

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**EFEITOS AGUDOS E REPETIDOS DA COCAÍNA EM
RATAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES HORMONAIAS:
ESTUDO DOS MECANISMOS INIBITÓRIOS E TÓXICOS
NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

Autor:

MSc. Marilise Fraga de Souza

Orientadora:

Dra. Helena Maria Tannhauser Barros

Co-orientadora:

Dra. Rosane Gomez

Tese de Doutorado

Biblioteca Paulo Lacerda de Azevedo

2013

Área de concentração: Farmacologia e Toxicologia

Marilise Fraga de Souza

Efeitos agudos e repetidos da cocaína em ratas em diferentes condições hormonais: estudo dos mecanismos inibitórios e tóxicos no Sistema Nervoso Central

Tese defendida no Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientadora:

Dra. Helena Maria Tannhauser Barros

Co-orientadora:

Dra. Rosane Gomez

UFCSPA
Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

2013

Área de concentração: Farmacologia e Toxicologia

Dedico esta Tese aos meus pais, Antônio Carlos Cypriano de Souza e Marlí Rejane Fraga de Souza, que me ensinaram que a educação é a forma mais gratificante e sóbria de se alcançar os objetivos e que foram os grandes responsáveis por mais este passo. Estas duas pessoas, com muita sabedoria e dedicação, estiveram ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Obrigada por serem meus pais, profissionais corretos e competentes, fonte de inspiração, apoio e ensino diário.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu marido, Jeferson E. da Silveira, agradeço por todo amor, carinho, paciência e compreensão em todos estes anos. Obrigada por estar ao meu lado, me apoiando desde o início da minha formação, compreendendo minhas ausências e me incentivando a alcançar meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Helena Maria Tannhauser Barros, minha orientadora, por toda sabedoria compartilhada. Obrigada por ter sido minha mãe intelectual, que me acompanhou e me incentivou nesta longa caminhada. Agradeço pela confiança e por ter apostado em mim e acreditado na minha capacidade.

À Profa. Dra. Rosane Gomez, minha co-orientadora, pela imensa colaboração, interesse e preocupação. Por ter sido, antes de tudo, uma amiga. Por ter estado ao meu lado em todos os momentos, sendo exemplo de mulher e de pesquisadora.

Às minhas irmãs e irmão por estarem sempre ao meu lado, em todos os momentos, torcendo por mim.

Aos meus sobrinhos e sobrinhas simplesmente por existirem e fazerem a minha vida mais feliz.

Aos meus amados avós, que onde quer que estejam, tenho a certeza de que olharam por mim todo este tempo.

À minha grande família (tios, primos, sogros, cunhados) pelos momentos prazerosos e por me ensinarem o valor da família.

Às colegas do laboratório Luana Freese, Greice Caletti, Kelly Martins, Priscila Costa, Laísa Umpierrez e Natividade Pereira por terem colaborado para que esta jornada fosse menos árdua e muito mais agradável. É indescritível o orgulho de fazer parte deste grupo.

Aos amigos Maurício Nin e Paulo Lopes pela colaboração em diversas etapas de elaboração desta tese.

Aos nossos incansáveis bolsistas, que colaboraram imensamente para que este trabalho pudesse ser realizado, representados aqui pelo Tierre Gonçales, Thiago Bastos de Melo, Christine Tosca, Thabata De Los Santos, Marina Gelain e Yasmin Boita.

Às bolsistas de pós-doutorado Dinara Moura (agora docente da UFCSPA) e Valéria Peres pela imensa contribuição no desenvolvimento das técnicas deste trabalho.

À professora Marisa Tsao pela disponibilização dos equipamentos da Central Analítica da UFCSPA e especialmente à técnica de laboratório Gabriela Cury pela colaboração na análise das amostras.

A todos os amigos, funcionários, professores e colaboradores da UFCSPA, que acompanharam o meu trajeto dentro desta Universidade. Em especial, à minha grande amiga, a farmacêutica Leticia Maya, ao bioterista Mário Serapião e ao técnico de laboratório Felipe Grillo por toda ajuda.

Aos amigos, colegas e pacientes do Hospital Psiquiátrico São Pedro pela compreensão e pelo apoio.

A todos vocês, muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
RESUMO	14
ABSTRACT	16
PARTE I - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	18
I.1 INTRODUÇÃO	19
I.1.1 Histórico e Epidemiologia do Uso de Cocaína.....	19
I.1.2 Mecanismo de ação da cocaína.....	20
I.1.3 Efeitos agudos da cocaína.....	22
I.1.3.1 Neurotoxicidade da cocaína.....	23
I.1.4 Dependência, Tolerância e Sensibilização à Cocaína.	25
I.1.4.1 Dependência.....	25
I.1.4.2 Tolerância.....	27
I.1.4.3 Sensibilização.....	28
I.1.4.4 Vias neurais envolvidas na dependência e sensibilização à cocaína.....	31
I.1.5 Influência dos hormônios sexuais femininos nos efeitos da cocaína.....	33
I.1.5.1 Diferença entre os sexos nos efeitos da cocaína.....	34
I.1.5.2 Avaliação do ciclo hormonal nos efeitos da cocaína.....	35
I.1.5.3 Avaliação da reposição hormonal nos efeitos da cocaína.....	36
I.1.5.4 Neurotoxicidade dos hormônios sexuais femininos.....	37
I.1.6 Mecanismos inibitórios cerebrais na sensibilização comportamental à cocaína.....	38
I.1.6.1 Ácido Gama Aminobutírico (GABA).....	39
I.1.6.1.1 GABA e Cocaína.....	41
I.1.6.1.2 GABA e os hormônios sexuais femininos.....	46
I.1.6.1.3 Precusores do GABA e Cocaína.....	47
I.1.6.2 Taurina.....	49
I.1.6.2.1 Taurina e cocaína.....	50
I.2. JUSTIFICATIVA	51
I.3. OBJETIVOS	42
I.3.1. Objetivo Geral.....	43

I.3.2 Objetivos Específicos.....	43
PARTE II - ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	53
Capítulo I – Efeitos modulatórios do estrógeno e da progesterona endógenos ou exógenos na sensibilização comportamental induzida por cocaína em ratas.....	54
Capítulo II – Efeitos dos hormônios sexuais femininos sobre danos no DNA em diferentes áreas cerebrais após o tratamento agudo ou repetido com cocaína.....	81
Capítulo III – Efeitos da administração aguda e repetida de cocaína nos níveis extracelulares de GABA e seus precursores no CPFm de ratas sob diferentes condições hormonais.....	96
Capítulo IV – Efeitos administração aguda e repetida de cocaína nos níveis extracelulares de taurina no CPFm de ratas sob diferentes condições hormonais.....	124
PARTE III – CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS.....	133
III.1 CONCLUSÕES.....	134
III.2 PERSPECTIVAS.....	139
REFERÊNCIAS.....	140
ANEXO A: Parecer de aprovação dos experimentos pelo comitê de ética animal da UFCSPA.....	159
ANEXO B: Carta de aprovação da revista Brazilian Journal of Medical and Biological Research.....	161
ANEXO C: Carta de aprovação parcial da revista Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.....	162

LISTA DE FIGURAS

PARTE I

Figura 1. Esquema representativo do mecanismo de ação da cocaína no SNC.....	22
Figura 2. Desvios em uma curva dose-resposta com tolerância e sensibilização.....	28
Figura 3. Topografia das neurotransmissões associadas com a sensibilização comportamental.....	33
Figura 4. Representação esquemática do cérebro de rato e alterações de GAD ₆₅ e GAD ₆₇	44

PARTE II

Capítulo I

Figure 1. Schematic time-line representation of experimental design.....	78
Figure 2. The locomotor activity of female rats over the 30 minutes following administration of saline (control) or cocaine to acute or repeated-cocaine-exposure rats on the challenge treatment day, according to the different hormonal conditions.....	78
Figure 3. The stereotypic behaviors of female rats over the 30 minutes following administration of saline (control) or cocaine to acute or repeated-cocaine-exposure rats on the challenge treatment day, according to the different hormonal conditions.....	79
Figure 4. Behaviors of the SHAM female rats according to the estral cycle phases and to the cocaine treatment. A. Total locomotion counts. B. Sum of the stereotypy scores...	80
Figure 5. Correlation between locomotion counts or stereotypy scores and the time block (10, 20 or 30 min) after the challenge cocaine injection in repeat-treated female rats.....	80

Capítulo II

Figure 1. Comet assay representation	93
Figure 2. Damage index (DI) according cocaine treatment and hormonal condition on different brain areas of female rats.....	94
Figure 3. Quantification of DNA damage index by comet assay under alkaline conditions in HYPc from OVX rats in CTR (A) and ACT (B) groups.....	94
Figure 4. Damage index is reported as the percent change relative to CTR on cocaine-treated rats according to hormonal condition (OVX or SHAM) in different brain areas.	95

CAPÍTULO III

Figure 1. Schematic time-line of procedures.....	122
---	-----

Figure 2. Locomotion counts on the challenge day before or after cocaine 15 mg/kg of female rats under different hormonal conditions.....	122
Figure 3. Extracellular GABA concentration (ng/mL) in the medial prefrontal cortex (mPFC) of female rats under different hormonal condition on the cocaine challenge day.....	122
Figure 4. Extracellular GABA levels (% from baseline) in the medial prefrontal cortex (mPFC) on the cocaine challenge day of female rats under different hormonal conditions.....	123
Figure 5. Extracellular glutamate concentration ($\mu\text{g/mL}$) in the medial prefrontal cortex (mPFC) of female rats under different hormonal condition on the cocaine challenge day.....	123
Figure 6. Extracellular glutamate levels (% from baseline) in the medial prefrontal cortex (mPFC) on the cocaine challenge day of female rats under different hormonal conditions.....	123
CAPÍTULO IV	
Figure 1. Total extracellular taurine levels ($\mu\text{g/mL}$) in the medial prefrontal cortex (mPFC) of female rats under different hormonal condition on the cocaine challenge day.....	132
Figure 2. Extracellular taurine levels ($\mu\text{g/mL}$) in the medial prefrontal cortex (mPFC) over time on the cocaine challenge day of female rats under different hormonal conditions cross the time: A. SHAM and B. Ovariectomized (OVX).....	132
PARTE III	
III.1 CONCLUSÕES	
Figura 5. Esquema representativo das principais conclusões da tese.....	138

LISTA DE TABELAS**PARTE II****Capítulo I**

Table 1. Rating stereotypy scale..... 77

Table 2. Hormonal concentrations according to sex-hormone-treated group on the last experimental day and number of animals according estral cycle phase in SHAM rats... 77

Capítulo II

Table 1. Estrogen and progesterone levels according to cocaine treatment and hormonal condition 93

PARTE III**III.1 CONCLUSÕES**

Tabela 1. Resumo dos principais resultados dos artigos..... 137

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABL	Amígdala basolateral
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazol-4-propiónico
ATV	Área Tegmentar Ventral
Cpf	Córtex Pré-Frontal
CPFm	Córtex Pré-Frontal Medial
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSM	Manual de Diagnósticos e Estatísticas de Distúrbios Mentais
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
GABA_A	Receptor GABA tipo A
GABA_B	Receptor GABA tipo B
GABA_C	Receptor GABA tipo C
GAD	Ácido Glutâmico Descarboxilase
HIPc	Hipocampo
HIPt	Hipotálamo
GLU	Glutamato
Gln	Glutamina
K⁺	Íon Potássio
Ca²⁺	Íon Cálcio
Cl⁻	Íon Cloreto
NA	Noradrenalina
NAc	Núcleo <i>accumbens</i>

NPV	Núcleo paraventricular
ONU	Organização das Nações Unidas
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA_m	Ácido Ribonucléico Mensageiro
SNC	Sistema Nervoso Central
STR	Estriado
TLD	Tegumento laterodorsal
VP	Ventral <i>pallidum</i>
5HT	Serotonina

RESUMO

A sensibilização comportamental à cocaína consiste no aumento da resposta após uso repetido intermitente da substância, e tem sido apontada como um dos principais fatores que aumentam o risco do desenvolvimento da dependência. Indivíduos do sexo feminino têm mostrado efeitos mais intensos em resposta ao uso de psicoestimulantes do que os do sexo masculino, influenciados por diferenças hormonais. Além da neurotoxicidade induzida por sua ação nos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico (excitatórios), a cocaína influencia a atividade dos sistemas inibitórios cerebrais (GABA e taurina), que se contrapõe aos sistemas acima. Objetivamos, portanto, verificar a influência dos hormônios femininos na neurotoxicidade da cocaína e nas adaptações dos sistemas inibitórios cerebrais, secundárias ao uso deste psicoestimulante em fêmeas. Para tanto, foram utilizadas ratas intactas hormonalmente ou ratas ovariectomizadas, recebendo reposição hormonal (progesterona e/ou estradiol) ou não. Estas foram sensibilizadas com doses repetidas de cocaína e seu comportamento (atividade locomotora e estereotipias) foi monitorado. Para avaliar a influência dos hormônios na neurotoxicidade da cocaína, foi realizado Teste Cometa em diferentes regiões cerebrais, para verificar lesão de DNA na célula neuronal. Para verificar a influência destes hormônios nos níveis extracelulares de GABA (e seus precursores, glutamato e glutamina) e de taurina no córtex pré-frontal medial, os animais foram submetidos a sessões de microdiálise após realização de cirurgia estereotáxica. Os resultados de comportamento indicaram apenas as fêmeas com presença endógena de estradiol e progesterona desenvolveram tanto sensibilização locomotora quanto estereotipia. Já a reposição de estradiol aumentou os comportamentos estereotipados após desafio à cocaína, enquanto as ratas que receberam reposição de progesterona, associada ou não ao estradiol, apresentaram menor escore de estereotipia após cocaína repetida. Tanto a

exposição aguda quanto a sensibilização à cocaína induziram dano no DNA em diferentes regiões cerebrais das ratas, exceto no hipotálamo, onde o dano foi comparado ao das ratas que não receberam cocaína. A presença endógena de estrógeno e progesterona diminuiu o dano provocado pela administração de cocaína em todas as regiões cerebrais, mostrando que uma maior sensibilização em fêmeas pode estar relacionada ao desenvolvimento de neuroplasticidade nas regiões avaliadas. Os níveis extracelulares de GABA, de seus precursores e de taurina também sofreram alteração após exposição à cocaína. A administração aguda deste psicoestimulante aumentou os níveis de GABA, glutamato e taurina e diminuiu os níveis de glutamina no CPFm, de forma diferente se for considerada a condição hormonal. Já a sensibilização à cocaína provocou menor alteração nos níveis de GABA e de taurina e consequente aumento nos níveis de glutamato no CPFm das ratas com presença hormonal endógena. Estes resultados sugerem que uma maior sensibilização à cocaína em fêmeas pode estar relacionada a uma hipofuncionalidade dos sistemas inibitórios cerebrais decorrentes da presença endógena dos hormônios sexuais femininos. Portanto, a sensibilização à cocaína em fêmeas com presença hormonal (principalmente o estrógeno) está relacionada ao desenvolvimento de neuroplasticidade e a uma menor atividade dos sistemas inibitórios cerebrais, com consequente aumento na atividade excitatória no CPFm, uma das regiões cerebrais mais importantes no desenvolvimento da adição.

Palavras-chave: cocaína, sensibilização, neurotoxicidade, GABA, taurina, estrógeno, progesterona, fêmeas.

ABSTRACT

Behavioral sensitization to cocaine is an increased response after repeated intermittent use of the substance, and has been identified as one of the main factors that increase the risk of developing addiction. Females have shown higher effects in response to psychostimulant use than males, influenced by hormonal differences. In addition to the induction of dopaminergic and glutamatergic (excitatory) neurotoxicity, cocaine influences the activity of brain systems inhibitory (GABA and taurine), which is opposite to the above systems. We aim therefore to investigate the influence of female hormones on cocaine neurotoxicity and in brain adaptations, secondary to this psychostimulant use in inhibitory systems of female rats. In this sense, we used hormonally intact rats or ovariectomized rats receiving hormone replacement therapy (progesterone and/or estrogen) or not. These were sensitized with repeated doses of cocaine and its behavior (locomotor activity and stereotypies) was monitored. To evaluate the influence of hormones on the neurotoxicity of cocaine, Comet Assay was performed in different brain areas, to verify DNA damage in neuronal cell. To check the influence of these hormones in extracellular levels of GABA (and its precursors, glutamate and glutamine) and taurine in the medial prefrontal cortex (mPFC), the animals were subjected to microdialysis session after performing stereotactic surgery. The behavior results indicated that only females with endogenous presence of both estrogen and progesterone developed sensitization by hyperlocomotion and stereotypy. The estradiol replacement increased stereotypic behaviors after cocaine challenge, while the rats that received progesterone replacement, associated or not with estradiol, had lower scores of stereotypy after repeated cocaine. Both acute exposure and sensitization to cocaine induced DNA damage in different brain areas of female rats, except in the hypothalamus, where the damage was compared to the rats that did not receive cocaine.

The presence of endogenous estrogen and progesterone decreased the damage caused by the administration of cocaine in all brain areas, showing that greater sensitization in females may be associated to neuroplasticity development in the evaluated areas. Extracellular levels of GABA, its precursors and taurine also been changed after cocaine exposure. Acute administration of cocaine increased levels of GABA, glutamate and taurine and decreased glutamine levels in mPFC, differently according with the hormonal condition. Already cocaine sensitization caused less change in the levels of GABA and taurine and subsequent increased levels of glutamate in the mPFC of rats with endogenous hormonal presence. These results suggest that greater sensitization to cocaine in females may be related to a hypofunction of brain inhibitory systems resulting from the presence of endogenous female sex hormones. Therefore, sensitization to cocaine in females with hormonal presence (especially the estrogen) is related to the neuroplasticity development and a lower inhibitory activity of brain systems, with a consequent increase in excitatory activity in the mPFC, one of the most important brain areas involved in the drug addiction.

Keywords: cocaine sensitization, neurotoxicity, GABA, taurine, estrogen, progesterone, female.

PARTE I

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

I.1 INTRODUÇÃO

I.1.1 Histórico e Epidemiologia do Uso de Cocaína

A cocaína (benzoilmetilecgonina) é um alcalóide tropano extraído das folhas do arbusto *Erythroxylon coca*, pertencente à família das eritroxiláceas, que é encontrado ao leste dos Andes e acima da Bacia Amazônica (Leite, 1999). É cultivada em clima tropical em altitudes que variam entre 450 e 1800 metros acima do nível do mar. A cocaína é conhecida e utilizada há mais de 4500 anos pelas grandes civilizações pré-colombianas dos Andes. Ela foi purificada em 1859 pelo alemão Albert Neiman e, em 1902, Willslat conseguiu sintetizá-la em seu laboratório. Inicialmente, a cocaína era considerada um fármaco milagroso. No início dos anos 20, no entanto, começaram a surgir relatos sobre os efeitos tóxicos da cocaína, incluindo a tolerância, dependência e até casos de mortes (Ferreira *et al.*, 2001). A disponibilidade e o consumo da cocaína ressurgiram no início de 1970 nos Estados Unidos e ao final de 1980 e início de 1990, no Brasil. Com o advento do *crack* a partir da metade dos anos 80, observou-se uma tendência de queda no uso do cloridrato de cocaína e um aumento do uso desta outra preparação (Bahls e Bahls, 2002).

Atualmente, o uso abusivo de crack e cocaína constituem um grande problema para a sociedade mundial, decorrente das grandes implicações causadas pelo seu consumo abusivo indo desde as complicações neuropsiquiátricas, cardiocirculatória, transtornos sócio-ocupacionais, econômicos e legais (Johanson e Schuster, 2000). Segundo o relatório mundial sobre drogas da Organização das Nações Unidas (ONU), realizado em 2008, o Brasil é o segundo maior mercado de cocaína das Américas (cerca de 870 mil usuários) (UNODC, 2008). Embora não existam dados recentes do consumo

de drogas ilícitas no Brasil, especialistas percebem um aumento no uso de cocaína nos últimos anos (UNODC, 2012).

De acordo com o último Levantamento Domiciliar brasileiro, realizado em 2005 nas 108 maiores cidades do país (Carlini *et al.*, 2007), a cocaína é a segunda droga ilícita mais utilizada, sendo superada apenas pela maconha. A pesquisa aponta que 2,9% da população já usou cocaína ao menos uma vez na vida. Em relação ao *crack*, dados deste levantamento revelam a prevalência de uso na vida de 0,7%. Além disso, tanto o uso de *crack* quanto o de cocaína são mais predominantes entre indivíduos do sexo masculino. No entanto, a porcentagem de mulheres jovens (de 12 a 17 anos) que fizeram uso na vida de cocaína é igual à encontrada entre os homens desta mesma faixa etária (0,4%) (Carlini *et al.*, 2007). Esta constatação pode já estar refletindo a mudança cultural com mais aceitação em relação ao uso de drogas mais “pesadas” pelas mulheres. Nos Estados Unidos, cerca de 30% dos usuários de cocaína são mulheres (SAMHSA, 2012). Portanto, o número de mulheres que fazem uso de psicoestimulantes como a cocaína tem aumentado nos últimos anos, e há diferenças nas respostas comportamentais entre indivíduos de sexos diferentes, tanto em humanos quanto em modelos experimentais, sendo o sexo feminino mais sensível aos efeitos dos psicoestimulantes do que o masculino. Justifica-se a menor incidência de uso de drogas pelas mulheres por fatores culturais. Assim sendo, é importante estudar as diferenças biológicas porque há cada vez mais a aceitação cultural da semelhança entre sexos.

I.1.2 Mecanismo de ação da cocaína

A cocaína atua como um poderoso agente simpaticomimético com capacidade de, simultaneamente, bloquear a recaptção e aumentar os níveis de catecolaminas

como dopamina (DA), serotonina (5HT) e noradrenalina (NA), produzindo ação de altas concentrações destas catecolaminas nos receptores pós-sinápticos, o que explica o seu efeito estimulante do Sistema Nervoso Central (SNC) (Dackis e O'Brien, 2001; Egred e Davis, 2005).

No entanto, o bloqueio da recaptação de DA na via mesocorticolímbica é o principal mecanismo de ação da cocaína (Figura 1) (Goldstein e Volkow, 2002; Koob, 2006). Esta via origina-se nos corpos celulares dopaminérgicos na área tegmentar ventral (ATV) e projeta-se para várias áreas do sistema límbico, incluindo córtex pré-frontal (Cpf), hipocampo (HIPc), amígdala (AMI) e núcleo *accumbens* (NAc) (Anderson e Pierce, 2005). A estimulação do NAc é responsável pela sensação de prazer obtida com o uso da droga e tem um papel central no reforço dos comportamentos de busca. O Cpf, por sua vez, está envolvido nos processos de tomada de decisões, sendo responsável pelo controle inibitório, e costuma estar hipofuncionante nos dependentes químicos ou indivíduos com outras comorbidades psiquiátricas, principalmente aqueles com sintomas de impulsividade (Alves e Carneiro, 2013).

Ao ligar-se aos transportadores que fazem a recaptação de DA situados na membrana pré-sináptica dos neurônios dopaminérgicos, a cocaína inibe a remoção da DA na fenda sináptica e sua subsequente degradação pela monoamina oxidase no nervo terminal. A DA permanece na fenda sináptica e liga-se livremente aos seus receptores sobre a membrana pós-sináptica, produzindo mais impulsos nervosos. Esse bloqueio aumenta a concentração de DA na fenda sináptica no NAc em até 15 vezes (Grimm, 2007). O aumento da ativação da DA na via mesocorticolímbica é o principal responsável pelos efeitos reforçadores e pelo sentimento de extrema euforia induzidos pela cocaína (Goldstein e Volkow, 2002; Koob, 2006).

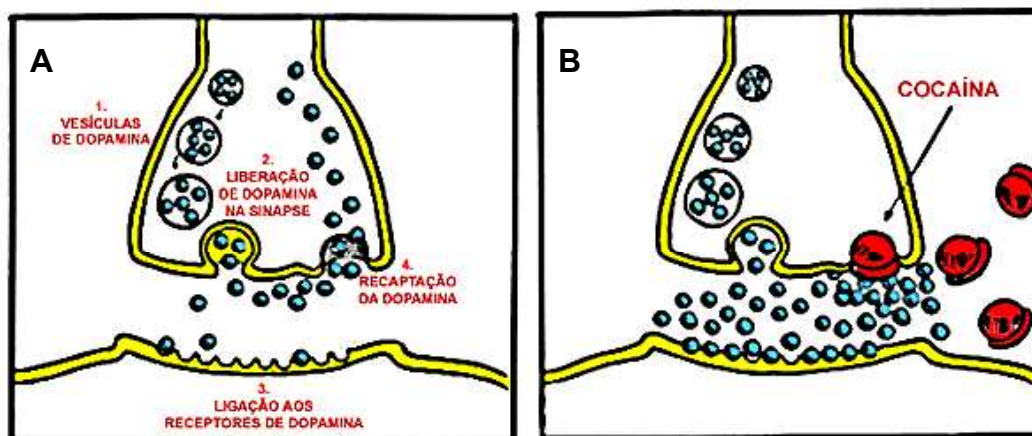


Figura 1. Esquema representativo do mecanismo de ação da cocaína no SNC, através do bloqueio da recaptação de DA pelo receptor pré-sináptico. A. Ação da DA em condições normais. B. Ação da DA na presença de cocaína. Fonte: NEAD, 2013.

Neste sentido, a DA tem um papel crucial na mediação dos efeitos reforçadores da cocaína (Aarão *et al.*, 2008; Cannon e Bseikri, 2004). O sistema de recompensa tem participação fundamental na busca de estímulos causadores de prazer, tais como alimentos, sexo, relaxamento, sendo um importante mecanismo de autopreservação. Por meio do reforço positivo da recompensa, obtida durante essas experiências, o organismo é impelido a buscá-las repetidas vezes. O reforço e a motivação, portanto, podem ser considerados componentes naturais do comportamento e fundamentais na sua organização (Stefano *et al.*, 2007). A cocaína, através da estimulação dopaminérgica, mimetiza os sentimentos e a busca de prazer naturais do organismo.

I.1.3 Efeitos agudos da cocaína

Os efeitos da cocaína já estão bem estabelecidos na literatura. Livros texto de farmacologia (Brunton *et al.*, 2011) apontam que a cocaína possui múltiplas ações, tanto periféricas, quanto centrais. Esta substância é um potente estimulante do SNC, com

ação inibitória sobre os transportadores de DA (Brunton *et al.*, 2011; Laranjeira *et al.*, 2003; Stahl, 1998).

A intoxicação aguda com cocaína produz vários efeitos clínicos, dependendo da dose, sendo mediada pela inibição do transportador de DA e, conseqüentemente, pelos efeitos da excessiva atividade dopaminérgica nas sinapses (Stahl, 1998). O efeito agudo predominante e mais esperado após o uso de cocaína é uma intensa euforia e sensação de bem estar (Leite, 1999). Outros sintomas psíquicos decorrentes do uso da cocaína são o aumento do estado de vigília, autoconfiança elevada, aceleração do pensamento e uma falsa impressão de aumento das capacidades físicas, intelectuais e sexuais (Brunton *et al.*, 2011). Por outro lado, doses elevadas de cocaína podem causar complicações como a morte por *overdose*, decorrente da excessiva estimulação central e simpática (Laranjeira *et al.*, 2003).

I.1.3.1 Neurotoxicidade da cocaína

O abuso de cocaína é um grande fator de risco para o aparecimento de transtornos psiquiátricos e neurológicos, devido às diversas alterações na quantidade ou densidade de neurônios, bem como na expressão de fatores tróficos no cérebro e na funcionalidade da barreira hematoencefálica (Alves e Carneiro, 2013).

Estudos em animais sugerem vários mecanismos possíveis para a neurotoxicidade induzida por cocaína ou seus metabólitos. Conforme revisado por Olsen (1995), os possíveis mecanismos incluem: alteração do canal de sódio e desenvolvimento do transportador de monoamina, liberação de epinefrina pela medula adrenal com subseqüente hiperglicemia, vasoconstrição com hipóxia e subseqüente diminuição do suprimento de nutrientes, quelação de íons de cálcio, formação de superóxido ou infarto após isquemia e reperfusão, inibição enzimática, redução da

atividade neurotrófica, alteração na expressão genética e alterações das membranas plasmáticas.

No entanto, o mecanismo exato com que a cocaína induz alterações neurológicas e outras desordens ainda não é totalmente compreendido. Estudos que avaliam os possíveis mecanismos de morte celular associada à cocaína sugerem que tanto a morte neuronal apoptótica quanto necrótica podem contribuir para danos neurológicos induzidos pela droga. O dano no DNA (ácido desoxirribonucleico) é um potente estímulo para a morte celular. Em relação a estes danos, diferentes modelos biológicos tem sido utilizado para demonstrar a influência de cocaína no DNA, indicando que a cocaína é capaz de induzir esses danos (Alvarenga *et al.*, 2009; 2011; Alvaro-Bartolomé *et al.*, 2011; Nersesyan *et al.*, 2013). Por outro lado, Lepsch e colaboradores (2009) demonstraram que a cocaína induziu fragmentação de DNA, ruptura da membrana celular e redução da atividade mitocondrial.

A neurotoxicidade da cocaína também tem sido correlacionada com a sua capacidade, assim como a de seus metabólitos, em produzirem espécies reativas de oxigênio (Valente *et al.*, 2012). Da mesma forma, em ratos, cocaína induz alterações morfológicas nas células gliais (Badisa *et al.*, 2010). Além disso, exposição fetal à cocaína diminui a sobrevivência neuronal, reduz a extensão de neurite (Snow *et al.*, 2001), induz a apoptose em neurônios do *locus coeruleus* (Dey e Snow, 2007) e induz morte celular em neurônios de ratos por indução de apoptose (Li *et al.*, 1999).

Conforme revisado por Alves e Carneiro (2013), a formação destes compostos também pode ser proveniente do metabolismo da DA e da 5HT, através da danificação de componentes celulares como lipídios, DNA e proteínas. A DA parece ser capaz de induzir a morte celular programada ou apoptose em determinadas células. Além disso, a hipertemia observada na intoxicação aguda/crônica de dependentes parece incrementar

a degeneração neuronal. Neste sentido, estudos mostram diminuição do número de células dopaminérgicas e serotoninérgicas, diminuição da densidade dos transportadores de monoaminas e da expressão gênica do RNA (ácido ribonucleico) mensageiro que codifica o transportador de dopamina (DAT) e de 5HT em diversas regiões do cérebro após exposição aos psicoestimulantes. O consumo de psicoestimulantes pode ocasionar perda de terminais dopaminérgicos ou células neuronais. Por outro lado, o envolvimento dos sistemas inibitórios cerebrais na neurotoxicidade induzida pela cocaína não está bem esclarecida.

I.1.4 Dependência, Tolerância e Sensibilização à Cocaína

Após o uso agudo de cocaína, aparece um período de desconforto, depressão, cansaço e disforia, tão rápido e intenso quanto os efeitos produzidos pela droga, com intensidade diretamente proporcional à dose consumida. Instala-se, então, o desejo compulsivo pela cocaína (*craving*) acompanhado de ansiedade, confusão, tremores, irritabilidade, comportamento violento, alucinações visuais e táteis, crises paranoicas e convulsões tônico-clônicas (Alves e Carneiro, 2013). Estas manifestações de desconforto levam ao uso repetido da droga.

I.1.4.1 Dependência

A principal complicação crônica relacionada ao consumo de cocaína é o grande potencial para o desenvolvimento de dependência. Segundo o Manual de Diagnósticos e Estatísticas de Distúrbios Mentais – DSM 5 (APA, 2013), a dependência se caracteriza por um padrão maladaptativo de uso de substância levando a prejuízo ou sofrimento significativo, manifestado por 2 (ou mais) dos seguintes critérios, ocorrendo dentro de um período de 12 meses: 1) uso recorrente de substância resultando em falha no

cumprimento de obrigações; 2) uso recorrente em situações em que isso pode ser fisicamente perigoso; 3) uso continuado da substância apesar de problemas recorrentes e persistentes nas esferas social ou interpessoal; 4) tolerância; 5) abstinência; 6) consumir em maiores quantidades ou por um período mais longo do que o pretendido; 7) desejo persistente ou esforços mal-sucedidos no sentido de reduzir ou controlar o uso; 8) muito tempo é gasto em atividades necessárias para a obtenção, na utilização da substância ou na recuperação de seus efeitos; 9) importantes atividades sociais, ocupacionais ou recreativas são abandonadas ou reduzidas; 10) o uso da substância continua, apesar da consciência de ter um problema físico; ou 11) fissura ou *craving* – um forte desejo ou urgência de usar uma substância específica.

Neurobiologicamente, a dependência pode ser explicada, ao menos em parte, pela adaptação em regiões cerebrais envolvidas no reforço e na motivação. O potencial de abuso da cocaína é essencialmente baseado no rápido desenvolvimento de tolerância para os efeitos de euforia (Büttner *et al.*, 2003). Além disso, as neuroadaptações à cocaína são manifestadas comportamentalmente através da sensibilização psicomotora (Samaha e Robinson, 2005). Outro fator importante para a dependência química se relaciona às manifestações de abstinência, principalmente do tipo depressão, que servem como reforço negativo, fazendo com que os indivíduos retomem o uso da droga que foi recentemente suspensa (Dafny e Yang, 2006). Com isso, estudos indicam que a tolerância, a retirada, e as neuroadaptações relacionadas com a sensibilização podem desempenhar um papel importante no processo de criação da dependência (Ben-Shahar *et al.*, 2004; Dafny e Yang, 2006; Wolf, 1988). Portanto, a dependência se desenvolve como resultado da adaptação a mudanças evocadas pelo uso crônico de drogas. Várias modificações neuronais, descritas como indução de neuroplasticidade

podem ser observadas. Mudanças adaptativas induzidas pela droga podem ser divididas em duas categorias básicas: tolerância e sensibilização (Brunton *et al.*, 2011).

I.1.4.2 Tolerância

A tolerância é a necessidade de doses cada vez maiores da substância para obter o efeito desejado. Este fenômeno é caracterizado por um desvio à direita na curva dose-resposta e resulta de adaptações neurofuncionais à ação prolongada da cocaína (figura 2) (Brunton *et al.*, 2011). A tolerância é, portanto, uma alteração quantitativa na sensibilidade às drogas com diminuição dos seus efeitos, estando associada ao uso crônico de altas doses de psicoestimulantes como a cocaína (Laviola *et al.*, 1995; Figlie *et al.*, 2004).

Pode ser causada por mecanismos farmacocinéticos e farmacodinâmicos. Entre as alterações na farmacocinética de drogas destacam-se a tolerância metabólica, quando as drogas são capazes de estimular o seu próprio metabolismo (Aarão *et al.*, 2008, 2007). Conforme revisado por Hammer *et al.* (1997), os fatores farmacocinéticos provavelmente não são significativos contribuintes para a tolerância à cocaína, já que a administração crônica desta droga não parece aumentar o metabolismo da mesma, e os níveis de cocaína no cérebro não são nalterados em animais tratados continuamente com a droga.

