. ed. McGraw Hill - Artmed, 2014. 1544p.

KAPLAN, H; SADOCK, B. **Compêndio de Psiquiatria: Ciências do comportamento e psiquiatria clínica**. Trad. Claudia Dornelles et al. 9.ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 1584p.

KARIM, N., KHAN, I., KHAN, H., AYUB, B., ABDEL-HALIM, H., GAYANDE, N. Anxiolytic Potential of Natural Flavonoids. **Journal of Steroids and Hormonal Science**, v. 1, n. 1, p. 1001, 2018.

KAUFMAN, M. J. Cocaine-Induced Cerebral Vasoconstriction Detected in Humans with Magnetic Resonance Angiography. **Journal of the American Medical Association**, v. 279, n. 5, p. 376, 1998.

KAWABATA, K.; KAWAI, Y.; TERAQ, J. Suppressive effect of quercetin on acute stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis response in Wistar rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 5, p. 374–380, 2010.

KELLEY, A. E. Ventral striatal control of appetitive motivation: Role in ingestive behavior and reward-related learning. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 8, p. 765-776, 2004.

KOŁODZIEJ, A.; LIPPERT, M.; ANGENSTEIN, F.; NEUBERT, J.; PETHE, A.; GROSSER, O.S.; AMTHAUER, H.; SCROEDER, U.H.; REYMANN, K.G.; SCHEICH, H. SPECT-imaging of activity-dependent changes in regional cerebral blood flow induced by electrical and optogenetic self-stimulation in mice. **NeuroImage**, v. 103, p. 171-80; 2014.

KOQB, G.F.; LE MOAL, M. Toxicodependência, desregulação da recompensa e alostase. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 2, p. 97-129; 2001.

LACERDA, G.F.M.L. **Ansiedade em modelos animais: Efeito de drogas nas dimensões extraídas da análise fatorial**. Dissertação (Mestrado em farmacologia) - Universidade Federal do Paraná, 2006, 74f.

LARANJEIRA, R.; DUNN, J.; ARAÚJO, M. R. **Álcool e drogas na Clínica Médica. Unidade de Pesquisa em Álcool e Drogas**, Departamento de Psiquiatria, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (EPM/UNIFESP), 2014. 65p.

LARANJEIRA, R.; RIBEIRO, M. **O tratamento do usuário de crack**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 664p.

LEITE, M. C. Abuso e dependência de cocaína: Conceitos. In: Leite MC, Andrade AG. **Cocaína e crack dos fundamentos ao tratamento**. Porto Alegre: Artmed; 1999. p.25-41.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 180-185, 1987.

LONDON, Edythe D. Cocaine-Induced Reduplication of Glucose Utilization in Human Brain. **Archives of General Psychiatry**, v. 47, n. 6, p. 567, 1990.

LÓPEZ-PEDRAJAS, R.; RAMÍREZ-LAMELAS, D. T.; MURIACH, B.; SÁNCHEZ-VILLAREJO, M. V.; INMACULADA, A.; VIDAL-GIL, L.; ROMERO, F. J.; BARCIA, J. M.; MURIACH, M. Cocaine promotes oxidative stress and microglial-macrophage activation in rat cerebellum. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, vol. 9, 2015.

LU, L.; KOYA, E.; ZHAI, H.; HOPE, B. T.; SHAHAM, Y. Role of ERK in cocaine addiction. **Trends in neurosciences**, v. 29, n. 12, p. 695-703, 2006.

LUCK, K.C.; STERN, L.; WEIGELE, M.; O'BRIEN, R.A.; SPIRST, N. Isolation and identification of "diazepam-like" compounds in bovine urine. **Journal of Natural Products**, v. 46, p. 852-861, 1983.

MA, Y. In vivo 3D digital atlas database of the adult C57BL/6J mouse brain by magnetic resonance microscopy. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 2, 2008

MAAS, L. C.; LUKAS, S. E.; KAUFMAN, M. J.; WEISS, M. D.; DANIELS, L. S.; ROGERS, V. W.; KUKES, T. J.; RENSHAW, P. F. Functional Magnetic Resonance Imaging of Human Brain Activation During Cue-Induced Cocaine Craving. **American Journal of Psychiatry**, v. 155, n. 1, p. 124–126, 1998.

