

Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Fernando Magela de Jesus

Atividade das enzimas esfingomielinase ácida e neutra em respostas comportamentais induzidas pela administração repetida de cocaína em primatas não-humanos (*Callithrix penicillata*).

Dissertação apresentada como requisito final para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Marília Barros.

Brasília

2019

Fernando Magela de Jesus

Atividade das enzimas esfingomielinase ácida e neutra em respostas comportamentais induzidas pela administração repetida de cocaína em primatas não-humanos (*Callithrix penicillata*).

Dissertação apresentada como requisito final para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 13 de junho de 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Marília Barros (Presidente)
Universidade de Brasília

Prof^a. Dr^a. Márcia Renata Mortari
Universidade de Brasília

Prof^a. Dr^a. Andreza Fabro de Bem
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Fábio Viegas Caixeta (Suplente)
NECBIO/IB/UnB

À minha mãe, Rosenilde

Agradecimentos

Agradeço a todos que estiveram comigo nessa caminhada, sem cada um de vocês não seria possível nada do que está aqui. Eu aprendi muito e cresci muito durante todo esse processo.

Agradeço a minha orientadora Marília Barros por todos esses anos de orientação. Sei que as minhas qualidades como pesquisador eu devo aos seus ensinamentos. Obrigado por me ensinar e me permitir pesquisar com você por tantos anos.

Ao grupo da Alemanha: Prof. Dr. Christian Müller pelas importantes contribuições para o trabalho!

À minha família que mesmo com todas as dificuldades sempre me acompanhou nessa aventura que é a pesquisa acadêmica. Especialmente a minha mãe que sempre me deu forças para seguir todos os dias trabalhando.

Agradeço a amizade, as broncas e o amor que encontrei verdadeiramente nas minhas amigas: Maria Varela e Victória Belúcio. Sem vocês não sei se teria conseguido.

À professora Dr^a Renata Duarte agradeço pelo apoio em todos os momentos de pesquisa, mas principalmente à amizade que pude contar em todos os momentos.

Aos meus companheiros de laboratório André, Clara, Jéssica Lohana e Lucas Cardoso por todas as reuniões, alegrias e sofrimentos compartilhados.

À Jéssica do Vale, 'minha' primeira pibic, pela paciência, companhia e ajuda.

À todas as alunas de graduação que me auxiliaram nos experimentos do mestrado: Alice, Ana Carolina, Bruna, Carolina Lisboa, Emily e Nathália. Obrigado por não terem medo de ir comigo de uber ou de carro (com um motorista de primeira viagem) por 60km por vários dias. No sol e na chuva. Na poeira e na lama.

Às minhas amigas Lara Piau, Helena Schuch e Taynah Roquete por todos os lanches no amarelinho que melhoraram meus dias.

A todos os membros do Laboratório de Neurociências e Comportamento que me acolheram por todo esse tempo. Vocês não sabem o quanto isso foi importante para mim. Obrigado professores Fábio Caixeta, Rafael Maior, Clotilde Tavares, Carlos Tomaz por todos os auxílios.

Aos colegas desse laboratório por toda a alegria e ajuda. Obrigado, Wesley, Giovanna, Lorena, Ana Luísa, Isa!

Aos professores Osmino, Júlia, Elisabeth e Márcia, do departamento de Ciências Fisiológicas que sempre estiveram a disposição para me ajudar. Muito obrigado!

Agradeço ao trabalho, cuidado e bom humor de toda a equipe do Centro de Primatologia! O trabalho foi muito melhor com vocês. Agradeço aos veterinários Antonizete, Cecília Dias e Juliana, sem vocês esse trabalho não aconteceria. Agradeço também aos tratadores, Almir, Geinaldo e Lindionor que cuidam e tratam com tanto zelo dos animais. Muito obrigado!

Aos meus amigos Rafael Milhomens, Raquel Santana, Leandro Cruz e Elisa Carvalho por embarcarem comigo nas minhas ideias mais loucas e dividirem comigo as inseguranças e felicidades da pesquisa acadêmica no Brasil.

Ao meu amigo carioca, Eduardo Gonçalves, pelas palavras de apoio e confiança mesmo com toda distância.

Agradeço imensamente à professora Maria Rita Avanzi que me deu apoio para conseguir fazer o mestrado e a licenciatura. Obrigado professora!

A todos os motoristas de Uber que por várias semanas levaram eu e outros estudantes para a fazenda água limpa. Obrigado por não abaixarem tanto minha nota por conta da poeira e do barro.

A todos que torceram e me ajudaram a conseguir a carteira de motorista para poder não depender de outros motoristas para ir para a fazenda.

Agradeço com todo amor e respeito os meus sujeitos experimentais: Gonero, Novela, Bijusta, Rubilina, Bijito, Bijeco, Miuka, Bijolo, Gremário, Amindoim, Gorinda e Feiosa.

Ao SENAD, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

“People can take everything away from you

But they can never take away your truth

But the question is

Can you handle mine? ”

(Britney Spears)

I'll tell you what freedom is to me. No fear.

(Nina Simone)

Resumo

As esfingomielinases são enzimas que atuam na formação de ceramida e são apontadas como alvos promissores para o tratamento de diversas patologias, como a dependência. A dependência por cocaína é um transtorno mental para a qual ainda não há tratamento eficaz. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade periférica das enzimas esfingomielinase ácida (SMA) e neutra (SMN) em micos (*Callithrix penicillata*) antes e após a indução de alterações comportamentais (hipervigilância e preferência-condicionada-por-lugar - CPP) causadas pela exposição repetida à cocaína. Os testes comportamentais ocorreram em uma caixa de CPP composto por dois compartimentos iguais e intercomunicáveis, mas com diferentes pistas visuais e táteis. O procedimento foi dividido em três fases consecutivas: habituação, condicionamento e teste. Todos os sujeitos passaram por duas sessões de habituação, tendo acesso a ambos os compartimentos. Os animais foram então divididos em dois grupos, COC ou SAL (n=6/grupo), e submetidos a uma sessão diária de condicionamento durante 12 dias consecutivos. Nos dias ímpares, o grupo COC foi tratado com cocaína (7 mg/kg, i.p.) e o grupo SAL com salina (i.p.) e dado acesso ao compartimento condicionado. Nos dias pares, todos receberam salina e tiveram acesso ao compartimento não-condicionado. Na última fase, todos os micos tiveram acesso novamente a ambos os lados da caixa de CPP por duas sessões teste, uma 24 h e outra 15 dias após o último condicionamento – sendo que nenhuma substância foi administrada nessa fase. Todas as sessões tiveram uma duração de 15 min. Foram feitas três coletas de sangue para determinar a atividade da SMA e SMN: uma logo após a última habituação (pós-H2) e uma antes de cada sessão teste (pré-T1 e pré-T2). Ao longo do condicionamento o tempo de vigilância no grupo COC aumentou, indicando uma sensitização comportamental. Esse grupo também aumentou o tempo de permanência no compartimento condicionado à droga em relação à fase de habituação, indicando uma resposta de CPP. Isso não foi visto para o grupo SAL. Após o condicionamento, a atividade da SMA foi maior no grupo COC que no SAL, enquanto que a da SMN permaneceu constante para todos. Ainda, uma correlação negativa entre a atividade da SMN pré-T1 e a resposta de CPP na sessão teste 1 foi vista apenas no grupo COC. Assim, aqueles com menor atividade da SMN tiveram maior resposta de CPP. Os resultados observados indicam que as esfingomielinases podem ter papel na formação de alguns tipos de memória e na dependência por cocaína.

Palavras-Chave: cocaína; mico-estrela; esfingomielinase; preferência-condicionada-por-lugar; sensitização.

Abstract

Sphingomyelinases are enzymes responsible for ceramide synthesis. They are promising targets for the treatment of various pathologies, including addiction. Cocaine addiction is a mental disorder for which there is still no effective treatment. Thus, this study assessed the peripheral activity of acid (SMA) and neutral sphingomyelinase (SMN) before and after marmosets (*Callithrix penicillata*) were repeatedly exposed to cocaine. Enzyme activity was related to drug-induced behavioral changes (hypervigilance and conditioned-place-preference - CPP). Testing was held in a CPP box consisting of two equally-sized and connecting compartments with different visual and tactile cues. The procedure was divided into three consecutive phases: habituation, conditioning and test. All subjects were submitted to two habituation sessions, having access to both compartments. They were then divided into two groups, COC or SAL (n=6/group), and submitted to a daily conditioning trial for 12 consecutive days. On odd numbered days, the COC group received cocaine (7 mg/kg, i.p.) and the SAL group saline (i.p.) and then given access to the conditioned compartment. On even numbered days, both groups received saline and were given access to the unconditioned compartment. On the last phase, all marmosets were again given access to both sides of the CPP box for two test trials, with no treatment being administered – one 24 h and the other 15 days after the last conditioning. Three blood samples were collected to determine SMA and SMN activity: one right after the last habituation (post-H2) and one before each test trial (pre-T1 and pre-T2). Vigilance increased significantly in the COC group over the course of the conditioning trials, indicating a behavioral sensitization effect. This group also spent increased the time spent in the conditioned compartment, compared to the habituation phase, indicative of a CPP response. This was not seen in the SAL group. Post-conditioning SMA activity levels were higher in the COC group than in the SAL group, while SMN activity remained unaltered in both groups. Moreover, a negative correlation between pre-T1 SMN activity and the CPP response on the last test trial was detected, albeit only in the COC group. Thus, those with lower SMN activity had a higher CPP response. The results presently observed suggest that sphingomyelinase may be involved in certain types of memories and cocaine addiction.

Key-Words: cocaine; marmoset; sphingomyelinase; conditioned place-preference; sensitization.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Representação da via esfingolipídica. A via esfingolipídica tem como molécula chave a ceramida. Os esfingolipídeos podem ser formados a partir da condensação do palmitoil-CoA com a serina, via Serina palmitoil transferase. A ceramida pode ser formada pela desaturação da dihidroceramida na via de síntese. A ceramida também pode ser formada pela ceramida sintase, evitando a terminação da via de degradação catalisada pela A ceramida também pode ser formada pela ceramida sintase, evitando a terminação da via de degradação catalisada pela esfingosina-1-fosfato liase. A ceramida é formada também por esfingomielinases, ceramida-1-fosfato fosfatase e glucosilceramidase. (Modificado de *Kalinichenko e cols., 2018*). 25
- Figura 2.** Indivíduos da espécie *Callithrix penicillata* (mico-estrela) mantidos em cativeiro no Centro de Primatologia da Universidade de Brasília (Foto: Fernando Magela, 2019). 34
- Figura 3.** Pavilhão do plantel de Calitriquídeos do Centro de Primatologia da Universidade de Brasília. (A) Vista interna, a partir do corredor central de segurança; (B) Vista de um viveiro a partir do corredor central do Pavilhão (Fotos: Fernando Magela, 2019). 34
- Figura 4.** Fotografia da caixa de CPP (vista superior) evidenciando os compartimentos distintos (listrado e branco) e a porta retrátil que os separa (Foto: Fernando Magela, 2018). 36
- Figura 5.** Fotografia da caixa de CPP durante análise comportamental (A) Vista superior, está evidenciado o acesso do sujeito a ambos os compartimentos através da abertura da porta retrátil; (B) Vista lateral; (Foto Fernando Magela, 2018). 36
- Figura 6.** Representação esquemática do procedimento experimental adotado no presente estudo. 38
- Figura 7.** Tempo (mediana \pm amplitude; em segundos) que os sujeitos passaram sendo vigilantes nas duas primeiras (1-2) e duas últimas (11-12) sessões de condicionamento. Os animais do grupo salina receberam salina nas doze sessões de condicionamento, enquanto o grupo cocaína recebeu 7mg/kg nos dias ímpares (1 e 11) e salina nos dias pares (2 e 12). N=6/grupo; * $<0,05$ vs. respectivas sessões 2 e 12 do grupo cocaína. 46
- Figura 8.** Tempo (média \pm epm; em segundos) que os sujeitos passaram em locomoção nas duas primeiras (1-2) e duas últimas (11-12) sessões de condicionamento. Os animais do grupo salina receberam salina nas doze sessões de condicionamento, enquanto o grupo cocaína recebeu 7 mg/kg nos dias ímpares (1 e 11) e salina nos dias pares (2 e 12). N=6/grupo. ... 46

Figura 9. Tempo que os sujeitos permaneceram (média \pm epm; em segundos) no compartimento condicionado à cocaína ou salina durante a última sessão de habituação (H2) e nas duas sessões testes (T1 e T2). Os animais do grupo salina receberam salina nas doze sessões de condicionamento e os animais do grupo cocaína receberam cocaína 7 mg/kg e salina em dias alternados. T1 e T2 foram realizados 24h e 15 dias após a última sessão de condicionamento, respectivamente. N=6/grupo; *p<0,05 vs. H2 no grupo cocaína..... 47

Figura 10. Atividade das enzimas (mediana \pm amplitude; em pmol/h/ μ g) esfingomielinase ácida (SMA; quadro superior) esfingomielinase neutra (SMN; quadro inferior) nas diferentes fases do procedimento experimental: pós-H2, imediatamente após a habituação 2; pré-T1 e pré-T2, 24h antes das respectivas sessões teste. *p<0,05 vs. grupo salina na respectiva amostragem..... 49

Figura 11. Relação entre a atividade da enzima (pmol/h/ μ g) esfingomielinase neutra (SMN) na amostra pré-teste 1 e o tempo no compartimento condicionado no teste 1..... 51

Lista de Tabelas

Tabela 1. Resposta comportamental dos micos (média \pm epm; n=12) durante a fase de habituação na caixa de CPP.....	45
Tabela 2. Resposta comportamental dos sujeitos (média \pm epm) tratados com salina ou cocaína (n=6/grupo) durante diferentes sessões experimentais.	48
Tabela 3. Relação entre os comportamentos observados antes do condicionamento a cocaína e as respostas comportamentais induzidas pela administração repetida da droga, em cada grupo experimental, expressa como o coeficiente r de correlação de Pearson ou Spearman (valor de p).	50
Tabela 4. Relação entre o nível de atividade das enzimas esfingomielinase ácida (SMA) e neutra (SMN) detectadas no sangue com tempo em vigiância induzida pela administração repetida da droga, expressa como o coeficiente r de correlação de Pearson ou Spearman (valor de p).	51
Tabela 5. Valor do teste de normalidade Shapiro-Wilk e valor de significância para tempo gasto em vigiância e em locomoção nas duas primeiras e duas últimas sessões do condicionamento.....	80
Tabela 6. Valor do teste de normalidade Shapiro-Wilk e valor de significância para dados apresentados da atividade enzimática das enzimas esfingomielinase ácida (SMA) e neutra (SMN).	81
Tabela 7. Valor do teste de normalidade Shapiro-Wilk e valor de significância para o tempo de permanência no compartimento condicionado nas sessões H2, T1 e T2.....	82
Tabela 8. Valor do teste de normalidade Shapiro-Wilk e valor de significância para o tempo de locomoção, tempo de vigiância, frequência de exploração e o tempo nos compartimentos branco e listrado nas sessões de habituação.	82
Tabela 9. Valor do teste de normalidade Shapiro-Wilk e valor de significância para o tempo de locomoção, tempo de vigiância, frequência de exploração nas sessões H2, T1 e T2. ...	83

Lista de Abreviaturas e siglas

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i> (Fator neurotrófico derivado do cérebro)
CC	Compartimento condicionado
CCD	Cromatografia em camada delgada
CEUA	Comissão de Ética no Uso Animal
COC	cocaína
CPP	<i>Conditioned place preference</i> (preferência condicionada por lugar)
CPUnB	Centro de Primatologia da UnB
DLS	Estriado dorsolateral
DSM	Manuais Diagnósticos e Estatísticos de Transtornos Mentais
E.G.	<i>Exempli gratia</i> (por exemplo)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
I.E.	<i>Id est</i> (isto é)
I.P.	Intraperitoneal
NC	Compartimento não-condicionado
OMS	Organização Mundial da Saúde (OMS),
PC	Fosfatidilcolinas
PE	Fosfoetanolamina
CPF	Córtex pré-frontal
PNH	Primata Não-Humano
SAL	Salina
SMA	Esfingomielinase ácida
SMN	Esfingomielinas neutra
TgSMA	Camundongos transgênicos hiper-expressando a SMA
UNODC	Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 ASPECTOS GERAIS DA DEPENDÊNCIA.....	15
1.2 DEPENDÊNCIA POR COCAÍNA.....	22
1.3 ESFINGOLIPÍDEOS, LIPÍDEOS ESTRUTURAIS E MENSAGEIROS.....	23
1.4 CALITRIQUÍDEOS, MODELOS PARA BIOCÊNCIAS.....	28
2. RELEVÂNCIA E ORIGINALIDADE.....	31
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 OBJETIVO GERAL.....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	33
4.2 SUJEITOS E CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO.....	33
4.3 APARATO.....	35
4.4 DROGAS.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	37
4.5.1 HABITUAÇÃO.....	39
4.5.2 CONDICIONAMENTO.....	39
4.5.3 TESTE.....	40
4.6 ANÁLISE DE COMPORTAMENTO.....	40
4.7 COLETA DE SANGUE.....	41
4.8 ANÁLISE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	42
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5. RESULTADOS.....	45
6. DISCUSSÃO.....	52

	14
6.1 HABITUAÇÃO.....	52
6.2 SENSITIZAÇÃO COMPORTAMENTAL	53
6.3 PREFERÊNCIA CONDICIONADA POR LUGAR	55
7. CONCLUSÕES.....	61
8. REFERÊNCIAS	62
9. ANEXO.....	79
10. APÊNDICES	80

1. Introdução

1.1 Aspectos gerais da dependência

A dependência por uma substância é um estado no qual há consumo compulsivo dessa substância apesar das consequências negativas, como desenvolvimento de doenças, problemas interpessoais ou a necessidade de engajar em atividade criminosa para obter a droga (Hyman e cols., 2006). Substâncias que são as causas proximais desse estado podem ser chamadas de drogas de abuso.

A dependência, como é vista hoje, é fruto de mudanças nas relações do ser humano com drogas de abuso e seu contexto histórico. O uso de drogas de abuso tem registro histórico extenso, sendo utilizadas basicamente: (1) em cerimônias religiosas; (2) para fins medicinais; e (3) como *commodities* básicas (Crocq, 2007). Traços de benzoilecognina, metabólito da cocaína, já foram encontrados no cabelo de indivíduos chilenos mumificados que viveram entre 1500 e 1250 antes de Cristo (Cartmell e cols., 1991). Mais recentemente, foi confirmado o uso de folhas de coca, ao longo de meses antes de cerimônias Incas no fim do período pré-colombiano (Wilson e cols., 2013, 2007). Os textos da bíblia hebraica trazem mais de 130 referências ao vinho (Sasson e Hill, 1994). Como *commodities*, drogas de abuso são extremamente populares. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2018), mostram que em 2016, o consumo *per capita* de álcool puro (indivíduos maiores de 15 anos) no Brasil era de 7,8 litros. Quando esse índice de consumo leva em conta apenas a população que bebe – 38% da população com mais de 15 anos, o consumo per capita de álcool puro sobe para 19,3 litros anuais.

O momento que os seres humanos passaram a usar drogas é uma pergunta ainda difícil de ser respondida. Alguns, como o pesquisador Robert Dudley, postulam que o consumo de álcool seria um produto da evolução da linhagem primata (Dudley e Stephens, 2004). Ele parte da seguinte dedução: (1) frutas maduras apresentam mais açúcar do que frutas não-maduras; (2) em um ambiente tropical, essas frutas ricas em açúcar começam a fermentar; (3) o etanol, um possível produto da fermentação facilitaria a identificação dessas frutas.

Assim, a hipótese do macaco bêbado, postula que primatas teriam uma preferência por álcool, pois este ajudaria a identificar frutas maduras em florestas tropicais (Dudley e Stephens, 2004). Trabalhos que testaram algumas dessas premissas apresentaram resultados interessantes. Primatas da subordem Strepsirrhini, como o Aie-aie (*Daubentonia madagascariensis*), são capazes de discriminar néctares com diferentes quantidades de álcool e preferem néctares com concentrações entre 3 e 5% de álcool (Gochman e cols., 2016). Apesar de ser pouco frequente, o consumo espontâneo de álcool também, já foi observado em grupos de chimpanzés (Hockings e cols., 2015). Outra hipótese é de que ao adaptarem-se ao modo de vida terrestre, os primatas teriam contato com frutas que caíram e estariam ainda mais fermentadas, levando a uma maior exposição ao álcool (Carrigan e cols., 2014). Uma das enzimas que metaboliza o álcool no ser humano, tem maior atividade catalítica nos hominíneos e no Aie-aie, sugerindo um processo de adaptação (Carrigan e cols., 2014). Com os dados atuais é difícil saber se o consumo de álcool e outras drogas tem base na evolução dos primatas, mas são hipóteses que vale à pena investigar. Essas hipóteses se referem ao álcool, por este ser uma droga que pode ser produzida independentemente em todo o mundo, diferente de gêneros ou espécies de plantas encontradas em outras drogas de abuso que possuem habitats específicos.