Por outro lado, os fatores farmacodinâmicos parecem desempenhar um papel importante na tolerância aos efeitos comportamentais da cocaína (Hammer *et al.*, 1997), como uma capacidade de compensar os efeitos da droga. A tolerância funcional, que pode constituir o tipo mais comum, decorre de alterações compensatórias nos receptores, nas enzimas efetoras ou nas ações da droga sobre as membranas (Aarão *et al.*, 2008). A tolerância à cocaína pode ser mediada por mecanismos adaptativos, tais como a atenuação da neurotransmissão de DA (Hammer *et al.*, 1997). Conceitualmente,

a administração crônica de cocaína pode reduzir a concentração basal de DA ou alterar a capacidade de resposta dos receptores dopaminérgicos e/ou de sistemas de segundo mensageiro. A tolerância também pode ser causada pela atenuação do aumento de DA sináptica produzida pela administração aguda de cocaína. Outros mecanismos possíveis subjacentes à atenuação de resposta da DA pela cocaína crônica incluem aumento do metabolismo ou diminuição da liberação dopaminérgica. O resultado é a depleção da concentração de DA extracelular e o aumento do limiar de auto-estimulação (Figlie *et al.*, 2004).

I.1.4.3 Sensibilização

A sensibilização ou tolerância reversa consiste na exacerbação da atividade motora e dos comportamentos estereotipados após a exposição a doses repetidas intermitentes de cocaína, acarretando um desvio à esquerda na curva dose-resposta (figura 2) (Brunton *et al.*, 2011; Laviola *et al.*, 1995). Um exemplo deste fenômeno pode ser o que acontece com alguns indivíduos, após intoxicação repetida com cocaína, em doses que anteriormente induziam apenas euforia, passam a tomar forma de psicose paranoide aguda (Stahl, 1998).

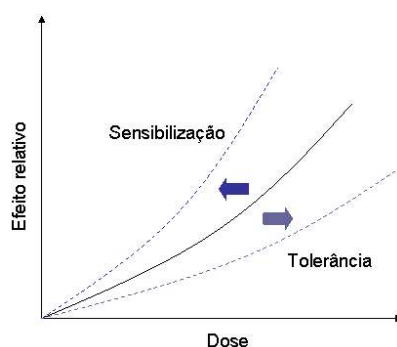


Figura 2. Desvios em uma curva dose-resposta com tolerância e sensibilização. Adaptado de Brunton e colaboradores, 2011.

A depleção dopaminérgica resultante do uso repetido de cocaína provoca alterações anatômicas e funcionais nos receptores neuronais, levando a um aumento do número e da sensibilidade dos receptores pós-sinápticos de DA. Além da maior permanência de DA na fenda após o uso de cocaína, esta catecolamina encontrará um número maior de receptores mais sensíveis para estimular (Figlie *et al.*, 2004). Segundo revisado por Steketee e Kalivas (2011) a sensibilização comportamental está associada com o aumento da transmissão na via dopaminérgica mesocorticolímbica. Vale ressaltar que o grau de liberação de dopamina está diretamente relacionado com o histórico de uso de psicoestimulantes, sugerindo uma resposta aumentada de dopamina com o uso repetido de drogas.

A sensibilização comportamental à cocaína foi primeiramente relatada por Downs e Eddy (1932) e, conforme revisado por Robinson e Berridge (2001), é um fenômeno dose-dependente, geralmente observada apenas quando as drogas são administradas intermitentemente. Muitas vezes é mais evidente após longa descontinuação do tratamento repetido do que logo após a cessação da droga. A sensibilização pode persistir por vários meses ou anos, inclusive quando esta é induzida durante a adolescência, podendo perdurar até o início da idade adulta (Marin *et al.*, 2008). Adicionalmente, este fenômeno pode ser observado não apenas após a administração da droga pelo pesquisador, mas também após a auto-administração da mesma. Além disso, a susceptibilidade à sensibilização possui grande variabilidade individual (Robinson e Berridge, 2001).

A sensibilização comportamental ocorre em duas fases temporalmente distintas, que envolvem diferentes mecanismos anatômicos e fisiológicos: a *indução/iniciação* é definida como a sequência de acontecimentos celulares e moleculares induzidos pelo uso inicial dos psicoestimulantes que podem levar a mudanças duradouras na função

neuronal responsável pelo comportamento sensibilizado; a *expressão* é definida como a demonstração da alteração neural decorrente do processo de iniciação que medeia a resposta comportamental aumentada por um período prolongado de tempo, na presença da droga, após um período de abstinência (Dafny e Yang, 2006; Vanderschuren e Kalivas, 2000).

A sensibilização comportamental pode ser atribuída não somente à ação farmacológica direta das drogas, como também aos conhecimentos associados com o uso destas. Portanto, a sensibilização não é uma consequência inevitável do uso repetido de drogas. Ela é poderosamente modulada pelo aprendizado e por circunstâncias envolvidas durante o uso da droga. O aprendizado pode modular a sensibilização de duas maneiras: 1) quando a modulação da expressão da sensibilização neural já foi previamente induzida, conhecida como modulação contexto-específica. Esta ocorre quando os animais recebem um desafio da droga em um ambiente diferente daquele em que anteriormente receberam o tratamento. Neste contexto, a sensibilização comportamental pode não ser expressa, embora se saiba que a sensibilização neural realmente tenha ocorrido. Esta modulação contextual pode contribuir para o papel fundamental que a sensibilização desempenha na recaída, quando o indivíduo retorna ao local onde costumava receber a droga; e 2) quando a sensibilização neural é induzida em ambiente reconhecido pelo indivíduo há menor efetividade na indução da sensibilização pela droga (ou, ao menos, a velocidade e o grau de sensibilização produzida por uma determinada dose da droga). Por exemplo, quando doses baixas a moderadas da droga, administradas no ambiente onde o animal vive, mostram-se menos eficazes na indução da sensibilização do que se as mesmas doses fossem dadas em um ambiente desconhecido (Robinson e Berridge, 2001).

Inicialmente, acreditava-se que a tolerância, que acompanha o uso da maioria das substâncias indutoras de dependência, desempenhava o papel principal nas toxicodependências (Vetulani, 2001). No entanto, há algum tempo presume-se que a sensibilização sirva como modelo de indução de dependência aos psicoestimulantes, estando envolvida no desenvolvimento e manutenção da dependência, desempenhando um papel mais importante que o da tolerância na procura e no uso compulsivo de cocaína (Robinson e Berridge, 1993; Dafny e Yang, 2006).

I.1.4.4 Vias neurais envolvidas na dependência e na sensibilização à cocaína

Segundo Wise e Bozarth (1987), o estabelecimento da dependência está relacionado à capacidade da droga em ativar as vias de recompensa cerebrais e induzir estimulação psicomotora. Em alguns indivíduos, o uso repetido de drogas pode produzir adaptações permanentes no sistema neural de recompensa, tornando-o cada vez mais sensibilizado à droga e aos estímulos associados (Robinson e Berridge, 1993). Assim, a sensibilização das vias motivacionais e estimulantes das drogas poderia contribuir mais fortemente para o aumento da busca pela droga e, conseqüentemente, para o estabelecimento da dependência (Robinson e Berridge, 1993; Stewart e Badiani, 1993).

Portanto, a literatura propõe que a dependência decorre de neuroadaptações que aumentam o incentivo motivacional para obter a substância. Essas neuroadaptações ocorrem principalmente na via dopaminérgica mesocorticolímbica e podem ser avaliadas por adaptações neuroquímicas nessa via ou por meio da sensibilização comportamental. Portanto, a teoria da sensibilização do incentivo motivacional parece explicar a dependência.

As vias dopaminérgicas mesocorticolímbicas, essenciais para o fluxo de informações entre o sistema límbico e o motor, além de estarem envolvidas nos mecanismos de recompensa das drogas, também fazem parte do processo de

sensibilização comportamental (Dafny e Yang, 2006). Além da ATV, do NAc e do estriado dorsal, o Cpf também possui um importante papel na sensibilização comportamental aos psicoestimulantes, uma vez que estes formam coletivamente o “circuito motivacional” (Pierce e Kalivas, 1997). Portanto, este circuito está envolvido na tradução dos estímulos ambientais e farmacológicos na resposta motora adaptativa ao processo de sensibilização aos psicoestimulantes.

Há algum tempo já se discute as vias neurais envolvidas no processo de sensibilização comportamental. Conforme revisado por Pierce e Kalivas (1997), além do NAc, a expressão da sensibilização envolve o engajamento de outros três núcleos do circuito motivacional: 1) aumento na transmissão de glutamato e diminuição na transmissão do Ácido gama-aminobutírico (GABA) na ATV; 2) redução da transmissão dopaminérgica no Cpf, com conseqüente aumento desta transmissão no NAc. Esta redução dopaminérgica é causada pelo aumento da transmissão glutamatérgica na ATV e no NAc; 3) aumento da liberação de GABA no ventral *pallidum* (VP) com diminuição da atividade das vias inibitórias GABAérgicas eferentes para a ATV e tálamo médio dorsal.

Mais recentemente revisado por Steketee e Kalivas (2011), aponta-se outras regiões envolvidas no desenvolvimento e expressão da sensibilização comportamental. Os neurônios GABAérgicos projetam-se ao NAc e ao córtex pré-frontal medial (CPFm) a partir da ATV, enquanto os terminais de DA localizados no NAc também liberam glutamato (GLU). Este circuito pode ser ativado por projeções do CPFm para a ATV, provavelmente através do tegumento laterodorsal (TLD). Além de conexões diretas, a ATV influencia provavelmente indiretamente o NAc e o CPFm via projeções para a amígdala basolateral (ABL) e o núcleo paraventricular (NPV). Finalmente, o HIPc é provável que atue no sistema dopaminérgico mesolímbico através de entradas para a

ATV. Assim, como ilustrado na figura 3, o CPFm fornece entrada excitatória, direta ou indiretamente através do TLD. Já a ATV fornece influência dopaminérgica para o NAc, direta ou indiretamente, através da ABL e do NPV. Este circuito pode ser igualmente influenciado pela entrada hipocampal direta na ATV e do CPFm para o NAc.

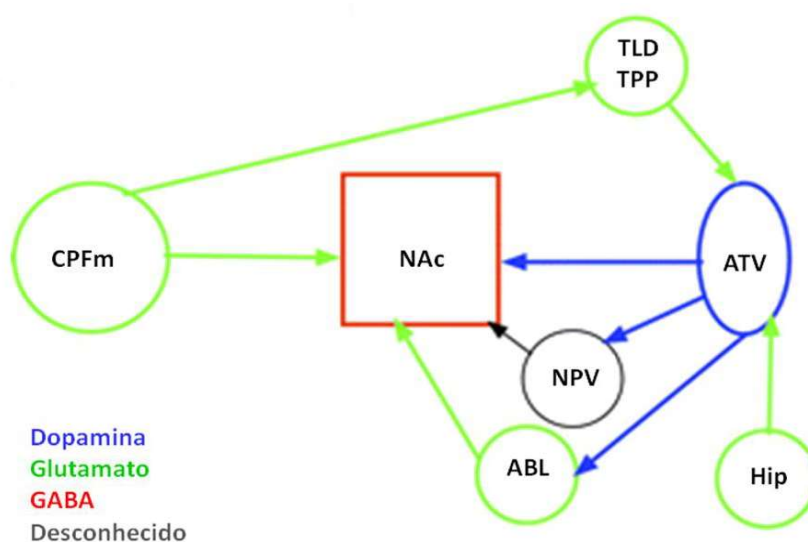


Figura 3. Topografia das neurotransmissões associadas com a sensibilização comportamental. Legenda: CPFm (córtex pré-frontal medial), tegmento laterodorsal (TLD), tegmento pedunculopontino (TPP), núcleo *accumbens* (NAc), área tegmentar ventral (ATV), núcleo paraventricular (NPV), amígdala basolateral (ABL), hipocampo (Hip). Traduzido de Steketee e Kalivas (2011). O NAc é modulado pela entrada de DA a partir da ATV que inerva direta ou indiretamente este alvo, através do NPV e da ABL. O NAc também recebe diretamente glutamato do CPFm, bem como projeções indiretas através da LDT/PPT e ATV. Finalmente, a ATV também recebe indiretamente a entrada de glutamato do hipocampo.

Com isso, entende-se que as vias neurais envolvidas no processo de sensibilização à cocaína fazem parte de um complexo mecanismo, envolvendo inúmeros neurotransmissores e regiões cerebrais, que necessitam de estudos adicionais para serem completamente elucidados.

1.1.5 Influência dos hormônios sexuais femininos na sensibilização comportamental e na neurotoxicidade da cocaína

Tradicionalmente, o abuso de drogas tem sido considerado um problema mais frequente entre os indivíduos do sexo masculino. No entanto, o consumo de cocaína por mulheres tem aumentado rapidamente nas últimas décadas. Estima-se que cerca de 600.000 dos 2 milhões de usuários de cocaína nos Estados Unidos sejam mulheres (SAMHSA, 2012). Com isso, nas últimas décadas, tem havido uma preocupação maior em verificar as diferenças entre ambos os sexos na aquisição de dependência química, sendo demonstrada efetiva interferência dos hormônios sexuais, tanto na ação em sistemas neuroquímicos (Perrotti *et al.*, 2000; Saleh, 2003), quanto sobre os efeitos comportamentais (Kouri *et al.*, 2002; Lynch *et al.*, 2002).

1.1.5.1 Diferença entre os sexos nos efeitos da cocaína

As respostas comportamentais agudas aos psicoestimulantes são diferentes entre animais machos e fêmeas (Perrotti *et al.*, 2001) e este dimorfismo sexual pode influenciar a auto-administração da cocaína e seus efeitos. Em comparação com os homens, as mulheres são mais propensas a usar cocaína em idade mais precoce e com uma maior frequência (Lynch *et al.*, 2002). Após o primeiro uso de cocaína, as mulheres tendem a levar menos tempo até se tornarem dependentes, elas buscam tratamento mais cedo e normalmente seu hábito de usar cocaína é mais grave do que é visto entre os homens que procuram tratamento (Hu e Becker, 2008; Carroll *et al.*, 2004). Além disso, utilizando-se a via intranasal para administração de cocaína, o pico de efeito foi duas vezes maior nas mulheres do que nos homens e, durante os 45 minutos após o uso da cocaína, a concentração da droga nas mulheres diminuiu 18% apenas, enquanto que nos homens a diminuição foi de 60%. Adicionalmente, mulheres relataram mais experiências de “nervosismo” com o uso de cocaína, demoram mais tempo a sentir os seus efeitos subjetivos, experimentam menos euforia e disforia, consomem as formas

mais severas e em quantidades maiores, e têm mais fissura em resposta aos estímulos associados à cocaína do que os homens (Kosten *et al.*, 1996).

Estes resultados levam a crer que os hormônios sexuais femininos, estrógeno e progesterona, podem ser os responsáveis pelo aumento dos efeitos subjetivos induzidos pela cocaína em humanos (Justice e de Wit, 2000).

I.1.5.2 Avaliação do ciclo hormonal nos efeitos da cocaína

As flutuações hormonais desempenham um papel importante nas respostas das mulheres para as drogas, o que sugere que os esteróides sexuais modulam as ações subjetivas de cocaína (Segarra *et al.*, 2010). Os hormônios gonadais regulam o sistema reprodutivo, assim como a plasticidade e a atividade de todo SNC. Estudos em mulheres, durante as diferentes fases do ciclo menstrual, têm mostrado que os efeitos positivos da droga são maiores durante a fase folicular, e que o maior desejo pela droga ocorre quando as concentrações de estrógeno e progesterona são maiores (Sofuoglu *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 2002).

Semelhante à mulher, as ratas fêmeas são mais sensíveis aos efeitos psicomotores da cocaína do que os machos (Hu e Becker, 2008). Fêmeas mostram uma maior sensibilização comportamental (Chin *et al.*, 2002; Hu e Becker, 2003), adquirem autoadministração de cocaína mais prontamente do que ratos machos (Lynch *et al.*, 2001; Carroll *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2004; Campbell *et al.*, 2002) e fazem mais associação entre a administração da droga e o ambiente em um período menor de tempo na preferência condicionada de lugar (Russo *et al.*, 2003a;b). Durante o ciclo estral, os níveis de estrógeno e progesterona flutuam, e as alterações comportamentais induzidas pela cocaína são afetadas pelos estágios do ciclo (Sell *et al.*, 2002; Walker *et al.*, 2002). Um aumento na resposta comportamental está diretamente relacionado com o proestro e

estro, onde os níveis hormonais de estrógeno e progesterona estão mais elevados (Sell *et al.*, 2000; Chin *et al.*, 2002; Feltenstein *et al.*, 2009).

Quando as ratas fêmeas são ovariectomizadas e, portanto, possuem níveis de estrógenos ou progesterona praticamente nulos, o comportamento de hipersensibilidade à cocaína fica reduzido e a capacidade de sensibilizar mais rápido do que os machos e de produzir uma forte associação entre a recompensa à cocaína e os estímulos ambientais não são mais evidenciadas (Quiñones-Jenab, 2006). A ovariectomia também faz com que a capacidade de autoadministração fique bastante reduzida, abolindo as diferenças encontradas entre os machos e as fêmeas. Isto faz supor que os hormônios sexuais femininos possam atuar nas propriedades de reforço da droga (Lynch *et al.*, 2001).

I.1.5.3 Avaliação da reposição hormonal nos efeitos da cocaína

A reposição de estrógeno e progesterona também afeta as respostas comportamentais da cocaína em ratas ovariectomizadas. O estrógeno parece desempenhar um importante papel na capacidade de reforço da cocaína, pois uma maior sensibilização está diretamente relacionada com a sua presença (Hu and Becker, 2003; Booze *et al.*, 1999). As fêmeas ovariectomizadas, na presença de estrógeno, apresentam uma alteração significativa no comportamento com metade da dose de cocaína que as ovariectomizadas que não utilizam estrógeno (Hu e Becker, 2003; Sell *et al.*, 2000).

Embora os dados apoiem que o estrógeno seja o maior responsável pelas diferenças encontradas entre machos e fêmeas em resposta ao uso da cocaína, esta parece não ser a única influência. Enquanto o estrógeno induz um aumento na atividade locomotora, a progesterona parece atenuar os efeitos causados pela cocaína (Sell *et al.*, 2000; Niyomchai *et al.*, 2005). Estudos clínicos com mulheres dependentes de cocaína relatam que as respostas subjetivas após uso de cocaína e a fissura por cocaína são

menores na fase lútea, caracterizada por concentrações mais elevadas de progesterona (Evans *et al.*, 2002). Além disto, a administração de progesterona atenua os efeitos subjetivos do *crack* em mulheres (Sofuoglu *et al.*, 2004; Evans e Foltin, 2006). Por outro lado, em animais do sexo feminino, o tratamento exógeno com progesterona: a) reverte os efeitos do estrógeno sobre a aquisição da autoadministração de cocaína (Jackson *et al.*, 2006); b) atenua as respostas motoras da cocaína em ratas (Russo *et al.*, 2003a,b); c) inibe a preferência de lugar da cocaína (Niyomchai *et al.*, 2005); e d) a hiperatividade induzida pela cocaína e a autoadministração de cocaína são as mais baixas na fase em que a progesterona está mais elevada (Roberts *et al.*, 1989; Sell *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 2006).

1.1.5.4 Neurotoxicidade dos hormônios sexuais femininos

O sexo feminino é mais influenciado pelos ritmos biológicos, devido aos ciclos hormonais específicos, sendo mais sensíveis a danos genéticos durante as fases ovulatória/estrogênica do ciclo menstrual (D'Souza *et al.*, 1988). Mulheres submetidas a tratamento com contraceptivos orais apresentam danos em linfócitos aumentados (Biri *et al.*, 2002). Atividades genotóxicas dos estrógenos incluem danos ao DNA induzidos por metabólitos reativos e espécies reativas de oxigênio (Roy e Liehr, 1999). Por outro lado, os estudos mostraram que a progesterona ativa o sistema de defesa antioxidante. Sua suplementação estimulou a atividade da peroxidase glutationa-S-transferase e glutationa-peroxidase no fígado e nos rins de ratas tratadas com benzeno e ajuda na atividade da catalase (Verma e Rana, 2011). Além disso, inibe a formação de peróxidos de lipídicos nos tecidos hepáticos e isso pode ser influenciada pela atividade da enzima (Verma e Rana, 2008; Strehlow *et al.*, 2003). Por outro lado, Braz e Salvadori (2007) mostraram que as flutuações periódicas de estradiol e progesterona endógena não afetam os níveis de danos no DNA de leucócitos do sangue periférico em fêmeas.

Portanto, a revisão da literatura sugere que os efeitos da cocaína sobre o SNC são gênero-dependentes e que os indivíduos do sexo feminino podem ser mais suscetíveis aos efeitos comportamentais e neurotóxicos da cocaína do que os do masculino, provavelmente devido à presença dos hormônios sexuais femininos. Desta forma, é reforçada a ideia da necessidade de estudos sobre os efeitos das variações fisiológicas dos ciclos hormonais ou da reposição hormonal em fêmeas em relação aos efeitos dos psicoestimulantes, especialmente a cocaína, bem como a utilização de tratamentos diferenciados para homens e mulheres que buscam tratamento para dependência química.

I.1.6 Mecanismos inibitórios cerebrais na sensibilização comportamental à cocaína

Apesar de a cocaína atuar diretamente sobre o sistema dopaminérgico, outros sistemas também sofrem influências de sua utilização, podendo haver profundas alterações em receptores, síntese de neurotransmissores, armazenamento, liberação e término de ação dos neurotransmissores (Johanson e Schuster, 2000; Perrotti *et al.*, 2000). Com isso, buscando equilibrar a atividade do SNC após a estimulação produzida pelas altas concentrações de catecolaminas decorrentes do uso de cocaína, ocorre a mobilização de sistemas inibitórios cerebrais. Os sistemas inibitórios cerebrais, representado principalmente pelo GABA, mas também por novos neurotransmissores como a taurina, estão envolvidos na modulação dos efeitos produzidos pela administração aguda ou crônica de cocaína no SNC (Banerjee *et al.*, 2013; Backes e Hemby, 2008; Jayaram e Steketee, 2004). No entanto, ainda existem lacunas no conhecimento quanto à forma com que estes sistemas inibitórios atuam na resposta ao

uso de psicoestimulantes, necessitando de estudos adicionais que revelem os mecanismos pelos quais esta regulação é feita.

I.1.6.1 Ácido Gama Aminobutírico (GABA)

O GABA é o mais importante neurotransmissor inibitório do SNC (Curtis e Watkins, 1960), sendo primeiramente descoberto como um aminoácido (Roberts e Frankel, 1950). A alta concentração e a distribuição difusa dos neurônios GABAérgicos no SNC dificultou o estabelecimento de sua função como neurotransmissor (Owens e Kriegstein, 2002).

No SNC de mamíferos, o GABA é sintetizado a partir do GLU, em uma reação catalisada por duas isoenzimas ácido glutâmico descarboxilase (GAD), GAD₆₅ e GAD₆₇. A GAD₆₅ é preferencialmente distribuída nos axônios terminais e está envolvida na síntese e recaptção de GABA vesicular, servindo a uma resposta rápida à demanda extra de GABA na neurotransmissão (Fenalti *et al.*, 2007; Castañeda *et al.*, 2005). Por outro lado, a enzima GAD₆₇ está distribuída no citoplasma axonal, sendo envolvida nas funções metabólicas e não vesicular de recaptção de GABA. É constitutivamente ativa e responsável pela produção basal de GABA (Soghomonian e Martim, 1998).

O GABA sintetizado é alocado em vesículas sinápticas por um transportador de neurotransmissor vesicular e liberado para o nervo terminal por exocitose cálcio-dependente, embora sejam descritas formas de secreção não vesicular de GABA (Owens e Kriegstein, 2002). O GABA liga-se a seu receptor pré ou pós-sináptico, causando uma hiperpolarização celular através do aumento da entrada de Cl⁻ e saída de K⁺. Os efeitos do GABA podem ser mediados pela ativação de receptores ionotrópicos ou metabotrópicos, sendo formado basicamente por três tipos de receptores, GABA_A, GABA_B e GABA_C (Morris *et al.*, 1999).

Os receptores GABA_A e GABA_C são ionotrópicos, canais iônicos, enquanto o GABA_B é metabotrópico, ou seja, acoplado a proteína G (Watanabe *et al.*, 2000). Os receptores GABA_A, em mamíferos, são compostos por 16 subunidades, que incluem α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , π e θ (Sieghart e Sperk, 2002; Darlison *et al.*, 2005). Inúmeras combinações destas subunidades são encontradas, mas a mais prevalente em mamíferos contém duas subunidades α_1 , duas β_2 e uma γ_2 (Rudolph *et al.*, 2001). Assim, as propriedades biofísicas e farmacológicas dos receptores GABA_A dependem da composição das subunidades (Wieland *et al.*, 1992). Os receptores GABA_C são proteínas compostas pelas subunidades ρ_1 , ρ_2 e ρ_3 , de forma homo- ou heteropentamérica, esta última constituída por uma combinação destas subunidades (Perfilova e Tiurenkov, 2011). Embora existam poucos estudos sobre este receptor, o GABA_C tem sido considerado uma variante farmacológica do receptor GABA_A (Owens e Kriegstein, 2002). Os receptores GABA_B (GABA_BR), por outro lado, são compostos por sete receptores transmembrana que, através dos sistemas de segundo mensageiro da fosfolipase C e adenilato ciclase, ativam canais iônicos de K⁺ e Ca²⁺ via acoplamento à proteína G (Chebib e Johnston, 1999). Desta forma, medeiam a neurotransmissão inibitória lenta de GABA pela regulação de vários efetores. Estes receptores são formados por duas combinações heterodímeras: GABA_BR₁ e GABA_BR₂, sendo que a subunidade GABA_BR₁ é subdividida em GABA_BR_{1a} e GABA_BR_{1b} (Bowery *et al.*, 2002).

Conforme explicitado anteriormente, evidências pré-clínicas demonstram que o sistema GABAérgico está envolvido com funções de modulação em termos de excitações e/ou inibições sinápticas, interagindo com outros sistemas neuronais, como os sistemas dopaminérgico e glutamatérgico, regulando de forma específica as interações entre neurônios adjacentes em diferentes áreas do SNC (Gray *et al.*, 1991).

Em vista disto, existe uma forte e crescente comprovação da associação entre a atividade deste neurotransmissor e o mecanismo de ação da cocaína (Barrett *et al.*, 2004).

I.1.6.1.1 GABA e Cocaína

A cocaína, assim como outros psicoestimulantes, além da conhecida ação dopaminérgica, influencia a atividade do sistema GABAérgico. Neste contexto, evidências apontam que o sistema GABA pode participar nos efeitos agudos e crônicos da cocaína através de ações pré e pós-sinápticas.

O sistema GABAérgico parece estar amplamente envolvido no processo de sensibilização à cocaína. O NAc modula o funcionamento da ATV por meio de neurônios que contém GABA (Pierce e Kalivas, 1997) e agentes GABAérgicos têm mostrado modificar a expressão de sensibilização comportamental produzida por psicoestimulantes. A injeção sistêmica de clonazepam preveniu o desenvolvimento de sensibilização à metanfetamina (Ito *et al.*, 1997), e o valproato de sódio atenuou os efeitos locomotores agudos do metilfenidato e bloqueou o desenvolvimento da sensibilização após administração repetida deste psicoestimulante (Eckermann *et al.*, 2001).

Os receptores dos neurônios GABA e dopaminérgicos se colocam no estriado (STR), Cpf e HIPc, regiões cerebrais relacionadas aos efeitos da cocaína no sistema GABAérgico (Yamaguchi *et al.*, 2000). No entanto, estudos têm implicado um importante papel do Cpf no desenvolvimento do comportamento de dependência (Huang *et al.*, 2007). Evidências apontam alterações de múltiplos sistemas de neurotransmissores no Cpf, incluindo GABA, DA, 5HT, GLU, NA, acetilcolina e peptídeos, sendo que a sinalização de receptores ativada por estes neurotransmissores

pode contribuir para o desenvolvimento da sensibilização comportamental e adição a psicoestimulantes (Steketee, 2003).

Neurônios de circuitos locais são a principal fonte de GABA no CPFm (Retaux *et al.*, 1992; 1993) e os neurônios GABAérgicos na ATV também projetam-se para esta região (Carr e Sesack, 2000). Além disso, as projeções corticais pré-frontais ao complexo estriatal podem contribuir para o papel modulador do Cpf, associado à inibição de atividades motoras e comportamentais, e podem ser afetadas pela exposição a longo prazo a drogas de abuso (Jentsch e Taylor, 1999).

O controle cortical inibitório do STR também parece envolver a atividade GABA, já que a injeção local de bicuculina, um antagonista GABA, resulta em aumento da DA extracelular recuperada por microdiálise no STR (Karler *et al.*, 1998; Karreman e Moghaddam, 1996). Já o aumento de DA induzido por psicoestimulantes ativa receptores dopaminérgicos tipo 2 (D₂) e pode diminuir o estímulo excitatório por inibir neurônios piramidais glutamatérgicos, através da liberação de GABA (Steketee e Beyer, 2005).

Adaptações em longo prazo nas células piramidais do Cpf por exposição repetida a cocaína (Trantham *et al.*, 2002) estão associadas a aumento transitório na transmissão GABAérgica pré-frontal (Jayaram e Steketee, 2005) e diminuição da função dopaminérgica no Cpf (Beyer e Steketee, 2002). Portanto, o GABA regula os processos excitatórios do Cpf e serve como intermediário na modulação DA nestes neurônios piramidais (Jayaram e Steketee, 2005). A resposta motora excitatória característica dos psicoestimulantes pode depender de inibição de vias inibitórias no STR, resultantes da excitação no córtex (Karler *et al.*, 1995).

A administração aguda ou crônica de cocaína, dependendo da região cerebral analisada, pode: a) diminuir a liberação do GABA na ATV (Cameron e Williams, 1994;

Pierce e Kalivas, 1997); b) aumentar o GABA extracelular no Cpf (Jayaram e Steketee, 2005), no NAc e no VP (Wydra *et al.*, 2013); c) aumentar a imunorreatividade de GABA no cíngulo anterior (Little e Teyler, 1998); d) aumentar ou diminuir o *turnover* do GABA em diferentes áreas cerebrais (Dworkin *et al.*, 1995; Pierce e Kalivas, 1997); e) reduzir a captação de cloreto induzida por GABA no STR após tratamento prolongado (Peris, 1996); f) aumentar a ligação dos receptores benzodiazepínicos no STR e HIPc (Lipton *et al.*, 1995; Goeders *et al.*, 1990); e g) diminuir o efeito inibitório do GABA em neurônios hipocámpais (Ye *et al.*, 1997). Vale ressaltar que todos estes estudos foram conduzidos em roedores machos.

O uso de psicoestimulantes também influencia na atividade das isoenzimas GAD₆₅ e GAD₆₇. Quando os animais machos são expostos agudamente aos psicoestimulantes, vê-se que os níveis de GAD total não estão alterados após uma hora da administração aguda de anfetamina no STR dorsal, no NAc *core* e *shell*, na amígdala central e basolateral de machos (Carta *et al.*, 2008) ou após quatro horas no NAc medial (Lindfors *et al.*, 1992). No entanto, estão alterados após seis horas da administração de cocaína no NAc *shell* (Sorg *et al.*, 1995). Em fêmeas, os níveis de GAD₆₅ no STR diminuíram após uma hora da administração aguda de cocaína, sem haver alteração nos níveis de GAD₆₅ e GAD₆₇ no Cpf (Souza *et al.*, 2009).

Alterações nas isoenzimas GAD também são descritas após o uso repetido de psicoestimulantes, conforme representado na figura 4. Cocaína repetida aumentou a densidade de GAD₆₅ no hipotálamo anterior e no núcleo amigdalóide central e medial, além de diminuição no septo lateral (Ricci *et al.*, 2005). Cocaína repetida não alterou a imunorreatividade do GAD₆₅ no VP (De Leon *et al.*, 2000), nem a expressão proteica desta isoenzima no NAc *core*, *shell* e caudato em machos (Chen *et al.*, 2007). Por outro lado, sensibilização à cocaína diminuiu a expressão de RNAm de GAD65 de ratas no

STR dorsal e aumenta no Cpf (Souza *et al.*, 2009). Em relação à GAD₆₇, cocaína repetida diminuiu os níveis protéicos desta isoenzima no NAc *core* e *shell* (Chen *et al.*, 2007) e metanfetamina repetida acarretou diminuição da expressão do RNAm de GAD₆₇ no NAc medial (Lindfors *et al.*, 1992). Os níveis de RNAm de GAD₆₇ não sofreram alterações após cocaína repetida no Cpf medial, STR dorsolateral, NAc *core* e *shell* (Sorg *et al.*, 1995). Além disso, tratamento repetido com cocaína aumentou os níveis proteicos de GAD₆₇ no caudato (Chen *et al.*, 2007) e anfetamina repetida elevou os níveis de RNAm de GAD₆₇ na amígdala central de ratos machos (Carta *et al.*, 2008). Em fêmeas, sensibilização a cocaína diminuiu a expressão de RNAm de GAD₆₇ no STR dorsal e aumenta no Cpf (Souza *et al.*, 2009).

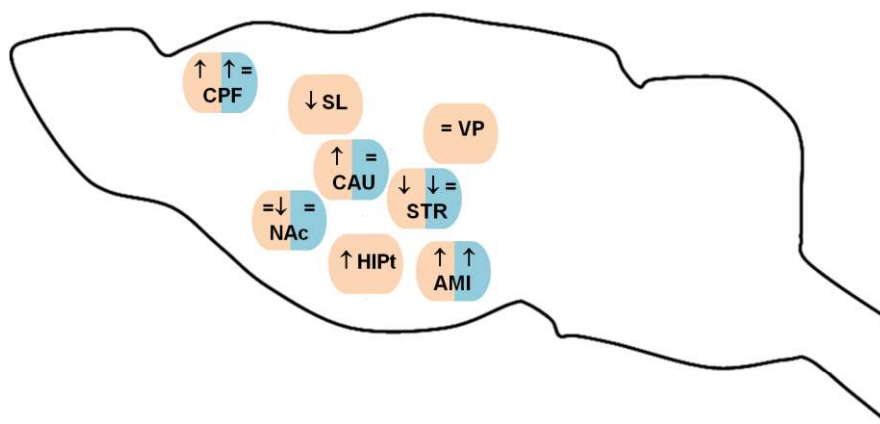


Figura 4. Representação esquemática do cérebro de rato e alterações em GAD₆₅ (rosa) e GAD₆₇ (azul) após exposição repetida à psicoestimulantes. Legenda: = indica não haver alteração, ↓ diminuição e ↑ aumento nos níveis das isoenzimas nas diferentes regiões cerebrais. Abreviações: AMI (amígdala), CAU (caudato), Cpf (córtex pré-frontal), HIPT (hipotálamo), SL (septo lateral), STR (estriado), NAc (núcleo accumbens) e VP (ventral pallidum).

Quando se leva em conta a retirada da cocaína após tratamento repetido, houve uma elevação nos níveis proteicos de GAD no hipotálamo (HIPT) após 1 e 8 dias de retirada, retornando aos níveis basais após 14 dias (Ma *et al.*, 2008). Adicionalmente, observou-se diminuição no RNAm de GAD₆₇ após 30 dias de retirada de anfetamina no STR dorsal e no NAc *core* e *shell*, mas não na amígdala central (Carta *et al.*, 2008).

As subunidades dos receptores GABAérgicos também são alteradas pelo uso de psicoestimulantes. O estado funcional de receptores GABA_A parece ser inversamente proporcional à magnitude do efeito comportamental da cocaína. A injeção, no STR, de oligodeoxi-nucleotídeos *antisense* de RNAm para subunidades α_2 e β_3 diminui a expressão e função dos receptores e aumenta os efeitos no comportamento rotatório da cocaína (Peris, 1998).