MALUF, M. C. V. R. **Efeitos do tratamento com cocaína sobre parâmetros comportamentais e na expressão de CREB/pCREB e BDNF em camundongos adolescentes e adultos**. 2011. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MARDER, M.; PALADINI, A.C. GABA(A)-receptor ligands of flavonoid structure. **Current Topics on Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 8, p. 853-867, 2002.

MARTIN-GARCIA, E., COURTIN, J. DEROCHE-GAMONET, V. Seeking in the rat: optogenic evidence for a role of the prelimbic cortex. **Nature Neuroscience**. 2014. 2018.

MATHEUS, F.C. **Dissociando anedonia de outros sintomas da depressão na doença de Parkinson em um modelo experimental em ratos: papel do estriado dorsolateral e do córtex pré-frontal**. 2015. Tese (Doutorado em Farmacologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2015.

MEDINA, J.H.; PALADINI, A.C.; WOLFMAN, C.; LEVI, M.; CALVO, D.; DIAZ, L.E.; PEÑA, C. Chrysin, a naturally occurring monoflavonoid, recognizes benzodiazepine receptors and possesses anticonvulsant properties. **Biochemical Pharmacology**, v. 40, p. 2227-2232, 1990.

MENEGHELO, R. S.; ARAÚJO, C. G. S.; STEIN, R.; MASTROCOLLA, L. E.; ALBUQUERQUE, P. F.; SERRA, S. M.; III Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre teste ergométrico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 95, n. 5, supl. 1, p. 1-26, 2010.

MENEGHETTI J.C., CHALELA W.A. I Diretriz da Sociedade brasileira de cardiologia sobre cardiologia nuclear. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 78, n. 3, 2002.

MEREGE FILHO, C. A. A.; ALVES, C. R. R.; SEPÚLVEDA, C. A.; COSTA, A. S.; LANCHÁ JUNIOR, A. H.; GUALANO, B. Influência do exercício físico na cognição: uma atualização sobre mecanismos fisiológicos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 237-241, 2014.

MIELKE, G. I. **Comportamento sedentário em adultos**. Dissertação de mestrado. 149 f. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de medicina. Programa de pós-graduação em epidemiologia. 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria Nº 442 de 13 de Agosto de 2004.

MIZUMA, H., SHUKURI, M., HAYASHI, T., WATANABE, Y., ONOE, H., Establishment of in vivo brain imaging method in conscious mice. **J. Nucl. Med.** v. 51, p. 1068–1075, 2010.

MOREIRA, F. P. M.; COUTINHO, V.; MONTANHER, A. B. P.; CARO, M. S. B.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G.; MONACHE, F. D. **Flavonóides e triterpenos de Baccharis pseudotenuifolia: bioatividade sobre Artemia salina**. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 309-311, 2003.

MORENO-RIUS, J.; MIQUEL, M. The cerebellum in drug craving. **Drug and Alcohol Dependence**, vol. 173, p. 151–158, 2017.

MÜLLER, C. P.; CAREY, R. J.; WILKISZ, M.; SCHWENZNER, S.; JOCHAM, G.; HUSTON, J. P.; DE SOUZA SILVA, M. A. Acute anxiolytic effects of cocaine: The role of test latency and activity phase. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 89, n. 2, p. 218–226, 2008.

NEGRETE, J. C. Cocaine problems in the cocagrowing countries of South America. In: BOCK, G. R.; WHELAN, J., (Eds.) **Cocaine: scientific and social dimensions**. Ciba Foundation Symposium 166. Chichester: John Wiley & Sons. 1992. p. 40-49.

NEGUS, S. S.; MILLER L. L. Intracranial self-stimulation to evaluate abuse potential of drugs. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 3, p 869-917, 2014.

NICASTRI, S. Métodos de neuroimagem e abuso de substâncias psicoativas. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23, supl. 1, p. 28-31, 2001.

NICASTRI, S.; BUCHPIGUEL, C. A.; ANDRADE, A. G. Anormalidades de fluxo sanguíneo cerebral em indivíduos dependentes de cocaína. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 22, n. 2, p. 42-50, 2000.