A dependência não foi sempre encarada como uma questão de saúde pública. Durante séculos, drogas fizeram parte da cultura ocidental, mas o seu uso excessivo era condenado como transgressão moral e em várias religiões isso era considerado pecado (Nathan e cols., 2016). Essa visão moral da dependência foi tão forte que mesmo nos dois primeiros Manuais Diagnósticos e Estatísticos de Transtornos Mentais (DSM), a dependência foi classificada como transtorno de personalidade juntamente com comportamentos considerados impróprios à época, como desvios sexuais (e.g. homossexualidade; APA, 1952, 1968). Segundo o DSM-I eram colocados nesta categoria “indivíduos que estavam doentes primariamente nos termos da sociedade e em inconformidade com o meio cultural prevalente” (tradução livre, p51 APA,

1952). Ao longo das versões do DSM, a visão e interpretação da dependência transitou de 'comportamento imoral' para 'doença do cérebro' (Nathan e cols., 2016).

Atualmente o DSM-5, versão mais atual do manual diagnóstico, diz que o transtorno por uso de substâncias é uma doença que apresenta um conjunto de sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos na qual o indivíduo continua com o uso da substância apesar dos problemas ocasionados por este (APA, 2013). Existe uma nomenclatura extensa para se referir a dependência e debates ainda mais extensos de qual usar. Aqui os termos 'dependência' e 'transtorno do uso de substâncias' serão utilizados de modo intercambiável. Nesse contexto, a dependência pode ser definida como uma doença crônica recorrente, caracterizada pela procura da droga, consumo compulsivo, perda de controle do uso e o aparecimento de estados emocionais negativos associados à retirada da droga (Koob e Volkow, 2016). Os dados mais recentes do Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC) estimam que 31 milhões de pessoas em todo o mundo sofram com algum transtorno do uso de substâncias (ONU, 2018).

A explicação atual das bases neurobiológicas da dependência, surgiu ao final do século XX, quando Koob e Le Moal (1997) apresentaram um modelo teórico cíclico, composto por três fases: 1) Compulsão/ Intoxicação; 2) Retirada da droga/ Estados emocionais negativos; 3) Preocupação/ Antecipação pela droga. Esse modelo nasceu da junção dos aspectos impulsivos e compulsivos da dependência que são associados respectivamente a reforços positivos e negativos (Koob e Volkow, 2010). Transtornos de impulsividade são caracterizados pela dificuldade em resistir a impulsos e quando os impulsos são realizados são normalmente acompanhados de sensações prazerosas (Berlin e Hollander, 2014). Por outro lado, transtornos compulsivos estão relacionados a pensamentos repetitivos e intrusivos, sendo realizados para aliviar a tensão (Berlin e Hollander, 2014). Assim, a impulsividade domina fases iniciais da dependência e a compulsão juntamente com a impulsividade atuam nas fases finais (Koob e Volkow, 2010). Historicamente este é um modelo importante, por ter sumarizado diversos pontos passíveis de intervenção terapêutica

e fornecido subsídio para estudos desses padrões em animais (Koob e Moal, 1997). Essas três grandes fases são importantes para entender as mudanças neurobiológicas envolvidas na transição entre o uso ocasional e a dependência (Koob, 2006). Apenas parte da população que usa drogas vai chegar a um estado patológico (Volkow e cols., 2016).

É na fase de compulsão e intoxicação que o indivíduo tem o primeiro contato com a droga e gera uma sensação de prazer. A via da recompensa, que por muito tempo foi sinônimo da via dopaminérgica mesocorticolímbica, agora foi expandida para um circuito maior que inclui a via dopaminérgica nigroestriatal, vários outros neurotransmissores e neuromoduladores (Koob e Volkow, 2016). Drogas de abuso são capazes de ativar regiões de recompensa no cérebro ao elevar a liberação fásica de dopamina (DA; revisado em Wise, 2008). Essa liberação foi por muito tempo associada como correspondente direta de respostas do sistema de prazer/hedônico.

Atualmente, sabe-se que liberação fásica de DA atua na predição de recompensas (Schultz e cols., 1997). Inicialmente, a liberação de DA acontece logo após a recompensa (Schultz e cols., 1997). Após um aprendizado, a liberação de DA não ocorre mais após a recompensa, mas depois de um estímulo preditivo. Nesse caso, na próxima vez que o estímulo preditivo aparecer há uma predição de recompensa, há um aumento fásico após o estímulo e uma segunda ativação dopaminérgica após a recompensa que depende da predição. Se o estímulo é melhor do que o previsto, há um aumento de DA também após a recompensa, se for igual o previsto, nada acontece e se for pior, há uma redução na transmissão dopaminérgica (Schultz, 2016).

Um estímulo ambiental, ciclo social ou estados emocionais que são associados repetidamente com o uso da droga se tornam estímulos condicionados preditivos da recompensa. Esses estímulos passam a estimular liberações fásicas de DA, que por sua vez impulsionam a fissura pelo uso da droga e a períodos de compulsão (Phillips e cols., 2003; Volkow e cols., 2016). A apresentação contínua desses estímulos condicionados inicia uma mudança neuroanatômica e comportamental, na qual o uso da droga passa do controle

cognitivo (estriado ventromedial) para o habitual (estriado dorsolateral, DLS; Willuhn e cols, 2012).

A transmissão dopaminérgica media não o 'gostar' por uma droga, mas sim o 'querer' (Berridge e Robinson, 2016). Exposições repetidas à drogas de abuso levam a uma hiperresponsividade (sensitização) da via dopaminérgica mesocorticolímbica em relação a droga ou a estímulos associados a ela (Vanderschuren e Pierce, 2010). A motivação mediada pela via mesocorticolímbica é mais associada a motivação ligada a estímulos preditivos do que à motivação de comportamentos controlados cognitivamente (Berridge e Robinson, 2016). Assim, uma pessoa dependente por uma droga não 'gosta' mais da droga em detrimento de outras recompensas, mas 'quer' e possui mais motivação em buscar a droga.

Quando há a interrupção do uso da droga inicia-se a fase de retirada e estados emocionais negativos associados (e.g. disforia, estresse, redução na motivação por recompensas naturais). Nesta fase, há uma elevação no limiar para recompensa que reduz a sensibilidade a estímulos naturais prazerosos (Koob e Volkow, 2016). Essa modificação é causada por alterações '*within-system*', respostas adaptativas que contrapõem o efeito da droga, como reduções na transmissão dopaminérgica durante a abstinência (Koob e Volkow, 2010). Outras alterações igualmente importantes são as '*between-system*' que envolvem hiperestimulação de sistemas que regulam estresse como o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, e a redução da atividade de sistemas que regulam a resposta ao estresse (anti-estresse), como o endocanabinóide (Koob e Volkow, 2016). Assim, o aumento do limiar de recompensa, resultante dessas neuroadaptações leva ao uso da droga não pelo prazer hedônico associado a ela, mas pelo alívio da disforia causada por essas alterações (Volkow e cols., 2016).

As adaptações do sistema de recompensa, estresse e anti-estresse vistas na fase de abstinência também estão em ação na última fase do ciclo, a fase de preocupação e antecipação. Essa fase é considerada chave para a recaída em humanos (Koob e Volkow, 2016). Essa recaída pode ser promovida por dois grandes fatores: (1) estímulos associados

à droga (inclusive a droga propriamente dita); ou (2) estressores e estados emocionais negativos (Koob e Volkow, 2010). Essa recaída se dá por alterações na sinalização dopaminérgica e glutamatérgica do córtex pré-frontal (CPF) que reduzem a capacidade do indivíduo de resistir a impulsos de usar a droga (Volkow e cols., 2016). Prejuízos no controle inibitório, memória e atenção associados a atividade irregular do CPF estão associados a piora no prognóstico de pacientes em tratamento (Sofuoglu e cols., 2013). Assim, é possível que drogas de abuso levem a dependência pelo fortalecimento da formação de hábito no DLS, mas também pela redução do controle cognitivo no CPF (Goodman e Packard, 2016).

Uma boa ferramenta para o estudo da dependência é o teste de preferência condicionada por lugar (CPP, sigla para *conditioned place preference*; Tzschentke, 2007). De modo simplificado, no protocolo de CPP, o sujeito é exposto a uma droga, alimento ou parceiro sexual em um contexto e em outro ambiente similar pode ter acesso a uma droga, alimento e parceiro controles (dependendo do protocolo usado). Após um número de pareamentos, os sujeitos têm a possibilidade de escolher entre os dois ambientes/contextos. O tempo que o animal passa em cada contexto é mensurado e a partir daí existem três possibilidades: se o animal passa mais tempo no contexto pareado ao estímulo de interesse há uma resposta de CPP; se o animal passa menos tempo no contexto do estímulo de interesse, há uma resposta de aversão condicionada por lugar (CPA); se não há diferença entre o tempo que o animal passa nos dois contextos, não há efeito aversivo ou hedônico. Assim, a associação que ocorre no teste de CPP é similar ao condicionamento pavloviano clássico (Sanchis-Segura e Spanagel, 2006).

O teste de CPP apresenta diversas vantagens como: ser sensível a baixas doses de fármacos; não necessitar treinamentos longos com o animal; medir tanto recompensa quanto aversão; poder testar o animal em um contexto sem drogas e não requerer procedimentos cirúrgicos (Bardo e Bevins, 2000). Outra vantagem importante desse teste é a possibilidade de acessar concomitantemente a resposta de CPP e a sensitização comportamental (Bardo e Bevins, 2000). Apesar disso, o teste de CPP não é um teste de dependência *per se*, mas

sim um teste que avalia as propriedades recompensadoras da droga (Sanchis-Segura e Spanagel, 2006).

A sensitização é o aumento de uma resposta a um mesmo estímulo, após repetidas exposições a esse estímulo, sendo que a sensitização comportamental é comumente estudada com respostas motoras. Testes de sensitização comportamental são utilizados a décadas como uma maneira de mensurar empiricamente se houve um aumento na resposta a um estímulo após repetidas exposições (Vanderschuren e Pierce, 2010). Testes de sensitização podem ser divididos em duas fases: iniciação, na qual a administrações repetidas da droga e alterações em circuitos neurais; e expressão, teste da sensitização e persistência dessas alterações neurais (Steketee e Kalivas, 2011). Na fase de expressão, a administração da mesma dose estudada leva a aumento na resposta (fisiológica ou comportamental), ou uma dose menor (*prime dose*) leva à mesma resposta que doses maiores utilizadas anteriormente.

A sensitização foi mais estudada na atividade locomotora de roedores (Sanchis-Segura e Spanagel, 2006), mas já foi avaliada em primatas com outros comportamentos (Bradberry, 2007). Apesar do processo de sensitização ser uma aprendizagem não-associativa, o contexto onde a sensitização foi induzida é importante para sua expressão (Robinson e Berridge, 2003). O desejo e a motivação para procurar a droga pela droga passam pelo mesmo processo de sensitização visto na sensitização comportamental (Berridge e Robinson, 2016). Devido à dificuldade de testar essa sensitização do 'querer', são estudadas as alterações neuroquímicas, fisiológicas e comportamentais vistas em animais que passaram por sensitização comportamental (Sanchis-Segura e Spanagel, 2006).

Apesar de serem testes bastante utilizados, poucos estudos analisaram a preferência condicionada por lugar e a sensitização comportamental ao mesmo tempo em um único indivíduo (Borges e cols., 2015; Seymour e Wagner, 2008). E esse protocolo simultâneo já foi realizado com micos-estrela e possui vantagens interessantes quando se trabalha com primatas, como a redução no número de animais utilizados (Borges e cols., 2015).

1.2 Dependência por cocaína

A cocaína é uma substância endógena das folhas da planta *Erythroxylum coca*. Essa planta possui distribuição na América do Sul, México e Caribe (Goldstein e cols., 2009). Por séculos, a única forma de utilizar a cocaína era mascando folhas de coca e devido à diferença farmacocinética da absorção oral, poucos eram os relatos de toxicidade (Karch, 1999). Os problemas de saúde pública relacionados à cocaína começaram a aumentar com a extração desse alcaloide na segunda metade do século 19 (Grzybowski, 2008). Essa inovação levou a produção de formas de cocaína que tem maior potencial de causar dependência. Alterando a farmacocinética da cocaína é possível aumentar ou reduzir seu potencial de causar dependência (Allain e cols., 2015). No formato de sal, o hidrocloreto de cocaína é altamente hidrossolúvel e pode ser diluído e injetado, o que permite uma concentração máxima mais rápida do que administração oral (Coe e cols., 2018). Formas alcalinas da cocaína como o crack podem ser fumadas e também permitem absorção mais rápida que a via oral (Goldstein e cols., 2009).

A cocaína atua como bloqueador de canais de sódio voltagem-dependente, e por isso foi inicialmente utilizada na prática médica como anestésico local (Goldstein e cols., 2009). A cocaína é classificada como estimulante simpatomimético, com uma meia vida de 1-2,5 h (Van Dyke e cols., 1976). O efeito psicoestimulante é atribuído principalmente a inibição dos transportadores de dopamina (DAT), mas também de serotonina e noradrenalina (NAT e SERT, respectivamente; Luessen e Chen, 2016). Assim, a cocaína aumenta o tempo de permanência desses neurotransmissores na fenda sináptica. Os efeitos agudos incluem euforia, aumento de confiança, aumento no estado de vigília, agressividade, desorientação e alucinação e são atribuídos primariamente à transmissão dopaminérgica (Wood e cols., 2013). Alucinações são mais comuns utilizando doses altas ou quando fumado na forma de crack. Efeitos cardiovasculares também são conhecidos, como arritmias e vasoconstrição e no uso crônico estão associados à hipertensão, acidentes vasculares encefálicos e isquemia

cardíaca (Goldstein e cols., 2009). Pacientes dependentes por cocaína apresentam taxas padronizadas de mortalidade de 4 a 8 vezes maiores do que a população com idade correspondente (Degenhardt e cols., 2011).

A dependência por cocaína é ainda um problema de saúde global sem tratamentos aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil ou pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos. Segundo relatório do UNODC, 18,2 milhões de pessoas usaram cocaína em 2016 (ONU, 2018). De acordo com dados do 2º Levantamento Nacional de Álcool e Drogas, o consumo e a dependência por cocaína foram prevalentes em 2,2% e 0,6% da população brasileira, respectivamente (Abdalla e cols., 2014). Também em 2016 a produção global de cocaína chegou ao seu maior nível, estimado em 1,410 toneladas (ONU, 2018). O aumento na produção e apreensão de drogas implica num possível aumento no consumo de cocaína (ONU, 2018).

1.3 Esfingolipídeos, lipídeos estruturais e mensageiros

A influência de receptores de membrana na dependência é bem estudada e tem recebido bastante atenção. Apesar da necessidade de se investir em novos alvos terapêuticos, as propostas terapêuticas recentes (Bogenschutz e Johnson, 2016; Brady e cols., 2011; Sofuoglu e cols., 2013) permanecem focando, em sua maioria, alvos proteicos. Por outro lado, o estudo de alvos não-proteicos no estudo da farmacodependência ainda não recebeu atenção da comunidade científica. Um alvo ainda não explorado nas terapias para a dependência são os esfingolipídeos. Já se sabe que essas moléculas devem exercer um papel chave em diversas doenças (câncer: Furuya e cols., 2011; aterosclerose: Hornemann e Worgall, 2013), inclusive neuropatologias (Alzheimer: van Echten-Deckert e Alam, 2018; esclerose múltipla: Halmer e cols., 2014).

Os lipídeos são definidos como moléculas pequenas hidrofóbicas ou anfipáticas que podem ser classificadas em 8 grandes classes: ácidos graxos, glicerolipídeos,

glicerofosfolipídeos, esfingolipídeos, esteróis, prenóis, sacarolipídeos e policetídeos (Fahy e cols., 2009). Os esfingolipídeos juntos de fosfolipídeos e colesteróis compõem a maior parte dos lipídeos em sinaptossomos (Breckenridge e cols., 1972). Os esfingolipídeos são uma classe de lipídeos definidos por uma estrutura aminoálcool de 18 carbonos (Gault e cols., 2010). Alterações nesta estrutura básica levam à formação dos mais de 600 esfingolipídeos, hoje conhecidos. Esfingolipídeos já foram considerados apenas componentes estruturais das membranas celulares, no entanto, a pouco mais de 30 anos, começou-se a registrar funções reguladoras dessas moléculas (Canals e cols., 2011). Desde então, tem sido visto que esfingolipídeos simples, como por exemplo, a ceramida, a esfingosina e a esfingosina 1-fosfato (S1P), são moléculas que exercem uma importante função regulatória no crescimento, morte celular, senescência, adesão, migração, inflamação, angiogênese e trânsito intracelular (Hannun e Obeid, 2008). Um desequilíbrio nas concentrações normais dessas moléculas tem grande relevância clínica, como na doença de Alzheimer, onde a ceramida atua com efeitos proapoptóticos e a S1P com anti-apoptóticos (Chakrabarti e cols., 2016).

Os esfingolipídeos simples são precursores e produtos da quebra de esfingolipídeos mais complexos (Gault e cols., 2010). A ceramida é a molécula central na síntese dos esfingolipídeos (Figura 1), servindo de substrato para formação de vários esfingolipídeos complexos e podendo ser sintetizada por diferentes vias (revisado em Lahiri e Futerman, 2007). Além disso, a interconversão da ceramida e da S1P, por meio de diversas enzimas, oferece uma complexa regulação celular e assim como novos potenciais alvos para estratégias terapêuticas para doenças que afetam essas moléculas (Canals e cols., 2011). A principal via de formação da ceramida é por meio da hidrólise da esfingomiéline de membrana via às enzimas esfingomiélinases (Zeidan e Hannun, 2007).

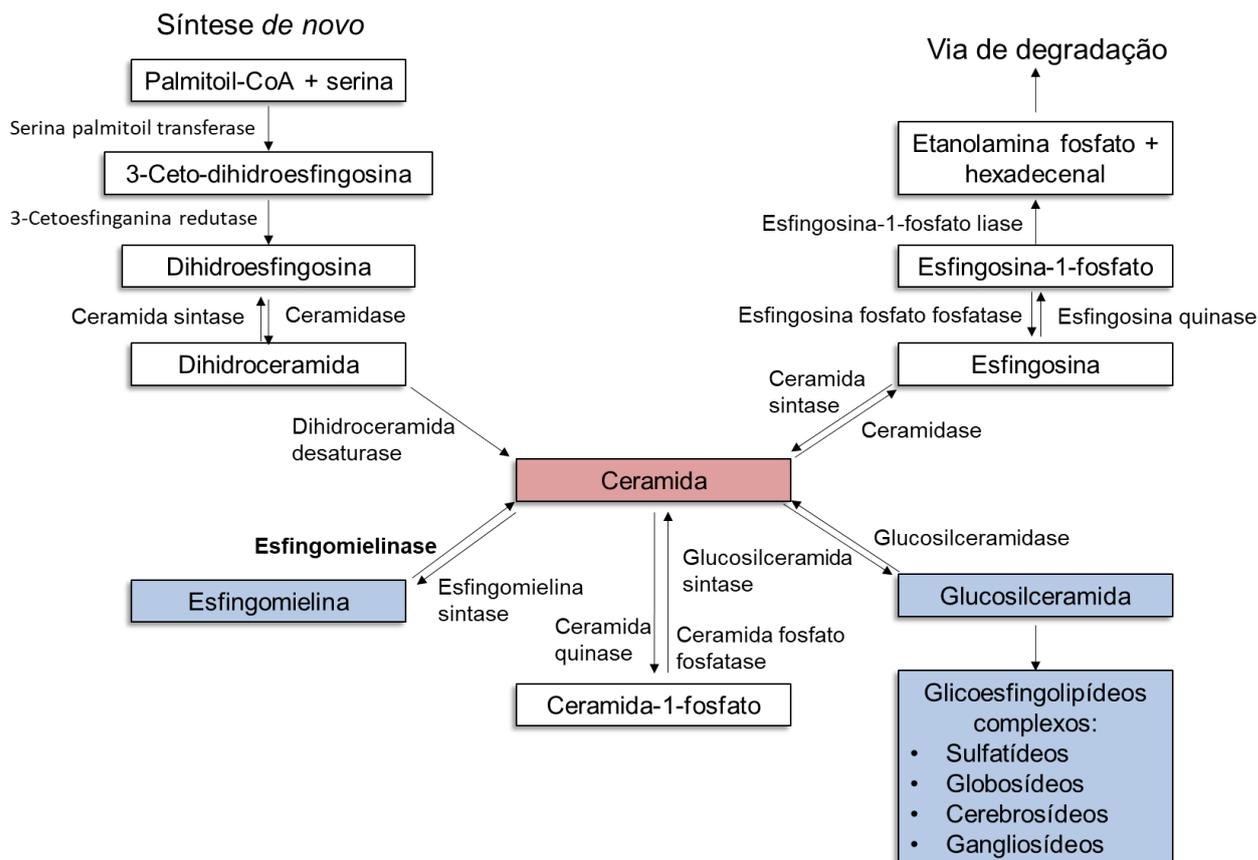


Figura 1. Representação da via esfingolípídica. A via esfingolípídica tem como molécula chave a ceramida. Os esfingolípídeos podem ser formados a partir da condensação do palmitoil-CoA com a serina, via Serina palmitoil transferase. A ceramida pode ser formada pela desaturação da diidroceramida na via de síntese. A ceramida também pode ser formada pela ceramida sintase, evitando a terminação da via de degradação catalisada pela A ceramida também pode ser formada pela ceramida sintase, evitando a terminação da via de degradação catalisada pela esfingosina-1-fosfato liase. A ceramida é formada também por esfingomielinases, ceramida-1-fosfato fosfatase e glucosilceramidase. (Modificado de *Kalinichenko e cols., 2018*).

