UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Mariana Sayuri Berto Udo

Caracterização da via de ativação de neurotoxicidade induzida pela Anidroegconina Metil Éster (AEME) *in vitro*

Tese para obtenção do título de
DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Tania Marcourakis
Co-orientadora: Profa. Dra. Silvya Stuchi Maria-Engler

São Paulo
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Mariana Sayuri Berto Udo

Caracterização da via de ativação de neurotoxicidade induzida pela Anidroegconina Metil Éster (AEME) *in vitro*

Versão corrigida

Tese apresentada ao departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Toxicologia e Análises Toxicológicas

Orientadora: Profa. Dra. Tania Marcourakis
Co-orientadora: Profa. Dra. Silvya Stuchi Maria-Engler

São Paulo
2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

U21c

Udo, Mariana Sayuri Berto
Caracterização da via de ativação de neurotoxicidade induzida pela Anidroegconina Metil Éster (AEME) in vitro / Mariana Sayuri Berto Udo. - São Paulo, 2018.
140 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Marcourakis, Tania
Coorientador: Maria-Engler, Silvya Stucchi

1. crack. 2. cocaína. 3. metilecgonidina. 4. morte celular. 5. cultura primária de hipocampo. I. T. II. Marcourakis, Tania, orientador. III. Maria-Engler, Silvya Stucchi, coorientador.

Mariana Sayuri Berto Udo

Caracterização da via de ativação de neurotoxicidade induzida pela Anidroegconina Metil Éster (AEME) *in vitro*

Comissão julgadora
da
Tese para obtenção do titulo de Doutor

_____

Profa. Dra. Tania Marcourakis

Orientador / presidente

_____

1º examinador – Dra. Andréa da Silva Torrão

_____

2º examinador – Dra. Renata Gorjão

_____

3º examinador – Dr. Rodrigo Portes Ureshino

_____

4º examinador – Dr. Christiano Marcello Vaz Barbosa

São Paulo, 07 de Dezembro de 2017

Aos meus pais **Sonia Maria Berto Udo** e **Paulino Noboru Udo**, pela educação que prezo muito e à minha família por me ensinarem o significado das palavras respeito, integridade, coragem e superação.

Ao meu querido esposo **Luiz Henrique Matuguma**, pela paciência, atenção e companheirismo. Por me apoiar em seguir meus sonhos e sempre estar ao meu lado.

Aos meus estimados e verdadeiros amigos, que me fortaleceram nos momentos de fraqueza e caminharam comigo quando não pude caminhar sozinha.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por toda a força, luz e sabedoria, e por colocar em minha vida pessoas maravilhosas que foram verdadeiros “anjos” em terra; pessoas que caminharam comigo, me ajudaram em momentos difíceis e também compartilharam bons momentos de risos.

Agradeço à professora Tania Marcourakis pela orientação e à professora Silvya Stucchi pela co-orientação. Obrigada pela oportunidade de realizar mais um sonho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP – Bolsa: 2013/20952-6; auxílio: 2014/08881-9) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – 159886/2013-9) pelos auxílios financeiros.

Aos colegas de laboratório, Wallace, Mariana Aguilera, Ana Carolina, Tatiana, Lidia, Yuli e Vitor Bruno, e aos alunos de iniciação científica, Leandro D’all Jovem e Sara de Souza Prates, pela companhia e ajuda na realização desse projeto.

Ao Raphael Caio, obrigada pela amizade, por todo o conhecimento transmitido e por me aguentar durante esses quatro anos.

À Stephanie, pela valiosa amizade. Obrigada por me ouvir e me ajudar sempre que precisei.

Ao professor Dr. Helio Alexandre Stefani e aos seus alunos Ariane, Shamim, Cristiane, Joel, Miguel e Stanley por me acolherem e me ajudarem com a síntese da AEME.

Ao professor Dr. Ernani Pinto Junior e ao técnico Felipe Augusto Dörr pelo auxilio com as análises químicas dos compostos utilizados nesse projeto.

À professora Sandra Farsky e aos seus alunos Lorena, Gustavo e Christiano pelo auxilio e colaboração com a técnica de citometria de fluxo.

Aos demais colegas de departamento, obrigada pelas risadas, desabafos, companhia e sabedoria durante todo esse tempo.

Aos meus queridos amigos, Thaísa, Julia, Natalia, Thiago, Izabel, Mariana Venancio, André Fukushima, Dra. Helenice, Dra. Martha, Dra. Arminda, Gustavo Ribeiro, Fernando Rinaldi, Diego Ribeiro e Marina Maretti pela preciosa amizade. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

À todos os funcionários que participaram da minha jornada (Samantha, Beatriz, Luciana, Mauro, Nelsinho, Ângelo, Rose e Renata), muito obrigada por tudo. Vocês também são responsáveis por essa vitória.

"Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana"

Carl Jung

Normatização

Esta tese está de acordo com o Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade de São Paulo (USP). **Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: Documento eletrônico e impresso. Parte I (ABNT).** Elaborado por Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro... [et al.]. 3.ed.rev.ampl.mod. São Paulo: SIBiUSP, 2016. 100 p, (Cadernos de Estudos; 9). São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas da USP. 2016.

RESUMO

UDO, M. S. B. **Caracterização da via de ativação de neurotoxicidade induzida pela anidroegconina metil éster (aeme) in vitro**. 2017. 140f. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2017.

O consumo mundial de cocaína vem crescendo e no Brasil já são estimados mais de 2 milhões de usuários, destes 370 mil usam regularmente o *crack*. A cocaína, em suas diversas formas, é um psicoestimulante com alto potencial de abuso e a forma fumada causa à seus usuários mais complicações de saúde do que as demais formas. Muitas dessas complicações estão relacionadas às funções cognitivas, como comprometimento da atenção e memória. O usuário de *crack*, no ato de fumar, está sujeito tanto à ação da cocaína volatilizada quanto a dos seus produtos de pirólise, principalmente da anidroecgnonina metil éster (AEME). Considerando que pouco se conhece a respeito da AEME, ou de sua associação com cocaína, que os distúrbios cognitivos podem estar relacionados à morte neuronal e que o hipocampo é uma das principais estruturas encefálicas relacionada com cognição e memória, este trabalho visou investigar as vias de ativação de morte celular decorrente das exposições à 1 mM de AEME, 2 mM de cocaína, bem como da associação de ambas (C + A), por 3, 6 e 12 h. Para tanto, utilizamos neurônios hipocampais de embriões de rato no 18º dia embrionário (E18) que foram mantidos em cultura por até 7 dias (DIV7), quando foram feitas as exposições. Nossos resultados mostraram que em 3 h a cocaína e a AEME promoveram aumento de atividade enzimática (pelo teste de MTT) que se reverteu ao longo de 12 h. Além disso, AEME aumentou na permeabilidade da membrana plasmática em 6 h que se manteve em 12 h. Embora essas alterações tenham ocorrido em 3 h e 6 h, caspase-8 se ativou apenas em 12 h, ativando também a sinalização apoptótica com a externalização de FS. A cocaína ativou o processo autofágico a partir de 3 h aumentando a quantificação de LC3 II, mas apresentou redução de células com vesículas ácidas em 6 h e 12 h, sugerindo que esta promova morte neuronal por causar falha no fluxo autofágico. A AEME apresentou somente aumento de células com vesículas ácidas em 3 h, revertendo-se já em 6 h, indicando que o processo autofágico só se fez presente no primeiro horário, dando vez à programação de apoptose celular, por ativação da via extrínseca. A associação dessas substâncias apresentou-se mais neurotóxica do que as substâncias isoladas, com redução de células íntegras a partir de 3 h de exposição, ativação de caspase-8 e externalização de FS em 6 h, sem envolver o sistema autofágico. Além disso, as características morfológicas observadas em 6 h, como o aumento do tamanho do núcleo e do corpo celular que se tornaram picnóticos em 12 h, podem sugerir que a neurotoxicidade induzida por C + A seja por necroptose, onde a ativação de caspases resulta em um processo tipo necrótico. Assim, concluímos que, embora a literatura mostre morte neuronal por apoptose a partir de 24 h de exposição para cocaína e para AEME, as respostas celulares que levam à este fim iniciam-se já em 12 h, por ativação da via extrínseca e a associação destas substâncias é ainda mais neurotóxica, iniciando a sinalização de morte já em 6 h e induzindo uma morfologia tipo necrótica.