A sensibilização à cocaína está associada a uma diminuição na expressão da subunidade α_2 no NAc de ratos machos (Chen *et al.*, 2007) e no Cpf de ratas (Toniazio *et al.*, 2007) e a depleção desta subunidade em camundongos aboliu a sensibilização (Morris *et al.*, 2008). Injeções agudas de cocaína alteram os níveis de RNAm da subunidade β_2 no córtex cingulado de machos (Yamaguchi *et al.*, 2000) e no Cpf de fêmeas (Toniazio *et al.*, 2007). Cocaína aguda também alterou a subunidade β_3 no STR e giro dentado, retornando ao normal após um período de tempo (Yamaguchi *et al.*, 2000). As subunidades β_3 mostraram participar da indução da resposta comportamental após uso agudo e crônico da cocaína, bem como mediar as adaptações neuroquímicas que ocorrem durante a sensibilização pelo seu uso repetido (Resnick *et al.*, 1999). Os níveis proteicos da subunidade γ estão aumentados no hipotálamo após a retirada da cocaína (Ma *et al.*, 2008). Paradoxalmente, a auto-administração de cocaína diminui a expressão de RNA mensageiro (RNAm) de α_2 e β_2 no Cpf, de α_2 no STR e de α_4 no Cpf e no HIPc de ratos hiperativos (de Azeredo *et al.*, 2010). Além disso, a expressão gênica das subunidades dos receptores GABA_B sofre aumento na região do HIPc após administração de cocaína (Li *et al.*, 2003). Na exposição pré-natal à cocaína, ocorrem alterações na distribuição das subunidades α_1 , β_2 e γ no córtex cingulado anterior, que retornam ao normal após alguns dias (Shumsky *et al.*, 2002).

Enfim, vários são os estudos que avaliam o papel do sistema GABA nos efeitos dos psicoestimulantes. No entanto, os mecanismos pelos quais a cocaína modifica este sistema, particularmente em fêmeas, ainda não estão completamente estabelecidos, necessitando de pesquisas adicionais que concernem esta questão.

I.1.6.1.2 GABA e os hormônios sexuais femininos

Estudos têm mostrado alterações no sistema GABAérgico secundárias à presença dos hormônios sexuais femininos (Saleh, 2003). O estrógeno tem a capacidade de modular os níveis de RNAm de GAD₆₅ e o GAD₆₇ no cérebro de ratas. O resultado das regiões analisadas mostrou que na área pré-óptica magnocelular, o GAD₆₅ está aumentado enquanto o GAD₆₇ está diminuído pela presença do hormônio. Na região do núcleo médio dorsal do HIPT, os resultados indicaram um aumento de 60% no GAD₆₇ após tratamento com estradiol e uma diminuição de 73% no GAD₆₅. No mesencéfalo houve um aumento no GAD₆₅ e uma diminuição do GAD₆₇ (McCarthy, 1995).

Uma proposta sugerida seria de que o estrógeno aumentaria a resposta neuroquímica a psicoestimulantes nas ratas através da indução de rápidas mudanças na excitabilidade neuronal levada pela ação do estrógeno sobre os neurônios GABAérgicos estriatal causando uma menor estimulação dos receptores GABA_B, conseqüentemente, um aumento na liberação de dopamina (Lynch *et al.*, 2002). O estrógeno também pode modular diferencialmente os níveis de mRNA de outros importantes componentes dentro do SNC como o sistema dopaminérgico, serotoninérgicos bem como a expressão de seus próprios receptores (Zhou, 2002).

A progesterona e seu metabólito ativo, a alopregnanolona, atuam como moduladores positivos dos receptores GABAérgicos (Rupprecht, 2003). Em estudos realizados em nosso laboratório, a progesterona diminui a expressão de RNAm de isoenzimas GABA (GAD₆₅ e GAD₆₇) no Cpf de ratas (Souza *et al.*, 2009). Em ratos

machos, a administração intrahipocampal de alopregnanolona aumentou a expressão da subunidade γ_2 do receptor GABA_A (Nin *et al.*, 2008). Além disso, a expressão das subunidades δ e γ_2 aumentou no hipocampo após administração de alopregnanolona no NAc (Nin *et al.*, 2012). Outro estudo mostra que a progesterona foi capaz de aumentar a subunidade α_1 do receptor GABA_A no córtex pré-frontal de ratos machos e fêmeas e diminuiu a expressão de γ_2 apenas nos machos (Andrade *et al.*, 2012). Na gravidez, quando existe um pico de ALLO, ocorre alteração da subunidade γ_2 no córtex cerebral e no hipocampo de ratas (Follesa *et al.*, 1998; Concas *et al.*, 1999; Follesa *et al.*, 2002), assim como da subunidade α_4 no hipocampo durante a lactação (Concas *et al.*, 1999), após administração de progesterona (Smith *et al.*, 1998).

Neste sentido, sugerimos que a reposição de progesterona atenua os efeitos agudos e crônicos de cocaína em ratos, possivelmente pela modulação de subunidades dos receptores GABA_A e das enzimas de síntese de GABA.

1.1.6.1.3 Precusores do GABA e Cocaína

A avaliação dos precursores do GABA contribuem para uma melhor compreensão do envolvimento dos diferentes sistemas cerebrais no desenvolvimento da sensibilização à cocaína. O chamado ciclo Glutamina (Gln)/GLU-GABA, que será descrito a seguir, é essencial para o funcionamento do SNC (Martinez -Hernandez *et al.*, 1977).

O *glutamato*, além de ser o precursor do GABA (Ricci *et al.*, 2005), conforme citado acima, é o principal neurotransmissor excitatório no SNC, sendo armazenado em vesículas sinápticas e liberado por exocitose cálcio-dependente (Yang *et al.*, 2009).

Este aminoácido exerce suas ações por meio da ativação de receptores ionotrópicos do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico) e cainato, produzindo respostas pré-sinápticas excitatórias

(Brunton *et al.*, 2011). Os receptores NMDA são compostos por 7 subunidades (NR₁-, NR_{2A-D}, NR_{3A-B}) e são os únicos que necessitam de dois agonistas diferentes para a sua ativação. Além de um sítio de ligação para o glutamato, encontrada no NR₂, a ligação da glicina na subunidade NR₁ parece ser essencial para a ativação deste receptor. Os receptores AMPA apresentam 4 subunidades (GluR₁₋₄) enquanto os do tipo cainato são compostos por 5 famílias (GluK₁₋₅). Potenciais excitatórios pós-sinápticos mais lentos podem ser alcançados com a ativação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos. Até hoje, oito membros da família acoplados à proteína G foram identificados (mGluR₁₋₈) (Kapczinski *et al.*, 2011).

O GLU é o neurotransmissor primário nas células piramidais e nas projeções talomocorticais e corticostriatais e também um neurotransmissor importante no hipocampo. Neurônios glutamatérgicos possuem a maior comunicação entre diversas regiões corticais frontais e, entre outros, projeções de neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo para a ATV e o NAc (Kalivas e Volkow, 2005).

A superativação dos receptores NMDA, AMPA e cainato devido a altas concentrações de glutamato pode levar à morte de células neuronais. Esta excitotoxicidade tem sido relacionada com mecanismos de dano ao SNC através do influxo de Ca²⁺ dentro dos neurônios, pela ativação de enzimas que degradam proteínas, membranas e ácidos nucleicos. Este fenômeno pode induzir os danos no SNC que ocorrem após isquemias, hiperglicemia ou epilepsia (Kapczinski *et al.*, 2011; Brunton *et al.*, 2011) ou até mesmo o uso de psicoestimulantes.

O uso de cocaína pode interferir neste sistema neurotransmissor em diferentes regiões cerebrais. Estudos pré-clínicos demonstraram que a utilização crônica de cocaína produz uma redução significativa na transmissão glutamatérgica basal no Cpf (Baker *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2001). Por outro lado, o desafio à cocaína induz

aumento do glutamato extracelular no NAc (Berglind *et al.*, 2009; Pierce *et al.*, 1996) e no Cpf (Steketee e Williams, 2004). Já a retirada de cocaína crônica está associada à redução nos níveis de glutamato extracelular no NAc *core* (Baker *et al.*, 2003). Tais mudanças possuem um papel crítico na dependência e recaída do uso de cocaína (Kalivas e Volkow, 2005).

A *glutamina* constitui 1/5 de todos os aminoácidos presentes no plasma. No SNC, a Gln é importante como um precursor de vários aminoácidos neurotransmissores, incluindo Glu e GABA. No ciclo Gln/Glu-GABA, a Gln é sintetizada a partir do Glu e amoníaco nos astrócitos, numa reação catalisada pela Gln-sintetase. Uma vez nos neurônios, a Gln é novamente convertida em Glu pela enzima mitocondrial glutaminase fosfato-ativada. Uma parte do glutamato pode ser descarboxilado para GABA ou transaminado para aspartato (Martinez -Hernandez *et al.*, 1977; Sidoryk-Wegrzynowicz e Aschner, 2013).

A entrada de Gln nos compartimentos neuronais é facilitada pela sua abundância nos espaços extracelulares em relação a outros aminoácidos. A Gln também parece afetar a neurotransmissão interagindo diretamente com a classe de receptores glutamatérgicos NMDA. Distúrbios do metabolismo e/ou no transporte de Gln contribui para alterações na transmissão glutamatérgica ou GABAérgica associadas a diferentes condições patológicas do cérebro, como na epilepsia (Albrecht *et al.*, 2010) e possivelmente na resposta ao uso de psicoestimulantes.

I.1.6.2 Taurina

A taurina ou ácido 2-aminoetanossulfônico é derivada da cisteína. Ela é um aminoácido não essencial no cérebro, que está amplamente distribuída em tecidos de animais e um dos aminoácidos mais abundantes em mamíferos. A taurina desempenha vários papéis cruciais, incluindo a modulação de sinalização de cálcio, regulação

osmótica, estabilização da membrana, sendo demonstrado um papel neuromodulador inibitório, possivelmente como um neurotransmissor (Kumari *et al.*, 2013).

Estudos têm mostrado que é um agente neuroprotetor e anticataléptico eficaz através de mecanismos fisiológicos e farmacológicos (Lidsky *et al.*, 1995). Possui capacidade de prevenir a apoptose e de agir como um antioxidante (Kumari *et al.*, 2013). Os mecanismos prováveis para as ações neuroprotetoras e anticatalépticas da taurina foram propostos tanto pelo seu antagonismo para a excitotoxicidade do GLU (Quinn e Miller, 1992; Yablonsky-Alter *et al.*, 2009), quanto pelo seu funcionamento como agonista parcial do receptor GABA_A (Quinn e Miller, 1992), aumentando a duração da condutância do canal de Cl⁻ (Wu e Prentice, 2010) e interagindo diretamente com este receptor (Jia *et al.*, 2008). Estes dados fazem sentido uma vez que tem sido reconhecido que a taurina e o GABA são estruturalmente semelhantes e podem compartilhar transportadores no cérebro (Kumari *et al.*, 2013).

I.1.6.2.1 Taurina e cocaína

Esse mecanismo inibitório e neuroprotetor parece dar à taurina uma importante participação nos efeitos das drogas psicoestimulantes. Nos ratos machos, a taurina foi eficaz na diminuição da dependência à cocaína, suprimindo a preferência e a sensibilização locomotora induzida por esta droga (Banerjee *et al.*, 2013). Adicionalmente, estudos mostraram que a exposição crônica e o desafio à cocaína aumentaram significativamente os níveis extracelulares de taurina no STR (Banerjee *et al.*, 2013; Yablonsky-Alter *et al.*, 2009). Por outro lado, a administração aguda de cocaína não alterou as concentrações extracelulares de taurina nesta região (Banerjee *et al.*, 2013). Estudos adicionais que verifiquem o papel deste neurotransmissor nos efeitos dos psicoestimulantes devem ser realizados.

I.2. JUSTIFICATIVA

A neurobiologia da dependência à cocaína ainda possui inúmeras lacunas que necessitam ser desvendadas. O estudo dos mecanismos inibitórios cerebrais, que se contrapõem aos mecanismos excitatórios, relacionados às propriedades de reforço e recaída da cocaína, é de fundamental importância para o tratamento dos usuários de cocaína, uma vez que estes poderão trazer subsídios para o desenvolvimento de novos fármacos.

Embora as mulheres sejam mais sensíveis aos efeitos das drogas de abuso, raros são os estudos que avaliam os efeitos e os mecanismos destas substâncias em indivíduos do sexo feminino. O desenvolvimento de pesquisas voltadas para estes indivíduos, visando o direcionamento de ações de tratamento e de diminuição dos efeitos das drogas no sexo feminino é indispensável.

Portanto, este trabalho justifica-se pela relevância do estudo da influência dos hormônios sexuais femininos na toxicidade da cocaína e nos mecanismos dos sistemas inibitórios cerebrais envolvidos nos efeitos do uso prolongado da cocaína em indivíduos do sexo feminino.

I.3. OBJETIVOS

I.3.1 Objetivo Geral

Verificar o papel dos sistemas inibitórios cerebrais nas alterações comportamentais e neurotóxicas decorrentes da administração repetida de cocaína em ratas em diferentes condições hormonais.

I.3.2 Objetivos Específicos

1) Sensibilização comportamental

Avaliar a influência dos hormônios sexuais femininos na sensibilização comportamental induzida pela administração repetida de cocaína em ratas.

2) Neurotoxicidade da cocaína

Verificar o dano celular no cerebelo, córtex pré-frontal, estriado, hipocampo e hipotálamo de ratas em diferentes condições hormonais tratadas aguda e repetidamente com cocaína.

3) Níveis extracelulares de GABA e seus precursores

Analisar a influência dos hormônios sexuais femininos nos níveis extracelulares *in vivo* de GABA e seus precursores no córtex pré-frontal de ratas tratadas com cocaína.

4) Níveis extracelulares de Taurina

Analisar a influência dos hormônios sexuais femininos nos níveis extracelulares *in vivo* de taurina no córtex pré-frontal de ratas tratadas com cocaína.

PARTE II

ARTIGOS CIENTÍFICOS

Capítulo I

Efeitos modulatórios do estrógeno e da progesterona endógenos ou exógenos na sensibilização comportamental induzida por cocaína em ratas.

Os experimentos realizados e apresentados no artigo a seguir estão associados com o objetivo específico 1 e foram idealizados com a proposta de responder as seguintes perguntas:

- 1) A sensibilização comportamental induzida pela administração repetida de cocaína em fêmeas é melhor expressa através da hiperlocomoção ou da estereotipia?
- 2) Os hormônios sexuais femininos endógenos ou exógenos influenciam diferentemente a sensibilização comportamental em fêmeas?

O artigo foi aceito para publicação na revista *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, fator de impacto 1,14 (Qualis B2).

Behavioral effects of endogenous or exogenous estradiol and progesterone on cocaine sensitization in female rats

Marilise Fraga de Souza¹; Natividade de Sá Couto-Pereira²; Luana Freese¹; Priscila Almeida Costa¹; Greice Caletti¹; Kelly Martins Bisognin¹; Maurício Schüller Nin^{1,3}; Rosane Gomez⁴; Helena Maria Tannhauser Barros¹.

1- Laboratório de Neurociência Comportamental, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA.

2- Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

3- Curso de Farmácia, Centro Metodista do Sul – IPA.

4- Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

Corresponding author:

Marilise Fraga de Souza

Rua Sarmiento Leite, 245, sala 317 - Divisão de Farmacologia, UFCSPA

90050-170 - Porto Alegre, RS, Brazil

E-mail: marifs@ufcspa.edu.br

Phone: +5551-330388221

Abstract

Cocaine sensitization is a marker for some facets of addiction and is greater in female rats and may be influenced by their sex hormones. We compared the modulatory effects of endogenous or exogenous estradiol and progesterone on cocaine-induced behavioral sensitization in female rats. Ovariectomized female rats received: progesterone, estradiol, progesterone plus estradiol or oil. Sham-operated females received oil as control. Control and acute subgroups received injections of saline while the repeated group received cocaine (15 mg/kg i.p.) for 8 days. After 10 days, the acute and repeated groups received a challenge dose of cocaine, after which locomotion and stereotypy were monitored. The estrous-cycle phase was evaluated and blood was collected to verify hormonal levels. Repeated cocaine treatment induced overall behavioral sensitization in female rats, with increased locomotion and stereotypies. In detailed analysis, ovariectomized rats showed no locomotor sensitization, however, the sensitization of stereotypies was maintained. Only females with endogenous estradiol and progesterone demonstrated increased locomotor activity after the cocaine challenge. Estradiol replacement enhanced stereotyped behaviors after repeated cocaine. Cocaine sensitization of stereotyped behaviors in female rats was lower after progesterone replacement, either alone or concomitant with estradiol. The behavioral responses (locomotion and stereotypy) to cocaine were affected differently depending on whether the female hormones were of an endogenous or exogenous origin. Therefore, hormonal cycling appears to be an important factor in the sensitization of females. While estradiol increases the risk of cocaine sensitization, progesterone may be further studied as a pharmacological treatment in the prevention of psychostimulant abuse.

Keywords: Cocaine; Locomotor activity; Female rats; Estradiol; Progesterone; Stereotypic activity

1. Introduction

Behavioral sensitization occurs after repeated psychostimulant use and is well described for drugs such as cocaine. This phenomenon is characterized by enhanced stereotypy or motor-stimulant responses, after a delay of days or weeks, following repeated intermittent administration of psychostimulants. Behavioral sensitization is thought to underlie some facets of cocaine addiction, including craving and relapse¹.

The prevalence of cocaine use and abuse has been increasing rapidly among women in recent years. In fact, women are more likely to use cocaine at an earlier age and with a higher frequency than men². Moreover, women tend to take less time to become addicted, use it in larger amounts, and show more craving signals than men³. Similarly, in experimental animals, the hormonal differences between males and females appear to influence both the use of cocaine and its behavioral effects, with females showing more intense acute behavioral effects than males⁴. Female rats have also been found to have more intense responses to the repeated administration of cocaine in studies involving sensitization, conditioned place preference, self-administration and dose escalation⁵.

Hormonal fluctuations play an important role in women's responses to drugs, suggesting that sex steroids modulate the subjective actions of cocaine⁶. Indeed, the reinforcing effects of drug abuse are greater during the follicular phase in women, and craving sensations are stronger when estrogen and progesterone levels are high⁷. In female rats, the behavioral effects of cocaine vary according to the estrous cycle phase⁸. Interestingly, the behavioral responses to cocaine are enhanced in the proestrus and estrus phases in female rats, when estrogen and progesterone levels are high⁹⁻¹¹. Ovariectomy abolishes the behavioral differences in response to cocaine administration between male and female rats and also delays behavioral sensitization and self-

administration in female rats¹², suggesting that hormonal fluctuations act as positive factors in the reinforcing properties of cocaine.

Despite the relevance of the hormonal condition on psychostimulant intake, the influence of the concomitant administration of progesterone and estrogen on females receiving repeated cocaine exposures is poorly understood. It is already known in rodents that estrogen increases sensitization^{13,14}, cocaine self-administration^{15,16} and relapses during the reinstatement phase¹⁷. However, progesterone appears to attenuate the effects of cocaine, acting as a protective factor. Exogenous treatment with progesterone reverses the effects of estrogen relative to the acquisition of self-administration of cocaine, attenuation of the motor response and inhibition of the place preference for cocaine¹⁸. In addition, cocaine-induced hyperactivity and self-administration are less intense during stages of the estrous cycle in which progesterone levels are high^{10,16}. A significant increase in responses also occurs during the reinstatement of cocaine use in rats during estrous phases relative to non-estrous phases, and this effect is selectively attenuated by progesterone¹⁹. In spite of several references showing the attenuation of cocaine effects by progesterone, other authors observed that progesterone might not have any influence²⁰ or, even, potentiate psychostimulant effects²¹.

Overall, studies investigating the effects of physiological variations of hormonal cycles or of hormone replacement therapy on cocaine-induced behavioral sensitization in females are scarce. It seems reasonable to expect that estrogen increases and progesterone decreases cocaine effects and that progesterone attenuates estrogen effects on cocaine when both hormones are on board. Thus, the aim of this study was to compare the modulatory effects of endogenous or exogenous estradiol and progesterone on cocaine-induced behavioral sensitization in female rats.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult (2 months age) female Wistar rats, 200-250 g (n=106; 6-7 animals for ovariectomized groups and 12 for sham groups), were obtained from the Animal Facility of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). The animals were housed in groups of five in polypropylene cages (33 X 17 X40 cm). Food and water were available *ad libitum*, and the animals were maintained in a temperature-controlled room (23±2°C) under a 12 h light-dark cycle (lights on from 7 am–7 pm). All *in vivo* experiments followed the guidelines of the International Council for Laboratory Animal Science and were approved by the Ethical Committee for Research of UFCSPA (# 1034/10). All efforts were made to minimize animal suffering and to use only the number of animals necessary to produce reliable scientific data.

2.2. Drugs

Cocaine hydrochloride (Merck, Germany) at 15 mg/mL was dissolved in a saline solution. Progesterone (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) and estradiol benzoate (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) were dissolved in an oil vehicle at concentrations of 0.5 mg/mL and 0.05 mg/mL, respectively.

2.3. Procedures

Bilateral ovariectomies were performed in 70 rats under intraperitoneal (i.p.) anesthesia with xylazine (10 mg/kg) and ketamine hydrochloride (75 mg/kg). Sham surgeries were performed in 36 rats (SHAM). Ovariectomized rats were randomly assigned to progesterone (PRO), estradiol (EST), progesterone plus estradiol (PRO+EST) or control ovariectomized (OVX) groups. The SHAM and OVX groups received the oil vehicle at 1 mL/kg. All sex hormone or vehicle administrations began

10 days after the ovariectomy/sham surgery¹⁷ and were delivered by subcutaneous (s.c.) administration (Figure 1).

One day after the beginning of the hormonal treatment, the rats were randomly assigned to receive either 1 mL/kg saline (control - CTR or acute - ACT groups) or 15 mg/kg cocaine (repeated - RPT group), once a day, for 8 consecutive days (sensitization phase). The rats were then submitted to a wash-out administration period of 10 days, after which they received a single challenge dose of either saline (CTR group) or 15 mg/kg cocaine (ACT and RPT groups)²².

2.4. Estrous cycle analysis and sex hormone analysis

Monitoring of the estrous cycle was performed by examining the cellular characteristics of vaginal smears collected after the behavioral assessments²³. In addition, at the end of the behavioral tests, the animals were sacrificed and trunk blood was collected, centrifuged and the serum was then stored at -20°C for subsequent analysis of the hormone levels. Estradiol (calibrator range 20 – 3200 pg/mL) and progesterone (calibrator range 0.2 – 40 ng/mL) levels were determined by ELISA using commercial reagents (Diagnostics Biochem Canada Inc, Canada and Symbiosys, Brazil, respectively).

2.5. Behavioral activity

Rats were placed individually, for 10 minutes, in a locomotor activity cage (80 x 26 x 22 cm) with three photocells (Alsbarsch, São Paulo, Brazil) to monitor horizontal locomotor activity. This procedure also had the purpose of habituating the rats to the experimental apparatus. After the habituation period, the rats received saline or cocaine and were immediately placed back into the locomotor activity cage. Based on protocol of Scheggi et al.²², the locomotor activity of rats was monitored for 30 minutes and locomotion counts were registered every 10 min.

Each animal was videotaped in the locomotion cage, and the animal's behavior was analyzed during a 30-second time window at 10, 20 and 30 minutes after the injection of cocaine or saline. The videotapes were analyzed for behavioral stereotypy by a trained observer blind to each animal's treatment. The rating for cocaine-induced stereotypic behavior was based on a modification²⁴ of the Creese and Iversen scale²⁵ (see Table 1).

2.6. Statistical analysis

A one-way ANOVA followed by a Student-Newman-Keuls (SNK) post hoc comparison was used to determine the statistical significance of the mean values for the progesterone and estradiol levels. A one-way ANOVA followed by a SNK post hoc comparison was used to determine the statistical significance of the total scores of locomotion and stereotypy. A two-way RM ANOVA followed by a SNK post hoc comparison was used to determine the statistical significance of the locomotion counts and stereotypy scores. Correlation between locomotion counts and stereotypy score was analyzed using the Spearman Test. A value of $p < 0.05$ was used as the acceptable level of significance.

3. Results

3.1. Estrous cycle and hormonal analysis

The estrous cycle analysis on the challenge day showed that 48% of SHAM rats were in the metestrus phase ($n=16$), 24% in diestrus ($n=8$), 14% in proestrus ($n=6$), and only 14% in estrus ($n=6$). Rats of the SHAM and OVX groups had vaginal cellular characteristics corresponding to the specific hormonal treatment, as described by Montes and Luque²⁶. The analysis of hormonal levels in the serum from the last experimental day (Table 2) indicated that the progesterone levels were higher in the SHAM, PRO and PRO+EST groups than in the OVX rats ($F_{(4,56)} = 3.79$; $P = 0.009$).

Likewise, the estradiol levels were significantly higher in the SHAM, EST and PRO+EST rats than in the OVX ($F_{(4,59)} = 2.707$; $P = 0.039$).

3.2. Behavioral observations

Repeated administration of cocaine during the sensitization protocol showed behavioral consequences in both the locomotor and stereotypy observations in female rats. After a subsequent challenge with cocaine at 15 mg/kg, the total locomotion of RPT animals (mean \pm SEM: 427.90 ± 47.98) was significantly higher than ACT animals (281.58 ± 35.22), and both were higher than the CTR group (50.25 ± 8.20) ($F_{\text{treat}(2,73)} = 29.21$; $P < 0.001$). However, the behavioral differences varied according to the hormonal condition of the rats, with only the SHAM animals exhibiting locomotion sensitization ($F_{\text{treat}(2,16)} = 12.82$; $P < 0.001$). For the females in different hormonal conditions, the analysis of locomotor activity over the 30 minutes following the administration of saline or cocaine during the challenge treatment is illustrated in figures 2A to 2E. Locomotion of the SHAM rats (Figure 2A) was highest, followed by RPT cocaine than ACT at 10 and 20 minutes after cocaine administration, with both RPT and ACT higher than the controls (CTR) over the time. No significant change was detected in the locomotion of OVX rats treated with ACT or RPT cocaine (Figure 2B). In both groups that received estradiol, PRO+EST (Figure 2C) and EST (Figure 2E), both RPT and ACT cocaine equally increased locomotion at 10 minutes, with no differences between the RPT and ACT treatments. However, in the group receiving PRO replacement (Figure 2D), only RPT cocaine animals showed higher locomotion than the CTR at 10 minutes after cocaine administration ($F_{\text{group}(14,146)} = 5.85$; $P < 0.001$; $F_{\text{time}(2,146)} = 9.66$; $P < 0.001$; $F_{\text{int}(28,146)} = 1.99$; $P = 0.005$).

The results of the sum of stereotypic behavioral scores indicated that the RPT cocaine-treated rats (mean \pm SEM: 13.89 ± 0.54) exhibited higher stereotypy than the

ACT animals (11.03 ± 0.54), and both RPT and ACT were higher than the CTR rats (5.36 ± 0.53) ($F_{\text{treat}(2,57)} = 66.59$; $P < 0.001$). The cocaine-induced stereotypy also was different according to the hormonal condition of the rats, with less stereotypies after repeated cocaine in OVX, PRO and PRO+EST groups relative to both SHAM and EST animals ($F_{\text{cond}(4,57)} = 2.75$; $P = 0.04$). The analysis of the stereotypic over the 30 minutes following the administration of saline or cocaine during the challenge treatment found significant differences according to the cocaine treatment and hormonal condition ($F_{(14,57)} = 10.84$; $P < 0.001$), as illustrated in Figures 3A to 3E. The results indicated that the SHAM animals (Figure 3A) treated with cocaine (ACT or RPT) presented higher stereotypy score than CTR over time. The RPT treated group presented higher stereotypy than ACT at 20 minutes after cocaine challenge. In OVX rats (Figure 3B), ACT cocaine enhancer stereotypy at 20 and 30 min after cocaine, when compare to CTR. The RPT group presented higher stereotyped behavior than CTR over the time and than ACT at 20 and 30 min after cocaine administration. In contrast, the stereotypy of the PRO+EST (Figure 3C) and PRO rats (Figure 3D) showed no difference between the RPT and ACT cocaine-treated animals, though both the RPT and ACT groups were higher than the CTR saline-treated animals. In the EST group (Figure 3E), ACT and RPT cocaine enhanced stereotyped behavior when compare to CTR over the time, while RPT cocaine treated rats presented higher stereotypy than ACT at 10 and 20 minutes after cocaine challenge.

When the estrous cycle phase was considered in SHAM female rats, the RPT group presented higher total locomotor activity than ACT in estrus ($F_{\text{treat}(2,25)} = 10.674$; $P < 0.001$) (Figure 4A). However, when the sum of the punctuation on stereotypy scale was considered (Figure 4B), the RPT group presented higher stereotypy than ACT in

proestrus phase ($F_{\text{treat}(2,18)} = 34.317$; $P = 0.009$). The powers of performed tests for locomotion and stereotypy results were 0.977 and 0.975, respectively.

Comparing the locomotion counts with the stereotypy scores of repeated cocaine treated rats we observed an inverse correlation between these two variables, most strongly in the SHAM-RPT group ($R = -0.62$; $P = 0.028$) (Figure 5A). Contrarily, in the OVX-RPT animals (Figure 5B), we observed a direct correlation between locomotion and stereotypy ($R = 0.85$; $P = 0.002$).

4. Discussion

We have shown here that endogenous or exogenous estradiol and progesterone differentially affect the behavioral responses to cocaine sensitization in female rats. Interestingly, we found that the regular hormonal cycling in intact female rats (SHAM operated) was the only hormonal condition that showed sensitization for locomotor activity after a later cocaine challenge. However, when stereotyped behaviors were considered as a characteristic of cocaine-sensitization, we found that all hormonal conditions, except exogenous progesterone administration (combined or not with estradiol), were able to promote sensitization in female rats.

In accordance with previous studies¹³, our results indicate that repeated cocaine treatment induces behavioral sensitization in female rats, demonstrated by both an increase in locomotion and stereotypy behaviors. However, after a cocaine challenge for ovariectomized female rats, we did not observe locomotor sensitization even though stereotypy sensitization remained. It is already known that higher doses of repeated cocaine treatment in intact female rats induces a classical dopaminergic syndrome characterized by increased locomotion followed by increased stereotypies and hind limb splaying, thus decreasing the initial hyperlocomotion²⁷. In fact, hyperlocomotion or stereotypies²⁷ are not uncommon after psychostimulant administration in animals.

Studies have already shown that cocaine administration at low to moderate doses increases locomotor activity, while higher doses or repeated administration produces stereotypy instead of locomotor activity in rodents^{27,28}. In our current study, for all hormonal conditions in sensitized female rats, we observed a tendency for an increase in the stereotypy in detriment to the locomotor activity 30 minutes after the cocaine challenge, a pattern of behavior usually observed after very high doses of psychostimulants and/or chronic drug administration in rodents²⁸. Because of the competition between locomotor activity and stereotypic behaviors, we may infer that locomotion is not the only behavior directly related to the magnitude of the response to the cocaine challenge in the sensitized rats. Thus, our results are evidence for the importance of the concurrent evaluation of both locomotor and stereotypy behaviors in future similar studies.

The study of drug effects in females is instructive because the interaction of hormone fluctuations with the physiological effects of the drug can induce behavioral differences to the same drug dose between individuals or even within an individual over time. Although most studies that assess behavioral sensitization to cocaine are performed in male animals, a handful of studies conducted on female rats have pointed to the presence of higher locomotor sensitization in females than males¹³. Here, we showed that female rats exhibit higher locomotion and stereotypy scores in repeatedly cocaine-treated female rats than those only acutely treated with cocaine. However, only SHAM-operated rats exhibited sensitization for both the locomotor and stereotypy behaviors. Chin et al.⁹ also observed higher cocaine sensitization in hormonally intact female rats than in ovariectomized female rats as well as male rats. These results also agree with others that point to the influence of hormonal fluctuations on the reinforcing properties of psychostimulant drugs in women¹².

Indeed, the psychostimulant effect after acute cocaine administration is greater during the proestrus and estrus phases in intact female rats, when estradiol is the main hormone and progesterone is still increasing in the plasma^{8,10,11}. In the current study, we found that physiological hormones also exert an influence on behavioral sensitization after repeated cocaine administration in female rats, with cocaine sensitization evidenced in estrus and proestrus phases, described in the literature as the phases with higher levels of estradiol and progesterone². Furthermore, half of our SHAM-operated female rats were in the metestrous phase that, under our experimental conditions, corresponded with a high level of estradiol in the plasma. Coincidentally, we also found that exogenous estradiol increased the locomotion and stereotypy behaviors in both the acute and repeated cocaine-treated rats. These results agree with previous studies that have shown that estradiol has an important role in cocaine sensitization in rats¹⁴.

As expected, our OVX female rats did not show locomotor sensitization after a cocaine challenge. Previous studies have also found that ovariectomy decreases or delays behavioral sensitization to cocaine and also decreases the self-administration behavior of female rats¹². However, although previous studies have not found a significant increase in stereotypy behavior after acute or repeated cocaine administration in OVX rats^{9,29}, we found that acutely administered or cocaine-sensitized OVX-rats had more stereotypy behaviors than control (saline-injected) rats. Curiously, exogenous progesterone, with or without estradiol, abolished these stereotypy behaviors in the OVX rats.

The behavioral effects of exogenous estradiol and progesterone have been studied previously in cocaine-sensitized ovariectomized female animals. Most studies have found that estradiol administration is associated with increasing cocaine sensitization while progesterone administration is associated with decreasing these

behaviors¹³. Here, we have found that endogenous estradiol increased locomotion (evidenced by higher estradiol levels in SHAM rats) and estradiol replacement increased stereotypy behaviors in ovariectomized rats subjected to either acute or repeated treatments with cocaine. These results reproduced other findings that have shown an increased behavioral cocaine sensitization due to estrogen administration^{10,13,14}. Therefore, it appears that estrogen plays an important role in the physiology of the cocaine reward process, increasing the sensitization mechanisms to cocaine in female rats. Indeed, it has been suggested that estradiol increases the psychostimulant effect of cocaine in rats through estrogen receptor alpha³⁰. Moreover, it causes changes in the neuronal excitability that is regulated by GABA_B receptors on dopaminergic terminals in the striatum, decreasing the activity of GABA_B receptors and thereby enhancing dopamine release². The authors do not discount that other mechanisms such as the sensitization of catecholaminergic neurons by estradiol or estrogen's direct action on dopaminergic and serotonergic receptors may explain the modification of cocaine sensitization behaviors by estradiol^{3,6}. We hypothesize that estradiol enhances the sensitization mechanisms and increases the magnitudes of the behavioral responses of locomotion and stereotypy³¹. Thus, we have shown that exogenous or endogenous estradiol increases the behavioral sensitization to cocaine in female rats.

Additionally, in our study, although OVX rats that were administered progesterone or progesterone plus estradiol treated with cocaine had a greater behavior when compare to control, they exhibited a lack of the stereotypy behaviors characteristic of cocaine sensitization. These results agree with others with respect to only progesterone administration decreasing stereotypy behaviors in cocaine-sensitized female rats^{15,29}, but there is no consensus in respect to the co-administration of

progesterone and estradiol. Some authors have found that progesterone plus estradiol increases locomotion but not stereotypy after repeated cocaine administration in OVX rats^{29,32}. These discrepancies may be due to differences in dosage because low doses of estradiol did not change locomotor activity in female rats when given repeated cocaine treatments¹⁵.