A esfingomielinase ácida (SMA), por sua vez, é uma das enzimas que catalisa a quebra de esfingomielina em fosforicolina e ceramida, sendo chamada assim por ter uma atividade ótima em pH ácido. Foi a primeira enzima dessa classe a ser clonada e purificada, possuindo duas formas, uma endolisossomal (dependente de Zn^{2+}) e uma secretória (independente de Zn^{2+} ; revisado em Schuchman, 2010). A SMA é ativada por vários estímulos, dentre: a ativação de receptores para morte celular, radiação, agentes quimioterápicos, vírus, bactérias, parasitas, citosinas e estresse oxidativo (Zeidan e Hannun, 2010). Já foram descritas várias formas de ativação da SMA, como a oxidação (Kobayashi e cols., 2016), a clivagem proteolítica da pro-SMA (Edelmann e cols., 2011), a fosforilação do resíduo de Serina508

(Zeidan e Hannun, 2007), a retirada da cisteína terminal, ou a deleção/modificação da cisteína para serina (Qiu e cols., 2003). No entanto, sempre que ativada, a SMA é translocada da membrana lisossomal para o folheto externo da membrana celular onde catalisa a quebra da esfingomielina em ceramida (Grassmé e cols., 2001).

As esfingomielinases neutras (SMN) compreendem uma família de 4 proteínas, SMN1, SMN2, SMN3 e uma SMN mitocondrial, a Ma-SMN (Clarke, 2018). Todas essas proteínas são dependentes de magnésio e tem funcionamento ótimo em pH neutro (Adada, e cols., 2016). A SMN1, primeira a ser clonada, apresenta expressão ubíqua nos tecidos mamíferos (Tomiuk, e cols., 1998), mas não tem atividade de esfingomielinase ou catalisa de alguma maneira a quebra de esfingomielinas (Sawai e cols., 1999). A SMN2 foi a segunda a ser clonada, apresenta atividade de esfingomielinase e é expressa majoritariamente no tecido nervoso e em menor intensidade no timo (Hofmann e cols., 2000). As SMN são ativadas por estímulos estressores, mas apenas a SMN2 é ativada por TNF- α (Clarke e cols., 2011). A SMN3, foi encontrada por meio de análise bioinformática, mas não apresenta atividade catalítica como esfingomielinase (Clarke e cols., 2011). Devido a sua recente descoberta, pouco se sabe sobre a atividade catalítica da SMN mitocondrial (Rajagopalan e cols., 2015). Normalmente, ao se tratar de atividade SMN subentende-se a enzima SMN2 e majoritariamente sua atividade enzimática no tecido nervoso (Adada e cols., 2016).

Ambas SMA e SMN vão catalisar a formação de ceramidas. A ceramida, por sua vez, possui propriedades biofísicas que permitem sua auto agregação, formando microdomínios de membrana que levam ao agrupamento de proteínas de membrana (Kolesnick e cols., 2000). Dentre essas proteínas se destacam diversos tipos de receptores, de modo que os microdomínios alteram a disposição espacial destes componentes de membrana, levando a um aumento da densidade de receptores e outras proteínas sinalizadoras, o que permite uma sinalização intracelular mais efetiva (Gulbins e Li, 2005). Assim, esses domínios de membrana não fazem parte da cascata de sinalização *per se*, mas sim facilitam e amplificam o sinal transmitido por um receptor (revisado em Mencarelli e Martinez–Martinez, 2013).

A via esfingolípídica ainda é pouco explorada no que diz respeito ao efeito de drogas de abuso, sendo o álcool uma das mais estudadas. Em 2010, um trabalho de Reichel e colaboradores (2010) mostrou que a atividade da SMA era maior em pacientes intoxicados com álcool do que em pacientes no início da abstinência. Ao longo de um período de abstinência o nível de atividade da SMA de pacientes dependentes por álcool vai diminuindo, mas permaneceu maior do que em indivíduos controle (Reichel e cols., 2011). Esses resultados foram recentemente replicados com um número amostral maior (n=200 pacientes dependentes (Mühle e cols., 2018). Ainda, a atividade da SMA foi correlacionada negativamente com o número de leucócitos e positivamente com biomarcadores para uso de álcool (Mühle e cols., 2018).

Em modelos animais, a importância da esfingomielinase ácida em modelos de uso de álcool foi estudada com camundongos transgênicos hiper-expressando a SMA (tgSMA). Animais tgSMA possuem maior preferência por álcool, maior facilidade em expressar uma resposta de CPP e apresentar hiperlocomoção induzida por álcool (Müller e cols., 2017). A SMA modula as repostas monoaminérgicas a álcool e alimento, já que animais tgSMA apresentam maiores níveis de DA extracelular após exposição ao álcool, mas não alimento (Kalinichenko e cols., 2019). A resposta noradrenérgica também é alterada em resposta ao álcool e a serotoninérgica em resposta a alimentos (Kalinichenko e cols., 2019). Por ser uma área de estudo relativamente recente, não é possível identificar se esses efeitos são exclusivos do para o transtorno por uso álcool ou se são generalizáveis para outras drogas.

Estudos com a SMN são menos abundantes. Mas a SMN também parece modular a neurotransmissão por diversas vias. A SMN, mas não a SMA, é importante para o tráfico do transportador de dopamina (DAT) para a superfície da célula, regulando a receptação (Won e cols., 2018). Este efeito é dependente do tamanho da ceramida, pois ceramidas com caudas de carbono curtas (i.e. C2, C4) não são substrato para a ceramida quinase (Wijesinghe e cols., 2005) e o produto ceramida-1-fosfato também é importante para o tráfico da DAT (Won e cols., 2018). Existe também um papel do tipo celular, já que em células PC12 a ceramida C2 não

altera a recaptação de DA, mas em ratos essa mesma ceramida leva a redução da receptação (Riddle e cols., 2003). O mecanismo pelo qual a C2 poderia levar a essa redução na recaptação de DA não é conhecido.

Esse papel do SMN no DAT também pode explicar o efeito de alguns outros lipídeos no condicionamento por cocaína, como o GM1. GM1 é um gangliosídeo, glicosídeo, glicosídeo com um ácido siálico, bastante estudado por ter propriedades neurogênicas e dendritogênicas. Em 2010, um trabalho mostrou que o GM1 foi capaz de facilitar o CPP por cocaína em ratos Wistar machos, sem alterar propriedades cinéticas da droga (Valdomero e cols., 2010). Anos depois, o mesmo grupo mostrou que o possível mecanismo seria pela indução de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF;73). Recentemente, foi visto que o GM1 modula a SMN, mas não a SMA, pois anticorpos anti-GM1 levam a redução da atividade e da quantidade de SMN2 em células PC12 (Ueda e cols., 2018). Assim, é possível que o GM1 facilite o CPP por cocaína por meio da ativação da SMN2.

Mais recentemente, foi visto que a cocaína altera as concentrações do lipidoma do cérebro de roedores (Lin e cols., 2017). Essas alterações no lipidoma são diferentes mesmo entre protocolos de CPP ou sensibilização (Lin e cols., 2017). A sensibilização locomotora induzida por metanfetamina também foi capaz de alterar diversos lipídeos em regiões específicas do cérebro (Jiang e cols., 2017). Portanto, é importante ressaltar que, independente da droga de abuso que o indivíduo foi exposto e em que período da vida, estas podem alterar constituintes lipídicos da membrana, e por sua vez exercem um efeito prejudicial ao sistema nervoso.

1.4 Calitriquídeos, modelos para biociências

A família Callitrichidae designa primatas pequenos, arbóreos, diurnos, com hábito alimentar insetívoro/frugívoro/gomívoro que habitam a América Central e América do Sul (Rylands e cols., 2009). O gênero *Callithrix* pertence à família Callitrichidae e compreende

primatas de pequeno porte (250-600 g) que apresentam gestações gemelares (Stevenson e Rylands, 1988). Em cativeiro é comum nascerem trigêmeos. Como um tempo de gestação de 143-144 dias e intervalo entre gestações de 162 dias, calitriquídeos apresentam alta taxa reprodutiva dentre primatas (Tardif e cols., 2003). Além disso possuem um ciclo de vida curto, em cativeiro vivem em média de 5-7 anos, mas podem chegar até 15 (Tardif e cols., 2011). Atingem a idade adulta em apenas 15 meses e são considerados idosos após os 6-7 anos de idade (Castro-Leão e cols., 2009; Tardif e cols., 2011).

O uso de *Callithrix* sp. tem ganhado bastante atenção na pesquisa biomédica devido ao seu conjunto de características únicas. Possuem uma vantagem translacional em relação a roedores devido às semelhanças que compartilham com humanos na fisiologia, neuroanatomia, reprodução cognição, desenvolvimento e comportamento social (Phillips e cols., 2014). São capazes de executar a tarefas complexas, como avaliar e responder a reciprocidade em indivíduos da mesma (Yasue e cols., 2018) ou de outras espécies, como humanos (Kawai e cols., 2014). Assim como em humanos, o envelhecimento de calitriquídeos leva a neuroalterações, como declínios na neurogênese, deposição de placas β -amilóides e perda de audição (Tardif e cols., 2011). E recentemente foi demonstrado que o aprendizado vocal depende de reforço social igual ao aprendizado vocal humano (Takahashi e cols., 2017)

Este gênero é um modelo animal em crescimento na neurociência por possuir vantagens em relação a outros primatas não-humanos (PNH), como tamanho reduzido, alta fertilidade e rápida maturidade sexual (Burkart e Finkenwirth, 2015), mas conservando consigo um padrão cerebral (número de neurônios x massa cerebral) partilhado apenas entre primatas (Herculano-Houzel, 2009). Além do que, o sequenciamento do genoma do *Callithrix jacchus* (Worley e cols., 2014) e o desenvolvimento de animais geneticamente modificados (revisado em Sasaki, 2015) aumenta a quantidade de ferramentas disponíveis para trabalhar com esse grupo.

Para o estudo da dependência, primatas são interessantes por apresentarem vários dos efeitos comportamentais (p.ex.: excitação, agressividade, sedação, descoordenação

motora) similares aos vistos em humanos e mais fáceis de serem percebidos do que em roedores (Porsolt, 2013). Calitriquídeos e outros primatas possuem enzimas citocromo P450 com alta homologia em relação às citocromos humanas, indicando alta semelhança no perfil de metabolismo de drogas (Uno e cols., 2016). Ademais, possuem um perfil de proteínas da barreira hematoencefálica mais próximo do visto em humanos e diferente de roedores (Hoshi e cols., 2013). PNH apresentam também diferenças na distribuição e densidade dos sistemas dopaminérgico, serotoninérgico e noradrenérgico (Weerts e cols., 2007).

O mico-estrela (*Callithrix penicillata*) é uma espécie endêmica do Cerrado (Bicca-Marques e cols., 2018), sendo adaptado às condições de clima e altitude da região. Micos-estrela podem ser utilizados em estudos de ansiedade, memória e comportamento alimentar (Barros e Tomaz, 2002; Duarte e cols., 2014; Melamed e cols., 2017). Respostas fisiológicas e comportamentais induzidas por estimulantes já foram registrados nessa espécie em particular (dietilpropiona: Mello e cols., 2005; metilfenidato: Kashefi e cols., 2019; cocaína: De Souza Silva e cols., 2006). Micos-estrela também já foram utilizados em testes de hipersensitização e CPP induzidos por cocaína usando várias doses e protocolos (Barros e cols., 2013; Borges e cols., 2015; Cagni e cols., 2012; Cagni e cols., 2014; Melamed e cols., 2013). Além disso, já foram utilizados para avaliar os efeitos da cocaína em tarefas não relacionadas à recompensa, como testes de reconhecimento (Melamed e cols., 2017).

Com base no descrito acima, calitriquídeos como a espécie *Callithrix penicillata*, podem ser um bom modelo para o estudo de mecanismos fisiológicos que subsidiam a dependência. Esses resultados podem ser valiosos para futuras investigações na espécie humana.

2. Relevância e originalidade

A dependência por cocaína é um problema de saúde global. Em 2016 a produção global de cocaína chegou ao seu maior nível, estimado em 1,410 toneladas (ONU, 2018). Esse aumento na produção e apreensão de drogas implica num possível aumento no consumo de cocaína. De fato, entre 2013 e 2016, as mortes relacionadas ao uso de cocaína mais do que duplicaram nos Estados Unidos (ONU, 2018). As taxas padronizadas de mortalidade de dependentes por cocaína são de quatro a oito vezes maiores do que a esperada para idade e sexo (Degenhardt e cols., 2011). Um tratamento para a dependência por cocaína é extremamente necessário.

Os esfingolipídeos se apresentam como potenciais alvos para o tratamento de diversas doenças (Furuya e cols., 2011; Hornemann e Worgall, 2013; van Echten-Deckert e Alam, 2018; Halmer e cols., 2014). Alterações nos níveis de lipídeos cerebrais de roedores também foram encontradas com cocaína e anfetamina (Jiang e cols., 2017; Lin e cols., 2017). Alterações na atividade periférica da SMA foram vistas com o uso de álcool (Mühle e cols., 2018; Reichel e cols., 2011). Assim é possível que a atividade dessas enzimas possa ser um marcador periférico do uso de drogas. No entanto, nenhum estudo avaliou os efeitos da cocaína na via esfingolipídica de PNH. Espécies como *Callithrix penicillata*, podem ser um bom modelo para o estudo de mecanismos fisiológicos que subsidiam a dependência por facilitarem a generalização dos resultados para humanos (Weerts e cols., 2007). Ainda, nessa espécie é possível avaliar simultaneamente a hipervigilância e a preferência condicionada por lugar induzidos pela cocaína (Borges e cols., 2015). Ambos esses comportamentos são marcadores do uso prolongado de drogas de abuso (Berridge e Robinson, 2016; Tzschentke, 2007).

Os resultados provenientes de estudos com PNH são importantes para melhorar a generalização de resultados para a espécie humana e o desenvolvimento de tratamentos para a dependência por cocaína.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade periférica das enzimas esfingomielinase ácida (SMA) e neutra (SMN) em micos-estrela (*Callithrix penicillata*) antes e após a indução de alterações comportamentais (hipervigilância e preferência-condicionada-por-lugar - CPP) causadas pela exposição repetida à cocaína.

3.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a atividade das enzimas esfingomielinase ácida e neutra, no sangue de PNH, antes e após a administração de cocaína;
- b) Verificar a persistência, se houver, de alterações na atividade enzimática periférica 15 dias após o fim da fase de condicionamento à cocaína;
- c) Determinar se os níveis basais de atividade enzimática das enzimas esfingomielinase ácida e neutra preveem as alterações comportamentais vistas na resposta de CPP e hipervigilância;
- d) Determinar se há correlação entre a atividade enzimática após a fase de condicionamento e comportamentos de hipervigilância e resposta de CPP;

4. Material e Métodos

4.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos descritos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (no. 66744/2016; Anexo 1). Os experimentos estão de acordo com a legislação brasileira quanto ao uso científico de animais (Lei Arouca 11.794/2008), assim como estão de acordo com as diretrizes de manejo e uso de primatas não-humanos em cativeiro do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Pissinatti e cols., 2016). O estudo foi realizado com animais do Centro de Primatologia da UnB (CPUUnB), credenciado como criadouro de primatas não-humanos para fins científicos pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA; registro nº 1/53/1999/000006-2). Todos os animais foram acompanhados por um médico veterinário durante e após a realização deste estudo.

4.2 Sujeitos e condições de alojamento

Para os procedimentos experimentais foram utilizados 12 micos-estrela (*Callithrix penicillata*; Figura 2) adultos (>18 meses), seis machos e seis fêmeas, pesando 340 ± 22 g (média \pm desvio padrão; amplitude de 305-369 g). Apesar do ciclo estral das fêmeas não ter sido controlado, nenhuma esteve prenha ou teve prole no período do estudo. Os animais fazem parte do plantel do CPUUnB e foram alojados em uma colônia com apenas membros da mesma espécie *Callithrix penicillata*. O pavilhão onde os animais foram alojados é composto por dois corredores paralelos, separados por um corredor central de segurança (Figura 3). Os sujeitos foram alojados em viveiros (2 m de altura x 2 m de largura x 1 m de comprimento), sendo uma das paredes dos viveiros constituída de tela metálica, duas paredes de cimento e a outra parede contendo a porta, também de tela metálica. Essa tela permite contato com condições naturais de luz, temperatura e umidade (Figura 3). Os animais foram mantidos em pares ou grupos familiares de 3-4 indivíduos.

Os animais recebem alimento fresco às 07:00 h e as sobras são retiradas às 17:00 h. Essa alimentação fresca consistiu em frutas e verduras cortadas, ovos e carne cozidos, oleaginosas e invertebrados (larvas de tenébrios). Alimentação seca específica para primatas de cativeiro (ração para pequenos primatas onívoros – P25; MEGAZOO, Betim-MG, Brasil) e água estavam disponíveis *ad libitum*.



Figura 2. Indivíduos da espécie *Callithrix penicillata* (mico-estrela) mantidos em cativeiro no Centro de Primatologia da Universidade de Brasília (Foto: Fernando Magela, 2019).



Figura 3. Pavilhão do plantel de Calitriquídeos do Centro de Primatologia da Universidade de Brasília. (A) Vista interna, a partir do corredor central de segurança; (B) Vista de um viveiro a partir do corredor central do Pavilhão (Fotos: Fernando Magela, 2019).

4.3 Aparato experimental

O aparato utilizado foi uma caixa de CPP, que consistiu em uma arena retangular (120 cm de largura x 60 cm de comprimento x 35 cm de altura) suspensa a 1 metro do chão (Figura 4). Essa arena possuía dois compartimentos de tamanho idêntico (60cm de largura x 60cm de comprimento x 35cm de altura). O piso e três paredes dos compartimentos foram feitos de chapa de alumínio, o teto e uma das paredes foi feito de vidro transparente com 4 mm de espessura. A parede e o teto de vidro permitiam a observação dos comportamentos do animal. Os compartimentos eram separados por uma parede retrátil de alumínio que poderia ser retraída (20 cm) para possibilitar a passagem do sujeito. Com exceção das partes feitas de vidro, cada compartimento tinha estímulos táteis e visuais distintos. Um dos compartimentos foi pintado de branco e possuía a superfície lisa. O outro possuía listras diagonais em preto e branco e uma superfície em relevo (ondulado). Cada compartimento dispunha de uma porta de entrada/saída independente (25 cm de comprimento x 35 cm de altura) localizada na parede de alumínio oposta à parede de vidro.

O aparato possuía uma antecâmara (*hall* de entrada; 15 cm comprimento x 10 cm de largura x 35 cm de altura) que ficava permanentemente acoplada em frente às portas de entrada/saída dos compartimentos. Esse *hall* possuía uma porta do tipo-guilhotina onde se acoplava uma caixa-transporte (35 cm de altura x 20 cm de largura x 23 cm de comprimento). Essa caixa-transporte foi confeccionada em alumínio. Essa caixa permitiu o transporte dos indivíduos dos viveiros de moradia até a sala de experimento no CPUUnB. A caixa também impediu o contato visual dos sujeitos com o ambiente externo.

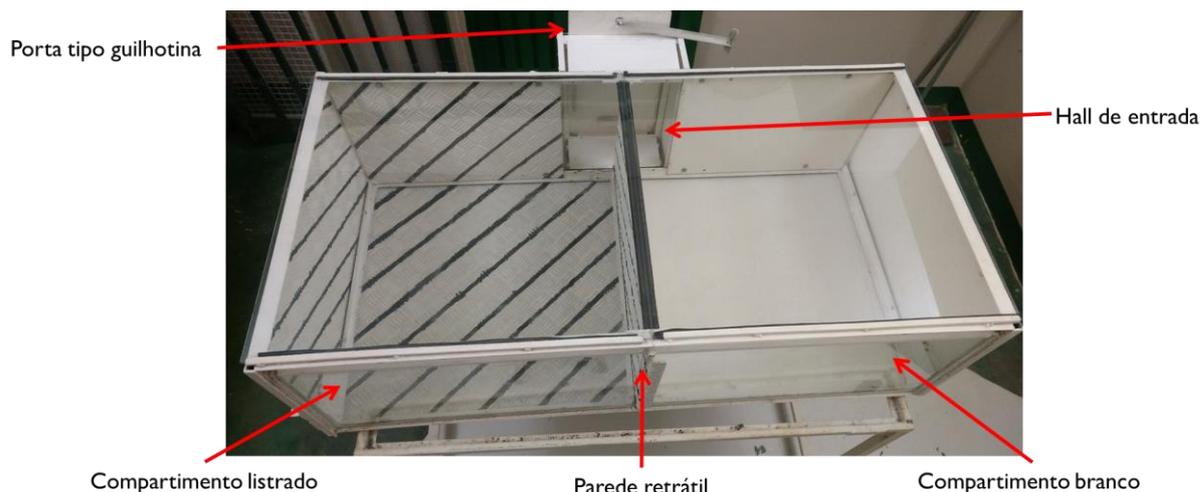


Figura 4. Fotografia da caixa de CPP (vista superior) evidenciando os compartimentos distintos (listrado e branco) e a porta retrátil que os separa (Foto: Fernando Magela, 2018).

