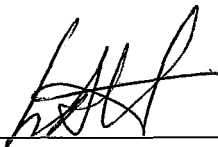


UM MODELO MATEMÁTICO DOS MECANISMOS  
CELULARES DA TOLERÂNCIA E DEPENDÊNCIA EM  
MORFINA

Luiz Otávio de Azevedo

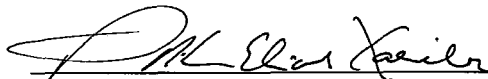
TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS  
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM ENGENHARIA  
DE SISTEMAS E COMPUTAÇÃO.

Aprovada por:



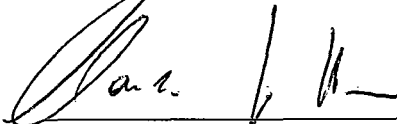
---

Prof. Luis Alfredo Vidal Carvalho, D.Sc.  
(Presidente)



---

Prof. Adilson Elias Xavier, D.Sc.



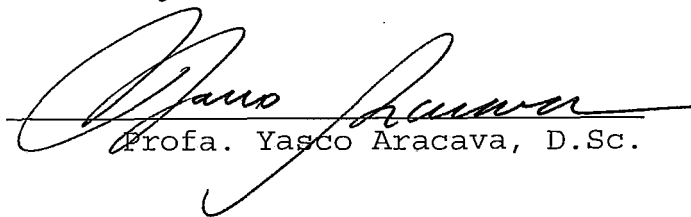
---

Prof. Claudio Struchiner, Ph.D.



---

Prof. Luiz Adauto Pessoa, Ph.D.



---

Prof. Yasco Aracava, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL  
MARÇO DE 1996

AZEVEDO, LUIZ OTAVIO DE

Um Modelo Matemático dos Mecanismos Celulares da Tolerância e Dependência em Morfina.

(Rio de Janeiro) 1996.

VIII, 165 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ, D.Sc., Engenharia e Sistemas e Computação, 1996)

Tese - UNIVERSIDADE Federal do Rio de Janeiro, COPPE

1. Modelagem Matemática em Neurobiologia. 2. Morfina. 3. Locus Coeruleus.

I. COPPE/UFRJ      II. Título (Série).

*À Sandra, Caca e Tavinho*

## AGRADECIMENTOS

Sou grato a todos, que direta ou indiretamente, colaboraram para a execução deste trabalho. No entanto, devido a uma participação mais direta sou especialmente grato :

Ao Prof. Dr. Luis Alfredo Vidal Carvalho, meu orientador, que me proporcionou uma orientação amiga, profícua e ininterrupta, conduzindo-me na execução do presente trabalho,

Ao Dr. Euclides Ayres de Castilho, pela amizade e incentivo durante todo o desenvolvimento deste trabalho,

Aos amigos do Departamento de Informações para a Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, pela acolhida e incentivo a mim dedicados,

A Antonia Cinira Melo Diogo, pelo incentivo e pela ajuda fundamental na fase final deste trabalho,

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Sistemas e Computação da UFRJ, pelo apoio e facilidades concedidas para a execução deste trabalho,

e finalmente a você Sandra, que muito mais que esposa, foi amiga e companheira em todos os momentos, e sem você nada teria sido possível ...

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

## UM MODELO MATEMÁTICO DOS MECANISMOS CELULARES DA TOLERÂNCIA E DEPENDÊNCIA EM MORFINA.

*Luiz Otávio de Azevedo*

MARÇO, 1996

Orientador : Prof. Luis Alfredo Vidal Carvalho

Programa : Engenharia de Sistemas e Computação

O Locus Coeruleus (LC) é o principal núcleo cerebral noradrenérgico localizado bilateralmente na superfície do quarto ventrículo na ponte rostral e formado por aproximadamente trinta mil neurônios.

Os seus neurônios quando submetidos a sucessivas doses de morfina desenvolvem tolerância passando para o estado crônico do vício como resultado das alterações ocorridas nas concentrações de diversos mensageiros intracelulares e na expressão de alguns genes.

Embora os efeitos eletrofisiológicos da morfina no LC sejam bem estabelecidos, alguns dos mecanismos celulares envolvidos na tolerância e dependência em morfina não são totalmente conhecidos. Nesta tese é proposto um modelo matemático que simula a ação da morfina num neurônio do LC. A hipótese fundamental do modelo é que apenas o aumento na expressão gênica de uma proteína é suficiente para promover as alterações necessárias ao desenvolvimento de tolerância e estabelecimento da dependência.

As simulações utilizando o modelo proposto mostram resultados que permitem comprovar a suficiência da hipótese da alteração na expressão gênica de apenas uma proteína para a obtenção do estado crônico de dependência.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.).

**A MATHEMATICAL MODEL FOR THE CELLULAR MECHANISMS  
OF MORPHINE TOLERANCE AND DEPENDENCE.**

*Luiz Otavio de Azevedo*

Thesis Supervisor : Luis Alfredo Vidal Carvalho

Department : Systems Engineering and Computer Science

The *Locus Coeruleus* (LC) is the major noradrenergic nucleus with approximately 30.000 neurons located on the floor of the fourth ventricle in the rostral pons.

LC neurons submitted to acute exposition to morphine develops and reaches from acute to chronic addiction, because the alteration in concentration of intracellular messengers and in genetic expression of some proteins.

Although the main eletrophysiological effects of opiates in the LC are well-established, some of cellular mechanisms of morphine tolerance and dependence have required further researches.

This work brings results related both to a mathematical model who simulate the effects of morphine in a neuron from LC and to the hypothesis that only the increase on genetic expression of a protein is sufficient to allow the neuron to develop tolerance and to reach from acute to chronic addiction.

Using the model many simulations was done and these shows interesting results who to permit infer that the hypothesis proposed is sufficient to neuron to attain the chronic dependence.

# ÍNDICE

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO

I.1. - <i>UMA VISÃO HISTÓRICA</i> .....	1
I.2 - <i>OBJETIVOS</i> .....	13
I.3 - <i>ORGANIZAÇÃO DO TEXTO</i> .....	15

## CAPÍTULO II

### OS MECANISMOS CELULARES DA DEPENDÊNCIA EM MORFINA

II.1 - <i>O Locus Coeruleus</i> .....	19
II.2 - <i>A Interação Droga-Receptor</i> .....	22
II.3 - <i>A Interação Receptor Opióide - Mensageiros Intracelulares</i> .....	28
II.4 - <i>A Fosforilação proteica</i> .....	35
II.5 - <i>Expressão gênica</i> .....	41
II.6 - <i>Ação aguda da morfina em neurônios do Locus Coeruleus</i> .....	48
II.7 - <i>Ação crônica da morfina em neurônios do Locus Coeruleus</i> .....	60
II.8 - <i>Propriedades da membrana dos neurônios do Locus Coeruleus</i> .....	68

### CAPÍTULO III

III.1. <i>Formalização Matemática</i> .....	71
III.2. <i>A Membrana Celular</i> .....	72
III.3. <i>Os Mensageiros Intracelulares</i> .....	83
III.4. <i>A Programação Computacional</i> .....	99

### CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO DAS SIMULAÇÕES UTILIZANDO O MODELO PROPOSTO.....	102
CONCLUSÕES .....	137
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	140
APÊNDICE .....	161



# CAPÍTULO I

## INTRODUÇÃO

### I.1. - *UMA VISÃO HISTÓRICA*

No decorrer dos séculos, o desenvolvimento da ciência e da tecnologia têm permitido um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na comunicação química do cérebro humano. Os gregos, influenciados por sua capacidade de construir aquedutos, pensavam que os processos cerebrais ocorriam em termos do fluxo dos fluídos corpóreos. No século XVII, quando os autômatos eram moda, o filósofo René Descartes comparou o cérebro, em funcionamento a uma máquina complexa constituída por engrenagens.

Já no século XIX, a ênfase foi nas conexões físicas entre os componentes do cérebro, um enfoque estimulado pela fascinação contemporânea com as ferrovias. Atualmente, como reflexo da influência que o computador exerce em nossa sociedade, grupos de pesquisa em áreas de interesse diversas têm tentado entender o funcionamento do cérebro humano se utilizando de simulações computacionais (RESTAK, 1993).

A despeito do imenso progresso obtido com os sofisticados recursos tecnológicos disponíveis devemos reconhecer que as diversas áreas de pesquisas em neurologia humana ainda se defrontam com a complexidade e unicidade do cérebro humano. Um dos critérios científicos que mais tem produzido resultados animadores na elucidação do funcionamento do cérebro humano é o estudo da relação entre neurotransmissores e seus receptores. Um neurônio individual pode responder a neurotransmissores diversos, ao contrário do que se acreditava, possibilitando uma versatilidade de resposta, ao nível molecular, que forma a base da complexidade comportamental da espécie humana (GANONG, 1993).

As drogas, o álcool, o café e a nicotina - entre outros - podem alterar as relações entre os neurotransmissores e seus receptores e todas estas substâncias, lícitas ou ilícitas, naturais ou sintéticas, têm se tornado foco de estudos por diversos grupos de pesquisa (RESTAK, 1993). Quando um indivíduo consome algum agente farmacológico, como uma droga de abuso, alguns tipos de neurônios e núcleos cerebrais mostram a propriedade de mudança, de maneira aguda ou mesmo crônica, do seu comportamento regular. Embora uma mudança de curta duração, também chamada aguda, possa ocorrer em resposta à administração de uma droga de abuso, algumas das alterações

na função cerebral, associadas com o vício, ocorrem gradualmente no tempo, em resposta a exposição prolongada às drogas.

Aparentemente estas mudanças agudas não deveriam ser importantes para as mudanças crônicas - aquelas de longa duração - que via de regra ocorrem quando o consumo da droga de abuso persiste por um período maior de tempo. Para que isto pudesse ocorrer seria necessário que as células, após submetidas a uma dose da droga, fossem capazes de mostrar um comportamento semelhante àquele apresentado antes de terem sido postas em contato com a droga. Porém tem sido observado que as células, sob a influência de uma droga, sofrem distúrbios em todos os seus passos metabólicos e que tentam compensar o efeito agudo produzindo mudanças no sentido contrário para recuperar a sua homeostase (NESTLER, 1992).

No decorrer do consumo continuado de uma droga de abuso são observadas mudanças que se desenvolvem gradualmente nas células, levando o indivíduo a se tornar um viciado crônico. Estas mudanças podem persistir por um longo tempo mesmo após o término da administração crônica da droga (NESTLER *et al.*, 1993c). Essas mudanças adaptativas são descritas em termos de tolerância, sensitização, dependência e vício. De acordo com NESTLER (1992a) o fenômeno da tolerância

se desenvolve como consequência do desbalanceamento produzido na célula por sua reação em compensar a sua homeostase e se traduz pela necessidade do aumento da dose da droga para produzir o mesmo efeito observado anteriormente. Já a sensibilização é definida como a crescente potencialização do efeito da droga com a manutenção constante da quantidade das doses de droga consumida (HARRIS & WILLIAMS,1991). Segundo NESTLER *et al.*, (1993b), após a tolerância ser estabelecida a ausência da droga pode produzir sintomas físicos e psicológicos desagradáveis que o consumidor tenta evitar se mantendo em constante contato com a droga de abuso até se tornar dependente. Desta forma, os autores citam que a dependência é definida, portanto, como a necessidade à exposição constante à droga de abuso para evitar a chamada crise de abstinência, caracterizada por sintomas físicos e psicológicos adversos.

Já a distinção tradicional entre dependência física e psicológica é artificial, porque ambas são mediadas pelo cérebro e possivelmente por um mesmo mecanismo neuronal (NESTLER *et al.*, 1993c). O vício é um termo associado de maneira clássica à síndrome de abstinência, porém não pode ser caracterizado nem pela tolerância nem pela dependência, visto que algumas drogas que não produzem o vício podem induzir a

severa crise de abstinência e outras, com conhecido potencial abusivo, não causam sintomas a todos os consumidores quando não mais consumidas (GOLDSTEIN, 1989). A definição clínica para vício mais aceita é o uso compulsivo de uma droga independente das conseqüências nocivas, que é presumivelmente devida a mudanças adaptativas que surgem em áreas cerebrais específicas (NESTLER *et al.*, 1993b).

Uma droga capaz de levar rapidamente um indivíduo ao vício é o ópio. Ele é um dos mais antigos medicamentos utilizados pelo homem por sua eficácia em aliviar a dor e a disenteria, mas vem sendo usado ao longo dos séculos sem que haja um perfeito entendimento do seu mecanismo de ação. Da mesma forma, os seus efeitos psicológicos são conhecidos desde os primórdios da raça humana visto que no século III A.C. Theophrastus já fazia referência à papoula de onde o ópio é extraído (JAFFE & MARTIN, 1985). Segundo os autores a extração é feita através da secagem do exsudado leitoso contido nas cápsulas das sementes imaturas da papoula, *Papaver somniferum*, formando uma massa com consistência de goma que em seguida é desidratada e pulverizada, obtendo-se assim o ópio utilizável em pó. O ópio é composto por mais de vinte alcalóides, porém apenas alguns - a morfina, a codeína e a papaverina - tem utilidade clínica. O principal ingrediente

ativo do ópio é o alcalóide morfina, que é um analgésico potente mas seu uso é limitado pelos efeitos colaterais, principalmente a dependência física, a depressão respiratória e a constipação (REES & HUNTER, 1990). Segundo JAFFE & MARTIN (1985) o isolamento e a purificação da morfina foram feitos por Sertürner em 1806 e o nome é uma homenagem a Morfeu, o deus grego dos sonhos. A invenção da agulha hipodérmica e o uso parenteral da morfina levaram à utilização compulsiva da droga. A utilização de opiáceos foi agravada pela imigração de trabalhadores chineses, para os Estados Unidos, que fumavam ópio e por seu uso, em larga escala, entre os soldados feridos na Guerra Civil e pela ilimitada oferta do ópio, que prevaleceu até o início deste século. O termo opióide vem sendo utilizado para designar todas as drogas, naturais ou sintéticas, dotadas de efeitos semelhantes aos da morfina, em substituição à opiáceo que define as drogas derivadas do ópio, tais como a morfina e a codeína (JOHNSON & FLEMING, 1989). Segundo estes autores, a partir do problema do vício em opióides os pesquisadores se empenharam em produzir compostos capazes de antagonizar seus efeitos e, em 1951, Echenhoff e colaboradores utilizaram a nalorfina como antídoto ao envenenamento pela morfina. As pesquisas subsequentes permitiram que novas drogas fossem desenvolvidas para a

utilização clínica, além da descoberta dos receptores, a nível celular, para os opióides.

A hipótese da existência de receptores específicos para opióides no sistema nervoso central de animais e humanos surgiu dos estudos farmacológicos que tentavam sintetizar drogas analgésicas que não produzissem vício. Daí o postulado sugerindo que para estas drogas produzirem o seu efeito deveriam existir sítios altamente específicos, os chamados receptores, onde elas se fixariam para disparar uma série de reações que resultariam na resposta observada. Os experimentos bioquímicos que permitiram a comprovação da validade desta hipótese só ocorreram na década de 70 quando pesquisadores como Simon e colaboradores (SIMON *et al.*, 1973) relataram, em células nervosas de mamíferos, sítios de ligação que hoje sabe-se serem os chamados receptores opióides (SIMON & HILLER, 1989). A existência dos receptores opióides sugeriram a presença de uma sistema opióide interno que foi realmente confirmado quando em 1975 Hughes e colaboradores encontraram atividade opióide em extratos aquosos de cérebro de porco (JAFFE & MARTIN, 1985). Os dois peptídeos opióides descobertos foram chamados de Leu-enkefalina e Met-enkefalina e mais tarde, por sugestão de Eric J. Simon, qualquer substância endógena com atividade opióide

passou a ser chamada de endorfina, uma contração dos termos endógeno e morfina. A hipótese de existência de tipos distintos de receptores opióides conduziu à pesquisas neste sentido e a primeira evidência de receptores múltiplos surgiu com as experiências de MARTIN et al.(1976) que postularam a ocorrência de pelo menos três tipos de receptores. Uma seqüência de experimentos utilizando drogas distintas estabeleceu a existência de receptores opióides específicos chamados originalmente  $\mu$ , para aqueles que tinham afinidade com a morfina;  $\kappa$ , para aqueles com afinidade com cetociclazocina e  $\sigma$  para aqueles que se associavam a N-alilnormetazocina. No ano seguinte, LORD et al.(1977) evidenciaram a existência de outro receptor que eles chamaram de  $\delta$ . Recentemente ROTHMAN (1992) relatou evidências da existência de peptídeos anti-opióide que atenuam a ação das endorfinas, o que aumenta a complexidade do sistema opióide endógeno.

O termo opióide é aplicado para qualquer substância que produza seus efeitos biológicos através da interação com qualquer um dos três tipos de receptores opióides ( $\mu$ ,  $\kappa$  ou  $\delta$ ) cuja ação são revertidas pelo naloxone. Já o termo opiato é utilizado para definir todo opióide cuja estrutura e propriedades biológicas são similares à morfina



(REES & HUNTER, 1990). Após a descoberta do sistema opióide endógeno um grande esforço foi dirigido para pesquisas que visavam detectar mudanças adaptativas de sensibilidade, densidade e afinidade dos receptores opióides à neurotransmissores e drogas de abuso, como a morfina, com o objetivo de elucidar os seus mecanismos celulares (JOHNSON & FLEMING, 1989). Estas pesquisas mostraram que células excitáveis quando submetidas a tratamento com drogas de abuso têm a habilidade de adequar sua sensibilidade através de uma mudança adaptativa, evidenciada pela alteração da relação estímulo-resposta dentro da célula. A obtenção de evidências de que esta adaptação ocorre, tornou importante que atenção especial fosse dada ao estudo dos mecanismos intracelulares relacionados com a tolerância e a dependência aos opióides. Embora as pesquisas já tenham obtido um avanço significativo ainda não se conhece todas as alterações, sejam a nível estrutural, de concentração ou mesmo de expressão gênica, sofridas pelos mensageiros intracelulares envolvidos com o consumo de opióides (JOHNSON & FLEMING, 1989).

O papel das proteínas G que ligam os receptores aos mensageiros intracelulares presentes dentro da célula têm sido estudado por vários grupos de pesquisa (DEMOLIOU-MASSON & BARNARD, 1986; CASEY & GILMAN, 1988; UEDA *et al.*, 1988;

DOLPHIN, 1990, BIRNBAUMER, 1990; BROWN, 1990, CARTER & MEDZIHRADSKY, 1993 ), evidenciando que sob a ação de opióides, de maneira aguda ou crônica, há alterações significativas em suas concentrações. Uma consequência direta da alteração das concentrações das proteínas G é que as concentrações de mensageiros intracelulares tais como a adenilato ciclase, a AMP cíclico, as proteínas quinase e as fosfatases são também reguladas pelos opióides (NESTLER, 1990). O desenvolvimento de adaptações progressivas e persistentes na função cerebral desde do contato inicial até o vício ao opióide sugere que estas mudanças de longa duração são importantes na mediação do fenômeno de vício. O vício ao opióide pode ser pensado como uma plasticidade neuronal induzida pela droga e como tal pode servir como um modelo para investigar os tipos de mecanismos neurobiológicos envolvidos. A melhoria do conhecimento da neurobiologia molecular do vício a opióide deve incluir dois tipos de informação: mecanismos de patofisiologia - identificação de mudanças que os opióides produzem a nível cerebral que levam ao vício - e mecanismos de risco individual - identificação de fatores genéticos e comportamentais específicos que predispõem certos indivíduos ao vício (NESTLER *et al.*, 1993c). Tendo em vista que muitas das características do vício a opióide se desenvolvem gradualmente

e persistem por longo período após a abstinência à droga, parece provável que os opióides controlam a expressão gênica de alguns dos mensageiros intracelulares (HAYWARD *et al.*, 1990, MORGAN & CURRAN, 1990, 1991) .

Devido à alta densidade de receptores opióides, o *Locus Coeruleus* (LC), maior núcleo noradrenérgico do cérebro localizado bilateralmente ao nível da ponte, tem sido pesquisado, através de uma variedade de estudos farmacológicos e comportamentais, pelo papel importante que exerce na dependência e abstinência física a opióides (AGHAJANIAN, 1978; REDMOND & KRYSYAL, 1984; NESTLER & TALLMAN, 1988; NESTLER *et al.*, 1989a,b; NESTLER, 1990; KOOB *et al.*, 1992; NESTLER, 1992; NESTLER *et al.*, 1993b). Os axônios dos neurônios do LC propagam-se através do córtex cerebral, dos centros subcorticais, do talo cerebral, do cerebelo e da medula espinhal, estando, portanto, numa posição que influenciam praticamente todos os níveis do sistema nervoso central (DIAMOND *et al.*, 1985). Tem sido sugerido que o LC exerce um papel importante na abstinência a opióide; esta hipótese é baseada em parte nos resultados obtidos em que injeção de antagonistas a opióides nos neurônios do locus de ratos dependentes, produzem uma crise de abstinência severa (RASMUSSEN *et al.*, 1990, RASMUSSEN, 1991). De maneira aguda,

os opióides inibem os neurônios do LC pela ação das proteínas G e das quinases dependentes de AMP cíclico nos canais iônicos. Conforme novas doses de opióides são consumidas há o desenvolvimento de tolerância com conseqüente aumento das atividades neuronais do LC, além dos sistema AMP cíclico tornar-se sobre-regulado, demonstrando a ocorrência de uma reação compensatória. Também ocorrem alterações nos níveis de certas proteínas nucleares, chamadas fatores de transcrição, levando a mudanças nas razões da transcrição genética e provocando alteração na expressão gênica de outras proteínas, caracterizando o estado crônico do vício (NESTLER, 1993a). Deve-se salientar ainda que, como o LC projeta-se para diversas regiões cerebrais e recebe axônios de outros núcleos cerebrais, alterações em seu comportamento podem ser a soma sinérgica de sinais aferentes, incluindo a retroalimentação ("feedback") de sua própria ação (CARVALHO & DIOGO, 1995). Desta forma, o vício em morfina poderia ser o resultado de uma interação complexa entre sítios cerebrais desbalanceados por exposição excessiva ao opióide.

## I.2 - OBJETIVOS

Este trabalho propõe um modelo matemático para as alterações celulares produzidas nos neurônios do LC como resultado de tratamento agudo e crônico com morfina. Com este objetivo, o modelo de um neurônio do LC é definido, incluindo seus canais iônicos, a interação droga-receptor, a ativação das proteínas G, a rota metabólica entre a proteína adenilato ciclase e as proteínas nucleares, além da realimentação exercida pela expressão gênica sobre toda a célula. O principal objetivo deste trabalho é testar, através do modelo proposto, se a alteração na expressão genética de uma proteína básica para a formação da proteína  $G_i$  é suficiente para o estabelecimento da tolerância e dependência em morfina no LC. Esta alteração seria responsável pelo desequilíbrio em todas as concentrações das demais proteínas que compõem a cascata de reações bioquímicas, provocando o aumento da excitabilidade do neurônio do LC, conforme observado por diversos autores (RASMUSSEN *et al.*, 1990; NESTLER, 1993).

Um outro objetivo é testar se o aumento na concentração da sub-unidade  $\alpha_s$ , de maneira a simular um tratamento de dependência em morfina, é suficiente para

reduzir as crises de abstinência. Com isto, está se propondo uma nova estratégia no tratamento de indivíduos viciados em morfina.

### I.3 - ORGANIZAÇÃO DO TEXTO

Este trabalho está dividido em mais três capítulos.

No Capítulo II é apresentado ao leitor os conhecimentos que se tem, até o presente, das estruturas componentes do LC sejam elas os receptores opióides, os mensageiros intracelulares, ou ainda, os fatores de transcrição, todas importantes nos mecanismos de tolerância e dependência à morfina neste núcleo cerebral. Concomitantemente, as relações metabólicas existentes entre estas proteínas são discutidas quando este sistema, até o presente livre de contato anterior com a morfina, tem seu funcionamento basal alterado de maneira lenta pela presença de doses sucessivas desta droga, até atingir o estado de vício à droga. Neste capítulo o leitor terá oportunidade de conhecer como de maneira gradual o neurônio do LC, quando em contato com uma nova dose de morfina, executa as alterações necessárias nas concentrações de seus mensageiros intracelulares com o objetivo de fazê-las retornar, senão plenamente, ao menos bem próximo aos seus valores basais. Quando o conhecimento acumulado até o presente, a nível fisiológico ou molecular, não for suficientemente definitivo,

ou seja, os dados experimentais não são plenamente conclusivos, são apresentadas hipóteses, produto do trabalho de diversos grupos de pesquisas, com o objetivo de subsidiar o modelo matemático proposto neste trabalho.

A apresentação do modelo matemático proposto é motivo do Capítulo III. Nele são apresentadas uma a uma as equações que representam o comportamento de cada um dos elementos da cascata de reações bioquímicas que ocorrem desde do contato da morfina com o receptor opióide na membrana do neurônio do LC até a retroalimentação da expressão gênica sobre toda a célula. Cada uma das equações da interação droga-receptor, seguida daquelas representando as reações químicas seqüenciais dos diversos mensageiros intracelulares até o nível do núcleo, são apresentadas com os subsídios fornecidos pelos resultados expostos na literatura e apresentados no capítulo anterior.

É no Capítulo IV que são apresentadas as simulações, os resultados obtidos e feita a sua discussão. Tais simulações têm como objetivo mostrar as características do modelo. A primeira delas constitui a propriedade do modelo de simular a eletrofisiologia dos neurônios do LC e de mostrar o desenvolvimento de tolerância quando, de maneira aguda, este núcleo cerebral entra em contato com a morfina. É mostrado que



seguidas doses da droga, todas de mesma concentração, produzem como resultado um efeito estimulatório cada vez menor, evidenciando a ocorrência de tolerância onde o neurônio necessita de doses cada vez maiores para que o estímulo se mantenha nos patamares daqueles produzidos pelas doses iniciais.

Um segundo grupo de simulações foi executado para evidenciar as alterações nas concentrações das diversas proteínas, tanto quando o neurônio se encontra no estado agudo ou quando evolui ao estado crônico de exposição à droga. Nestas simulações foram estudadas várias hipóteses entre elas como o neurônio, após ser colocado inúmeras vezes em contato com a droga passa de um estado agudo para um estado crônico do vício, pela progressiva alteração das concentrações de suas proteínas levando, por hipótese, a uma alteração da expressão gênica de seus elementos. Outras simulações foram feitas para evidenciar como após ser submetido a uma abstinência de consumo, o neurônio possui a propriedade de lentamente retornar ao estado normal de funcionamento. Além disso, é importante destacar as simulações que mostram uma das propriedades do modelo: aquela que permite evidenciar que se o neurônio, após ter atingido o estado crônico do vício e retornado a níveis quase basais em decorrência do fim de

oferta de novas doses, é novamente exposto a uma nova dose de morfina, este atinge o estado crônico num período de tempo extremamente inferior àquele necessário para atingí-lo quando é, pela primeira vez, colocado em contato com a droga; esta evidência é compatível com as observações dos estudos já desenvolvidos.

Na seção seguinte são apresentadas as conclusões relativas a este trabalho que evidenciando todas as propriedades do modelo proposto e a comprovação das hipóteses formuladas, que podem servir de subsídios para pesquisas na área de neurobiologia.

## CAPÍTULO II

# OS MECANISMOS CELULARES DA DEPENDÊNCIA EM MORFINA

### II.1 - O *Locus Coeruleus*

O *Locus Coeruleus* (LC) é o principal núcleo cerebral noradrenérgico localizado bilateralmente na superfície do quarto ventrículo na ponte e formado por aproximadamente trinta mil neurônios (Figura 1).

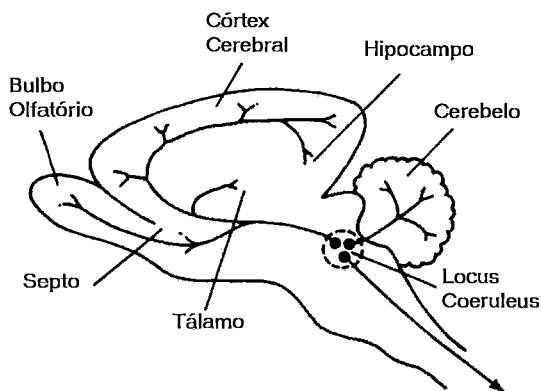


Figura 1. Representação esquemática do LC (Adaptado de BLACK, 1991)

Esta minúscula população celular representa a mais importante fonte do neurotransmissor norepinefrina para o

sistema nervoso central e parece estar envolvida em muitas funções incluindo o sono e o controle do nível de atenção. Os neurônios do LC projetam seus axônios para o córtex cerebral, o córtex cerebelar, além da medula espinhal, estando, portanto, numa posição que possibilita influenciar neurônios em todos os níveis do sistema nervoso central (DIAMOND *et. al.*, 1985).

MALDONADO *et. al.*, (1992) demonstraram o papel desempenhado pelo LC na mediação do vício a opiáceos injetando localmente antagonistas a receptores em várias regiões cerebrais de ratos dependentes a drogas e demonstraram que a mais severa síndrome de abstinência foi produzida pela injeção de antagonistas no LC.

Pesquisas recentes sugerem que o LC pode exercer importante papel nos efeitos de ansiedade provocados pela abstinência a opióides (REDMOND & KRYSTAL, 1984; WATSON *et. al.*, 1989). Os estudos farmacológicos e comportamentais têm indicado que a modulação das taxas de ativação do LC contribuem para os aspectos físicos do vício a opiato, principalmente a dependência física e abstinência em várias espécies de mamíferos, incluindo primatas (REDMOND & KRYSTAL, 1984; GEORG & GOLDBERG, 1989; GOLDSTEIN, 1989; RASMUSSEM *et al.*, 1990; KOOB *et. al.*, 1992; NESTLER, 1992).

Além disto, trabalhos recentes têm revelado os mecanismos moleculares e celulares envolvendo a rota intracelular do AMP cíclico e que são responsáveis pelos efeitos de longa duração dos opiatos nos neurônios do LC (NESTLER *et. al.*, 1993b).

## II.2 - A Interação Droga-Receptor

A morfina quando inalada é absorvida rapidamente pelo trato gastrintestinal, pela membrana da mucosa nasal e pelos pulmões. Por outro lado, a administração parenteral provoca a difusão passiva da droga no tecido até atingir a corrente sanguínea que a distribui em doses elevadas para o rim, o fígado, a tiróide e a glândula supra-renal. A baixa concentração da morfina observada nos núcleos cerebrais provoca analgesia, depressão respiratória e sedação de maneira marcante e complexa.