Palavras chave: *crack*, cocaína, metilecgonidina, morte celular, cultura primária de hipocampo

ABSTRACT

UDO, M. S. B. **Activation pathways characterization related to the Anhydroegconin Methyl Ester (AEME)-induced neurotoxicity *in vitro*.** 2017. 140f. Thesis (doctor degree) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2017.

Cocaine market is increasing all around the world. In Brazil it is estimated that almost 2 million people make usage of this substance which 370 thousand people use the *crack* form. Cocaine is a psychostimulant with large potential for abuse and the smokable form produces more health problems than the other routes of use, mainly in the cognitive field related to compromising attention, memory and decision take. The *crack* users are exposed to both volatized cocaine and their pyrolysis products, which the main product is the anhydroecgonine methyl ester (AEME). Considering that the cognitive disturbs could be related to neurons death, the memory functions are also related to the hippocampal functions, and little is known about the AEME neurotoxicity or even the combination of cocaine and AEME in cell fate, our study aims to characterize the time and pathways related to the hippocampal neurotoxicity induced by 2 mM of cocaine, 1 mM of AEME and the association (C + A) of both substances during 3 h, 6 h and 12 h of exposure. Our results showed that cocaine and AEME increased enzymatic activity (MTT test) in 3 h but it reversed during 12 h of exposure. Moreover, AEME increased cell permeability in 6 h keeping it until 12 h. Although theses early alterations, both substances activated caspase -8 after 12 h when early apoptosis was also observed by the FS externalization. Cocaine activated the autophagic process at 3 h increasing the LC3 II quantification, but decreased the number of cell with acid vesicle at 6 h and 12 h, suggesting neuronal death due to failure in the autophagic flux. AEME showed increased in cell number with acid vesicle only in 3 h which returned after 6 h suggesting that the autophagic process gave place to the apoptotic program starting from the extrinsic pathway. The association of cocaine and AEME was shown more neurotoxic than them alone, decreasing the number of integral cells after 3 h, activating caspase -8 and promoting FS externalization after 6 h without involving the autophagy. In addition, taking the C + A morphology in 6 h, where it was observed increasing of nucleus and soma size that became pyknotic at 12 h, we suggest that the neuronal death could occur by necroptosis because this composition activated caspase -8 and resulted in necrotic like morphology. Thus, we conclude that cocaine- and AEME-induced apoptosis neuronal death starts in 12 h of exposure by the extrinsic pathway and the association of both substances is more neurotoxic than they alone, starting earlier after 6 h and resulting in a necrotic-like morphology.

Key words: *crack*, cell death, cocaine, methylecgonidine, primary hippocampal cell culture

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rotas de tráfico de cocaína no mundo 16

Figura 2 - Estimativa do número de usuários de crack e/ou similares 17

Figura 3 - Reação de pirólise da cocaína resultando em AEME e ácido benzóico 22

Figura 4 - Vias de biotransformação da cocaína e seus produtos 24

Figura 5 - Vias de biotransformação da anidroecgonina metil ester (AEME) e seus produtos 25

Figura 6 - Estruturas químicas das moléculas de arecolina, AEME e anatoxina-a 26

Figura 7 - Características morfológicas dos principais tipos de morte celular após estímulo estressor 30

Figura 8 - Ativação da apoptose pela via extrínseca 36

Figura 9 - Ativação da apoptose pela via intrínseca 37

Figura 10 - Vias de sinalização cruzada entre apoptose e autofagia 40

Figura 11 - Via de ativação da necroptose 41

Figura 12 - Hipocampo de rato 42

Figura 13 - Camadas celulares nas regiões da formação hipocampal 45

Figura 14 - Circuito tri-sináptico na formação hipocampal de roedores 46

Figura 15 - Fluxograma das etapas de purificação de cocaína 57

Figura 16 - Curva de calibração para análise da concentração de cocaína 58

Figura 17 - Espermatozoides de rato 60

Figura 18 - Desenvolvimento fenotípico dos neurônios hipocampais em cultura 62

Figura 19 - Cromatogramas representativos de cocaína, por CG/NPD 71

Figura 20 - Cromatogramas representativos de AEME, por CG/NPD 72

Figura 21 - Perfil cromatográfico da AEME 73

Figura 22 - Caracterização do tipo celular na cultura primária hipocampal 74

Figura 23 - Atividade metabólica celular medida pelo teste de MTT 75

Figura 24 - Ensaio de viabilidade celular por coloração com azul de tripan 77

Figura 25 - Avaliação de apoptose pelo teste de anexina V/PI após 1 h de exposição 78

Figura 26 - Avaliação de apoptose pelo teste de anexina V/PI após 3 h de exposição 79
Figura 27 - Avaliação de apoptose pelo teste de anexina V/PI após 6 h de exposição 80
Figura 28 - Avaliação de apoptose pelo teste de anexina V /PI após 12 h de exposição 81
Figura 29 - Quantificação da proteína Bax, pela técnica de Western blotting... 82
Figura 30 - Quantificação da proteína Bcl-2, pela técnica de Western blotting. 83
Figura 31 - Análise quantitativa da razão entre as proteínas Bax e Bcl-2 83
Figura 32 - Análise da fração ativa de caspase-3 (17kDa) por Western blotting 84
Figura 33 - Análise das frações de caspase-8 (53, 25 e 18 kDa) por Western blotting 85
Figura 34 - Análise das frações de caspase-9 (37 e 17 kDa) por Western blotting 86
Figura 35 - Avaliação de caspase-8 ativa após 3 h de exposição 87
Figura 36 - Avaliação de caspase-8 ativa após 6 h de exposição 88
Figura 37 - Avaliação de caspase-8 ativa após 12 h de exposição 89
Figura 38 - Avaliação de caspase-9 ativa após 3 h de exposição 90
Figura 39 - Avaliação de caspase-9 ativa após 6 h de exposição 91
Figura 40 - Avaliação de caspase-9 ativa após 12 h de exposição 92
Figura 41 - Avaliação de caspase-3 ativa 93
Figura 42 - Análise da porcentagem de células com vesículas ácidas por citometria de fluxo 95
Figura 43 - Porcentagem de células marcadas com laranja de acridina por citometria de fluxo 95
Figura 44 - Células com vesículas ácidas por microscopia de fluorescência ... 96
Figura 45 - Células com vesículas ácidas por microscopia de fluorescência ... 97
Figura 46 - Análise quantitativa da proteína LC3 II por Western blotting 98
Figura 47 - Morfologia celular após 3 h de exposição 100
Figura 48 - Morfologia celular após 6 h de exposição 101
Figura 49 - Morfologia celular após 12h de exposição 102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre as formas intravenosa, fumada e intranasal da cocaína 24
Tabela 2 - Pontos da curva de calibração do padrão de cocaína 58
Tabela 3 - Composição das soluções utilizadas no processo de dissociação das células hipocampais 61
Tabela 4 - Composição das soluções utilizadas na técnica de Western blotting 66
Tabela 5 - Anticorpos primários utilizados nos ensaios de Western blotting ... 66