NIELSEN, M.; FROKJAER, S.; BRAESTRUP. C. High affinity of naturally-occurring biflavonoid, amentoflavone, to brain benzodiazepine receptor in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, p. 3285-3287, 1988.

NOBREGA, A. C. L. The subacute effects of exercise: concept, characteristics, and clinical implications. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 33, n. 2, p. 84-7, 2005.

NUNES, E. A., HALLAK, J. E. C. Modelos animais em psiquiatria: avanços e desafios. **Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental**, v. 17, n. 3, p. 528-543, 2014.

OBSERVATÓRIO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS (OBID). Álcool. **SENAD – Secretaria Nacional de Políticas sobre drogas**.

OLIVEIRA, D. A. **O Labirinto em Cruz Elevado como Modelo de Adicção Animal: Efeito Comportamental do Pareamento de Morfina com os Braços Abertos**. 2012. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Psicologia, Universidade de Brasília, Brasília. 54f.

OLIVEIRA, M. F. De; ALVES, J. Q.; ANDRADE, J. F. De; SACZK, A. A.; OKUMURA, L. L. Análise do teor de cocaína em amostras apreendidas pela polícia utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Vis. **Eclética Química**, v. 34, n. 3, p. 77–83, 2009.

Organização Mundial da Saúde (OMS). **Global recommendations on physical activity for health**. Genebra, 2010.

PATE, R.P.; DURSTINE, J.L. Exercise physiology and its role in the clinical sports medicine. **Southern Medical Journal**, v. 97, n. 9, p. 881-5, 2004.

PAVLOV, I.P. Resposta de um fisiologista aos psicólogos. 1932 in: ALVAREZ, Antonio C. (org.) **Textos de Ivan Pavlov, fisiologia e psicologia**. Lisboa, Estudos Cor, 1976

PEARLSON, G. D.; JEFFREY, 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. **American Journal of Psychiatry**, v. 150, n. 3, p. 495-497, 1993.

PEREGRINO, A. A. F.; COELHO, C.D.; VIANNA, C.M.M.; COELI, C.M.; VIANNA, D.; WERNECK, G.L.; MAGALHÃES, R.E.A.; CAETANO, R. Avaliação Tecnológica da Tomografia de Emissão de Pósitrons (PET): Revisão Sistemática e Proposta de Estudo. Relatório 1: Síntese das Avaliações Tecnológicas sobre PET realizadas por **Agências Internacionais de ATS na área de Oncologia**, 2004.

PETERS, S. K.; DUNLOP, K.; DOWNAR, J. Cortico-Striatal-Thalamic Loop Circuits of the Salience Network: A Central Pathway in Psychiatric Disease and Treatment. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 10, 2016.

PLANETA, C.S.; LEPSCH, L. B.; ALVES, R.; SCAVONE, C. Influence of the dopaminergic system, CREB, and transcription factor- κ B on cocaine neurotoxicity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, n. 11, p. 909-915, 2013.

POWERS, S. K.; HOWLEY, E. T. **Fisiologia do Exercício: Teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho**. 1. ed. São Paulo: Manole, p. 74-75; 2000.

PROVENSÍ, G. **Investigação da atividade ansiolítica de passiflora alata curtis (passifloraceae)**. 2007. 153f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007.

RAMOS, A.; BERTON, O., PIERRE, M.; CHAUOFF, F. A multiple-test study of anxiety-related behaviors in six inbred rat strains. **Behavioural Brain Research**, v. 85, n. 1, p. 57-69, 1997.

RAMOS, A.; MORMED, P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 22, n. 1, p. 33–57, 1997

RAVAGNANI, C. F. C.; MELO, F. C. L.; BURINI, F. H. P.; BURINI, R. C. Estimativa do equivalente metabólico (MET) de um protocolo de exercícios físicos baseada na calorimetria indireta. **Revista Brasileira de Medicina e Esporte**, v. 19, n. 2, p. 134-138, 2013.

REAL, C. C., **Efeitos do Exercício Físico sobre a expressão de receptores de glutamato no encéfalo de ratos**, Dissertação (Mestrado de Ciências), USP, São Paulo, 2009. 119f.