In addition to exogenous progesterone decreasing stereotypy behaviors, studies have shown that progesterone other effects relative to responses to cocaine: a) progesterone reverses the effects of estradiol on the acquisition of cocaine self-administration¹⁶; b) progesterone attenuates motor responses to cocaine^{33,34}; and c) progesterone inhibits place preference for cocaine in rats³⁵. Additionally, the hyperactivity induced by cocaine and cocaine self-administration are less in estrous stages in which progesterone is higher^{10,16}. In humans, although some studies show that progesterone is not effective in reducing cocaine use²⁰ and increases positive subjective effects of amphetamine²¹, most studies show that progesterone attenuates the effects of cocaine in women³⁶.

The role of progesterone and its active metabolite, allopregnanolone, has been evaluated in the central nervous system (CNS) due to progesterone's positive modulation of gamma-aminobutyric acid (GABA), the main inhibitory neurotransmitter in the CNS. In studies conducted in our laboratory, progesterone decreased the mRNA expression of GABA isoenzymes (GAD₆₅ and GAD₆₇) in the prefrontal cortex³⁷. Additionally, the intrahippocampal administration of allopregnanolone enhanced the mRNA expression of the γ_2 GABA_A subunit³⁸. Both δ and γ_2 GABA_A subunit expression increased in the rat hippocampus after allopregnanolone intra-nucleus accumbens treatment³⁹. Progesterone increased $\alpha 1$ GABA_A subunit mRNA in the prefrontal cortex of both male and female rats and decreased the GABA_A $\gamma 2$ mRNA

expression in male rats⁴⁰. Thus, we suggest that progesterone replacement attenuates the acute and chronic effects of cocaine in rats, possibly by the modulation of GABA_A receptor subunits and GABA synthesis.

Concluding, in this study, we have shown that endogenous or exogenous estradiol and progesterone differentially affect the behavioral responses of cocaine-sensitized female rats. Intact female rats showed sensitization for locomotor activity after a cocaine challenge. Progesterone decreased cocaine sensitization in ovariectomized rats. We may infer from our data that the normal cyclic changes in both hormones increase the risk of drug abuse by potentiating cocaine sensitization mechanisms. The more important observation is that exogenous progesterone, given as a replacement in our study, decreases cocaine sensitization in female rats, and therefore may protect against drug dependence and drug-use relapse. Future studies are needed to verify if chronic progesterone administration is useful for the prevention and treatment of cocaine abuse, for both male and female individuals.

6. Acknowledgment: This study received support from UFCSPA, CNPQ and CAPES.

7. References

1. Steketee JD, Kalivas PW. Drug Wanting: Behavioral Sensitization and Relapse to Drug-Seeking Behavior. *Pharmacol Rev* 2011; 63: 348-365.
2. Lynch WJ, Roth ME, Carroll ME. Biological basis of sex differences in drug abuse: preclinical and clinical studies. *Psychopharmacol* 2002; 164: 121-137.
3. Hu M, Becker JB. Acquisition of cocaine self-administration in ovariectomized female rats: Effect of estradiol dose or chronic estradiol administration. *Drug Alcohol Depend* 2008; 94: 56-62.
4. Walker QD, Cabassa J, Kaplan KA, Li ST, Haroon J, Spohr HA, Kuhn CM. Sex Differences in Cocaine-Stimulated Motor Behavior: Disparate Effects of Gonadectomy. *Neuropsychopharmacol* 2001; 25: 118-130.
5. Becker JB, Hu M. Sex differences in drug abuse. *Front Neuroendocrinol* 2008; 29(1): 36-47.
6. Segarra AC, Agosto-Rivera JL, Febo M, Lugo-Escobar N, Menéndez-Delmestre R, Puig-Ramos A, Torres-Diaz YM. Estradiol: A key biological substrate mediating the response to cocaine in female rats. *Horm Behav* 2010; 58: 33-43.
7. Sofuoglu M, Dudish-Poulsen S, Nelson D, Pentel PR, Hatsukami DK. Sex and menstrual cycle differences in the subjective effects from smoked cocaine in humans. *Exp Clin Psychopharmacol* 1999; 7: 274-283.
8. Sell SL, Thomas ML, Cunningham KA. Influence of estrous cycle and estradiol on behavioral sensitization to cocaine in female rats. *Drug Alcohol Depend* 2002; 67: 281-290.
9. Chin J, Sternin O, Wu HBK, Burrell S, Lu D, Jenab S, Perrotti LI, Quinones-Jenab V. Endogenous gonadal hormones modulate behavioral and neurochemical

- responses to acute and chronic cocaine administration. *Brain Res* 2002; 945: 123-130.
10. Sell SL, Scalzitti JM, Thomas ML, Cunningham KA. Influence of Ovarian Hormone and Estrous Cycle on the Behavioral Response to Cocaine in Female Rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293: 879-886.
 11. Quiñones-Jenab V, Ho A, Schlussman SD, Franck J, Kreek MJ. Estrous cycle differences in cocaine-induced stereotypic e locomotor behaviors in Fischer rats. *Behav Brain Res* 1999; 101: 15-20.
 12. Quiñones-Jenab V. Why are women from Venus and men from Mars when they abuse cocaine? *Brain Res* 2006; 1126: 200–203.
 13. Festa ED, Quiñones-Jenab V. Gonadal hormones provide the biological basis for sex differences in behavioral responses to cocaine. *Horm Behav* 2004; 46: 509-519.
 14. Hu M, Crombag HS, Robinson TE, Becker JB. Biological basis of sex differences in the propensity to self-administer cocaine. *Neuropsychopharmacol* 2004; 29: 81–85.
 15. Yang H, Zhao W, Hu M, Becker JB. Interactions among ovarian hormones and time of testing on behavioral sensitization and cocaine self-administration. *Behav Brain Res* 2007; 184: 174-184.
 16. Jackson LR, Robinson TE, Becker JB. Sex differences e hormonal influences on acquisition of cocaine self-administration in rats. *Neuropsychopharmacol* 2006; 31: 129-138.
 17. Larson EB, Roth M E, Anker AJ, Carroll ME. Effect of short- and long-term estrogen on reinstatement of cocaine-seeking behavior in female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2005; 82: 98–108.

18. Evans SM, Foltin RW. Does the Response to Cocaine Differ as a Function of Sex or Hormonal Status in Human and Non-human Primates? *Horm Behav* 2010; 58(1): 13-21.
19. Feltenstein MW, Byrd EA, Henderson AR, See RE. Attenuation of cocaine-seeking by progesterone treatment in female rats. *Psychoneuroendocrinol* 2009; 34(3): 343-52.
20. Reed SC, Evans SM, Bedi G, Rubin E, Foltin RW. The Effects of Oral Micronized Progesterone on Smoked Cocaine Self-Administration in Women. *Horm Behav* 2011; 59(2): 227-235.
21. Reed SC, Levin FR, Evans SM. The Effects of Progesterone Pretreatment on the Response to Oral d-Amphetamine in Women. *Horm Behav* 2010; 58(3): 533-43.
22. Scheggi S, Raone A, De Montis MG, Tagliamonte A, Gambarana C. Behavioral expression of cocaine sensitization in rats is accompanied by a distinct pattern of modifications in the PKA/DARPP-32 signaling pathway. *J Neurochem* 2007; 103: 1168–1183.
23. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 2002; 62(4a): 609-614.
24. Daunais JB, McGinty JF. Cocaine binges differentially alter striatal preprodynorphin and *zif/268* mRNAs. *Mol Brain Res* 1995; 29: 201-210.
25. Creese I, Iversen S. The role of forebrain dopamine systems in amphetamine induced stereotyped behavior in the rat. *Psychopharm (Berl)* 1974; 39(1): 345-357.
26. Montes GS, Luque EH. Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anat (Basel)* 1998; 133(3): 192-199.

27. Flagel SB, Robinson TE. Quantify the psychomotor activating effects of cocaine in the rat. *Behav Pharm* 2007; 18: 297-302.
28. Kuczenski R, Segal DS, Aizenstein ML. Amphetamine, cocaine, and fencamfamine: 27. relationship between locomotor and stereotypy response profiles and caudate and accumbens dopamine dynamics. *J Neurosci* 1991; 11: 2703–2712.
29. Perrotti LI, Russo SJ, Fletcher H, Chin J, Webb T, Jenab S, Quiñones-Jenab V. Ovarian Hormones Modulate Cocaine-Induced Locomotor and Stereotypic Activity. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 937: 202-216.
30. Van Swearingena AED, Sanchez CL, Frisbeea SM, Williams A, Walker QD, Korachc KS, Kuhn CM. Estradiol replacement enhances cocaine-stimulated locomotion in female C57BL/6 mice through estrogen receptor alpha *Neuropharmacol* 2013; 72: 236-49.
31. Robinson TE, Becker JB. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res* 1986; 396(2): 157–198.
32. Sircar R, Kim D. Female gonadal hormones differentially modulate cocaine-induced behavioral sensitization in Fischer, Lewis, and Sprague–Dawley rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 289: 54–65.
33. Russo SJ, Festa ED, Fabian SJ, Gazi FM, Kraish M, Jenab S, Quiñones-Jenab V. Gonadal hormones differentially modulate cocaine-induced conditioned place preference in male e female rats. *Neurosci* 2003; 120: 523-533.
34. Russo SJ, Jenab S, Fabian SJ, Festa ED, Kemen LM, Quiñones-Jenab V. Sex differences in the conditioned rewarding effects of cocaine. *Brain Res* 2003; 97 (1-2): 214-220.

35. Niyomchai T, Russo SJ, Festa ED, Akhavan A, Jenab S, Quiñones-Jenab V. Progesterone inhibits behavioral responses e estrogen increases corticosterone levels after acute cocaine administration. *Pharmacol Biochem Behav* 2005; 80: 603-610.
36. Evans SM. The role of estradiol and progesterone in modulating the subjective effects of stimulants in humans. *Exp Clin Psychopharmacol* 2007; 15(5): 418-26.
37. Souza MF, Toniato VM, Frazzon AP, Balrros HM. Influence of progesterone on GAD65 and GAD67 mRNA expression in the dorsolateral striatum and prefrontal cortex of female rats repeatedly treated with cocaine. *Braz J Med Biol Res* 2009; 42(11): 1068-1075.
38. Nin MS, Salles FB, Azeredo LA, Frazon AP, Gomez R, Barros HM. Depressant effect and changes of GABAA receptor gamma2 subunit mRNA after hippocampal administration of allopregnanolone in rats. *J Psychopharmacol* 2008; 22(5): 477-485.
39. Nin MS, Ferri MK, Couto-Pereira NS, Souza MF, Azeredo LA, Agnes G, Gomez R, Barros HM. The effect of intra-nucleus accumbens administration of allopregnanolone on δ and γ 2 GABA(A) receptor subunit mRNA expression in the hippocampus and on depressive-like and grooming behaviors in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2012; 103(2): 359-366.
40. Andrade S, Arbo BD, Batista BAM, Neves AM, Branchini G, Brum IS, Barros HMT, Gomez R, Ribeiro MFM. Effect of progesterone on the expression of GABA_A receptor subunits in the prefrontal cortex of rats: implications of sex differences and brain hemisphere. *Cell Biochem Funct* 2012; 30(8): 696–700.

Legends

Tables

Table 1. Rating stereotypy scale from Daunais and McGinty²⁴

Table 2. Hormonal concentrations according to sex-hormone-treated group on the last experimental day (mean \pm SEM) and number of animals (n/n total) according estral cycle phase in SHAM rats.

Figures

Figure 1. Schematic time-line representation of experimental design.

Figure 2. The locomotor activity of female rats over the 30 minutes following administration of saline (control) or cocaine to acute or repeated-cocaine-exposure rats on the challenge treatment day, according to the different hormonal conditions. A. Sham female rats. B. Ovariectomized female rats. C. Ovariectomized female rats treated with progesterone plus estradiol. D. Ovariectomized female rats treated with progesterone. E. Ovariectomized female rats treated with estradiol. Legends: Saline (CTR); Acute cocaine (ACT); Repeated cocaine (RPT); * represents difference from CTR; \times represents difference from ACT.

Figure 3. The stereotypic behaviors of female rats over the 30 minutes following administration of saline (control) or cocaine to acute or repeated-cocaine-exposure rats on the challenge treatment day, according to the different hormonal conditions. A. Sham

female rats. B. Ovariectomized female rats. C. Ovariectomized female rats treated with progesterone plus estradiol. D. Ovariectomized female rats treated with progesterone. E. Ovariectomized female rats treated with estradiol. Legends: Saline (CTR); Acute cocaine (ACT); Repeated cocaine (RPT); * represents difference from CTR; × represents difference from ACT.

Figure 4. Behaviors of the SHAM female rats according to the estral cycle phases and to the cocaine treatment. **A.** Total locomotion counts. **B.** Sum of the stereotypy scores. Bars represents mean±SEM. Legends: Saline (CTR); Acute cocaine (ACT); Repeated cocaine (RPT); * represents difference from CTR; × represents difference from ACT.

Figure 5. Correlation between locomotion counts or stereotypy scores and the time block (10, 20 or 30 min) after the challenge cocaine injection in repeat-treated female rats (mean ± SEM). Legends: Stereotypy score (STER); Locomotion counts (LOC); repeated cocaine (RPT); Sham (SHAM); Ovariectomized (OVX); Progesterone + estradiol (PRO+EST); Progesterone (PRO); Estradiol (EST). * represents significant negative correlation. # represents significant positive correlation.

Table 1.

Score	Behavior
1	asleep, inactive
2	alert, actively grooming
3	increased sniffing in one location
4	intermittent rearing and sniffing
5	increased locomotion and sniffing
6	intense sniffing in one location
7	continuous pivoting and sniffing
8	continuous rearing and sniffing
9	maintained rearing and sniffing for > 25 s
10	splayed hind limbs

Table 2.

	SHAM	OVX	PRO+EST	PRO	EST
Progesterone (ng/mL)	13.97±2.34*	6.15±1.28	13.22±2.93*	16.03±3.38*	5.68±0.85
Metestrus (10/21)	11.82±3.07				
Diestrus (5/21)	10.60±0.64				
Proestrus (3/21)	15.68±6.37				
Estrus (3/21)	17.83±5.23				
Estradiol (pg/mL)	108.29±33.84*	42.41±5.91	75.31±12.82*	35.45±7.10	130.61±24.09*
Metestrus (10/21)	141.24±67.09				
Diestrus (5/21)	46.00±23.30				
Proestrus (3/21)	110.95±53.15				
Estrus (3/21)	58.40±9.14				

Legends: Sham (SHAM); Ovariectomized (OVX); Progesterone + Estradiol (PRO+EST); Progesterone (PRO); Estradiol (EST); * represents difference from OVX.

Figure 1.

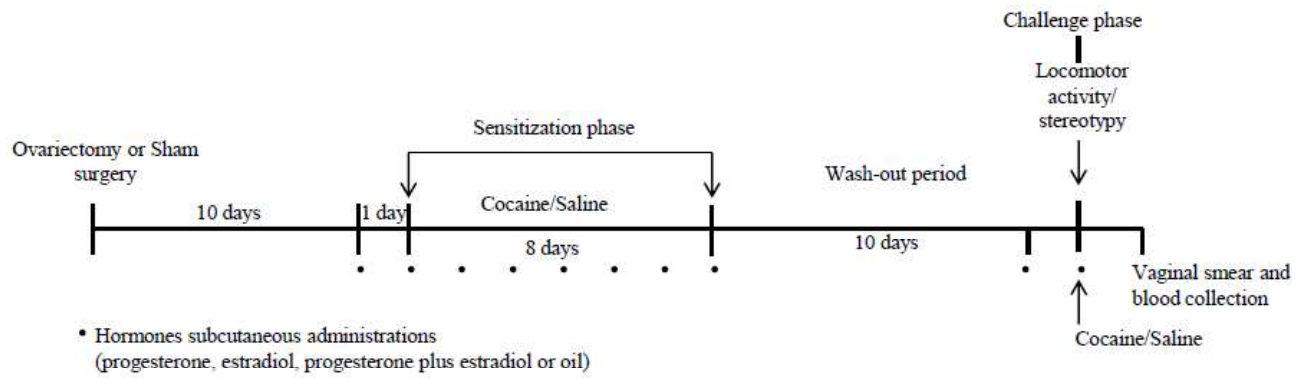


Figure 2.

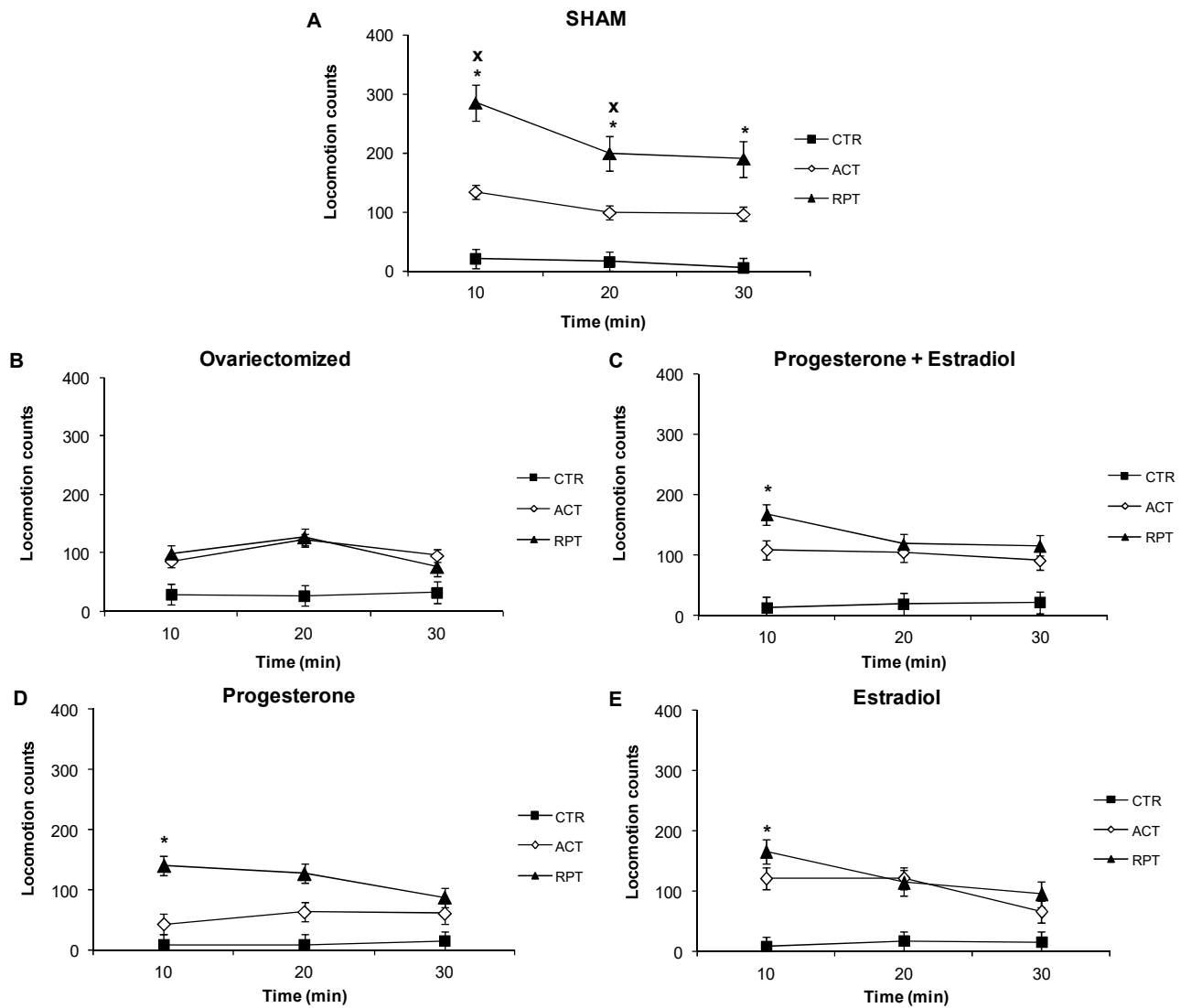


Figure 3.

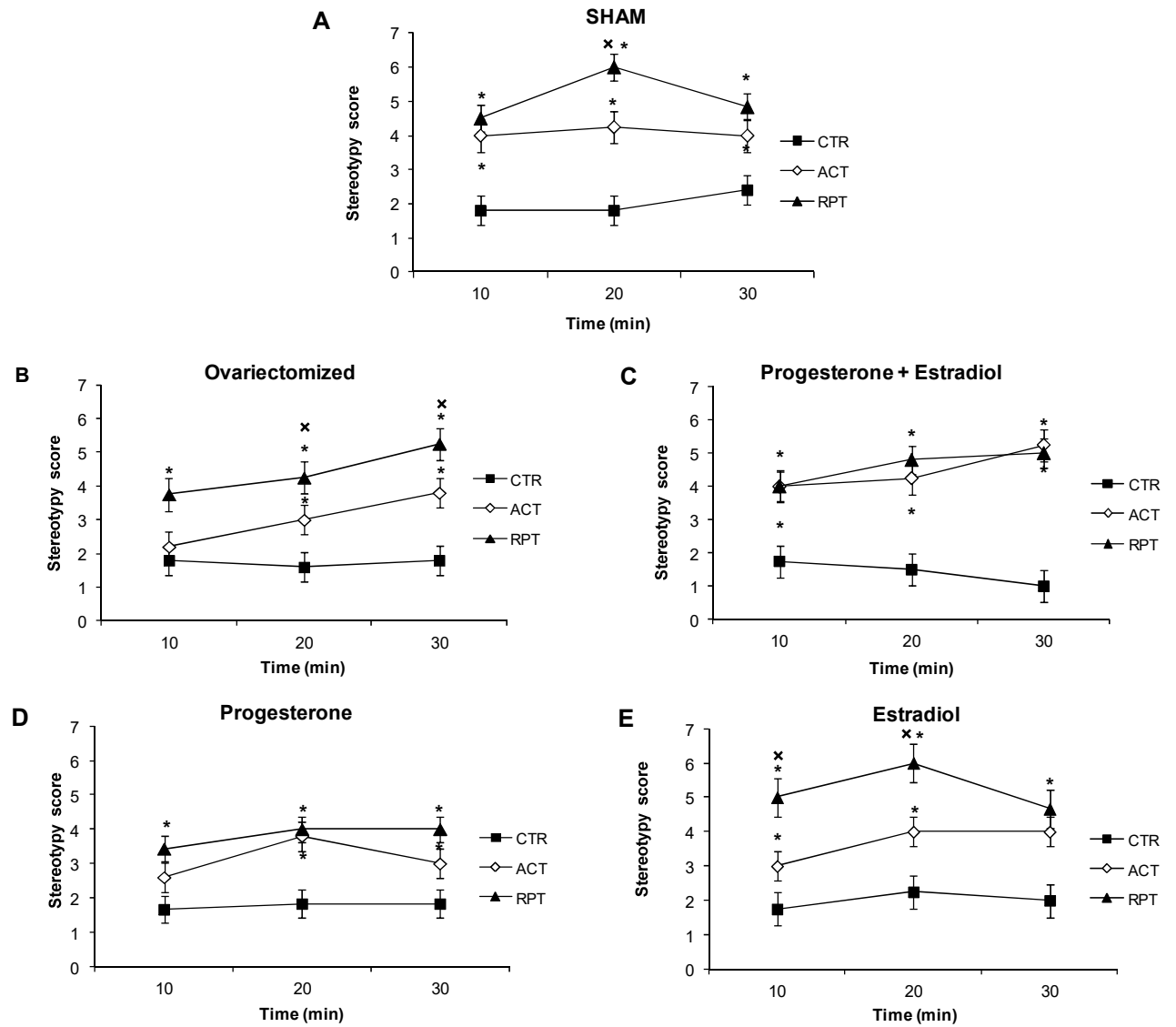


Figure 4.

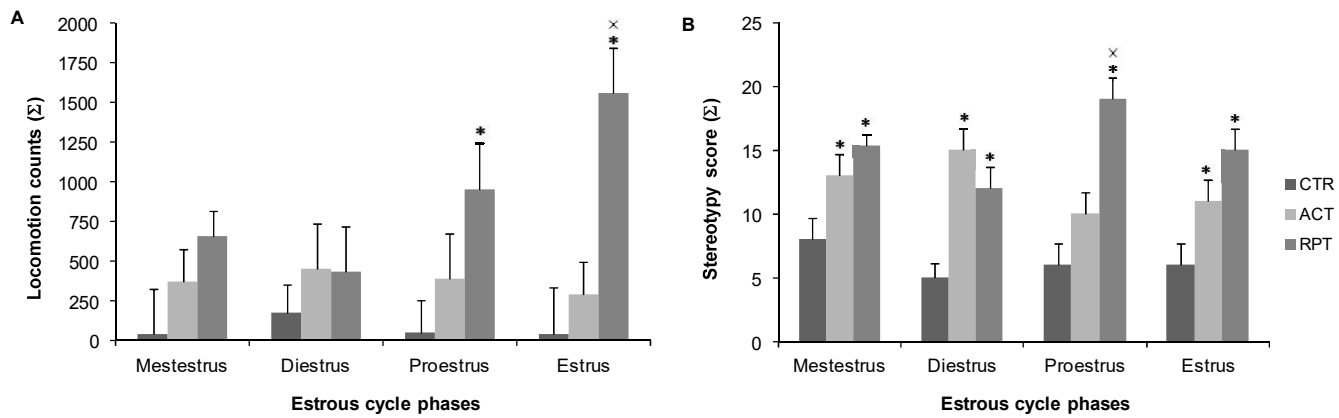
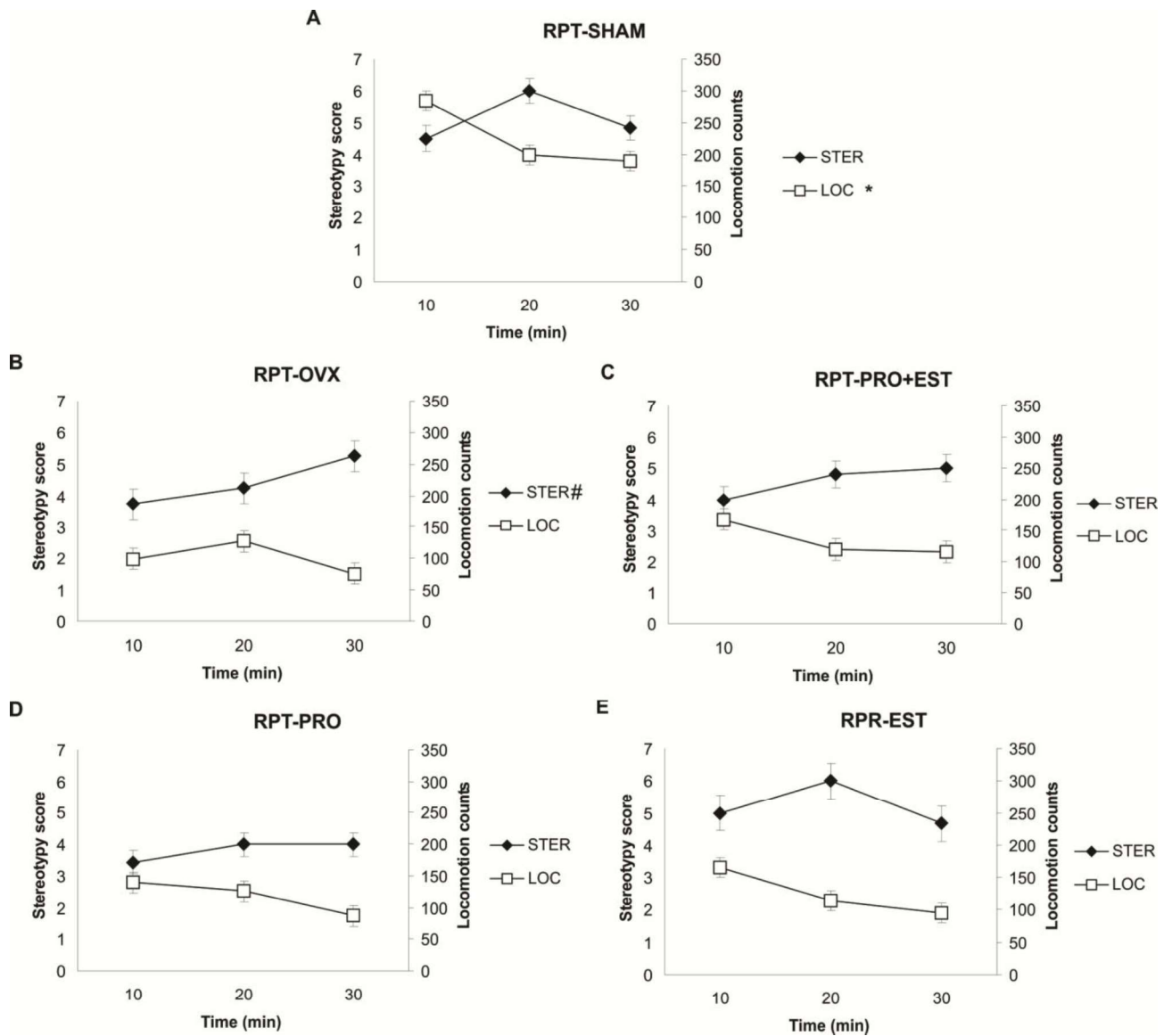


Figure 5.



Capítulo II

Efeitos dos hormônios sexuais femininos sobre danos no DNA em diferentes áreas cerebrais após o tratamento agudo ou repetido com cocaína.

Os experimentos realizados e apresentados no artigo a seguir estão associados com o objetivo específico 2, e foram idealizados com a proposta de responder as seguintes perguntas:

- 1) A administração aguda ou a sensibilização à cocaína são capazes de induzir dano no DNA neuronal de diferentes regiões cerebrais em fêmeas?
- 2) A presença dos hormônios sexuais femininos é capaz de induzir dano no DNA neuronal de diferentes regiões cerebrais em fêmeas?
- 3) A presença dos hormônios sexuais femininos influenciam no dano no DNA neuronal provocado pela administração aguda ou repetida de cocaína?

O artigo foi aceito com modificações para publicação na revista *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, fator de impacto 2,16 (Qualis B1).

Cocaine induces DNA damage in distinct brain areas of female rats under different hormonal conditions.

Marilise Fraga de Souza¹; Tierre Aguiar Gonçales¹; Aline Steinmetz²; Dinara Jaqueline Moura²; Jenifer Saffi²; Rosane Gomez^{1,3}; Helena Maria Tannhauser Barros¹

1- Laboratório de Neurociência Comportamental, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA.

2- Laboratório de Genética Toxicológica. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA.

3- Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

Short title: Cocaine DNA damage in female rat brain.

Corresponding author:

Marilise Fraga de Souza

St. Sarmiento Leite, 245/317 – Division of Pharmacology, UFCSPA

90050-170 - Porto Alegre, RS, Brazil

E-mail: marifs@ufcspa.edu.br

Phone: +5551-33038821

Abstract: We evaluated the levels of DNA neuronal damage after acute or repeated cocaine treatment in different brain areas of female rats after ovariectomy or SHAM surgery. Rats received saline or acute or repeated cocaine (15 mg/kg/dose) administrations. Animals were euthanatized and the cerebellum, hippocampus, hypothalamus, prefrontal cortex and striatum were dissected for comet assay. Acute cocaine exposure induces DNA damage in all brain areas. This effect persisted after repeated administration, except in the hypothalamus, where repeated treatment did not relate to increased DNA damage. Sexual hormones showed a neuroprotective effect, decreasing DNA damage in cocaine cycling rats in all brain areas.

Keywords: cocaine; DNA damage; estrogen; ovariectomy; progesterone

Rapid communication

Hormonal differences between males and females influence cocaine use and abuse. Indeed, females experience more intense behavioral cocaine effects than males, including cocaine sensitization.¹ This phenomenon is defined by the augmented motor-stimulant response that occurs with repeated intermittent exposure to a specific drug,² and is a marker for some facets of addiction.³ In female rats, behavioral sensitization to cocaine varies according to hormonal status.⁴ Estrogen increases the risk of dependence, while progesterone protects females against cocaine dependence.⁵ Furthermore, estrogen increases the levels of reactive metabolites and reactive oxygen species associated with DNA damage,⁶ but progesterone behaves as an antioxidant.⁷ A single exposure to cocaine induces DNA damage in the brain of male mice.^{8,9} However, the effects of female hormones on DNA damage in different brain areas after acute or repeated cocaine treatment has not been studied.

We performed a UFCSPA Ethics Committee-approved study (#1034/10) in adult female Wistar rats that were ovariectomized (OVX) or SHAM operated (n=4-5/group). Rats were allowed to recover for at least 10 days after surgery and then divided into 3 experimental groups: saline control (CTR), acute cocaine (ACT) and repeated cocaine (RPT). The sensitization protocol¹⁰ was performed with CTR and ACT groups receiving 1 mL/kg saline i.p. and RPT receiving 15 mg/kg cocaine hydrochloride i.p. for 8 consecutive days. After a 10-day wash-out, ACT and RPT groups received a cocaine challenge dose, while CTR received saline. The estrous cycle was monitored by examining the cellular characteristics of vaginal smears collected daily. Animals were euthanized by decapitation, the trunk blood was collected and the serum was used for analysis of the hormone levels. Estradiol (calibrator range 20 – 3200 pg/mL) and progesterone (calibrator range 0.2 – 40 ng/mL) levels were determined by ELISA using commercial reagents (Diagnostics Biochem Canada Inc, Canada and Symbiosys, Brazil, respectively).

Immediately after euthanasia, the cerebellum (CER), hippocampus (HIPc), hypothalamus (HYPt), prefrontal cortex (PFC) and striatum (STR) were dissected and frozen. These regions were selected because they are involved in drug addiction.^{1,11-13} While the PFC and the STR are a part of the limbic system,² the HIPc is related to memory.¹¹ On the other hand, the HYPt commands the autonomic nervous system and endocrine responses during motivated behavior,¹² and the CER is involved in performance of cognitive tasks that require explicit and episodic memory.¹³

A single-cell suspension from different brains areas was obtained according to the method described by Hartmann et al.¹⁴ Briefly, 0.2 g of each brain area was placed in a separated microtube with 1 mL chilled solution (PBS with 20 mM EDTA and 10 % DMSO) and chopped into pieces with a pair of scissors. The pieces were allowed to

settle and the supernatant containing the single cells was taken. The isolated cells were counted in a Neubauer Chamber to determine cell concentration. The comet assay was performed in accordance to Singh et al.¹⁵ and to Hartmann and Speit¹⁶ and is represented in Figure 1. Isolated cells ($\sim 10^4$ cells/mL) were mixed with low melting point agarose solution and spread on agarose-precoated microscope slides to carry out the comet assay. For each treatment of different brain areas three slides were made. Slides were incubated in ice-cold lysis solution (2.5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100, and 10% DMSO, pH 10.0) at 4°C for at least 1 h in order to remove cell membranes. After, slides were placed in a horizontal electrophoresis unit and incubated with fresh buffer solution (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13.0) at 4°C for 15 min in order to allow DNA unwinding and the expression of alkali-labile sites. Electrophoresis was conducted for 15 min at 25 V (94 V/cm). All the above steps were performed under yellow light or in the dark in order to prevent additional DNA damage. Slides were stained using silver nitrate staining. One hundred cells from each treatment were selected, and analyzed for DNA migration and the average of the three slides of each treatment was used to determine the damage index (DI). The DI is an arbitrary score calculated for cells in different damage classes, which are visually according to tail length into five classes: (1) class 0: undamaged, without a tail; (2) class 1: with a tail shorter than the diameter of the head nucleus; (3) class 2: with a tail length 1–2x the diameter of the head; (4) class 3: with a tail longer than 2x the diameter of the head; and (5) class 4: comets with no heads. DI ranges from 0 (no tail: 100 cells \times 0) to 400 (with maximum migration: 100 cells \times 4).