O sistema límbico, o núcleo respiratório, o córtex cerebral e o LC são alguns dos centros onde a droga tem clara influência. Nestes núcleos do sistema nervoso central os receptores opióides podem ser encontrados ligados à membrana celular principalmente na região sináptica (NORTH, 1989; SIMON & HILLER, 1989; LOH & SMITH, 1990; OFFERMANN *et. al.*, 1991).

Estudos autoradiográficos mostram que o LC possui a maior densidade de receptores opióides, particularmente os subtipos  $\mu$  e  $\kappa$ . Neste núcleo cerebral os opióides agem através dos receptores  $\mu$  e de maneira aguda hiperpolarizam as células (TEMPEL & ZUKIN, 1987).

O mecanismo responsável pela inibição aguda dos neurônios do LC pelos opióides tem sido examinado através de técnicas eletrofisiológicas e bioquímicas. Estes estudos *in vitro* sugerem que a inibição aguda pelo opiato de neurônios do LC envolve a regulação de dois tipos de canais iônicos: a ativação de um canal de potássio e a inibição de um canal dependente de sódio, que parece ser responsável pela atividade marca-passo do neurônio (AGHAJANIAN & WANG, 1987; WANG & AGHAJANIAN, 1987; NORTH *et. al.*, 1987; ALREJA & AGHAJANIAN, 1991; FINTA *et. al.*, 1993).

A perda de resposta à morfina ocorre quando os receptores  $\mu$  são expostos à droga, reduzindo a mencionada hiperpolarização aguda (NORTH & WILLIAMS; 1983,1985). Esta perda de resposta aos opiatos envolve uma mudança na relação estímulo-resposta dentro da célula e pode ser considerada como uma reação de dessensibilização ou ainda como um processo de compensação onde as células tentam recuperar seu equilíbrio (HARDEN, 1983; JOHNSON & FLEMING, 1989; HAUSDORFF *et. al.*, 1990). Embora experimentos sobre a dessensibilização do receptor  $\mu$  não sejam conclusivos (HARRIS & WILLIAMS, 1991), os estudos de dessensibilização nos receptores  $\beta$ -adrenérgicos (SIBLEY & LEFKOWITZ, 1985), por ter seus mecanismos bem definidos, têm servido de modelo para os receptores opióides.

Para entender o processo de dessensibilização no sistema agonista-receptor necessitamos conhecer alguns detalhes do processo de ativação. Os conceitos apresentados abaixo são baseados nas revisões de JOHNSON & FLEMING (1989) e SIBLEY & LEFKOWITZ (1985).

Entre os sistemas de receptor-efetor que mediam a ação de muitos hormônios e drogas no homem poucos são mais importantes que o sistema proteína G-adenilato ciclase, que sintetiza o segundo mensageiro AMP cíclico (GILMAN, 1984; MARTENS, 1992). Um receptor quando ativado por um agonista dispara reações de ligação entre uma série de proteínas associadas, embora independentes, na membrana celular levando à formação de um mensageiro intracelular chamado AMP cíclico. O AMP cíclico, por sua vez, ativa uma proteína quinase dependente de AMP cíclico (GILMAN, 1987; NESTLER & TALLMAN, 1988; NESTLER *et. al.*, 1989). As várias respostas dos agonistas dependem da localização e da função de proteínas específicas que são fosforiladas pelas proteínas quinase. Parece bastante provável que entre as proteínas que tornam-se fosforiladas estão aquelas associadas com algum canal iônico.

A chamada dessensibilização homóloga é um processo de duas fases: na primeira o complexo receptor-agonista é "seqüestrado" e na segunda ocorre o processo de "down-



regulation" do receptor . A observação de que o número de receptores decresce durante a dessensibilização sugere que eles são deslocados para o interior da célula e armazenados num compartimento isolado. Esta ação de seqüestro é descrita com um passo inicial onde, sob a presença contínua do agonista, não ocorre o acoplamento do receptor com o sistema proteína G-adenilato ciclase, seguido da fosforilação do receptor por uma proteína quinase associada ao receptor  $\beta$ -adrenérgico (NESTLER *et. al.*, 1993a).

Numa segunda etapa, o receptor , ainda com sua função normal, é seqüestrado. A localização dos receptores seqüestrados pode ser na superfície interna da membrana celular ou dentro das vesículas citoplasmáticas. O seqüestro é rápido e permite o retorno dos receptores para a superfície da membrana celular através de um processo de resensibilização através de proteínas fosfatases (HAUSDORFF *et al.*, 1990).

Por outro lado, o processo de "down-regulation" parece ser uma conseqüência do desaparecimento dos receptores por degradação proteolítica. Desta forma, este processo seria irreversível e para que houvesse o retorno do número de receptores aos seus níveis basais seria necessário síntese de novos receptores (HARDEN, 1983; COLLINS *et. al.*, 1991).

Na dessensibilização heteróloga ocorre a redução da resposta do receptor quando células são incubadas com um agonista e em seguida incubadas com um agonista diferente. Neste tipo de dessensibilização, a fosforilação dos receptores através de proteínas quinase dependentes de AMP cíclico pode ser o resultado de inúmeros eventos, tais como a ação, isolada ou de maneira combinada, de neurotransmissores, hormônios e também outras drogas (CARVALHO & DIOGO, 1995).

Por outro lado, na dessensibilização homóloga o receptor opióide seria fosforilado pela proteína quinase dependente de AMP cíclico em resposta à ativação pela morfina. Desta forma, a atividade basal da proteína quinase não seria capaz de fosforilar o receptor na ausência do agonista, visto que o receptor estaria associado com as proteínas G, que por sua vez bloqueariam seus sítios de fosforilação. Após a ligação com o agonista, os receptores livres do complexo proteína G-adenilato ciclase seriam produzidos e então poderiam ser fosforilados pela atividade basal da proteína quinase e contribuir para a dessensibilização do receptor. Este processo explicaria porque a proteína quinase dependente de AMP cíclico não fosforila receptores não acoplados ao agonista (NESTLER *et. al.*, 1993a).

Tendo em vista que os opióides reduzem o nível de atividade do sistema AMP cíclico, o mecanismo anterior de dessensibilização não deveria ser tão importante para exposições agudas à droga como ela parece ser no tratamento crônico, quando a concentração do sistema AMP cíclico se mostra aumentado (TERWILLIGER *et. al.*, 1991).

### II.3 - A Interação Receptor Opióide - Mensageiros Intracelulares

As células se comunicam entre si através de uma variedade de moléculas de comunicação tais como os neurotransmissores, os hormônios e os fatores de crescimento, que são detectados por receptores específicos na membrana plasmática da célula de resposta. A estimulação de um receptor por seu agonista inicia uma cascata de processos bioquímicos que produzem um sinal intracelular, que causa mudanças no comportamento da célula, por exemplo, a secreção de uma enzima ou mesmo a redução ou início da divisão celular (NEER & CLAPHAM, 1988).

Dezenas de mensageiros intracelulares foram descobertos nos últimos anos e cada um deles inicia uma série de interações moleculares. Muitos destes mensageiros intracelulares se utilizam de uma classe de moléculas, chamadas proteínas G, para controlar o fluxo dos sinais do receptor para o resto da célula. Estas proteínas são chamadas proteínas G porque elas se ligam a nucleotídeos guanina, que como todos os nucleotídeos são compostos de uma base orgânica ( no caso uma guanina ), um açúcar e um ou mais fosfatos (LINDER & GILMAN, 1993).

O papel das proteínas como controladora do fluxo dos sinais entre as células pode ocorrer de duas formas: através das chamadas " proteínas G pequenas ", que são geralmente encontradas como simples polipeptídeos compostos por 200 aminoácidos e possuem propriedade de regular o crescimento das células ou a secreção de uma proteína. Existem ainda as proteínas G que são heterotrímeros, compostas de subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , que estão associadas com o fluxo dos sinais vindos dos receptores localizados na superfície da membrana celular (SIMON *et. al.*, 1991).

A transmissão do sinal vindos destes receptores é iniciada pela formação de uma nova estrutura química fruto da união entre o agonista - uma droga, um neurotransmissor - ao receptor permitindo que ocorra a transmissão da informação através da membrana celular (SIMON *et. al.*, 1991). O complexo receptor-agonista inicia dois processos: um leva a dessensibilização e o outro é o processo de geração do sinal que começa com a ativação da proteína heterotrimérica G.

De forma bastante simplificada NEER & CLAPHAM (1988) descreveram a ativação das proteínas G (Figura 2)

Iniciando de um estado (a) onde não está ocorrendo a ligação entre o receptor e o agonista - por exemplo, a morfina - estes se unem produzindo uma mudança (b) na interação

receptor-proteína G, permitindo que GTP (trifosfato de guanina), na presença de  $Mg^{2+}$ , substitua GDP (difosfato de guanina) da subunidade  $\alpha$ .

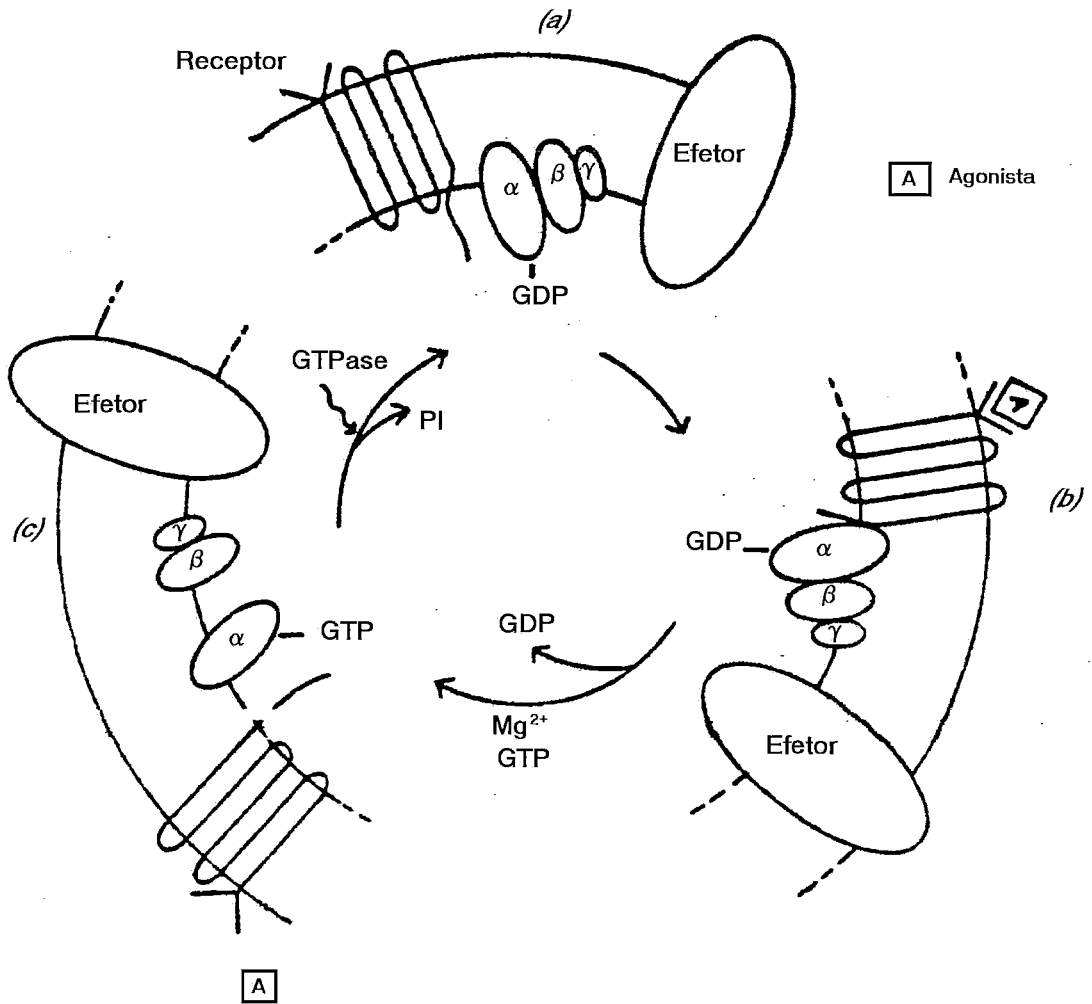


Figura 2. Esquema simplificado da ativação das proteínas G (Adaptado de NEER & CLAPHAM 1988).

Como consequência, a sub-unidade  $\alpha$ -GTP e as subunidades  $\beta\gamma$  se dissociam, permitindo que o complexo  $\alpha$ -GTP

livre possa interagir com os efetores (por exemplo, adenilato ciclase, canal iônico  $K^+$ ). Da mesma forma, as sub-unidades  $\beta\gamma$  podem se ligar a outras sub-unidades  $\alpha$ . Finalmente, sob a atividade de GTPase nas sub-unidades  $\alpha$  causam a hidrólise de GTP a GDP, liberando fosfato inorgânico (Pi) e permitindo que o complexo  $\alpha$ -GDP possa novamente se reassociar com o complexo  $\beta\gamma$ , terminando o ciclo de ativação e retornando ao estado inicial.

As sub-unidades  $\alpha$  são as responsáveis pela caracterização e a nomenclatura utilizadas para denominação das diversas proteínas G já descritas na literatura, visto que as sub-unidades  $\beta$  e  $\gamma$ , que estão presentes em todas as formas desta proteína, não permitem uma distinção que possa ser útil na discriminação entre elas. Desta forma, toxinas de bactérias como *Vibrio cholera* ou *Bordetella pertussis* podem modificar as proteínas G pela adição de uma ribose na sub-unidade  $\alpha$ ; desta forma, elas podem ser classificadas em quatro classes dependendo da susceptibilidade à ribosilação, isto é, ribosilação apenas por toxinas da cólera, apenas pelas toxinas da coqueluche, por ambas toxinas e por nenhuma delas.

Existe ainda uma outra importante proteína G presente no LC chamada  $G_o$ , sensível a toxina da coqueluche, e

que age nos canais iônicos através da membrana celular (BROWN, 1990).

Como já descrito anteriormente, cada uma destas proteínas é composta por sub-unidades  $\alpha$  e por um complexo composto pelas sub-unidades  $\beta\gamma$ . Desta forma, as sub-unidades  $\alpha$  presentes na proteína  $G_s$  são denominadas  $\alpha_s$ , as presentes na proteína  $G_i$  são denominadas  $\alpha_i$  e as da proteína  $G_o$  são denominadas  $\alpha_o$  (CARTER & MEDZIHRADSKY, 1993).

Nos neurônios presentes no LC os complexos processos que convertem um sinal extracelular, como a exercida por uma droga, numa resposta celular é mediada pelo monofosfato-5'-3'-adenosina (AMP cíclico). A concentração intracelular do AMP cíclico é função das razões de sua síntese - tendo como substrato proteico moléculas de trifosfato de adenosina (ATP), sob a ação catalítica da proteína adenilato ciclase - e da parcela de suas moléculas que são revertidas a AMP sob a ação de diversas fosfodiesterases.

A concentração da proteína adenilato ciclase nos neurônios presentes no LC é regulada pela ação da morfina (DUMAN *et al.*, 1988; VAN VLIET *et al.*, 1991) e, como conseqüência, a síntese de AMP cíclico está condicionada à



ação que esta droga exerce sobre a concentração da primeira proteína (NORTHUP, 1989).

A ação das proteínas  $G_s$  e  $G_i$  se dá através de suas sub-unidades  $\alpha_s$  e  $\alpha_i$  que, respectivamente, estimulam ou inibem a ação da proteína adenilato ciclase e, desta forma, aumentam ou reduzem a produção de AMP cíclico e, por conseqüência, interferem na fosforilação protéica (DUMAN *et al.*, 1988).

Os mecanismos envolvidos na ação da morfina no LC, de maneira aguda ou crônica, são em grande parte conhecidos através de estudos eletrofisiológicos e bioquímicos (NESTLER *et al.*, 1993a) e as sub-unidades  $\alpha$  das proteínas G são indubitavelmente os mediadores dos sinais vindos dos receptores (BIRNBAUMER, 1990). Os receptores opióides  $\mu$  quando ligados à morfina ativam as proteínas  $G_i$  e as proteínas  $G_o$  liberando, respectivamente, as sub-unidades  $\alpha_i$  e  $\alpha_o$ , além do complexo formado pelas sub-unidades  $\beta\gamma$ .

Os mecanismos envolvidos no aumento ou diminuição das concentrações das diversas proteínas que compõem a cascata de reações químicas desde a membrana celular até o núcleo dos neurônios presentes no LC, serão descritos a seguir quando

tratarmos da ação da morfina, de maneira aguda e crônica,  
nestas células.

## II.4 - A Fosforilação proteica.

A fosforilação proteica é o segundo passo bioquímico importante como um processo de regulação biológica dentro da rota metabólica que se inicia na ligação da droga ao receptor até a produção de uma resposta celular. Desta forma, os inúmeros sinais intracelulares ou extracelulares que regulam a função neuronal, como os neurotransmissores, os hormônios e as drogas podem produzir os seus diversos efeitos fisiológicos, de maneira direta, pela alteração da razão de fosforilação de proteínas específicas. Já quando estes sinais extracelulares agem de maneira indireta, podem regular as funções neuronais como a síntese e a liberação dos neurotransmissores, a condutância dos canais iônicos, a expressão gênica de proteínas e a plasticidade das próprias células (ALBERTS et al., 1989; GRANNER, 1993).

Todo sistema de fosforilação proteica consiste de três proteínas: uma proteína quinase, uma proteína fosfatase e uma proteína usada como substrato (Figura 3).

O substrato proteico é convertido de uma forma desfosforilada para uma forma fosforilada pela ação de uma proteína quinase e retorna a forma inicial pela ação de uma proteína fosfatase. Nos neurônios presentes no LC, por

exemplo, a ação das proteínas quinase se dá através do transporte de um grupo fosfato de uma molécula de trifosfato de adenosina (ATP) para uma proteína substrato, no caso uma defosfo-proteína, para formação de uma fosfo-proteína, enquanto que a ação da proteína fosfatase se dá pela remoção do grupo fosfato da fosfo-proteína para revertê-la a forma defosfo-proteína, através da hidrólise.

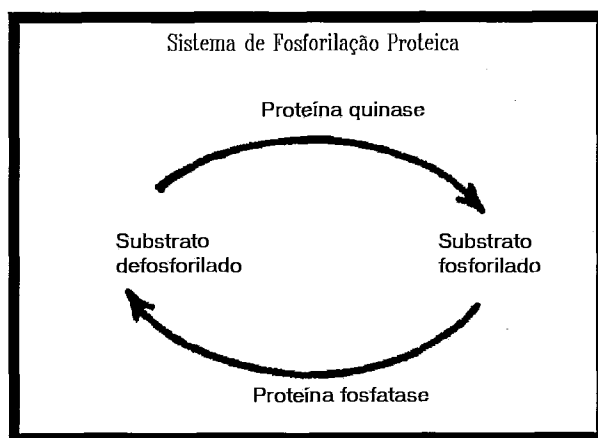


Figura 3. Diagrama esquemático do sistema de fosforilação proteica (Adaptado de NESTLER & GREENGARD, 1989)

O controle da ativação das proteínas quinase e proteínas fosfatase através de sinais extracelulares constitui um importante mecanismo para a regulação da função neuronal (NESTLER *et al.*, 1984; NESTLER & GREENGARD, 1983; 1989).

Os sinais extracelulares - ou primeiros mensageiros - no sistema nervoso incluem uma variedade de neurotransmissores, hormônios e drogas que agem através dos receptores localizados na membrana celular unindo-se a eles; com isto seus impulsos passam para o interior da célula tornando-se sinais intracelulares. Desta forma, estes primeiros mensageiros podem ativar as proteínas quinase indiretamente através do aumento do nível intracelular de um segundo mensageiro. No caso da ação da morfina - o primeiro mensageiro - sobre os neurônios localizados no LC esta ação se dá pela alteração dos níveis de AMP cíclico - o segundo mensageiro (CHEN & YU,1994). Os próximos passos bioquímicos são a ativação de classes específicas de proteínas quinase por estes segundos mensageiros e a seguir a fosforilação de proteínas utilizadas como substrato que através de um ou mais passos bioquímicos produzirão uma resposta biológica específica (NESTLER & GREENGARD,1989).

O cérebro contém inúmeras proteínas quinase que são ativadas por segundo mensageiros, como o AMP cíclico, e que recebem sua denominação em função do segundo mensageiro que as ativa. No LC o segundo mensageiro responsável pela ativação das proteínas quinase é o AMP cíclico, então todas as proteínas quinase que participam do sistema de fosforilação

proteica são denominadas genericamente como proteínas quinase dependentes de AMP cíclico

O cérebro contém apenas dois subtipos de proteínas quinase dependente de AMP cíclico que são denominadas como tipo I e II. Cada uma delas possui sub-unidades catalíticas idênticas de peso molecular igual a 41 kDa e distinguíveis apenas pelas sub-unidades regulatórias, designadas R-I e R-II, com peso molecular, respectivamente, de 47 kDa e 54 kDa (NESTLER & GREENGARD, 1989).

Já os quatro tipos de proteínas fosfatases observados podem ser controlados ou, pelos segundos mensageiros, como o AMP cíclico, ou, indiretamente, por inibidores de fosfatase que são ativados pelo AMP cíclico. O nível intracelular do AMP cíclico, como já citado, é regulado pela concentração da proteína adenilato ciclase, que catalisa a síntese do AMP cíclico - tendo o ATP como substrato proteico - e das concentrações de algumas fosfodiesterases cíclicas que revertem este segundo mensageiro à forma de AMP (NORTHUP, 1989).

No sistema nervoso o processo de fosforilação das proteínas quinase dependentes de AMP cíclico é dependente da síntese do AMP cíclico. Desta forma, a regulação da fosforilação proteica constitui um mecanismo que as drogas -

como a morfina - se utilizam para promover alterações em inúmeros aspectos da função neuronal, como o fechamento ou a abertura de canais iônicos, que modificam o comportamento dos neurônios (BROWN, 1990).

A ação da morfina nos neurônios do LC podem provocar o aumento ou na diminuição das concentrações de proteínas quinase dependentes de AMP cíclico e das fosfoproteínas reguladas por morfina e AMP cíclico (MARPPs), ou ainda do seu estado de fosforilação. Estes dois processos de ativação de fosfoproteínas podem servir como formas diferentes das síndromes do vício e da abstinência (GUITART & NESTLER, 1990; NESTLER, 1990). Uma importante MARPP já identificada é a enzima tirosina hidroxilase, que regula a razão da produção das catecolaminas. Se levarmos em consideração que o LC é predominantemente constituído por neurônios noradrenérgicos que projetam suas conexões para inúmeras estruturas do cérebro, o aumento na concentração da tirosina hidroxilase poderia levar a distúrbios na liberação da norepinefrina e, por consequência, mudanças importantes na função cerebral (CARVALHO & DIOGO, 1995).

Certamente, no LC , existem outras MARRPs ainda desconhecidas que participam dos processos neuronais básicos relacionados com o vício; desta forma, a identificação destas

fosfoproteínas são de relevante importância para o conhecimento dos mecanismos celulares envolvidos na ação da morfina nos neurônios do LC (GUITART & NESTLER, 1989).



## II.5 - *Expressão Gênica.*

O cérebro é uma estrutura celular extremamente complexa pois ele contém mais de  $10^{12}$  neurônios sendo cada um deles único nos aspectos de tamanho, formato, posição, padrão de conexão e resposta a sinais químicos ou elétricos. Por outro lado, o genoma humano contém apenas informações para cerca de  $10^6$  genes - onde todas as informações genéticas estão armazenadas - então mesmo que todos estes genes fossem expressados no cérebro, ou seja, produzissem as proteínas que podem codificar, não haveria informação suficiente para especificar cada neurônio separadamente (TOBIN & KHRESTCHATISKY, 1989).

Os diversos tipos de células num organismo multicelular tornam-se diferentes umas das outras porque elas sintetizam e acumulam diferentes conjuntos de moléculas de RNA e proteínas. Desta forma, as diferenças entre dois tipos de células dependem dos genes que eles expressam (ALBERTS *et al.*, 1989). Sabemos que são necessários diversos passos para que uma célula produza uma determinada proteína e existem evidências que todos eles podem ser regulados (Figura 4).

Segundo TOBIN & KHRESTCHATISKY (1989) o dogma central da biologia molecular estabelece que a informação genética flui do DNA para o RNA e deste para a proteína. Este fluxo se dá porque as células copiam as informações contidas na seqüência de nucleotídeos para a correspondente seqüência de nucleotídeos do RNA; esta conversão das informações contidas no DNA para o RNA é chamada de transcrição.

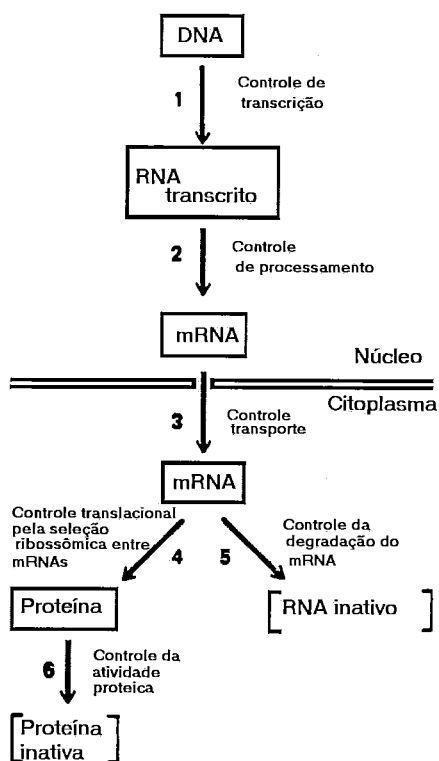


Figura 4. Diagrama esquemático dos diversos passos para a produção de uma proteína (Adaptado de ALBERTS *et al.*, 1989).

O RNA que transporta a informação é chamado RNA mensageiro (mRNA) e, como pode ser observado na Figura 4, os mRNAs são produzidos no núcleo e se deslocam para o citoplasma, onde em associação com os ribossomos e outros catalisadores, cada um destes mRNAs dirige a síntese de um tipo de cadeia polipeptídea, que, de maneira direta ou indireta, torna-se uma proteína. A conversão das informações contidas no RNA para a proteína é chamada de translação.

Quando os neurônios do sistema nervoso central são submetidos à exposição por um longo período de tempo a uma droga de abuso, podem ocorrer alterações nas quantidades totais de algumas das proteínas intracelulares, que por sua vez, podem provocar modificações no número de "spikes" (impulsos nervosos) destas células (NESTLER, 1993).

O estudo dos mecanismos moleculares responsáveis pela produção de proteínas intracelulares específicas e como a exposição de longa duração às drogas de abuso podem alterar os níveis destas proteínas são de vital importância para o entendimento dos aspectos relacionados ao vício.

Segundo NESTLER *et al.*, .(1993b) de todos os tipos de mecanismos que podem estar envolvidos na regulação da expressão gênica das proteínas intracelulares por uma droga de abuso, aqueles que influenciam a transcrição gênica tem sido

os mais estudados. Porém, as pesquisas não excluem um papel importante para os mecanismos pós-transcriptacionais, tendo em vista o aumento das evidências que indicam que o processamento do RNA, o transporte para o citoplasma e a razão de translação, entre outros, são altamente reguladas nas células (PTASHNE & GANN, 1990).

Os mesmos autores destacam que estudos são necessários para tentar esclarecer o papel exercido pelas drogas como reguladores do retorno da proteína ao núcleo, incluindo razões e sítios de proteólises, transporte subcelular e associação com organelas celulares específicas em complexos macromoleculares. A ação das drogas nos neurônios desencadeia, de maneira aguda, alterações fisiológicas nos diversos mensageiros intracelulares através do controle das concentrações de seus mensageiros intracelulares. Da mesma forma, podem desencadear efeitos de longa duração através do controle da forma e do conteúdo como os genes irão se expressar (NESTLER *et al.*, 1993b).

Como já mencionado, quando uma droga se liga a um receptor da membrana celular desencadeia uma série de eventos que, no decorrer de longo período de tempo, podem culminar em mudanças na expressão gênica dos segundos mensageiros intracelulares (ARMSTRONG & MONTMINY, 1993).

Uma das formas como a atividade sináptica altera a expressão gênica é através dos chamados "immediate early genes" (IEGs), que são rapidamente induzidos em resposta ao estímulo produzido por uma droga de abuso. Estes IEGs tem diversas características: são expressados em baixos níveis em células não estimuladas, mas são rapidamente induzidos por estímulo celular; sua indução na transcrição é de curta duração (30 a 60 minutos) e independe da síntese de novas proteínas (ARMSTRONG & MONTMINY, 1993), mas a sua principal característica é que estas proteínas podem servir como fatores de transcrição (MORGAN & CURRAN, 1986,1989,1991).

Os fatores de transcrição são proteínas que podem se ligar ao DNA afetando a transcrição de um determinado gene e os estudos de regulação da expressão gênica por drogas têm sido dirigidos para duas famílias de fatores de transcrição: proteínas ligadas a elementos de resposta AMP cíclico (CREB) e proteínas correlatas, além das proteínas c-Fos e c-Jun.

As proteínas *c-Fos* e *c-Jun*, apresentadas na Figura 5, produzidas pelos IEGs *c-Fos* e *c-Jun*, formam homodímeros ou heterodímeros que se ligam a uma seqüência regulatória do DNA chamada sítio AP-1 (RAUSCHER *et al.*, 1988; GENTZ *et al.*, 1989). Alguns destes dímeros aumentam a transcrição gênica e outros a inibem (GANONG, 1993).

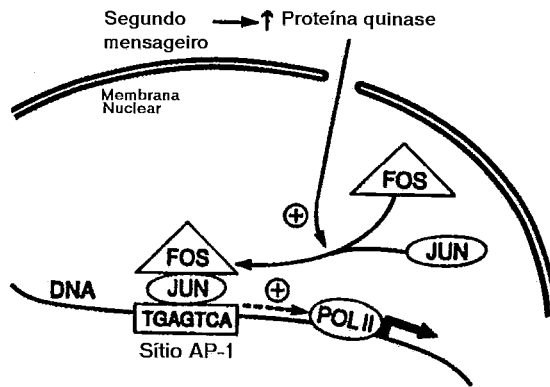


Figura 5. Esquema simplificado da ativação de genes pelos segundos mensageiros (Adaptado de GANONG, 1993).