A observação e registro das sessões foram realizados por meio de um circuito fechado de câmeras. Esse sistema consistiu em duas câmeras digitais (Logitech C920, Brasil), sendo que uma das câmeras foi fixada a aproximadamente 1,5m do topo do aparato (denominada vista superior; Figura 5a) e outra a aproximadamente 1,5 m da parede de vidro do aparato (denominada vista lateral; Figura 5b). Ambas as câmeras foram conectadas diretamente a um computador portátil localizado em uma sala adjacente à sala de experimentos, de onde as sessões foram observadas e registradas usando o programa de análises comportamentais AnyMaze (Stoelting. Co., EUA).

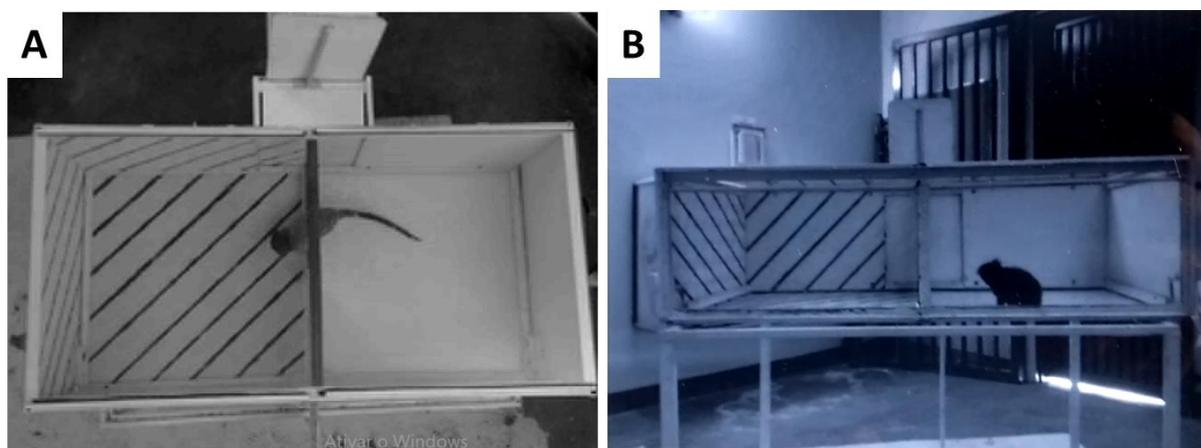


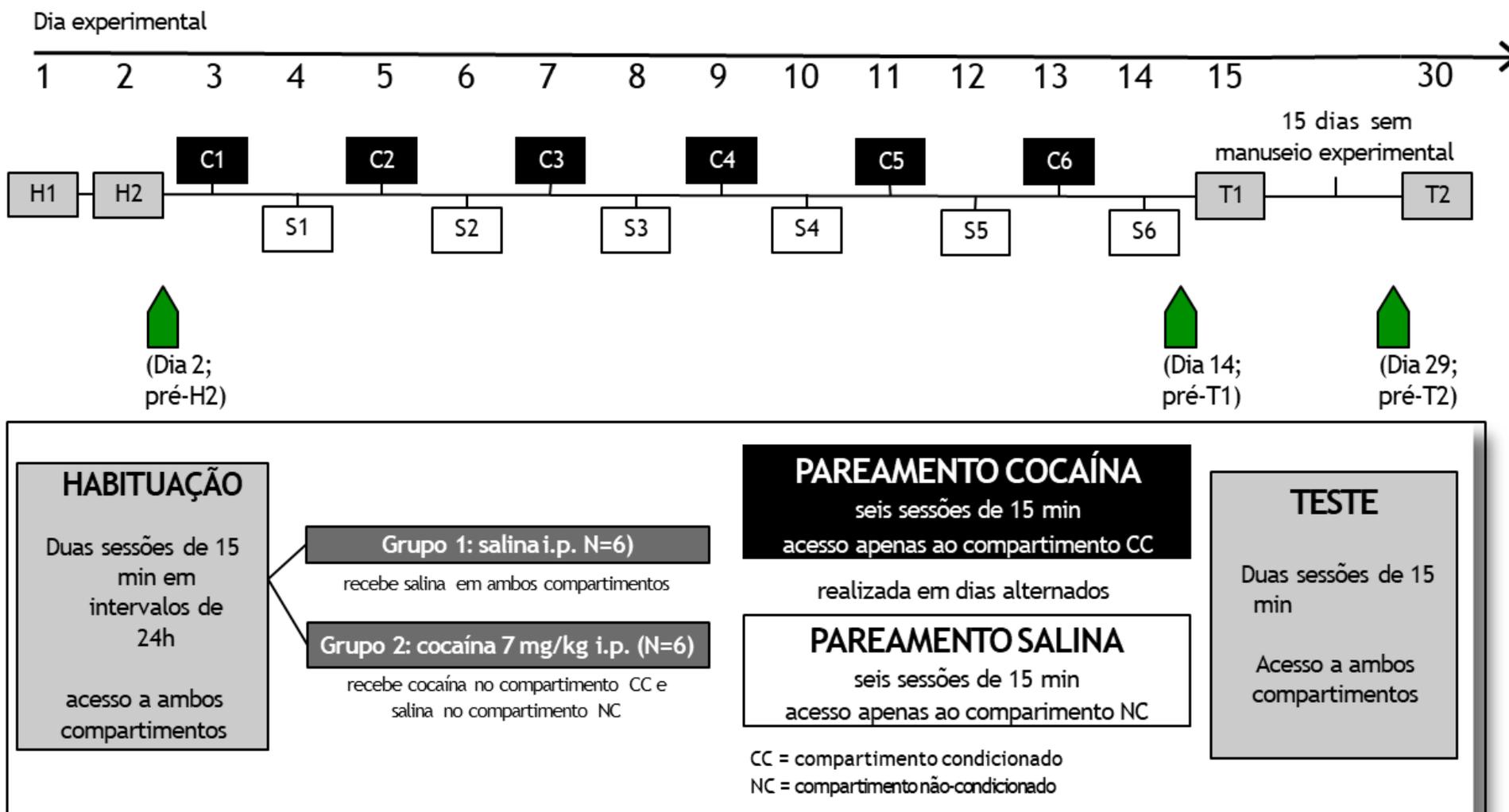
Figura 5. Fotografia da caixa de CPP durante análise comportamental (A) Vista superior, está evidenciado o acesso do sujeito a ambos os compartimentos através da abertura da porta retrátil; (B) Vista lateral; (Foto Fernando Magela, 2018).

4.4 Substâncias

O hidrocloreto de cocaína (Sigma-Aldrich, EUA) foi dissolvido em solução salina (0,9%) e injetado em uma concentração de 7 mg/kg por via intraperitoneal (i.p.), em um volume de 0,5 ml/kg. A solução salina também foi empregada como veículo controle. Efeitos comportamentais dessa concentração estudada já foram descritos em trabalhos anteriores com a mesma espécie de PNH (Borges e cols., 2015; Melamed e cols., 2013). A cocaína ou salina foram administradas 5 min antes da entrada no aparato. Durante a administração o sujeito foi contido por um experimentador e a injeção foi aplicada por um segundo experimentador.

4.5 Procedimento experimental

O procedimento foi dividido em três fases consecutivas: habituação, condicionamento e teste, conforme esquema experimental apresentado na Figura 6. Em todas as fases, as sessões realizadas consistiram na captura do sujeito em seu viveiro de moradia, com auxílio de um puçá. O animal foi então colocado na caixa-transporte, conduzido até a sala de experimentos, liberado no *hall* de entrada da caixa de CPP, iniciando assim uma sessão de 15 min. Ao final da sessão, o animal foi levado de volta ao seu viveiro de moradia na caixa-transporte. O aparato foi limpo com álcool 70% antes de iniciar uma nova sessão. A ordem de testagem dos indivíduos foi randomizada a cada dia. Todos os animais foram testados apenas uma vez por dia. Todos os procedimentos ocorreram entre 13:00 h e 17:30 h.



Coleta de sangue

Figura 6. Representação esquemática do procedimento experimental adotado no presente estudo.

4.5.1 Habituação

O objetivo dessa fase foi adaptar os sujeitos à caixa CPP, independentemente de experimentos anteriores, além de avaliar possíveis preferências inatas por um dos compartimentos da caixa de CPP. Nesta fase, cada sujeito foi submetido a duas sessões de habituação, com intervalo de 24 h entre elas (H1 e H2). Na caixa de CPP a parede retrátil foi mantida parcialmente aberta (20 cm), permitindo assim que o sujeito tivesse acesso livre a ambos os compartimentos do aparato. Não houve administração de nenhuma substância durante essa fase. Os sujeitos foram separados em dois grupos SAL (n=6) e COC (n=6). Essa divisão foi feita com base na atividade locomotora, na vigilância e no tempo em ambos os compartimentos durante a sessão H2.

4.5.2 Condicionamento

O objetivo dessa fase foi induzir simultaneamente uma resposta de hipervigilância e uma resposta de preferência condicionada-por-lugar associada ao compartimento em que o sujeito esteve durante as sessões em que foi administrada a cocaína. Esta fase foi iniciada 24 h após a última sessão de habituação. Os sujeitos foram submetidos a uma sessão diária de condicionamento por 15 min, durante 12 dias consecutivos. Cada sujeito, em dias alternados, teve acesso a apenas um dos compartimentos (branco ou listrado). Nos dias ímpares (1, 3, 5, 7, 9 e 11), o grupo COC foi tratado com cocaína (7 mg/kg; i.p.; 0,5 ml/kg) e o grupo SAL com solução salina (i.p.; 0,5 ml/kg) e foi dado acesso apenas a um compartimento (compartimento condicionado – CC). Nos dias pares (2, 4, 6, 8, 10 e 12) tanto o grupo COC, quanto o SAL receberam salina e tiveram acesso ao outro compartimento (compartimento não-condicionado – NC). Um dos compartimentos foi aleatoriamente designado como CC, enquanto o outro foi considerado como sendo o NC. Metade dos sujeitos de cada grupo tiveram como compartimento CC o compartimento branco e a outra metade o compartimento listrado. Essa divisão permaneceu por todo o experimento. Em todas as 12 sessões desta

fase, a parede retrátil que conecta os dois compartimentos foi mantida fechada, impossibilitando o trânsito direto de um compartimento ao outro.

4.5.3 Teste

O objetivo desta fase foi determinar se foi desenvolvida uma resposta de preferência condicionada-por-lugar induzida pela cocaína na caixa de CPP. Para tanto, cada indivíduo foi submetido a duas sessões teste: uma realizada 24h após a última sessão de condicionamento (T1) e a outra, 15 dias após a última sessão de condicionamento (T2). Nessa sessão de 15 min, cada sujeito teve acesso novamente a ambos os compartimentos do aparato, de maneira similar ao descrito na fase de habituação (Ver seção 4.5.1 acima). Nesta fase não houve administração de substâncias.

4.6 Análise de comportamento

O registro das sessões experimentais foi feito automaticamente pelo software AnyMaze (Stoelting. Co., EUA), via o circuito fechado de câmeras. Um observador previamente treinado fez o registro manual dos seguintes comportamentos: (1) Vigilância: duração do movimento contínuo de varredura com a cabeça enquanto o animal permaneceu parado; (2) Locomoção: duração do tempo gasto em movimento; (3) Uso do espaço: duração do tempo de permanência em cada compartimento; (4) Exploração: frequência de cheirar/lamber qualquer parte do aparato. Os comportamentos avaliados foram baseados em etogramas de calitriquídeos (Poole e Stevenson, 1976; Stevenson e Rylands, 1988) e em estudos similares conduzidos com a espécie *Callithrix penicillata* (Borges e cols., 2015; Cagni e cols., 2012; Duarte e cols., 2015; Melamed e cols., 2013).

4.7 Coleta de sangue

Foram coletadas três amostras de 1,5 mL de sangue de cada sujeito: (1) imediatamente após a última sessão de habituação (pós-H2); (2) um dia antes da primeira sessão de teste e imediatamente após a última sessão de condicionamento (pré-T1); e (3) um dia antes da segunda sessão teste (pré-T2). Todas as amostras foram obtidas na presença do veterinário do CPUUnB, entre às 13:00 h e 17:30 h. A coleta pré-T2 foi feita no mesmo horário do dia em que as sessões comportamentais foram realizadas. Nesta coleta os animais foram capturados diretamente no seu viveiro de moradia, com o auxílio de um puçá e luvas de couro (para proteção do experimentador) e levados para uma sala de procedimentos adjacente ao corredor de viveiros. Nas coletas pós-H2 e pré-T1, os animais foram capturados no seu viveiro de moradia, transportados via caixa de transporte até a caixa de CPP para realização de sessão experimental. Ao final dos 15 min de observação comportamental, os sujeitos foram transportados até a sala de procedimentos adjacente ao corredor dos viveiros para coleta de amostras.

Na sala de procedimentos, o animal foi anestesiado com isoflurano por via inalatória, com auxílio de um vaporizador universal usando um fluxo de oxigênio. O fluxo de oxigênio foi fixado em 1,0 L/min e de isoflurano em 2% para indução e manutenção da anestesia (conforme Pissinatti e cols., 2016). Quando os movimentos voluntários do animal cessaram e a respiração foi estabilizada, 1,5ml de sangue foi obtido por punção da veia femoral, por um médico veterinário do CP/UnB. Ao final da punção, o fluxo de anestésico foi cessado e o animal recebeu uma dose de 0,3ml de vitamina K e 0,03ml de ferro. O animal permaneceu em observação até o final do efeito anestésico (1-2 min), e então, foi levado de volta ao viveiro em que estava alojado e monitorado pelos 15-30 min seguintes.

A amostra de sangue foi imediatamente colocada em um vacuette de 4 mL com fator ativador de coagulação e gel separador e mantida resfriada até o seu processamento inicial. As amostras foram então centrifugadas a 3.000 rpm por 10 min, à temperatura ambiente e o sobrenadante (soro) foi coletado com pipetas, transferido para tubo eppendorf e congelado à

-80°C. As amostras foram enviadas à -80°C para análise na Alemanha. O soro foi analisado posteriormente para a determinação da atividade das enzimas SMA e SMN.

4.8 Análise de atividade enzimática

A atividade enzimática das esfingomielinases foi determinada usando um substrato fluorescente BODIPY-FL-C12-SM (N-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-dodecanoyl) esfingosil fosfocolina, (D-7711; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA/Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), com triplicatas para cada amostra e atividade enzimática. A reação enzimática padrão conteve 58 pmol de esfingomielina como substrato em uma reação de volume 100µL contendo: 200mM de tampão de acetato de sódio (pH 5,0), 500mM NaCl e 0,2% de detergente Nonidet P-40 para a análise da atividade da esfingomielinase ácida; 200mM tampão HEPES (pH 7,0), 200mM MgCl₂ e 0,05% de detergente Nonidet P-40 para análise da atividade da esfingomielinase neutra. As reações foram iniciadas com a adição de 1,5 µL do soro correspondendo a 1-2 µg de proteína. Após a incubação a 37°C as reações foram cessadas por congelamento à 20°C e armazenadas até o próximo processamento. Os lipídeos foram extraídos, adicionando 250 µL de clorofórmio: metanol (2:1 v/v), brevemente vortexados e separados em fases por centrifugação a 16 000g por 2 min. A fase orgânica mais baixa foi concentrada em uma centrífuga evaporadora SpeedVac® por 20 min a 42°C e dissolvida em 2 µL de clorofórmio: metanol (2:1, v/v) e aplicado sobre placas de sílica-gel para cromatografia em camada delgada (CCD; (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha, 805034). O produto e o substrato não-clivado foram separados usando clorofórmio: metanol (80:20, v/v). O sinal de fluorescência foi quantificado em uma Typhoon Trio scanner (excitação a 488 nm; emissão a 520 nm, 285–350 V, resolução de 100 µm; GE Healthcare, Darmstadt, Alemanha) com o software QuantityOne (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). A atividade enzimática foi calculada como a taxa de hidrólise de esfingomielinas (pmol), por tempo (h) por proteína (µg).

4.9 Análise estatística

Inicialmente foi feita análise da premissa de distribuição normal dos dados. Essa análise foi feita usando métodos gráficos qualitativos (*box-plot*) e uso de métodos quantitativos (teste de *Shapiro-Wilk*). O uso exclusivo de métodos qualitativos pode ser muito subjetivo e portanto o uso de testes analíticos é recomendável (Das e Imon, 2016). Apesar de testes de normalidade não terem grande poder com *n* amostral pequeno (Razali e Wah, 2011), o teste de Shapiro-Wilk é considerado um bom teste de normalidade dentre os testes mais comuns (Henderson, 2006). Dados com distribuição considerada normal são apresentados como a média dos valores e o erro padrão da média (\pm EPM), dados considerados com distribuição não-paramétrica, são apresentados como a mediana dos valores e a amplitude. O uso de média e medidas de dispersão relacionadas à média só fornecem informações precisas sobre os dados quando a distribuição é considerada normal (Hopkins e Weeks, 1990). Os resultados do teste de normalidade são apresentados no Apêndice 1.

Os dados referentes à locomoção, exploração e vigilância nas sessões de habituação de todos os animais foram analisados usando o teste *t* para amostras repetidas. Para o tempo de permanência nos compartimentos durante as sessões de habituação, foi feita uma Análise de Variância de duas vias (ANOVA) para medidas repetidas. Para os dados de vigilância, entre as primeiras e últimas sessões do condicionamento (sessões 1, 2, 11 e 12) de cada grupo, foi feito o teste de *Friedman* e quando resultados significativos foram obtidos foi feito o uso *post hoc* do teste de múltiplas comparações de Dunn. Os dados de locomoção entre as primeiras e últimas sessões de condicionamento (sessões 1, 2, 11 e 12) e o tempo de permanência no CC nas sessões H2, T1 e T2 foram analisados por meio de uma ANOVA de duas vias de desenho misto (*mixed design two-way ANOVA*). Sendo que para ambas as análises a variável independente foi o 'grupo' e o fator de medidas repetidas foi a 'sessão'. Quando resultados significativos foram obtidos, o teste *post hoc* de *Tukey* foi utilizado. Os comportamentos de locomoção, exploração e vigilância entre as sessões H2, T1 e T2, foram analisados via teste de *Friedman*, para cada grupo e se aplicável feito pós teste de Dunn.

Para os dados de atividade enzimática, foram comparados os grupos SAL e COC em cada amostra de sangue por meio do teste U de Mann-Whitney.

Foi calculado o coeficiente de correlação de *Pearson* e de *Spearman*, para dados paramétricos e não paramétricos, respectivamente. Para analisar se os comportamentos dos animais na habituação poderiam prever a resposta de CPP, o tempo de permanência no compartimento condicionado (T1 e T2) foi correlacionado com: (1) os níveis de vigilância na sessão H2 e na sessão 11 do condicionamento (última de cocaína); (2) a frequência de exploração na sessão H2; e (3) o tempo gasto se locomovendo na sessão H2. Para analisar se a atividade enzimática da SMA ou SMN inicial poderia prever a resposta de CPP, o tempo no compartimento condicionado pós-condicionamento (T1 e T2) foi correlacionado à atividade da SMA e SNM nas coletas pós-H2, pré-T1 e pré-T2. Por fim, para testar se as respostas comportamentais na habituação podem prever o tempo dispendido em vigilância, o tempo de vigilância na sessão 11 do condicionamento foi correlacionada à (1) vigilância; (2) exploração; e (3) locomoção da sessão de pré-condicionamento (H2). Para todas as estatísticas realizadas foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, EUA) e o nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$.

5. Resultados

Houve uma redução significativa no tempo gasto em locomoção entre as sessões de habituação H1 e H2 ($t_{11}= 9,00$; $p<0,0001$; Tabela 1). Não foram observadas diferenças significativas entre as sessões de habituação para os outros comportamentos avaliados (*Exploração*: $t_{11}=0,40$; $p=0,69$; *Vigilância*: $t_{11}= 0,13$; $p=0,90$; Tabela 1). Além disso, os animais não demonstraram ter uma preferência inata por um dos compartimentos durante as sessões, já que não houve diferença significativa nos tempos de permanência em cada compartimento (sessão: $F_{1,11}=0,04$; $p=0,85$; compartimento: $F_{1,11}=1,09$; $p=0,32$; interação: $F_{1,11}=0,33$; $p=0,57$; Tabela 1).

Tabela 1. Resposta comportamental dos sujeitos (média \pm epm; $n=12$) durante a fase de habituação na caixa de CPP.

Parâmetro comportamental	Sessão de habituação	
	H1	H2
Locomoção (em segundos)	148 \pm 15	85 \pm 13 ^a
Exploração (frequência)	34 \pm 5	37 \pm 4
Vigilância (em segundos)	349 \pm 24	347 \pm 23
Tempo gasto no compartimento branco (em segundos)	458 \pm 39	492 \pm 42
Tempo gasto no compartimento listrado (em segundos)	434 \pm 38	402 \pm 39

^a $p<0,0001$ vs. habituação 1

Durante o período de condicionamento, houve diferença estatística no tempo que o grupo COC permaneceu vigilante ($X^2=13,4$; $p=0,0006$; Figura 7). Análise *post hoc* com teste de Dunn, apontou que o tempo de vigilância da sessão C6 do grupo COC aumentou significativamente em comparação com as sessões S1 ($p=0,021$) e S6 ($p=0,004$), mas não se mostrou diferente estatisticamente da sessão C1 ($p=0,441$). Já para o grupo SAL, houve uma tendência na redução do tempo de vigilância entre as sessões ($X^2=7,2$; $p=0,06$; Figura 7).