Two or three-way ANOVA followed by a Tukey *post hoc* test was used to determine significant differences ($P < 0.05$) on DNA damage index; cocaine treatment, hormonal condition and different brain areas were considered as the independent

variables. A one or two-way ANOVA followed by a Tukey *post hoc* test was used to determine significant differences ($P < 0.05$) on progesterone and estrogen levels in female rats according to cocaine treatment and hormonal condition.

Overall, we showed that cocaine increased DNA damage in each brain area of female rats examined (Figure 2). The Figure 3 is representative of nuclear DNA migration increased after treatment with cocaine in HYPc from OVX rats, the ACT presented a considerable increase in migration as consequence of cocaine treatment (Figure 3B) when compared to the CTR (Figure 3A). As explained, this study verified the neurotoxicity of cocaine in females, expanding previous descriptions by Alvarenga et al.^{8,9} who showed that cocaine increases DNA damage in total brain of male mice. Cocaine administration generates reactive oxygen species in the brain¹⁷ and induces neuronal cell death.¹⁸ Interestingly, although ACT administration of cocaine produces DNA damage in the hypothalamus, RPT administration of cocaine after a washout period leaves no evidence of DNA damage (Figure 2). Some authors indicate that a repeated low dose exposure to direct-acting genotoxins may be tolerated by cells through homeostatic mechanisms such as DNA repair.¹⁹ However, we only found this adaptative mechanism in the hypothalamus, which may have the most efficient DNA repair than in other areas of the brain. Coincidentally, this brain area is involved in reward and reinforcement processing by regulating dopamine responses to drugs of abuse.²⁰ In this sense, we infer that cocaine sensitization can be correlated to lower DNA damage in female rats in some brain regions. Curiously, a recent study found that repeated cocaine induced a rapid increase in the formation and accumulation of new dendritic spines in frontal cortex and this phenomenon was correlated with preference to cocaine.²¹ Therefore, a greater behavioral response to repeated exposure to cocaine, which is strongly related to addiction development, may be due to a bigger and better neuronal

activity or less cell damage, at least in initial phases of drug use. Longer cocaine treatments studies are needed to show if this effect is maintained.

When we compared hormonal conditions in the CTR group, cycling females presented higher levels of DNA damage than OVX in all regions examined (Figure 2), suggesting a crucial role of hormones in the induction of DNA damage in rats that did not receive cocaine. One may propose that, although progesterone appears to activate the antioxidant defense system,⁷ estrogen induced DNA damage by forming reactive metabolites and reactive oxygen species.⁶ Therefore, the data indicate that, although the levels of estrogen and progesterone in SHAM rats were not significantly higher than in OVX rats (Table 1), a slight increase in both hormones may produce DNA damage.

On the other hand, when we explored the effect of hormonal conditions on DNA damage in rats that received cocaine, cycling females presented a lower DNA damage index than the OVX female rats in all brain areas (Figure 4), suggesting that female gonadal hormones protect against DNA damage induced by cocaine (Figure 4). The evaluation of the estrous cycle phases here indicated that rats were cycling normally and were homogeneously distributed among the different cycle phases. Additionally, the analysis of hormonal levels indicated that the estrogen were higher in SHAM (104.94 ± 5.25 pg/mL) than in OVX rats (79.89 ± 3.54) ($F_{(1,18)} = 15.61$; $P < 0.001$) and progesterone levels was non-significantly higher in SHAM (46.36 ± 6.02 ng/mL) than in OVX female rats (40.68 ± 5.61) ($F_{(1,11)} = 0.477$; $P = 0.504$). The analyses of hormonal levels according to treatments are shown in Table 1.

There is no difference in progesterone and estrogen levels between SHAM and OVX rats treated with saline, probably because a part of these females stayed in cycle phases where the levels of estrogen and progesterone are low. However, cocaine treatment (ACT and RPT) increased estrogen levels in SHAM operated rats. Previous

study also showed that cocaine increases estrogen levels in intact female rhesus monkeys.²²

The influence of female hormones on the incidence of DNA damage is contradictory. While some studies have shown that increased activity of oxidative enzymes results in an equilibrated redox state and decreased DNA damage,⁷ other studies show that hormones induce genomic instability.⁶ However, our study suggests that mainly estrogen, but also progesterone or both hormones may have neuroprotective effects and decrease DNA damage in neurons of rats exposed to cocaine. The presence of hormones in the normally cycling females appears to reduce the incidence of DNA damage induced by cocaine. This result contributes to the hypothesis that greater behavioral sensitization is associated with less DNA damage in female rats and, consequently, a better response in neural pathways involved in cocaine addiction, as previously suggested.

In summary, we showed that cocaine administration increases DNA damage in several distinct brain areas and those female sexual hormones may act to protect neurons from cocaine damage. Additional studies need to be conducted to clarify whether exogenous administration of estrogen or progesterone or both would decrease the neurotoxic effects of cocaine.

Acknowledgements: This project was financed by CAPES, CNPq and UFCSPA.

References

1. Becker JB, Hu M. Sex differences in drug abuse. *Front. Neuroendocrinol.* 2008; **29**(1): 36-47.

2. Steketee JD, Kalivas PW. Drug Wanting: Behavioral Sensitization and Relapse to Drug- Seeking Behavior. *Pharmacol. Rev.* 2011; **63**: 348-365.
3. Vanderschuren LJ, Kalivas PW. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacol. (Berl.)* 2000; **151**(2-3): 99-120.
4. Sell SL, Thomas ML, Cunningham KA. Influence of estrous cycle and estradiol on behavioral sensitization to cocaine in female rats. *Drug Alcohol Depen.* 2002; **67**: 281-290.
5. Fox HC, Sofuoglu M, Morgan PT, Tuit KL, Sinha R. The effects of exogenous progesterone on drug craving and stress arousal in cocaine dependence: Impact of gender and cue type. *Psychoneuroendocrinol.* 2013; **29**: 456-458.
6. Roy D, Liehr JG. Estrogen, DNA damage and mutations. *Mutat. Res.* 1999; **424**: 107-115.
7. Verma Y, Rana SVS. Modulation of phase-II enzyme activities in benzene treated ovariectomized rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2011; **31**: 371-377.
8. Alvarenga TA, Andersen ML, Ribeiro DA, Araujo P, Hirotsu C, Costa JL, Battisti MC, Tufik S. Single exposure to cocaine or ecstasy induces DNA damage in brain and other organs of mice. *Addict. Biol.* 2009; **15**: 96-99.
9. Alvarenga TA, Ribeiro DA, Araujo P, Hirotsu C, Mazaro-Costa R, Costa JL, Battisti MC, Tufik S, Andersen ML. Sleep loss and acute drug abuse can induce DNA damage in multiple organs of mice. *Hum. Exp. Toxicol.* 2011; **30**(9): 1275-81.
10. Scheggi S, Raone A, De Montis MG, Tagliamonte A, Gambarana C. Behavioral expression of cocaine sensitization in rats is accompanied by a distinct pattern of modifications in the PKA/DARPP-32 signaling pathway. *J. Neurochem.* 2007; **103**: 1168-1183.

11. Koob G, Volkow ND. Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacol. Rev.* 2010; **35**: 217-238.
12. Vasconcelos SMM, Feitosa LB, Felix PA, Aguiar LMV, Sousa FCF, Viana GSB. Motivação, vias neuronais e drogas de abuso. *Rev. Psiq. Clín.* 2002; **29**(3): 130-134.
13. Grant S, London ED, Newlin DB, Villemagne VL, Liu X, Contoreggi C, Phillips RL, Kimes AS, Margolint A. Activation of memory circuits during cue-elicited cocaine craving. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; **93**: 12040-12045.
14. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis.* 2003; **18**: 45-51.
15. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Scheider EL. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 1988; **175**: 184-191.
16. Hartmann A, Speit G. The contribution of Cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol. Lett.* 1997; **90**: 183-188.
17. Dietrich JB, Mangeol A, Revel MO, Burgun C, Aunis D, Zwiller J. Acute or repeated cocaine administration generates reactive oxygen species and induces antioxidant enzyme activity in dopaminergic rat brain structures. *Neuropharmacol.* 2005; **48**: 965-974.
18. Lepsch LB, Munhoz CD, Kawamoto EM, Yshii LM, Lima LS, Curi-Boaventura MF, Salgado TML, Curi R, Planeta CS, Scavone C. Cocaine induces cell death and activates the transcription nuclear factor kappa-b in pc12 cells. *Mol. Brain.* 2009; **2**: 3.
19. Jenkins GJ, Zaïr Z, Johnson GE, Doak SH. Genotoxic thresholds, DNA repair, and susceptibility in human populations. *Toxicol.* 2010; **278**(3): 305-310.
20. Calipari ES, España RA. Hypocretin/orexin regulation of dopamine signaling: implications for reward and reinforcement mechanisms. *Front. Behav. Neurosci.* 2012; **6**: 54.

21. Muñoz-Cuevas FJ, Athilingam J, Piscopo D, Wilbrecht L. Cocaine-induced structural plasticity in frontal cortex correlates with conditioned place preference. *Nat. Neurosci.* 2013; **16**(10): 1367-9.
22. Mello NK, Mendelson JH, Negus SS, Kelly M, Knudson I, Roth ME. The effects of cocaine on gonadal steroid hormones and LH in male and female rhesus monkeys. *Neuropsychopharmacol* 2004; **29**(11): 2024-34.

Table and Figures

Table 1. Estrogen and progesterone levels according to cocaine treatment and hormonal conditions (mean \pm SEM).

Figure 1. Comet assay representation.

Figure 2. Damage index (DI) according cocaine treatment and hormonal condition on different brain areas of female rats. Legends: Saline group (CTR), Acute cocaine (ACT), Repeated cocaine (RPT), Ovariectomized (OVX) and SHAM. Bars represent means \pm SEM. # represents the difference from OVX, * represents treatment group differences from respective CTR, + represents treatment group differences from respective RPT and • represents the difference of the RPT group from all other brain structures ($F_{\text{treat}(2, 107)} = 81.715, P < 0.001$; $F_{\text{cond}(1, 107)} = 7.945, P = 0.006$; $F_{\text{treat} \times \text{cond}(2, 107)} = 15.701, P < 0.001$; $F_{\text{treat} \times \text{reg}(8, 107)} = 2.580, P = 0.013$).

Figure 3. Quantification of DNA damage index by comet assay under alkaline conditions in HYPc from OVX rats in CTR (A) and ACT (B) groups.

Figure 4. Damage index is reported as the percent change relative to CTR on cocaine-treated rats according to hormonal condition (OVX or SHAM) in different brain areas. Legends: Saline group (CTR), Acute cocaine (ACT), Repeated cocaine (RPT), Ovariectomized (OVX) and SHAM. Bars represent means \pm SEM. + represents the difference from respective SHAM group. * represents the difference from respective RPT group ($F_{\text{treat}(1, 67)} = 23.496, P < 0.001$; $F_{\text{cond}(1, 67)} = 144.644, P < 0.001$; $F_{\text{cond}(1, 67)} = 144.644$).

Table 1.

Cocaine treatment	Estrogen (pg/mL)		Progesterone (ng/mL)	
	SHAM	OVX	SHAM	OVX
<i>CTR</i>	91.17 ± 0.78	83.76 ± 2.28	58.15 ± 10.91	39.6 ± 8.86
<i>ACT</i>	113.56 ± 0.46*	88.59 ± 1.85	45.22 ± 0.82	44.1 ± 7.1
<i>RPT</i>	126.45 ± 13.69*	66.04 ± 5.58	35.71 ± 0.31	38.33 ± 8.19

Legends: Saline group (*CTR*), Acute cocaine (*ACT*), Repeated cocaine (*RPT*), Ovariectomized (*OVX*) and *SHAM*. * represents difference from respective *OVX* group ($F_{\text{int}(2,14)} = 22.016$; $P < 0.001$).

Figure 1.

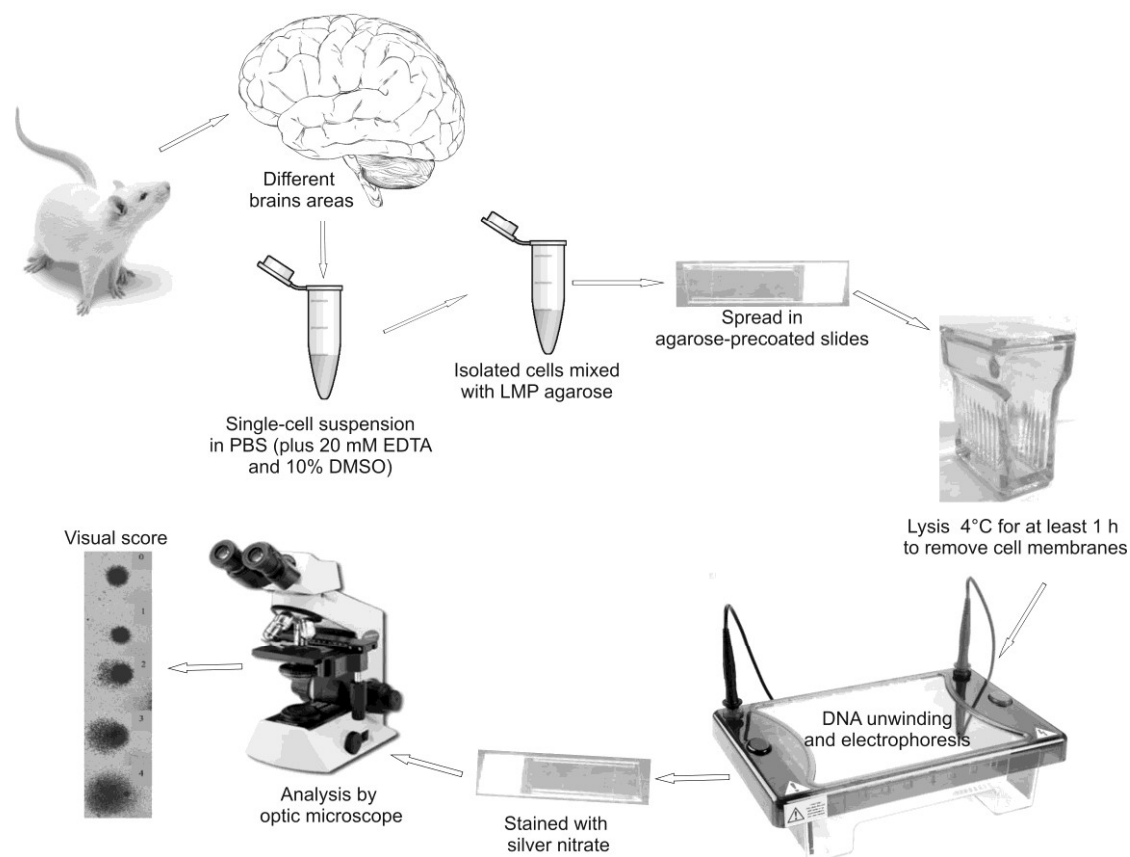


Figure 2.

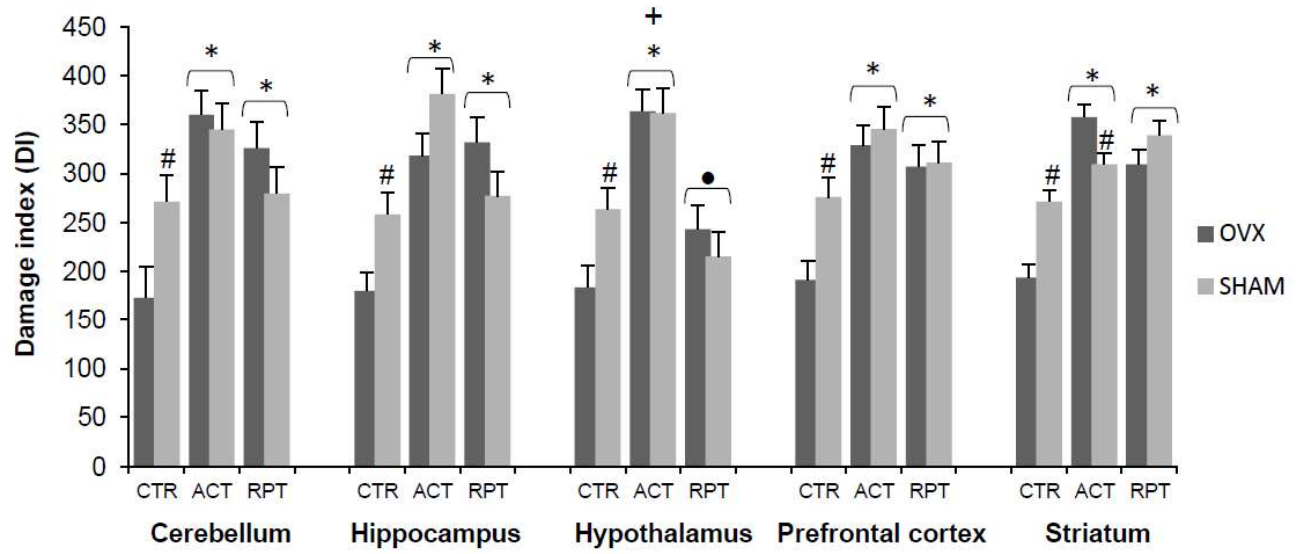


Figure 3.

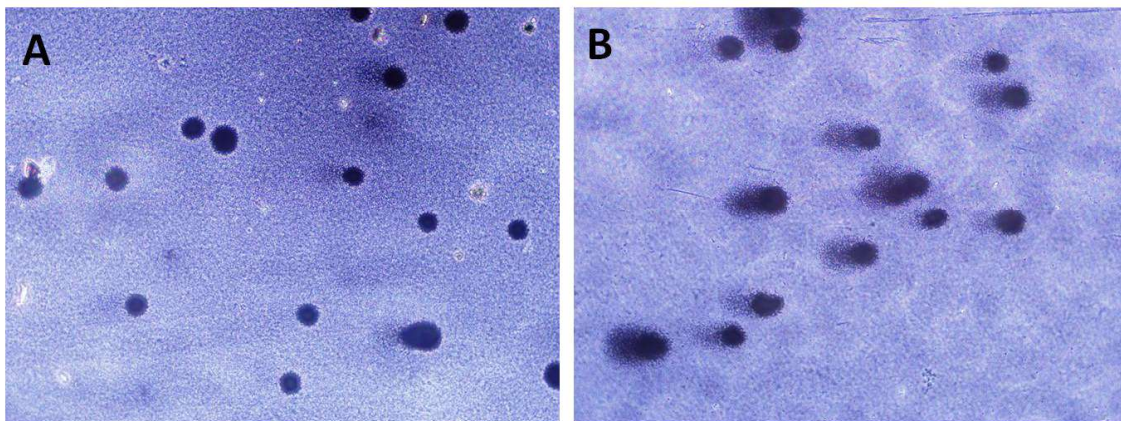
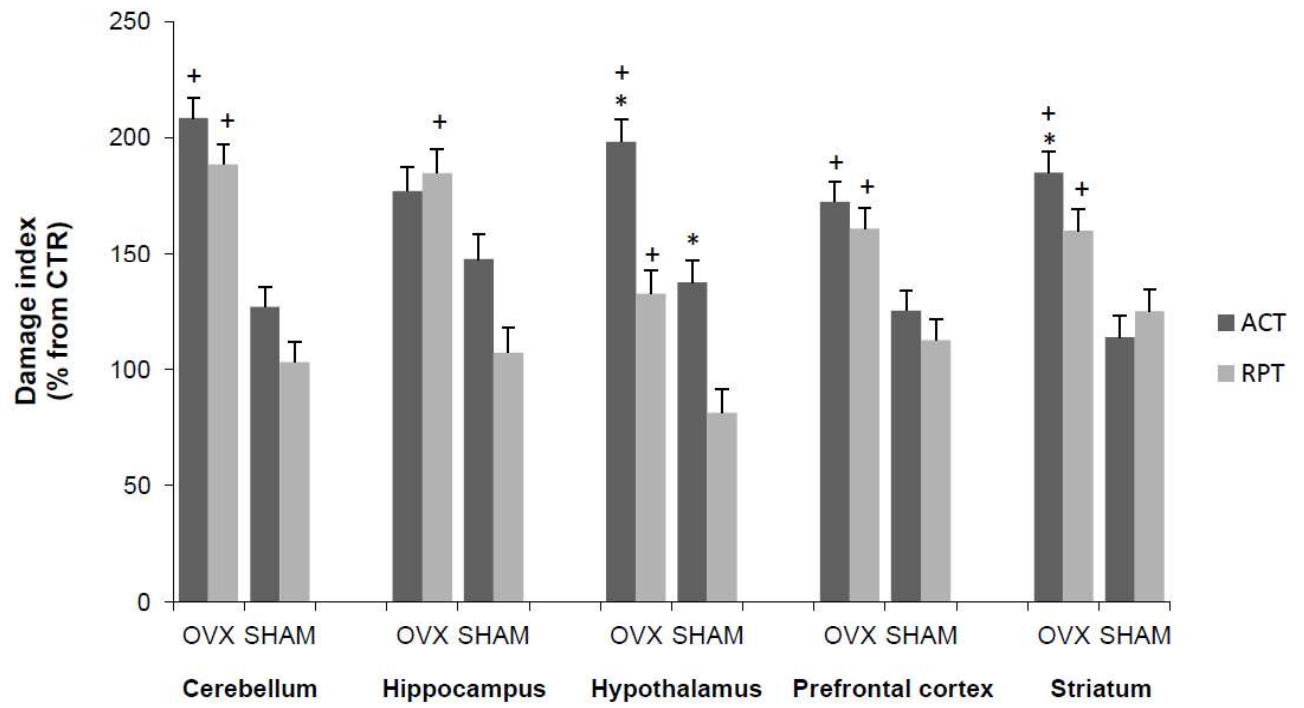


Figure 4.



Capítulo III

Efeitos da administração aguda e repetida de cocaína nos níveis extracelulares de GABA e seus precursores no CPFm de ratas sob diferentes condições hormonais.

Os experimentos realizados e apresentados no artigo a seguir estão associados com o objetivo específico 3, e foram idealizados com a proposta de responder as seguintes perguntas:

- 1) A administração aguda e a sensibilização à cocaína são capazes de alterar os níveis extracelulares de GABA, glutamato e glutamina no CPFm de fêmeas?
- 2) A presença dos hormônios sexuais femininos influencia os níveis extracelulares de GABA, glutamato e glutamina no CPFm de fêmeas?
- 3) A presença dos hormônios sexuais femininos influenciam nas alterações dos níveis extracelulares de GABA, glutamato e glutamina provocados pela administração aguda ou repetida de cocaína?

O artigo foi preparado para publicação na revista *The Journal of Neuroscience*, fator de impacto 6,91 (Qualis A1).

Extracellular GABA and glutamate changes on prefrontal cortex of cocaine-sensitized female rats

Abbreviated title: Cocaine induces GABA and glutamate changes in females.

Marilise Fraga de Souza¹; Greice Caletti¹; Maurício Schüller Nin^{1,2}; Gabriela Kampf Cury³; Valéria Flores Peres⁴; Rosane Gomez⁵; Helena Maria Tannhauser Barros¹.

1- Laboratório de Neurociência Comportamental, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA.

2- Curso de Farmácia, Centro Metodista do Sul – IPA.

3- Central Analítica, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA.

4- Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA.

5- Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

Corresponding author:

Marilise Fraga de Souza

Rua Sarmento Leite, 245, sala 317 - Divisão de Farmacologia, UFCSPA

90050-170 - Porto Alegre, RS, Brazil

E-mail: marifs@ufcspa.edu.br

Phone: +5551-330388221

Acknowledgements: This study received support from UFCSPA, CNPQ and CAPES.

Abstract

Cocaine sensitization is a marker for some facets of addiction. Sensitization is greater in female rats and may be influenced by their sex hormones. GABAergic and glutamatergic changes are related with cocaine sensitization in different cerebral regions. These neurotransmitter systems and its precursors also may be influenced by female sexual hormones. The aim of this study was to investigate the effects of a single cocaine challenge or after sensitization to cocaine on the extracellular GABA, glutamate and glutamine levels in the mPFC of female rats. Female Wistar rats were submitted to bilateral ovariectomy or SHAM surgery and were randomly assigned to control (CTR), acute (ACT) or repeated (RPT) cocaine. Both the CTR and ACT subgroups received daily doses of saline, while the RPT subgroup received cocaine (15 mg/kg i.p.) for 8 days. One week before the challenge day, guide-cannulae were implanted in the mPFC. After 10 days of wash-out period, the ACT and RPT received a challenge dose of cocaine 15 mg/kg i.p., locomotion was monitored and microdialysis was conducted to determine the extracellular levels of GABA, glutamate and glutamine. The perfusates were analyzed by HPLC. Repeated cocaine treatment induced behavioral sensitization in SHAM female rats. Acute cocaine increased GABA levels in SHAM rats and cocaine sensitization in these female rats is associated to lower increment in GABA and higher glutamate levels on mPFC. The glutamine levels are reduced only after single cocaine administration in SHAM females. Therefore, hormonal cycling appears to be an important factor in the sensitization of females, with involvement of GABAergic and glutamatergic systems.

Keywords: Medial Prefrontal Cortex; female sex hormones; cocaine-sensitization; GABA; glutamate; glutamine.

1. Introduction

Behavioral sensitization occurs after repeated psychostimulant use and is well described for cocaine (Jayaram and Steketee, 2005). This phenomenon is characterized by motor-stimulant responses following repeated intermittent administration of psychostimulants after a delay of days or weeks (Brady et al., 2005). Behavioral sensitization is thought to underlie some facets of addiction, including craving and relapse (Vanderschuren and Kalivas, 2000). This phenomenon is higher in female rats and may be influenced by their sex hormones (Becker and Hu, 2008).

Although dopaminergic pathways are considered central to the sensitized behavioral responses to cocaine, glutamate neurotransmitter also appear to be relevant (Brady et al., 2005). The neurochemical excitatory influences are added by glutamate increase and are opposed by Gamma-AminoButyric Acid (GABA), the main inhibitory neurotransmitter in the central nervous system (CNS) (Laprade and Soghomonian, 1995; Allison and Pratt, 2003).

GABA is synthesized from glutamate (Glu) and glutamine (Gln) in a reaction catalyzed by glutamic acid decarboxylase (GAD) enzymes (Ricci *et al.*, 2005). Psychostimulants appear to influence directly the activity of GABAergic neurons. In male, chronic cocaine administration has been shown to increase or decrease GABA in different brain areas (Dworkin et al., 1995; Pierce and Kalivas, 1997; Smith et al., 2003; Cameron and Williams, 1994). In the medial prefrontal cortex (mPFC), repeated cocaine increases extracellular GABA of males (Jayaram and Steketee, 2005). Thus there is supporting evidence that repeated cocaine may alter GABA activity, the direction of change depends on the brain area under study.

Although glutamate is a precursor of GABA, it is also an excitatory neurotransmitter per se (Yang et al., 2009). Preclinical studies conducted in male

animals have demonstrated that chronic cocaine use produces a significant reduction in the basal glutamatergic transmission from the PFC (Baker et al., 2003; Thomas et al., 2001). On the other hand, cocaine challenge induced increase in extracellular glutamate on NAc (Berglind et al., 2009; Pierce et al., 1996) and PFC (Williams and Steketee, 2004). Such changes have been thought to play a critical role in cocaine addiction and subsequent relapse to drug-seeking behavior (Kalivas and Volkow, 2005).

However, the exact effect of the cocaine in GABA and glutamate neurotransmitter in females is not clear, because studies performed in females are scarce due to the difficult to understand the involvement of physiologic sex hormonal fluctuation in these systems. However, studies indicated that human females, also seen in animal models, are more prone to drugs effects and begin regular self-administration of cocaine at lower doses than do males, escalate drug use more rapidly to addiction, and females are at greater risk for relapse (Becker and Hu 2008). Hormonal fluctuations play an important role in women's responses to drugs, suggesting that sex steroids modulate the subjective actions of cocaine (Segarra et al., 2010). Ovariectomy abolishes the behavioral differences in response to cocaine administration between male and female rats and also delays behavioral sensitization and self-administration in female rats (Quiñones-Jenab, 2006; Lynch et al., 2001).

Studies have implicated an important role for the PFC in the development of addictive behaviors and GABA and glutamate has a very important influence in the function of this brain region, inclusive decision making (Pierce and Kalivas, 1997). Therefore, the aim of this study is to investigate the effects of sensitization to cocaine or a single cocaine challenge on the extracellular GABA, glutamate and glutamine levels in mPFC of female rats under different hormonal conditions.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult female Wistar rats, 200-250 g (n=31; 5-6 per group), were obtained from the Animal Facility of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). The animals were housed in groups of five in polypropylene cages (33 X 17 X40 cm). Food and water were available *ad libitum*, and the animals were maintained in a temperature-controlled room (23±2°C) under a 12 h light-dark cycle (lights on from 7 am–7 pm). All *in vivo* experiments followed the guidelines of the International Council for Laboratory Animal Science and were approved by the Ethical Committee for Research of UFCSPA (# 1034/10). All efforts were made to minimize animal suffering and to use only the number of animals necessary to produce reliable scientific data.

2.2. Procedures

Bilateral ovariectomies were performed in 15 rats (OVX) under intraperitoneal (i.p.) anesthesia with xylazine (10 mg/kg) and ketamine hydrochloride (75 mg/kg). Sham surgeries were performed in 16 rats (SHAM). The animals were left for recovery for 10 days. After, rats were randomly assigned to receive either 1 mL/kg saline (control - CTR or acute - ACT groups) or cocaine hydrochloride (Merck, Brazil) 15 mg/kg i.p. (repeated - RPT group), once a day, for 8 consecutive days. The rats were then submitted to a wash-out period of 10 days, after which they received a single challenge dose of either saline (CTR group) or cocaine hydrochloride 15 mg/kg i.p (ACT and RPT groups) (Scheggi et al., 2007).

In the challenge day, the rats were kept in the locomotion apparatus for habituation. The locomotion of rats was evaluated in the locomotor activity cage (40 x 26 x 22 cm), composed by two photocells (Alsbarsch, São Paulo, Brazil), that registered

the locomotion counts every 30 min, 120-min before and 150-min after the saline/cocaine challenge.

2.2.1. Stereotaxic surgery

One week before the cocaine challenge day, the rats were again anesthetized with a mixture of xylazine (10 mg/kg i.p.) and ketamine hydrochloride (75 mg/kg i.p.), and were placed into the stereotaxic frame (David Kopf, Tujunga, CA). Unilateral guide-cannulae (CMA/12, Acton, MA) were implanted in the right medial prefrontal cortex (mPFC – bregma: anteroposterior + 3.2 mm, lateral + 0.6 mm and vertical 1.5 mm), according to Paxinos and Watson (1986). The guide-cannulae assembly was then fixed to the skull with two anchorage screws and dental cement. After recovering from anesthesia, the animals were maintained in isolated acrylic cages (35X25X40 cm) with wood shaving beds and were observed closely for 1 week.

2.2.2. Microdialysis

One day before cocaine challenge, rats were individually habituated for 5 h to a containment system for freely moving animals (CMA/120, Acton, MA), in which the animal is connected to the counterbalanced arm and swivel through a plastic collar fixed to the walls of the locomotor cage.

The microdialysis experiment was performed concomitantly to the behavioral observations on the challenge day. The probes were inserted into the guide-cannulae and the animals were introduced into the same containment system for freely moving animals described above. Probes were perfused with artificial cerebrospinal fluid (NaCl 147 mM; CaCl₂ 2.3 mM; KCl 4.0 mM; MgCl₂ 0.9 mM with unadjusted pH 7.1–7.3) at a constant flux rate of 1.0 µl/min with a microperfusion pump (CMA/102, Acton, MA) (Gomez and Barros, 2003). The microdialysis membrane was stabilized for 1 h and two samples were then collected at 30-min intervals to determine mPFC baseline GABA,

glutamate and glutamine levels. At 120 min after the insertion of the probes, subgroups of CTR, ACT or RPT rats received saline or 15 mg/kg of cocaine. Subsequent perfusate samples were collected at 30-min intervals for 1 h (Figure 1), along with locomotion count registration.

At the end of the microdialysis experiment, the animals were euthanized by decapitation and the trunk blood was collected, centrifuged and the serum was then stored at -20°C for subsequent analysis of the hormone levels. Additionally, the brains were carefully removed and were sectioned using a rat brain slicer 1.0 mm (Zivic, Pittsburgh, PA, USA) into the cannulae incision area and photographed for posterior placement analysis (Samsung™–DigimaxV5).

2.2.3. Estrous cycle and hormonal analysis

Monitoring of the estrous cycle was performed daily, along with the sensitization protocol, by examining the cellular characteristics of vaginal smears. Vaginal smears were collected immediately after any behavioral assessment that occurred on each day (Marcondes et al., 2002).

The hormone levels (estradiol and progesterone) were analyzed in the serum of rats. Estradiol (calibrator range 20 – 3200 pg/mL) and progesterone (calibrator range 0.2 – 40 ng/mL) levels were determined by ELISA using commercial reagents (Diagnostics Biochem Canada Inc, Canada and Symbiosys, Brazil, respectively).

2.2.4. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

All microdialysate samples were frozen at -80 °C and GABA, glutamate and glutamine were detected by HPLC with fluorometric detection (Petkova-Kirova et al., 2008). We used detection by post-column fluorescence derivatization, with o-phthalaldehyde (OPA) as the reaction reagent. To obtain the peak areas, 20 µL of sample were derivatized with 20 µL of derivatizing solution, after 4 min of reaction,

5 μ L were injected into the system. GABA, glutamate and glutamine levels were quantitatively determined by correlating the chromatographic peak areas to that obtained from a known standard mixture.

2.3. Statistical analysis

A one-way ANOVA was used to determine the statistical differences of the progesterone or estradiol levels and to determine the GABA, glutamate and glutamine concentrations in CTR group.

The evaluation of the extracellular levels of GABA, glutamate or glutamine at 30 and 60 minutes (min) after cocaine challenge was performed using a two-way ANOVA followed by a Tukey post hoc comparison, considering cocaine treatment and hormonal condition as independent variables.

Repeated-measures two-way ANOVA followed by a Tukey post hoc comparison was used to determine statistical differences of the locomotion counts and the percentual levels of GABA and glutamate considering cocaine treatment and hormonal condition over time. These results were evaluated using the percentage of GABA and glutamate levels in relation to their specific baseline (period prior to the saline/cocaine administration). A value of $p < 0.05$ was used as the acceptable level of significance.

3. Results

3.1. Hormonal levels

The analysis of hormone levels on the challenge day indicated that estrogen levels were higher in SHAM (104.94 ± 5.25 pg/mL) than in OVX rats (79.89 ± 3.54) ($F_{(1,18)} = 15.61$; $P < 0.001$). Progesterone levels in SHAM (46.36 ± 6.02 ng/mL) were not significantly higher than in OVX female rats (40.68 ± 5.61) ($F_{(1,11)} = 0.477$; $P = 0.504$). The evaluation of the estrous cycle phases here indicated that rats were cycling

normally and were homogeneously distributed among the different cycle phases, with a weightless predominance of proestrus and estrus phases.