Segundo NESTLER *et al.*, (1993b) embora exista pouca dúvida de que estes fatores de transcrição desempenham um papel importante na mediação dos efeitos de certos sinais extracelulares na expressão gênica (MORGAN & CURRAN, 1991; SHENG *et al.*, 1991), existe também pouca dúvida de que os efeitos de uma droga na expressão gênica são provavelmente mediadas através de regulação de muitos outros fatores de transcrição, com diferentes mecanismos operando em diferentes tipos de células neuronais.

Segundo os mesmos autores o principal objetivo dos estudos dos mecanismos moleculares envolvidos no vício por drogas, está relacionado com as alterações nos fatores de transcrição ou outras proteínas regulatórias que podem modificar a expressão de genes que codificam os mensageiros

intracelulares, produzindo os efeitos funcionais nos neurônios.

Segundo NESTLER (1993) o primeiro passo na elucidação dos mecanismos responsáveis pelos efeitos de longa duração produzidos pelas drogas de abuso nas funções cerebrais é identificar as adaptações bioquímicas que as drogas produzem no cérebro em resposta à exposição prolongada a elas. Desta forma, para que seja possível o entendimento das adaptações bioquímicas produzidas pela exposição prolongada às drogas é importante conduzir os estudos em regiões do cérebro bem definidas anatomicamente, nas quais as investigações farmacológicas-comportamentais tenham indicado um importante papel nos comportamentos de vício e naquelas onde os estudos eletrofisiológicos tenham identificado mudanças funcionais nos neurônios que conduzem ao vício.

O LC é uma das regiões cerebrais onde inúmeros estudos bioquímicos vem sendo feitos para a caracterização comportamental e eletrofisiológica, quando sob a ação de drogas como os opiatos (DUMAN *et al.*, 1988; BEITNER *et al.*, 1989; GUITART & NESTLER, 1989; CHRISTIE, 1991; AGHAJANIAN *et al.*, 1992; NESTLER, 1992; NESTLER, *et al.*, 1993a). A ação dos opiatos, quando ministrados de maneira aguda ou crônica nos neurônios do LC é o tema das próximas seções.

## II.6 - Ação aguda da morfina em neurônios do LC.

Os mecanismos da ação aguda da morfina nos neurônios do LC, baseados em estudos eletrofisiológicos e bioquímicos, já estão bem estabelecidos e são mostrados de maneira simplificada na parte superior da Figura 6.

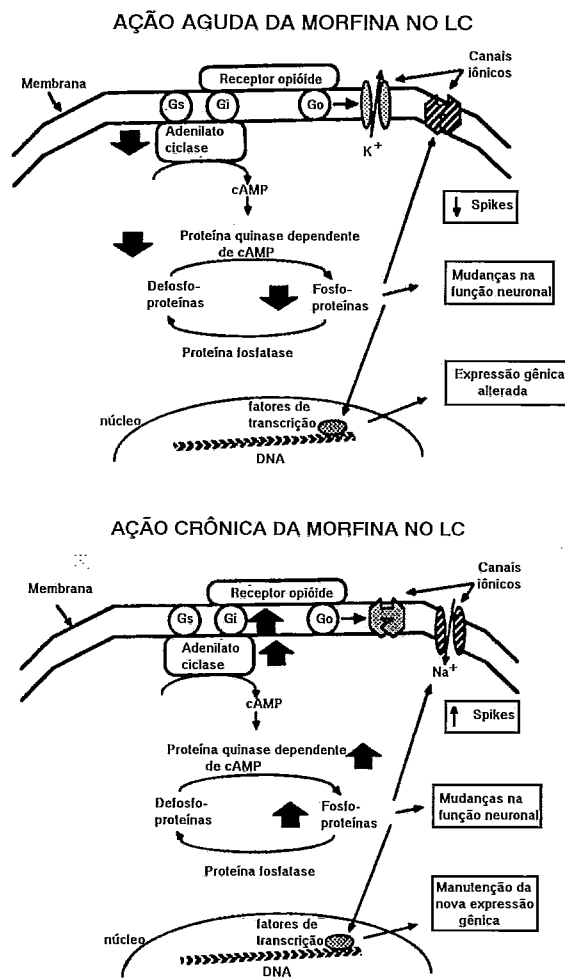


Figura 6. Ilustração esquemática dos mecanismos da ação aguda e crônica da morfina no LC (Adaptado de NESTLER, 1992b).



No LC, a morfina age através dos receptores  $\mu$  e, quando aplicados de maneira aguda, inibem os neurônios de duas maneiras distintas: diretamente, pela abertura dos canais iônicos de  $K^+$  (JAN, 1992; NESTLER, 1993) e, indiretamente, pelo bloqueio de uma corrente dependente de  $Na^+$ , que parece ser responsável por sua atividade de marca-passo (ALREJA & AGHAJANIAN, 1991).

Quando os receptores  $\mu$  são expostos à droga ocorre uma perda de resposta ao estímulo provocado pela morfina, responsável pela redução da hiperpolarização aguda. Esta dessensibilização do receptor parece ser o primeiro processo de compensação que as células possuem para tentar recuperar o seu equilíbrio (JOHNSON & FLEMING, 1989).

A hiperpolarização dos neurônios ocorrida pela ativação do canal iônico de  $K^+$  e pelo decréscimo da corrente de entrada dependente de  $Na^+$ , são ações mediadas através de proteínas G ( $G_i$  e/ou  $G_o$ ) (AGHAJANIAN & WANG, 1986; NORTH *et al.*, 1987; MYAKE *et al.*, 1989).

Por outro lado, a inibição da corrente dependente de  $Na^+$  é indireta, visto que este canal é normalmente ativado pelas proteína quinase dependente do AMP cíclico (através da fosforilação do canal por si só ou alguma proteína associada). Desta forma, a inibição do canal parece ser mediada pelo nível

reduzido de AMP cíclico e da proteína quinase dependente de AMP cíclico. (ALREJA & AGHAJANIAN, 1991; WANG & AGHAJANIAN, 1987).

Os estudos bioquímicos têm confirmado que a morfina de maneira aguda inibe a atividade da adenilato ciclase no LC (DUMAN et al., 1988; BEITNER et al., 1989; VAN VLIET et. al., 1991). Da mesma forma, a morfina de maneira aguda também inibe a fosforilação da proteína dependente de AMP cíclico nesta região do cérebro (GUITART & NESTLER, 1989).

Na parte superior da Figura 6 pode-se observar que as concentrações dos diversos mensageiros intracelulares são diminuídas quando o neurônio está sob a ação da morfina. Para entendermos como a ação da morfina provoca esta diminuição vamos analisar todos os passos bioquímicos desde a ligação do agonista com o receptor  $\mu$  até a influência que as fosfoproteínas exercem no núcleo. Quando a morfina se liga ao receptor opióide  $\mu$  eles passam a formar um complexo que se une às proteínas  $G_i$  e ou  $G_o$ , que funcionam como o elo de ligação entre o meio externo e o interior da célula. Desta forma, estas proteínas recebem a informação transportada pelo par droga-receptor e transformam-na num código interno que regula a unidade catalítica da proteína adenilato ciclase (CASEY & GILMAN, 1988).

Tendo em vista que a morfina inibe a atividade da adenilato ciclase nos neurônios do LC (DUMAN *et al.*, 1988), então quais as reações químicas que ocorrem para que isto ocorra ?

Como já mencionado, a unidade catalítica da adenilato ciclase é estimulada pela sub-unidade  $\alpha_s$  da proteína  $G_s$  e inibida pela sub-unidade  $\alpha_i$  da proteína  $G_i$ . Para que se possa entender como, no caso agudo, ocorre a inibição da adenilato ciclase, NESTLER *et. al.*, (1989a) consideraram que no estado basal, onde o neurônio não entrou em contato com a droga, as sub-unidades  $\alpha_i$  e  $\alpha_s$  estão associadas com o complexo formado pelas sub-unidades  $\beta\gamma$  de uma forma equilibrada permitindo que as sub-unidades  $\alpha_i$  e  $\alpha_s$ , que permanecem livres, exerçam o papel de estimular a adenilato ciclase na sua ação basal.

Na ação aguda da morfina, as proteínas  $G_i$  são dissociadas nas sub-unidades  $\alpha_i$  e no complexo  $\beta\gamma$ ; desta forma, passaria a existir na célula mais sub-unidades  $\beta\gamma$  livres que se associariam às sub-unidades  $\alpha_s$  para a formação de proteína  $G_s$ . Com isto, haveria o aumento da concentração de sub-unidades  $\alpha_i$

(inibidoras) e a diminuição de sub-unidades  $\alpha_s$  (estimulatórias) ocasionando, portanto, a diminuição da atividade da adenilato ciclase, através da diminuição da ordem de 10 a 15% de sua concentração (NESTLER *et. al.*, 1989a).

Presumivelmente, a inibição da adenilato ciclase provocada pela morfina também leva à diminuição dos níveis da concentração do AMP cíclico da ordem de 10 a 15%, visto que a adenilato ciclase funciona como um catalizador desta segunda proteína, bem como dos níveis das proteínas quinase dependentes de AMP cíclico, conforme constatado por GUITART & NESTLER (1989).

A maneira como ocorre a inibição da corrente dependente de  $\text{Na}^+$  é explicada por estas mudanças que ocorrem pela ação da morfina no neurônio, produzindo o decréscimo da fosforilação do canal iônico (ou alguma proteína associada) e, como conseqüência, a ocorrência de uma condutância menor (NESTLER *et al.*, 1993a).

Deve-se destacar ainda o papel regulador que a ação da morfina exerce sobre fosforilação proteica, podendo ser responsável por outros aspectos da função neuronal, como aquelas que levam à alteração de longa duração da expressão dos genes que codificam as proteínas que participam de toda a

casca de reações entre o receptor opióide e o núcleo da célula.

Segundo GUITART *et al.*, . (1992) a administração da morfina pode regular a expressão gênica através de dois mecanismos:

- No primeiro, a quantidade total de um fator de transcrição pode ser alterado através de mudanças na sua própria transcrição, como é o caso da família de fatores de transcrição Fos/Jun.

Deve-se destacar também que HAYWARD *et al.*, . (1990) demonstraram que ocorre a inibição ou o estímulo da expressão gênica de Fos e de Jun no LC em resposta, respectivamente, à administração ou à abstinência à morfina, além da constatação feita por SHENG & GRENBORG (1990) e MORGAN & CURRAN (1991) que a expressão destas proteínas é regulada no sistema nervoso adulto em resposta a diversos outros tipos de estímulo.

- O segundo implica na alteração da atividade de transcrição de uma quantidade constante de fator de transcrição através de sua fosforilação.

Como protótipo temos as chamadas proteínas ligadas a elementos de resposta do AMP cíclico (CREB), cuja habilidade para regular a transcrição é controlada primeiramente através de sua fosforilação pelas proteínas quinase dependentes de AMP

cíclico ou dependentes de cálcio (SHENG *et al.*, 1990,1991; NESTLER, 1992a). No trabalho de GUITART *et al.*, . (1992) os autores concluem que o estado de fosforilação de CREB sofre um decréscimo em resposta à administração aguda de morfina, retorna aos níveis de controle após o estado crônico e é estimulado durante a abstinência aguda à morfina.

NESTLER (1993) baseado nos estudos bioquímicos e moleculares desenvolvidos com o intuito de esclarecer a ação exercida pelas drogas de abuso no LC e em outras regiões do cérebro, além dos mecanismos que formam a base da regulação da expressão gênica, foi quem primeiro formulou um modelo para explicar como estas drogas podem alterar a expressão de genes de proteínas específicas. Desta maneira, a complexidade dos mecanismos de regulação genéticos sugerem que a completa identificação dos passos necessários usados pelas drogas de abuso para produzir vício através da alteração da expressão gênica em células do cérebro é uma tarefa extremamente difícil.

O modelo prevê a existência de dois mecanismos de regulação possíveis, envolvendo as famílias de fatores de transcrição CREB e Fos/Jun, que são mostrados na Figura 7.

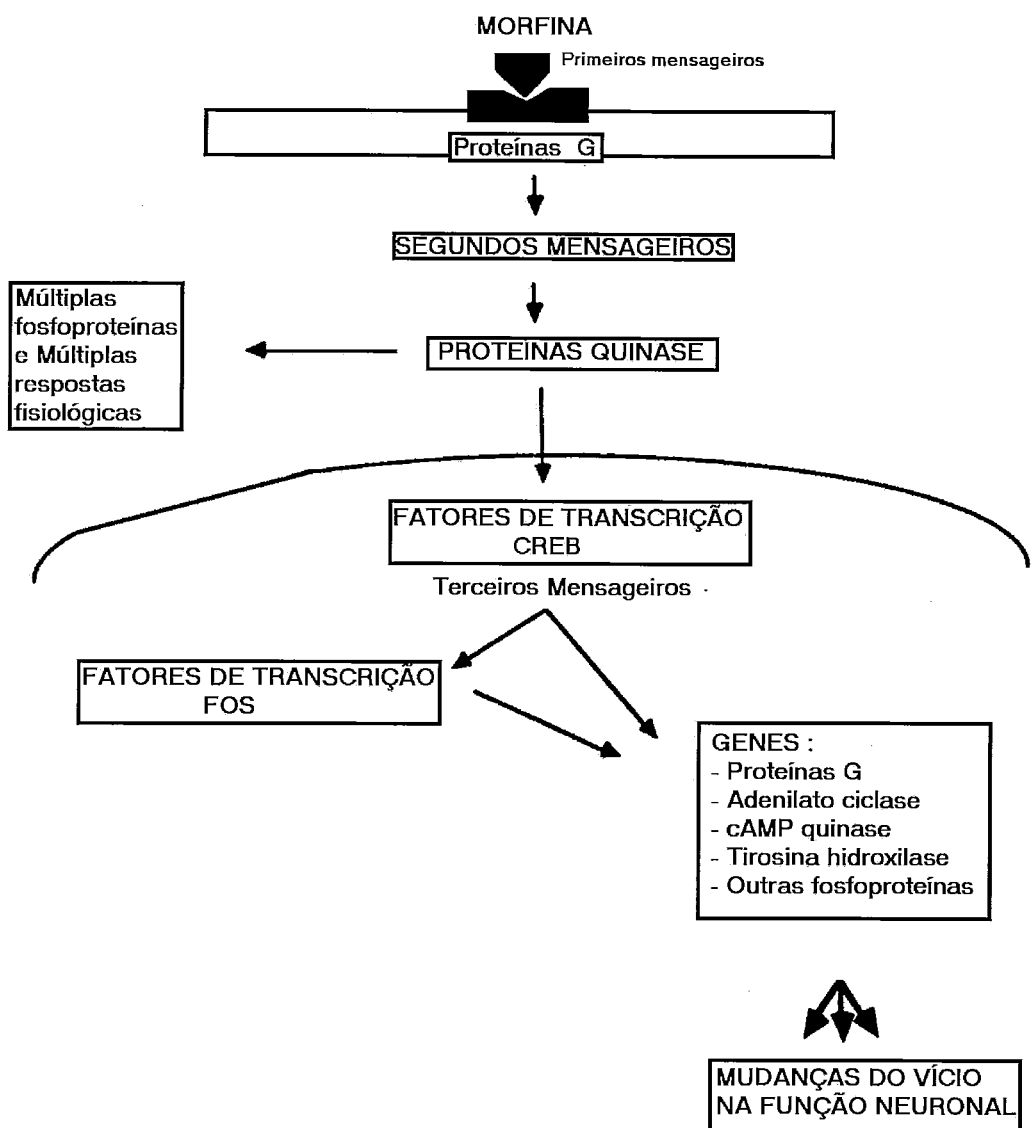


Figura 7. Diagrama esquemático de como a morfina podem regular a expressão gênica no neurônio do LC (Adaptado de NESTLER, 1993).

Estes dois mecanismos não são mutuamente exclusivos, nem eles são os únicos tipos de mecanismos que poderiam estar envolvidos, tendo em visto que existem outros tipos de fatores de transcrição, ou uma combinação de fatores, que poderiam

exercer esta função, entretanto, a regulação de neurotransmissores nos fatores de transcrição é melhor estabelecido para as famílias de fatores de transcrição CREB e Fos/Jun (NESTLER, 1993).

O mesmo autor afirma existirem evidências que muitos dos genes que, sob a ação da morfina ou da cocaína, regulam, entre outras, a expressão gênica das proteínas quinase dependentes de AMP cíclico, da fosfoproteína tirosina hidroxilase e estas são conhecidos conter AMP cíclico e/ou elementos de resposta AP-1 e como já descrito são seqüências do DNA que ligam as família de fatores de transcrição CREB e Fos/Jun.

Como mencionado anteriormente, as proteínas CREB são pensadas serem expressadas de forma basal nos neurônios, com sua atividade de transcrição regulada primeiramente via sua fosforilação pela proteína quinase dependente de AMP cíclico ou de cálcio.

O modelo apresentado na Figura 7 mostra que a morfina exerce seu efeito inicial na rota do AMP cíclico através da inibição da proteína adenilato ciclase (DUMAN et al., 1988); este decréscimo por sua vez acarreta sucessivas alterações nas concentrações das proteínas participantes da



cascata de reações bioquímicas, que em última análise conduziriam ao decréscimo do estado de fosforilação do CREB e subseqüentes mudanças na expressão gênica de genes presentes no núcleo. Desta forma, este mecanismo envolve a regulação de fatores de transcrição que normalmente estão presentes nos neurônios, de tal forma que a regulação exercida na família CREB ocorreria rapidamente, isto é, em minutos.

O estudo da regulação de CREB pela morfina tem mostrado que a administração aguda de morfina decresce o estado de fosforilação de CREB no LC, um efeito que diminui após a exposição crônica. Esta regulação de fosforilação de CREB é consistente com os efeitos conhecidos da administração aguda e crônica de opiatos na atividade do sistema AMP cíclico no LC. Desta forma a regulação da fosforilação de CREB poderia contribuir para as mudanças induzida pela morfina na expressão das proteínas G e do sistema AMP cíclico nesta região do cérebro (NESTLER, 1992a).

NESTLER (1993) afirma ainda que estes resultados aumentam a possibilidade de que a administração crônica de morfina pode aumentar a quantidade total de CREB, que também poderia contribuir para as mudanças de transcrição associadas com o vício pela morfina. Para completar o modelo proposto, o autor conclui que ao contrário de CREB, a família de fatores

de transcrição Fos/Jun tende a se expressar em níveis menores sobre condições basais. Em resposta a diversos tipos de sinais extracelulares, os altos níveis de expressão destes fatores de transcrição são induzidos via aumento nas razões de transcrição e translação do RNA mensageiro.

Assim a fosforilação de CREB, pelas proteínas quinase dependentes de AMP cíclico ou dependentes de cálcio, regulariam os efeitos dos sinais extracelulares na expressão de Fos (SHENG et al., 1991). Como este mecanismo requer síntese proteica, ele seria mais lento que o primeiro, de tal forma que as alterações esperadas na expressão dos genes Fos/Jun só ocorreriam num período de 30 a 60 minutos após o estímulo inicial.

HAYWARD et al., (1990) pesquisaram a ação da morfina no LC, quando administrada de maneira aguda ou crônica, na regulação da expressão de Fos e concluíram que a administração aguda do opiato decresce os níveis de mRNA e proteína Fos nesta região e que este nível reduzido da expressão de Fos persiste com o tratamento crônico. Porém a mais importante conclusão obtida por estes pesquisadores é que as mudanças observadas em Fos e nos níveis de ligação com AP-1 são consistentes com a possibilidade que o aumento dos níveis de expressão das G proteínas e do sistema AMP cíclico

no LC durante o tratamento crônico poderia ser mediado em algum grau, através de níveis reduzidos de Fos, e que o retorno dos níveis de expressão para estas proteínas intracelulares em direção aos níveis de controle durante a abstinência poderia ser alcançado como um resultado da expressão elevada de Fos.

O autor conclui afirmando que quanto mais se aprende sobre a regulação de CREB, Fos/Jun e outras famílias de fatores de transcrição, haveria possibilidade de se formular hipóteses mais complexas para descrever as ações da expressão gênica de opíatos, cocaína e outras drogas de abuso.

As alterações, produzidas por seguidas doses de morfina, na expressão gênica das proteínas participantes da cadeia de reações bioquímicas nos neurônios do LC conduzem-no, num tempo relativamente curto, ao estado crônico do vício.

As modificações nas concentrações das proteínas dos neurônios ocorrem de maneira contínua como conseqüência da ação aguda da morfina, desta forma, quando a morfina passa a atuar sobre o neurônio de modo crônico a produção daquelas proteínas apresenta comportamento diverso daquele visto no modo agudo; este é, portanto, o tema do próximo tópico deste trabalho.

## II.7 - Ação crônica da morfina em neurônios do LC.

Os mecanismos da ação crônica da morfina nos neurônios do LC são mostrados de maneira simplificada na parte inferior da Figura 6. Os neurônios do LC atingem o estado crônico do vício após terem desenvolvido tolerância ao longo de uma série de doses de morfina (CHRISTIE et al., 1987).

Para que o neurônio possa retornar aos seus níveis basais quanto ao número de spikes ele depende da presença continuada do opiato. Como consequência, se houver a interrupção abrupta do tratamento com opiato após a exposição crônica à droga, através da administração de um antagonista ao receptor opiato, tal procedimento eleva o número de spikes do LC acima dos níveis basais observados tanto *in vivo* como *in vitro* (RASMUSSEM et al., 1990; RASMUSSEN, 1991; KOGAN et al., 1992).

As pesquisas desenvolvidas nos últimos anos através de estudos farmacológicos e comportamentais têm indicado que a regulação pela morfina na excitabilidade dos neurônios do LC contribui para os aspectos físicos do vício a opiatos, tais como, a dependência física e a abstinência, em várias espécies de mamíferos, incluindo primatas (RASMUSSEN et al., 1990; REDMOND & KRYSTAL, 1984).

O papel exercido pelo LC quanto aos aspectos da dependência física e da abstinência foi evidenciado por estudos recentes, onde a injeção de um antagonista em regiões específicas do cérebro, produziu a mais severa síndrome de abstinência a opiato quando estas injeções eram feitas no LC (MALDONADO et al., 1992). Estudos efetuados por SHARMA et. al., (1975) foram os primeiros a relatar os efeitos opostos exercidos pela ação de opiatos de maneira aguda e crônica nos níveis de AMP cíclico quando da exposição aguda e crônica a opiato em células cultivadas de neuroblastoma x glioma. Estas observações proporcionaram a base da hipótese do envolvimento da rota de AMP cíclico na tolerância e dependência a opiato.

Como já exposto anteriormente, as proteínas G e o AMP cíclico exercem papel importante quando os neurônios se encontram na fase aguda do vício ao opiato. Como no decorrer do estágio agudo do consumo o indivíduo se submete a seguidas doses da droga levando, num curto período de tempo, a alterações de longa duração evidenciadas pelas adaptações nas concentrações das proteínas dos mensageiros intracelulares os pesquisadores voltaram sua atenção no intuito de determinar se as proteínas G e o AMP cíclico poderiam estar envolvidos na tolerância, na dependência e na abstinência que ocorrem com a exposição crônica à morfina dos neurônios do LC.

Nos estudos feitos, diversos pesquisadores (DUMAN *et. al.*, 1988; NESTLER *et. al.*, 1989; NESTLER *et. al.*, 1993a; NESTLER *et. al.*, 1993b) proporcionaram evidências de que a administração crônica de morfina conduz a uma elevação dos níveis do sistema AMP cíclico como um dos mais importantes participantes dos passos bioquímicos envolvidos entre o receptor e a resposta fisiológica do neurônio; estes resultados estão mostrados na parte inferior da Figura 6.

Porém, sabemos que o sistema AMP cíclico é apenas um dos participantes de toda a cascata de reações químicas presentes no neurônio, desta forma se torna importante sabermos como se comporta cada um dos participantes destes mensageiros intracelulares.

Nos últimos anos, diversos grupos de pesquisa têm se empenhado em examinar como a administração crônica de opiatos nos neurônios do LC alteram a concentração destes mensageiros intracelulares. Entre eles pode-se destacar os resultados obtidos por NESTLER *et. al.*, (1989) que mostraram que de maneira crônica a morfina causa o aumento, nos neurônios do LC, dos níveis das sub-unidades  $\alpha_1$  e  $\alpha_s$  e, contrariando a expectativa, um aumento proporcional na atividade da adenilato ciclase (DUMAN, 1989) - visto que se esperaria que o aumento

das concentrações da sub-unidade  $\alpha_i$  (por seu papel inibidor) provocasse um decréscimo na atividade daquela proteína.

A contradição aparente foi explicada pelos autores através da consideração de que, no estado basal, as sub-unidades  $\alpha_i$  e  $\alpha_s$  estão associadas a complexos  $\beta\gamma$  para a formação das proteínas  $G_i$  e  $G_s$  de uma forma equilibrada; desta forma, as sub-unidades  $\alpha_i$  e  $\alpha_s$  livres exerceriam a função de funcionar como catalisadoras estimulando a atividade da adenilato ciclase.

Desta forma, quando a droga induz a alteração na expressão gênica dos genes que codificam a sub-unidade  $\alpha_i$  e, por conseqüência, um aumento crônico na concentração das sub-unidades  $\alpha_i$  livres, a associação entre o complexo  $\beta\gamma$  e esta sub-unidade é aumentada pela maior oferta de  $\alpha_i$  livres no citoplasma. Então, a associação entre o complexo  $\beta\gamma$  e as sub-unidades  $\alpha_s$  é diminuído pela redução de sub-unidades  $\beta\gamma$  disponíveis, o que proporciona uma maior concentração de sub-unidades  $\alpha_s$  livres disponíveis, permitindo, desta forma, que haja uma alteração no equilíbrio, observado no estado basal, entre a oferta destas duas sub-unidades e, conseqüentemente,

pela maior concentração de sub-unidades  $\alpha_s$  a atividade da adenilato ciclase é aumentada.

O autor conclui afirmando que a competição existente entre as várias sub-unidades  $\alpha$  pela quantidade constante do complexo  $\beta\gamma$  pode ser o mecanismo de controle da atividade da adenilato ciclase exercido pelas proteínas G.

Da mesma maneira, a submissão do neurônio a um tratamento crônico utilizando opiatos tem mostrado aumentar os níveis das proteína quinase dependente de AMP cíclico, como observado por NESTLER & TALLMAN (1988), além de diversas fosfoproteínas que servem de substratos para a proteína quinase dependente de AMP cíclico (GUITART & NESTLER, 1989, 1990), incluindo a tirosina hidroxilase (GUITART et al., 1990) a enzima limitante da razão da biosíntese das catecolaminas.

Segundo NESTLER (1993) o aumento na concentração do AMP cíclico - a níveis que alcançam 35% da concentração basal (NESTLER et. al., 1989) - produzida pelo efeito do opiato no LC ocorre tanto no nível da proteína, como do RNA mensageiro, o que torna consistente a possibilidade de que as mudanças ocorridas nas concentrações dos mensageiros intracelulares possam ser explicadas através da regulação gênica.

NESTLER (1993) afirma, por outro lado, que as adaptações ocorridas requerem a exposição crônica do neurônio



aos opíatos e podem ser bloqueadas pela administração concomitante de um antagonista ao opíato, indicando que a ativação permanente dos receptores opíatos está envolvida.

A partir das conclusões do trabalho de NESTLER & TALLMAN (1988) o enfoque da pesquisa foi no sentido de observar se a sobre-regulação do sistema AMP cíclico não estaria envolvida no aumento da excitabilidade dos neurônios do LC.

A interpretação oferecida por NESTLER e colaboradores (NESTLER, 1992a; NESTLER, 1993; NESTLER *et. al.*, 1993a,b) é que o aumento dos níveis do sistema AMP cíclico nos neurônios do LC pode ser visto como uma resposta homeostática compensatória dos neurônios à inibição persistente exercida pelo opíato nestas células. Desta forma, o aumento do sistema AMP cíclico seria responsável pelo aumento da excitabilidade intrínseca dos neurônios LC e, por esta razão, pelo menos em parte, pela tolerância, dependência e abstinência ao opíato exibida por estes neurônios. Então, no estado de tolerância/dependência ao opíato, a presença combinada do opíato e do sistema AMP cíclico aumentado seria responsável pelo retorno do neurônio às razões de disparo do LC aos níveis do pré-tratamento, enquanto que a remoção dos opíatos levaria ao estado de abstinência dos neurônios.

Os mesmos autores apontam diversas linhas de evidência que justificam estas hipóteses, das quais destacamos:

A primeira é que o AMP cíclico excita os neurônios através da ativação das proteína quinase dependentes de AMP cíclico e a subsequente ativação de uma corrente de entrada dependente de  $\text{Na}^+$  (WANG & AGHAJANIAN, 1990). Este fato explicaria porque o disparo espontâneo dos neurônios feitos *in vitro* parecem ser dependentes da atividade dos sistema AMP cíclico e deste canal (ALREJA & AGHAJANIAN, 1991).

A segunda é que o tempo decorrido para que certos componentes do sistema AMP cíclico aumentado possam retornar de maneira natural a seus níveis normais durante a abstinência a opiatos, parece ser o mesmo tempo de recuperação quando a abstinência é precipitada (RASMUSSEM et al., 1990; RASMUSSEM, 1991).

A terceira razão apontada é que experimentos em neurônios do LC *in vitro*, onde muitas conexões sinápticas dos neurônios foram desligadas, indicaram que os neurônios do LC de animais dependentes exibem taxa de disparo basal duas vezes maiores do que os de animais controle.

Estes resultados permitiram concluir a existência de mecanismos intrínsecos que contribuem para a dependência a

opiato nestas células. Além disso, os neurônios do LC de animais dependentes mostram uma resposta máxima maior para análogos do AMP cíclico, proporcionando a evidência de uma trajetória do AMP cíclico durante a dependência (KOGAN et al., 1992). Segundo os autores todos estes resultados sugerem que o aumento do AMP cíclico representa um mecanismo pelo qual os opiatos induzem o vício nos neurônios do LC.

## II.8 - *Propriedades da membrana dos neurônios do Locus Coeruleus.*

A eletrofisiologia dos neurônios do LC mostram que estas células possuem potenciais de ação de longa duração ( mais que 2 ms ) e uma atividade espontânea basal de cerca de 2 spikes por segundo. A resposta evocada é composta de duas fases distintas na qual uma seqüência de cerca de dez spikes é seguida por um período de inibição de aproximadamente três segundos (RASMUSSEN *et. al.*, 1986). O potencial de repouso varia entre -65 mV a -55 mV , acima da qual os spikes espontâneos surgem.