Para o tempo gasto em locomoção, não houve diferença estatística entre os grupos ou sessões experimentais (efeito da sessão: $F_{3,30}= 2,403$; $p=0,087$; efeito do grupo: $F_{3,30}=0,03$; $p= 0,85$; interação: $F_{3,30}= 0,45$; $p=0,72$; Figura 8).

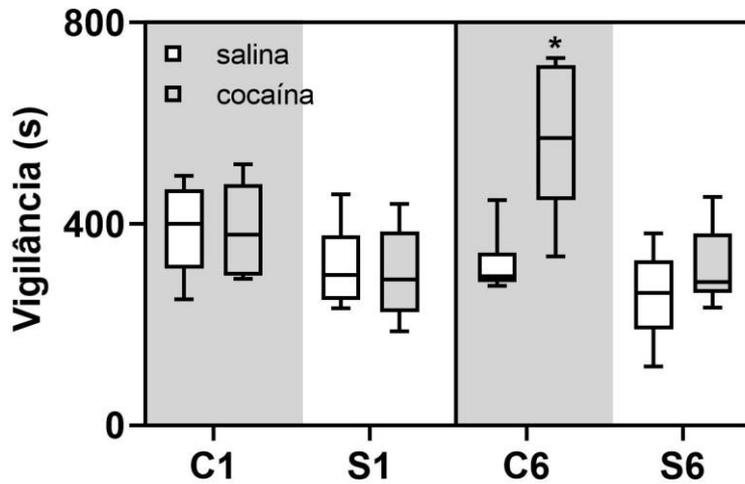


Figura 7. Resposta de hipervigilância induzida pela cocaína. Tempo (mediana \pm amplitude; em segundos) que os sujeitos passaram sendo vigilantes nas duas primeiras (C1 e S1) e duas últimas (C6 e S6) sessões de condicionamento. Os animais do grupo salina receberam salina nas doze sessões de condicionamento, enquanto o grupo cocaína recebeu 7mg/kg nos dias ímpares (1 e 11) e salina nos dias pares (2 e 12). $N=6$ /grupo; * $<0,05$ vs. respectivas sessões 2 e 12 do grupo cocaína.

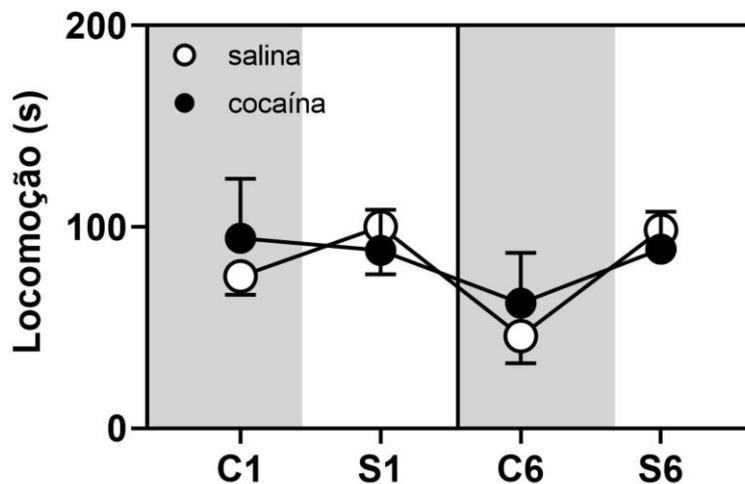


Figura 8. Cocaína não altera resposta locomotora nos micos-estrela. Tempo (média \pm epm; em segundos) que os sujeitos passaram em locomoção nas duas primeiras (C1 e S1) e duas últimas (C6 e S6) sessões de condicionamento. Os animais do grupo salina receberam salina nas doze sessões de condicionamento, enquanto o grupo cocaína recebeu 7 mg/kg nos dias ímpares (1 e 11) e salina nos dias pares (2 e 12). $N=6$ /grupo.

Nas sessões testes 1 e 2, o grupo COC permaneceu significativamente mais tempo no compartimento condicionado à cocaína do que o grupo SAL (sessão: $F_{2,20}=3,71$; $p=0,04$; grupo: $F_{1,10}=7,20$; $p=0,02$; interação: $F_{2,20}=4,73$; $p=0,02$; Figura 9). O grupo COC passou mais tempo no compartimento condicionado na sessão T1($p=0,027$) e T2($p=0,02$) em comparação ao tempo de permanência durante a sessão H2. Para o grupo SAL, não houve diferença entre o tempo de permanência no compartimento condicionado na sessão H2 e as sessões teste.

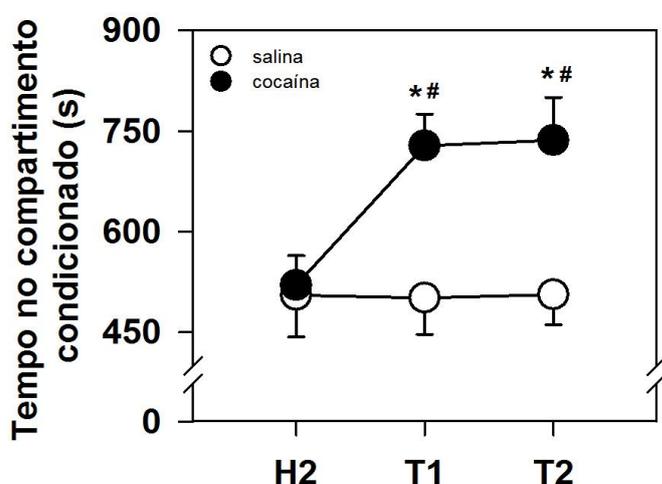


Figura 9. Resposta de CPP induzida por cocaína. Tempo que os sujeitos permaneceram (média \pm epm; em segundos) no compartimento condicionado à cocaína ou salina durante a última sessão de habituação (H2) e nas duas sessões testes (T1 e T2). Os animais do grupo salina receberam salina nas doze sessões de condicionamento e os animais do grupo cocaína receberam cocaína 7 mg/kg e salina em dias alternados. T1 e T2 foram realizados 24h e 15 dias após a última sessão de condicionamento, respectivamente. $N=6$ /grupo; * $p<0,05$ vs. H2 no grupo cocaína.; # $p<0,05$ vs. mesma sessão do grupo salina.

Entre as sessões H2, T1 e T2 não houve diferenças estatísticas entre o tempo gasto em locomoção para o grupo cocaína ($X^2=4,33$; $p=0,14$; Tabela 2) ou salina ($X^2=3$; $p=0,25$; Tabela 2). Houve diferenças nos níveis de exploração entre as sessões H2, T1 e T2, para ambos os grupos (*cocaína*: $X^2=9,478$; $p=0,0054$; *salina*: $X^2=9,333$; $p=0,0055$; Tabela 2). O grupo COC explorou com mais frequência na sessão T1 do que na sessão H2 ($p=0,0424$) e T2 ($p=0,0183$), já o grupo SAL teve maior frequência de exploração na sessão T1 comparado a sessão H2 ($p=0,0117$). Por fim, o grupo COC não apresentou diferenças significativas nos níveis de vigilância entre estas sessões ($X^2=1$; $p=0,7402$; Tabela 2), diferente do grupo SAL

($X^2=8,333$; $p=0,012$; Tabela 2) que ficou vigilante por menos tempo na sessão T2, quando comparado com a sessão H2($p=0,01$).

Tabela 2. Resposta comportamental dos sujeitos (média \pm epm) tratados com salina ou cocaína (n=6/grupo) durante diferentes sessões experimentais.

Parâmetro comportamental	Sessão		
	H2	T1	T2
Locomoção (em segundos)			
salina	88 \pm 19	108 \pm 18	115 \pm 19
cocaína	81 \pm 20	75 \pm 14	69 \pm 21
Exploração (frequência)			
salina	38 \pm 2	90 \pm 21 ^a	57 \pm 15
cocaína	35 \pm 8	64 \pm 13 ^b	31 \pm 8
Vigilância (em segundos)			
salina	358 \pm 22	273 \pm 32	224 \pm 16 ^b
cocaína	335 \pm 42	332 \pm 28	285 \pm 23

^a $p<0,05$ vs. H2 e T2

^b $p<0,05$ vs. H2

O tempo médio de todas as coletas (i.e., tempo gasto desde a entrada no viveiro para captura do indivíduo até o fim da venipuntura) foi 3,6 \pm 0,3 min (média \pm erro padrão da média; EPM). O tempo médio e EPM das coletas individualmente pós-H2, pré-T1 e pré-T2 foi respectivamente 3,96 \pm 0,25 min, 4,01 \pm 0,7 min e 2,96 \pm 0,23 min. A atividade enzimática não apresentam diferenças estatísticas ao longo das coletas. Para a atividade da SMA não houve diferença entre os grupos COC e SAL na amostra pós-H2 ($U=16$; $p=0,82$; Figura 10). Na coleta pré-T1, a atividade da SMA do grupo salina foi significativamente menor que do grupo cocaína ($U=5$; $p=0,04$; Figura 10). Para a última coleta – pré-T2, não houve diferença na atividade da SMA entre os grupos ($U=12$; $p=0,39$; Figura 10). Para a atividade da SMN não foi encontrada diferença entre os grupos entre nenhuma das coletas (pós-H2: $U=14$; $p=0,59$; pré-T1: $U=10,5$; $p=0,27$; pré-T2: $U=16$; $p=0,82$; Figura 10).

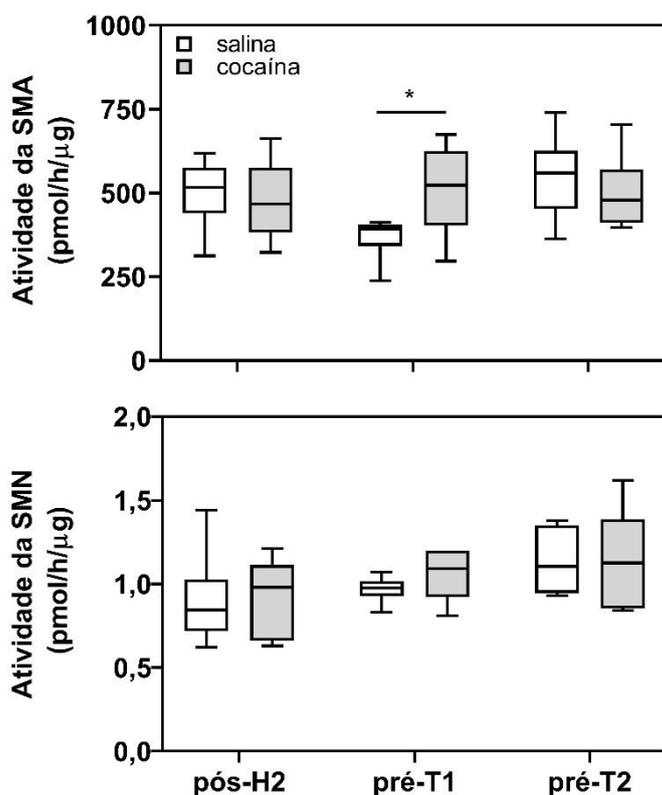


Figura 10. Cocaína impede a redução da atividade periférica da SMA, mas não altera atividade da SMN. Atividade das enzimas (mediana \pm amplitude; em pmol/h/ μ g) esfingomielinase ácida (SMA; quadro superior) esfingomielinase neutra (SMN; quadro inferior) nas diferentes fases do procedimento experimental: pós-H2, imediatamente após a habituação 2; pré-T1 e pré-T2, 24h antes das respectivas sessões teste. * $p < 0,05$ vs. grupo salina na respectiva amostragem.

Não houve correlações significativas entre a vigilância na última sessão de condicionamento com cocaína (C11) e o tempo de permanência no compartimento condicionado nas sessões testes T1 (grupo SAL: $r = 0,57$; $p = 0,24$; grupo COC: $r = -0,02$; $p = 0,98$) ou T2 (grupo SAL: $r = -0,04$; $p = 0,94$; grupo COC: $r = 0,17$; $p = 0,75$). Os níveis de locomoção e vigilância na sessão de habituação (pré-condicionamento) não foram correlacionados significativamente com o tempo de vigilância na sessão de condicionamento C11, nem com o tempo de permanência no compartimento condicionado nas sessões testes T1 ou T2 (Tabela 3).

Tabela 3. Relação entre os comportamentos observados antes do condicionamento a cocaína e as respostas comportamentais induzidas pela administração repetida da droga, em cada grupo experimental, expressa como o coeficiente r de correlação de Pearson ou Spearman (valor de p).

Comparação	Sessão habituação H2		
	locomoção	exploração	vigilância
Vigilância C6 x			
grupo salina	-0,30 (0,57)	-0,65 (0,17)	-0,77(0,07)
grupo cocaína	-0,64 (0,17)	-0,27 (0,61)	0,03 (0,96)
CPP T1 x			
grupo salina	-0,38 (0,46)	-0,87 (0,03)*	-0,24 (0,65)
grupo cocaína	0,01 (0,99)	0,63 (0,18)	0,24 (0,65)
CPP T2 x			
grupo salina	0,11 (0,84)	-0,49 (0,32)	0,26 (0,62)
grupo cocaína	-0,57 (0,23)	-0,42 (0,41)	0,33 (0,53)

Para o grupo SAL não houve correlação entre a atividade da SMA e o tempo no compartimento condicionado na sessão T1 (coletas – pós-H2: $r = 0,43$; $p = 0,39$; pré-T1: $r = -0,52$; $p = 0,29$) ou na sessão T2 (coletas – pós -H2: $r = 0,43$; $p = 0,39$; pré-T2: $r = -0,40$; $p = 0,43$). Para o grupo COC também não houve correlação entre a atividade da SMA e o tempo no compartimento condicionado na sessão T1 (coletas – pós -H2: $r = -0,54$; $p = 0,26$; pré-T1: $r = 0,49$; $p = 0,32$) ou na sessão T2 (coletas – pós-H2: $r = -0,74$; $p = 0,09$; pré-T2: $r = 0,39$; $p = 0,45$).

Para o grupo COC, a atividade da SMN no pré-T1 foi correlacionada com o tempo que o grupo permaneceu no compartimento condicionado no T1 (Figura 11). Não houve correlação entre a atividade da SMN na coleta pós-H2 e o tempo que o grupo COC permaneceu no compartimento condicionado na sessão T1 ($r = -0,62$; $p = 0,19$) ou entre a atividade da SMN em qualquer coleta e o tempo no CC na sessão T2 (coletas – pós-H2: $r = -0,64$; $p = 0,17$; pré-T2: $r = -0,25$; $p = 0,63$). Não houve correlação entre a atividade da SMN e o tempo no compartimento condicionado na sessão T1 (coletas – pós-H2: $r = 0,12$; $p = 0,83$; pré-T1: $r = -0,48$; $p = 0,34$) ou na sessão T2 (coletas – pós-H2: $r = 0,40$; $p = 0,27$; pré-T2: $r = 0,13$; $p = 0,81$) do grupo SAL. O tempo em vigilância na primeira e última sessão com administração de cocaína (C1 e C11) não foi

correlacionado com a atividade enzimática da SMA ou SMN em nenhuma das coletas e em nenhum dos grupos (Tabela 4).

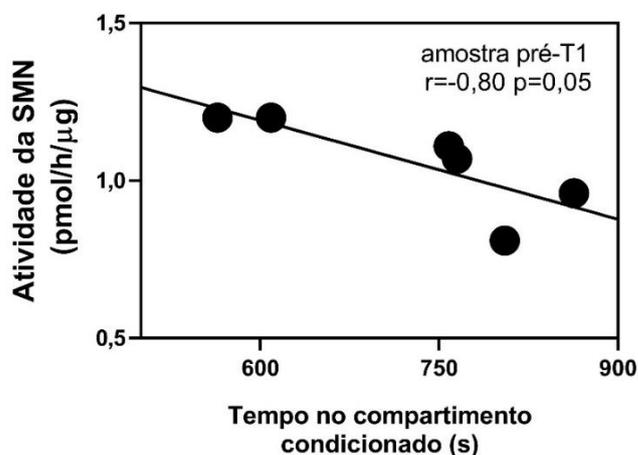


Figura 11. Relação entre a atividade da enzima (pmol/h/μg) esfingomielinase neutra (SMN) na amostra pré-teste 1 e o tempo no compartimento condicionado no teste 1.

Tabela 4. Relação entre o nível de atividade das enzimas esfingomielinase ácida (SMA) e neutra (SMN) detectadas no sangue com tempo em vigiância induzida pela administração repetida da droga, expressa como o coeficiente r de correlação de Pearson ou Spearman (valor de p).

Grupo	Comparação	Amostra de sangue*		
		pós-H2	pré-T1	pré-T2
<i>Salina</i>	<i>tempo de vigiância x SMA</i>			
	sessão condicionamento 1	-0,11 (0,83)	-0,60 (0,24)#	-0,36 (0,48)
	sessão condicionamento 11	-0,66 (0,18)#	-0,02 (0,99)#	0,48 (0,35)#
	<i>tempo de vigiância x SMN</i>			
	sessão condicionamento 1	-0,08 (0,88)	-0,36 (0,49)	0,34 (0,51)
	sessão condicionamento 11	0,03 (0,99)#	0,29 (0,60)#	0,66 (0,18)#
<i>Cocaína</i>	<i>tempo de vigiância x SMA</i>			
	sessão condicionamento 1	0,45 (0,37)	-0,23 (0,65)	0,74 (0,09)
	sessão condicionamento 11	0,17 (0,37)	-0,11 (0,84)	0,34 (0,51)
	<i>tempo de vigiância x SMN</i>			
	sessão condicionamento 1	-0,23 (0,66)	0,74 (0,09)	0,58 (0,23)
	sessão condicionamento 11	-0,31 (0,55)	-0,01 (0,99)	-0,28 (0,59)

*pós-H2 = logo após a sessão de habituação 2; pré-T1 = logo após a sessão de condicionamento 12; pré-T2 = 24 h antes da sessão teste 2

#Coeficiente de correlação de Spearman

6. Discussão

6.1 Habituação

No presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas no tempo que os sujeitos permaneceram em cada compartimento da caixa de CPP na fase de habituação, indicando a ausência de uma preferência inata do animal a algum dos compartimentos. Preferências inatas anteriores ao período de condicionamento podem interferir na resposta de CPP ou implicar em protocolos ‘enviesados’ – por envolverem a escolha não aleatória do compartimento condicionado (Bardo e Bevins, 2000). Quando há uma preferência inata significativa pode-se condicionar o sujeito no compartimento menos preferido (Sanchis-Segura e Spanagel, 2006). Desta forma, uma resposta de CPP nessas condições envolveria superar essa ‘aversão’ inicial ao compartimento. Por ser difícil separar a alteração de um estado motivacional prévio (aversão) das propriedades recompensadoras da droga, protocolos com esse viés são interpretados com cautela e isso os torna menos atrativos (Cunningham e cols., 2003).

Assim como em outros trabalhos com preferência condicionada-por-lugar em calitriquídeos, não houve alterações nos níveis de vigilância e exploração durante a fase de habituação (Borges e cols., 2015; Duarte e cols., 2015). No entanto, em oposição ao relatado nestes trabalhos, os animais do presente estudo apresentaram uma redução significativa no tempo de locomoção entre a primeira e a segunda sessão da habituação. A habituação de primatas é um processo contínuo que pode ser alterado por diversos fatores (e.g. ambiente, experiências prévias e a própria espécie) e medido por diversos comportamentos (Williamson e Feistner, 2011). Ao serem expostos repetidamente a ambientes novos, micos-estrela reduzem rapidamente sua atividade locomotora e exploratória, além de comportamentos relacionados à exposição à novidade, mas não reduzem comportamentos de vigilância como o ‘*visual scanning*’ (Barros e cols., 2004).

6.2 Sensitização comportamental

Ao longo da fase de condicionamento, os sujeitos do grupo COC apresentaram uma modificação no padrão de vigilância. Os animais do grupo COC tiveram um aumento nos níveis de vigilância na última sessão de condicionamento com cocaína (sessão C6) e esse nível de vigilância foi significativamente maior que a vigilância nas sessões S1 e S6 do condicionamento, mas não para a sessão C1. Essa alteração nos níveis de vigilância não foi vista no grupo SAL que apresentou uma tendência de redução da vigilância ao longo do condicionamento. O tempo de vigilância na sessão C6 de ambos os grupos não foi correlacionado com a locomoção, exploração ou vigilância na sessão H2. Isso indica que o perfil basal de comportamentos não influenciou na indução e expressão da resposta de hipervigilância induzida pela cocaína. Em estudos com micos-estrela, administrações diárias de cocaína produzem um efeito de hipervigilância nos animais (5mg/kg: Cagni e cols., 2012; 7mg/kg: Borges e cols., 2015; Melamed e cols., 2013). Esse efeito comportamental é considerado como uma sensitização do sistema mesolímbico a drogas de abuso, como a cocaína (Berridge e Robinson, 2016). Essas respostas sensitizadas são importantes para expressão de comportamentos do abuso de drogas (Vezina e Leyton, 2009). Por outro lado, uma dose de 5 mg/kg de metilfenidato não induziu vigilância em um protocolo de CPP similar ao deste trabalho (Kashefi e cols., 2019, no prelo). Ainda, uma dose de 3 mg/kg de cocaína falhou em induzir um efeito de hipervigilância em micos-estrela, apesar de levar a uma resposta de CPP (Borges e cols., 2015). Assim, fica claro, que a sensitização comportamental induzida por estimulantes vista em PNH parece ser dose-dependente, variando de acordo com o estimulante utilizado e o comportamento avaliado (e.g. padrões locomotores específicos e estereotipias; Castner e Goldman-Rakic, 1999).