3.2. *Locomotor activity on challenge day*

The locomotion of female rats before and after cocaine administration on challenge days as exposed in figure 2 A and B in SHAM and OVX animals, respectively. The results indicated that ACT and RPT cocaine treated groups showed higher locomotor activity than CTR, 30 min after cocaine challenge, independently of the hormonal condition (OVX or SHAM). These results were maintained until 60 min after cocaine, except in ACT-OVX rats, who do not show sensitization to RPT cocaine. After 90 minutes of the cocaine administration, the locomotion returns to the basal counts. In intact female rats, RPT showed higher locomotion than ACT 30 minutes after cocaine administration. Additionally, in the same time period, RPT-SHAM presented higher locomotor activity than RPT-OVX female rats.

3.3. *GABA extracellular levels*

The mPFC extracellular GABA concentration in saline treated female rats is 6.72 ± 0.71 ng/mL. When these animals were grouped according to the hormonal conditions, the SHAM female rats (9.64 ± 0.96 ng/mL) presented higher extracellular GABA levels than the OVX (3.06 ± 0.49 μ g/mL) ($F_{(1,61)} = 31.86$; $P < 0.001$).

Because locomotion counts are higher at 30 and 60 min after cocaine challenge, the mean of the extracellular GABA in these times is presented in figure 3. Results indicated that acute cocaine administration enhanced GABA levels in SHAM female rats. Additionally, OVX rats repeatedly treated with cocaine presented higher GABA concentration than the respective CTR. On the other hand, RPT cocaine showed similar extracellular GABA concentration to CTR in SHAM female rats.

The analysis of the GABA concentration in mPFC across the time, considering the cocaine treatment in relation to the baseline, in SHAM and OVX female rats, is exposed in Figures 4A and 4B, respectively. The results indicated that RPT cocaine enhanced extracellular GABA levels in both SHAM and OVX female rats when compare to ACT and CTR groups. However, SHAM repeatedly cocaine treated rats showed lower GABA levels than OVX rats, 30 min after cocaine administration.

3.4. Glutamate extracellular levels

The extracellular glutamate levels in the mPFC of saline treated rats were 1.25 ± 0.24 $\mu\text{g/mL}$, without differences between OVX and SHAM hormonal conditions. As exposed in figure 5, the means of extracellular glutamate at 30 and 60 min after cocaine challenge demonstrate that ACT or RPT cocaine do not alter the levels of glutamate in the mPFC of both OVX or SHAM female rats.

We analyze the glutamate concentration in mPFC across the time, considering the cocaine treatment in relation to the baseline, in SHAM and OVX female rats (Figures 6A and 6B, respectively). The results indicated that % from baseline of extracellular glutamate levels of SHAM female rats (Figure 6A) is higher in RPT than in CTR. In OVX female rats (Figure 6B), ACT cocaine rats presented higher levels than CTR and RPT at 90 min and than CTR after 120 min after cocaine administration.

3.3. Glutamine extracellular levels

The extracellular glutamine levels in the mPFC of saline treated rats were 9.001 ± 0.919 $\mu\text{g/mL}$, without differences between OVX and SHAM hormonal conditions. The ACT (mean \pm SEM = 3.64 ± 1.58 $\mu\text{g/mL}$) and RPT (6.63 ± 1.37) cocaine treatments reduced glutamine extracellular concentration in mPFC of SHAM female rats, when compare to CTR group (10.44 ± 1.23) ($F_{\text{treat}(1,148)} = 4.330$; $P = 0.015$).

However, cocaine do not altered the levels of extracellular glutamine in mPFC of OVX female rats (CTR: 7.56 ± 1.37 ; ACT: 5.89 ± 1.58 ; RPT: 7.11 ± 1.58 $\mu\text{g/mL}$).

4. Discussion

We determined that repeated cocaine administration elicited behavior sensitization with hyperlocomotion in female rats with endogenous sex hormones presence, predominantly estradiol. This behavior is associated with a lower GABA inhibitory system response in mPFC in cycling females than in rats without hormonal influence, which did not develop sensitization. As expected, associated to this lower inhibition function, sensitized cycling females showed a consequent higher glutamatergic excitatory system response in mPFC. In this sense, we believe that the female sex hormones presence have a fundamental role in the development of behavioral sensitization in females, due to a hypoactivity of the brain inhibitory system and a subsequent hyperactivity of excitatory system.

As expected, analyzing the animal's locomotion, our results indicated that cocaine exposure enhanced locomotor activity mainly 30 minutes after i.p. administration. This effect is time-limited, since the hyperlocomotion shown to be decreasing at 60 minutes after cocaine challenge, except in acutely cocaine-treated rats without the hormonal presence at which the effect was extinguished early. In fact, cocaine sensitization also is related to accelerate the onset of peak cocaine behavioral effects that is related with abuse liability (Carey and Gui, 1997).

In the same way, locomotor sensitization after repeated cocaine treatment was evidenced only in intact female rats in detriment of OVX rats. This result is in accordance with the literature, that show higher cocaine sensitization in hormonally intact than in castrated female rats (Souza et al., 2013; Chin et al., 2002) as well as male rats (Chin et al., 2002). These results also agree with others that point to the

influence of hormonal fluctuations on the reinforcing properties of psychostimulant drugs in women and that refers the hormone presence as an inductive factor in the sensitization development (Quiñones-Jenab, 2006). The analysis of hormonal levels indicated that estrogen was elevated in our cycling females. Studies indicate that estrogen play an important role in reward capacity of cocaine, with a greater sensitization directly related to its presence (Hu and Becker, 2003; Souza et al., 2013). On the other hand, while estrogen induces an increase in locomotor activity, progesterone appears to attenuate the cocaine effects (Niyomchai et al., 2005; Souza et al., 2013). However, when the natural cycling is evaluated, an increase in behavioral response is directly related on the cycle phases if estrogen and progesterone are higher (Sell et al, 2000; Chin et al., 2002, Feltenstein et al. 2009), suggesting that progesterone protector effect on cocaine response is overcome by the concomitant presence of estrogen.

Evidences indicate that the GABA neurotransmitter is involved in cocaine effects. As in male rats (Jayaram and Steketee 2005), acute cocaine shown an ineffective effect in change the GABA levels on mPFC of our OVX female rats. However, our results indicated an acute-cocaine increment on GABA concentration in cycling females when we analyzed the peak time of cocaine effect.

The role of the GABAergic system also has been examined in relationship to cocaine sensitization. In studies performed in males, chronic cocaine administration has been shown to: a) both increase or decrease GABA turnover in different brain areas (Dworkin et al. 1995; Pierce and Kalivas 1997; Smith et al. 2003) and b) decrease the release of GABA in the ventral tegmental area (VTA) (Cameron and Williams 1994; Pierce and Kalivas 1997) and in ventral *pallidum* (VP) (Torregrossa et al., 2008; Torregrossa and Kalivas, 2008). In the mPFC, studies indicate an increase on GABA

levels of male rats, when measured one or seven days, but not thirty days, following repeated cocaine exposure (Jayaram and Steketee, 2005; 2006). As in males, the repeated cocaine administration in our ovariectomized female rats significantly increases GABA levels in mPFC, possibly because they have no hormonal influence. On the other hand, when the rats are normally cycling and estrogen levels predominates, the evaluation of the extracellular GABA during the cocaine peak effect indicates that cocaine challenge induces similar levels of these neurotransmitter to the rats that have not received cocaine. Additionally, the extracellular GABA concentration in relation to the baseline in mPFC of intact female rats presents less enhancer than in rats that do not have hormones. So, cocaine sensitization in our cycling female rats was associated to a lower response of GABAergic system in mPFC.

Curiously, both locomotion sensitization and neurotransmitters changes occurred in cycling female rats. These results contribute with literature, which indicates behavioral sensitization induced by female sex hormones presence, mainly estrogen (Souza et al., 2013) and more prominent role of either GABA or glutamate in cocaine-sensitization behavior in females than in males (Siegal and Dow-Edwards, 2009). However, this is the first study to identify changes in the levels of extracellular GABA and glutamate in females. One proposal suggested that estrogen would increase the response to psychostimulants in rats by inducing rapid changes in neuronal excitability driven by the action of estrogen on striatal GABAergic neurons causing less stimulation of GABA_B receptors, consequently, an increase in the release of dopamine (Lynch et al., 2002). Estrogen may also differentially modulate mRNA levels of other important components within the CNS such as dopaminergic, serotonergic and the expression of their own receptor (Zhou, 2002). Still, progesterone and its active metabolite, allopregnanolone, act as positive modulators of GABA receptors (Rupprecht, 2003).

Thus, progesterone replacement attenuates acute and chronic effects of cocaine in rats, possibly by modulation of GABAA receptor subunits (Nin *et al.*, 2008; 2012; Andrade *et al.*, 2012) and enzymes for the synthesis of GABA (Souza *et al.*, 2009).

Glutamine has a role in general metabolism by supporting tissue homeostasis as an intercellular substrate cyler. In the brain, Gln is important as a precursor of several neurotransmitter amino acids, including Glu and GABA. Intercellular compartmentation of Gln and Glu, the so-called Gln/Glu-GABA cycle, is critical for optimal CNS function (Sidoryk-Wegrzynowicz and Aschner, 2013). Indeed, glutamine may be utilized as a marker of GABAergic and glutamatergic systems function. In our study, cycling females treated with cocaine presented lower levels of this amino acid in the mPFC. Since glutamine is a glutamate precursor, this decrease can be explained by the increase of glutamate in this group of rats.

In fact, after to the reduction in GABA inhibitory function, our results indicated that repeated cocaine promotes an increment in extracellular glutamate concentration in mPFC of sensitized cycling female rats, but not in castrated females. Studies performed in males demonstrated that cocaine sensitization also is associated with an increase in extracellular glutamate on NAc (Berglind *et al.*, 2009; Pierce *et al.*, 1996) and PFC (Williams and Steketee, 2004) and in mPFC pyramidal neuron excitability (Nasif *et al.*, 2005). Cocaine sensitization also alters glutamate receptor subunit levels, producing a long-lasting increase in GluR1 in the NAc as well as a temporary increase in NMDAR1 and GluR1 in the VTA (Churchill *et al.*, 1999). Moreover, antagonists of various glutamate receptor subtypes (including NMDA and AMPA receptors) block some indicators of sensitization (Carlezon and Nestler, 2002). Therefore, cocaine sensitization could lead to a loss of response inhibition and consequent increment in excitation of

mPFC, with an increase in craving, drug seeking and behavior sensitization (Kalivas and Volkow, 2005).

Recent studies have implicated an important role for the mPFC in the development of addictive behaviors. Glutamatergic pyramidal neurons make up 85% of neurons found within the mPFC and play an important role in regulating the activity of VTA and NAc neurons (Hearing et al., 2012), regions hypothesized to be involved in the initiation and expression of sensitization, respectively (Steketee, 2005).

Additionally, as reviewed by Hearing et al. (2012), local GABA neurons account for ~15% of neurons in the mPFC, synapse onto and provide one source of GABA to mPFC pyramidal neurons. Additionally, GABA-containing neurons in the VTA send axons to the mPFC where they synapse on dendrites of both pyramidal and local circuit.

Indeed, the mPFC plays an intricate role in decision-making, goal-directed behavior, and the processing of reward-related information and is involved in mediating the primary rewarding and reinforcing effects of abused drugs and drug craving and in the development of sensitization (Steketee, 2005).

Recently reviewed by Hearing et al. (2012), one of the core theories explaining how addiction-related behavior becomes compulsive is that a functionally ‘hypoactive’ frontal cortex results in decreased inhibitory control over behavior and an inability to regulate drug-seeking. Additionally, a study realized in cocaine-dependent subjects suggests that cocaine dependence can decrease GABA levels in frontal lobe (Ke et al., 2004). Corroborating with the literature, our result indicates that a lower response of brain inhibitory GABA system and consequent higher response in excitatory glutamatergic system in female rats with hormonal presence may lead to the increase of the effects of repeated cocaine, participating directly in the development of behavioral sensitization.

6. References

- Allison C, Pratt JA (2003). Neuroadaptive processes in GABAergic and glutamatergic systems in benzodiazepine dependence. *Pharmacol Ther* 98: 171-195.
- Andrade S, Arbo BD, Batista BAM, Neves AM, Branchini G, Brum IS, Barros HMT, Gomez R, Ribeiro MFM (2012) Effect of progesterone on the expression of GABA_A receptor subunits in the prefrontal cortex of rats: implications of sex differences and brain hemisphere. *Cell Biochem Funct* 30(8): 696–700.
- Baker DA, McFarland K, Lake RW, Shen H, Tang XC, Toda S, Kalivas PW (2003) Neuroadaptations in cystine-glutamate exchange underlie cocaine relapse. *Nat Neurosci* 6:743–749.
- Becker JB, Hu M (2008) Sex differences in drug abuse. *Front Neuroendocrinol* 29(1): 36-47.
- Berglind WJ, Whitfield Jr TW, LaLumiere RT, Kalivas PW, McGinty JF (2009) Single Intra-PFC Infusion of BDNF Prevents Cocaine-Induced Alterations in Extracellular Glutamate within the Nucleus Accumbens. *J Neurosci* 29(12): 3715-3719.
- Brady AM, Glick SD, O'Donnell P (2005) Selective disruption of nucleus accumbens gating mechanisms in rats behaviorally sensitized to methamphetamine. *J Neurosci* 25(28): 6687-6695.
- Cameron DL, Williams JT (1994) Cocaine inhibits GABA release in the VTA through endogenous 5-HT. *J Neurosci* 11: 6763-7.
- Carey R, Gui J (1998). Cocaine Sensitization Can Accelerate the Onset of Peak cocaine Behavioral Effects. *Pharmacol Biochem Behav* 60(2): 395–405.

- Carlezon WA Jr, Nestler EJ (2002) Elevated levels of GluR1 in the midbrain: a trigger for sensitization to drugs of abuse? *Trends Neurosci* 25(12): 610-605.
- Chin J, Sternin O, Wu HBK, Burrell S, Lu D, Jenab S, Perrotti LI, Quinones-Jenab V (2002) Endogenous gonadal hormones modulate behavioral and neurochemical responses to acute and chronic cocaine administration. *Brain Res* 945: 123-130.
- Churchill L, Swanson CJ, Urbina M, Kalivas PW (1999) Repeated cocaine alters glutamate receptor subunit levels in the nucleus accumbens and ventral tegmental area of rats that develop behavioral sensitization. *J Neurochem* 72(6): 2397-403.
- Dworkin SI, Co C, Smith JE (1995) Rat brain neurotransmitter turnover rates altered during withdrawal from chronic cocaine administration. *Brain Res* 682: 116-26.
- Dworkin SI, Co C, Smith JE (1995) Rat brain neurotransmitter turnover rates altered during withdrawal from chronic cocaine administration. *Brain Res* 682: 116-26.
- Feltenstein MW, Byrd EA, Henderson AR, See RE (2009) Attenuation of cocaine-seeking by progesterone treatment in female rats. *Psychoneuroendocrinol* 34(3): 343-352.
- Gomez R, Vargas CR, Wajner M, Barros HM (2003) Lower in vivo brain extracellular GABA concentration in diabetic rats during forced swimming. *Brain Res* 968:281-4.
- Hearing MC, Zink AN, Wickman K (2012) Cocaine-induced adaptations in metabotropic inhibitory signaling in the mesocorticolimbic system. *Rev Neurosci* 23(4): 325–351.

- Hu M, Becker JB (2003) Effects of sex and estrogen on behavioral sensitization to cocaine in rats. *J Neurosci* 23: 693–699.
- Jayaram P, Steketee JD (2005) Effects of cocaine-induced behavioural sensitization on GABA transmission within rat medial prefrontal cortex. *Eur J Neurosci* 21: 2035-2039.
- Jayaram P, Steketee JD (2006) Cocaine-induced increases in medial prefrontal cortical GABA transmission involves glutamatergic receptors. *Eur J Pharmacol* 531(1-3): 74-79.
- Kalivas PW (2004) Glutamate systems in cocaine addiction. *Curr Opin Pharmacol* 4:23–29.
- Kalivas PW, Volkow ND (2005) The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry* 162(8): 1403-13.
- Ke Y, Streeter CC, Nassar LE, Sarid-Segal O, Hennen J, Yurgelun-Todd DA, Awad LA, Rendall MJ, Gruber SA, Nason A, Mudrick MJ, Blank SR, Meyer AA, Knapp C, Ciraulo DA, Renshaw PF (2004) Frontal lobe GABA levels in cocaine dependence: a two-dimensional, J-resolved magnetic resonance spectroscopy study. *Psychiatry Res* 130(3): 283-293.
- Laprade N, Soghomonian JJ (1995) Differential regulation of mRNA levels encoding for the two isoforms of glutamate decarboxylase (GAD₆₅ and GAD₆₇) by dopamine receptors in the rat striatum. *Brain Res Mol Brain Res* 34: 65-74.
- Lynch WJ, Roth ME, Carroll ME (2002) Biological basis of sex differences in drug abuse: preclinical and clinical studies. *Psychopharmacol* 164: 121–137

- Lynch WJ, Roth ME, Mickelberg JL, Carroll ME (2001) Role of estrogen in the acquisition of intravenously self-administered cocaine in female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 68: 641–646.
- Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP (2002) Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 62(4a): 609-614.
- McFarland K, Lapish CC, Kalivas PW (2003) Prefrontal glutamate release into the core of the nucleus accumbens mediates cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *J Neurosci* 23: 3531–3537.
- Nasif FJ, Sidiropoulou K, Hu XT, White FJ (2005) Repeated cocaine administration increases membrane excitability of pyramidal neurons in the rat medial prefrontal cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 312(3):1305-13.
- Nin MS, Ferri MK, Couto-Pereira NS, Souza MF, Azeredo LA, Agnes G, Gomez R, Barros HM (2012) The effect of intra-nucleus accumbens administration of allopregnanolone on δ and $\gamma 2$ GABA(A) receptor subunit mRNA expression in the hippocampus and on depressive-like and grooming behaviors in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 103(2): 359-366.
- Nin MS, Salles FB, Azeredo LA, Frazon AP, Gomez R, Barros HM (2008) Depressant effect and changes of GABAA receptor gamma2 subunit mRNA after hippocampal administration of allopregnanolone in rats. *J Psychopharmacol* 22(5): 477-485.
- Niyomchai T, Russo SJ, Festa ED, Akhavan A, Jenab S, Quiñones-Jenab V (2005) Progesterone inhibits behavioral responses e estrogen increases corticosterone levels after acute cocaine administration. *Pharmacol Biochem Behav* 80: 603-610.

- Paxinos G, Watson C (1996) The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney: Academic Press.
- Petkova-Kirova P, Rakovska A, Della Corte L, Zaekova G, Radomirov R, Mayer A (2008) Neurotensin modulation of acetylcholine, GABA, and aspartate release from rat prefrontal cortex studied in vivo with microdialysis. *Brain Res Bull* 77(2-3): 129-35.
- Pierce RC, Bell K, Duffy P, Kalivas PW (1996) Repeated cocaine augments excitatory amino acid transmission in the nucleus accumbens only in rats having developed behavioral sensitization. *J Neurosci* 16:1550–1560.
- Pierce RC, Kalivas PW (1997) A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Brain Res Rev* 25(2): 192-216.
- Pierce RC, Kalivas PW (1997) A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Rev* 25: 192–216.
- Quiñones-Jenab V (2006) Why are women from Venus and men from Mars when they abuse cocaine? *Brain Res* 1126: 200-203.
- Ricci LA, Grimes JM, Knyshevski I, Melloni RH (2005). Repeated cocaine exposure during adolescence alters glutamic acid decarboxylase-65 (GAD₆₅) immunoreactivity in hamster brain: correlation with offensive aggression. *Brain Res* 1035: 131-8.
- Rupprecht R (2003) Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. *Psychoneuroendocrinol* 28(2): 139-68.

- Scheggi S, Raone A, De Montis MG, Tagliamonte A, Gambarana C (2007) Behavioral expression of cocaine sensitization in rats is accompanied by a distinct pattern of modifications in the PKA/DARPP-32 signaling pathway. *J Neurochem* 103: 1168–1183.
- Segarra AC, Agosto-Rivera JL, Febo M, Lugo-Escobar N, Menéndez-Delmestre R, Puig-Ramos A, Torres-Diaz YM (2010). Estradiol: A key biological substrate mediating the response to cocaine in female rats. *Horm Behav* 58: 33-43.
- Sell SL, Scalzitti JM, Thomas ML, Cunningham KA (2000) Influence of Ovarian Hormone e Estrous Cycle on the Behavioral Response to Cocaine in Female Rats. *J Pharm Exp Ther* 293: 879-886.
- Sidoryk-Wegrzynowicz M, Aschner M (2013) Manganese toxicity in the central nervous system: the glutamine/glutamate-c-aminobutyric acid cycle. *J Intern Med* 273: 466–477.
- Siegal N, Dow-Edwards D (2009) Isoflurane anesthesia interferes with the expression of cocaine-induced sensitization in female rats. *Neurosci Lett* 464(1):52-56.
- Smith JE, Koves TR, Co C (2003) Brain neurotransmitter turnover rates during rat intravenous cocaine self-administration. *Neuroscience* 117: 461-75.
- Smith JE, Koves TR, Co C (2003) Brain neurotransmitter turnover rates during rat intravenous cocaine self-administration. *Neuroscience* 117: 461-75.
- Souza MF, Couto-Pereira NS, Freese L, Costa PA, Caletti G, Bisognin KM, Nin MS, Gomez R, Barros HMT (2013) Behavioral effects of endogenous or exogenous estradiol and progesterone on cocaine sensitization in female rats. *Braz J Med Biol Res* *in press*.

- Souza MF, Toniato VM, Frazzon AP, Balrros HM (2009) Influence of progesterone on GAD65 and GAD67 mRNA expression in the dorsolateral striatum and prefrontal cortex of female rats repeatedly treated with cocaine. *Braz J Med Biol Res* 42(11): 1068-1075.
- Steketee JD (2005) Cortical mechanisms of cocaine sensitization. *Crit Rev Neurobiol* 17(2): 69-86.
- Thomas MJ, Beurrier C, Bonci A, Malenka RC (2001) Long-term depression in the nucleus accumbens: a neural correlate of behavioral sensitization to cocaine. *Nat Neurosci* 4:1217–1223.
- Torregrossa MM, Tang XC, Kalivas PW (2008) The glutamatergic projection from the prefrontal cortex to the nucleus accumbens core is required for cocaine-induced decreases in ventral pallidal GABA. *Neurosci Lett* 438(2): 142–145.
- Torregrossa MM, Kalivas PW (2008) Neurotensin in the ventral pallidum increases extracellular gamma-aminobutyric acid and differentially affects cue and cocaine-primed reinstatement. *J Pharmacol Exp Ther* 325(2): 556-566.
- Vanderschuren LJ, Kalivas PW (2000) Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacol (Berl)* 151(2-3): 99-120.
- Williams JM, Steketee JD (2004) Cocaine increases medial prefrontal cortical glutamate overflow in cocaine-sensitized rats: a time course study. *Eur J Neurosci* 20:1639–1646.
- Yang S, Salmeron BJ, Ross TJ, Xi ZX, Stein EA, Yang Y (2009) Lower glutamate levels in rostral anterior cingulate of chronic cocaine users - A (1)H-MRS study

using TE-averaged PRESS at 3 T with an optimized quantification strategy.

Psychiatr Res 174:171–176.

Zhou W, Cunningham KA, Thomas ML (2002) Estrogen regulation of gene expression in the brain: a possible mechanism altering the response to psychostimulants in female rats. *Brain Res Mol Brain Res* 100(1-2): 75-83.

Legends

Figure 1. Schematic time-line of procedures. ● represents only locomotion registration.

○ represents perfusate collection and locomotion registration.

Figure 2. Locomotion counts on the challenge day before or after cocaine 15 mg/kg of female rats under different hormonal conditions: **A.** SHAM and **B.** Ovariectomized (OVX). Legends: Saline (CTR); Acute cocaine (ACT); Repeated cocaine (RPT); * represents significant difference from CTR; + represents significant difference from ACT; ● represents significant difference from OVX. ($F_{\text{treat}(2,150)} = 14.73; P < 0.001$; $F_{\text{time}(5,150)} = 13.83; P < 0.001$; $F_{\text{treat} \times \text{time}(10,150)} = 4.36; P < 0.001$).

Figure 3. Extracellular GABA concentration (ng/mL) in the medial prefrontal cortex (mPFC) at 30 and 60 minutes after cocaine challenge of intact (SHAM) and ovariectomized (OVX) female rats. Legends: Saline (CTR); Acute cocaine (ACT); Repeated cocaine (RPT); ● represents significant difference from the respective CTR; * represents significant difference from RPT-SHAM; + represents significant difference from respective OVX group. ($F_{\text{treat}(2,38)} = 12.73; P < 0.001$. $F_{\text{int}(2,38)} = 10.41; P < 0.001$).

Figure 4. Extracellular GABA levels (% from baseline) in the medial prefrontal cortex (mPFC) on the cocaine challenge day of female rats under different hormonal conditions: **A.** SHAM and **B.** Ovariectomized (OVX). Legends: Acute cocaine (ACT); Repeated cocaine (RPT); * represents significant difference from CTR; + represents significant difference from ACT; ● represents significant difference from the respective

SHAM group. ($F_{\text{treat (1,112)}} = 11.344; P < 0.001$. $F_{\text{time (6,112)}} = 5.705; P < 0.001$. $F_{\text{treat x cond x time (12,112)}} = 2.218; P = 0.015$).

Figure 5. Extracellular glutamate concentration ($\mu\text{g/mL}$) in the medial prefrontal cortex (mPFC) at 30 and 60 minutes after cocaine challenge of intact (SHAM) and ovariectomized (OVX) female rats. Legends: Saline (CTR); Acute cocaine (ACT); Repeated cocaine (RPT); Ovariectomized (OVX); SHAM. ($F_{\text{treat (2,38)}} = 1.00; P = 0.38$. $F_{\text{cond (1,38)}} = 2.38; P = 0.13$).

Figure 6. Extracellular glutamate levels (% from baseline) in the medial prefrontal cortex (mPFC) on the cocaine challenge day of female rats under different hormonal conditions: **A.** SHAM and **B.** Ovariectomized (OVX). Legends: Acute cocaine (ACT); Repeated cocaine (RPT); * represents significant difference from CTR; + significant represent difference from RPT. ($F_{\text{treat (2,112)}} = 4.13; P = 0.019$. $F_{\text{time (6,112)}} = 2.97; P = 0.01$).

Figure 1.

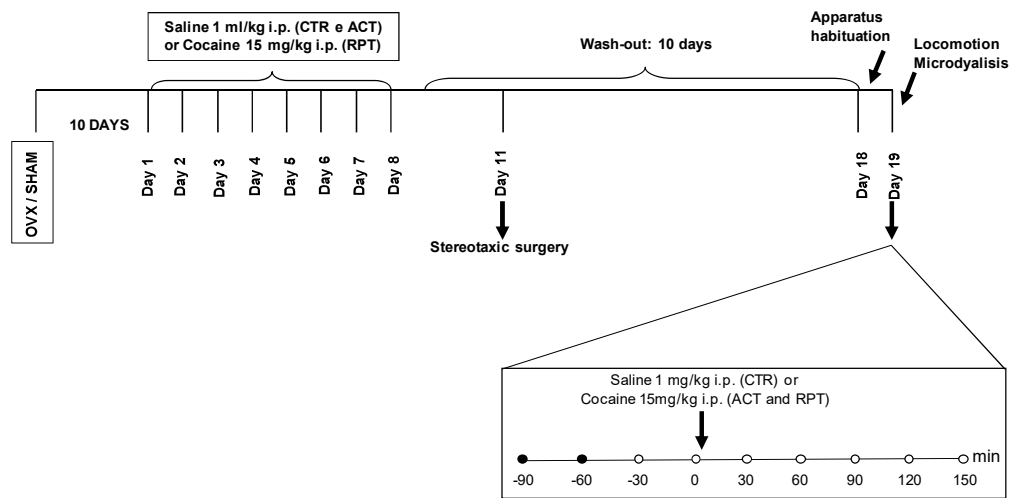


Figure 2.

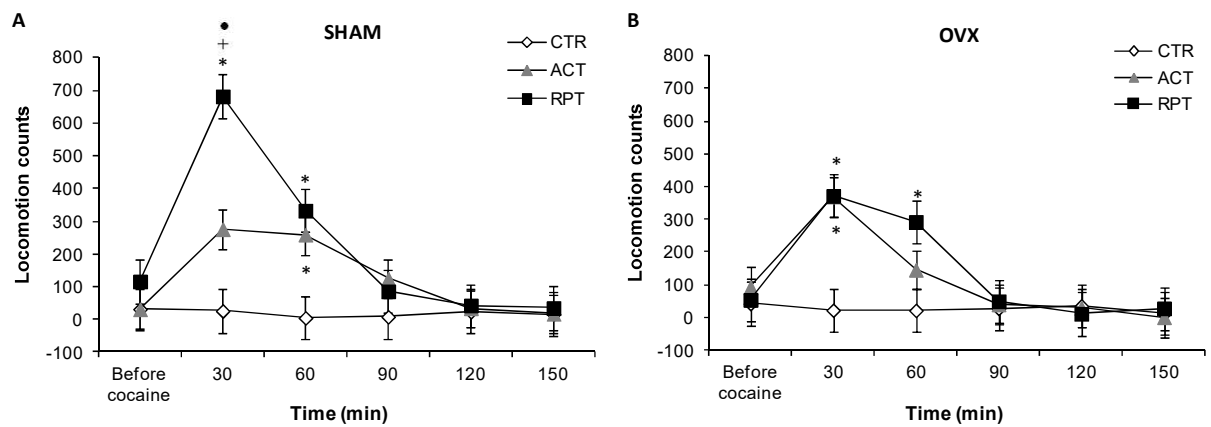


Figure 3.

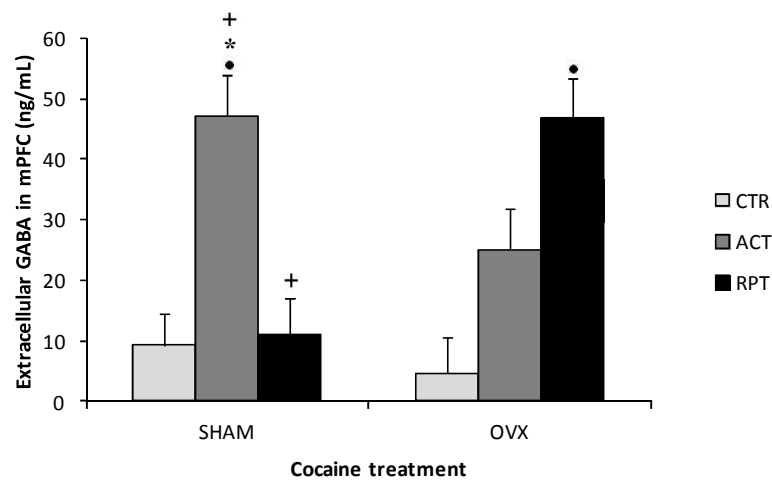


Figure 4.

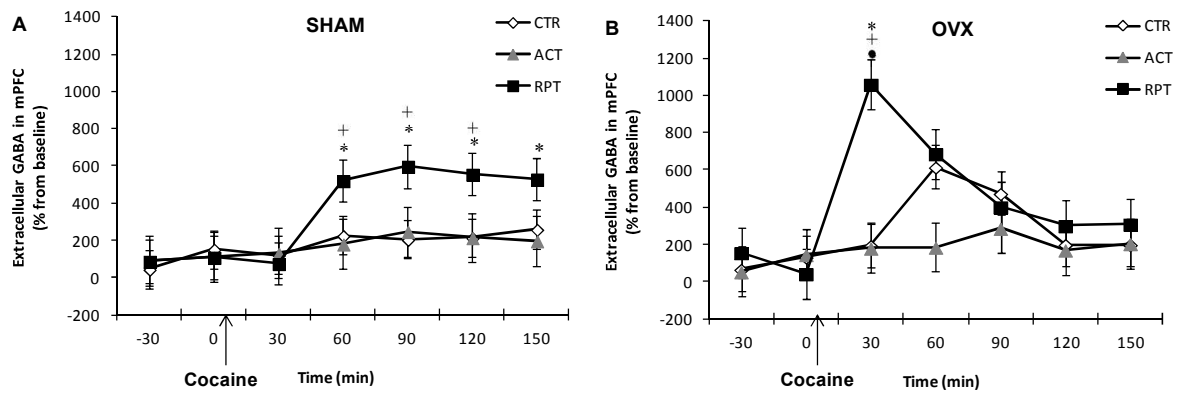


Figure 5.

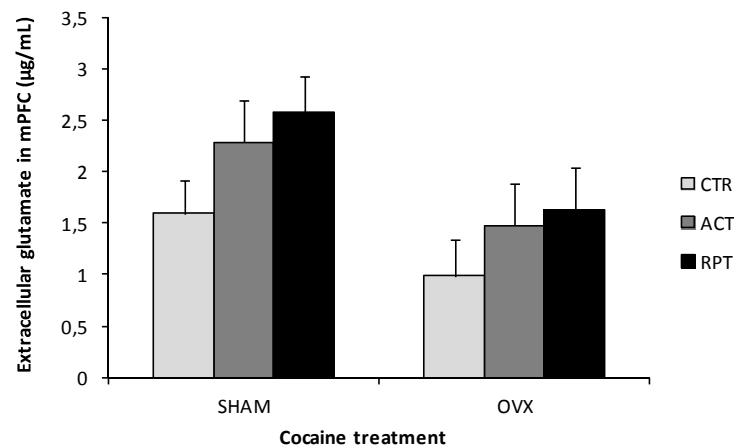
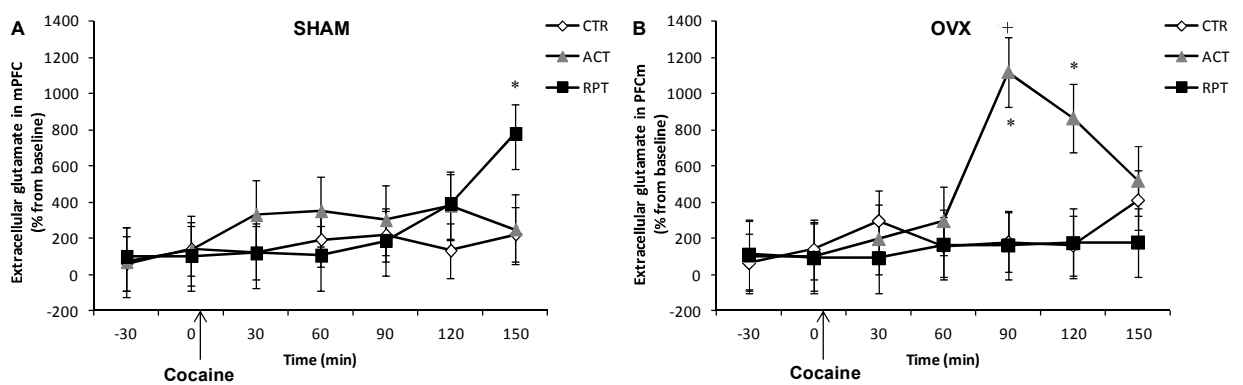


Figure 6.