LISTA DE SIGLAS

Ach	Acetilcolina
AEME	anidroecgonina metil ester
CA	*Cornu Amonis*
CE	Córtex entorrinal
CG/NPD	Cromatografia gasosa acoplada à um detector de nitrogênio-fósforo
CL-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectometria de massas sequencial
DA	Dopamina
DISC	*Death-induced signaling complex* – Complexo indutor de sinalização de morte
FS	Fosfatidilserina
GD	Giro denteado
mAchRs	Receptores colinérgicos do tipo muscarínico
MAP2	Proteína associada ao microtúbulo tipo 2
nAchRs	Receptores colinérgicos do tipo nicotínico
PI	*Propidium iodide* - Iodeto de propídio
PLL	Poli-L-lisina
SNC	Sistema Nervo Central
VTA	Área tegmental ventral

SUMÁRIO

1 Introdução 15
2 Revisão da literatura 21
2.1 Cocaína e *crack* 21
2.1.1 Toxicocinética do *crack* 23
2.1.2 Toxicodinâmica do *crack* 26
2.1.3 Neurotoxicidade do *crack* 27
2.2 Morte celular 29
2.2.1 Necrose 32
2.2.2 Apoptose 33
2.2.3 Autofagia 38
2.2.4 Necroptose 40
2.3 O hipocampo 42
2.4 Proteína associada ao microtúbulo tipo 2 (MAP2) 50
3 Objetivos 55
3.1 Geral 55
3.2 Estratégias experimentais 55
4 Material e Métodos 57
4.1 Purificação da cocaína 57
4.2 Síntese da AEME 59
4.3 Cultura de células hipocampais 59
4.3.1 Animais 59
4.3.2 Cultura de neurônio hipocampais 60
4.3.3 Dissociação das células hipocampais 61
4.3.4 Caracterização de neurônios por imunofluorescência 63
4.3.5 Condições experimentais 63
4.4 Ensaio de viabilidade celular pela atividade da enzima succinato desidrogenase (ensaio de MTT)..... 64
4.5 Análise da integridade da membrana plasmática (teste de azul de tripan)..... 64
4.6 Análise da externalização de fosfatidilserina 64
4.7 Análise de proteínas por Western blotting 65
4.8 Detecção de caspases ativas por citometria de fluxo 67
4.9 Análise de vesículas ácidas por citometria de fluxo 67
4.10 Análise de vesículas ácidas por microscopia de fluorescência 67
4.11 Análise da expressão de MAP2 por microscopia de fluorescência 68
4.12 Análise estatística 69
5 Resultados 71
5.1 Purificação da cocaína 71
5.2 Síntese da AEME 72

5.3 Caracterização da cultura celular por imunofluorescência 73
5.4 Estudo de viabilidade celular pelo teste de MTT 74
5.5 Estudo de viabilidade celular por azul de tripan 76
5.6 Análise da externalização de fosfatidilserina (FS) 77
5.7 Análise de proteínas anti e pró-apoptóticas por Western blotting 82
5.8 Análise de caspases ativas por citometria de fluxo 86
5.9 Investigações do processo autofágico 94
5.10 Análise da morfologia celular pela expressão protéica de MAP2 99
6 Discussão 104
7 Conclusão 114
Referências bibliográficas 115
Anexos
A - CEUA da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCF/USP 131
B - CEUA da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/USP . 132
C - Membranas inteiras de Western blotting dos resultados das caspases 134
D - Estratégias de *Gates* nas análises de citometria de fluxo 137
E - Ficha do aluno 139

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

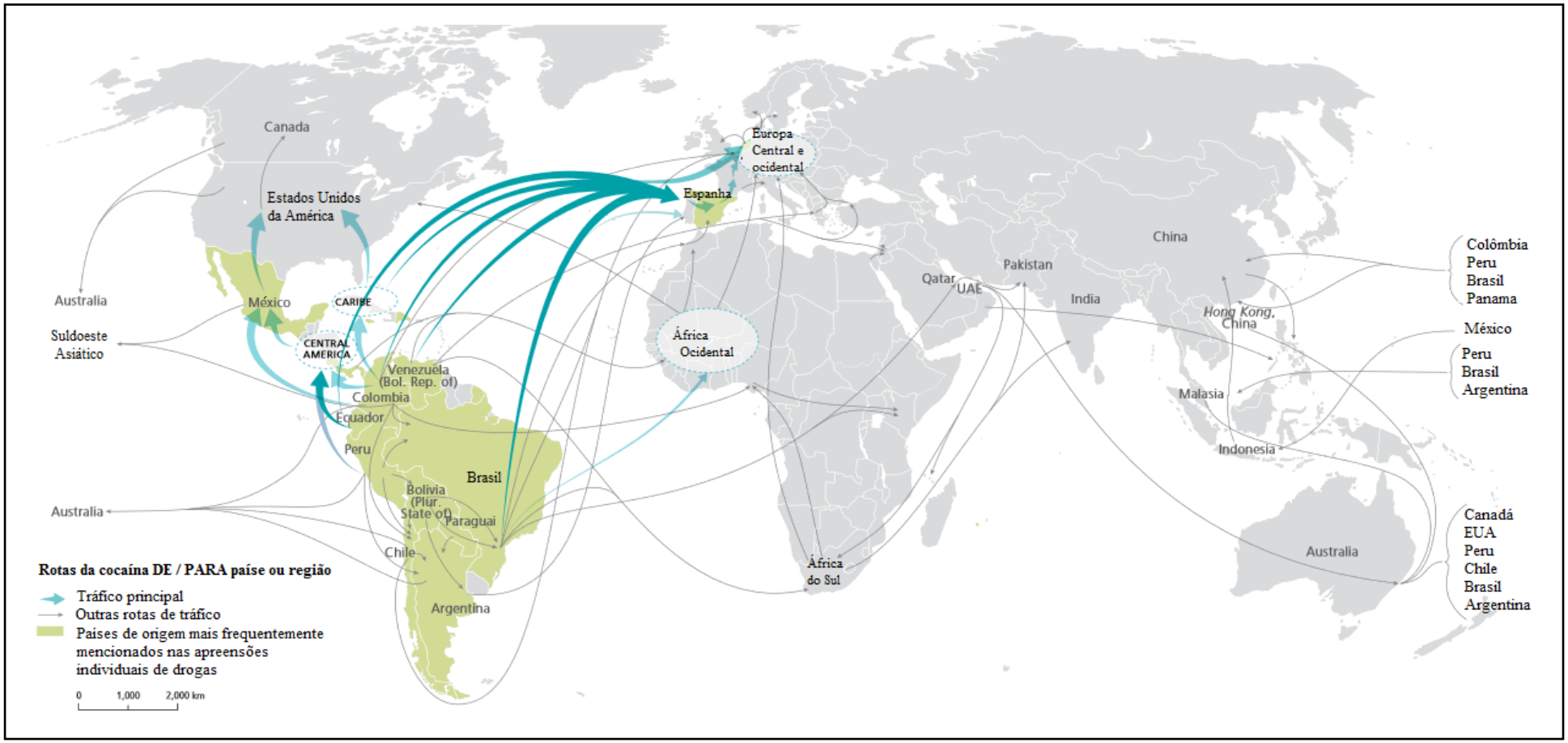
A preocupação com o uso abusivo de drogas é um problema mundial, uma vez que gera graves problemas sociais e econômicos. Em 2015 foi estimado que 250 milhões de pessoas entre 15-64 anos (quase 4% da população mundial de adultos) fizeram, ou ainda fazem uso de pelo menos uma droga ilícita e que 29,5 milhões desses usuários apresentam problemas relacionados ao uso da droga (UNODC, 2017a).