Não foram encontradas alterações significativas na atividade locomotora ao longo das sessões de condicionamento para o grupo COC ou SAL. Diferente do que é visto em roedores, psicoestimulantes não costumam levar a um aumento da locomoção em primatas (revisado em Bradberry, 2007). A sensitização comportamental parece acontecer com os comportamentos mais frequentes da espécie (Melamed e cols., 2013). Comportamentos de

vigilância são muito frequentes em etogramas de calitriquídeos (Stevenson e Poole, 1976; Stevenson e Rylands, 1988). Apesar disso, doses agudas de cocaína podem aumentar a locomoção em subgrupos de calitriquídeos (De Souza Silva e cols., 2006). Ademais, van Vliet e colaboradores (2006) relataram que doses altas de modafinil (>100mg/kg) foram suficientes para induzir hiperlocomoção no teste de Bungalow usado para medir atividade locomotora e exploratória em calitriquídeos.

A atividade de SMA e SMN não foi estatisticamente diferente entre as sessões pós-H2 e pré-T1. Esse efeito estatístico se deve, provavelmente, ao pequeno número amostral utilizado. Quanto à atividade enzimática (SMA ou SMN), não foram encontradas correlações significativas entre eles e os níveis de vigilância pré ou pós-condicionamento. Assim, é plausível considerar que a modulação por cocaína ou o protocolo experimental utilizado não altere a atividade da SMA e SMN ou mesmo que os esfingolipídeos não tenham papel fundamental no processo de sensitização comportamental nesse modelo de primata.

Em acordo com essa ideia, os lipídeos mais alterados por um modelo de sensitização por cocaína em roedores foram glicerofosfolipídeos, como fosfoetanolamina (PE) e fosfatidilcolinas (PC), e foram majoritariamente mais modulados no corpo estriado (Lin e cols., 2017). Esses aumentos induzidos pela cocaína nos níveis de glicerofosfolipídeos são potencialmente causados pela inibição da cocaína na fosfolipase 1, enzima que cliva fosfolipídeos (Nassogne e cols., 2004). Esse efeito, no entanto, não explica o aumento de ceramidas e outros esfingolipídeos encontrados no protocolo de sensitização (Lin e cols., 2017). Em outro trabalho, agora com sensitização induzida por metanfetamina em camundongos, foram encontradas alterações nos níveis de Ceramida-1-fosfato no hipocampo, mas nenhuma alteração no núcleo accumbens (NAc; Jiang e cols., 2017). Esses resultados apontam que os esfingolipídeos podem não ser essenciais na sensitização comportamental e o efeito nos lipídeos pode ser resultante de outros processos. Portanto, essas alterações lipídicas parecem ser droga-específicas. Fica claro que o uso de cocaína

leva a alterações lipídicas, mas devido à falta de estudos focados em esfingolipídeos, a relação desses lipídeos com processos de sensitização é menos documentada.

No entanto, já foram encontradas alterações nos níveis de glicerofosfolipídeos no protocolo de sensitização com cocaína e encontrada uma correlação positiva entre os níveis sanguíneos de PE 41:2 e PC 32:0 e PC34:1 e a hiperlocomoção em ratos (Cummings e cols., 2015). Essas alterações foram mensuradas uma semana após a última injeção de cocaína, assim, essas alterações não são resultantes de um efeito direto da cocaína (agudo). É possível que metabólitos, e não a atividade enzimática, se relacionem melhor com a sensitização comportamental ou ainda que esfingolipídeos não tenham um papel vital nesse processo.

Ainda, as modificações lipídicas induzidas por drogas de abuso também parecem ser espécie-específicas. Tendo em vista que drosófila (*Drosophila melanogaster*) tratadas com cocaína tem aumento nos PC totais e redução nos níveis de PE e PI totais em relação a moscas controle, esse efeito é o oposto do induzido pelo metilfenidato no mesmo modelo, no qual há aumento de PE e PI e redução de PC (Philipsen e cols., 2018). Essas alterações no perfil de PC e PE são diferentes das vistas no modelo de roedor. De modo que as alterações no perfil lipídico são altamente específicas.

6.3 Preferência condicionada por lugar

Nas duas sessões testes, uma 24 h e outra 15 dias após o último condicionamento, apenas o grupo COC ficou significativamente mais tempo no compartimento condicionado à droga. O uso repetido de cocaína é capaz de induzir respostas de CPP em diversas situações experimentais em roedores (revisado em Tzschentke, 2007). Em PNH, a preferência condicionada por lugar induzida por drogas, só foi documentada em 2011, quando uma resposta de CPP induzida por morfina foi demonstrada em macacos *rhesus* (Wang e cols., 2012). Pouco depois, uma resposta de CPP induzida por cocaína em micos-estrela foi demonstrada (Barros e cols., 2013). Ainda mais recente é o CPP induzido por metilfenidato

em micos-estrela (Kashefi e cols., 2019). A resposta de CPP já foi induzida em humanos, utilizando anfetamina e álcool (Childs & de Wit, 2009, 2013, 2016). Ademais, um estudo utilizando brinquedos demonstrou uma resposta de CPP em crianças entre 30 e 55 meses (Hiller e cols., 2015). Essa ubiquidade da resposta entre as espécies reflete uma forma simples e conservada de aprendizado. De fato, essa resposta é possível por meio da expressão de um ou mais tipos de memória, dentre os quais, a explicação mais comum é ser de uma memória associativa induzida pela motivação associada ao uso da droga (Huston e cols., 2013).

O protocolo de CPP avalia um aprendizado pavloviano e tem sido utilizado para avaliar o a associação entre potencial efeito reforçador de várias substâncias e um contexto (Bardo e Bevins, 2000). É um teste que reflete elementos da dependência, já que indivíduos dependentes exibem muitas associações entre o ambiente em que é consumida a droga e as propriedades motivadoras da droga (Napier e cols., 2013). Inclusive, respostas de CPP em humanos já foram induzidas por anfetamina (Childs e de Wit, 2009, 2013) e por álcool (Childs e de Wit, 2016). Além do que, é um protocolo que permite avaliar o desempenho de medicamentos para o tratamento da dependência (Napier e cols., 2013), inclusive na mesma espécie deste trabalho (Kashefi e cols., 2019). Por ser útil para avaliar o potencial reforçador do potencial medicamento e por permitir estudos de recaída (Napier e cols., 2013). O teste de CPP pode ser útil para identificar medicamentos que inibam a recaída induzida por pistas, droga ou estresse (Napier e cols., 2013).

A resposta de CPP também não foi correlacionada com os níveis comportamentais vistas na última sessão de habituação (H2). Resultados semelhantes, nos quais não houve correlação foram encontrados quando utilizada a mesma dose de cocaína em micos-estrela (Borges e cols., 2015). Apesar disso, utilizando uma dose menor, 3 mg/kg os comportamentos no pré-condicionamento correlacionaram negativamente com a resposta de CPP (Borges e cols., 2015). Em outro tipo de resposta de CPP, induzida por alimento, a resposta de CPP também não foi correlacionada com níveis de comportamentos pré-condicionamento. O que

diferencia o modelo primata do modelo roedor, no qual comportamentos pré-CPP estão correlacionados a resposta de CPP (Seymour e Wagner, 2008).

A resposta de CPP vista no presente trabalho é persistente por pelo menos 15 dias e similar à de outros trabalhos com a mesma espécie e droga (Borges e cols., 2015), o que demonstra uma consolidação do comportamento aprendido e da associação entre o contexto (estímulo preditivo de recompensa) e os efeitos hedônicos da cocaína. As modificações induzidas pela cocaína são persistentes e suficientes para que, mesmo após longo período sem droga, a apresentação de um contexto pareado, estresse e ou doses baixas da droga produzam uma resposta de CPP (Tzschentke, 2007).

No presente trabalho não foram encontradas correlações entre os comportamentos de hipervigilância e a resposta de CPP, em ambos os grupos COC e SAL. Trabalhos que analisaram ambas as variáveis em um mesmo indivíduo também tiveram resultados semelhantes (Borges e cols., 2015; Seymour e Wagner, 2008), o que indica a existência de bases neurais diferentes para o condicionamento e a sensitização comportamental apesar de se sobreporem em alguns pontos. O perfil lipídico do cérebro de um camundongo após um protocolo de CPP por cocaína é diferente do perfil observado após um protocolo de sensitização comportamental induzida por essa mesma droga (Lin e cols., 2017). Os lipídeos e a área mais afetados pelo teste de CPP, induzido por cocaína, foram os esfingolipídeos e o NAc, respectivamente (Lin e cols., 2017). O papel da cocaína como inibidor funcional da SMA (Nassogne e cols., 2004) poderia explicar a redução nos níveis de ceramida e um aumento de seus metabólitos no protocolo de CPP do visto trabalho de Lin e cols., (2017), mas não explica o aumento de ceramidas e outros esfingolipídeos encontrados no protocolo de sensitização.

A administração de cocaína não levou ao condicionamento de outras respostas comportamentais. A atividade locomotora foi similar antes (H2) e após o condicionamento (T1 e T2). A atividade exploratória apresentou um aumento na sessão T1, mas esse aumento foi em ambos os grupos, o que reduz as chances de ter sido um efeito da cocaína. Por fim, no

grupo SAL, o tempo de vigiância na sessão T2 foi menor do que o visto na H2. Micos-estrela reduzem a vigiância após perceber a ausência de estímulos aversivos (Barros e cols., 2004). Esses resultados são similares a outros trabalhos com administração de cocaína em PNH (Borges e cols., 2015; Cagni e cols., 2012).

O grupo COC apresentou maior atividade enzimática da SMA que o grupo SAL antes do teste 1 (pré-T1). Não foram encontradas correlações entre a atividade da SMA e o tempo no compartimento condicionado nas sessões teste. Assim, pode-se sugerir que a cocaína bloqueou a redução nos níveis de atividade da SMA. Essa diferença de atividade não foi vista na coleta pré-T2, na qual os níveis de atividade da SMA dos dois grupos são similares. É possível que o grupo salina tenha chegado a um estado de habituação que reduziu a atividade da SMA na pré-T1, afinal a habituação é uma redução na resposta após repetidas estimulações (Rankin e cols., 2009). Essa diferença na atividade da SMA não foi vista na amostra pré-T2. Enquanto o grupo COC apresentou níveis de atividade da SMA similares ao longo de todo o estudo. Um estudo *in vitro* mostrou que a cocaína pode atuar como inibidor funcional da SMA (Nassogne e cols., 2004). Apesar disso, no presente estudo a cocaína não reduziu a atividade da SMA na dose e protocolo adotados. Isso porque, a ação sistêmica de um inibidor funcional da SMA exige administrações contínuas por período prolongado de tempo (Kornhuber e cols., 2010). Assim, é possível que a maior atividade da SMA deva-se ao TNF- α induzido pela administração de cocaína (Lee e cols., 2001) que ativa a SMA (Edelmann e cols., 2011). De fato, estressores físicos ou a administração de corticosterona induzem o aumento de ceramidas, possivelmente catalisadas pela atividade de esfingomielinase (Oliveira e cols., 2016). No presente trabalho, a exposição repetida ao aparato de CPP induz a redução na atividade da SMA, mas a administração de cocaína impediu essa redução. Essa redução, vista no grupo controle, pode ser um indicativo de uma memória não-associativa, a habituação. A resposta de CPP do primeiro teste (T1) foi correlacionada com os níveis de atividade da SMN, apenas no grupo que recebeu cocaína. Isso pode ser um indicativo do papel dessa enzima na aprendizagem de comportamentos relacionados à droga.

Houve uma correlação negativa significativa entre os níveis de atividade enzimática da SMN (pré-T1) e o tempo de permanência no compartimento condicionado na sessão teste 1, apenas para o grupo COC. Isso significa que os sujeitos com os menores níveis de atividade da SMN exibiram as maiores respostas de CPP. Essa correlação não aconteceu entre os níveis de SMN pré-T2 e a sessão T2. Essa correlação parece então ser associada a aprendizagem/consolidação do condicionamento (pré-T1), mas não à expressão do comportamento após o período de 15 dias sem manuseio experimental (pré-T2).

Usando um protocolo de depressão-induzida por extinção em ratos, Huston e colaboradores (2016) encontraram uma correlação positiva entre a atividade da SMN no hipocampo e um comportamento aprendido. É possível que a atividade periférica da SMN não reflita a atividade central. Utilizando um inibidor da SMN2, as alterações vistas no soro de camundongos foram praticamente contrárias daquelas vistas nos tecidos cerebrais (Tabatadze e cols., 2010). Assim, as alterações da cocaína na via esfingolipídica no cérebro podem não ser diretamente traduzidas para as alterações vistas no soro. A atividade da SMN parece prever o aprendizado. No entanto, são necessários mais estudos causais para analisar se a associação encontrada tem esse significado biológico. Não é possível afirmar que a atividade da SMN esteja de fato mediando o aprendizado relacionado à resposta de CPP, mas pode-se dizer que animais com as menores atividades da SMN após um protocolo de CPP apresentam as maiores respostas de CPP no dia seguinte.

Em modelos animais, a via esfingolipídica parece estar mais envolvida em memória ou aplicação de protocolos que envolvam algum tipo de estresse. A inibição farmacológica da SMN2, usando GW4869, atrasou a formação da memória espacial no labirinto aquático de Morris e em uma versão aquática do labirinto radial, para avaliar memória episódica operacional (Tabatadze e cols., 2010). No entanto, essa inibição da SMN2 não alterou o desempenho no teste de reconhecimento espacial no labirinto em Y (Tabatadze e cols., 2010). Tanto o protocolo de depressão-induzida por extinção e o labirinto aquático de Morris são protocolos que induzem estresse em um modelo de depressão (Huston e cols., 2013). O

manuseio dos sujeitos para o protocolo de CPP e a administração de cocaína também. De modo que o grupo SAL apresentou uma redução nos níveis de atividade da SMA, mas não apresentou resposta de CPP. Enquanto o grupo COC, não teve essa redução na atividade da SMA, mas demonstrou uma resposta de CPP e uma correlação entre a atividade da SMN e esta resposta.

Até o presente momento, este é o primeiro trabalho mostrando a atividade das enzimas SMA e SMN em resposta à administração de cocaína em um modelo de PNH. Estas diferenças no perfil de atividade enzimática podem subsidiar alterações comportamentais e celulares vistas na dependência. Assim, medicamentos que possam atuar nessas enzimas podem ser candidatos ao tratamento para dependência por cocaína.

Uma das limitações desse trabalho é o pequeno número amostral. A atividade enzimática da SMA e SMN foi mensurada periféricamente e isso pode não refletir as mudanças no cérebro. Sabe-se que a atividade da SMA no soro não correlaciona com a atividade no líquido cefalorraquidiano (Mühle e cols., 2013), ainda mais que essa atividade é possivelmente depende da região cerebral. Seria interessante ter mais amostragens ao longo do estudo, principalmente ao longo da fase de condicionamento. Futuros trabalhos devem analisar a atividade dessas enzimas em grupos maiores de primatas ou por um período de tempo maior.

Outras análises interessantes seriam: testar se as alterações de atividade enzimática encontradas neste trabalho se estendem para outras drogas de abuso e analisar se as correlações encontradas se estendem para outros tipos de memória. Atualmente existem diversas lacunas que impossibilitam a comparação confiável dos dados e a proposição de mecanismos universais do papel desses lipídeos para a memória.

Um campo vasto a ser explorado são os níveis plasmáticos dos esfingolipídeos, uma metodologia mais específica de analisar o impacto desses lipídeos na transição do uso para

a dependência por cocaína. Análises lipidômicas podem ser usadas para a criação de perfis lipídicos específicos para cada droga de abuso

7. Conclusões

Ao avaliar o papel das enzimas esfingomielinase ácida e neutra nos comportamentos relacionados a dependência em micos-estrela foi constatado que:

- Os níveis de atividade da SMA foram diferentes entre os grupos após o protocolo de condicionamento;

- A atividade da SMN se manteve em níveis similares ao longo de todo o estudo, em ambos os grupos;
- O nível de atividade da SMA e SMN não apresentou correlação com o processo de sensitização comportamental induzido por cocaína (i.e., hipervigilância);
- A atividade da SMA não se correlacionou com a resposta de CPP em ambos os grupos;
- Apenas no grupo que recebeu cocaína, os níveis de atividade da SMN após o protocolo de condicionamento (pré-T1) foram correlacionados com a resposta de CPP e podem ser marcadores de uma aprendizagem relacionada à droga;
- As alterações na atividade da SMA e SMN induzidas pela administração de cocaína não foram iguais.

Assim, os esfingolípídeos parecem ter uma função na formação de diversas memórias e também em aspectos do condicionamento e da sensitização comportamental induzidos pela cocaína. A expressão desses comportamentos é um importante marcador das alterações de longo prazo vistas no transtorno do uso de cocaína.

8. Referências

- Abdalla, R. R., Madruga, C. S., Ribeiro, M., Pinsky, I., Caetano, R., & Laranjeira, R. (2014). Prevalence of Cocaine Use in Brazil: Data from the II Brazilian National Alcohol and Drugs Survey (BNADS). *Addictive Behaviors*, 39(1), 297–301. <https://doi.org/10.1016/j.addbeh.2013.10.019>
- Adada, M., Luberto, C., & Canals, D. (2016). Inhibitors of the sphingomyelin cycle: Sphingomyelin synthases and sphingomyelinases. *Chemistry and Physics of Lipids*, 197,

45–59. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2015.07.008>

- Allain, F., Minogianis, E.-A., Roberts, D. C. S., & Samaha, A.-N. (2015). How fast and how often: The pharmacokinetics of drug use are decisive in addiction. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *56*, 166–179. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.06.012>
- APA, A. P. A. (1952). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (First Edition) DSM-I (Second)*. Recuperado de <http://dsm.psychiatryonline.org/data/PDFS/dsm-i.pdf>
- APA, A. P. A. (1968). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (Second Edition) DSM-II*. Recuperado de <http://allpsych.com/disorders/dsm.html>
- APA, A. P. A. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (Fifth Edition) DSM-5 (Vol. 25)*. Recuperado de <http://stacks.iop.org/1751-8121/44/i=8/a=085201?key=crossref.abc74c979a75846b3de48a5587bf708f>
- Bardo, M. T., & Bevins, R. A. (2000). Conditioned place preference: What does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology*, *153*(1), 31–43. <https://doi.org/10.1007/s002130000569>
- Barros, M., de Souza Silva, M. A., Huston, J. P., & Tomaz, C. (2004). Multibehavioral analysis of fear and anxiety before, during, and after experimentally induced predatory stress in *Callithrix penicillata*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *78*(2), 357–367. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.04.008>
- Barros, M., Dempster, E. L., Illott, N., Chabrawi, S., Maior, R. S., Tomaz, C., De Souza Silva, M. A., Huston, J. P., Mill, J., & Müller, C. P. (2013). Decreased methylation of the NK3 receptor coding gene (TACR3) after cocaine-induced place preference in marmoset monkeys. *Addiction Biology*, *18*(3), 452–454. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2011.00409.x>
- Barros, M., & Tomaz, C. (2002). Non-human primate models for investigating fear and anxiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *26*, 187–201. Recuperado de <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0028503007&partnerID=40&md5=2fdefc08d4e999d144f6c53e3f57c9fb>
- Berlin, G. S., & Hollander, E. (2014). Compulsivity, impulsivity, and the DSM-5 process. *CNS spectrums*, *19*(1), 62–68. <https://doi.org/10.1017/S1092852913000722>
- Berridge, K. C., & Robinson, T. E. (2016). Liking, wanting, and the incentive-sensitization theory of addiction. *The American psychologist*, *71*(8), 670–679. <https://doi.org/10.1037/amp0000059>

- Bicca-Marques, J., Jerusalinsky, L., Mittermeier, R. A., Pereira, D., Ruiz-Miranda, C., Rímoli, J., Valença Montenegro, M., & do Valle, R. R. (2018). *Callithrix penicillata*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2018: e.T41519A17935797.*, 8235. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2>
- Bogenschutz, M. P., & Johnson, M. W. (2016). Classic hallucinogens in the treatment of addictions. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 64, 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.03.002>
- Borges, A. C., Duarte, R. B. M., Nogueira, L., & Barros, M. (2015). Temporal and dose-dependent differences in simultaneously-induced cocaine hypervigilance and conditioned-place-preference in marmoset monkeys. *Drug and Alcohol Dependence*, 148, 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2015.01.007>
- Bradberry, C. W. (2007). Cocaine sensitization and dopamine mediation of cue effects in rodents, monkeys, and humans: Areas of agreement, disagreement, and implications for addiction. *Psychopharmacology*, 191(3), 705–717. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0561-6>
- Brady, K. T., Gray, K. M., & Tolliver, B. K. (2011). Cognitive enhancers in the treatment of substance use disorders: Clinical evidence. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 99(2), 285–294. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.04.017>
- Breckenridge, W. C., Gombos, G., & Morgan, I. G. (1972). The lipid composition of adult rat brain synaptosomal plasma membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 266(3), 695–707. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(72\)90365-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(72)90365-3)
- Burkart, J. M., & Finkenwirth, C. (2015). Marmosets as model species in neuroscience and evolutionary anthropology. *Neuroscience Research*, 93, 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2014.09.003>
- Cagni, P., Komorowski, M., Melo, G. C., Lima, T., Tomaz, C., De Souza Silva, M. A., Huston, J. P., & Barros, M. (2012). Repeated cocaine administration in marmoset monkeys induces hypervigilance-related behaviors, but no changes in locomotion and cortisol levels. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 103(2), 279–283. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.08.003>
- Cagni, P., Melo, G. C., De Jesus, A. G. L., & Barros, M. (2014). Cannabinoid type-1 receptor ligands, alone or in combination with cocaine, affect vigilance-related behaviors of marmoset monkeys. *Brain Research*, 1550, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.01.009>