RIBAS, G. C. As bases neuroanatômicas do comportamento: histórico e contribuições recentes. **Ver. Bras. Psiq.**, v. 29, n. 1, p. 63–71, 2007

RIBEIRO, F.M.; SILVA, A. L. M.; CORREIA, P. M. M.; ENCARNAÇÃO, P. M. C. C.; SANTOS, A. C.; RAMOS, C.; FERREIRA, N. C.; SÁ, D. A.; PRIOLLI, D. G.; NICOLUCCI, C.; VELOSO, J. F. C. A. Assessment of easyPet for 18 F-FDG neurological studies in mice. **IEEE Nuclear Science Symposium and Medical Imaging Conference, Sidney**, 2018.

RIBEIRO, M., LARANJEIRA, R., DUNN, J. Cocaína: bases biológicas da administração, abstinência e tratamento. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 47, n. 10, p. 497-511, 1998.

RIBEIRO, M.; LARANJEIRA, R.; CIVIDANES, G. Transtorno bipolar do humor e uso indevido de substâncias psicoativas. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 32, supl. 1, p. 78-88, 2005.

ROCHA, B. A., FUMAGALLI, F., GAINETDINOV, R. R., JONES, S. R., ATOR, R., GIROS, B.; CARON, M. G. Cocaine self-administration in dopamine-transporter knockout mice. **Nature Neuroscience**, v. 1, n. 2, p. 132–137, 1998.

RUDOLPH, U., MÖHLER, H. GABAA Receptor Subtypes: Therapeutic Potential in Down Syndrome, Affective Disorders, Schizophrenia, and Autism. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 54, p. 483-507, 2014.

RUIZ CONTRERAS, A. E.; DÍAZ, M. M.; GÓMEZ, B. P.; ROMANO, A.; CAYNAS, S.; GARCÍA, O. P. El cerebro, las drogas y los genes. **Salud Mental**, v. 33, n. 6, p. 535-542, 2010.

RUSSO, D.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; FERNANDEZ, E. C.; MILELLA, L. Evaluation of Antioxidant, Antidiabetic and Anticholinesterase Activities of *Smallanthus sonchifolius* Landraces and Correlation with Their Phytochemical Profiles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 8, p. 17696–17718, 2015.

SALGUEIRO, J. B.; ARDENGHI, P.; DIAS, M.; FERREIRA, C.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Anxiolytic natural and syntetic flavonoid ligands of the central benzodiazepine receptor have no effect on memory tasks in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 58, n. 4, p. 887-891, 1997.

SAMAD, N.; SALEEM, A.; YASMIN, F.; SHEZHAD, M. A. Quercetin protects against stress-induced anxiety- and depression-like behavior and improves memory in male mice. **Physiological research**, v. 67, p. 795-808, 2018.

SAMPEDRO-PIQUERO, P.; BEGEGA, A. ¿Previene la actividad física y mental el deterioro cognitivo?: evidencia de la investigación animal. **Escritos de Psicología**, Málaga, v. 6, n. 3, p. 5-13, 2013 .

SCALZO, L.; TEIXEIRA-JÚNIOR, A. L. Participação dos núcleos da base no controle do tônus e da locomoção. **Fisioter. Mov.**, v. 22, n. 4, p. 595-603, 2009.

SCHIMIDT, K. C. **Exercício físico, humor e bem-estar na percepção de dependentes químicos em tratamento**. Dissertação (Mestrado em Educação Física) - Universidade Federal de Santa Catarina. 2007. Santa Catarina.

SEAMANS, J. K., & YANG, C. R. The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. **Prog. Neurobiol.**, v. 74, n. 1, p. 1-58, 2004.

SHUSTER, L., YU, G. e BATES, A. Sensitization to cocaine stimulation in mice. **Psychopharmacology**. v. 52, p. 185-190, 1977.

SILVA, M.C., DEUS, A. **Comportamento sedentário e sedentarismo: percepção de alunos concluintes do curso de Educação Física de uma Faculdade Particular da cidade de Maceió-AL**. 2017. 13f. Trabalho de Conclusão de Curso (bacharelado em Educação Física) - Faculdade Estácio de Alagoas , Maceió, AL.