No Brasil essa preocupação se faz muito presente, especialmente com relação à cocaína. Devido à sua localização geográfica, que faz fronteira com os três principais países produtores de cocaína (Colômbia, Peru e Bolívia - Figura 1), e com um longo litoral, o Brasil é considerado um país chave de trânsito e rota de tráfico dessa droga, principalmente pelo oceano Atlântico alcançando a África e a Europa (UNODC, 2016).

Segundo o escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crimes (UNODC, 2017b), estima-se que em 2015 o número de usuários de cocaína (cloridrato e derivados) chegou à 17,1 milhões de pessoas e que o mercado mundial dessa droga está em expansão, com aumento no cultivo (156.500 hectares), na produção de cocaína pura (1.125 toneladas) e na quantidade de apreensões (864 toneladas) em relação ao ano de 2013. Além disso, foi constatado aumento na porcentagem de usuários na América do Norte, seguido pela Europa e Américas Central e do Sul.

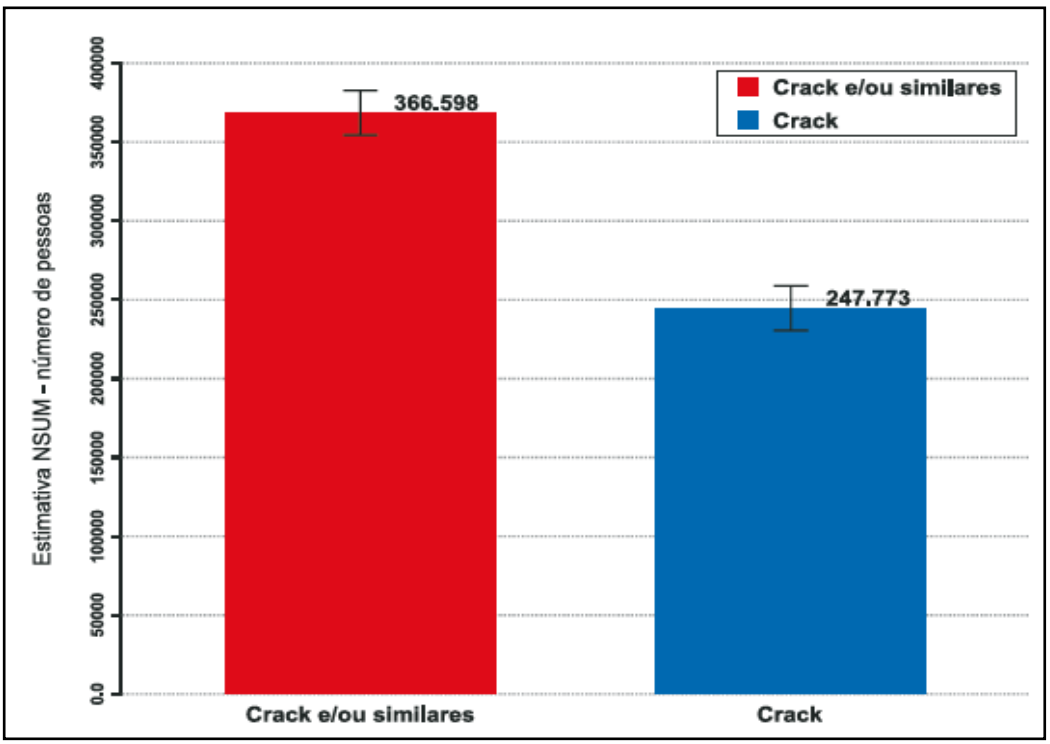
No Brasil, um estudo realizado em 2012 com adultos e adolescentes que não vivem em situação de rua, mostrou que 225 mil adolescentes (entre 14 e 17 anos) declararam ter utilizado cocaína nos últimos 12 meses, assim como cerca de 2 milhões de brasileiros acima de 18 anos (LENAD, 2014). Ainda em 2012, outro estudo epidemiológico mostrou que as estimativas de número de usuários de *crack* e/ou similares (merla e oxi) nas 27 capitais brasileiras chegaram à aproximadamente 370 mil usuários regulares, ou seja, aqueles que fizeram uso por pelo menos 25 dias da mesma forma de droga num período de seis meses (Figura 2) (FIOCRUZ, 2014).

Figura 1 - Rota de tráfico da cocaína no mundo. As rotas ilustradas nessa imagem foram baseadas em análise de dados e não devem ser consideradas como rotas definitivas. Tal análise é baseada nos dados oficiais relatados de apreensões nessas rotas, pelos relatórios oficiais dos países e nas respostas de questionários anuais. As rotas podem desviar, assim como pode haver outras não ilustradas. Os limites territoriais aqui apresentados são meramente ilustrativos



Fonte: Adaptado de UNODC (2016)

Figura 2 - Estimativa do número de usuários de *crack* e/ou similares. Estudo realizado em 27 capitais brasileiras no ano de 2012 pela estimativa NSUM – *Network Scale-up Method*, utilizado em populações de "difícil acesso", tendo como base entrevistas com a população geral em seus domicílios



Fonte: FIOCRUZ (2014)

Nas ruas, a cocaína pode ser encontrada nas formas de cloridrato de cocaína ("pó" – utilizada pela via intranasal ou intravenosa) e de cocaína básica (*crack* – utilizada pela via inalatória por meio do fumo – ao qual será referida como via fumada daqui em diante) (CICCARONE, 2011). O uso do *crack* está amplamente associado às doenças sexualmente transmissíveis, por causa da prostituição, comportamentos violentos e criminais, além de complicações clínicas e psiquiátricas, elevando drasticamente os índices de morbidade e mortalidade (KOLLING *et al.*, 2007; DEGENHARDT *et al.*, 2011), sendo considerado um grave problema de saúde pública nos dias atuais (FALCK; WANG e CARLSON, 2008; SCHEFFER; PASA e ALMEIDA, 2010).

A cocaína é um psicoestimulante com alto potencial de abuso que atua no sistema nervoso central (SNC) inibindo a recaptura de dopamina, norepinefrina e serotonina, aumentando a concentração extracelular desses neuromediadores excitatórios, promovendo quadros de agitação e euforia, além de interagir indiretamente sobre os sistemas glutamatérgico, GABAérgico, endocanabinoide (FERREIRA e MARTINI, 2001; CARTER e GRIFFITHS, 2009; FITZGERALD, 2013;

O'NEILL; TILLEY e GU, 2013) e colinérgico (SHARKEY *et al.*, 1988; GOLDSTEIN *et al.*, 2009).

Usuários crônicos de cocaína apresentam *down-regulation* dos receptores dopaminérgico D_2, anormalidades no metabolismo encefálico, hipoperfusão vascular nas regiões sub-cortical temporal e frontal (SPRONK *et al.*, 2013), além de reduzir a proliferação de células progenitoras no hipocampo de ratos (SUDAI *et al.*, 2011).