Dois componentes produzem a fase de 75 mV de subida do potencial de ação: Primeiro, a despolarização lenta causada por uma corrente de entrada dependente de cálcio (DOLPHIN, 1990), aqui chamada de  $I_{Ca}$ , e, segundo, o potencial de ação propriamente dito que é devido a uma corrente de sódio rápida e também dependente de tensão, representada por  $I_{Na}$  (DUMAN *et. al.*, 1989).

Com a função de um retificador atrasado, uma corrente de saída de potássio dependente de voltagem, denominada  $I_K$  , possibilita a repolarização da membrana.

Logo após uma seqüência de spikes, uma outra corrente de potássio, referida como  $I_{K,ca}$  por depender da concentração de cálcio intracelular, é disparada e hiperpolariza a célula até aproximadamente  $-75$  mV. Atingido este potencial, uma corrente de entrada de potássio, dependente de voltagem,  $I_A$  provoca o retorno do potencial de membrana a seu valor de repouso e, desta forma, controla a freqüência entre os spikes (WILLIAMS *et. al.*, 1984).

A atividade espontânea observada nos neurônios do LC é devida, possivelmente, a uma corrente de sódio dependente do AMP cíclico, denominada  $I_{Na,p}$ , que de maneira lenta despolariza a célula do seu potencial de repouso para o potencial limite da corrente  $I_{ca}$  (ALREJA & AGHAJANIAN, 1991). Esta atividade de marca-passo pode ser regulada por drogas, neuromoduladores ou neurotransmissores que atuam, de modo direto ou indireto, sobre o sistema do AMP cíclico.

Como citado anteriormente, a morfina é uma das drogas capazes de produzir alterações nos níveis do AMP cíclico, reduzindo ou aumentando as concentrações basais desta proteína e, desta forma, modificar o comportamento espontâneo do neurônio do LC.

O modelo matemático do comportamento do neurônio do LC quando sob o efeito agudo ou crônico da morfina é apresentado no Capítulo que se segue.

## CAPÍTULO III

### III.1. *Formalização Matemática*

Com o objetivo de formalizar, através de equações matemáticas, um modelo que se mostre capaz de simular as inúmeras alterações produzidas pela morfina, seja no caso agudo como no crônico, este capítulo está dividido em módulos para melhor compreensão.

Suponhamos que haja uniformidade eletrofisiológica do neurônio noradrenérgico do LC, de forma que a modelagem de um neurônio possa representar toda a população de suas células.

O primeiro módulo do modelo proposto é composto pelas equações da membrana do neurônio com as várias correntes presentes; já o segundo módulo se refere às equações das diversas proteínas intracelulares presentes na mesma estrutura fisiológica.

### III.2. A Membrana Celular.

As equações apresentadas neste primeiro módulo são baseadas no modelo proposto por CARVALHO & DIOGO (1995) que descrevem as propriedades da membrana dos neurônios do LC (WILLIAMS *et al.*, 1984, 1985).

A membrana de uma célula excitável pode ser modelada como um circuito elétrico no qual a capacitância da membrana  $C$  está em paralelo com os canais iônicos conforme sugerido no modelo proposto por HODGKIN & HUXLEY (1952), no qual a membrana está concentrada em um ponto e tem um potencial elétrico  $V$ .

A equação da membrana para o neurônio do LC é :

$$C \frac{dV}{dt} = I_{Na} + I_K + I_{Na,p} + I_{Ca} + I_{K,Ca} + I_A \quad (1)$$

onde  $I_{Na}$  representa a corrente de entrada dependente de sódio,  $I_K$  a corrente de entrada dependente de potássio,  $I_{Na,p}$  a corrente de sódio dependente do AMP cíclico,  $I_{Ca}$  a corrente de entrada dependente de cálcio,  $I_{K,Ca}$  a corrente de potássio dependente de cálcio e  $I_A$  a corrente de entrada de potássio,



dependente de voltagem. A descrição do comportamento de cada uma destas correntes foi feita no capítulo anterior.

Se assumirmos uma relação linear entre a voltagem instantânea através da membrana e a corrente instantânea fluindo através dos canais iônicos, a lei de Ohm permite-nos escrever as seguintes equações :

$$I_{Na} = -g_{Na}(V - E_{Na}), \quad (2)$$

$$I_K = -g_K(V - E_K), \quad (3)$$

$$I_{Na,p} = -g_{Na,p}(V - E_{Na}), \quad (4)$$

$$I_{Ca} = -g_{Ca}(V - E_{Ca}), \quad (5)$$

$$I_{K,Ca} = -g_{K,Ca}(V - E_K), \quad (6)$$

$$I_A = -g_A(V - E_K), \quad (7)$$

onde os termos  $g_{Na}$ ,  $g_K$ ,  $g_{Na,p}$ ,  $g_{Ca}$ ,  $g_{K,Ca}$  e  $g_A$  correspondem às condutâncias das correntes  $I_{Na}$ ,  $I_K$ ,  $I_{Na,p}$ ,  $I_{Ca}$ ,  $I_{K,Ca}$  e  $I_A$ , enquanto que os parâmetros  $E_{Na}$ ,  $E_K$  e  $E_{Ca}$  representam, respectivamente, o potencial de Nernst dos canais iônicos de  $Na^+$ ,  $K^+$  e  $Ca^{2+}$ .

Levando-se em consideração que a condutância  $g_{Na}$ , presente na equação (2) tem um comportamento dinâmico, este é expresso pelo produto de uma variável de ativação  $d \in (0,1)$  e uma variável de inativação  $f \in (0,1)$ , que representam, respectivamente, a abertura e o fechamento do canal iônico de  $Na^+$ , e uma constante de condutância máxima denominada  $\bar{g}_{Na}$  :

$$g_{Na} = \bar{g}_{Na} df \quad (8)$$

A variável de inativação  $f$  segue um valor de regime permanente  $f_{\infty} \in (0,1)$  com um tempo de relaxação  $\tau_f$ , de acordo com:

$$\frac{df}{dt} = \frac{f_{\infty} - f}{\tau_f}, \quad (9)$$

onde  $f_{\infty}$  expressa a dependência de voltagem da corrente de inativação  $I_{Na}$  segundo

$$f_{\infty} = \frac{1}{1 + e^{(V - V_f)/S_f}}, \quad (10)$$

onde  $V_f$  representa o potencial de meio-máximo de  $f_o$  e  $S_f$  a inclinação da função sigmóide. O tempo de relaxação  $\tau_f$  é também uma função do potencial de membrana e usualmente tem a forma de um sino (CHAY, 1990):

$$\tau_f = \frac{\bar{\tau}_f}{e^{(V-V_{\tau_f})/S_{\tau_f}} + e^{-(V-V_{\tau_f})/S_{\tau_f}}}, \quad (11)$$

onde  $S_{\tau_f}$  é a inclinação,  $V_{\tau_f}$  é o potencial para o máximo e  $\bar{\tau}_f$  é a constante de tempo de relaxação máxima. Como a entrada de ativação tem uma dinâmica rápida, esta sempre assume o valor  $d_\infty$  dependente da voltagem :

$$d_\infty = d = \frac{1}{1 + e^{-(V-V_d)/S_d}}, \quad (12)$$

onde  $V_d$  é o potencial de meio-máximo para  $d_\infty$  e  $S_d$  é uma constante para regular a inclinação da curva.

De forma análoga, a condutância  $g_K$  da corrente  $I_K$  da equação (3) é modelada como

$$g_K = \bar{g}_K l \quad (13)$$

onde  $\bar{g}_K$  é a condutância máxima constante e a variável  $l \in (0,1)$  segue a equação de relaxação

$$\frac{dl}{dt} = \frac{l_\infty - l}{\tau_l}, \quad (14)$$

onde

$$l_\infty = \frac{1}{1 + e^{-(V-V_l)/S_l}}, \quad (15)$$

e

$$\tau_l = \frac{\bar{\tau}_l}{e^{(V-V_{\tau_l})/S_{\tau_l}^\tau} + e^{-(V-V_{\tau_l})/S_{\tau_l}^l}}, \quad (16)$$

O valor de regime permanente  $l_\infty$  tem um potencial para meio-máximo  $V_l$  e uma inclinação  $S_l$ , enquanto que na relaxação, o tempo  $\bar{\tau}_l$  tem um valor máximo de  $\bar{\tau}_l$  com as inclinações  $S_{\tau_l}^\tau$  e  $S_{\tau_l}^l$ , respectivamente, para os lados direito e esquerdo da curva e potencial máximo  $V_{\tau_l}$ .

Os canais iônicos de  $Na^+$  da corrente  $I_{Na,P}$  apresentada na equação (4) são fosforilados pelo AMP cíclico

(ALREJA & AGHAJANIAN, 1991) do valor basal  $\bar{g}_{Na,p}$  até o valor máximo  $g_{Na,p}^*$ .

Assumindo-se que a relação entre os níveis de cAMP, [cAMP] na equação, e a condutância  $g_{Na,p}$  do canal de sódio pode ser representada por uma sigmóide, então teremos:

$$g_{Na,p} = \frac{g_{Na,p}^*}{1 + e^{-([cAMP] - [cAMP]_h) / S_{Na,p}}} + \bar{g}_{Na,p} \quad (17)$$

onde  $[cAMP]_h$  é o nível de cAMP para produzir a metade da fosforilação máxima do canal.

A dinâmica da condutância  $g_{Ca}$  que aparece na equação (5) é representada pelo produto

$$g_{Ca} = \bar{g}_{Ca} m h \quad (18)$$

entre a condutância máxima  $\bar{g}_{Ca}$  e as variáveis de ativação e inativação  $m \in (0,1)$  e  $h \in (0,1)$ .

A variável de inativação  $h$  segue seu valor  $h_\infty$  com um tempo de relaxação  $\tau_h$ ,

$$\frac{dh}{dt} = \frac{h_{\infty} - h}{\tau_h}, \quad (19)$$

onde

$$h_{\infty} = \frac{1}{1 + e^{(V - V_h)/S_h}}, \quad (20)$$

e

$$\tau_h = \frac{\bar{\tau}_h}{e^{\frac{(V - V_{\tau_h})/S_{\tau_h}^{\tau}}{\tau_h}} + e^{-\frac{(V - V_{\tau_h})/S_{\tau_h}^l}{\tau_h}}}. \quad (21)$$

A dependência de voltagem de  $h$  é estabelecido no potencial de meio máximo  $V_h$ , no tempo máximo de relaxação  $\bar{\tau}_h$ , nas inclinações  $S_h$ ,  $S_{\tau_h}^{\tau}$  e  $S_{\tau_h}^l$  e no potencial para o máximo  $V_{\tau_h}$ . A variável; de ativação  $m$  iguala seu valor de regime permanente  $m_{\infty}$ , dado por

$$m_{\infty} = \frac{1}{1 + e^{-(V - V_m)/S_m}}, \quad (22)$$

onde  $V_m$  e  $S_m$  são, respectivamente, o potencial de meio máximo e a inclinação constante para  $m$ .

Para a corrente  $I_{K,Ca}$ , a condutância  $g_{K,Ca}$  na equação (6) é representada por

$$g_{K,Ca} = \bar{g}_{K,Ca} o p q, \quad (23)$$

onde  $\bar{g}_{K,Ca}$  é a condutância máxima desta corrente e  $o \in (0,1)$  é a variável de ativação que depende da concentração intracelular de cálcio  $[Ca]$ . As variáveis de ativação e inativação são, respectivamente,  $p \in (0,1)$  e  $q \in (0,1)$ .

O comportamento da variável  $o$  é função da concentração de cálcio, segundo a equação

$$o = \frac{1}{1 + e^{-([Ca] - [Ca]_o)/S_o}}, \quad (24)$$

sendo  $[Ca]_o$ , o limite inferior da abertura do canal. A variável  $p$  tem uma dinâmica rápida e controla a dependência de voltagem do canal conforme

$$p = \frac{1}{1 + e^{(V - V_p)/S_p}}, \quad (25)$$

onde  $V_p$  é o potencial de meio-máximo e  $S_p$  é a inclinação. Da mesma forma,  $q$  tem uma dinâmica lenta que obedece uma equação de relaxação como

$$\frac{dq}{dt} = \frac{q_\infty - q}{\tau_q}, \quad (26)$$

onde o valor de regime permanente  $q_\infty$  tem uma inclinação  $S_q$  e um potencial de meio-máximo  $V_q$  definido por

$$q_\infty = \frac{1}{1 + e^{-(V - V_q)/S_q}}, \quad (27)$$

e o tempo de relaxação  $\tau_q$  é uma função em forma de sino do potencial de membrana  $V$  :

$$\tau_q = \frac{\bar{\tau}_q}{e^{(V - V_{r_q})/S_{\tau_q}} + e^{-(V - V_{\tau_q})/S_{\tau_q}}}. \quad (28)$$



O termo  $\bar{\tau}_q$  é o tempo máximo de relaxação, enquanto  $S_{\tau q}$  é a inclinação e  $V_{\tau q}$  é o potencial para o máximo.

A concentração de cálcio livre intracelular aumenta como função da corrente de entrada  $I_{Ca}$  e diminui devido às bombas iônicas e às proteínas de ligação de cálcio ("buffers") como

$$\frac{d[Ca]}{dt} = \alpha I_{Ca} - \beta [Ca]^n, \quad (29)$$

onde  $\alpha, \beta$  e  $n$  são constantes.

A condutância  $g_A$  da corrente dependente de voltagem  $I_A$  da equação (7) é modelada como

$$g_A = \bar{g}_A r^z, \quad (30)$$

onde  $\bar{g}_A$  é a condutância máxima desta corrente e a variável de ativação rápida  $r \in (0,1)$  alcança seu valor de regime permanente

$$r = \frac{1}{1 + e^{(V - V_r)/S_r}}, \quad (31)$$

com uma inclinação  $S_r$  e um potencial de meio-máximo  $V_r$ . A variável  $z$  tem uma dinâmica lenta que obedece uma equação de relaxação como

$$\frac{dz}{dt} = \frac{z_\infty - z}{\tau_z}, \quad (32)$$

onde o valor  $z_\infty$  tem uma inclinação  $S_z$  e um potencial de meio-máximo  $V_z$  segundo

$$z_\infty = \frac{1}{1 + e^{-(V - V_z)/S_z}}, \quad (33)$$

e o tempo de relaxação  $\tau_z$  é uma função em forma de sino do potencial de membrana  $V$ , segundo

$$\tau_z = \frac{\bar{\tau}_z}{e^{-\frac{(V - V_{r_z})/S_{r_z}^\tau}{\tau_z}} + e^{-\frac{(V - V_{\tau_z})/S_{\tau_z}}{\tau_z}}}. \quad (34)$$

O termo  $\bar{\tau}_z$  é o tempo de relaxação constante máximo, enquanto que  $S_{r_z}$  é uma inclinação e  $\tau_z$  é o potencial para o máximo.

### III.3. Os Mensageiros Intracelulares

No segundo módulo são apresentadas as equações que representam o comportamento das diversas proteínas intracelulares presentes no LC.

Como já citado, a formação de receptores ativados  $\mu^*$  se faz pela associação das moléculas de morfina  $m$  com os receptores livres  $\mu$  com taxa  $k_1$ .

Os receptores ativados  $\mu^*$  se ligam às proteínas  $G_i$  e  $G_o$ , quebrando-as nas suas sub-unidades  $\alpha_i$ ,  $\alpha_o$  e  $\beta\gamma$ . Neste processo, o receptor ativado se desprende da molécula de morfina, a chamada redução da afinidade, por causa de uma transformação de conformação na molécula do receptor e, desta forma, este receptor volta a ser livre.

Os receptores ativados, por sua vez, são fosforilados por uma proteína-quinase, aqui representada por  $P_\mu$  perdendo sua capacidade de quebrar as proteínas  $G_s$ . Estes receptores, representados neste trabalho por  $\mu_p$  são sequestrados para o interior da célula, no processo já citado de internalização, e, após sofrer um processo de resensitização, são devolvidos à membrana celular.

Este processo de fosforilação é uma forma do neurônio desenvolver tolerância num curto período de tempo, pois produz a redução da concentração de receptores ativos na membrana do neurônio.

Por outro lado, o processo de resensitização, quando ocorre de forma lenta, também pode representar uma redução dos receptores livres presentes na membrana celular do neurônio, o chamado processo de "down-regulation". Este processo normalmente ocorre em uma escala de tempo maior quando o neurônio já se encontra no estado crônico do vício.

Desta forma, podemos supor que a fosforilação, a internalização e a resensitização (normal ou desacelerada) não são processos diferentes mas fases de um único processo responsável pela sensibilização tanto no estado agudo como no estado crônico do vício.

Portanto, pode-se representar a formação de receptores ativados como:

$$\frac{d[\mu^*]}{dt} = k_1[morf][\mu] - k_2[\mu^*][G_i] - k_3[\mu^*][G_o] - k_4[\mu^*][P_\mu],$$

onde  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  e  $k_4$  são, respectivamente, as constantes de afinidade entre a morfina e o receptor opióide  $\mu$ , o receptor ativado  $\mu^*$  e as proteínas  $G_i$ ,  $G_o$  e  $P_\mu$ .

Já o processo de fosforilação dos receptores ativados  $\mu^*$  depende da concentração da associação da proteína quinase  $P_\mu$  e o receptor ativado  $\mu^*$  com uma constante de afinidade  $k_5$  e da taxa de resensibilização  $k_6$  destes receptores :

$$\frac{d[\mu_p]}{dt} = k_5[\mu^*][P_\mu] - k_6[\mu_p], \quad (36)$$

Da mesma forma o processo de "down-regulation" dos receptores  $\mu$ , pode ser representada como função da taxa  $k_{60}$  de destruição destes receptores :

$$\frac{d[\mu_d]}{dt} = k_{60}[\mu_p], \quad (37)$$

A concentração basal  $\bar{\mu}$  dos receptores opióides presentes num neurônio do LC pode ser representada pelas concentrações disponíveis dos receptores livres, dos

ativados, dos fosforilados e daqueles submetidos ao processo de "down-regulation":

$$\overline{[\mu]} = [\mu] + [\mu^*] + [\mu_p] + [\mu_d], \quad (38)$$

O processo de metabolização da morfina pode ser representada por :

$$\frac{d[morf]}{dt} = -k_7[morf] \quad (39)$$

onde  $k_7$  representa a taxa de metabolização da morfina.

Por sua vez, as proteínas  $G_i$ ,  $G_s$  e  $G_o$  são formadas, respectivamente, pela associação entre as sub-unidades  $\alpha_i$ ,  $\alpha_s$ ,  $\alpha_o$  e as sub-unidades  $\beta\gamma$ .

Quando a morfina se liga ao receptor opióide este se torna ativado ligando-se às proteínas  $G_i$  e  $G_o$ ; estas, por sua vez, passam por um processo de dissociação que resulta na liberação de suas sub-unidades  $\alpha$  das sub-unidades  $\beta\gamma$ .

Após todo um processo, já exposto no Capítulo II, que envolve vários passos bioquímicos ocorre a formação de novas moléculas de proteínas  $G$ ; para tanto, ocorre uma competição entre as sub-unidades  $\alpha$  por uma associação com as sub-unidades  $\beta\gamma$ , que são comuns a todas.

A proteína  $G_s$ , por sua vez, não é dissociada pelos receptores ativados mas apenas participa da competição entre as sub-unidades  $\alpha$  na associação com as sub-unidades  $\beta\gamma$ . Portanto, a formação de proteínas  $G_i$  pode ser formulada como:

$$\frac{d[G_i]}{dt} = k_8[\alpha_i][\beta\gamma] - k_9[\mu^*][G_i] - k_{10}[G_i][\alpha_s] - k_{11}[G_i][\alpha_o], \quad (40)$$

onde o termo  $k_8\alpha_i\beta\gamma$  representa a associação entre as sub-unidades  $\alpha_i$  e  $\beta\gamma$ ;  $k_9\mu^*G_i$  a ligação entre os receptores opióides ativados e a proteína  $G_i$ ;  $k_{10}G_i\alpha_s$  a ligação das sub-unidades  $\alpha_s$  com as sub-unidades  $\beta\gamma$  de  $G_i$  e  $k_{11}G_i\alpha_o$  a ligação entre  $\alpha_o$  e as sub-unidades  $\beta\gamma$  de  $G_i$ .

Cabe salientar que o primeiro termo é responsável pela formação de proteínas  $G_i$  enquanto que os demais simulam as diminuições na concentração das proteínas  $G_i$  decorrentes da ligação ou entre receptores opióides ativados e a proteína  $G_i$  ou entre sub-unidades  $\alpha$  de outras proteínas  $G$  e sub-unidades  $\beta\gamma$  da proteína  $G_i$  durante o processo que se segue à dissociação ocorrida pela ação da morfina nos neurônios do LC.

Da mesma forma, a variação de concentração de proteínas  $G_o$  ao longo do tempo pode ser formulada como :

$$\frac{d[G_o]}{dt} = k_{12}[\alpha_o][\beta\gamma] - k_{13}[\mu^*][G_o] - k_{14}[G_o][\alpha_s] - k_{15}[G_o][\alpha_i], \quad (41)$$

onde os quatro termos são responsáveis, respectivamente, pela formação de proteína  $G_o$  e os demais significam as perdas pela ligação de proteínas  $G_o$  com receptores opióides ativados ou de sub-unidades  $\alpha$  de outras proteínas  $G$  com as sub-unidades  $\beta\gamma$  de  $G_o$ .

Finalmente, a concentração das proteínas  $G_s$  ao longo do tempo é definida como:

$$\frac{d[G_s]}{dt} = k_{16}[\alpha_s][\beta\gamma] - k_{17}[G_s][\alpha_i] - k_{18}[G_s][\alpha_o], \quad (42)$$

onde a formação de proteína  $G_s$  é controlada pelo primeiro termo diminuída pelos termos que simulam as ligações entre sub-unidades  $\alpha$  das proteínas  $G_i$  e  $G_o$  e as sub-unidades  $\beta\gamma$  da



proteína  $G_s$  que se dissociam quando a célula está sob o efeito da morfina.

Como sabemos, a sub-unidade  $\beta\gamma$  é comum a todas as proteínas G, portanto, a concentração basal disponível - aqui representada por  $\overline{\beta\gamma}$  - num determinado instante de tempo é uma função das concentrações destas sub-unidades em todas as proteínas G, mais a concentração desta sub-unidade, que pelo efeito da droga se encontra dissociada de qualquer uma das proteínas G:

$$\overline{[\beta\gamma]} = [G_i] + [G_s] + [G_o] + [\beta\gamma]. \quad (43)$$

Da mesma maneira, a concentração máxima basal disponível das diversas sub-unidades  $\alpha$  - representadas aqui por  $\overline{\alpha}$  - podem ser pensadas como devido àquelas que se associam às sub-unidades  $\beta\gamma$  para a formação das proteínas G acrescidas daquelas, que por estarem dissociadas das sub-unidades  $\beta\gamma$ , permanecem livres no citoplasma; então, a variação de suas concentrações podem ser definidas como :

$$\overline{[\alpha_i]} = [G_i] + [\alpha_i] \quad (44)$$

$$\overline{[\alpha_s]} = [G_s] + [\alpha_s] \quad (45)$$

$$\overline{[\alpha_o]} = [G_o] + [\alpha_o] \quad (46)$$

Como já vimos no Capítulo anterior a ativação da proteína adenilato ciclase (AC) num determinado instante de tempo é função da concentração da adenilato ciclase ativada no seu estado basal, representada por  $\overline{AC}^*$ , ou seja, a concentração de AC que se encontra ativada quando os neurônios do LC estão funcionando normalmente sem a influência de morfina, menos a concentração de adenilato ciclase AC que sofre alteração quando a célula vier a sofrer a ação da morfina, diminuída ainda da concentração das sub-unidades  $\alpha_i$ , que exercem um efeito inibitório na sua produção, acrescida da concentração das sub-unidades  $\alpha_s$  que funcionam como ativadoras na produção da adenilato ciclase, resultando então a seguinte equação :

$$\frac{d[AC^*]}{dt} = [\overline{AC^*}] - [AC^*] + k_{19}[\alpha_s] - k_{20}[\alpha_i] \quad (47)$$

Todo este processo da ativação da adenilato ciclase, mais o relativo à produção do AMP cíclico, está representado de maneira simplificada na Figura 8.

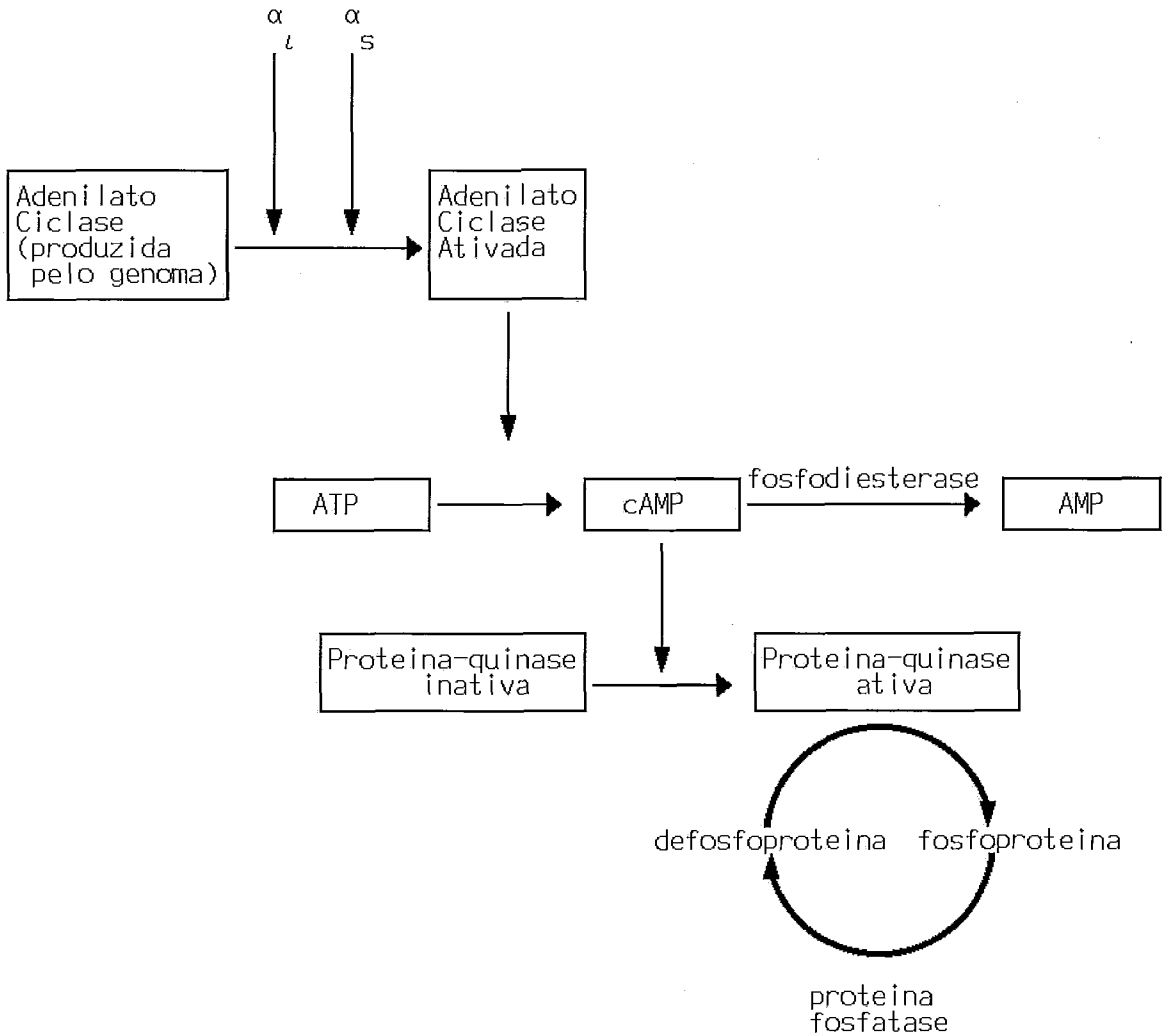


Figura 8. Esquema de reações bioquímicas envolvendo as subunidades  $\alpha_i$ ,  $\alpha_s$ , adenilato ciclase, AMP cíclico e proteínas quinase.

A formação de AMP cíclico se dá pela influência da adenilato ciclase ativada que age como um catalizador da reação da conversão de trifosfato de adenosina (ATP) em AMP cíclico; este por sua vez, pode ser novamente convertido a AMP e deste novamente a ATP, reações estas catalizadas por enzimas como a cAMP-fosfodiesterase.

Por outro lado, como se pode observar na Figura 8, parte da concentração de AMP cíclico serve ainda como catalizador da ativação das proteínas quinase dependentes de AMP cíclico, levando-as de um estado inativo a um estado ativo quando catalisam a produção das fosfoproteínas.

Pode-se, portanto, formular as equações de produção de cAMP como uma função da concentração de  $AC^*$  que converte ATP em cAMP - representado pelo termo  $k_{21}[AC^*]$  - menos parte da concentração de cAMP ou que retorna a AMP sob a ação de cAMP-fosfodiesterase ou que é utilizada para ativar as proteínas quinase dependentes de AMP cíclico - representado pelo termo  $k_{22}[cAMP]$  :

$$\frac{d[cAMP]}{dt} = k_{21}[AC^*] - k_{22}[cAMP]. \quad (48)$$

Por sua vez, a formação de proteína quinase dependente de cAMP ativada como função do tempo - representada neste trabalho por  $PQ^*$  - pode ser pensada como função da concentração de proteínas-quinase inativas - representada por  $PQ$  - e que podem ser ativadas pelo cAMP, menos a concentração de proteínas-quinases dependentes de cAMP ativadas que agem como catalisadoras das defosfoproteínas no processo de fosforilação para a formação das fosfoproteínas :

$$\frac{d[PQ^*]}{dt} = k_{24}[PQ][cAMP] - k_{25}[PQ^*]. \quad (49)$$

Pode-se da mesma forma se supor que a concentração basal máxima disponível de proteínas-quinases ( $\overline{PQ}$ ) é função da concentração das proteínas quinase inativas acrescida da concentração das proteínas quinase ativadas pelo AMP cíclico, ou seja :

$$\overline{PQ} = [PQ] + [PQ^*] . \quad (50)$$

O modelo proposto por NESTLER (1993) e apresentado na Figura 6 sugere que a morfina exerce seu efeito agudo

inicial na rota do AMP cíclico através da inibição da proteína adenilato ciclase e as alterações resultantes desta ação provocariam o decréscimo do estado de fosforilação do CREB. A regulação exercida nestas proteínas ocorreria rapidamente, isto é, em minutos.