- Canals, D., Perry, D. M., Jenkins, R. W., & Hannun, Y. A. (2011). Drug targeting of sphingolipid metabolism: sphingomyelinases and ceramidases. *British Journal of Pharmacology*, *163*(4), 694–712. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01279.x>
- Carrigan, M. A., Uryasev, O., Frye, C. B., Eckman, B. L., Myers, C. R., Hurley, T. D., & Benner, S. A. (2014). Hominids adapted to metabolize ethanol long before human-directed fermentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(2), 458–463. <https://doi.org/10.1073/pnas.1404167111>
- Cartmell, L. W., Aufderheide, A. C., Springfield, A., Weems, C., & Arriaza, B. (1991). The Frequency and Antiquity of Prehistoric Coca-Leaf-Chewing Practices in Northern Chile: Radioimmunoassay of a Cocaine Metabolite in Human-Mummy Hair. *Latin American Antiquity*, *2*(03), 260–268. <https://doi.org/10.2307/972171>
- Castner, S. A., & Goldman-Rakic, P. S. (1999). Long-lasting psychotomimetic consequences of repeated low-dose amphetamine exposure in rhesus monkeys. *Neuropsychopharmacology*, *20*(1), 10–28. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(98\)00050-5](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(98)00050-5)
- Childs, E., & de Wit, H. (2009). Amphetamine-Induced Place Preference in Humans. *Biological Psychiatry*, *65*(10), 900–904. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.11.016>
- Childs, E., & de Wit, H. (2013). Contextual conditioning enhances the psychostimulant and incentive properties of d-amphetamine in humans. *Addiction Biology*, *18*(6), 985–992. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2011.00416.x>
- Childs, E., & de Wit, H. (2016). Alcohol-induced place conditioning in moderate social drinkers. *Addiction*, *111*(12), 2157–2165. <https://doi.org/10.1111/add.13540>
- Clarke, C. J. (2018). Neutral Sphingomyelinases in Cancer. In *Advances in Cancer Research* (Vol. 140, p. 97–119). <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2018.04.010>
- Clarke, C. J., Cloessner, E. A., Roddy, P. L., & Hannun, Y. A. (2011). Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2) is the primary neutral sphingomyelinase isoform activated by tumour necrosis factor- α in MCF-7 cells. *Biochemical Journal*, *435*(2), 381–390. <https://doi.org/10.1042/BJ20101752>
- Coe, M. A., Jufer Phipps, R. A., Cone, E. J., & Walsh, S. L. (2018). Bioavailability and Pharmacokinetics of Oral Cocaine in Humans. *Journal of Analytical Toxicology*, *42*(5), 285–292. <https://doi.org/10.1093/jat/bky007>
- Crocq, M. (2007). Historical and cultural aspects of addiction. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *9*(4), 355–361. Recuperado de

<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-clinpsy-021815-093546>

- Cummings, B. S., Pati, S., Sahin, S., Scholpa, N. E., Monian, P., Trinquero, P. M., Clark, J. K., & Wagner, J. J. (2015). Differential effects of cocaine exposure on the abundance of phospholipid species in rat brain and blood. *Drug and Alcohol Dependence*, *152*(5), 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2015.04.009>
- Cunningham, C. L., Ferree, N. K., & Howard, M. A. (2003). Apparatus bias and place conditioning with ethanol in mice. *Psychopharmacology*, *170*(4), 409–422. <https://doi.org/10.1007/s00213-003-1559-y>
- Das, K. R., & Imon, A. H. M. R. (2016). A Brief Review of Tests for Normality. *American Journal of Theoretical and Applied Statistics*, *5*(1), 5–12. <https://doi.org/10.11648/j.ajtas.20160501.12>
- de Castro Leão, A., Duarte Dória Neto, A., & Bernardete Cordeiro de Sousa, M. (2009). New developmental stages for common marmosets (*Callithrix jacchus*) using mass and age variables obtained by K-means algorithm and self-organizing maps (SOM). *Computers in Biology and Medicine*, *39*(10), 853–859. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2009.05.009>
- De Souza Silva, M. A., Mello, E. L., Müller, C. P., Jocham, G., Maior, R. S., Huston, J. P., Tomaz, C., & Barros, M. (2006). The tachykinin NK3receptor antagonist SR142801 blocks the behavioral effects of cocaine in marmoset monkeys. *European Journal of Pharmacology*, *536*(3), 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.03.010>
- Degenhardt, L., Singleton, J., Calabria, B., McLaren, J., Kerr, T., Mehta, S., Kirk, G., & Hall, W. D. (2011). Mortality among cocaine users: A systematic review of cohort studies. *Drug and Alcohol Dependence*, *113*(2–3), 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2010.07.026>
- Duarte, R. B. M., Patrono, E., Borges, A. C., César, A. A. S., Tomaz, C., Ventura, R., Gasbarri, A., Puglisi-Allegra, S., & Barros, M. (2014). Consumption of a highly palatable food induces a lasting place-conditioning memory in marmoset monkeys. *Behavioural Processes*, *107*, 163–166. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2014.08.021>
- Duarte, R. B. M., Patrono, E., Borges, A. C., Tomaz, C., Ventura, R., Gasbarri, A., Puglisi-Allegra, S., & Barros, M. (2015). High versus low fat/sugar food affects the behavioral, but not the cortisol response of marmoset monkeys in a conditioned-place-preference task. *Physiology and Behavior*, *139*, 442–448. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.11.065>
- Dudley, R., & Stephens, D. (2004). The Drunken Monkey Hypothesis. *Natural History*, 40–44.

- Edelmann, B., Bertsch, U., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Perrotta, C., Jakob, M., Adam-Klages, S., Kabelitz, D., & Schütze, S. (2011). Caspase-8 and caspase-7 sequentially mediate proteolytic activation of acid sphingomyelinase in TNF-R1 receptosomes. *The EMBO Journal*, *30*(2), 379–394. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.326>
- Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R. C., Nishijima, M., Raetz, C. R. H., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., Wakelam, M. J. O., & Dennis, E. A. (2009). Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, *50*(Supplement), S9–S14. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800095-JLR200>
- Furuya, H., Shimizu, Y., & Kawamori, T. (2011). Sphingolipids in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, *30*(3–4), 567–576. <https://doi.org/10.1007/s10555-011-9304-1>
- Gault, C. R., Obeid, L. M., & Hannun, Y. A. (2010). An Overview of Sphingolipid Metabolism: From Synthesis to Breakdown. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 29, p. 1–23). https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6741-1_1
- Gochman, S. R., Brown, M. B., & Dominy, N. J. (2016). Alcohol discrimination and preferences in two species of nectar-feeding primate. *Royal Society Open Science*, *3*(7). <https://doi.org/10.1098/rsos.160217>
- Goldstein, R. A., DesLauriers, C., & Burda, A. M. (2009). Cocaine: History, Social Implications, and Toxicity—A Review. *Disease-a-Month*, *55*(1), 6–38. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2008.10.002>
- Goodman, J., & Packard, M. G. (2016). Memory Systems and the Addicted Brain. *Frontiers in Psychiatry*, *7*(FEB), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2016.00024>
- Grassmé, H., Jekle, A., Riehle, A., Schwarz, H., Berger, J., Sandhoff, K., Kolesnick, R., & Gulbins, E. (2001). CD95 Signaling via Ceramide-rich Membrane Rafts. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(23), 20589–20596. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101207200>
- Grzybowski, A. (2008). Cocaine and the Eye: A Historical Overview. *Ophthalmologica*, *222*(5), 296–301. <https://doi.org/10.1159/000140625>
- Gulbins, E., & Li, P. L. (2005). Physiological and pathophysiological aspects of ceramide. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *290*(1), R11–R26. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00416.2005>
- Halmer, R., Walter, S., & Faßbender, K. (2014). Sphingolipids: Important Players in Multiple Sclerosis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *34*(1), 111–118. <https://doi.org/10.1159/000362988>

- Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), 139–150. <https://doi.org/10.1038/nrm2329>
- Henderson, A. R. (2006). Testing experimental data for univariate normality. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 366(1–2), 112–129. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.11.007>
- Herculano-Houzel, S. (2009). The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Frontiers in Human Neuroscience*, 3(November), 1–11. <https://doi.org/10.3389/neuro.09.031.2009>
- Hiller, L. T., Takata, S., & Thompson, B. L. (2015). Conditioned place preference successfully established in typically developing children. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9(July), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00187>
- Hockings, K. J., Bryson-morrison, N., Carvalho, S., Fujisawa, M., Mcgrew, W. C., & Nakamura, M. (2015). Tools to tipple : ethanol ingestion by wild chimpanzees using leaf-sponges Subject Category : Subject Areas : Author for correspondence : *Royal Society Open Science*, 1–6.
- Hofmann, K., Tomiuk, S., Wolff, G., & Stoffel, W. (2000). Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg²⁺-dependent neutral sphingomyelinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(11), 5895–5900. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.11.5895>
- Hopkins, K. D., & Weeks, D. L. (1990). Tests for normality and measures of skewness and kurtosis: their place in research reporting. *Educational and Psychological Measurement*, 50(1), 717–729.
- Hornemann, T., & Worgall, T. S. (2013). Sphingolipids and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 226(1), 16–28. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.08.041>
- Hoshi, Y., Uchida, Y., Tachikawa, M., Inoue, T., Ohtsuki, S., & Terasaki, T. (2013). Quantitative Atlas of Blood–Brain Barrier Transporters, Receptors, and Tight Junction Proteins in Rats and Common Marmoset. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102(9), 3343–3355. <https://doi.org/10.1002/jps.23575>
- Huston, J. P., Kornhuber, J., Mühle, C., Japtok, L., Komorowski, M., Mattern, C., Reichel, M., Gulbins, E., Kleuser, B., Topic, B., De Souza Silva, M. A., & Müller, C. P. (2016). A sphingolipid mechanism for behavioral extinction. *Journal of Neurochemistry*, 137(4), 589–603. <https://doi.org/10.1111/jnc.13537>

- Huston, J. P., Silva, M. A. d. S., Komorowski, M., Schulz, D., & Topic, B. (2013). Animal models of extinction-induced depression: Loss of reward and its consequences. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37(9), 2059–2070. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.02.016>
- Huston, J. P., Silva, M. A. D. S., Topic, B., & Müller, C. P. (2013). What's conditioned in conditioned place preference? *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(3), 162–166. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.01.004>
- Hyman, S. E., Malenka, R. C., & Nestler, E. J. (2006). NEURAL MECHANISMS OF ADDICTION: The Role of Reward-Related Learning and Memory. *Annual Review of Neuroscience*, 29(1), 565–598. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.113009>
- Jiang, L., Gu, H., Lin, Y., Xu, W., Zhu, R., Kong, J., Luo, L., Long, H., Liu, B., Chen, B., Zhao, Y., & Cen, X. (2017). Remodeling of brain lipidome in methamphetamine-sensitized mice. *Toxicology Letters*, 279(April), 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.07.214>
- Kalinichenko, L. S., Gulbins, E., Kornhuber, J., & Müller, C. P. (2018). The role of sphingolipids in psychoactive drug use and addiction. *Journal of Neural Transmission*, 125(4), 651–672. <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1840-1>
- Kalinichenko, L. S., Hammad, L., Reichel, M., Kohl, Z., Gulbins, E., Kornhuber, J., & Müller, C. P. (2019). Acid sphingomyelinase controls dopamine activity and responses to appetitive stimuli in mice. *Brain Research Bulletin*, 146, 310–319. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.01.026>
- Karch, S. B. (1999). Cocaine: History, Use, Abuse. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 92(8), 393–397. <https://doi.org/10.1177/014107689909200803>
- Kashefi, A., Duarte, R. B., Jesus, F. M., Jamali, S., Haghparast, A., & Tomaz, C. (2019). MPH induces a CPP effect in marmoset monkeys. *Behavioural Brain Research*, 1–31.
- Kawai, N., Yasue, M., Banno, T., & Ichinohe, N. (2014). Marmoset monkeys evaluate third-party reciprocity. *Biology Letters*, 10(5), 20140058–20140058. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2014.0058>
- Kobayashi, K., Ishizaki, Y., Kojo, S., & Kikuzaki, H. (2016). Strong Inhibition of Secretory Sphingomyelinase by Catechins, Particularly by (–)-Epicatechin 3-O-Gallate and (–)-3'-O-Methylepigallocatechin 3-O-Gallate. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 62(2), 123–129. <https://doi.org/10.3177/jnsv.62.123>
- Kolesnick, R. N., Goñi, F. M., & Alonso, A. (2000). Compartmentalization of ceramide signaling:

- physical foundations and biological effects. *Journal of Cellular Physiology*, 184(3), 285–300. [https://doi.org/10.1002/1097-4652\(200009\)184:3<285::AID-JCP2>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-4652(200009)184:3<285::AID-JCP2>3.0.CO;2-3)
- Koob, G. F. (2006). The neurobiology of addiction: A neuroadaptational view relevant for diagnosis. *Addiction*, 101(SUPPL. 1), 23–30. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2006.01586.x>
- Koob, G. F., & Moal, M. Le. (1997). Drug Abuse: Hedonic Homeostatic Dysregulation. *Science*, 278(5335), 52–58. <https://doi.org/10.1126/science.278.5335.52>
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 217–238. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.110>
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2016). Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The Lancet Psychiatry*, 3(8), 760–773. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)00104-8)
- Kornhuber, J., Tripal, P., Reichel, M., Mühle, C., Rhein, C, Muehlbacher, M., Groemer, T. W., & Gulbins, E. (2010). Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FIASMA): A Novel Pharmacological Group of Drugs with Broad Clinical Applications. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 26(1), 9–20. <https://doi.org/10.1159/000315101>
- Lahiri, S., & Futerman, A. H. (2007). The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(17), 2270–2284. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7076-0>
- Lee, Y. W., Hennig, B., Fiala, M., Kim, K. S., & Toborek, M. (2001). Cocaine activates redox-regulated transcription factors and induces TNF- α expression in human brain endothelial cells. *Brain Research*, 920(1–2), 125–133. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)03047-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)03047-5)
- Lin, Y., Gu, H., Jiang, L., Xu, W., Liu, C., Li, Y., Qian, X., Li, D., Li, Z., Hu, J., Zhang, H., Guo, W., Zhao, Y., & Cen, X. (2017). Cocaine modifies brain lipidome in mice. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 85(August), 29–44. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.08.004>
- Luessen, D. J., & Chen, R. (2016). Psychostimulants, Brain Membrane Lipids and Dopamine Transmission. *Journal of Biomolecular Research & Therapeutics*, 5(2). <https://doi.org/10.4172/2167-7956.1000143>
- Melamed, J. L., de Jesus, F. M., Aquino, J., Vannuchi, C. R. S., Duarte, R. B. M., Maior, R. S., Tomaz, C., & Barros, M. (2017). Differential modulatory effects of cocaine on marmoset monkey recognition memory. In *Progress in Brain Research* (p. 155–176). <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2017.07.005>

- Melamed, J. L., de Jesus, F. M., Maior, R. S., & Barros, M. (2017). Scopolamine Induces Deficits in Spontaneous Object-Location Recognition and Fear-Learning in Marmoset Monkeys. *Frontiers in Pharmacology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00395>
- Melamed, J. L., De Souza Silva, M. A., Tomaz, C., Müller, C. P., Huston, J. P., & Barros, M. (2013). Sensitization of hypervigilance effects of cocaine can be induced by NK3 receptor activation in marmoset monkeys. *Drug and Alcohol Dependence*, 128(1–2), 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2012.08.020>
- Mello, E. L., Maior, R. S., Carey, R. J., Huston, J. P., Tomaz, C., & Müller, C. P. (2005). Serotonin1A-receptor antagonism blocks psychostimulant properties of diethylpropion in marmosets (*Callithrix penicillata*). *European Journal of Pharmacology*, 511(1), 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.01.037>
- Mencarelli, C., & Martinez–Martinez, P. (2013). Ceramide function in the brain: when a slight tilt is enough. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(2), 181–203. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1038-x>
- Mühle, C., Huttner, H. B., Walter, S., Reichel, M., Canneva, F., Lewczuk, P., Gulbins, E., & Kornhuber, J. (2013). Characterization of Acid Sphingomyelinase Activity in Human Cerebrospinal Fluid. *PLoS ONE*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062912>
- Mühle, C., Weinland, C., Gulbins, E., Lenz, B., & Kornhuber, J. (2018). Peripheral Acid Sphingomyelinase Activity Is Associated with Biomarkers and Phenotypes of Alcohol Use and Dependence in Patients and Healthy Controls. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 4028. <https://doi.org/10.3390/ijms19124028>
- Müller, C. P., Kalinichenko, L. S., Tiesel, J., Witt, M., Stöckl, T., Sprenger, E., Fuchser, J., Beckmann, J., Praetner, M., Huber, S. E., Amato, D., Mühle, C., Büttner, C., Ekici, A. B., Smaga, I., Pomierny-Chamiolo, L., Pomierny, B., Filip, M., Eulenburg, V., Gulbins, E., Lourdasamy, A., Reichel, M., & Kornhuber, J. (2017). Paradoxical antidepressant effects of alcohol are related to acid sphingomyelinase and its control of sphingolipid homeostasis. *Acta Neuropathologica*, 133(3), 463–483. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1658-6>
- Napier, T. C., Herrold, A. A., & De Wit, H. (2013). Using conditioned place preference to identify relapse prevention medications. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37(9), 2081–2086. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.05.002>
- Nassogne, M. C., Lizarraga, C., N’Kuli, F., Van Bambeke, F., Van Binst, R., Wallemacq, P., Tulkens, P. M., Mingeot-Leclercq, M. P., Levade, T., & Courtoy, P. J. (2004). Cocaine

- induces a mixed lysosomal lipidosis in cultured fibroblasts, by inactivation of acid sphingomyelinase and inhibition of phospholipase A1. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 194(2), 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.09.026>
- Nathan, P. E., Conrad, M., & Skinstad, A. H. (2016). History of the Concept of Addiction. *Annual Review of Clinical Psychology*, 12(1), 29–51. <https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-021815-093546>
- Oliveira, T. G., Chan, R. B., Bravo, F. V., Miranda, A., Silva, R. R., Zhou, B., Marques, F., Pinto, V., Cerqueira, J. J., Di Paolo, G., & Sousa, N. (2016). The impact of chronic stress on the rat brain lipidome. *Molecular Psychiatry*, 21(1), 80–88. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.14>
- ONU. (2018). *World Drug Report 2018*. <https://doi.org/10.18356/d29e3f27-en>
- Philipsen, M. H., Phan, N. T. N., Fletcher, J. S., Malmberg, P., & Ewing, A. G. (2018). Mass Spectrometry Imaging Shows Cocaine and Methylphenidate Have Opposite Effects on Major Lipids in Drosophila Brain [Research-article]. *ACS Chemical Neuroscience*, 9(6), 1462–1468. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.8b00046>
- Phillips, K. A., Bales, K. L., Capitanio, J. P., Conley, A., Czoty, P. W., 't Hart, B. A., Hopkins, W. D., Hu, S.-L., Miller, L. A., Nader, M. A., Nathanielsz, P. W., Rogers, J., Shively, C. A., & Voytko, M. Lou. (2014). Why primate models matter. *American Journal of Primatology*, 76(9), 801–827. <https://doi.org/10.1002/ajp.22281>
- Phillips, P. E. M., Stuber, G. D., Heien, M. L. A. V, Wightman, R. M., & Carelli, R. M. (2003). Subsecond dopamine release promotes cocaine seeking. *Nature*, 422(6932), 614–618. <https://doi.org/10.1038/nature01476>
- Pissinatti, A., Muniz, J. A. P. C., Silva, K. S. M., & Andrade, M. C. R. A. (2016). Fascículo 4: primatas não humanos mantidos em instalações de instituições de ensino e pesquisa científica. In *Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica* (p. 1–94).
- Porsolt, R. D. (2013). The usefulness of non-human primates in central nervous system safety pharmacology. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 68(1), 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2013.03.004>
- Qiu, H., Edmunds, T., Baker-Malcolm, J., Karey, K. P., Estes, S., Schwarz, C., Hughes, H., & Van Patten, S. M. (2003). Activation of Human Acid Sphingomyelinase through Modification or Deletion of C-terminal Cysteine. *Journal of Biological Chemistry*, 278(35), 32744–32752. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303022200>

- Rajagopalan, V., Canals, D., Luberto, C., Snider, J., Voelkel-Johnson, C., Obeid, L. M., & Hannun, Y. A. (2015). Critical determinants of mitochondria-associated neutral sphingomyelinase (MA-nSMase) for mitochondrial localization. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1850(4), 628–639. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.11.019>
- Rankin, C. H., Abrams, T., Barry, R. J., Bhatnagar, S., Clayton, D. F., Colombo, J., Coppola, G., Geyer, M. A., Glanzman, D. L., Marsland, S., McSweeney, F. K., Wilson, D. A., Wu, C. F., & Thompson, R. F. (2009). Habituation revisited: An updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92(2), 135–138. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.09.012>
- Razali, N. M., & Wah, Y. B. (2011). Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics*, 2(1), 21–33.
- Reichel, M., Beck, J., Mühle, C., Rotter, A., Bleich, S., Gulbins, E., & Kornhuber, J. (2011). Activity of secretory sphingomyelinase is increased in plasma of alcohol-dependent patients. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 35(10), 1852–1859. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2011.01529.x>
- Reichel, M., Greiner, E., Richter-Schmidinger, T., Yedibela, Ö., Tripal, P., Jacobi, A., Bleich, S., Gulbins, E., & Kornhuber, J. (2010). Increased acid sphingomyelinase activity in peripheral blood cells of acutely intoxicated patients with alcohol dependence. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 34(1), 46–50. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2009.01064.x>
- Riddle, E. L., Rau, K. S., Topham, M. K., Hanson, G. R., & Fleckenstein, A. E. (2003). Ceramide-induced alterations in dopamine transporter function. *European Journal of Pharmacology*, 458(1–2), 31–36. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)02727-9](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)02727-9)
- Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (2003). Addiction. *Annual Review of Psychology*, 54(1), 25–53. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.54.101601.145237>
- Rylands, A. B., Coimbra-Filho, A. F., & Mittermeier, R. A. (2009). The Systematics and Distributions of the Marmosets (*Callithrix*, *Callibella*, *Cebuella*, and *Mico*) and *Callimico* (*Callimico*) (*Callitrichidae*, *Primates*). In S. M. Ford, L. M. Porter, & L. C. Davis (Orgs.), *The Smallest Anthropoids* (p. 25–61). https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0293-1_2
- Sanchis-Segura, C., & Spanagel, R. (2006). Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addiction Biology*, 11(1), 2–38.