O uso do *crack* está relacionado ao maior potencial de abuso, maior propensão à dependência e uma gama de complicações cardiovasculares, respiratórias, neurológicas e psiquiátricas quando comparado com as outras formas de uso da cocaína (FALCK; WANG e CARLSON, 2008). Ao fumar a pedra, os usuários estão sujeitos tanto à ação da cocaína volatilizada quanto aos produtos de pirólise resultante da queima, principalmente da anidroecgonina metil éster (AEME) (SCHEIDWEILER *et al.*, 2003). A via fumada produz efeitos fisiológicos similares à via intravenosa, porém, os efeitos subjetivos, como a euforia e estimulação, aparecem mais rapidamente, em cerca de 2 a 5 min depois da tragada (FOLTIN e FISCHMAN, 1991; CONE, 1995; JENKINS *et al.*, 2002).

Estudos a respeito das capacidades neurológicas dos usuários mostram que o uso de cocaína pode prejudicar as habilidades de atenção, memória (principalmente memória verbal, de trabalho e de curta duração) e funções executivas, como dificuldades em tomadas de decisão, abstração e planejamento, mesmo após longos períodos de abstinência (KOLLING *et al.*, 2007; LANE *et al.*, 2010; GARCÍA-CABRERIZO; KELLER e GARCÍA-FUSTER, 2015).

O hipocampo é uma estrutura encefálica muito utilizada para as investigações dos efeitos da cocaína considerando o fato de sua relação com o aprendizado e a memória e que os usuários de cocaína apresentam déficits nessas faculdades intelectuais (VONMOOS *et al.*, 2013; XIE; WELLS e FUCHS, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2017).

Além disso, Sudai *et al*. (2011) observaram que a cocaína atenua o desenvolvimento e sobrevivência de novos neurônios no hipocampo de ratos adultos, causando redução no desempenho cognitivo, como observado no teste de memória de trabalho no labirinto aquático de Moris, e concluíram que o comprometimento na formação de novas memórias pode eventualmente evocar memórias comportamentais induzidas na presença da droga o que pode resultar numa maior propensão à busca compulsiva pela cocaína.

García-Cabrerizo, Keller e García-Fuster (2015) mostraram que ratos expostos à cocaína durante a adolescência, um período crítico de plasticidade hipocampal, apresentaram na idade adulta, comprometimento da proliferação e sobrevivência das células hipocampais, comprometimento da plasticidade neuronal esperada para a idade dos animais e indício do envolvimento do processo apoptótico por aumento da expressão de marcadores pró-apoptóticos (pFADD/FADD) e clivagem de PARP-1.

Estudo prévio do nosso grupo (GARCIA *et al*, 2012), em culturas primárias de neurônios hipocampais, mostrou que a exposição dessas células por 24 h ao cloridrato de cocaína (2mM) e/ou à AEME (1mM) reduziram a viabilidade celular, ambas em cerca de 23% e a associação delas reduziu a viabilidade celular em 26%. Em 48 h de exposição, essa redução foi de aproximadamente 41% e 61%, respectivamente, sendo que a associação reduziu a viabilidade em 78,5%. Tanto a exposição à cocaína quanto a associação de ambas as substâncias causaram a liberação de Lactado Dehidrogenase (LDH - indicador de lesão tecidual) em 24 e 48 h, porém a exposição à AEME, isoladamente, não causou tal liberação. Com isso, os autores sugerem um efeito aditivo na associação entre cocaína e AEME sobre a morte dos neurônios após 24 h de exposição.

Dessa forma, considerando que os usuários de *crack* estão expostos simultaneamente aos efeitos da cocaína e do AEME, e que há poucos estudos relacionados com a neurotoxicidade dessa última substância, fica evidente a importância da compreensão dos mecanismos e vias pelas quais essas substâncias induzem a neurotoxicidade e como se comporta a associação de ambas.

2 Revisão da literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cocaína e *crack*

A cocaína é um alcaloide encontrado nas folhas do arbusto da coca (*Erytroxylum coca*), uma planta nativa da América do Sul, México e Indonésia, sendo amplamente utilizada por antigas civilizações em situações religiosas e cerimoniais (GOLDSTEIN *et al.*, 2009; CICCARONE, 2011; DE GIOVANNI e MARCHETTI, 2012). Isolado em 1884, esse alcaloide foi utilizado para fins de analgesia e anestesia, incluindo bloqueio de nervos e anestesia espinal. Posteriormente, descoberta suas propriedades estimulantes, a cocaína passou a ser incorporada em soluções tônicas, favorecendo estados de alerta e disposição, o que colaborou para sua disseminação e abuso, culminando em uma legião de dependentes no início do século XX (FERREIRA e MARTINI, 2001; GOLDSTEIN *et al.*, 2009).

A cocaína pode ser encontrada sob duas formas químicas: cloridrato de cocaína e cocaína base. O cloridrato de cocaína, ou sal de cocaína, é caracterizado como um pó branco, cristalino, solúvel em água. Devido ao seu alto ponto de fusão (198°C), esse sal é vulnerável à pirólise, sendo degradado na queima antes mesmo da sua volatilização, resultando em baixo efeito e, portanto, inapropriado para ser tragado. Sendo assim, as vias de autoadministração dessa forma são: oral, intranasal ou intravenosa (CARRERA; MEIJLER e JANDA, 2004; GOLDSTEIN *et al.*, 2009; DE GIOVANNI e MARCHETTI, 2012; GARCIA *et al.*, 2012).

Em relação à forma básica de cocaína podemos ainda encontrar dois produtos: cocaína base-livre e o *crack*, onde ambos compartilham da mesma estrutura química, mas possuem características diferentes e são produzidos por técnicas distintas. Para se obter cocaína base-livre, o cloridrato de cocaína é misturado com água e amônia, e em seguida é extraído com algum solvente orgânico, geralmente éter. A porção orgânica é então evaporada e o resíduo final é a cocaína base-livre. O *crack*, por sua vez, não passa pelo processo de extração com éter; o cloridrato de cocaína é misturado com água e bicarbonato de sódio, que quando aquecido origina uma massa que se solidifica quando seca (GOLDSTEIN *et al.*, 2009).

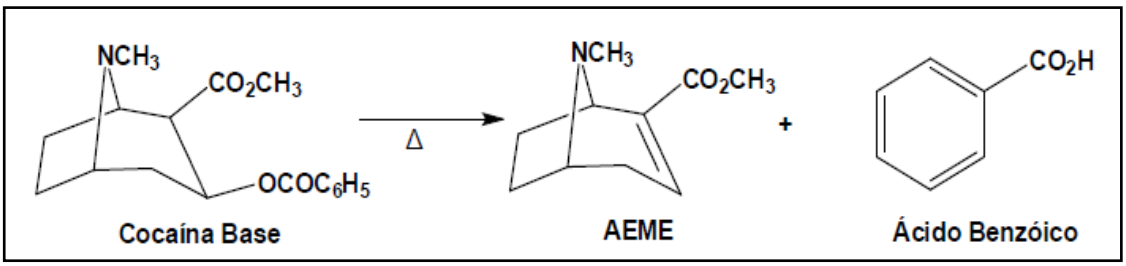
Ambas as formas básicas de cocaína possuem baixo ponto de fusão (96-98°C), portanto não se degradam antes de volatizarem, sendo assim apropriadas para o fumo (NAKAHARA e ISHIGAMI, 1991; CARRERA; MEIJLER e JANDA, 2004;

GARCIA *et al.*, 2012). Entretanto, se houver resquício de éter na cocaína base-livre, este se torna altamente inflamável e pode causar queimaduras faciais no usuário. Além disso, o *crack* é uma droga barata, de fácil acesso, e com alto potencial para causar dependência (SMART, 1991; GOLDSTEIN *et al.*, 2009; WERB *et al.*, 2010).