Capítulo IV

Efeitos administração aguda e repetida de cocaína nos níveis extracelulares de taurina no CPFm de ratas sob diferentes condições hormonais.

Os experimentos realizados e apresentados no artigo a seguir estão associados com o objetivo específico 4, e foram idealizados com a proposta de responder as seguintes perguntas:

- 1) A administração aguda e a sensibilização à cocaína são capazes de alterar os níveis extracelulares de taurina no CPFm de fêmeas?
- 2) A presença dos hormônios sexuais femininos influencia os níveis extracelulares de taurina no CPFm de fêmeas?
- 3) A presença dos hormônios sexuais femininos influenciam nas alterações dos níveis extracelulares de taurina provocados pela administração aguda ou repetida de cocaína?

O artigo foi enviado para publicação na forma de *Brief repport* na revista *Addiction Biology*, fator de impacto 5,914 (Qualis A1).

Extracellular taurine is decreased in the prefrontal cortex of cocaine sensitized female rats

Marilise Fraga de Souza¹; Greice Caletti¹; Maurício Schüler Nin^{1,2}; Gabriela Kampf Cury³; Valéria Flores Peres⁴; Helena Maria Tannhauser Barros¹; Rosane Gomez⁵.

1- Laboratório de Neurociência Comportamental, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA.

2- Curso de Farmácia, Centro Metodista do Sul – IPA.

3- Central Analítica, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA.

4- Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA.

5- Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

Corresponding author:

Marilise Fraga de Souza

Rua Sarmento Leite, 245, sala 317 - Divisão de Farmacologia, UFCSPA

90050-170 - Porto Alegre, RS, Brazil

E-mail: marifs@ufcspa.edu.br

Phone: +5551-330388221

Abbreviated title: Cocaine sensitization changes taurine in females.

Abstract

We evaluated the extracellular levels of taurine (TAU) in the mPFC after acute or repeated cocaine treatment of ovariectomized (OVX) or intact female rats. Rats were treated with saline or cocaine (15 mg/kg/dose) for 8 days. After a washout, microdialysis was performed in the mPFC before and after the cocaine challenge in acute or repeated cocaine groups and the perfusates were analyzed by HPLC. Acute cocaine exposure increased TAU in intact but not in OVX rats. Repeated cocaine rats presented lower TAU increment than ACT in SHAM rats. Sensitization was associated with a hypofunction of brain inhibitory system and the sexual hormones appear to influence the TAU extracellular levels in mPFC of female rats.

Main text

Behavioral sensitization occurs after repeated cocaine use and is thought to underlie some facets of cocaine addiction (Steketee and Kalivas, 2011). Female have more intense responses to cocaine, including behavioral sensitization. Hormonal fluctuations play an important role in this enhanced response, suggesting that the presence of female sex hormones contributes to the reinforcing properties of cocaine (Becker and Hu, 2008).

Taurine (TAU) possibly acts as a neurotransmitter in spite of its mechanisms of action not being understood. It prevents glutamate excitotoxicity (Yablonsky-Alter et al., 2009) or interact with the type A Gamma-AminoButyric Acid receptor (GABA-A), acting as an agonist and increasing the duration of chloride channel conductance (Wu and Prentice, 2010). Moreover, it has been recognized that TAU and GABA are structurally similar and may share transporters in the brain.

Few studies tried to elucidate the role of TAU in cocaine addiction. In males, taurine treatment blocks cocaine addiction, suppressing cocaine sensitization and place preference (Banerjee et al., 2013). On the other hand, chronic cocaine administration seems to increase TAU levels in the striatum of male rats (Banerjee et al., 2013; Yablonsky-Alter et al., 2009). The aim of this study is to investigate the effects of cocaine sensitization or a single cocaine dose on the extracellular level of TAU in the medial prefrontal cortex (mPFC) of ovariectomized (OVX) or intact female rats.

We performed a study with adult female Wistar rats OVX or SHAM operated (n=4-5/group), approved by the UFCSPA Ethics Committee (#1034/10). Rats were randomly assigned to control (CTR), acute (ACT) or repeated (RPT) cocaine subgroups. Both the CTR and ACT received daily doses of saline, while the RPT subgroup received cocaine (15 mg/kg i.p.) for 8 days. Experiments occurred after 10 days of wash-out and the rats were implanted guide-cannulae in the mPFC one week before the challenge day. Microdialysis was conducted to determine the extracellular levels of TAU in mPFC. After collection of the baseline samples with CMA/12 probes, the ACT and RPT subgroups received a challenge dose of cocaine 15 mg/kg i.p., the perfusates were analyzed in a HPLC as previously described by Souza et al. (submitted). A one-way ANOVA was used to determine the statistical differences of TAU concentrations in CTR group. A two- or three-way ANOVA followed by a Tukey post hoc comparison was performed to determine differences on the TAU total levels and TAU levels over time, respectively. A value of $P < 0.05$ was used as the acceptable level of significance.

The mPFC extracellular TAU concentration in CTR female rats is 2.00 ± 0.4 $\mu\text{g/mL}$, without differences between SHAM (1.73 ± 0.53 $\mu\text{g/mL}$) and OVX (2.27 ± 0.6 $\mu\text{g/mL}$) female rats ($F_{(1,61)} = 0.79$; $P = 0.376$). This is the first study that shows the TAU levels on the mPFC of female rats.

When we treated the animals with acute cocaine, TAU levels were not altered in OVX females, but were increased in SHAM female rats (Figure 1), from 30 minutes to cocaine administration (Figure 2A). If we compare the results of OVX females to results in the literature with male rats, very similar results are seen since acute cocaine administration to males do not alter the extracellular concentrations of TAU in the striatum (Banerjee et al., 2013). The results may be demonstrating that rats that show very low estrogen levels don't have an effects in TAU levels in the dose used. One might have to test different cocaine doses to see changes in TAU levels in the animals (males and OVX females).

The increment in the TAU levels after acute cocaine in normally cycling female rats (SHAM) demonstrates that the presence of female sex hormones was crucial to changes in TAU concentration in the mPFC after cocaine (Figure 1). Studies indicated that chronic exposure and a cocaine challenge significantly increases the extracellular levels of TAU in the striatum of male rats (Banerjee et al., 2013; Yablonsky-Alter et al. 2009). However, the increment in TAU levels after RPT cocaine in our SHAM rats was significant lower than that elicited by acute cocaine administration (Figure 1), mainly at 60 minutes after cocaine administration, when a peak in the TAU levels of acutely cocaine treated female occurs (Figure 2A).

The repeated cocaine administration, as proposed in our protocol, induces behavioral sensitization (Souza et al., 2013), that is higher in females than in males (Becker and Hu, 2008). According to a recent study conducted in our laboratory (Souza et al., 2013) hormonally intact females show greater sensitization than castrated rats. Our results show that TAU levels presented lower increment after cocaine sensitization when compared to animals that received a single cocaine dose. Since TAU has an important role in brain inhibitory system, both for its direct inhibitory action, reducing

glutamate-induced excitotoxicity (Yablonsky-Alter et al., 2009), and as a GABA agonist (Wu and Prentice, 2010), the hypofunctionality of this inhibitory cerebral system may be associated to the behavioral changes seen in sensitization after repeated cocaine administration observed in female normal cycling (Souza et al., 2013). An unpublished study of our group (Souza et al., submitted) shows that the extracellular GABA levels also are lower in sensitized intact females, right after the cocaine challenge, and is followed by an increase in glutamate levels in the mPFC. Therefore, cocaine sensitization in normally cycling females can be related to a lower functioning of brain inhibitory systems and consequently allow higher levels of stimulation by increased glutamate release in brain areas related to the cocaine addiction.

References

- Banerjee SP, Ragnauth A, Chan CY, Agovic MS, Sostris V, Jashanmal I, Vidal L, Friedman E. Neuropsychopharmacological Actions of Taurine. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer Science+Business Media New York 2013.
- Becker JB, Hu M. Sex differences in drug abuse. *Front Neuroendocrinol* 2008; 29(1): 36-47.
- Kumari N, Prentice H, Wu JY. Taurine and Its Neuroprotective Role. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer Science+Business Media New York 2013.
- Lidsky TI, Schneider JS, Yablonsky-Alter E, Zuck LG, Banerjee SP (1995) Taurine prevents haloperidol-induced changes in striatal neurochemistry and behavior. *Brain Res* 686:104–106.

Scheggi S, Raone A, De Montis MG, Tagliamonte A, Gambarana C. Behavioral expression of cocaine sensitization in rats is accompanied by a distinct pattern of modifications in the PKA/DARPP-32 signaling pathway. *J Neurochem* 2007; 103: 1168–1183.

Souza MF, Caletti G, Nin MS, Cury GK, Peres VF, Gomez R, Barros HMT. Extracellular GABA and glutamate changes on prefrontal cortex of cocaine-sensitized female rats. Submitted to The journal of neuroscience.

Souza MF, Couto-Pereira NS, Freese L, Costa PA, Caletti G, Bisognin KM, Nin MS, Gomez R, Barros HMT (2013) Behavioral effects of endogenous or exogenous estradiol and progesterone on cocaine sensitization in female rats. *Braz J Med Biol Res*, *in press*.

Steketee JD, Kalivas PW. Drug Wanting: Behavioral Sensitization and Relapse to Drug-Seeking Behavior. *Pharmacol. Rev.* 2011; 63: 348-365.

Wu J-Y, Prentice H (2010) Role of taurine in the central nervous system. *J Biomed Sci* 17(Suppl1):S1–S6

Yablonsky-Alter E, Agovic MS, Gashi E, Lidsky TI, Friedman E, Banerjee SP. Cocaine challenge enhances release of neuroprotective amino acid taurine in the striatum of chronic cocaine treated rats: a microdialysis study. *Brain Res Bull.* 2009 May 29;79(3-4):215-8.

Legends

Figure 1. Total extracellular taurine levels ($\mu\text{g/mL}$) in the medial prefrontal cortex (mPFC) of female rats under different hormonal condition on the cocaine challenge day.

Legends: Saline (CTR); Acute cocaine (ACT); Repeated cocaine (RPT);

Ovariectomized (OVX); SHAM; * represents significant difference from CTR; +

represents significant difference from respective RPT group • represents significant

difference from respective OVX group. ($F_{\text{treat}(2,106)} = 426.31; P < 0.001; F_{\text{cond}(1,106)} =$

$20.33; P < 0.001; F_{\text{int}(2,106)} = 9.53; P < 0.001$).

Figure 2. Extracellular taurine levels ($\mu\text{g/mL}$) in the medial prefrontal cortex (mPFC) over time on the cocaine challenge day of female rats under different hormonal

conditions cross the time: **A.** SHAM and **B.** Ovariectomized (OVX). Legends: Acute

cocaine (ACT); Repeated cocaine (RPT); * represents significant difference from CTR;

+ represents significant difference from ACT; • represents significant difference from

the respective OVX group. ($F_{\text{treat}(2,112)} = 36.73; P < 0.001. F_{\text{cond}(1,112)} = 29.06; P <$

$0.001. F_{\text{treat} \times \text{cond} \times \text{time}(12,112)} = 3.32; P < 0.001$).

Figure 1.

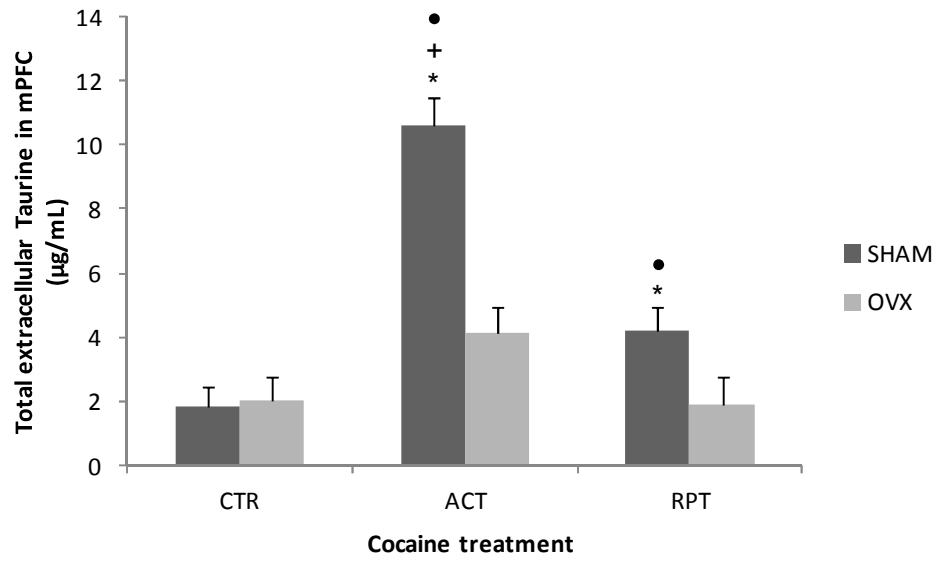
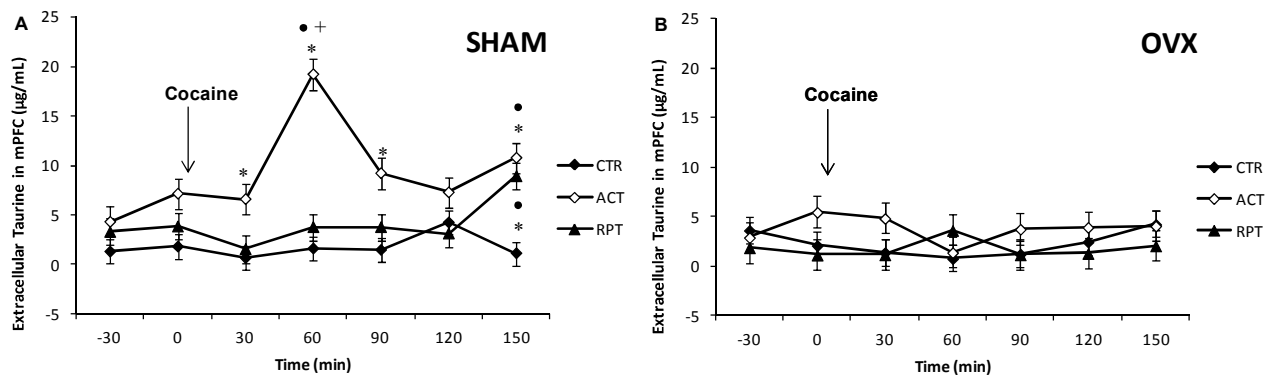


Figure 2.



PARTE III

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

III.1 CONCLUSÕES

Os diferentes resultados obtidos nos artigos incluídos nesta tese mostram que os hormônios sexuais femininos influenciam nos efeitos neurotóxicos e no controle inibitório cerebral, decorrentes da administração aguda ou repetida de cocaína em fêmeas. Um resumo dos principais resultados do artigo estão descritos abaixo e na tabela 1.

Os resultados do primeiro artigo indicam que a exposição aguda ou repetida de cocaína em roedores é capaz de alterar significativamente seu comportamento, tanto na atividade locomotora quanto na indução de comportamentos estereotipados. A exposição repetida intermitente de cocaína induziu sensibilização comportamental em fêmeas, que foi evidenciada através do incremento da locomoção e da estereotipia nestes animais quando comparados àqueles animais que foram expostos a apenas uma administração de cocaína. No entanto, quando verificamos a influência hormonal no desenvolvimento da sensibilização comportamental, a associação destes dois comportamentos somente foi vista quando os animais possuíam a liberação endógena de ambos os hormônios, estrógeno e progesterona. Quando as ratas foram ovariectomizadas e, portanto, apresentavam baixos níveis hormonais, não desenvolveram sensibilização locomotora, embora a sensibilização por estereotipia tenha sido mantida. A reposição hormonal nas ratas ovariectomizadas também alterou diferentemente os comportamentos dos animais. Ratas que receberam reposição de estradiol isoladamente apresentaram sensibilização à cocaína quando os comportamentos estereotipados foram observados. No entanto, quando as ratas receberam progesterona isolada ou em associação com o estradiol, a administração repetida de cocaína não induziu sensibilização comportamental, tanto pela observação

da locomoção quanto da estereotipia. Portanto, o estradiol e progesterona endógena ou exógena afetam diferentemente as respostas comportamentais das ratas sensibilizadas por cocaína. Enquanto a presença do estrógeno, tanto endógena quanto exogenamente foi fator de risco para o desenvolvimento da sensibilização, a progesterona, quando administrada de forma exógena, foi fator de proteção. Portanto, a realização de estudos adicionais que verifiquem a utilização de fármacos que modulem a função hormonal pode ser útil, uma vez que estes podem contribuir e proteger quanto ao o uso de drogas em mulheres.

Os resultados do segundo artigo contribuem para o entendimento da neurotoxicidade da exposição à cocaína em regiões cerebrais envolvidas na adição (CER, Cpf, STR, HIPc e HIPt). Os resultados indicaram que, tanto a exposição aguda, quanto a sensibilização à cocaína, foram capazes de induzir dano no DNA neuronal em diferentes regiões cerebrais das ratas, exceto no hipotálamo, onde a sensibilização à cocaína não provocou dano no DNA dos neurônios desta região. Além disso, embora não significativamente, todas as demais regiões cerebrais apresentaram uma tendência de diminuição dos índices de dano após exposição repetida de cocaína. Estes resultados indicam que a sensibilização à cocaína pode estar relacionada com o desenvolvimento de mecanismos de neuroplasticidade em regiões cerebrais envolvidas na adição. Também a presença dos hormônios sexuais femininos, principalmente o estrógeno endógeno, diminuiu o dano no DNA causado pela administração de cocaína em todas as regiões cerebrais. Portanto, este resultado fortalece a hipótese de que a sensibilização à cocaína, que é mais evidente em ratas que estão ciclando normalmente, possa estar relacionada ao desenvolvimento de neuroplasticidade nas regiões cerebrais avaliadas.

O envolvimento dos sistemas inibitórios cerebrais é fundamental no controle da resposta excitatória decorrente do uso de psicoestimulantes no SNC. Nos dois últimos

artigos, buscamos elucidar o envolvimento do GABA e seus precursores, assim como da taurina, que foi atualmente descrito como um neurotransmissor inibitório, no desenvolvimento da sensibilização comportamental à cocaína em fêmeas. Os resultados indicaram que a cocaína administrada agudamente aumentou os níveis extracelulares de GABA, GLU e taurina no CPFm de ratas, evidenciando que uma única administração de cocaína produz uma resposta inibitória satisfatória nesta região. Por outro lado, os níveis extracelulares de GABA e de taurina tiveram um menor incremento nas ratas com presença hormonal, com conseqüente aumento nos níveis de GLU no CPFm destas ratas. Estes resultados sugerem que uma maior sensibilização à cocaína em fêmeas pode estar relacionada a uma hipofuncionalidade dos sistemas inibitórios cerebrais decorrentes da presença endógena dos hormônios sexuais femininos, tornando os indivíduos do sexo feminino mais susceptíveis aos efeitos da cocaína e provavelmente aumentando o risco de dependência.

Portanto, a sensibilização à cocaína é mais evidente em fêmeas com presença hormonal (principalmente o estrógeno), e esta pode estar relacionada ao desenvolvimento de neuroplasticidade em regiões cerebrais envolvidas com a adição. Além disso, a sensibilização comportamental em fêmeas está relacionada a uma menor atividade dos sistemas inibitórios cerebrais, com conseqüente aumento na atividade excitatória no CPFm, uma das regiões cerebrais mais importantes no desenvolvimento da adição. Um esquema representativo dos principais resultados está exposto na figura 5.

Tabela 1 – Resumo dos principais resultados dos artigos

	Geral	OVX	SHAM	PRO+EST	PRO	EST
Cocaína aguda						
<i>Locomoção</i>	↑	0	0	0	0	0
<i>Estereotipia</i>	↑↑	↑	↑↑↑	↑↑	↑	↑↑
<i>Dano DNA(CER, CPF, HIPc, HIPt, STR)</i>	↑↑	↑↑	↑↑	-	-	-
<i>GABA no CPFm</i>	↑↑↑	↑	↑↑↑	-	-	-
<i>Glutamato no CPFm</i>	↑	↑	0	-	-	-
<i>Glutamina no CPFm</i>	↓	0	↓	-	-	-
<i>Taurina no CPFm</i>	↑↑↑	0	↑↑↑	-	-	-
Sensibilização à cocaína						
<i>Locomoção</i>	0	0	↑↑↑	↑	↑	↑
<i>Estereotipia</i>	↑↑	↑↑	↑↑↑	↑	↑	↑↑↑
<i>Dano DNA(CER, CPF, HIPc, HIPt, STR)</i>	↑	↑	0	-	-	-
<i>GABA no CPFm</i>	↑↑	↑↑↑	0	-	-	-
<i>Glutamato no CPFm</i>	↑	0	↑	-	-	-
<i>Glutamina no CPFm</i>	↓	0	↓	-	-	-
<i>Taurina no CPFm</i>	↑	0	↑	-	-	-

Legenda: ↑ indica aumento; ↓ diminuição; 0 sem efeito; - não avaliado.

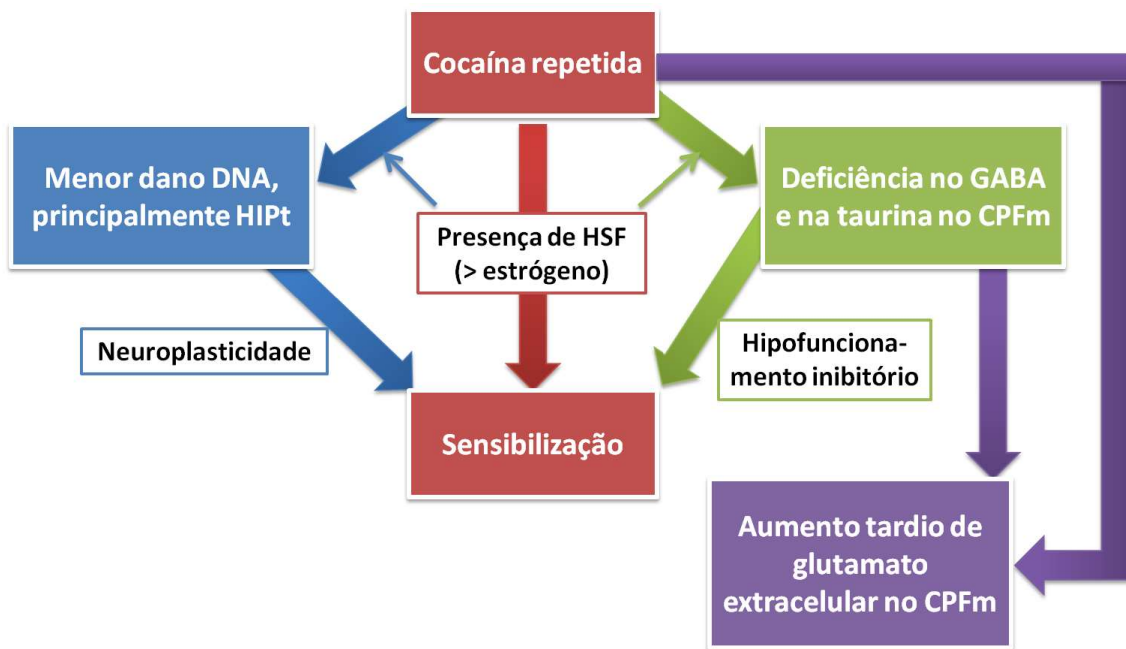


Figura 5. Esquema representativo das principais conclusões da tese.

III.2 PERSPECTIVAS

Com base na discussão dos resultados encontrados, outros questionamentos foram gerados. Futuramente, tentaremos elucidar, através da construção de projeto de pós-doutorado, os seguintes aspectos:

- Avaliar as alterações dos sistemas inibitórios após sensibilização à cocaína em outras regiões cerebrais envolvidas na dependência à cocaína, principalmente aquelas que, assim como o Cpf, compõe o sistema límbico (NAc, HIPc, ATV e amígdala).
- Realizar estudos que prevejam a utilização de animais para que seja possível rastrear outras fases do ciclo onde, por exemplo, a progesterona esteja aumentada.

Esta série de perspectivas pontuais ajudará a esclarecer o papel de ambos hormônios sexuais femininos na sensibilização à cocaína nas principais regiões cerebrais envolvidas na dependência química. Desta forma, poderemos investigar o uso de substâncias como alternativa no tratamento da adição e na prevenção do uso abusivo de drogas por mulheres.

REFERÊNCIAS

(As referencias abaixo foram citadas e não incluem, necessariamente, as referencias citadas nos artigos).

AARÃO, M. C. **Cocaína: Mecanismos de Ação e Efeitos no Organismo, 2008**. 20 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) – Universidade Federal de São João Del-Rei, São João Del-Rei.

ALBRECHT, J.; SIDORYK-WĘGRZYNOWICZ, M.; ZIELIŃSKA, M.; ASCHNER, M. Roles of glutamine in neurotransmission. **Neuron Glia Biology**, v. 6, n. 4, p. 263-76, 2010.

ALVARENGA, T.A.; ANDERSEN, M.L.; RIBEIRO, D.A.; ARAUJO, 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, p. 96-99, 2009.

ALVARENGA, T.A.; RIBEIRO, D.A.; ARAUJO, P.; HIROTSU, C.; MAZARO-COSTA, R.; COSTA, J.L.; BATTISTI, M.C.; TUFIK, S.; ANDERSEN, M.L. Sleep loss and acute drug abuse can induce DNA damage in multiple organs of mice. **Human and Experimental Toxicology**, n. 30, v. 9, p. 1275-81, 2011.

ALVARO-BARTOLOMÉ, M.; LA HARPE, R.; CALLADO, L.F.; MEANA, J.J.; GARCÍA-SEVILLA, J.A. Molecular adaptations of apoptotic pathways and signaling partners in the cerebral cortex of human cocaine addicts and cocaine-treated rats. **Neuroscience**, v. 196, p. 1-15, 2011.

ALVES, B.E.P.; CARNEIRO, E.O. **Drogas psicoestimulantes: uma abordagem toxicológica sobre cocaína e metanfetamina**. Disponível em: < www.cpgls.ucg.br >. Acesso em: 23 de out. 2013.

ANDRADE, S.; ARBO, B.D.; BATISTA, B.A.M.; NEVES, A.M.; BRANCHINI, G.; BRUM, I.S.; BARROS, H.M.T.; GOMEZ, R.; RIBEIRO, M.F.M. Effect of progesterone on the expression of GABA_A receptor subunits in the prefrontal cortex of rats: implications of sex differences and brain hemisphere. **Cell Biochemistry and Function**, v. 30, n. 8, p. 696–700, 2012.

APA (American Psychiatric Association): **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**, Fifth Edition. Arlington, VA, American Psychiatric Association, 2013.

ANDERSON, S. M.; PIERCE, R. C. Cocaine-induced alterations in dopamine receptor signaling: Implications for reinforcement and reinstatement. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 106, p. 389-403, 2005.

BACKES, E. N.; HEMBY, S. E. Contribution of Ventral Tegmental GABA Receptors to Cocaine Self-administration in Rats. **Neurochem Research**, v. 33, p. 459-467, 2008.

BADISA R.B.; DARLING-REED, S.F.; GOODMAN, C.B. Cocaine induces alterations in mitochondrial membrane potential and dual cell cycle arrest in rat c6 astrogloma cells. **Neurochem Research**, v. 35, n. 2, p. 288-97, 2010.

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

BAKER, D.A.; MCFARLAND, K.; LAKE, R.W.; SHEN, H.; TANG, X.C.; TODA, S.; KALIVAS, P.W. Neuroadaptations in cystine-glutamate exchange underlie cocaine relapse. **Nature Neuroscience**, v. 6, n 7, p. 743-9, 2003.

BANERJEE, S.P.; RAGNAUTH, A.; CHAN, C.Y.; AGOVIC, M.S.; SOSTRIS, V.; JASHANMAL, I.; VIDAL, L.; FRIEDMAN, E. **Neuropsychopharmacological Actions of Taurine**. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer Science and Business Media, New York, 2013.

BARRETT, A. C.; MILLER, J. R.; DOHRMANN, J. M.; CAINE, S. B. Effects of dopamine indirect agonists and selective D1-like and D2-like agonists and antagonists on cocaine self-administration and food maintained responding in rats. **Neuropharmacology**, v. 47, Suppl 1, p. 256-73, 2004.

BEN-SHAHAR, O.; AHMED, S. H.; KOOB, G.F.; ETTENBERG, A. The transition from controlled to compulsive drug use is associated with a loss of sensitization. **Brain Research**, v. 995, p. 46-54, 2004.

BERGLIND, W.J.; WHITFIELD JR, T.W.; LALUMIERE, R.T.; KALIVAS, P.W.; MCGINTY, J.F. Single Intra-PFC Infusion of BDNF Prevents Cocaine-Induced Alterations in Extracellular Glutamate within the Nucleus Accumbens. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 12, p. 3715-3719, 2009.

BEYER, C. E.; STEKETEE, J. D. Cocaine sensitization: modulation by dopamine D2 receptors. **Cerebral Cortex**, v. 12, n. 5, p. 526-535, 2002.

BIRI A.; CIVELEK, E.; KARAHALIL, B.; SARDAŞ, S. Assessment of DNA damage in women using oral contraceptives. **Mutation Research**, v. 521, n. 1-2, p. 113-9, 2002.

BOOZE, R. M.; WOOD, M. L.; WELCH, M. A.; BERRY, S.; MACTUTUS, C. F. Estrous cyclicity and behavioral sensitization in female rats following repeated intravenous cocaine administration. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 64, n. 3, p. 605-610, 1999.

BOWERY, N. G.; BETTLER, B.; FROESTL, W.; GALLAGHER, J. P.; MARSHALL, F.; RAITERI, M.; BONNER, T. I.; ENNA, S. J. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. **Pharmacological Reviews**, v. 54, p. 247-264, 2002.

BRADY, A. M.; GLICK, S. D.; O'DONNELL, P. Selective disruption of nucleus accumbens gating mechanisms in rats behaviorally sensitized to methamphetamine. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 8, p. 6687-6695, 2005.

BRAZ, M.G.; SALVADORI, D.M. Lack of genotoxicity induced by endogenous and synthetic female sex hormones in peripheral blood cells detected by alkaline comet assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 48, n. 5, p. 414-2, 2007.

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. GOODMAN & GILMAN'S. **The Pharmacology Basis of Therapeutics**, 12th ed, New York: McGraw-Hill, 2011.

BÜTTNER, A.; MALL, G.; PENNING, R.; SACHS, H.; WEIS, E. The neuropathology of cocaine abuse. **Legal Medicine**, v. 5, p. 240-242, 2003.

CAMERON, D. L.; WILLIAMS, J. T. Cocaine inhibits GABA release in the VTA through endogenous 5-HT. **The Journal of Neuroscience**, v. 14, p. 6763-6767, 1994.

CAMPBELL, U. C.; MORGAN, A. D.; CARROLL, M. E. Sex differences in the effects of baclofen on the acquisition of intravenous cocaine self-administration in rats. **Drug e Alcohol Dependence**, v. 66, p. 61-69, 2002.

CANNON, C. M.; BSEIKRI, M. R. Is dopamine required for natural reward? **Physiology and Behavior**, v. 81, p. 741-748, 2004.

CARLINI, E. A.; GALDURÓZ, J. C. F.; NOTO, A. R.; FONSECA, A. M.; CARLINI, C. M. A.; OLIVEIRA, L. G. , et al. **II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país - 2005**. Brasília: Secretaria Nacional Antidrogas, 2007.

CARR, D. B.; SESACK, S.R. GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex. **Synapse**, v. 38, p. 114–123, 2000.

CARROLL, .M.; LYNCH, W.; ROTH, M.; MORGAN, A.; COSGROVE, K. Sex and estrogen influence drug abuse. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, p. 273–279, 2004.

CARROLL, M.E.; MORGAN, A.D.; LYNCH, W.J.; CAMPBELL, U.C.; DESS, N.K. Intravenous cocaine and heroin self-administration in rats selectively bred for differential saccharin intake: phenotype and sex differences. **Psychopharmacology**, v. 161, p. 304–313, 2002.

CARTA, A.R.; MORENO, C.C.; CADONI, C.; TRONCI, E.; DI CHIARA, G. Long-term increase in GAD67 mRNA expression in the central amygdala of rats sensitized by drugs and stress. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 5, p. 1220-30, 2008.

CASTAÑEDA, M.T.; SANABRIA, E.R.G.; HERNANDEZ, S.; AYALA, A.; REYNA, T.A.; WU, J.Y.; COLOM, L.V. Glutamic acid decarboxylase isoforms are differentially distributed in the septal region of the rat. **Neuroscience Research**, v. 52, p.107-119, 2005.

CHEBIB, M.; JOHNSTON, G.A. The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 26, n. 11, p. 937-940, 1999.

CHEN, Q.; LEE, T.H.; WETSEL, W.C.; SUN, Q.A.; LIU, Y.; DAVIDSON, C.; XIONG, X.; ELLINWOOD, E.H.; ZHANG, X. Reversal of cocaine sensitization-induced behavioral sensitization normalizes GAD67 and GABAA receptor alpha2 subunit expression, and PKC zeta activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 356, n. 3, 733-738, 2007.

- CHIN, J.; STERNIN, O.; WU, H.B.K.; BURRELL, S.; LU, D.; JENAB, S.; PERROTTI, L.I.; QUINONES-JENAB, V. Endogenous gonadal hormones modulate behavioral and neurochemical responses to acute and chronic cocaine administration. **Brain Research**, v. 945, p. 123-130, 2002.
- CONCAS, A.; FOLLESA, P.; BARBACCIA, M.L.; PURDY, R.H.; BIGGIO, G. Physiological modulation of GABA(A) receptor plasticity by progesterone metabolites. **European Journal of Pharmacology**, v. 375, n. 1-3, p. 225-235, 1999.
- CURTIS, D.R.; WATKINS, J.C. The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. **Journal of Neurochemistry**, v. 6, p. 117-41, 1960.
- DACKIS, C.A.; O'BRIEN, C. Cocaine dependence: a disease of brain's reward centers. **Journal of Substance Abuse Treatment**, v. 21, p. 111-117, 2001.
- DAFNY, N.; YANG, P.B. The role of age, genotype, sex, and route of acute and chronic administration of methylphenidate: A review of its locomotor effects. **Brain Research Bulletin**, v. 68, 393-405, 2006.
- DARLISON, M.G.; PAHAL, I.; THODE, C. Consequences of the evolution of the GABA A receptor gene family. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 25; p. 607-624, 2005.
- DE AZEREDO, L.A.; MARQUARDT, A.R.; FRAZZON, A.P.; BARROS, H.M. Cocaine reverses the changes in GABAA subunits and in glutamic acid decarboxylase isoenzymes mRNA expression induced by neonatal 6-hydroxydopamine. **Behavioral Pharmacology**, v. 21, n. 4, p. 343-52, 2010.
- DE LEON, K.R.; TODTENKOPF, M.S.; STELLAR, J.R. An examination of glutamate decarboxylase(65) immunoreactive puncta with respect to rat ventral pallidum neurons after repeated cocaine administration. **Neuroscience Letters**, v. 284, n. 1-2, p. 69-72, 2000.
- DEY, S.; SNOW, D.M. Cocaine exposure in vitro induces apoptosis in fetal locus coeruleus neurons through TNF-alpha-mediated induction of Bax and phosphorylated c-Jun NH(2)-terminal kinase. **Journal of Neurochemistry**, v. 103, n. 2, p. 542-56, 2007.
- DOWNS, A.; EDDY, N. The effect of repeated doses of cocaine on the rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 46, p. 199-200, 1932.