SILVA, V. A. P.; BOTTARO, M.; JUSTINO, M. A.; RIBEIRO, M. M.; LIMA, R. M.; OLIVEIRA, R. J. Maximum heart rate in Brazilian elderly women: comparing measured and predicted values. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, n. 3, p. 283-288, 2007.

SILVEIRA, D. X.; DOERING-SILVEIRA, E. B. **Padrão de uso de drogas: Eixo, políticas e fundamentos**, 2016. 25p.

SILVEIRA, D. X.; FERANDES, M.; BARBIERI, A.; LABIGALINI, E.; SILVEIRA, E. D. Fatores associados à perfusão cerebral anormal em dependentes de cocaína. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 9-14, 2001.

SIM, M. E.; LYOO, I.K.; STREETER, C. C.; COVEL, J.; SARID-SEGAL, O.; CIRAULO, D. A.; KIM, M. J.; KAUFMAN, M. J.; YURGELUN-TODD, D. A.; RENSHAW, P. F. Cerebellar Gray Matter Volume Correlates with Duration of Cocaine Use in Cocaine-Dependent Subjects. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 10, p. 2229–2237, 2007.

SOFUOGLU, M.; KOSTEN, T. R. Emerging pharmacological strategies in the fight against cocaine addiction. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 11, n. 1, p. 91-98, 2006.

SORDI, A. O. **Trauma, resiliência e dependência química: um estudo sobre seus aspectos clínicos e biológicos em uma amostra de usuários de crack**. 2015. 89f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015.

SOUSA, R. F.; OLIVEIRA, Y. R. and CALOU, I. B. F. Ansiedade: aspectos gerais e tratamento com enfoque nas plantas com potencial ansiolítico. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, vol. 11, no. 1, 2018.

SPENCER, J. The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. 3, p. S40-S47, 2010.

UNGLESS, M. A.; WHISTLER, J.L.; MALENKA, R.C.; BONCI, A. Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. **Nature**, v. 411, n. 6837, p. 583–587, 2001.

UNODC. World Drug Report 2015. United Nations publication, Sales No. E.15.XI.6. Viena, 2015.

VACANTI, L. J.; SESPEDES, L. B. H.; SARPI, M. O. Teste ergométrico em indivíduos muito idosos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 82, n. 2, p. 147-50, 2004.

VÁLLEZ, G. D.; CASTEELS, C.; SCHWARTZ, A. J.; DIERCKX, R. A. J. O.; KOOLE, M.; DOORDUIN, J. A Standardized Method for the Construction of Tracer Specific PET and SPECT Rat Brain Templates: Validation and Implementation of a Toolbox. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, 2015.

VAZQUEZ-SANROMAN, D.; LETO, K.; CEREZO-GARCIA, M.; CARBO-GAS, M.; SANCHIS-SEGURA, C.; CARULLI, D.; ROSSI, F.; MIQUEL, M. The cerebellum on cocaine: plasticity and metaplasticity. **Addiction Biology**, v. 20, n. 5, p. 941–955, 2015.

VERSTRAETE, A. G. Detection Times of Drugs of Abuse in Blood, Urine, and Oral Fluid. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 26, n. 2, p. 200–205, 2004.

VIOLA, H.; WASOWSKI, C.; LEVI DE STEIN, M.; WOLFMAN, C.; SILVEIRA, R.; DAJAS, F.; MEDINA J.H.; PALADINI, A.C. Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. **Planta Medica**, v. 61, p. 213-216, 1994.

VOCCI, F.J, ELKASHEF, A. Pharmacotherapy and other treatments for cocaine abuse and Dependence. **Current opinion in Psychiatry**, v. 18, n. 3, p. 265-270, 2005.

VOLKOW, N. D.; FOWLER, J. S.; WOLF, A. P.; HITZEMANN, R.; DEWEY, S.; BENDRIEM, B.; ALPERT, R.; HOFF, A. Changes in brain glucose metabolism in cocaine dependence and withdrawal. **American Journal of Psychiatry**, v. 148, n. 5, p. 621-626, 1991.

VOLKOW, N. D.; WANG, G. J.; FISCHMAN, M. W.; FOLTIN, R. W.; FOWLER, J. S.; ABUMRAD, N. N.; VITKUN, S.; LOGAN, J.; GATLEY, S. J.; PAPPAS, N.; HITZERMANN, R.; SHEA, C. E. Relationship between subjective effects of cocaine and dopamine transporter occupancy. **Nature**. v. 386, n. 6627, p. 827–830, 1997.