A queima do *crack* volatiliza a cocaína, sendo esta rapidamente absorvida pelos pulmões, alcançando quase que imediatamente o sistema nervoso central (SNC), causando intensa euforia. Ressalta-se ainda que a absorção pela via pulmonar é mais rápida do que pela via intranasal por causa da alta vascularização do órgão e grande superfície de contato. Devido a rápida absorção, os efeitos também ocorrem mais rapidamente (PAQUETTE *et al.*, 2010; WERB *et al.*, 2010; DIAS *et al.*, 2011). Segundo Falck, Wang e Carlson (2008), mais de 30% das pessoas que fumaram *crack* apresentaram sintomas da dependência de cocaína em até um ano após o início do uso.

Ainda durante o processo de queima do *crack*, o principal produto de pirólise formado é a anidroecgonina metil éster (*Anhydroecgonine methyl ester* - AEME), ou metilecgonidina (Figura 3). Esse produto é inalado juntamente com a cocaína volatilizada e não é formado metabolicamente, sendo ele o principal indicativo do uso de cocaína fumada quando encontrado nas análises forenses (TOENNES *et al.*, 2003; PAQUETTE *et al.*, 2010; GARCIA *et al.*, 2012).

Figura 3 - Reação de pirólise da cocaína resultando em AEME e ácido benzoico



Fonte: GARCIA (2009)

Segundo Nakahara e Ishimagi (1991), 50-70% da cocaína é convertida em AEME na temperatura de 255°C – 650°C. No mesmo estudo, foi verificado que quanto maior a temperatura de queima e menor quantidade de cocaína na associação com bicarbonato de sódio (para gerar o *crack*), mais AEME é obtida (proporção de 1 g cocaína: 20 g $NaHCO_3$, gerou 89% de AEME, à 650ºC). Na

prática, no momento do consumo nas ruas, os dispositivos de queima utilizado pelos usuários variam de material e, portanto, de temperatura de aquecimento. Como a concentração de cocaína nas pedras de *crack* também varia, é difícil predizer a quantidade exata de AEME que é convertida e inalada pelo usuário (PEREZ-REYES *et al.*, 1982; GARCIA *et al.*, 2012).

2.1.1 Toxicocinética do *crack*

Tanto a cocaína quanto a AEME são volatilizadas durante o fumo do *crack* e prontamente absorvidas pelo pulmão (NAKAHARA e ISHIGAMI, 1991; FANDIÑO; TOENNES e KAUERT, 2002a). Através do pulmão, estas substâncias passam quase que imediatamente para a circulação e atingem rapidamente o SNC, justificando o rápido surgimento dos efeitos estimulantes dessa substância (QUINN; WODAK e DAY, 1997; JENKINS *et al.*, 2002).

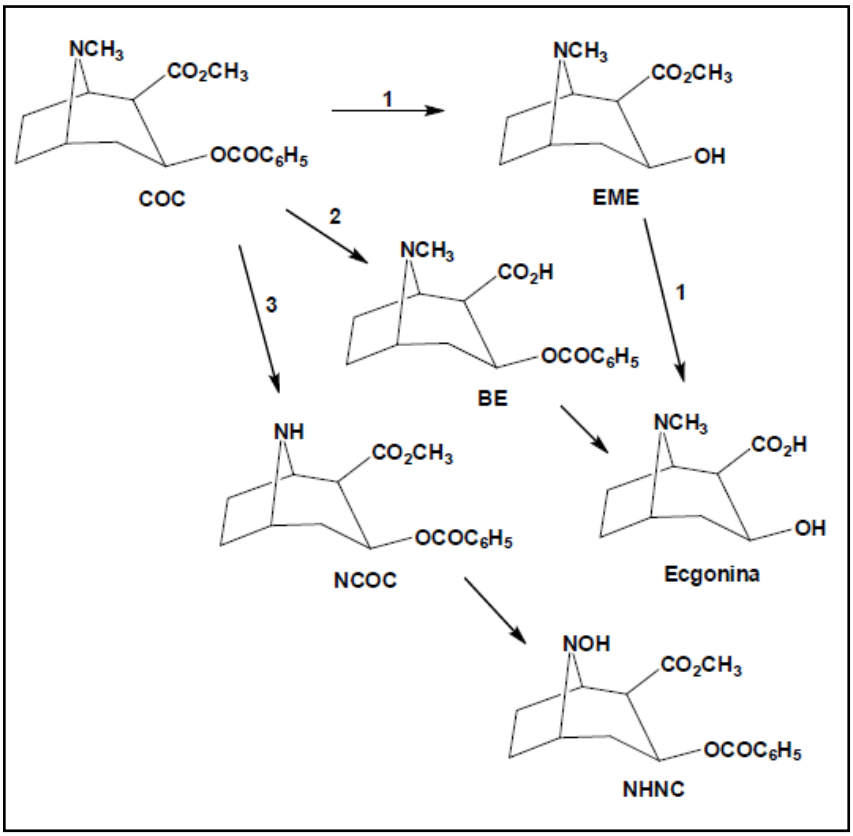
Embora os efeitos fisiológicos da cocaína intravenosa sejam semelhantes aos efeitos da cocaína fumada, existe maior potencial de abuso e maior propensão à dependência pela via fumada do que pela intravenosa. A preferência pela segunda forma pode ser em decorrência da facilidade de autoadministração, evitando o uso de agulhas, e pelo fato de que os efeitos subjetivos se iniciam mais rapidamente (entre 2 a 5 min). Além disso, também é relatada uma sensação de prazer por estes usuários (CONE, 1995). Os efeitos estimulantes dessa droga se reduzem a partir de 10-15 min, estando o usuário pronto para a próxima dose em 30 - 40 min (JAVAID *et al.*, 1978; PEREZ-REYES *et al.*, 1982; CONE, 1995; JENKINS *et al.*, 2002; WERB *et al.*, 2010).

A cocaína é inicialmente hidrolisada no plasma sanguíneo em benzoilecgonina (BZE) e ecgonina metil ester tanto por hidrólise química, quanto por hidrólise enzimática pela ação de colinesterases, principalmente a butirilcolinesterase (BuChE). Em menor proporção, a cocaína pode ainda ser N-desmetilada à norcocaína e em seguida oxidada à N-hidroxinorcocaina e à nitróxido de norcocaina (Figura 4) (STEWART *et al.*, 1977; JATLOW, 1988).

Estudos realizados por Cone (1995) em seis voluntários, comparando rotas de administração de cocaína e seus produtos de biotransformação, mostraram que a via intravenosa e a fumada não são estatisticamente diferentes entre si (Tabela 1), mas são diferentes da via intranasal. Devido às semelhanças estruturais entre

cocaína e AEME sugeriu-se que as vias de biotransformação de ambas fossem semelhantes. Dessa forma, estudos mostraram que a AEME, assim como a cocaína, passa por hidrólise e oxidação, tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (SCHEIDWEILER *et al.*, 2000; FANDIÑO; TOENNES e KAUERT, 2002b; SCHEIDWEILER *et al.*, 2003).