D'SOUZA, D.; THOMAS, I.M.; DAS, B.C. Variation in spontaneous chromosomal damage as a function of biologic rhythms in women. **Human Genetics**, v. 79, n. 1, p. 83-5, 1988.

DWORKIN, S.I.; CO, C.; SMITH, J.E. Rat brain neurotransmitter turnover rates altered during withdrawal from chronic cocaine administration. **Brain Research**, v. 682, p. 116-26, 1995.

ECKERMANN, K.; BEASLEY, A.; YANG, P.; GAYTAN, O.; SWANN, A.; DAFNY, N. Methylphenidate sensitization is modulated by valproate. **Life Sciences**, v. 69, n. 1, p. 47-57, 2001.

EGRED, M.; DAVIS, G.K. Cocaine and the heart. **Postgraduate Medical Journal**, v. 81, p. 568-571, 2005.

EVANS, S.M.; FOLTIN, R.W. Exogenous progesterone attenuates the subjective effects of smoked cocaine in women, but not in men. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, p. 659-74, 2006.

EVANS, S.M.; HANEY, M.; FOLTIN, R.W. The effects of smoked cocaine during the follicular e luteal phases of the menstrual cycle in women. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 159, p. 397-406, 2002.

FENALTI, G.; LAW, R.H.; BUCKLE, A.M.; et al. GABA production by glutamic acid decarboxylase is regulated by a dynamic catalytic loop. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 14, p. 280-286, 2007.

FERREIRA, P.E.M.; MARTINI, R.K. Cocaína: lendas, história e abuso. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23, n. 2, p. 96-99, 2001.

FELTENSTEIN, M.W.; BYRD, E.A.; HENDERSON, A.R.; SEE, R.E. Attenuation of cocaine-seeking by progesterone treatment in female rats. **Psychoneuroendocrinol**, v. 34, n. 3, p. 343-52, 2009.

FIGLIE, N.B.; BORDIN, S.; LARANJEIRA, R.R. **Aconselhamento em dependência química**. São Paulo: Editora Roca, 2004.

FOLLESA, P.; FLORIS, S.; TULIGI, G.; MOSTALLINO, M.C.; CONCAS, A.; BIGGIO, G. Molecular and functional adaptation of the GABA(A) receptor complex

during pregnancy and after delivery in the rat brain. **European Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 9, p. 2905-2912, 1998.

FOLLESA, P.; PORCU, P.; SOGLIANO, C.; CINUS, M.; BIGGIO, F.; MANCUSO, L.; MOSTALLINO, M.C.; PAOLETTI, A.M.; PURDY, R.H.; BIGGIO, G.; CONCAS, A. Changes in GABA_A receptor gamma 2 subunit gene expression induced by long-term administration of oral contraceptives in rats. **Neuropharmacology**, v. 42, p. 325–336, 2002.

GOEDERS, N.; BELL, V.; GUIDROZ, A.; MCNULTY, M. Dopamine involvement in the cocaine-induced up-regulation of benzodiazepine receptors in the rat caudate nucleus. **Brain Research**, v. 515, p. 1-8, 1990.

GOLDSTEIN, R.Z.; VOLKOW, N.D. Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. **The American Journal of Psychiatry**, v. 159, n. 10, p. 1642-52, 2002.

GRAY, J. A.; FELDON, J.; RAWLINS, J. N. P.; HEMSLEY D. R.; SMITH, A. D. The neuropsychology of schizophrenia. **Behavioral and Brain Sciences**, v. 14, n. 1, p. 1-84, 1991.

GRIMM, O. Armadilhas da Obesidade. **Mente & Cérebro**, v. 169, p 66-71, 2007.

HAMMER, R.P. JR.; EGILMEZ, Y.; EMMETT-OGLESBY, M.W. Neural mechanisms of tolerance to the effects of cocaine. **Behavioural Brain Research**, v. 84, n. 1-2, p. 225-39.

HU, M.; BECKER, J.B. Acquisition of cocaine self-administration in ovariectomized female rats: Effect of estradiol dose or chronic estradiol administration. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 94, p. 56–62, 2008.

HU, M.; BECKER, J.B. Effects of sex and estrogen on behavioral sensitization to cocaine in rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 693–699, 2003.

HU, M.; CROMBAG, H.S.; ROBINSON, T.E.; BECKER, J.B. Biological basis of sex differences in the propensity to self-administer cocaine. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, p. 81–85, 2004.

HUANG, C.C.; LIN, H.J.; HSU, K.S. Repeated cocaine administration promotes long-term potentiation induction in rat medial prefrontal cortex. **Cerebral Cortex**, v. 17, p. 1877-88, 2007.

ITO, K.; OHMORI, T.; ABEKAWA, T.; KOYAMA, T. Clonazepam prevents the development of sensitization to methamphetamine. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 58, n. 4, p. 875-9, 1997.

JACKSON, L.R.; ROBINSON, T.E.; BECKER, J.B. Sex differences e hormonal influences on acquisition of cocaine self-administration in rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, p. 129-38, 2006.

JAYARAM, P.; STEKETEE, J.D. Effects of cocaine-induced behavioural sensitization on GABA transmission within rat medial prefrontal cortex. **European Journal Neuroscience**, v. 21, p. 2035-9, 2005.

JAYARAM, P.; STEKETEE, J.D. Effects of repeated cocaine on medial prefrontal cortical GABAB receptor modulation of neurotransmission in the mesocorticolimbic dopamine system. **Journal of Neurochemistry**, v. 90, p. 839-847, 2004.

JENTSCH, J.D.; TAYLOR, J.R. Impulsivity resulting from frontostriatal dysfunction in drug abuse: implications for the control of behavior by reward-related stimuli. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 146, n. 4, p. 373-90, 1999.

JIA, F.; YUE, M.; CHANDRA, D.; KERAMIDAS, A.; GOLDSTEIN, P.A.; HOMANICS, G.E.; HARRISON, N.L. Taurine is a potent activator of extrasynaptic GABA(A) receptors in the thalamus. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 1, p. 106-15, 2008.

JOHANSON, C.E.; SCHUSTER, C.R. Cocaine. In: BLOOM, F.E.; KUPFER D.J. (Org.). **Neuropsychopharmacology: The Fourth Generation of Progress**. 4th ed., New York: Raven, 2000. Disponível em <<http://www.acnp.org/g4/GN401000164/Default.htm>>. Acesso em: 6 nov. 2008.

JUSTICE, A.J.H., DE WIT, H.. Acute effects of d-amphetamine during the early and late follicular phases of the menstrual cycle in women. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 66, p. 509-515, 2000.

KALIVAS, P.W.; VOLKOW, N.D. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. **The American Journal of Psychiatry**, v. 162, n. 8, p. 1403-13, 2005.

KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO J.; IZQUIERDO, I. **Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos: uma abordagem translacional**. 3ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

KARLER, R.; CALDER, L.D.; THAI, D.K.; BEDINGFIELD, J.B. The role of dopamine and GABA in the frontal cortex of mice in modulating motor-stimulant effects of amphetamine e cocaine. **Pharmacology, Biochemistry and Behavioral**, v. 60, n. 1, p. 237-244, 1998.

KARLER, R.; CALDER, L.D.; THAI, L.H.; BEDINGFIELD, J.B. The dopaminergic, glutamatergic, GABAergic bases for the action of amphetamine and cocaine. **Brain Research**, v. 671, p. 100-104, 1995.

KARREMAN, M.; MOGHADDAM, B. The prefrontal cortex regulates the basal release of dopamine in the limbic striatum: an effect mediated by ventral tegmental area. **Journal of Neurochemistry**, v. 66, n. 2, p. 589-598, 1996.

KOOB, G.F. The neurobiology of addiction: a neuroadaptational view relevant for diagnosis. **Addiction**, v. 101, Suppl. 1, p. 23–23, 2006.

KOSTEN, T.R.; KOSTEN, T.A.; MCDOUGLE, C.J.; HAMEEDI, F.A.; MCCANCE, E.F.; ROSEN, M.I.; OLIVETO, A.H.; PRICE, L.H. Gender differences in response to intranasal cocaine administration to humans. **Psychiatry**, v. 39, p. 147–148, 1996.

KOURI, E.M.; LUNDAHL, L.H.; BORDEN, K.N.; MCNEIL, J.F.; LUKAS, S.E. Effects of oral contraceptive on acute cocaine response in female volunteers. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 74, p. 173-180, 2002.

KUMARI, N.; PRENTICE, H.; WU, J.Y. **Taurine and Its Neuroprotective Role**. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer Science and Business Media, New York, 2013.

LARANJEIRA, R.; OLIVEIRA, R.A.; NOBRE, M.R.C.; BERNARDO, W.M. **Usuários de substâncias psicoativas: abordagem, diagnóstico e tratamento**. 2ª ed. São Paulo: Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo/Associação Médica Brasileira, 2003.

- LAVIOLA, G.; WOOD, R.D.; KUHN, C.; FRANCIS, R.; SPEAR, L.P. Cocaine sensitization in periadolescent and adult rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 275, n. 1, p. 345-57, 1995.
- LEITE, M.C. História da cocaína. In: LEITE, M.C; ANDRADE A.G. (Org.). **Cocaína e crack: dos fundamentos ao tratamento**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1999. p.15-23.
- LEPSCH, L.B.; MUNHOZ, C.D.; KAWAMOTO, E.M.; YSHII, L.M.; LIMA, L.S.; CURI-BOAVENTURA, M.F.; SALGADO, T.M.L.; CURI, R.; PLANETA, C.S.; SCAVONE, C. Cocaine induces cell death and activates the transcription nuclear factor kappa-b in pc12 cells. **Molecular Brain**, v. 2, p. 3, 2009.
- LI, H.; JIANG, Y.; RAJPURKAR, A.; DUNBAR, J.C.; DHABUWALA, C.B. Cocaine induced apoptosis in rat testes. **Journal of Urology**,v. 162, n. 1, p. 213-6, 1999.
- LI, J.; OLINGER, A.B.; DASSOW, M.S.; ABEL, M.S. Up-regulation of GABA_B receptor mRNA e protein in the hippocampus of cocaine- e lidocaine-kindled rats. **Neuroscience**, v. 118, p. 451-462, 2003.
- LIDSKY, T.I.; SCHNEIDER, J.S.; YABLONSKY-ALTER, E.; ZUCK, L.G.; BANERJEE, S.P. Taurine prevents haloperidol-induced changes in striatal neurochemistry and behavior. **Brain Research**, v. 686, p. 104–106, 1995.
- LINDEFORS, N.; HURD, Y.L.; O'CONNOR, W.T.; BRENE. S.; PERSSON, H.; UNGERSTEDT, U. Amphetamine regulation of acetylcholine and gamma-aminobutyric acid in nucleus accumbens. **Neuroscience**, v. 48, p. 439-48, 1992.
- LIPTON, J.W.; OLSEN, R.W.; ELLISON, G.D. Length of continuous cocaine exposure determines the persistence of muscarinic benzodiazepine receptor alterations. **Brain Research**, v. 676, n. 2, p. 378-385, 1995.
- LITTLE, J.Z.; TEYLER, T.J. GABA_A receptor-mediated field potentials are enhanced in area CA1. **Developmental Brain Research**, v. 110, n. 1, p. 115-119, 1998.
- LYNCH, W.J.; ROTH, M.E.; CARROLL, M.E. Biological basis of sex differences in drug abuse: preclinical and clinical studies. **Psychopharmacology**, v. 164, p. 121–137, 2002.

LYNCH, W.J.; ROTH, M.E.; MICKELBERG, J.L.; CARROLL, M.E. Role of estrogen in the acquisition of intravenously self-administered cocaine in female rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 68, p. 641–646, 2001.

MA, Y.; MA, H.; HONG, J.T.; KIM, Y.B.; NAM, S.Y.; OH, K.W. Cocaine withdrawal enhances pentobarbital-induced sleep in rats: Evidence of GABAergic modulation. **Behavioural Brain Research**, v. 194, n. 1, p. 114-117, 2008.

MARIN, M.T.; CRUZ, F.C.; PLANETA, C.S. Cocaine-induced behavioral sensitization in adolescent rats endures until adulthood: lack of association with GluR1 and NR1 glutamate receptor subunits and tyrosine hydroxylase. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 91, n. 1, p. 109-14, 2008.

MARTINEZ-HERNANDEZ, A.; BELL, K.P.; NOREMBERG, M.D. Glutamine synthetase: glial localization in brain. **Science**, v. 195, n. 4284, p. 1356-8, 1977.

MCCARTHY, M.M.; KAUFMAN, L.C.; BROOKS, P.J.; PFAFF, D.W.; SCHWARTZ-GIBLIN, S. Estrogen modulation of mRNA levels for the two forms of glutamic acid decarboxylase (GAD) in female rat brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 360, n. 4, p. 685-97, 1995.

MORRIS, H.V.; DAWSON, G.R.; REYNOLDS, D.S.; ATACK, J.R.; ROSAHL, T.W.; STEPHENS, D.N. Alpha2-containing GABAA receptors are involved in mediating stimulant effects of cocaine. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 90, n. 1, p. 9-18, 2008.

MORRIS, K.D.W.; MOOREFIELD, C.N.; AMIN, J. Differential modulation of the γ -aminobutyric acid type C receptor by neuroactive steroids. **Molecular**, v. 56, p. 752-759, 1999.

NEAD - Núcleo Einstein de Álcool e Drogas. **Neurobiologia da Dependência Química: O Sistema de Recompensa**. Disponível em: <http://apps.einstein.br/alcooledrogas/novosite/atualizacoes/as_115.htm>. Acesso em 18 de dez. 2013.

NERSESYAN, A.; KUNDI, M.; KRUPITZA, G.; BARCELOS, G.; MIŠÍK, M.; WULTSCH, G.; CARRION, J.; CARRION-CARRERA, G.; KNASMUELLER, S. Induction of nuclear anomalies in exfoliated buccal cells of coca chewers: results of a field study. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 3, p. 529-34, 2013.

NIN, M.S.; FERRI, M.K.; COUTO-PEREIRA, N.S.; SOUZA, M.F.; AZEREDO, L.A.; AGNES, G.; GOMEZ, R.; BARROS, H.M. The effect of intra-nucleus accumbens administration of allopregnanolone on δ and $\gamma 2$ GABA(A) receptor subunit mRNA expression in the hippocampus and on depressive-like and grooming behaviors in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.103, n. 2, p. 359-366, 2012.

NIN, M.S.; SALLES, F.B.; AZEREDO, L.A.; FRAZON, A.P.; GOMEZ, R.; BARROS H.M. Depressant effect and changes of GABAA receptor gamma2 subunit mRNA after hippocampal administration of allopregnanolone in rats. **Journal of Psychopharmacology**, v. 22, n. 5, p. 477-485, 2008.

NIYOMCHAI, T.; RUSSO, S.J.; FESTA, E.D.; AKHAVAN, A.; JENAB, S.; QUIÑONES-JENAB, V. Progesterone inhibits behavioral responses e estrogen increases corticosterone levels after acute cocaine administration. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 80, p. 603-10, 2005.

OLSEN, G.D. Potential mechanisms of cocaine-induced developmental neurotoxicity: a minireview. **Neurotoxicology**, v. 16, n. 1, p. 159-67, 1995.

OWENS, D.F.; KRIEGSTEIN, A.R. Is there more to GABA than synaptic inhibition? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 9, p. 715-27, 2002.

PERFILOVA, V.N.; TIURENKOV, I.N. GABAC receptors: structure and functions. **Ekspertimental'naia i klinicheskaia farmakologija**, v. 74, n. 1, p. 45-9, 2011.

PERIS, J. Antisense inhibition of striatal GABA_A receptor protein decreases GABA-stimulated chloride uptake e increases cocaine sensitivity in rats. **Molecular Brain Research**, v. 57, p. 310- 320, 1998.

PERIS, J. Repeated cocaine injections decrease the function of striatal gamma-aminobutyric acid(A) receptors. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 276, n. 3, p. 1002-8, 1996.

PERROTTI, L.I.; RUSSO, S.J.; FLETCHER, H.; CHIN, J.; WEBB, T.; JENAB, S.; QUIÑONES-JENAB, V. Ovarian hormones modulate cocaine-induced locomotor e stereotypic activity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 937, p. 202-16, 2001.

PERROTTI, L.I.; BECK, K.D.; LUINE, V.N.; QUIÑONES-JENAB, V. Progesterone e Cocaine administration affect Serotonin in the media prefrontal cortex of ovariectomized rats. **Neuroscience Letters**, v. 291, p. 155-158, 2000.

PIERCE, R.C.; BELL, K.; DUFFY, P.; KALIVAS, P.W. Repeated cocaine augments excitatory amino acid transmission in the nucleus accumbens only in rats having developed behavioral sensitization. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, p. 1550–1560, 1996.

PIERCE, R.C.; KALIVAS, P.W. A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants, **Brain Research Reviews**, n. 25, p. 192–216, 1997.

QUIÑONES-JENAB, V. Why are women from Venus and men from Mars when they abuse cocaine? **Brain Research**, v. 1126, p. 200-203, 2006.

QUINN, M.R.; MILLER, C.L. Taurine allosterically modulates flunitrazepam binding to synaptic membranes. **Journal of Neuroscience Research**, v. 33, n. 1, p. 136-41, 1992.

RESNICK, A.; HOMANICS, G.E.; JUNG, B.J.; PERIS, J. Increased acute cocaine sensitivity and decreased cocaine sensitization in GABA(A) receptor beta3 subunit knockout mice. **Journal of Neurochemistry**, v. 73, n. 4, p.1539-48, 1999.

RETAUX, S.; CABOCHE, J.; ROGARD, M.; JULIEN, J.F.; PENIT-SORIA, J.; BESSON, M.J. GABA interneurons in the rat medial frontal cortex: characterization by quantitative in situ hybridization of the glutamic acid decarboxylase (GAD67) mRNA. **Brain Research**, v. 611, p. 187-196, 1993.

RETAUX, S.; JULIEN, J.F.; BESSON, M.J.; PENIT-SORIA, J. Expression of GAD mRNA in GABA interneurons of the rat medial frontal cortex. **Neuroscience Letters**, v. 136, p. 67-71, 1992.

RICCI, L.A.; GRIMES, J.M.; KNYSHEVSKI, I.; MELLONI, R.H. Repeated cocaine exposure during adolescence alters glutamic acid decarboxylase – 65 (GAD₆₅) immunoreactivity in hamster brain: correlation with offensive aggression. **Brain Research**, v. 1035, p. 131-138, 2005.

ROBERTS, D.C.; BENNETT, S.A.; VICKERS, G.J. The estrous cycle affects cocaine self-administration on a progressive ratio schedule in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 98, p. 408-11, 1989.

ROBERTS, E.; FRANKEL, S. Gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 187, n. 1, p. 55-63, 1950.

ROBINSON, T.E.; BERRIDGE, K.C. Mechanisms of Action of Addictive Stimuli: Incentive-sensitization and addiction. **Addiction**, v. 96, p. 103–114, 2001.

ROBINSON, T.E.; BERRIDGE, K.C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. **Brain Research Reviews**, v. 18, p. 247–291, 1993.

ROY, D.; LIEHR, J.G. Estrogen, DNA damage and mutations. **Mutation Research**, v. 424, p. 107-115, 1999.

RUDOLPH, U.; CRESTANI, F.; MOHLER, H. GABA(A) receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, p. 188-194, 2001.

RUPPRECHT, R. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. **Psychoneuroendocrinology**, v. 28, n. 2, p. 139-68, 2003.

RUSSO, S.J.; FESTA, E.D.; FABIAN, S.J.; GAZI, F.M.; KRAISH, M.; JENAB, S.; QUIÑONES-JENAB, V. Gonadal hormones differentially modulate cocaine-induced conditioned place preference in male e female rats. **Neuroscience**, v. 120, p. 523-33, 2003a.

RUSSO, S.J.; JENAB, S.; FABIAN, S.J.; FESTA, E.D.; KEMEN, L.M.; QUIÑONES-JENAB, V. Sex differences in the conditioned rewarding effects of cocaine. **Brain Research**, v. 970, n. 1-2, p. 214-20, 2003b.

SALEH, T. Estrogen-induced autonomic effects are mediated by NMDA e GABA_A receptors in the parabrachial nucleus. **Brain Research**, v. 973, p. 161-170, 2003.

SAMAHA, A.N.; ROBINSON, T.E. Why does the rapid delivery of drugs to the brain promote addiction? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 2, p. 82-7, 2005.

SAMHSA – Substance Abuse and Mental Health Services Administration. **Results from the 2012 National Survey on Drug Use and Health: Summary of National Findings.** Rockville: SAMSHA, 2012.

SEGARRA AC, AGOSTO-RIVERA JL, FEBO M, LUGO-ESCOBAR N, MENÉNDEZ-DELMESTRE R, PUIG-RAMOS A, TORRES-DIAZ YM. Estradiol: A key biological substrate mediating the response to cocaine in female rats. **Hormones and Behavior**, n. 58, p. 33-43, 2010.

SELL, S.L.; THOMAS, M.L.; CUNNINGHAM, K.A. Influence of estrous cycle and estradiol on behavioral sensitization to cocaine in female rats. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 67, p. 281-290, 2002.

SELL, S.L.; SCALZITTI, J.M.; THOMAS, M.L.; CUNNINGHAM, K.A. Influence of Ovarian Hormone e Estrous Cycle on the Behavioral Response to Cocaine in Female Rats. **The Journal of Pharmacology e Experimental Therapeutics**, v. 293, p. 879-886, 2000.

SHUMSKY, J.S.; WU, Y.; MURPHY, E.H.; NISSANOV, J.; O'BRIEN-JENKINS, A.; GRAYSON, D.R. Differential effects of prenatal cocaine exposure on selected subunit mRNAs of the GABA_A receptor in rabbit anterior cingulate cortex. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 24, p. 243-255, 2002.

SIDORYK-WEGRZYNOWICZ, M; ASCHNER M. Manganese toxicity in the central nervous system: the glutamine/glutamate-c-aminobutyric acid cycle. **Journal of Internal Medicine**, v. 273, n. 5, p. 466–477, 2013.

SIEGHART, W.; SPERK, G. Subunit composition, distribution and function of GABA_A receptor subtypes. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, p. 795-816, 2002.

SMITH, S.S.; GONG, Q.H.; HSU, F.C.; MARKOWITZ, R.S.; FRENCH-MULLEN, J.M.H.; LI, X. GABA_A receptor α 4 subunit suppression prevents withdrawal properties of an endogenous steroid. **Nature**, v. 392, p. 926–930, 1998.

SNOW, D.M.; SMITH, J.D.; BOOZE, R.M.; WELCH, M.A.; MACTUTUS, C.F. Cocaine decreases cell survival and inhibits neurite extension of rat locus coeruleus neurons. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 23, n. 3, p. 225-34, 2001.

SOFUOGLU, M.; MITCHELL, E.; KOSTEN, T.R. Effects of progesterone treatment on cocaine responses in male and female cocaine users. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 78, n. 4, p. 699-705, 2004.

SOFUOGLU, M.; DUDISH-POULSEN, S.; NELSON, D.; PENTEL, P.R.; HATSUKAMI, D.K. Sex and menstrual cycle differences in the subjective effects from smoked cocaine in humans. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, v. 7, n. 3, p. 274-83, 1999.

SOGHOMONIAN, J.; MARTIN, D.L. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 19, n. 12, p. 500-505, 1998.

SORG, B.A.; GUMINSKI, B.J.M.; HOOKS, M.S.; KALIVAS, P.W. Cocaine alters glutamatic acid descaroxylyase differentially in the nucleus accumbens core and shell. **Molecular Brain Research**, v. 29, p. 381-386, 1995.

SOUZA, M.F.; TONIAZO, V.M.; FRAZZON, A.P.; BARROS, H.M. Influence of progesterone on GAD65 and GAD67 mRNA expression in the dorsolateral striatum and prefrontal cortex of female rats repeatedly treated with cocaine. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 11, p. 1068-1075, 2009.

STAHL, S.M. **Psicofarmacologia: bases neurocientíficas e aplicações clínicas**. Rio de Janeiro: MEDSI, 1998.

STEFANO, G.B.; BIANCHI, E.; GUARNA, M.; FRICCHIONE, G.L.; ZHU, W.; CADET, P.; MANTIONE, K.J.; CASARES, F.M.; KREAM, R.M.; ESCH, T. Nicotine, alcohol and cocaine coupling to reward processes via endogenous morphine signaling: the dopamine-morphine hypothesis. **Medical Science Monitor**, v. 13, n. 6, p. 91-102, 2007.

STEKETEE, J.D.; KALIVAS, P.W. Drug Wanting: Behavioral Sensitization and Relapse to Drug-Seeking Behavior. **Pharmacological Reviews**, v. 63, p. 348-365, 2011.

STEKETEE, J.D.; BEYER, C.E. Injections of baclofen into the ventral medial prefrontal cortex block the initiation, but not the expression, of cocaine sensitization in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 180, n. 2, p. 352-8, 2005.

STEKETEE, J.D. Neurotransmitter systems of the medial prefrontal cortex: potential role in sensitization to psychostimulants. **Brain Research Reviews**, v. 41, p. 203–228, 2003.

STEWART, J.; BADIANI, A. Tolerance and sensitization to the behavioral effects of drugs. **Behavioural Pharmacology**, v. 4, n. 4, p. 289-312, 1993.

STREHLOW, K.; ROTTER, S.; WASSMANN, S.; ADAM, O.; GROHE, C.; LAUFS, K.; BOHM, M.; NICKENIG, G. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. **Circulation Research**, v. 93, p.170–178, 2003.

THOMAS, M.J.; BEURRIER, C.; BONCI, A.; MALENKA, R.C. Long-term depression in the nucleus accumbens: a neural correlate of behavioral sensitization to cocaine. **Nature Neuroscience**, v. 4, p. 1217–1223, 2001.

TONIAZO, V.M.; PEREIRA, N. S. C.; SOUZA, M.F.; BARROS, H.M.T. Expressão de subunidades de receptores GABA_A no cortex pré-frontal (CPF) de ratas fêmeas após tratamento agudo e repetido de cocaína: ligação da ovariectomia e do hormônio progesterona. **Anais da XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**. Águas de Lindóia, 2007.

TRANHAM, H.; SZUMLINSKI, K.K.; MCFARLAND, K.; KALIVAS, P.W.; LAVIN, A. Repeated cocaine administration alters the electrophysiological properties of prefrontal cortical neurons. **Neuroscience**, v. 113, n. 4, p. 749-53, 2002.

UNODC – United Nations Office on Drugs and Crime. **World Drug Report 2008**. Disponível em: <www.unodc.org>. Acesso em: 19 de set. 2013.

UNODC – United Nations Office on Drugs and Crime. **World Drug Report 2012**. Disponível em: <www.unodc.org>. Acesso em: 19 de set. 2013.

VALENTE, M.J.; CARVALHO, F.; BASTOS, M.D.; DE PINHO, P.G.; CARVALHO, M. Contribution of oxidative metabolism to cocaine-induced liver and kidney damage. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, n. 33, p. 5601-6, 2012.

VANDERSCHUREN, L.J.; KALIVAS, P.W. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 151, n 2-3, p. 99-120, 2000.

VERMA, Y.; RANA, S.V.S. Modulation of phase-II enzyme activities in benzene treated ovariectomized rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 31, p. 371-377, 2011.

VERMA, Y.; RANA, S.V.S. Effects of progesterone on benzene toxicity in rats. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 59, p. 1–9, 2008.

VETULANI, J. Drug addiction. Part II. Neurobiology of addiction. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 53, n. 4, p. 303-17, 2001.

WALKER, Q.D.; NELSON, C.J.; SMITH, D.; KUHN, C.M. Vaginal lavage attenuates cocaine-stimulated activity and establishes place preference in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 73, p. 743–752, 2002.

WATANABE, W.; MAEMURA, K.; KANBARA, K.; TAMAYAMA, T.; HAYASAKI, H. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. **International Review of Cytology**, v. 213, p. 1-47, 2000.

WIELAND, H.A.; LÜDDENS, H.; SEEBURG, P.H. A Single Histidine in GABAA Receptors Is Essential for Benzodiazepine Agonist Binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 3, p. 1426-9, 1992.

WISE, R.A.; BOZARTH, M.A. A psychomotor stimulant theory of addiction. **Psychological Review**, v. 94, n. 4, p. 469-92, 1987.

WOLF, M.E. The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. **Progress in Neurobiology**, v. 54, p. 679-720, 1998.

WU, J.Y.; PRENTICE, H. Role of taurine in the central nervous system. **Journal of Biomedical Science**, v. 17, p. S1–S6, 2010.

WYDRA K, GOLEMBIOWSKA K, ZANIEWSKA M, KAMIŃSKA K, FERRARO L, FUXE K, FILIP M. Accumbal and pallidal dopamine, glutamate and GABA overflow during cocaine self-administration and its extinction in rats. **Addiction Biology**, v. 18, n. 2, p. 307-24, 2013.

YABLONSKY-ALTER, E.; AGOVIC, M.S.; GASHI, E.; LIDSKY, T.I.; FRIEDMAN, E.; BANERJEE, S.P. Cocaine challenge enhances release of neuroprotective amino acid

taurine in the striatum of chronic cocaine treated rats: a microdialysis study. **Brain Research Bulletin**, v.79, n. 4, p.215-8, 2009.

YAMAGUCHI, M.; SUZUKI, T.; ABE, S.; BABA, A.; ITO, T.; OKADO, N. Time-course effects of a single administration of cocaine on receptor binding α subunit mRNAs of GABA_A receptors. **Molecular Brain Research**, v. 81, p. 155-163, 2000.

YANG, S.; SALMERON, B.J.; ROSS, T.J.; XI, Z.X.; STEIN, E.A.; YANG, Y. Lower glutamate levels in rostral anterior cingulate of chronic cocaine users - A (1)H-MRS study using TE-averaged PRESS at 3 T with an optimized quantification strategy. **Psychiatry Research**, v. 174, p. 171–176, 2009.

YE, J.H.; LIU, P.L.; WU, W.H.; MCARDLE, J.J. Cocaine depresses GABA_A current of hippocampal neurons. **Brain Research**, v. 1-2, p. 169-175, 1997.

ZHOU, W.; CUNNINGHAM, K.A.; THOMAS, M.L. Estrogen regulation of gene expression in the brain: a possible mechanism altering the response to psychostimulants in female rats. **Molecular Brain Research**, v. 100, n. 1-2, p. 75-83, 2002.

ANEXO A – Parecer de aprovação dos experimentos pelo comitê de ética animal da UFCSPA.

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Influência dos hormônios sexuais femininos nos efeitos dos psicoestimulantes: o papel do sistema GABA.

Pesquisador Responsável: Helena Maria Tanhauser Barros **Parecer:** 1034/10

Data da Versão: 09/08/2009

Cadastro: 423/09

Data do Parecer: 11/03/2010

Grupo e Área Temática: III - Projeto fora das áreas temáticas especiais

Objetivos do Projeto

-Verificar a influência dos hormônios femininos nas adaptações GABAérgicas secundárias ao uso de psicoestimulantes.

-Comparar o processo de sensibilização aos psicoestimulantes de ratas ovariectomizadas após diferentes esquemas de reposição dos hormônios sexuais femininos, estrógeno e/ou progesterona;

- Avaliar os efeitos dos hormônios sexuais femininos sobre as concentrações de GABA extracelular *in vivo* em ratas que fizeram uso de psicoestimulantes;

Avaliar os efeitos dos hormônios sexuais femininos sobre a expressão do RNA m de subunidades dos receptores GABA_A e das enzimas GAD65 e GAD67 em ratas que fizeram uso de psicoestimulantes;

Avaliar os efeitos dos hormônios sexuais femininos sobre a expressão protéica de subunidades dos receptores GABA_A e das enzimas GAD65 e GAD67 em ratas que fizeram uso de psicoestimulantes

Sumário do Projeto

Este projeto visa a elucidação dos efeitos da sensibilização aos psicoestimulantes no sistema GABAérgico ea influência dos hormônios sexuais femininos neste processo. A sensibilização comportamental a psicoestimulantes consiste no aumento da resposta após uso repetido da substância, e tem sido apontada como um dos principais fatores que aumentam o risco do desenvolvimento da dependência. Além de agir no sistema dopaminérgico e glutamérgico, psicoestimulantes como a cocaína e o metilfenidato influenciam a atividade do sistema GABAérgico, que se contrapõe aos sistemas acima. Indivíduos do sexo feminino têm mostrado efeitos mais intensos em resposta ao uso de psicoestimulantes do que os do sexo masculino, influenciados por diferenças hormonais.

Item Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não informado
Aprovação no país de origem	Não necessária
Local de Realização	Própria Instituição
Outras instituições envolvidas	Sim
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os itens de identificação

Laboratório de Farmacologia-UFCSPA

Introdução	Adequada
------------	----------

Comentários sobre a introdução

Objetivos	Adequados
-----------	-----------

Comentários sobre os Objetivos

Pacientes e Métodos	
Delimitamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total 482 Local
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não

Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Critérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Não se aplica
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Atualização dos dados	Adequada - qualitativa
Privacidade e confidencialidade	Não se aplica
Termo de Consentimento	Não necessário
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os Rens de Pacientes e Métodos

Não informou onde serão obtidas as drogas a serem utilizadas neste projeto.

Cronograma	Adequado
Data de início prevista	10/08
Data de término prevista	08/13
Orçamento	Adequado
Fonte de financiamento externa	Agência de fomento

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

Será solicitado auxílio para o CNPq, já possui verba do pós graduação da UFCSPA.

Referências Bibliográficas	Adequadas
-----------------------------------	-----------

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

As correções foram efetuadas, estando o projeto aprovado.

ANEXO B: Carta de aprovação da revista Brazilian Journal of Medical and Biological Research

De: bjmbr@msubmit.net
Assunto: 3627R1 Decision Letter
Data: Sab, Janeiro 18, 2014 9:20 am
Para: marifs@ufcspa.edu.br
CC: npereira@ufcspa.edu.br, lufreese@ufcspa.edu.br, costapa_@hotmail.com, cgreice@hotmail.com, kelly_biomedic@hotmail.com

January 18, 2014

Dear Dr. Marilise Sousa,

Your manuscript "3627R1 Behavioral effects of endogenous or exogenous estradiol and progesterone on cocaine sensitization in female rats" has been evaluated and we are pleased to inform you that it can be **accepted for publication** after it is revised on the basis of the suggestions still held by one of the referees. We would be willing to review a revised manuscript with modifications addressing these concerns.

Sincerely yours,

Dr. Luiz Mello
Section Editor
Brazilian Journal of Medical and Biological Research

ANEXO C: Carta de aprovação parcial da revista Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology

De: cepp@wiley.com
Assunto: CEPP-13-0375.R1
Data: Dom, Janeiro 5, 2014 12:37 pm
Para: marifs@ufspa.edu.br

Dear Ms. Souza,

Ms: CEPP-13-0375.R1

Title: Cocaine induces DNA damage in distinct brain areas of female rats under different hormonal conditions.

Type: Rapid Communication

Your paper has now been returned from our reviewers. The reviewers still have some concerns which preclude us from accepting it, at least in its current form. We invite you to respond to the reviewers' concerns and submit a revised manuscript. This invitation does not guarantee your paper will eventually be accepted for publication in CEPP.

Yours sincerely,

Dr. Jian-Sheng Lin
Editor

Editorial Office
cepp@wiley.com