Desta forma, a regulação produzida pelo efeito da morfina na fosforilação de CREB poderia contribuir para as mudanças na expressão das proteínas G e dos sistema AMP cíclico nesta região do cérebro (NESTLER, 1992).

Estes resultados elevam a possibilidade de que a administração crônica de morfina pode aumentar a quantidade total de CREB, que também poderia contribuir para as mudanças de transcrição associadas com o vício pela morfina (NESTLER, 1993). Desta forma, ao contrário de CREB, a família de fatores de transcrição Fos/Jun tende a ser expressada em níveis menores sobre condições basais.

Assim a fosforilação de CREB, pelas proteínas quinase dependentes de AMP cíclico, regulariam os efeitos dos sinais extracelulares na expressão de Fos (SHENG et al., 1991). Como este mecanismo requer síntese proteica, ele seria mais lento que o primeiro, de tal forma que as alterações esperadas na expressão dos genes Fos/Jun só ocorreriam num período de 30 a 60 minutos após o estímulo inicial.

HAYWARD *et al.*, (1990) concluíram que as mudanças observadas em Fos e nos níveis de ligação com AP-1 são consistentes com a possibilidade que o aumento dos níveis de expressão das proteínas G e do sistema cAMP no LC durante o tratamento crônico poderia ser mediado em algum grau, via níveis reduzidos de Fos, e que o retorno dos níveis de expressão para estas proteínas intracelulares em direção aos níveis de controle durante a abstinência poderia ser alcançado como um resultado da expressão elevada de Fos.

Baseados nestes resultados o modelo proposto neste trabalho tem como principal suposição que a ação exercida pela morfina, nas sucessivas doses a que o neurônio é submetido, provoca no decorrer do tempo alterações nas concentrações basais das sub-unidades  $\alpha_1$  como consequência de mudanças na expressão gênica desta sub-unidade. Desta forma, a progressiva passagem do neurônio do estado agudo para o estado crônico do vício provoca aumentos nas concentrações das proteínas presentes no citoplasma.

Segundo NESTLER (1993) estes aumentos de até 35% seriam, pela suposição do modelo proposto, provocados única e exclusivamente pela alteração na expressão gênica e por consequência na concentração basal da sub-unidade  $\alpha_1$ . Desta maneira, a concentração da família de fatores de transcrição

CREB fosforilados, CREBf, num determinado instante de tempo, pode ser modelado como uma função da ação das proteínas quinase dependentes de AMP cíclico sobre as moléculas livres de CREB diminuída a parcela da concentração que está ou agindo como fator de transcrição de Fos ou como fator de transcrição na transdução dos genes das várias proteínas do neurônio:

$$\frac{d[CREBf]}{dt} = k_{26}[PQ^*][CREB] - k_{27}[CREBf] \quad (51)$$

onde  $k_{26}$  representa a constante de afinidade entre  $PQ^*$  e CREB e  $k_{27}$  a parcela de CREBf que funciona como fator de transcrição.

A quantidade máxima disponível de proteínas quinases ( $\overline{\overline{CREB}}$ ) se distribui pelas CREB livres inativas (CREB) e as fosforiladas ( $CREB_f$ ) :

$$\overline{\overline{CREB}} = CREB + CREB_f \quad (52)$$

Como citado por NESTLER (1993b) a fosforilação de CREB pelas proteínas quinases dependentes de cAMP mediam o efeito dos sinais extracelulares na expressão de FOS, então a quantidade de fatores de transcrição c-FOS/JUN transcritos é



função da maior ou menor habilidade de CREB em permitir a transcrição de c-FOS/JUN.

Se supormos que a concentração dos fatores de transcrição c-FOS/Jun - representado por [Fos] - pode ser escrita pela função sigmóide representando saturação da produção deste composto:

$$\frac{d[Fos]}{dt} = k_{28} \left\{ \frac{2}{1 + e^{-\gamma_r \{([CREBf] - [CREBfb]) - (Th_r * gene)\}}} - 1 \right\}, \quad (53)$$

onde  $k_{28}$  é uma constante do modelo,  $\gamma_r$  controla a inclinação da sigmóide, [CREBf] representa a concentração de CREB fosforilado, [CREBfb] representa a concentração basal de CREBf,  $T_{hr}$  representa o limiar da função sigmóide e a função *gene* é definida por outra sigmóide que descreve a ativação genética da forma:

$$gene = \frac{1}{1 + e^{-\gamma_g ([CREBf] - [Fos] - T_{hg})}} \quad (54)$$

onde  $\gamma_g$  controla a inclinação da sigmóide e  $T_{hg}$  representa o ponto de ativação do gene.

Finalmente, a função que define a concentração basal  $\overline{(\alpha_i(t))}$  das sub-unidades  $\alpha_i$ , em um dado instante de tempo, pode ser formulada como função do disparo genético:

$$\overline{[\alpha_i]}(t) = (k_{gene} * gene + 1) \overline{[\alpha_i]} \Big|_{t=0}. \quad (55)$$

onde  $k_{gene}$  é uma constante do modelo,  $gene$  é a função definida anteriormente e  $\overline{[\alpha_i]} \Big|_{t=0}$  representa a concentração basal da sub-unidade  $\alpha_i$  no tempo zero.

### III.4 - A Programação Computacional

Para a simulação do modelo, escreveu-se um programa de computador na linguagem FORTRAN. O programa foi compilado e executado em equipamentos compatíveis com IBM-PC com processador Intel DX4 de 100 MHz e, mais recentemente, com processador Pentium de 90 MHz.

Para a obtenção dos resultados das simulações o processo foi dividido em duas etapas: na primeira, construímos um programa de computador que fosse capaz de simular todo o comportamento das proteínas presentes no citoplasma e no núcleo do neurônio, quando submetidas à ação da morfina - nos casos agudo e crônico - e, na segunda, complementamos os resultados aplicando os dados obtidos na primeira etapa, como dados de entrada no programa computacional desenvolvido por DIOGO (1995) para simularmos o comportamento do neurônio no nível da membrana celular, obtendo, desta forma, o número de spikes/minuto produzido pelo neurônio.

A primeira etapa foi composta de várias fases e, em entre todas, seria importante ressaltar aquela que consistiu na escolha adequada dos valores iniciais para as concentrações tanto das doses de morfina, como de todas as concentrações das proteínas envolvidas e, principalmente, das constantes de afinidade entre elas, além das taxas de aumento e ou decréscimo destas mesmas proteínas - os parâmetros representados em todas as equações pela letra  $k$ . Os valores

que melhor se adequaram ao modelo proposto são mostrados no Apêndice no final deste trabalho.

Esta fase, em todo processo de simulação, é a mais demorada pois como todas as equações estão de alguma forma relacionadas, a simples alteração de um dos parâmetros pode modificar o comportamento de todo o resultado. Desta forma, a obtenção de um resultado de simulação compatível com as conclusões das pesquisas efetuadas em laboratório foi o nosso maior desafio.

Na etapa seguinte, os resultados relativos às alterações nas concentrações dos mensageiros intracelulares, quando submetidos à ação da morfina do modo agudo ou crônico, foram utilizados para simular o comportamento do neurônio quanto as correntes elétricas da membrana celular e, como consequência, foi obtido o número de spikes do neurônio.

Todos os resultados obtidos nas diversas séries de simulação serão apresentados posteriormente em forma de gráficos para podermos analisar como a ação da morfina pode alterar o comportamento do neurônio tanto no estado agudo como no estado crônico do vício.

As várias simulações visaram demonstrar que o modelo está plenamente adequado às observações laboratoriais sendo capaz de simular:

- A tolerância e a crise de abstinência observada no neurônio quando submetido a seguidas doses de morfina;
- A diminuição do número de receptores opióide na superfície celular;
- A queda no número de spikes emitidos pelo neurônio a cada dose a que é submetido e o retorno que se dá sempre em níveis superiores aos observados quando no estado basal;
- O aumento gradativo da expressão gênica da sub-unidade  $\alpha_i$  é capaz de reproduzir, ao final de uma série de doses, o estado crônico de vício do neurônio;
- A dose de droga necessária para produzir o mesmo número de spikes do estado basal deve ser consideravelmente aumentada;
- O número de doses de morfina a que o neurônio foi submetido tem relação direta com o tempo necessário para que o neurônio - sem ter novamente contato com a droga - possa retornar aos níveis basais e, finalmente,
- O aumento da concentração das sub-unidades  $\alpha_s$  é capaz de reduzir o tempo das crises de abstinência observadas no comportamento do neurônio.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS E DISCUSSÃO DAS SIMULAÇÕES

#### UTILIZANDO O MODELO PROPOSTO

##### IV.1 - *Discussão dos Resultados*

A primeira simulação teve por objetivo mostrar o comportamento do neurônio quando submetido a uma série de doses não suficientes para produzir o vício. Porém, como é de se esperar mesmo um número reduzido de doses já possibilita a observação do aparecimento de tolerância à morfina pelo neurônio.

Para tanto, o neurônio foi submetido a uma série de cinco doses de morfina com concentrações constantes no valor de 100  $\mu\text{M}$ , que constitui a dose utilizada em experimentos laboratoriais (DUMAN et al., 1988)

A simulação foi feita num tempo total de 1000 minutos e as doses foram dadas nos tempos de 5, 100, 200, 300 e 400 minutos.

Este espaçamento entre as doses foi feito para permitir que toda a dose de morfina a que o neurônio foi

submetido pudesse ser metabolizada - o que ocorre em aproximadamente 60 minutos - antes que o neurônio viesse a ter contato novamente com a droga.

A partir da última dose ocorrida no 400º minuto após o início da simulação, o neurônio não foi submetido a nenhuma outra dose de droga; isto permitiu que se observasse o seu comportamento até o milésimo minuto.

Os resultados relativos às alterações ocorridas no número de spikes por minuto do neurônio são apresentados nas Figura 9.

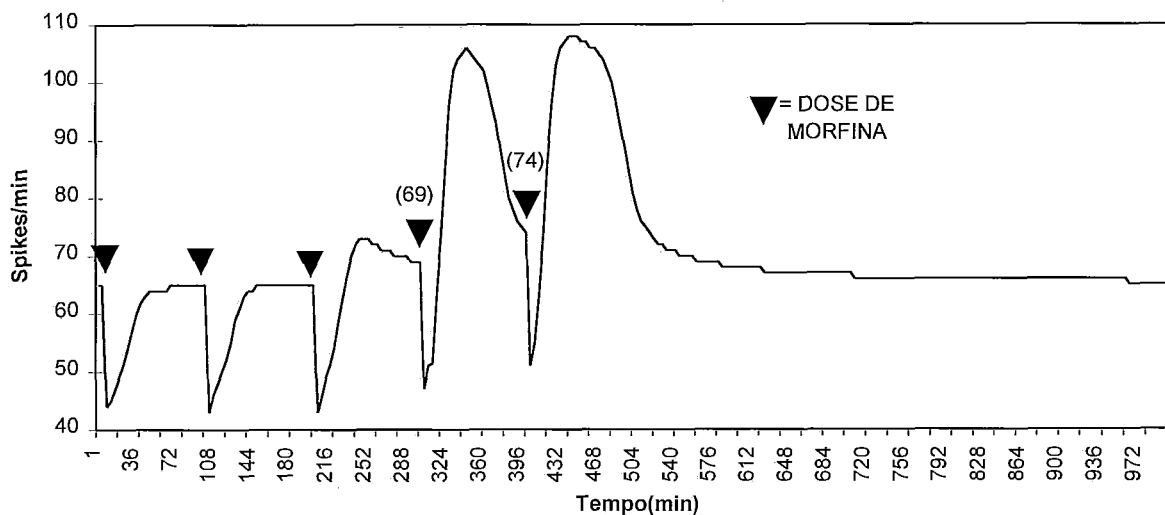


Figura 9. Variação do número de spikes/minuto quando o neurônio é submetido a cinco doses de morfina.

Os resultados apresentados na Figura 9 permitem concluir que o neurônio, mesmo tendo sido submetido a apenas

cinco doses de morfina, já apresenta tolerância à droga. Isto pode ser observado, a partir da terceira dose, quando o número basal de spikes de cerca de 65 spikes/minuto - que se repete após as três primeiras doses - apresenta um aumento progressivo, alcançando na quarta dose mais de setenta spikes e mais de 105 spikes já na quinta dose da droga, evidenciando o processo de tolerância à droga. A partir deste ponto o neurônio não foi submetido a novas doses e retorna ao nível basal de spikes de maneira natural.

Os resultados relativos às alterações ocorridas, respectivamente, nas concentração de cAMP e da sub-unidade  $\alpha_i$  total são apresentados nas Figuras 10 e 11.

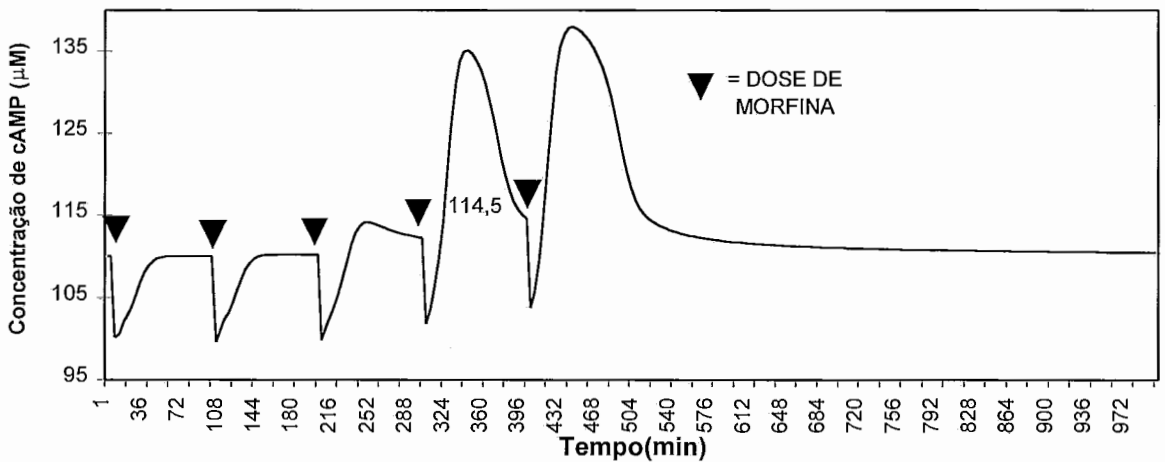


Figura 10. Variação da concentração de cAMP quando o neurônio é submetido a cinco doses de morfina.



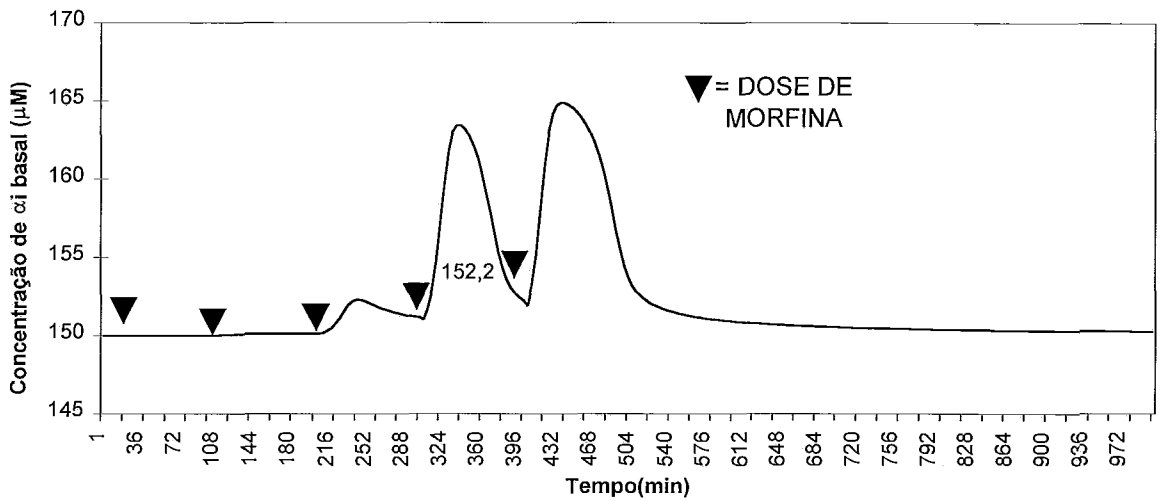


Figura 11. Variação da concentração de  $\alpha_i$  total quando o neurônio é submetido a cinco doses de morfina.

Nas três primeiras doses de morfina observa-se que a concentração de AMP cíclico tem um decréscimo de cerca de 10%, compatível com os experimentos de DUMAN *et al.*, (1988) e, a seguir, retorna para valores próximos do basal. A partir daí, a concentração de cAMP teve seus níveis aumentados acompanhando o aumento havido na concentração da sub-unidade  $\alpha_i$  total a partir do mesmo ponto. Nas doses seguintes os níveis de cAMP e de  $\alpha_i$  atingem níveis ainda mais altos e retornam aos níveis basais quando o neurônio não é mais submetido a novas doses da droga.

A explicação das variações havidas para mais e para menos nos níveis destas duas proteínas é que a cada dose de morfina os níveis sofrem decréscimo por influência da droga; como resultante entre o aumento ocasionado pela expressão gênica e o decréscimo provocado pela droga é que dá este padrão de comportamento observado para estas substâncias.

Os resultados relativos às alterações na concentração de receptores  $\mu$  livres são apresentados na Figura 12.

Como podemos observar na Figura 12, após cada uma das doses a concentração dos receptores  $\mu$  livres sofre um leve decréscimo como resultado do processo de "down-regulation" que as células são submetidas quando em contato com a morfina.

Desta forma, nesta simulação o modelo pode reproduzir os fenômenos de tolerância à droga, as alterações ocorridas nas concentrações de cAMP, das sub-unidades  $\alpha_i$  e dos receptores  $\mu$  livres, além daquelas havida no número de spikes do neurônio.

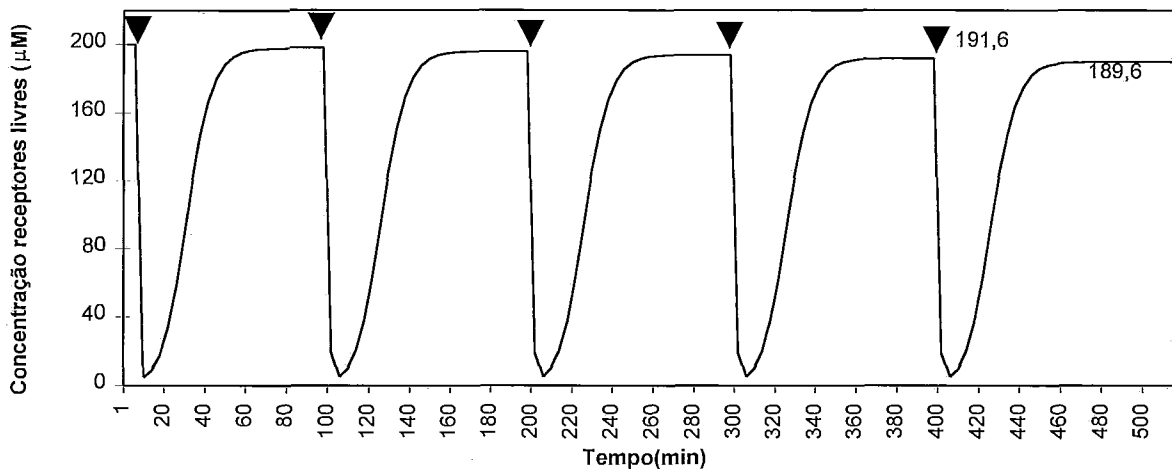


Figura 12. Variação da concentração de receptores  $\mu$  livres quando o neurônio é submetido a cinco doses de morfina.

A segunda série de simulações foi feita com o objetivo de sabermos se o aumento de uma das doses de morfina, administrada numa série de cinco delas, seria capaz de fazer o neurônio retornar, senão totalmente, pelo menos próximo aos níveis basais quanto ao número de spikes.

Para tanto, o neurônio foi submetido a uma série de cinco doses de morfina com concentrações constantes de 100  $\mu\text{M}$  nas primeiras quatro doses e uma dose de 150  $\mu\text{M}$  na quinta delas. Como sabemos o estado de tolerância se caracteriza pela necessidade do consumo de concentrações cada vez mais elevadas da droga para que se obtenha o mesmo efeito produzido no início do processo de vício, desta forma, o aumento de 50% em uma das doses desta simulação teve o objetivo de se observar o

efeito produzido por este repentino aumento na quantidade de droga oferecida no comportamento do neurônio.

Como na simulação anterior o tempo total de simulação foi de 1000 minutos e as doses foram dadas nos tempos de 5, 100, 200, 300 e 400 minutos, para que toda a dose da droga pudesse ser metabolizada antes que o neurônio viesse a ser submetido a uma nova dose.

A partir da última dose ocorrida no 400<sup>o</sup> minuto o neurônio não foi submetido a nenhuma outra dose de droga, o que permitiu que se observasse o comportamento de todas as proteínas em estudo até o final do experimento.

Esta simulação difere da anterior apenas pelo aumento da concentração de morfina na quinta dose para 150  $\mu\text{M}$  e o resultado relativo ao número de spikes/minuto apresentado pelo neurônio é apresentado na Figura 13.

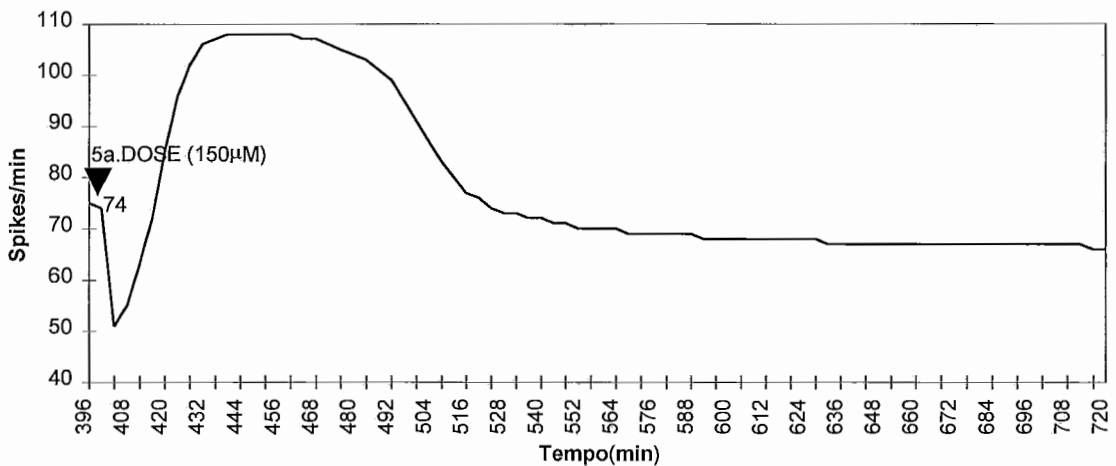


Figura 13. Variação do número de spikes/minuto quando o neurônio é submetido a cinco doses de morfina de concentrações diferentes.

Os resultados apresentados na Figura 13 permitem observar um comportamento similar ao da simulação anterior quanto ao aspecto de tolerância e a variação do número de spikes produzidos pelo neurônio como consequência das quatro primeiras doses da droga.

Como já observado na Figura 9, as duas primeiras doses causaram a diminuição do número de spikes/minuto, porém ao final da metabolização da droga o neurônio retornou ao seu valor basal. Só a partir do final da terceira dose é que se observa um aumento do número de spikes/minuto produzido pelo neurônio, inicia-se desta forma o processo de tolerância à droga que se acentua nas duas doses posteriores.

Já a quinta dose, com concentração aumentada em 50% em relação a que o neurônio havia sido submetido, não foi capaz de diminuir significativamente o número de spikes/minuto do neurônio e como pode-se observar causou apenas uma manutenção por um maior período de tempo do número de spikes/minuto, entre o 440<sup>o</sup> e o 480<sup>o</sup> minuto, antes que o neurônio retornasse naturalmente a níveis próximos aos basais por não ter sido submetido a novas doses de morfina.

Os resultados relativos às alterações ocorridas, respectivamente, nas concentração de cAMP e da sub-unidade  $\alpha_i$  total são apresentados nas Figuras 14 e 15.

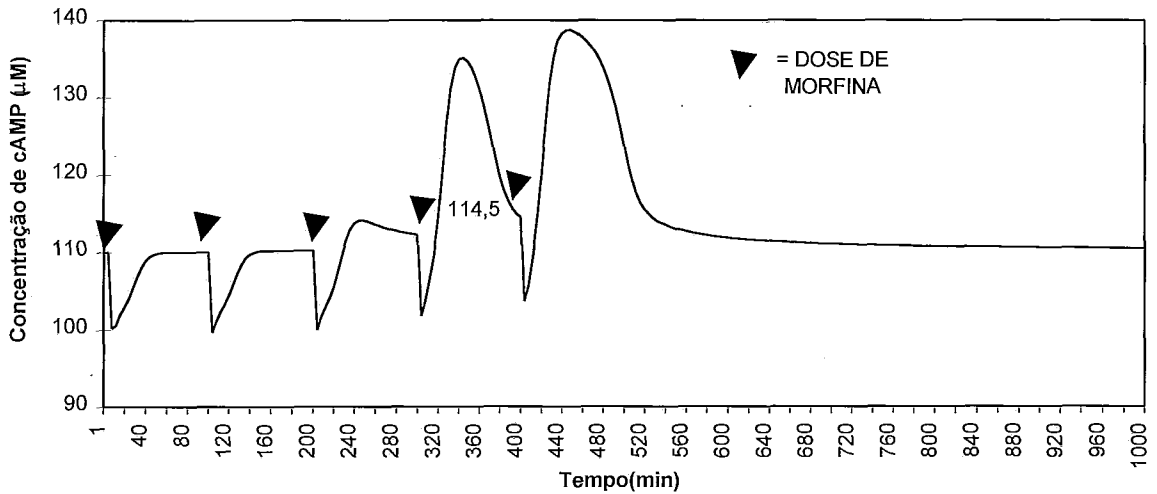


Figura 14. Variação da concentração de cAMP quando o neurônio é submetido a cinco doses de morfina de concentrações diferentes.

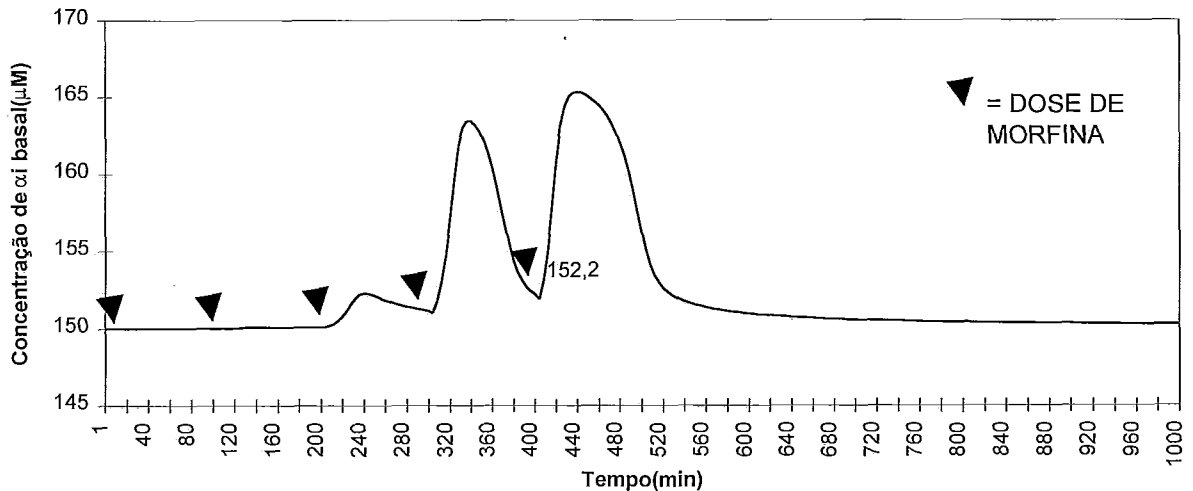


Figura 15. Variação da concentração da sub-unidade  $\alpha_i$  total quando o neurônio é submetido a cinco doses de morfina de concentrações diferentes.

Os resultados apresentados na Figura 14 mostram que o aumento ocorrido na última dose de morfina não foi suficiente para alterar de maneira significativa o comportamento, já observado na simulação anterior, da concentração de cAMP, porque embora ela tivesse seus níveis aumentados, estes apenas seguiram a tendência do acréscimo da concentração da sub-unidade  $\alpha_i$  total a partir da terceira dose.

Nas doses seguintes os níveis de cAMP e da sub-unidade  $\alpha_i$  atingem níveis ainda mais elevados mostrando que já a partir de algumas doses o neurônio já inicia o processo progressivo de alteração das concentrações de suas proteínas intracelulares necessários para a passagem do estado agudo para o estado crônico do vício. Terminado o efeito destas doses o neurônio volta lentamente ao seu estado basal.

Como sabemos cada dose aguda a que o neurônio é submetido provoca a diminuição dos níveis dos mensageiros intracelulares, porém, passado o efeito da droga naturalmente os níveis tendem a retornar a seus valores basais.

Porém, o que observamos em relação aos níveis da sub-unidade  $\alpha_i$  é que cada uma das doses agudas provoca ligeiras alterações na expressão do gene responsável por sua

produção, por outro lado, as variações que se observa nos níveis de cAMP é que, a cada dose aguda, os seus níveis sofrem decréscimo por influência da droga e um acréscimo devido à lenta alteração da expressão gênica das sub-unidades  $\alpha_1$  e deste equilíbrio é que surge o padrão de comportamento das variações observadas nas concentrações destas proteínas.

Os resultados relativos às alterações na concentração de receptores  $\mu$  livres são apresentados nas Figura 16.