<https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2006.00012.x>

- Sasaki, E. (2015). Prospects for genetically modified non-human primate models, including the common marmoset. *Neuroscience Research*, 93, 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2015.01.011>
- Sasson, J. M., & Hill, C. (1994). The Blood of Grapes Viticulture and Intoxication in the Hebrew Bible. In *Drinking in Ancient Societies: History and Culture of Drinks in the Ancient Near East* (p. 399–419). Recuperado de https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1045663500008506/type/journal_article
- Sawai, H., Domae, N., Nagan, N., & Hannun, Y. A. (1999). Function of the cloned putative neutral sphingomyelinase as lyso- platelet activating factor-phospholipase C. *Journal of Biological Chemistry*, 274(53), 38131–38139. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.53.38131>
- Schuchman, E. H. (2010). Acid sphingomyelinase, cell membranes and human disease: Lessons from Niemann-Pick disease. *FEBS Letters*, 584(9), 1895–1900. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.11.083>
- Schultz, W. (2016). Dopamine reward prediction error coding. *Dialogues in clinical neuroscience*, 18(1), 23–32. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27069377>
- Schultz, W., Dayan, P., & Montague, P. R. (1997). A Neural Substrate of Prediction and Reward. *Science*, 275(5306), 1593–1599. <https://doi.org/10.1126/science.275.5306.1593>
- Seymour, C. M., & Wagner, J. J. (2008). Simultaneous expression of cocaine-induced behavioral sensitization and conditioned place preference in individual rats. *Brain Research*, 1213, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.03.054>
- Shubhra Chakrabarti, S., Bir, A., Poddar, J., Sinha, M., Ganguly, A., & Chakrabarti, S. (2016). Ceramide and Sphingosine-1-Phosphate in Cell Death Pathways: Relevance to the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*, 13(11), 1232–1248. <https://doi.org/10.2174/1567205013666160603004239>
- Sofuoglu, M., DeVito, E. E., Waters, A. J., & Carroll, K. M. (2013). Cognitive enhancement as a treatment for drug addictions. *Neuropharmacology*, 64(1), 452–463. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.06.021>
- Steketee, J. D., & Kalivas, P. W. (2011). Drug Wanting: Behavioral Sensitization and Relapse to Drug-Seeking Behavior. *Pharmacological Reviews*, 63(2), 348–365.

<https://doi.org/10.1124/pr.109.001933>

- Stevenson, M. F., & Poole, T. B. (1976). An ethogram of the common marmoset (*Callithrix jacchus jacchus*): general behavioural repertoire. *Animal behaviour*, 24(2), 428–451. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/820223>
- Stevenson, M. F., & Rylands, A. B. (1988). The marmosets, genus *Callithrix*. In *Ecology and behavior of neotropical primates* (p. 131–222).
- Tabatadze, N., Savonenko, A., Song, H., Bandaru, V. V. R., Chu, M., & Haughey, N. J. (2010). Inhibition of neutral sphingomyelinase-2 perturbs brain sphingolipid balance and spatial memory in mice. *Journal of Neuroscience Research*, 88(13), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/jnr.22438>
- Takahashi, D. Y., Liao, D. A., & Ghazanfar, A. A. (2017). Vocal Learning via Social Reinforcement by Infant Marmoset Monkeys. *Current Biology*, 27(12), 1844-1852.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.004>
- Tardif, S. D., Mansfield, K. G., Ratnam, R., Ross, C. N., & Ziegler, T. E. (2011). The Marmoset as a Model of Aging and Age-Related Diseases. *ILAR Journal*, 52(1), 54–65. <https://doi.org/10.1093/ilar.52.1.54>
- Tardif, S. D., Smucny, D. A., Abbott, D. H., Mansfield, K., Schultz-Darken, N., & Yamamoto, M. E. (2003). Reproduction in captive common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Comparative medicine*, 53(4), 364–368. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14524412>
- Tomiuk, S., Hofmann, K., Nix, M., Zumbansen, M., & Stoffel, W. (1998). Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: Functions in sphingolipid signaling? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(7), 3638–3643. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.3638>
- Tzschentke, T. M. (2007). Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: Update of the last decade. *Addiction Biology*, 12(3–4), 227–462. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2007.00070.x>
- Ueda, A., Shima, S., Murate, K., Kikuchi, K., Nagao, R., Maeda, T., Muto, E., Niimi, Y., Mizutani, Y., & Mutoh, T. (2018). Anti-GM1 ganglioside antibodies modulate membrane-associated sphingomyelin metabolism by altering neutral sphingomyelinase activity. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 89(January), 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.03.012>
- Uno, Y., Uehara, S., & Yamazaki, H. (2016). Utility of non-human primates in drug

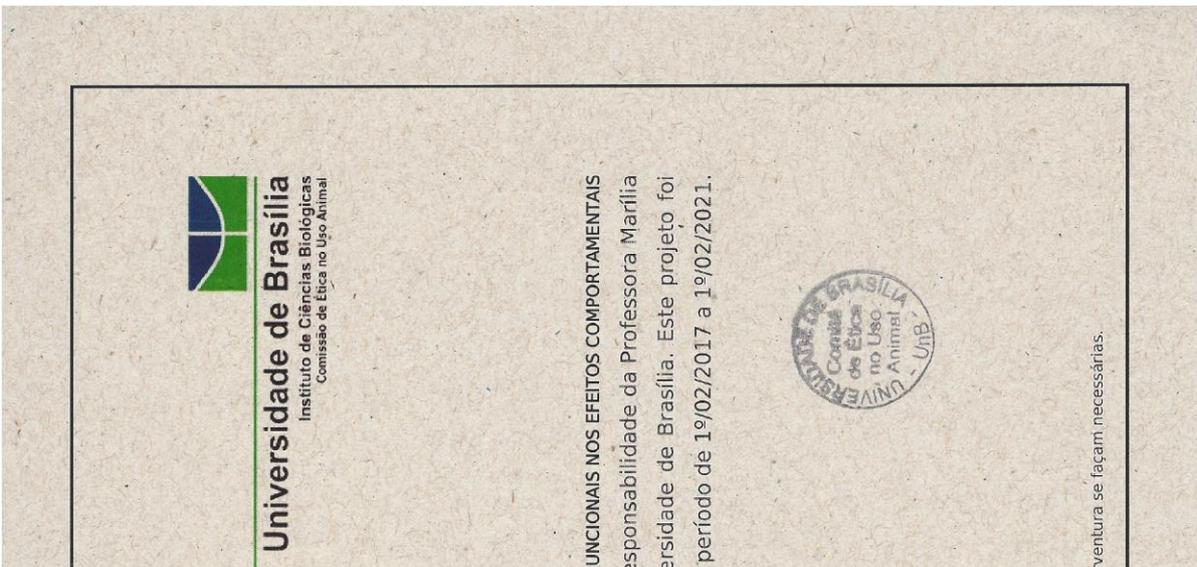
- development: Comparison of non-human primate and human drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes. *Biochemical Pharmacology*, 121, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.06.008>
- Valdomero, A., Hansen, C., de Burgos, N. G., Cuadra, G. R., & Orsingher, O. A. (2010). GM1 ganglioside enhances the rewarding properties of cocaine in rats. *European Journal of Pharmacology*, 630(1–3), 79–83. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.12.029>
- Valdomero, A., Perondi, M. C., Orsingher, O. A., & Cuadra, G. R. (2015). Exogenous GM1 ganglioside increases accumbal BDNF levels in rats. *Behavioural Brain Research*, 278, 303–306. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.10.013>
- Van Dyke, C., Barash, P. G., Jatlow, P., & Byck, R. (1976). Cocaine: Plasma concentrations after intranasal application in man. *Science*, 191(4229), 859–861. <https://doi.org/10.1126/science.56036>
- van Echten-Deckert, G., & Alam, S. (2018). Sphingolipid metabolism – an ambiguous regulator of autophagy in the brain. *Biological Chemistry*, 399(8), 837–850. <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0237>
- Van Vliet, S. A. M., Jongsma, M. J., Vanwersch, R. A. P., Olivier, B., & Philippens, I. H. C. H. M. (2006). Behavioral effects of modafinil in marmoset monkeys. *Psychopharmacology*, 185(4), 433–440. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0340-4>
- Vanderschuren, L. J. M. J., & Pierce, R. C. (2010). Sensitization Processes in Drug Addiction. In *Current topics in behavioral neurosciences* (Vol. 3, p. 179–195). https://doi.org/10.1007/7854_2009_21
- Vezina, P., & Leyton, M. (2009). Conditioned cues and the expression of stimulant sensitization in animals and humans. *Neuropharmacology*, 56(SUPPL. 1), 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.06.070>
- Volkow, N. D., Koob, G. F., & McLellan, A. T. (2016). Neurobiologic Advances from the Brain Disease Model of Addiction. *New England Journal of Medicine*, 374(4), 363–371. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1511480>
- Wang, J., Wu, X., Li, C., Wei, J., Jiang, H., Liu, C., Yu, C., Carlson, S., Hu, X., Ma, H., Duan, W., & Ma, Y. (2012). Effect of morphine on conditioned place preference in rhesus monkeys. *Addiction Biology*, 17(3), 539–546. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2010.00289.x>
- Weerts, E. M., Fantegrossi, W. E., & Goodwin, A. K. (2007). The Value of Nonhuman Primates in Drug Abuse Research. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 15(4), 309–

327. <https://doi.org/10.1037/1064-1297.15.4.309>

- Wijesinghe, D. S., Massiello, A., Subramanian, P., Szulc, Z., Bielawska, A., & Chalfant, C. E. (2005). Substrate specificity of human ceramide kinase. *Journal of Lipid Research*, *46*(12), 2706–2716. <https://doi.org/10.1194/jlr.m500313-jlr200>
- Williamson, E. A., & Feistner, A. T. C. (2011). Habituating primates: Processes, techniques, variables and ethics. *Field and Laboratory Methods in Primatology: A Practical Guide, Second Edition*, 33–50. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511921643.004>
- Willuhn, I., Burgeno, L. M., Everitt, B. J., & Phillips, P. E. M. (2012). Hierarchical recruitment of phasic dopamine signaling in the striatum during the progression of cocaine use. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(50), 20703–20708. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213460109>
- Wilson, A. S., Brown, E. L., Villa, C., Lynnerup, N., Healey, A., Ceruti, M. C., Reinhard, J., Previgliano, C. H., Araoz, F. A., Gonzalez Diez, J., & Taylor, T. (2013). Archaeological, radiological, and biological evidence offer insight into Inca child sacrifice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(33), 13322–13327. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305117110>
- Wilson, A. S., Taylor, T., Ceruti, M. C., Chavez, J. A., Reinhard, J., Grimes, V., Meier-Augenstein, W., Cartmell, L., Stern, B., Richards, M. P., Worobey, M., Barnes, I., & Gilbert, M. T. P. (2007). Stable isotope and DNA evidence for ritual sequences in Inca child sacrifice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(42), 16456–16461. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704276104>
- Wise, R. A. (2008). Dopamine and reward: The anhedonia hypothesis 30 years on. *Neurotoxicity Research*, *14*(2–3), 169–183. <https://doi.org/10.1007/BF03033808>
- Won, J. H., Kim, S. K., Shin, I. C., Ha, H. C., Jang, J. M., Back, M. J., & Kim, D. K. (2018). Dopamine transporter trafficking is regulated by neutral sphingomyelinase 2/ceramide kinase. *Cellular Signalling*, *44*(May 2017), 171–187. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.01.006>
- Wood, S., Sage, J. R., Shuman, T., & Anagnostaras, S. G. (2013). Psychostimulants and Cognition: A Continuum of Behavioral and Cognitive Activation. *Pharmacological Reviews*, *66*(1), 193–221. <https://doi.org/10.1124/pr.112.007054>
- World Health Organisation, & Management of Substance Abuse Team. (2018). Global status report on alcohol and health 2018. In *World Health Organisation*. Geneva.
- Worley, K. C., Warren, W. C., Rogers, J., Locke, D., Muzny, D. M., Mardis, E. R., Weinstock,

- G. M., Tardif, S. D., Aagaard, K. M., Archidiacono, N., Rayan, N. A., Batzer, M. A., Beal, K., Brejova, B., Capozzi, O., Capuano, S. B., Casola, C., Chandrabose, M. M., Cree, A., Dao, M. D., de Jong, P. J., del Rosario, R. C.-H., Delehaunty, K. D., Dinh, H. H., Eichler, E. E., Fitzgerald, S., Flicek, P., Fontenot, C. C., Fowler, R. G., Fronick, C., Fulton, L. A., Fulton, R. S., Gabisi, R. A., Gerlach, D., Graves, T. A., Gunaratne, P. H., Hahn, M. W., Haig, D., Han, Y., Harris, R. A., Herrero, J., Hillier, L. W., Hubley, R., Hughes, J. F., Hume, J., Jhangiani, S. N., Jorde, L. B., Joshi, V., Karakor, E., Konkel, M. K., Kosiol, C., Kovar, C. L., Kriventseva, E. V., Lee, S. L., Lewis, L. R., Liu, Y., Lopez, J., Lopez-Otin, C., Lorente-Galdos, B., Mansfield, K. G., Marques-Bonet, T., Minx, P., Misceo, D., Moncrieff, J. S., Morgan, M. B., Nazareth, L. V, Newsham, I., Nguyen, N. B., Okwuonu, G. O., Prabhakar, S., Perales, L., Pu, L.-L., Puente, X. S., Quesada, V., Ranck, M. C., Raney, B. J., Raveendran, M., Deiros, D. R., Rocchi, M., Rodriguez, D., Ross, C., Ruffier, M., Ruiz, S. J., Sajjadian, S., Santibanez, J., Schrider, D. R., Searle, S., Skaletsky, H., Soibam, B., Smit, A. F. A., Tennakoon, J. B., Tomaska, L., Ullmer, B., Vejnar, C. E., Ventura, M., Vilella, A. J., Vinar, T., Vogel, J.-H., Walker, J. A., Wang, Q., Warner, C. M., Wildman, D. E., Witherspoon, D. J., Wright, R. A., Wu, Y., Xiao, W., Xing, J., Zdobnov, E. M., Zhu, B., Gibbs, R. A., & Wilson, R. K. (2014). The common marmoset genome provides insight into primate biology and evolution. *Nature Genetics*, *46*(8), 850–857. <https://doi.org/10.1038/ng.3042>
- Yasue, M., Nakagami, A., Nakagaki, K., Ichinohe, N., & Kawai, N. (2018). Inequity aversion is observed in common marmosets but not in marmoset models of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Behavioural Brain Research*, *343*(September 2017), 36–40. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.01.013>
- Zeidan, Y. H., & Hannun, Y. A. (2007). Activation of Acid Sphingomyelinase by Protein Kinase C δ -mediated Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(15), 11549–11561. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609424200>
- Zeidan, Y. H., & Hannun, Y. A. (2010). The acid sphingomyelinase/ceramide pathway: biomedical significance and mechanisms of regulation. *Current molecular medicine*, *10*(5), 454–466. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20540705>

9. Anexo



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

FUNCIONAIS NOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS
responsabilidade da Professora Marília
Universidade de Brasília. Este projeto foi
período de 1º/02/2017 a 1º/02/2021.



eventura se façam necessárias.

10. Apêndices

Tabela 5. Valor do teste de normalidade Shapiro-Wilk e valor de significância para tempo gasto em vigilância e em locomoção nas duas primeiras e duas últimas sessões do condicionamento.

Comportamento	Sessão	Grupo	W	p
Vigilância	1	salina	0,9629	0,8421
		cocaína	0,8744	0,2443
	2	salina	0,9127	0,4546
		cocaína	0,9806	0,9544
	11	salina	0,6543	0,002
		cocaína	0,9504	0,7431

	12	salina	0,9881	0,9842
		cocaína	0,8851	0,2933
Locomoção	1	salina	0,9777	0,9393
		cocaína	0,9239	0,5342
	2	salina	0,9655	0,8612
		cocaína	0,9014	0,3825
	11	salina	0,8837	0,2866
		cocaína	0,8441	0,1409
	12	salina	0,8512	0,1609
		cocaína	0,9152	0,4716

Tabela 6. Valor do teste de normalidade Shapiro-Wilk e valor de significância para dados apresentados da atividade enzimática das enzimas esfingomielinase ácida (SMA) e neutra (SMN).

Atividade				
da	Sessão	Grupo	W	p
enzima				
SMA	pós-H2	salina	0,904	0,3981
		cocaína	0,9511	0,7494
	pré-T1	salina	0,6739	0,0032
		cocaína	0,9775	0,9387
	pré-T2	salina	0,9698	0,8912
		cocaína	0,8706	0,2285

SMN	pós-H2	salina	0,8178	0,0844
		cocaína	0,9147	0,468
	pré-T1	salina	0,9101	0,4368
		cocaína	0,9053	0,4064
	pré-T2	salina	0,8868	0,3018
		cocaína	0,9358	0,6258

Tabela 7. Valor do teste de normalidade Shapiro-Wilk e valor de significância para o tempo de permanência no compartimento condicionado nas sessões H2, T1 e T2.

Dado	Sessão	Grupo	W	p
CPP	H2	salina	0,9785	0,9439
		cocaína	0,9523	0,759
	T1	salina	0,9008	0,3787
		cocaína	0,9106	0,4406
	T2	salina	0,9252	0,5436
		cocaína	0,8119	0,075

Tabela 8. Valor do teste de normalidade Shapiro-Wilk e valor de significância para o tempo de locomoção, tempo de vigilância, frequência de exploração e o tempo nos compartimentos branco e listrado nas sessões de habituação.

Comportamento	Sessão	W	p
Locomoção	H1	0,9522	0,6693
	H2	0,8974	0,1469
Exploração	H1	0,9319	0,4012
	H2	0,9735	0,9437

Vigilância

H1 0,9352 0,4389

H2 0,9591 0,7703

Tempo gasto no compartimento branco

H1 0,9658 0,8627

H2 0,9801 0,9842

Tempo gasto no compartimento listrado

H1 0,974 0,9481

H2 0,9728 0,9379

Tabela 9. Valor do teste de normalidade Shapiro-Wilk e valor de significância para o tempo de locomoção, tempo de vigilância, frequência de exploração nas sessões H2, T1 e T2.

Comportamento	Sessão	Grupo	W	p
Locomoção				
	H2	salina	0,8977	0,3606
		cocaína	0,9025	0,389
	T1	salina	0,8848	0,292
		cocaína	0,9114	0,4459
	T2	salina	0,9376	0,64

		cocaína	0,8441	0,1408
Exploração				
	H2	salina	0,7452	0,0179
		cocaína	0,9227	0,5247
	T1	salina	0,943	0,6831
		cocaína	0,9459	0,7072
	T2	salina	0,9433	0,6862
		cocaína	0,9129	0,4558
Vigilância				
	H2	salina	0,9376	0,6401
		cocaína	0,8886	0,311
	T1	salina	0,7943	0,0522
		cocaína	0,9583	0,8066
	T2	salina	0,9056	0,4079
		cocaína	0,9924	0,9943