Figura 4 - Vias de biotransformação da cocaína e seus produtos. Coc - cocaína; BE - benzoilecgonina; EME - éster metilecgonina; NCOC - norcocaína; NHNC - N-hidroxinorcocaína. 1 - hidrólise por colinesterases; 2 - hidrólise por carboxilesterases; 3 - oxidação por enzimas do citocromo P450



Fonte: Adaptado de GARCIA (2009)

Tabela 1 - Comparação entre as formas intravenosa, fumada e intranasal da cocaína. Estudo realizado em seis voluntários. Entre parêntesis encontra-se o tempo para atingir o pico máximo. BZE – Benzoilecgonina

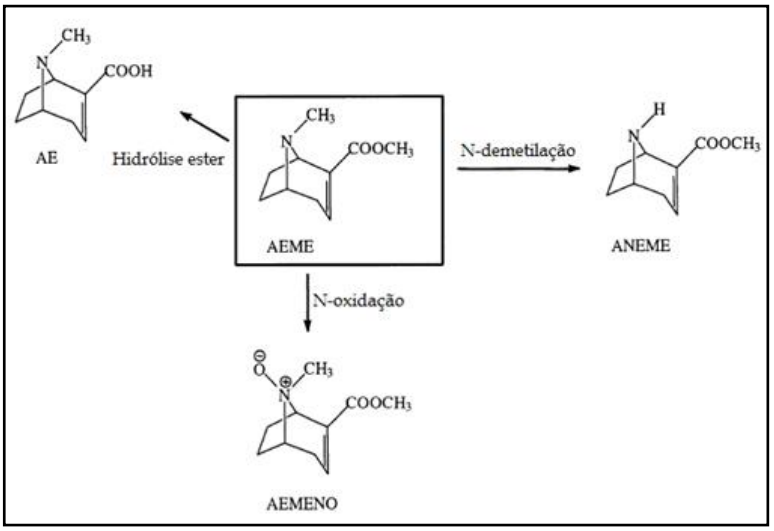
	Intravenosa	Fumada	Intranasal
Pico de concentração plasmática de cocaína (ng/mL)	97,7 - 349,4 (até 5 min)	154 - 345 (até 5 min)	40,1 - 88,5 (23-51 min)
Pico de concentração plasmática de BZE (ng/mL)	60,6 - 165,4 (66-158 min)	46,7 - 168,7 (72-151 min)	94 - 158,1 (176-228 min)

Fonte: Adaptado de CONE (1995)

A AEME, segundo Fadiño, Toennes e Kauert (2002a), pode ser hidrolisada de modo não enzimático à anidroecgonina (AE), na presença de fluoreto de sódio (NaF), um inibidor de esterases, porém com baixa taxa de hidrólise (1,1 ± 0,1% após 60 min). A hidrólise na presença de estearases é muito mais eficiente e depende do órgão onde será biotransformado, devido à atividade enzimática característica de cada tecido (atividade enzimática por miligrama de proteína microssomal decresce na seguinte ordem: fígado > pulmão > rim > encéfalo). Além disso, esses autores mostraram que AEME também pode ser N-desmetilada à anidronorecgonina metil éster (ANEME) e oxidada à anidroecgonina metil estil N-óxido (AEMENO) (Figura 5).

Em um estudo realizado em ovelhas por Scheidweiler *et al.* (2003), foi observado que a administração intravenosa de 10,0 mg/kg de AEME apresentou concentração plasmática máxima (Cmáx) de aproximadamente 5,7 mg/mL em até 2 min, com meia vida de eliminação de quase 20 min, depuração plasmática de 380,6 mL/kg/min e volume de distribuição aparente de 10,7 L/kg. Além disso, durante a sua biotransformação, a AEME foi rapidamente convertida em AE, pela ação da BuChE e este produto de biotransformação pode ser encontrado nas amostras de sangue coletadas em 30 segundos após a administração, com Cmáx sendo alcançada em 30 - 45 min. A meia vida de eliminação da anidroecgoninina foi até três vezes maior do que a meia vida de eliminação de AEME, sendo encontrada em até 48 h após sua administração.

Figura 5 - Vias de biotransformação da anidroecgonina metil ester (AEME) e seus produtos. AE - anidroecgonidina; AEMENO - anidroecgonina metil ester N-oxido; ANEME- anidronorecgonina metil ester



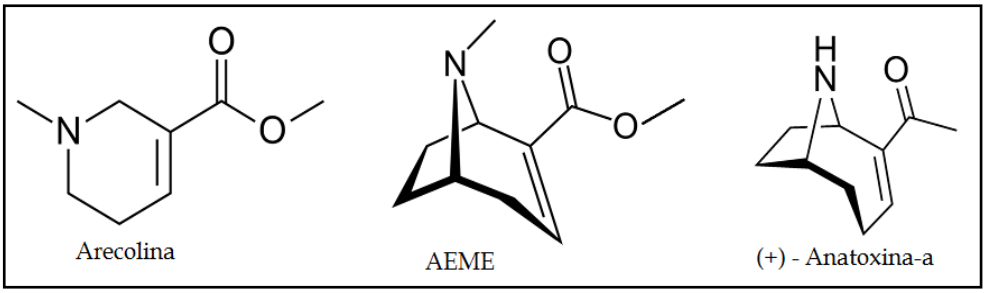
Fonte: Adaptado de FANDIÑO; TOENNES e KAUERT (2002a)

2.1.2 Toxicodinâmica do *crack*

Poucas são as informações sobre o mecanismo de ação da AEME isoladamente, porém, devido às semelhanças estruturais com a arecolina, um agonista não seletivo de receptores muscarínicos (SO *et al.*, 2015), e com a anatoxina-a, um potente agonista colinérgico de receptores nicotínicos (WONNACOTT e GALLAGHER, 2006), sugere-se que o mecanismo de ação da AEME ocorra por meio do sistema colinérgico (Figura 6).

Segundo Huang *et al*. (1997), tanto cocaína quanto AEME reduzem a concentração intracelular de cálcio, de modo concentração dependente em cardiomiócitos isolados de furão. Além disso, esses autores mostraram que essa redução é mais evidente na exposição com AEME do que com cocaína e se dá por estimulação de receptores colinérgicos muscarínicos, uma vez que os efeitos foram abolidos na presença de atropina, um antagonista não seletivo de receptores muscarínicos.

Figura 6 - Estruturas químicas das moléculas de arecolina, AEME e anatoxina-a



Fonte: Adaptado de WONNACOTT e GALLAGHER (2006); SO *et al.* (2015)

Ainda a respeito da atividade muscarínica da AEME, Yang *et al.* (2001), verificaram em células HEL299 (*Human Embryonic Lung*) - que expressavam os receptores M_2 - que tanto a cocaína quanto a AEME aumentaram a produção de GMP cíclico, reduziram a concentração de AMP cíclico e estes efeitos foram bloqueados ou significativamente atenuados pela presença de atropina, ou metoctramina, um bloqueador seletivo de receptores muscarínicos M_2. O efeito desses agentes na redução de AMP cíclico pode se dar pela inibição de adenililciclase via G_i e pela estimulação de fosfodiesterases dependentes de GMP cíclico, o que leva à inibição da atividade de quinases dependentes de AMP cíclico e

reduzem a fosforilação de canais de cálcio, o que leva à redução do influxo desse íon e, finalmente, ao efeito inotrópico negativo observado em outros estudos (FOLTIN e FISCHMAN, 1991; ERZOUKI *et al.*, 1995; HUANG *et al.*, 1997; WOOLF *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 2001; FALCK; WANG e CARLSON, 2008; ZHAO *et al.*, 2015).