- WALLACE, E. A.; WISNIEWSKI, G.; ZUBAL, G.; VANDYCK, C. H.; PFAU, S. E.; SMITH, E. O.; ROSEN, M. I.; SULLIVAN, M. C.; WOODS, S. W.; KOSTEN, T. R. Acute cocaine effects on absolute cerebral blood flow. **Psychopharmacology**, vol. 128, no. 1, p. 17–20, 1996.
- WELCH, M.; MINGARELLI, M.; RIEDEL, G.; PLATT, B. Mapping changes in mouse brain metabolism with PET/CT, **Journal of Nuclear Medicine**, v. 54, p. 1946–1953, 2013.
- WOLFMAN, C.; VIOLA, H.; PALADINI, A.C.; DAJAS, F.; MEDINA, J.H. A. Possible anxiolytic effects of chrysin, a central benzodiazepine receptor ligand isolated from *Passiflora coerulea*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 47, p. 1-4, 1994.
- YANG, L.L.; XIAO, N.; LI, X. W.; FAN, Y.; ALOLGA, R. N.; SUN, X. Y.; WANG, S. L.; LI, P.; QI, L. W. Pharmacokinetic comparison between quercetin and quercetin 3-O- β -glucuronide in rats by UHPLC-MS/MS. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 2016.
- ZANOLI, P.; AVALLONE, R.; BARALDI, M. Behavioural characterization of the flavonoids apigenin and chrysin. **Fitoterapia**, v. 71, p. 5117-5123, 2000
- ZAPARTE, A. **Análise do perfil oxidativo de usuárias de crack em processo de desintoxicação**. 2014. 59f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2014.
- ZHANG, Y, MANTSCH, J.R, SCHULSSMAN, S.D, HO, A, KREEK, M.J. Conditioned place preference after single doses or “binge” cocaine in C57BL/6J and 129/J mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, n. 73, p. 655–662, 2002.
- ZUANAZZII, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 5 ed., 9., 2003, p.577-615.

9. ANEXO 1 – Certificado de aprovação CEUA:


FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

COMISSÃO DE ÉTICA DA FMUC

Of. Refª **3-CE-2011**
 Data 9/2/2011

c/c à Exma. Senhora Prof. Doutora Maria Filomena Botelho Exmo Senhor
 c/c à Exma. Senhora Denise Gonçalves Prioli Prof. Doutor Manuel Santos Rosa
 Director da Faculdade de Medicina de
 Universidade de Coimbra

Assunto: Pedido de parecer à Comissão de Ética - Projecto de Investigação autónomo.

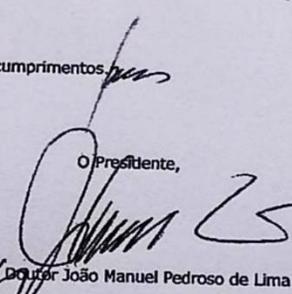
Investigador(a) Principal: Maria Filomena Rabaça Roque Botelho
Co-Investigador(es): Denise Gonçalves Prioli

Título do Projecto: *"Modelos de Xenoinxerto de Adenocarcinoma Colo-rectal e e boca em Ratos atímicos. Comparação entre Implantação ortotópica, heterotópica de Células em subcutâneo e língua, subcutâneo, Ceco e Cólon Distal".*

A Comissão de Ética da Faculdade de Medicina, após análise do projecto de investigação supra identificado, decidiu emitir o parecer que a seguir se transcreve:

A Comissão de Ética da Faculdade de Medicina, após análise do projecto de investigação supra identificado, decidiu emitir o parecer que a seguir se transcreve: **"Parecer Favorável"**.

Queira aceitar os meus melhores cumprimentos.


 O Presidente,
 Prof. Doutor João Manuel Pedroso de Lima

GC

SERVIÇOS TÉCNICOS DE APOIO À GESTÃO - STAG - COMISSÃO DE ÉTICA
 Rua Larga - 3004-504 Coimbra - Portugal - Tel. +351 239 657 7966 - Fax +351 239 623 236 - www.fmed.ucp