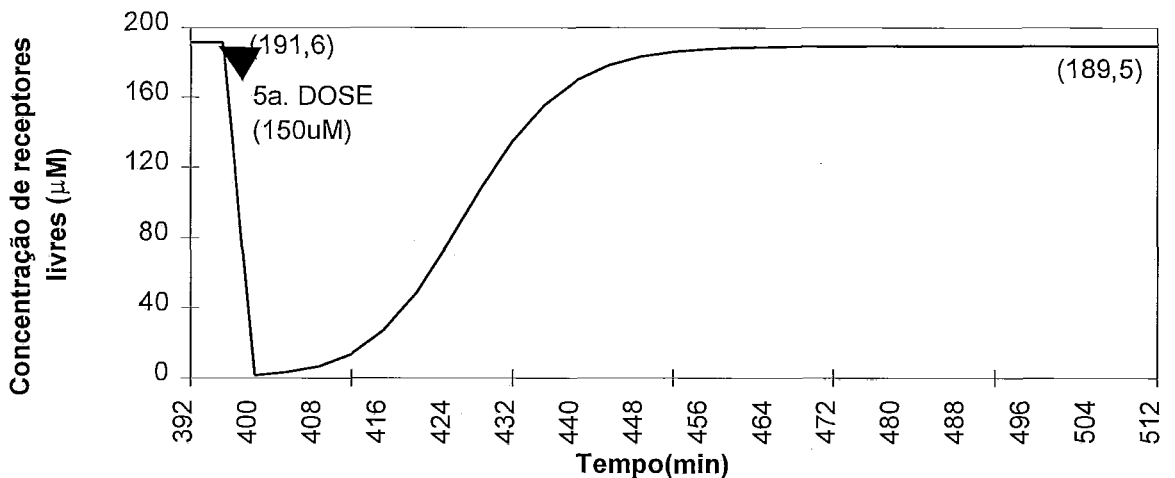


Figura 16. Variação da concentração de receptores  $\mu$  livres quando neurônio é submetido a cinco doses de morfina de concentrações diferentes.

Os resultados mostrados na Figura 16 confirmam que o aumento de apenas uma dose numa série de cinco delas não é



suficiente para que se observasse uma diminuição mais acentuada, do que a mostrada na simulação anterior, da concentração dos receptores  $\mu$  livres, que sofre um decréscimo natural como consequência do processo de "down-regulation" a que os receptores opióides são submetidos quando em contato com a morfina.

Como na simulação anterior, o modelo foi capaz de mostrar os fenômenos de tolerância à droga com consequente variação do número de spikes produzidos pelo neurônio, as alterações nas concentrações de cAMP, das sub-unidades  $\alpha_i$  e dos receptores  $\mu$  livres.

A terceira simulação teve como objetivo observar o comportamento do neurônio quando submetido ao número de doses de morfina suficientes para produzir o estado crônico do vício e, a seguir, este não recebe nenhuma dose adicional.

Para tanto, o neurônio foi submetido a uma série de onze doses de morfina com concentrações constantes no valor de 100  $\mu\text{M}$ . Como na simulação anterior, as doses foram dadas em espaços de tempo de aproximadamente 100 minutos para permitir que toda a dose de morfina fosse metabolizada antes que o neurônio viesse a ter contato novamente com a morfina.

Podemos, com este tipo de simulação, observar como a tolerância à droga se torna cada vez mais acentuada até que o neurônio passe do estado agudo para o estado crônico do vício.

O número de doses necessárias para que o neurônio possa atingir o estado crônico foi obtido a partir de uma série de simulações prévias onde em cada uma delas o número de doses era aumentado e se analisava os resultados para sabermos se o neurônio já havia atingido o estado de vício.

Quando se estabeleceu que pelo nosso modelo eram necessárias onze doses de morfina de igual concentração para levar o neurônio ao estado crônico do vício, foi idealizada esta simulação que mostra todo o processo de alteração nos níveis dos mensageiros intracelulares.

Os resultados desta simulação são mostrados nas Figuras 17 a 19.

Na Figura 17 estão apresentados resultados relativos à variação no número de spikes/minuto apresentados pelo neurônio ao longo da série de doses fornecidas.

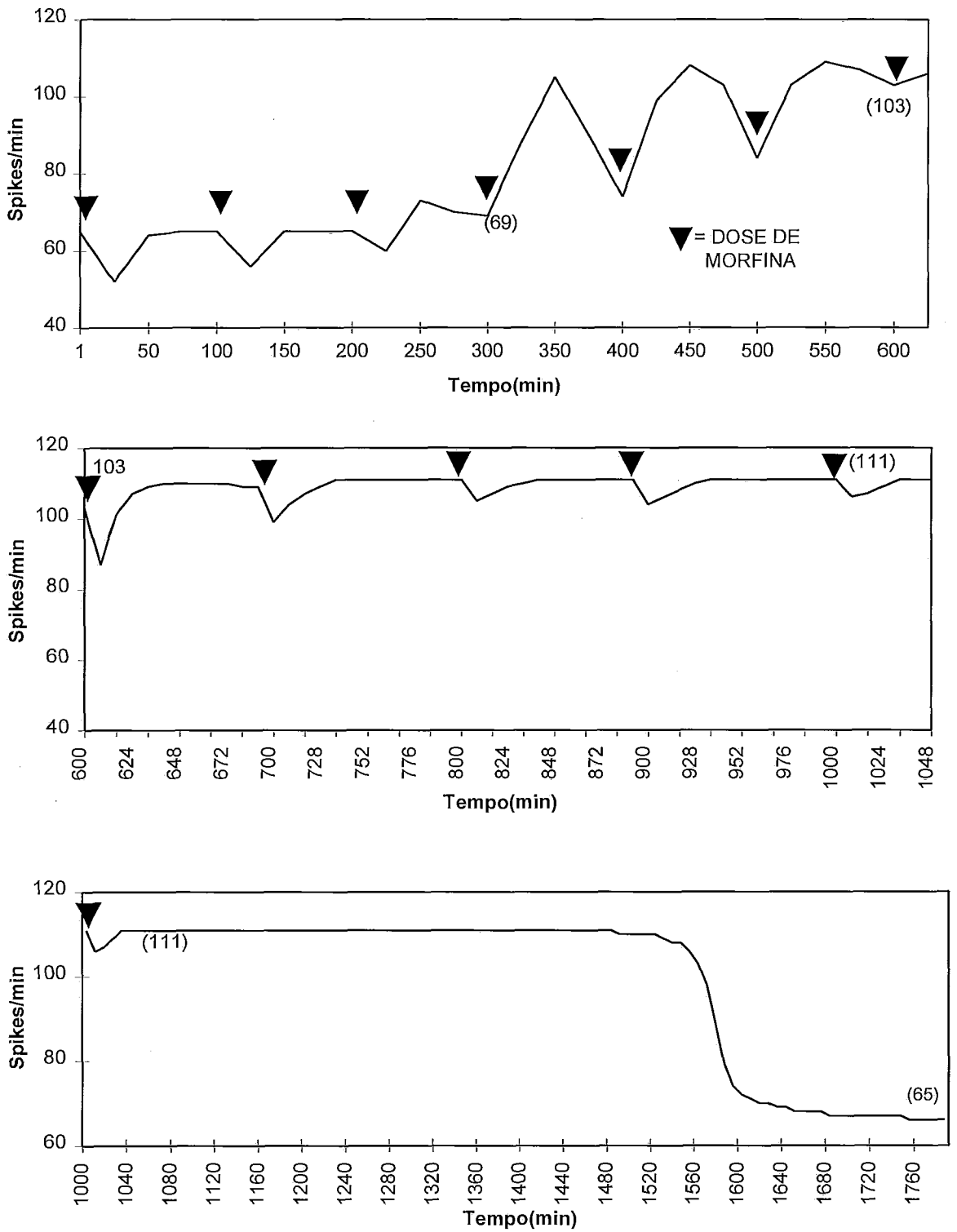


Figura 17. Variação do número de spikes/minuto quando o neurônio é submetido a onze doses de morfina.

A Figura 18 apresenta os resultados relativos à variação da concentração de cAMP quando o neurônio é submetido a onze doses de morfina.

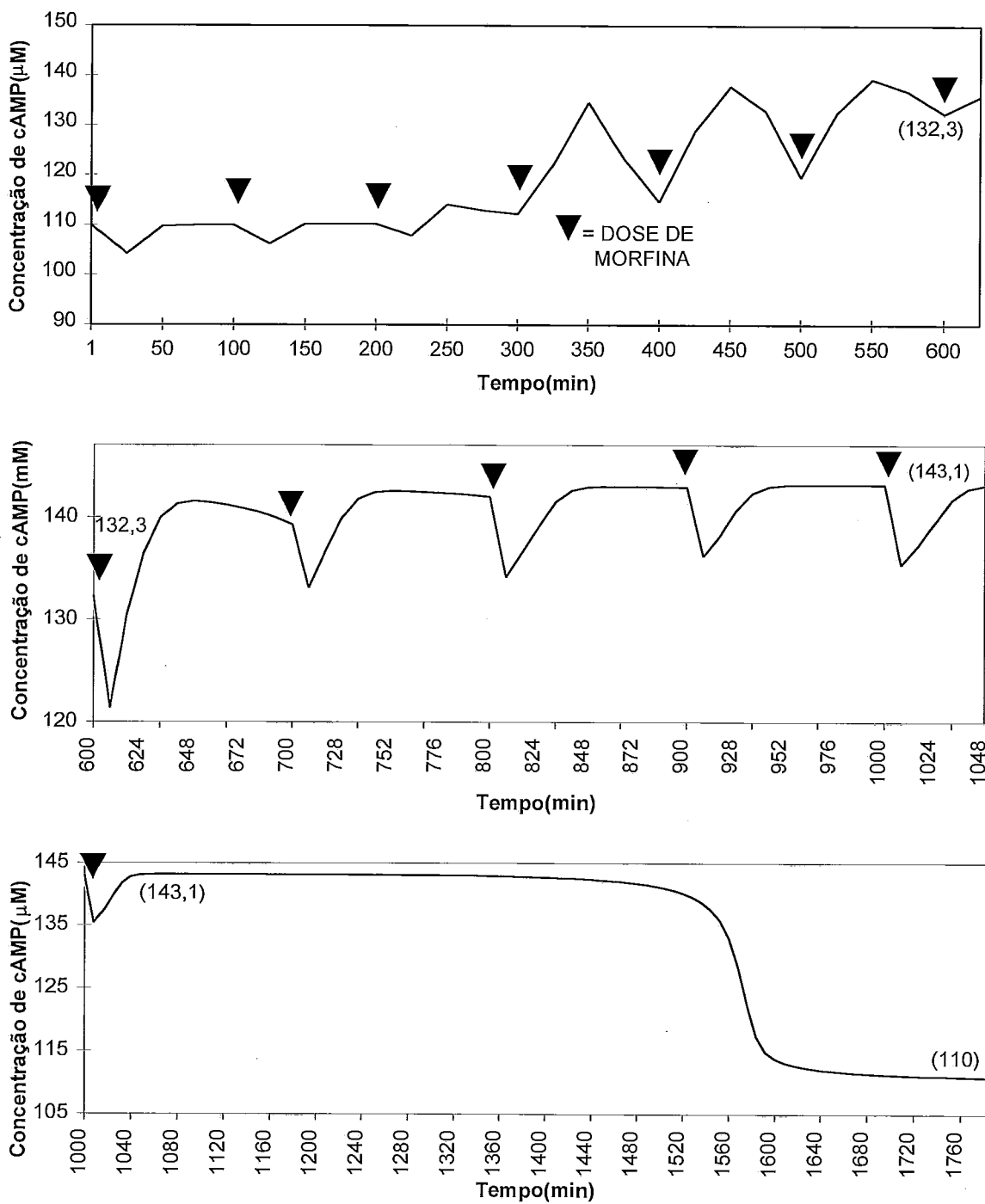


Figura 18. Variação da concentração de cAMP quando o neurônio é submetido a onze doses de morfina.

Na Figura 19 estão apresentados resultados relativos à variação da concentração da sub-unidades  $\alpha_i$  quando o neurônio é submetido a onze doses de morfina.

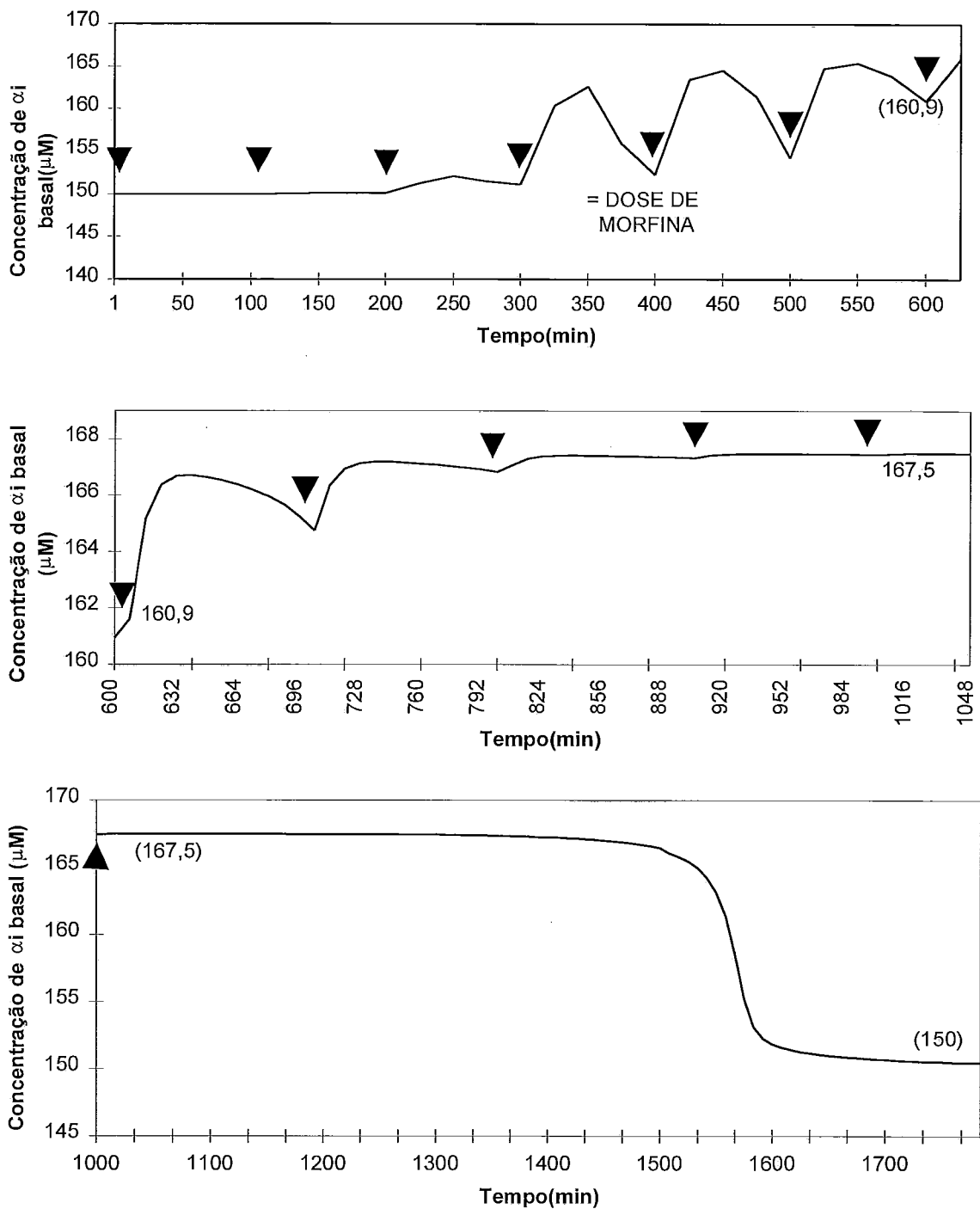


Figura 19. Variação da concentração das sub-unidades  $\alpha_i$  quando o neurônio é submetido a onze doses de morfina.

Na Figura 20 estão apresentados resultados relativos à variação da concentração dos receptores  $\mu$  livres quando o neurônio é submetido a onze doses de morfina.

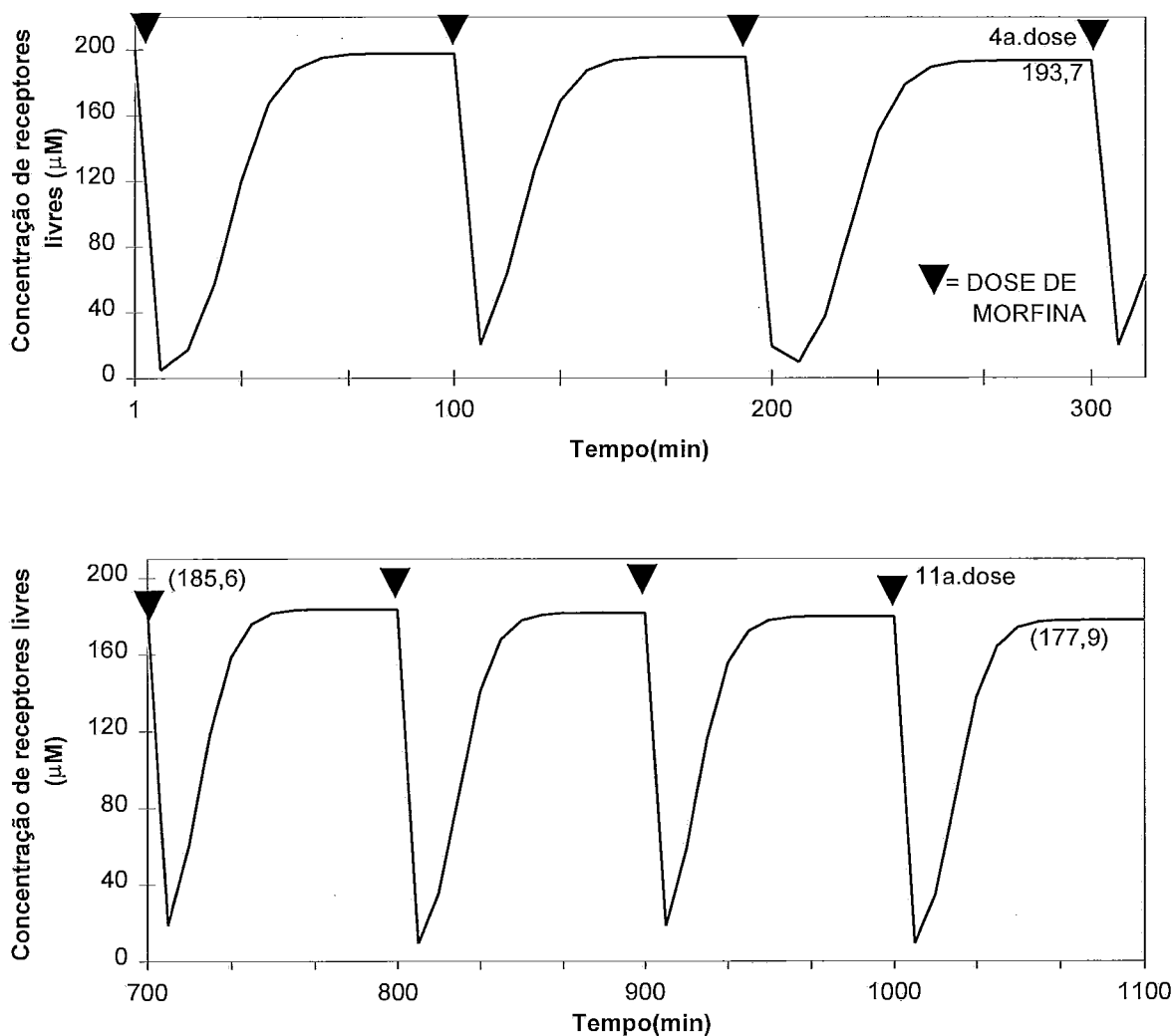


Figura 20. Variação da concentração de receptores  $\mu$  livres quando o neurônio é submetido a onze doses de morfina.

Os resultados apresentados nas Figuras 17 a 20 mostram que o neurônio após submetido a onze doses de morfina passa do estado agudo para o estado crônico do vício.

Como já evidenciado nas simulações anteriores, a tolerância à droga se inicia a partir da terceira dose, pois nas duas primeiras doses o número de spikes/minuto produzidos pelo neurônio decrescem pela ação da droga, atingindo valores inferiores a 65 spikes/minuto, que retornam aos valores basais quando da completa metabolização da morfina.

Quando da terceira dose, o número de spikes/minuto também apresenta valores inferiores ao basal, entretanto, ao final do efeito da droga, este se estabiliza em valores superiores aos basais (65 spikes/minuto), evidenciando o início do processo de tolerância.

A partir daí, cada vez que o efeito da droga se encerra, o valor do número de spikes/minuto aumenta, até que, a partir da sexta dose, nem ao menos o decréscimo provocado pela ação da morfina é capaz de trazer os níveis dos spikes aos seus níveis basais.

Como consequência, o neurônio se mantém em um estado constante de excitação que pode, de certa forma, simular o comportamento observado na realidade em que o indivíduo a procura novamente a droga para minimizar a síndrome de

abstinência e, desta forma, conduzi-lo ao estado crônico do vício.

A simulação mostra ainda que se, logo após atingir o vício, nenhuma nova dose for oferecida ao neurônio, este retorna lentamente os valores do número de spikes/minuto a níveis próximos do basal como decorrência do retorno dos níveis dos mensageiros intracelulares a valores próximos do basal, como veremos a seguir.

Os comportamentos apresentados pelas concentrações de cAMP e da sub-unidade  $\alpha_i$  são, respectivamente, apresentados na Figura 18 e 19.

Como podemos observar as variações ocorridas nas concentrações de cAMP possuem dois momentos distintos: nas doses iniciais a ação da morfina não é capaz de promover uma alteração na expressão gênica da sub-unidade  $\alpha_i$ , como consequência os decréscimos observados nos níveis de cAMP são apenas resultantes da ação da droga, sem que sejam influenciados pela alteração na concentração da sub-unidade  $\alpha_i$ .

A partir da terceira dose já se observa uma ligeira alteração nos níveis da sub-unidade  $\alpha_i$ , que com isto provoca o



início das crises de abstinência pela estabilização dos níveis de cAMP num patamar superior ao seu valor basal.

Com o oferecimento de novas doses da droga a elevação das concentrações ocorre de maneira acentuada para a sub-unidade  $\alpha_1$ , que por sua vez provoca o aumento da concentração de cAMP.

Este processo culmina quando, após as 11 doses a que o neurônio é submetido, os níveis de cAMP se elevam até 35% dos seus valores basais, confirmando os resultados obtidos por inúmeros pesquisadores em experimentos *in vitro* (DUMAN *et al.*, 1988).

A partir do momento que o neurônio atinge o estado crônico do vício este patamar de concentrações é mantido, mesmo não tendo recebido novas doses da droga.

Isto se explica pelo aumento provocado pelas inúmeras doses, administradas de maneira aguda, na concentração das proteínas CREB e pela diminuição nos níveis de c-Fos, que como já citado, são fatores de transcrição que atuam como reguladoras da expressão dos genes responsáveis pela produção da sub-unidade  $\alpha_1$ .

Desta forma, quando cessam as doses da droga o retorno à concentração basal do fator de transcrição c-Fos, que funciona como um repressor, se faz de maneira lenta; com

isso, os níveis de CREB, que funcionam como ativador, continuam elevados proporcionando como resultado a manutenção das concentrações elevadas da sub-unidade  $\alpha_i$ .

Após decorrido um longo período de tempo desde da última dose de morfina, os níveis do fator de transcrição c-Fos retornam a valores que permitem que ele volte a funcionar como um repressor da produção da sub-unidade  $\alpha_i$  e, desta forma, provoquem o retorno desta proteína a seus níveis basais.

O comportamento da variação observada na concentração de cAMP se assemelha ao da sub-unidade  $\alpha_i$ , porque um aumento nos níveis desta proteína provocará, como já explicado neste trabalho, um acréscimo em cadeia nas concentrações de adenilato ciclase e por conseqüência nos níveis do AMP cíclico.

Desta forma, os decréscimos observados nos níveis de cAMP são devidos a ação de maneira aguda sobre seus níveis. Porém, uma vez cessadas as doses o comportamento de cAMP segue o mesmo observado para a sub-unidade  $\alpha_i$  até o retorno aos níveis basais, pela relação existente entre estas duas substâncias.

Nesta mesma simulação podemos observar na Figura 20 que após 11 doses a concentração dos receptores  $\mu$  livres já apresenta um decréscimo muito mais acentuado daquele simulado anteriormente quando o neurônio foi submetido a apenas cinco doses da droga. Podemos concluir desta observação que o modelo é capaz de reproduzir o fenômeno de "down-regulation" a que os receptores são submetidos.

Este experimento tem, portanto, a capacidade de mostrar o comportamento das principais proteínas envolvidas na passagem do estado agudo para o estado crônico do vício, com os fenômenos de tolerância, de abstinência, do vício, da alteração na expressão gênica da sub-unidade  $\alpha_1$  e o retorno aos níveis basais ocorrido pela interrupção do fornecimento de novas doses da droga.

A quarta simulação teve como objetivo observar qual a consequência no tempo necessário para o retorno aos níveis basais de algumas proteínas presentes no neurônio quando este é submetido a 17 doses da droga, que constitui uma vez e meia o número de doses necessárias para provocar o estado crônico nesta célula.

Esta série de doses procura simular o que ocorre quando o indivíduo já se encontrando no estado crônico do vício se submete a novas doses da droga.

Com isso, pôde-se observar o comportamento de todas as proteínas estudadas nos dois estágios do vício e quando há a interrupção do consumo da droga.

Como nas simulações anteriores, o neurônio foi submetido a uma série de 17 doses de morfina com concentrações constantes no valor de  $100 \mu\text{M}$ . As doses foram dadas em espaços de tempo de aproximadamente 100 minutos para permitir que toda a dose de morfina fosse metabolizada antes que o neurônio viesse a ter contato novamente com a morfina.

Os resultados obtidos são mostrados nas Figuras 21 a 24.

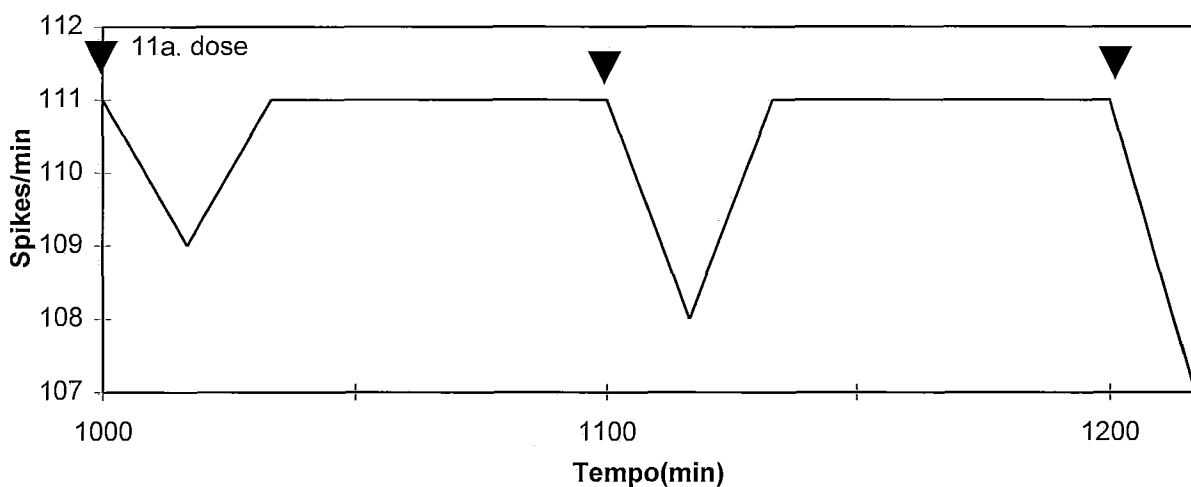


Figura 21. Variação do número de spikes/minuto quando o neurônio é submetido a 17 doses de morfina.

Continuação da Figura 21.

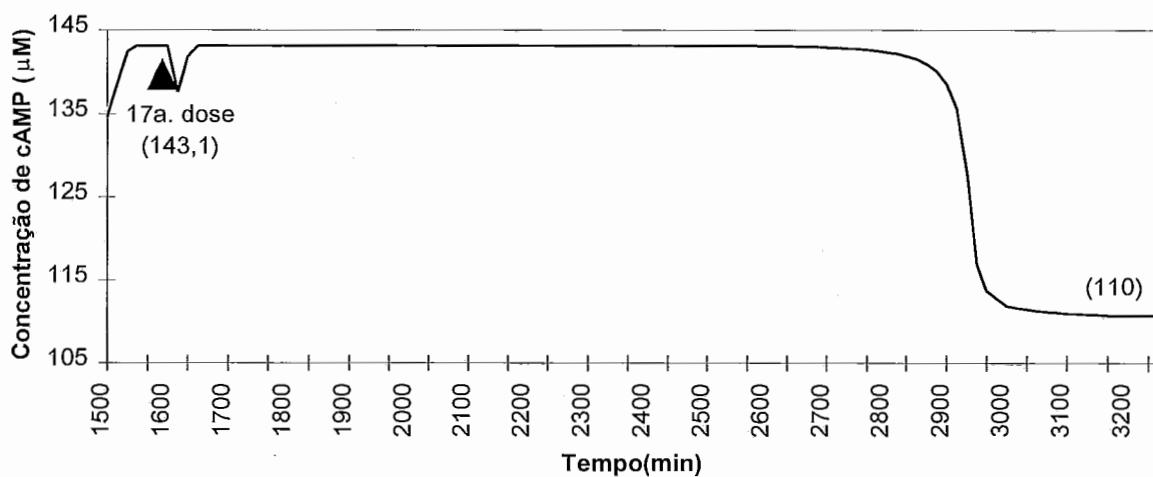
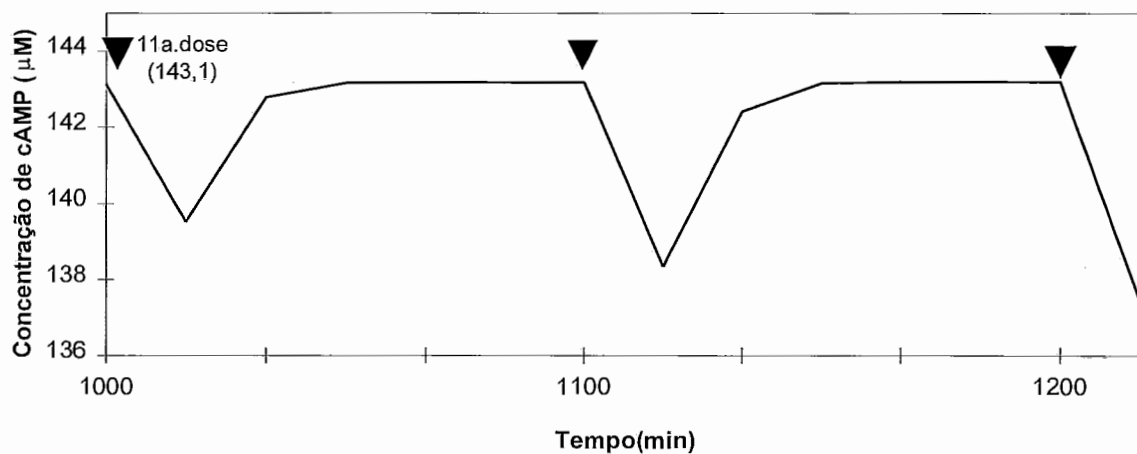
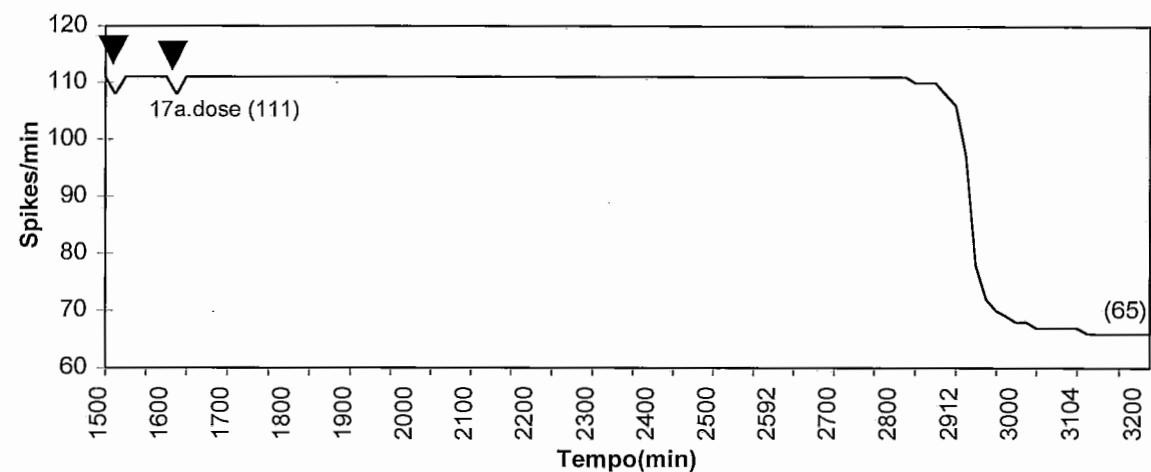


Figura 22. Variação da concentração de cAMP quando o neurônio é submetido a 17 doses de morfina.

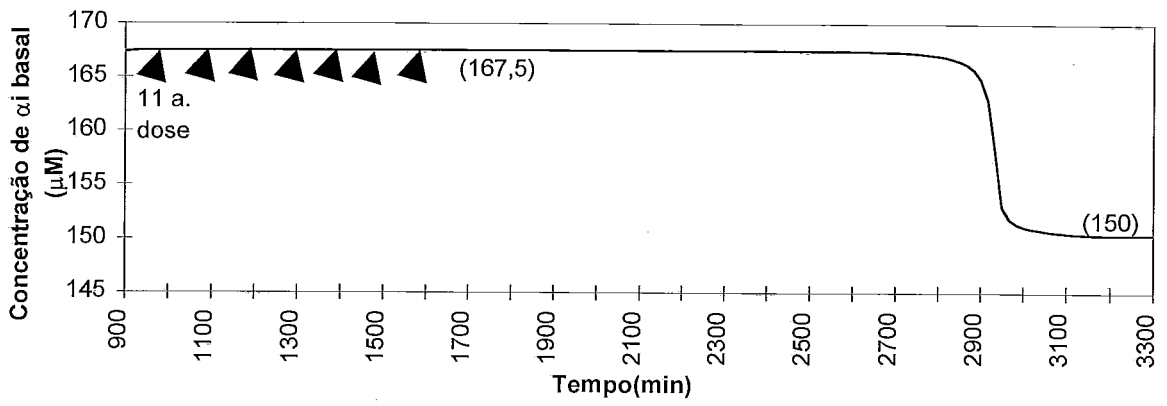


Figura 23. Variação da concentração da sub-unidade  $\alpha_i$  quando o neurônio é submetido a 17 doses de morfina.

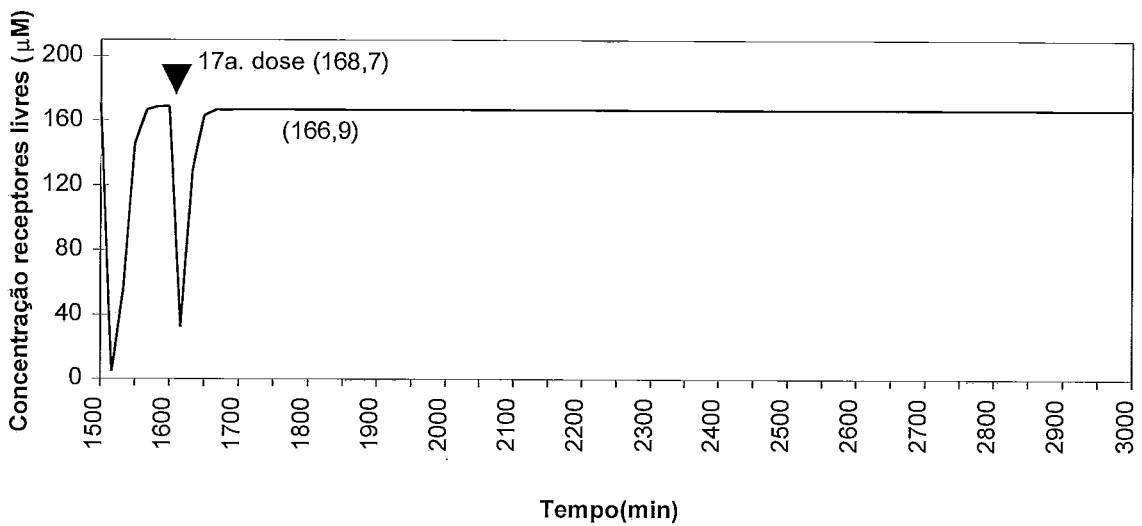
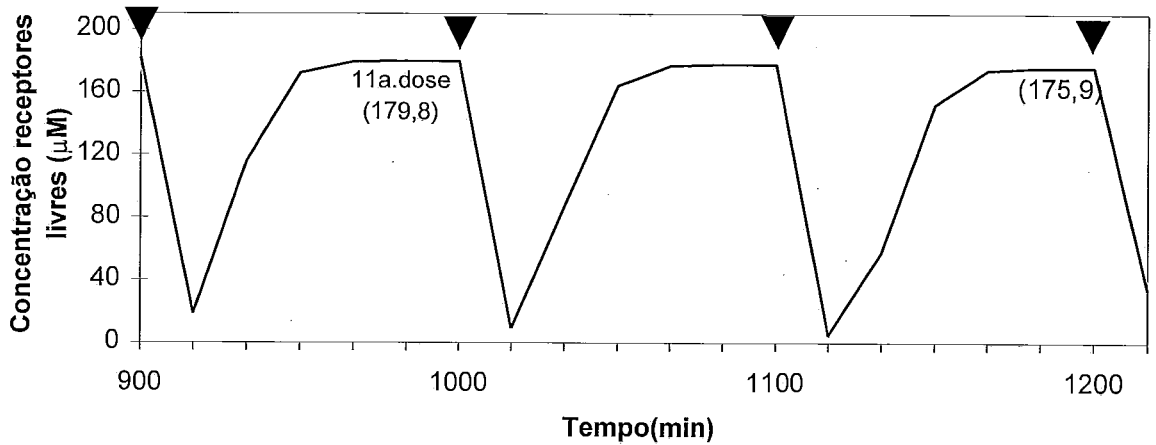


Figura 24. Variação da concentração dos receptores livres quando o neurônio é submetido a 17 doses de morfina.

Os resultados mostrados na Figura 21, relativos ao número de spikes/minuto emitidos pelo neurônio mostram que até alcançar o estado crônico o neurônio se comporta como na simulação anterior (Figura 17).

A partir deste ponto a cada nova dose que o neurônio recebe há o decaimento relativo da ação da droga sobre os mensageiros intracelulares que provocam este comportamento de leve diminuição do número de spikes seguido de retorno ao níveis anteriores.

Para podermos entender quais as conseqüências do neurônio receber doses já na fase crônica do vício, necessitamos analisar o que ocorre com as concentrações de cAMP e da sub-unidade  $\alpha_1$ , cujos resultados são mostrados nas Figuras 22 e 23.

As concentrações de cAMP e da sub-unidade  $\alpha_1$  mostram um comportamento similar até o neurônio atingir o estado crônico do vício (Figuras 18 e 19). A partir daí apenas as concentrações de cAMP sofrem decréscimo pelo efeito da morfina sobre o neurônio, retornando aos valores do estado crônico (Figura 22).

Por outro lado a concentração das sub-unidades  $\alpha_1$  não sofre qualquer alteração (Figura 23), visto que o neurônio se encontra no estado crônico do vício e a sua expressão

gênica se encontra aumentada. Para que a concentração destas sub-unidades retorne aos seus valores basais é necessário que se cesse o fornecimento de novas doses, para que sua expressão gênica possa se normalizar, com o lento retorno aos seus níveis basais.

Neste ponto é que podemos notar a diferença entre esta simulação - onde foram ministradas 17 doses - e a anterior - onde a simulação foi feita com apenas 11 doses: nesta simulação, o tempo necessário para que houvesse o retorno aos níveis basais de cAMP e da sub-unidade  $\alpha_1$  foi cerca de 1500 minutos enquanto que na anterior de apenas 760 minutos, evidenciando um aumento no tempo de recuperação de aproximadamente duas vezes.

Esta constatação mostra uma concordância com o que se espera acontecer quando o indivíduo se submete a inúmeras doses após atingir o estado crônico, ou seja, quanto maior o número de doses consumidas maior seria o tempo necessário para que pudesse retornar ao seu estado normal.

A Figura 24 mostra de maneira ainda mais acentuada o processo de "down-regulation" dos receptores opióides, onde quanto maior o número de doses a que a célula é exposta menor é a concentração de receptores livres na membrana celular, visto que após 11 doses a concentração dos receptores foi



reduzida de 200  $\mu\text{M}$  para 177,9  $\mu\text{M}$  e nesta simulação a concentração foi reduzida para 166,9  $\mu\text{M}$ . Este processo pode ser interpretado como uma defesa contra o aumento de estímulo à célula, pois se houver menos receptores presentes na superfície da membrana menor será a concentração de receptores ativados e conseqüentemente menor alteração na concentração dos mensageiros intracelulares. Esta simulação tem a capacidade adicional de mostrar que, após cessado o fornecimento da morfina, ocorre um aumento de aproximadamente duas vezes no tempo necessário para que a célula possa retornar a seus valores basais, com o acréscimo de apenas 50% no número de doses suficientes para produzir o vício. Com isso pôde-se mostrar que quanto maior o tempo de exposição à droga maior será o tempo necessário para o retorno da célula a seu estado normal.

Na quinta simulação o comportamento do neurônio, quando submetido a seguidas doses de morfina, foi observado em quatro momentos distintos : nas primeiras 11 doses quando passa do estado agudo do vício para o estado crônico; um segundo momento quando já tendo atingido o estado crônico do vício o indivíduo se submete a inúmeras outras doses; um terceiro momento, quando não mais submetido a novas doses, o

neurônio volta lentamente a patamares próximos aos observados no estado inicial e, finalmente um quarto momento, quando o indivíduo tem uma recaída e volta a se submeter a novas doses da droga.

Como na simulação anterior, o neurônio foi submetido a uma série inicial de 17 doses de morfina com concentrações constantes no valor de 100  $\mu\text{M}$  e as doses foram dadas em espaços de tempo de 100 minutos para permitir que toda a dose de morfina fosse metabolizada antes que o neurônio viesse a ter contato novamente com a droga. Após o retorno do número de spikes do neurônio a valores próximos do basal, este é submetido a mais onze doses da droga.

Como nos demais casos, esta simulação pode nos fornecer informações importantes referentes ao comportamento do neurônio quanto ao aspecto de tolerância tanto no estado agudo como no estado crônico do vício, mas, principalmente, como ele se comporta quando tendo retornado a níveis próximos aos basais, volta a ser submetido a novas doses da droga.

Os resultados são mostrados na Figura 25 a 28.

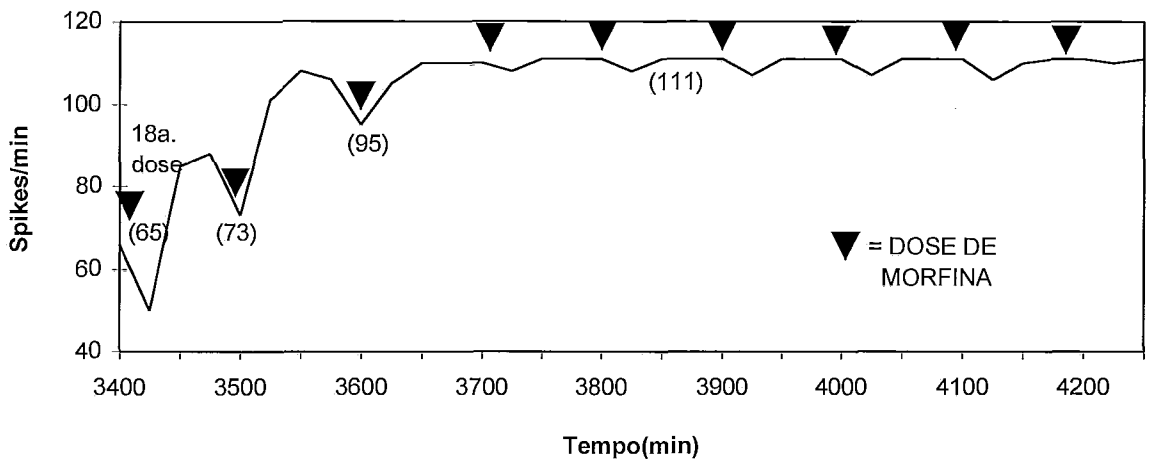


Figura 25. Variação do número de spikes/minuto quando o neurônio é submetido a 17 doses de morfina, retorna ao normal e recebe mais 11 doses.

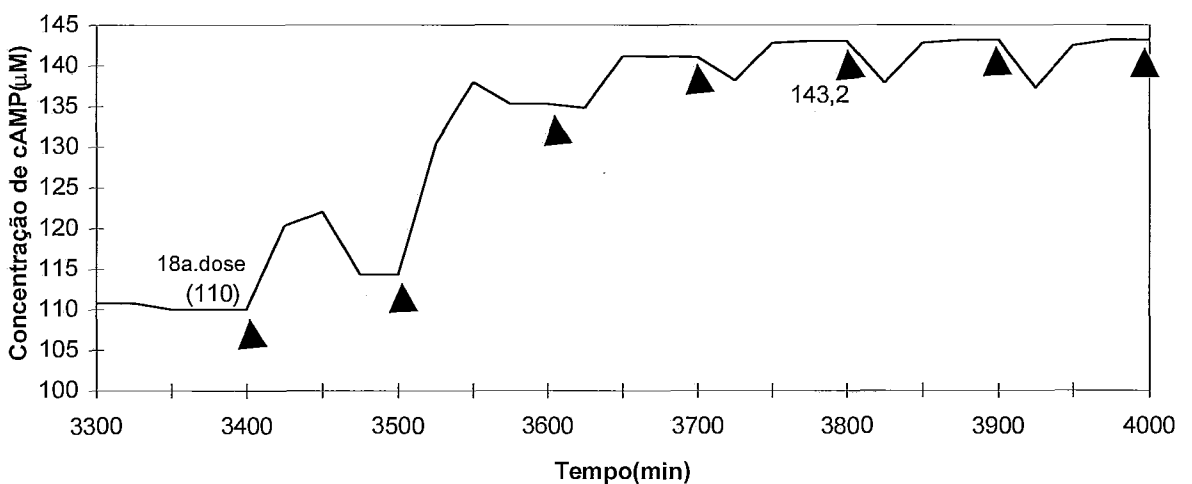


Figura 26. Variação da concentração de cAMP quando o neurônio é submetido a 17 doses de morfina, volta ao normal e recebe mais 11 doses.

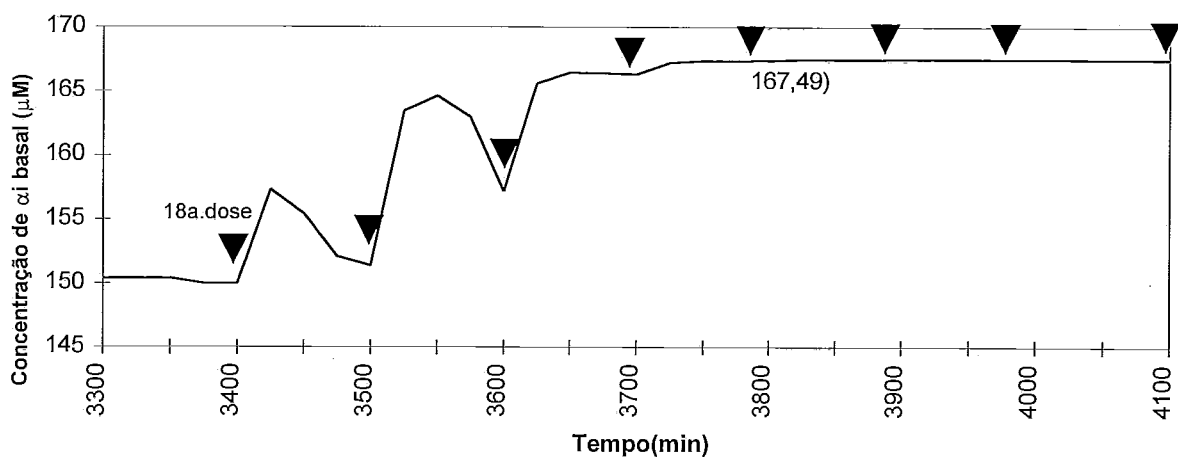


Figura 27. Variação da concentração da sub-unidade  $\alpha_i$  basal quando o neurônio é submetido a 17 doses de morfina, volta ao normal e recebe mais 11 doses.

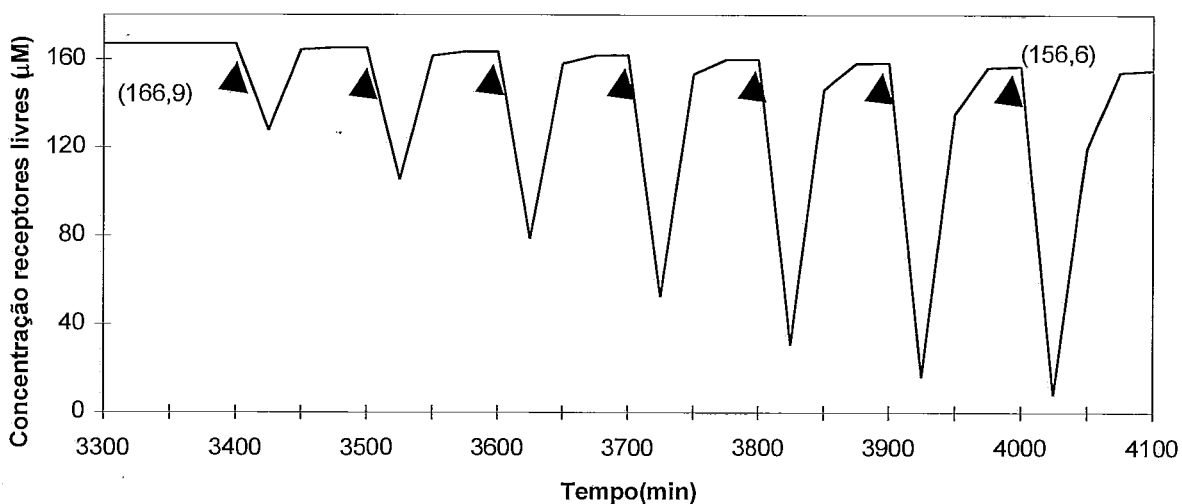


Figura 28. Variação da concentração de receptores  $\mu$  livres quando o neurônio é submetido a 17 doses de morfina, retorna ao normal e recebe mais 11 doses.

Os resultados, apresentados na Figura 25, relativos à variação do número de spikes/minuto emitidos pelo neurônio

devem ser discutidos apenas a partir do retorno à normalidade, após terem recebido 17 doses de morfina, visto que já foram comentados na simulação anterior.

O experimento foi feito de tal forma que após a célula ter retornado próximo aos níveis normais no tempo de simulação de 3400 minutos, o neurônio recebe uma nova série de onze doses.

O que podemos observar é que já na terceira dose há um aumento acentuado do número de spikes/minuto (95 spikes/min) que atinge um nível superior àquele alcançado pela célula na quarta dose inicial do experimento - 83 spikes/min - (Figura 17) ; este comportamento é mantido nas duas doses seguintes mostrando que após ter alcançado o estado crônico do vício, o neurônio tem a tendência de, numa reexposição à droga, atingir novamente este patamar com um número reduzido de doses.

Esta constatação fica evidenciada na Figuras 26 e 27 se observarmos que nesta nova série de doses as concentrações de cAMP e da sub-unidade  $\alpha_1$  atingem em apenas cinco doses níveis que só foram obtidos pelo menos o dobro de exposições na primeira das séries (Figuras 18 e 19), ou seja, retornam ao estado crônico com apenas a metade das doses necessárias para

atingi-lo quando a célula tem contato com a droga pela primeira vez.

Da mesma forma, o comportamento da concentração de receptores livres, mostrado na Figura 28, evidencia que após já haver sido reduzida pela exposição das 17 doses iniciais, sofre uma leve redução pela reexposição à droga, evidenciando a continuidade do processo de "down-regulation" sofrido pelos receptores.

Esta simulação tem, portanto, a capacidade de mostrar que após a célula ter retornado a níveis próximos dos basais, a sua reexposição à morfina ocasiona uma volta ao estado crônico com apenas a metade do número de doses daquele necessário quando o neurônio é exposto pela primeira vez.

Finalmente, uma última simulação foi feita com o objetivo de se testar se, após o neurônio ter atingido o estado crônico do vício, o aumento da concentração basal das sub-unidades  $\alpha_s$ , feito de maneira a simular um tratamento de desintoxicação, pudesse auxiliar na redução das crises de abstinência.

Como mostrado na terceira série de simulações, a administração de 11 doses de morfina leva o neurônio do estado agudo para o estado crônico do vício; se a partir deste instante nenhuma nova dose da droga for oferecida, o neurônio

tende a lentamente retornar aos seus valores basais (Figuras 17 a 20).

A simulação foi feita sob estas mesmas condições mas, a partir do momento que o neurônio atinge o estado crônico, a concentração basal das sub-unidades  $\alpha_s$  é aumentada em 20% de forma escalonada - um aumento de 4% em sua concentração a cada 5 minutos - como se o indivíduo fosse submetido a um tratamento medicamentoso com este intuito.

Os resultados são mostrados na Figura 29.

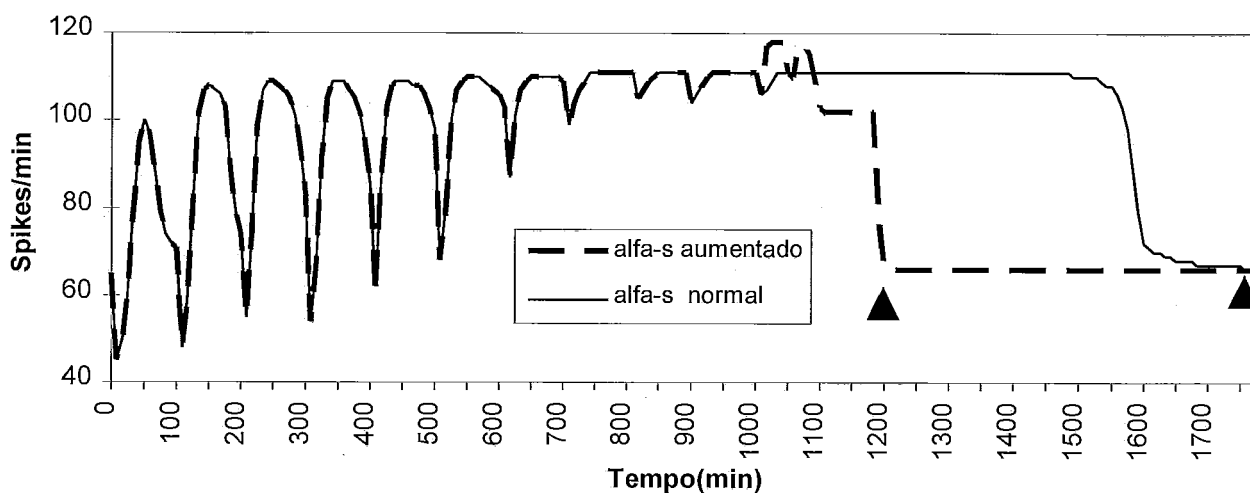


Figura 29. Comparação do número de spikes/min sob duas condições experimentais diferentes: com e sem o aumento na concentração das sub-unidades  $\alpha_s$ .

Os resultados apresentados na Figura 29 mostram que após 11 doses da droga o neurônio atinge o estado crônico do vício. Da mesma forma, o aumento na concentração das sub-unidades  $\alpha_s$  da ordem de 20% foi capaz de reduzir o tempo de recuperação do neurônio de 760 minutos para apenas 200 minutos conforme mostram as setas indicativas. Desta maneira, a estratégia do aumento da concentração da sub-unidade  $\alpha_s$  simulando um tratamento medicamentoso pode representar um alternativa interessante no tratamento de desintoxicação, visto que o indivíduo ficaria livre da crise de abstinência, evitando assim a necessidade do consumo de novas doses da droga pela redução do número de spikes/minuto a níveis próximos do basal.

Como se sabe a representação através da modelagem matemática dos complexos mecanismos celulares envolvidos no vício pela morfina não constitui uma tarefa fácil. Desta maneira, quanto mais os pesquisadores souberem sobre os mecanismos celulares responsáveis pela tolerância e dependência às drogas, modelos mais complexos poderão ser idealizados.

Na seção seguinte são apresentadas as conclusões deste trabalho.



## CONCLUSÕES

A série de simulações executadas neste trabalho mostram que o modelo proposto é capaz de reproduzir os processos de tolerância, dependência e vício através da transição havida entre o estado agudo e o estado crônico do vício.

Por outro lado, a principal hipótese deste trabalho é a que apenas a alteração na expressão dos genes que codificam a produção da sub-unidade  $\alpha_i$  seria suficiente para explicar todas as alterações havidas na cascata de reações químicas e, por conseqüência, levaria o neurônio ao estado crônico do vício. Esta proposta foi plenamente demonstrada como podemos constatar na discussão dos resultados mostrados neste Capítulo.

Da mesma forma, a principal contribuição que este trabalho pôde oferecer às pesquisas em neurobiologia é a sugestão que se houver uma maneira de aumentar a concentração das sub-unidades  $\alpha_s$ , seria possível ao neurônio do LC, de maneira rápida, retornar os níveis basais de todos os mensageiros intracelulares e, como resultado, do número de spikes aos níveis basais em um tempo extremamente reduzido,

evitando as crises de abstinência que levam o indivíduo ao consumo continuado da droga. Seria, portanto, uma alternativa altamente interessante no tratamento da dependência à morfina.

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, decorrentes das simulações feitas a partir do modelo proposto, podemos concluir que:

- O modelo é capaz de simular os processos de tolerância, dependência, vício e crise de abstinência provocadas pelo consumo de morfina tanto de forma aguda como de forma crônica.

- O modelo é capaz de simular o número de doses e os tempos necessários para que o neurônio passe ao estado crônico do vício.

- O modelo simula, tanto na exposição aguda como na crônica, os tempos necessários para que, cessada a oferta de morfina, o neurônio retorne a seus níveis basais no número de spikes e na concentração dos mensageiros intracelulares.

- A proposta feita neste trabalho de que somente o aumento gradual da expressão gênica da sub-unidade  $\alpha_1$  é

suficiente para conduzir o neurônio ao estado crônico do vício à morfina foi plenamente confirmada através das simulações executadas.

- O aumento da concentração das sub-unidades  $\alpha_s$  de maneira a simular um tratamento da dependência à morfina foi capaz de reduzir de maneira significativa as crises de abstinência apresentada pelo neurônio.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. (1989). Control of Gene Expression. In Molecular biology of the cell. *Garland Publishing Inc. New York*. 1218 pp.
- AGHAJANIAN, G.K. & WANG, Y.Y. (1986). Pertussis toxin blocks the outward currents evoked by opiate and  $\alpha_2$ -agonists in locus coeruleus neurons. *Brain Research*. **371**: 390-394.
- AGHAJANIAN, G.K. & WANG, Y.Y. (1987). Common  $\alpha_2$ - and opiate effector mechanisms in the locus coeruleus : intracellular studies in brain slices. *Neuropharmacology*. **26(7)**: 793-799.
- AGHAJANIAN, G.K.; ALREJA, M.; NESTLER, E.J.; KOGAN, J.H. (1992). Dual mechanisms of opiate dependence in the locus coeruleus. *Clin. Neuropharm.* **5(1), pt A** : 143-144.

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. (1989). *Biology of the cell*. Garland Publishing Inc. New York. 1218 pp.
- ALREJA, M. & AGHAJANIAN, G.K. (1991). Pacemaker activity of locus coeruleus neurons: whole-cell recordings in brain slices show dependence on CAMP and protein kinase A. *Brain Research*. **556**: 339-343.
- ALREJA, M. & AGHAJANIAN, G.K. (1993). Opiates suppress a resting sodium-dependent inward current in addition to activating an outward potassium current in locus coeruleus neurons. *J. Neurosci*. **13**: 3525-3532.
- ARMSTRONG, R.C.; MONTMINY, M.R. (1993). Transsynaptic control of gene expression. *Ann.Rev.Neurosci*.. **16**: 17-29.
- BEITNER-JOHSON, D.; DUMAN, R.S.; NESTLER, E.J. (1989). A novel action of morphine in the rat locus coeruleus : persistent decrease in adenylate cyclase. *Molecular Pharmacology*. **35**: 559-564.

- BIRNBAUMER, L. (1990). G proteins in signal transduction. *Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **30**: 675-605.
- BLACK, I.B. (1991). Information in the brain. *MIT Press*. Cambridge. 225 pp.
- BROWN, D.A. (1990). G-proteins and potassium currents in neurons. *Annu. Rev. Physiol.* **52**: 215-42.
- CARTER, B.D. & MEDZIHRADSKY, F. (1993). G<sub>o</sub> mediates the coupling of the  $\mu$  opioid receptor to adenylyl cyclase in cloned neural cells and brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **90**: 4062-4066.
- CARVALHO, L.A.V. & DIOGO, A.C.M. (1995). Positive-feedback loop between norepinephrine- and corticotropin-releasing factor-containing pontine nuclei as a substrate for chronic stress. Submetido para *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*.

- CASEY, P.J. & GILMAN, A.G. (1988). G protein involvement in receptor-effector coupling . *The Journal of Biological Chemistry*. **263(6)**: 2577-2580.
- CHAUDHARI, N. & HAHN, W.E. (1983). Genetic expression in the developing brain. *Science*, **220** : 924-928.
- CHAY, T.R. (1990). Electrical bursting and intracellular  $Ca^{2+}$  oscillations in excitable cells models. *Biological Cybernetics*. **63**: 15-23.
- CHEN, Y. & YU L. (1994). Differential regulation by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C of the  $\mu$  opioid receptor coupling to a G protein-activated  $K^+$  channel. *The Journal of Biological Chemistry*. **269(11)**: 7839-7842.
- CHIARA, G.D. & NORTH, R.A. (1992). Neurobiology of opiate abuse. *Trends Pharmacology Sci*. **13**: 185-193.

CHRISTIE, M.J.; WILLIAMS, J.T.; NORTH, R.A. (1987). Cellular mechanisms of opioid tolerance: Studies in single brain neurons. *Molecular Pharmacology*. **32**: 633-638.

CHRISTIE, M.J. (1991). Mechanisms of opioid actions on neurons of the locus coeruleus. *Progress in Brain Research*. **88**: 197-205.

COLLINS, S.; CARON, M.G.; LEFKOWITZ, R.J. (1991). Regulation of adrenergic receptor responsiveness through modulation of receptor gene expression. *Ann.Rev.Physiol*. **53**: 497-508.

DIAMOND, M.C.; SCHEIBEL, A.B.; ELSON, L.M. (1985). The human brain coloring book. *Harper Perennial*. 301 pp.

DIOGO, A.C.M. (1995). Uma teoria neurobiológica do estresse crônico: Definição, modelagem matemática e simulação computacional. Tese de Mestrado. COPPE.UFRJ. 76p.

DOLPHIN, A.C. (1990) G protein modulation of calcium currents in neurons. *Annu. Rev. Physiol*. **52**: 243-55.



DUMAN, F.S.; TALLMAN, J.F.; NESTLER, E.J. (1988). Acute and chronic opiate-regulation on adenylate cyclase in brain : specific effects in locus coeruleus. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **246(3)**: 1033-1039.

DUMAN, R.S.; TERWILLIGER, R.Z.; NESTLER, E.J.; TALLMAN, J.F. (1989). Sodium and potassium regulation of guanine nucleotide-stimulated adenylate cyclase in brain. *Biochemical Pharmacology*. **38(12)**: 1909-1914.

FINTA, E.P.; HARMS, L.; SEVCIK, J.; FISCHER, H.-D.; ILLES, P. (1993). Effects of potassium channel openers and their antagonists on rat locus coeruleus neurones. *Br. J. Pharmacol.* **109**: 308-315.

GANONG, W.F. (1993). Review of Medical Physiology. *Prentice-Hall International Inc.* 774 pp.

- GENTZ, R.; RAUSCHER, III, F.J.; ABATE, C.; CURRAN, T. (1989). Parallel association of *fos* and *jun* leucine zippers juxtaposes DNA binding domains. *Science*, **243**: 1695-1699.
- GEORG, F.R. & GOLDBERG, S.T. (1989). Genetic approaches to the analysis of addiction processes. *Trends Pharmacology Sci.*, **10**: 78-83.
- GILMAN, A.G. (1984). G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell*. **36**: 577-579.
- GILMAN, A.G. (1987). G Proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 615-649.
- GOLDSTEIN, A. (1989). Molecular and cellular aspects of the drug addictions. *Springer-Verlag*. 238 pp.
- GOODMAN, R.H. (1990). Regulation of neuropeptide gene expression. *Annu. Rev. Neurosc.* **13**: 111-127.

GRANNER, C.K. (1993). Regulation of gene expression. In *Harper's Biochemistry*. ed. Murray, R.K.; Granner, D.K.; Mayes, P.A.; Rodweel, V.W. *Prentice-Hall International Inc.* 433-449.

GUITART, X & NESTLER, E.J. (1989). Identification of morphine- and cyclic phosphoproteins (MARPPs) in the locus coeruleus and other regions of rat brain : regulation by acute and chronic morphine. *The Journal of Neuroscience*. **9(12)**: 4371-4387.

GUITART, X. & NESTLER, E.J. (1990). Identification of MARPP(14-20), morphine- and cyclic AMP-regulated phosphoproteins of 14-20 kDa, as myelin basic proteins: evidence for their acute and chronic regulation by morphine in rat brain. *Brain Research*. **516**: 57-65.

GUITART, X.; THOMPSON, M.A.; MIRANTE, C.K.; GREENBEG, M.E.; NESTLER, E.J. (1992). Regulation of cyclic AMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation by acute and chronic morphine in the rat locus coeruleus. *Journal of Neurochemistry*. **58** : 1168-1171.

HARDEN, T.K. (1983). Agonist-induced desensitization of the  $\beta$ -adrenergic receptor-linked adenylate cyclase. *Pharmacological Reviews*. **35(1)**: 5-32.

HARRIS, G.C. & WILLIAMS, J.T. (1991). Transient homologous  $\mu$ -agonist receptor desensitization in rat locus coeruleus neurons. *Journal of Neuroscience*. **11**: 2574-2581.

HAYWARD, M.D.; DUMAN, R.S.; NESTLER, E.J. (1990). Induction of the *c-fos* proto-oncogene during opiate withdrawal in the locus coeruleus and other regions of rat brain. *Brain Research*. **525**: 256-266.

HAUSDORFF, W.P.; CARON, M.G.; LEFKOWITZ, R.J. (1990). Turning off the signal : desensitization of  $\beta$ -adrenergic receptor function. *The FASEB Journal* **4**: 2881-2889.

HODGKIN, A.L. & HUXLEY, A.F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *Journal of Physiology*, **117**: 500-544.

JAFFE, J.H. & MARTIN, W.R. (1985) Analgésicos e antagonistas opióides. In *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. ed. A.G.Gilman, L.S.Goodman, A.Gilman, New York, Macmillan, 6ª edição. 1195 pp.

JAN, L.Y. & JAN, Y.N. (1992). Structural elements involved in specific K<sup>+</sup> channel functions. *Ann.Rev.Physiol.* **54**: 537-55.

JOHNSON, S.M. & FLEMING, W.W. (1989). Mecanismos of cellular adaptative sensitivity changes: applications to opioid tolerance and dependence. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.* **41(4)**: 435-488.

KOGAN, J.H.; NESTLER, E.J. & AGHAJANIAN, G.K. (1992). Elevated basal firing rates and enhanced responses to 8-Br-cAMP in locus coeruleus neurons in brain slices from opiate-dependent rats. *Eur.J.Pharmacol.* **211**: 47-53.

KOOB, G.F. (1992). Drugs of abuse : anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacology Sci.* **13(5)**: 177-184.

LINDER, M.E. & GILMAN, A.G. (1993). G proteins. *Scientific American. Special Issue on Medicine.* 70-77.

LOH, H.H. & SMITH, A.P. (1990). Molecular characterization of opioid receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **30**: 123-147.

MALDONADO, R.; STINUS, L.; GOLD, L.H.; KOOB, G.F. (1992). Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **261**: 669-677.

- MARTENS, G.J.M. (1992). Molecular biology of G-protein-coupled receptors. In *Progress in Brain Research*, **92**: 201-214.
- MYAKE, M.; CHRISTIE, M.J.; NORTH, R.A. (1989). Single potassium channels by opioid in rat locus coeruleus neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*. **86**: 3419-3422.
- MORGAN, J.I. & CURRAN, T. (1986). Role of ion flux in the control of *c-fos* expression. *Nature*, **322**: 552-555.
- MORGAN, J.I. & CURRAN, T. (1989). Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends Neurosci.*, **12(11)**: 459-62.
- MORGAN, J.I. & CURRAN, T. (1991). Stimulus-transcription coupling in the nervous system : Involvement of the inducible proto-oncogenes *fos* and *jun*. *Annu. Rev. Neurosci.* **14**: 421-451.
- NEER, E.J. & CLAPHAM, D.E. (1988). Roles of G protein subunits in transmembrane signalling. *Nature*, **333** : 129-134.

NESTLER, E.J. & GREENGARD, P. (1983). Protein phosphorylation in the brain. *Nature*. **305(13)**: 583-588.

NESTLER, E.J.; WALAAS, S.I.; GREENGARD, P. (1984). Neuronal phosphoproteins : Physiological and clinical implications. *Science*, **225** : 1357-1364.

NESTLER, E.J. & TALLMAN, J.F. (1988). Chronic morphine treatment increases cyclic AMP-dependent protein kinase activity in the rat locus coeruleus. *Molecular Pharmacology*. **33**: 127-132.

NESTLER, E.J. & GREENGARD, P. (1989). Protein phosphorylation and the regulation of neuronal function. In *Basic Neurochemistry*. eds. G.J.Siegel; B.W.Agranoff; R.W.Alberts; P.B.Molinoff. Raven Press. 984 pp.



NESTLER, E.J.; ERDOS, J.J.; TERWILLIGER, R.; DUMAN, R.S.;  
TALLMAN, J.F. (1989a). Regulation of G proteins by chronic  
morphine in the rat locus coeruleus. *Brain Research*. **476**:  
230-239.

NESTLER, E.J.; TERWILLIGER, R.; BEITNER, D. (1989b).  
Regulation by chronic clonidine of adenylate cyclase and  
cyclic AMP-dependent protein kinase in the rat locus  
coeruleus. *Life Sciences*. **45**: 1073-1080.

NESTLER, E.J. (1990). Adaptive changes in signal  
transduction systems: molecular mechanisms of opiate  
addiction in the rat locus coeruleus. In *Progress in Cell  
Research*. Eds, M.Ritchie, P.J.Magistretti, L. Bolis. **Vol. 1**:  
73-88.

NESTLER, E.J. (1992a). Regulation of Cyclic AMP response  
element-binding protein (CREB) phosphorylation by acute and  
chronic morphine in the rat locus coeruleus. *Journal of  
Neurochemistry*. **58(3)**: 1168-1171.

- NESTLER, E.J. (1992b). Molecular mechanisms of drug addiction. *The Journal of Neuroscience*. **12(7)** : 2439-2450.
- NESTLER, E.J. (1993). Cellular responses to chronic treatment with drugs of abuse. *Critical Reviews in Neurobiology*. **7(1)** : 23-39.
- NESTLER, E.J.; ALREJA, M.; AGHAJANIAN, G.K. (1993a) Molecular and cellular mechanisms of opiate action: studies in the rat locus coeruleus. 2<sup>nd</sup>. *International Symposium on the Locus Coeruleus*.
- NESTLER, E.J.; HOPE, B.T.; WIDNELL, K.L. (1993b). Drug Addiction: A model for the molecular basis of neural plasticity. *Neuron*. **11**: 995-1006.
- NORTH, R.A. & WILLIAMS, J.T. (1983). Opiate activation of potassium conductance inhibits calcium action potentials in rat locus coeruleus neurones. *Br. J. Pharmac.* **80**: 225-228.

NORTH, R.A. & WILLIAMS, J.T. (1985). On the potassium conductance increased by opioids in rat locus coeruleus neurones. *J. Physiol.* **364**: 265-280.

NORTH, R.A.; WILLIAMS, J.T.; SURPRENANT, A.; CHRISTIE, M.J. (1987).  $\mu$  and  $\delta$  receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 5487-5491.

NORTH, R.A. (1989). Drug receptors and the inhibition of nerve cells. *Br.J.Pharmacol.* **98**: 13-28.

NORTHUP, J.K. (1989). Regulation of cyclic nucleotides in the nervous system. In *Basic Neurochemistry*. eds. G.J.Siegel; B.W.Agranoff; R.W.Alberts; P.B.Molinoff. Raven Press. 984 pp.

OFFERMANN, S.; SCHULTZ, G.; ROSENTHAL, W. (1991). Evidence for opioid receptor-mediated activation of the G-proteins,  $G_o$  and  $G_{i2}$ , in membranes of neuroblastoma x glioma (NG108-15) hybrid cells. *J. Biol.Chem.* **266**: 3365-3368.

PTASHNE, M. & GANN, A.A.F. (1990). Activators and targets. *Nature*, **346**: 329-331.

RASMUSSEN, K.; BEITNER-JOHNSON, DOSE.; KRYSTAL, J.H.; AGHAJANIAN, G.K.; NESTLER, E.J. (1990). Opiate withdrawal and the rat locus coeruleus : Behavioral, eletrophysiological, and biochemical correlates. *Journal of Neuroscience*. **10**: 2308-2317.

RASMUSSEN, K. (1991). Afferent effects on locus coeruleus in opiate withdrawal. *Progress in Brain Research*. **88**: 207-216.

RAUSCHER, III, F.J.; SAMBUCETTI, L.C.; CURRAN, T.; DISTEL, R.J.; SPIELGELMAN, B.M. (1988). Common DNA binding site for *fos* protein complexes and transcription factor AP-1. *Cell*, **52**: 471-480. 574.8(3).

REDMOND, D.E. & KRYSTAL, J.H. (1984). Multiple mechanisms of withdrawal from opioid drugs. *Ann. Rev. Neurosci.* **7**: 443-478.

REES, D.C. & HUNTER, J.C. (1990). Opioid receptors. In *Comprehensive Medical Chemistry*. Ed. P.G. Sammes & J.B. Taylor. Vol. 3.

RESTAK, R. (1993). Brain by design. *The Sciences*. **edição set/out: 27-33.**

SHENG, M & GREENBERG, M.E. (1990). The regulation and function of *c-fos* and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*. **4: 477-485.**

SHENG, M.; McFADDEN, G.; GREENBERG, M.E. (1990). Membrane depolarization and calcium induce *c-fos* transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron*. **4: 571-582.**

SHENG, M.; THOMPSON, M.A.; GREENBERG, M.E. (1991). CREB: A  $Ca^{2+}$ -regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinase. *Science*. **252: 1427-1430.**

SIBLEY, D.R. & LEFKOWITZ, R.J. (1985). Molecular mechanisms of receptor desensitization using the  $\beta$ -adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase system as a model. *Nature*, **317**: 124-129.

SIMON, E.J. & HILLER, J.M. (1989). Opioid peptides and opioid receptors. In *Basic Neurochemistry*. eds. G.J.Siegel; B.W.Agranoff; R.W.Alberts; P.B.Molinoff. Raven Press. 984 pp.

SIMON, M.I.; STRATHMANN, M.P.; GAUTAM, N. (1991). Diversity of G Proteins in Signal Transduction. *Science*, **252**: 802-808.

TEMPEL, A & ZUKIN, R.S. (1987). Neuroanatomical patterns of the  $\mu$ ,  $\sigma$  and  $\kappa$  opioid receptors on rat brain as determined by quantitative *in vitro* autoradiography. *Proc.Natl. Acad. Sci.* **84**: 4308-4312.

TERWILLIGER, R.Z.; BEITNER-JOHNSON, D.; SEVARINO, K.A.; CRAIN, S.M.; NESTLER, E.J. (1991). A general role for adaptations in G-proteins and the cyclic AMP system in mediating the chronic actions of morphine and cocaine on neuronal function. *Brain Research*. **548**: 100-110.

TOBIN, A.J. & KHRESTCHATISKY, M. (1989). Gene expression in the mammalian nervous system. In *Basic Neurochemistry*. eds. G.J.Siegel; B.W.Agranoff; R.W.Alberts; P.B.Molinoff. Raven Press. 984 pp.

UEDA, H.; HARADA, H.; NOZAKI, M., KATADA, T.; UI, M; SATOH, M.; TAKAGI, H. (1988). Reconstitution of rat brain  $\mu$  opioid receptors with purified guanine nucleotide-binding regulatory proteins,  $G_i$  and  $G_o$ . *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **85**: 7013-7017.

VAN VLIET, B.J.; DE VRIES, T.J.; WARDEH, G.; MULDER, A.H.; SCHOFFELMEER, A.N.M. (1991).  $\mu$ -opioid receptor-regulated adenylate cyclase activity in primary cultures of rat striatal neurons upon chronic morphine exposure. *European Journal of Pharmacology*. **208**: 105-111.

WANG, Y.Y. & AGHAJANIAN, G.K. (1987a). Excitation of locus coeruleus neurons by an adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-activated inward current: Extracellular and intracellular studies in rat brain slices. *Synapse*, **1**: 481-487.

WATSON, S.J., TRUJILLO, K.A.; HERMAN, J.P.; AKIL H. (1989). Neurochemical substrates of drug-seeking behavior: Overview and future directions. In Molecular and cellular aspects of the drug addictions. ed. A.GOLDSTEIN. *Springer-Verlag*: 29-91.

WILLIAMS, J.T.; NORTH, R.A.; SHEFNER, S.A.; NISHI, S.; EGAN, T.M. (1984). Membrane properties of rat locus coeruleus neurones. *Neuroscience*. **13(1)**: 137-156.

WILLIAMS, J.T.; HENDERSON, G.; NORTH, R.A. (1985). Characterization of  $\alpha_2$  - adrenoceptors which increase potassium conductance in rat locus coeruleus neurones. *Neuroscience*. **14**: 95-101.



## APÊNDICE

### GLOSSÁRIO GERAL

$\overline{[AC]}$	Concentração de adenilato ciclase basal	80 $\mu M$
$[AC]$	Concentração de adenilato ciclase livre	$\mu M$
$\overline{[AC^*]}$	Concentração de adenilato ciclase basal ativada	80 $\mu M$
$[AC^*]$	Concentração de adenilato ciclase ativada no tempo t	$\mu M$
C	Capacitância da membrana do neurônio do LC	8 $\mu F$
$[Ca]$	Concentração de cálcio no neurônio do LC	$\mu M$
$[cAMP]$	Concentração de cAMP no neurônio do LC	$\mu M$
$[cAMP_h]$	Concentração de cAMP para a fosforilação meio-máximo	40 $\mu M$
$\overline{[CREB]}$	Concentração de CREB basal	400 $\mu M$
$[CREB]$	Concentração de CREB livre	$\mu M$
$[CREB_f]$	Concentração de CREB fosforilado	$\mu M$
d	Variável de ativação para $I_{Na}$	
$d_\infty$	Valor de regime permanente para d	
$E_{Ca}$	Potencial de Nerst para o ion $Ca^{2+}$	50 mV
$E_{Na}$	Potencial de Nerst para o ion $Na^+$	40 mV
f	Variável de inativação para $I_{Na}$	
$f_\infty$	Valor regime permanente para f	
$[FOS]$	Concentração do fator de transcrição c-FOS/JUN	$\mu M$
$g_A$	Condutância para a corrente $I_A$	$\mu.mhos$
$\bar{g}_A$	Condutância para a corrente $I_A$	0,6 $\mu.mhos$
$g_{Ca}$	Condutância para a corrente $I_{Ca}$	$\mu.mhos$
$\bar{g}_{Ca}$	Condutância para a corrente $I_{Ca}$	3,8 $\mu.mhos$
$[G_i]$	Concentração de proteína $G_i$	$\mu M$
$[G_s]$	Concentração de proteína $G_s$	$\mu M$
$[G_o]$	Concentração de proteína $G_o$	$\mu M$
$g_K$	Condutância para a corrente $I_K$	$\mu.mhos$
$\bar{g}_K$	Condutância para a corrente $I_K$	18 $\mu.mhos$
$g_{K,Ca}$	Condutância para a corrente $I_{K,CA}$	$\mu.mhos$
$\bar{g}_{K,Ca}$	Condutância máxima para a corrente $I_{K,CA}$	1 $\mu.mhos$

$G_{Na}$	Condutância para a corrente $I_{Na}$	$\mu.mhos$
$\bar{g}_{Na}$	Condutância máxima para a corrente $I_{Na}$	$\mu.mhos$
$G_{Na,p}$	Condutância para a corrente $I_{Na,p}$	$\mu.mhos$
$G^*_{Na,p}$	Condutância máxima para a corrente $I_{Na,p}$	2,4 n.mhos
$\bar{g}_{Na,p}$	Condutância basal para a corrente $I_{Na,p}$	0,6 n.mhos
$h$	Variável de inativação para $I_{Ca}$	
$h_{\infty}$	Valor de regime permanente para $h$	
$I_A$	Corrente "inicial" de potássio no LC	nA
$I_{Ca}$	Corrente de cálcio dependente de voltagem em LC	nA
$I_K$	Corrente de retificação atrasada do LC	nA
$I_{K,Ca}$	Corrente de sódio dependente de cálcio do LC	nA
$I_{Na}$	Corrente de sódio rápida no LC dependente de voltagem	nA
$I_{Na,p}$	Corrente de sódio persistente no LC	nA
$k_1$	Constante de afinidade entre $m$ e $\mu$	$1,8 (min. \mu M)^{-1}$
$k_2$	Constante de afinidade entre $\mu^*$ e $G_i$	$0,015 (min. \mu M)^{-1}$
$k_3$	Constante de afinidade entre $\mu^*$ e $G_O$	$0,05 (min. \mu M)^{-1}$
$k_4$	Constante de afinidade entre $\mu^*$ e $P_{\mu}$	$0,05 (min. \mu M)^{-1}$
$k_5$	Constante de afinidade entre $\mu^*$ e $P_{\mu}$	$0,05 (min. \mu M)^{-1}$
$k_6$	Taxa de dessensitização	$0,2 (min)^{-1}$
$k_7$	Taxa de metabolização da morfina	$0,2 (min)^{-1}$
$k_8$	Constante de afinidade entre $\alpha_i$ e $\beta\gamma$	$20/9 (min. \mu M)^{-1}$
$k_9$	Constante de afinidade entre $\mu^*$ e $G_i$	$0,015 (min. \mu M)^{-1}$
$k_{10}$	Constante de afinidade entre $\alpha_S$ e $G_i$	$0,1875 (min. \mu M)^{-1}$
$k_{11}$	Constante de afinidade entre $\alpha_O$ e $G_i$	$0,1875 (min. \mu M)^{-1}$
$k_{12}$	Constante de afinidade entre $\alpha_O$ e $\beta\gamma$	$0,6n. \mu M)^{-1}$
$k_{13}$	Constante de afinidade entre $\mu^*$ e $G_O$	$0,015 (min. \mu M)^{-1}$
$k_{14}$	Constante de afinidade entre $\alpha_S$ e $G_O$	$0,15 (min. \mu M)^{-1}$
$k_{15}$	Constante de afinidade entre $\alpha_i$ e $G_O$	$0,15 (min. \mu M)^{-1}$
$k_{16}$	Constante de afinidade entre $\alpha_S$ e $\beta\gamma$	$0,75 (min. \mu M)^{-1}$
$k_{17}$	Constante de afinidade entre $\alpha_i$ e $G_S$	$0,1875 (min. \mu M)^{-1}$
$k_{18}$	Constante de afinidade entre $\alpha_O$ e $G_S$	$0,1875 (min. \mu M)^{-1}$
$k_{19}$	Porcentagem de $\alpha_S$ usada na formação de AC	$5,5 (min)^{-1}$
$k_{20}$	Porcentagem de $\alpha_i$ usada na formação de AC	$5,5 (min)^{-1}$
$k_{21}$	Porcentagem de AC usada na formação de cAMP	$0,653125 (min)^{-1}$
$k_{22}$	Taxa de degradação de cAMP	$0,475 (min)^{-1}$
$k_{24}$	Constante de afinidade entre PQ e cAMP	$0,3 (min. \mu M)^{-1}$
$k_{25}$	Taxa de degradação de PQ*	$33 (min)^{-1}$
$k_{26}$	Constante de afinidade entre PQ* e CREB	$0,3 (min. \mu M)^{-1}$

$k_{27}$	Taxa de degradação de CREB <sub>F</sub>	$30 (\text{min})^{-1}$
$k_{28}$	Constante da equação de [Fos]	1,5
$k_{\text{gene}}$	Taxa de crescimento da concentração da sub-unidade $\alpha_j$ basal	0,11666667
$k_{60}$	Taxa de $\mu_p$ que sofre "down-regulation"	$6 \cdot 10^{-4} (\text{min})^{-1}$
$\ell$	Variável de ativação para $I_K$	
$\ell_{\infty}$	Valor de regime permanente para $\ell$	
$m$	Variável de ativação para $I_{Ca}$	
[ <i>morf</i> ]	Concentração de morfina	$\mu\text{M}$
$m_{\infty}$	Valor de regime permanente para $m$	
$n$	Constante para o "cálcio buffering"	0,33
$o$	Variável de ativação de cálcio para $I_{K, CA}$	
$p$	Variável de ativação de voltagem para $I_{K, CA}$	
[ <i>PQ</i> ]	Concentração de proteína quinase inativa	$\mu\text{M}$
[ <i>PQ*</i> ]	Concentração de proteína quinase ativa	100 $\mu\text{M}$
[ <i>PQ</i> ]	Concentração de proteína quinase basal	200 $\mu\text{M}$
[ <i>P<sub>μ</sub></i> ]	Concentração de proteína quinase $P_{\mu}$	10 $\mu\text{M}$
$q$	Variável de inativação de voltagem para $I_{K, CA}$	
$q_{\infty}$	Valor de regime permanente para $q$	
$r$	Variável de ativação pra $I_A$	
$S_d$	Inclinação para $d_{\infty}$	0,9 mV
$S_f$	Inclinação para $f_{\infty}$	0,1 mV
$S_{\tau_{fe}}$	Inclinação para $\tau_f$	2,5 mV
$S_h$	Inclinação para $h_{\infty}$	1,5 mV
$S_{\tau_h}^r$	Inclinação direita para $\tau_h$	1 mV
$S_{\tau_h}^l$	Inclinação esquerda para $\tau_h$	1 mV
$S_{\ell}$	Inclinação para $\ell_{\infty}$	0,1 mV
$S_m$	Inclinação para $m_{\infty}$	0,48 mV
$S_{Na,p}$	Inclinação para $g_{Na,p}$	12,5 nMol
$S_o$	Inclinação para $o$	0,01 nMol
$S_p$	Inclinação para $p$	0,1 mV
$S_q$	Inclinação para $q_{\infty}$	0,5 mV
$S_{\tau_{qe}}$	Inclinação para $\tau_q$	1 mV
$S_r$	Inclinação para $r$	1 mV
$S_{\tau_l}^r$	Inclinação direita de $\tau_l$	0,5 mV

$S_{\tau l}^l$	Inclinação esquerda de $\tau_l$	13,5 mV
$S_z$	Inclinação de $Z_\infty$	0,5 mV
$S_{\tau ze}$	Inclinação de $\tau_z$	0,3 mV
$t$	tempo	minutos
$T_{hg}$	Limite da função sigmóide de gene	40,0
$T_{hr}$	Limite da função sigmóide de [FOS]	12,13
$V$	Potencial da membrana dos neurônios do LC	mV
$V_d$	Potencial de meio-médio para $d_\infty$	-45 mV
$V_f$	Potencial de meio-máximo para $f_\infty$	0 mV
$V_{\tau f}$	Potencial máximo para $\tau_f$	0 mV
$V_h$	Potencial de meio-máximo para $h_\infty$	-50 mV
$V_{\tau h}$	Potencial máximo para $\tau_h$	-60 mV
$V_l$	Potencial de meio-máximo para $l_\infty$	-17,5 mV
$V_{\tau l}$	Potencial máximo para $\tau_l$	-17,5 mV
$V_m$	Potencial de meio-máximo para $m_\infty$	-50 mV
$V_p$	Potencial de meio-máximo para $p$	-65 mV
$V_q$	Potencial de meio-máximo para $q_\infty$	-68 mV
$V_{\tau q}$	Potencial máximo para $\tau_q$	-68 mV
$V_r$	Potencial de meio-máximo para $r$	-74 mV
$V_z$	Potencial de meio-máximo para $z_\infty$	-73 mV
$V_{\tau z}$	Potencial máximo para $\tau_z$	-73 mV
$Z$	variável de inativação de $I_A$	
$z_\infty$	Valor de regime permanente para $Z$	
$\alpha$	Constante taxa de acumulação de cálcio	8 mMol/A
$[\alpha_i]$	Concentração de sub-unidade $\alpha_i$	$\mu M$
$\overline{[\alpha_i]}$	Concentração da sub-unidade $\alpha_i$ basal	$\mu M$
$[\alpha_s]$	Concentração de sub-unidade $\alpha_s$	$\mu M$
$\overline{[\alpha_s]}$	Concentração de sub-unidade $\alpha_s$ basal	150 $\mu M$
$[\alpha_o]$	Concentração de sub-unidade $\alpha_o$	$\mu M$
$\overline{[\alpha_o]}$	Concentração de sub-unidade $\alpha_o$ basal	150 $\mu M$
$\beta$	Constante taxa de buffer de cálcio	0,004
$[\beta\gamma]$	Concentração de sub-unidades $\beta\gamma$	$\mu M$
$\overline{[\beta\gamma]}$	Concentração de sub-unidades $\beta\gamma$ basal	350 $\mu M$
$\gamma_g$	Inclinação da função sigmóide para gene	0,095
$\gamma_r$	Inclinação da função sigmóide para [FOS]	0,6

$[\mu]$	Concentração de receptores opióides livres	$\mu M$
$[\mu_d]$	Concentração de receptores que sofreram down-regulation	$\mu M$
$[\mu_p]$	Concentração de receptores fosforilados	$\mu M$
$[\mu^*]$	Concentração de receptores opióides ativados	$\mu M$
$\bar{[\mu]}$	Concentração de receptores opióides basal	$200 \mu M$
$\tau_l$	Tempo de relaxação para $l$	$ms$
$\frac{\tau_l}{\tau}$	Máximo tempo de relaxação máxima para $l$	$150 ms$