Considerando ainda a hipótese da ação colinérgica, Garcia *et al.* (2015) estudaram em células CHO-K1, que expressavam os cinco subtipos de receptores muscarínicos, a afinidade da molécula de AEME por esses receptores e observaram que esta atua tanto como agonista parcial de M_1 e M_3, com menor afinidade por este último, quanto como antagonista de M_2, M_4 e M_5, com maior afinidade por M_2.

2.1.3 Neurotoxicidade do *crack*

Neurotoxicidade pode ser definida como qualquer efeito adverso na estrutura ou na função do SNC e/ou periférico produzido por agentes biológicos, químicos ou físicos (TILSON, 1990).

A neurotoxicidade induzida pela cocaína pode ser observada quanto aos déficits cognitivos apresentados pelos seus usuários, como comprometimento das funções de aprendizado e memória, pensamentos abstratos, distúrbios motores, entre outros, mesmo após longos períodos de abstinência (KÜBLER; MURPHY e GARAVAN, 2005; HAILE *et al.*, 2012; VONMOOS *et al.*, 2013; MORENO *et al.*, 2014; XIE; WELLS e FUCHS, 2014; MA *et al.*, 2015; MIN *et al.*, 2015).

Pesquisas apontam que os mecanismos celulares envolvidos com as disfunções cognitivas promovidas pela cocaína estão relacionados aos processos de morte neuronal por apoptose e autofagia (CUNHA-OLIVEIRA; REGO e OLIVEIRA, 2008; LEPSCH; PLANETA e SCAVONE, 2015; GUHA; HARRAZ e SNYDER, 2016).

Em relação aos processos apoptóticos, a cocaína promove a ativação de caspase-3 (MITCHELL e SNYDER-KELLER, 2003; LEPSCH *et al.*, 2009; GARCIA *et al.*, 2012), perda do potencial de membrana mitocondrial com liberação de citocromo c (OLIVEIRA *et al.*, 2003) e aumento da razão entre Bax/Bcl-2, com redução da expressão de Bcl-2 e ativação de NF-κB (LEPSCH, 2009).

Entretanto, Guha, Harraz e Snyder (2016) demonstraram em cultura primária de neurônios corticais, que a cocaína (1 µM por 3 h) ativou do processo autofágico, promovendo aumento da formação de LC3-II. Além disso, esses autores observaram

que a exposição das células à cocaína (200 µM por 48 h), pré-tratadas com inibidores específicos de outros processos de morte celular, como inibidor de PARP-1 (para apoptose induzida por PARP), necrostatina (inibidor de necroptose) e zVAD-fmz (inibidor pan-caspases) não impediu as células de morrerem.

Em relação ao AEME, GARCIA *et al.* (2012) mostraram que a exposição de neurônios hipocampais à esta substância (1 mM) promoveu a redução da viabilidade celular (pelo teste de MTT) a partir de 24 h de exposição, sem a liberação de LDH, com aumento da atividade de caspase-3 a partir de 6h de exposição. Esses autores também observaram que a morte celular promovida pela AEME pode ser impedida pelo pré-tratamento com atropina, demonstrando assim, a ação da AEME sobre o sistema colinérgico.

No estudo de 2015, Garcia *et al*. (2015) mostraram que os neurônios hipocampais expostos à 10^{-3} M de AEME por 24 h apresentaram fragmentação de DNA e aumento nas concentrações de cálcio intracelular. Ainda no mesmo estudo, os autores observaram pelo teste de MTT, que a redução da viabilidade celular induzida pelo AEME foi impedida quando as células foram expostas em combinação com pirenzepina (antagonista seletivo dos receptores M_1), p-F-HHSiD (antagonista seletivo dos receptores M_3) ou com U73122 (inibidor seletivo de fosfolipase C), comprovando a ação colinérgica dessa substância.

Até o momento, somente o nosso grupo de pesquisa avaliou os efeitos da associação de cocaína com o AEME. Nesse estudo, a associação das substâncias promoveu a redução da viabilidade celular de neurônios hipocampais a partir de 12 h de exposição, promoveu a liberação de LDH (indicador de necrose celular) a partir de 24 h, e reduziu a atividade de caspase-3 a partir de 6 h de exposição (GARCIA *et al.*, 2012).

Dessa forma, fica evidente que ainda há muitas questões a serem investigadas sobre os efeitos e mecanismos de ação do AEME e da sua associação com cocaína para melhor compreender a neurotoxicidade do *crack*.

2.2 Morte celular

Na década de 1970, acreditava-se que as células poderiam ser classificadas quanto ao tipo de morte apenas de duas formas: necrose, também chamada de morte patológica ou não natural, onde a célula se rompe e o conteúdo citosólico extravasado promove inflamação no tecido; e apoptose, um tipo de morte regulada, programada, essencial em tecidos normais para balancear os eventos de divisão celular e controlar a população de células, de modo silencioso, sem promover inflamação local (KERR; WYLLIE e CURRIE, 1972; MELINO, 2001; MARTIN e HENRY, 2013).

Na década de 1990, Clarke (1990) apresentou três diferentes tipos de morte celular, tomando apenas como critério características morfológicas da célula durante e após o processo de morte e a participação, ou não, de lisossomos.

Essa classificação foi empregada durante muito tempo, descrito por vários autores da seguinte forma (KERR; WYLLIE e CURRIE, 1972; SCHWEICHEL e MERKER, 1973; CLARKE, 1990; KROEMER *et al.*, 2009; GALLUZZI *et al.*, 2012):

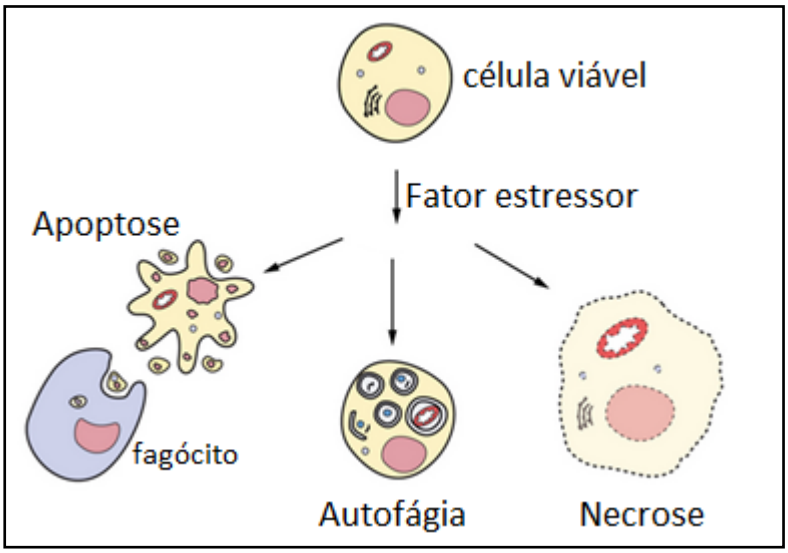
- Tipo 1: Apoptose. Inicialmente a célula apresenta condensação de núcleo (aparência picnótica) e do citoplasma com retração da membrana citoplasmática, formando pequenas unidades de conteúdo citoplasmático (chamados corpos apoptóticos) e estes, por sua vez, são fagocitados por células vizinhas (processo heterofágico);

- Tipo 2: Autofagia. Inicialmente a célula apresenta inúmeros vacúolos autofágicos (autofagossomos) no citoplasma; a mitocôndria e o retículo endoplasmático algumas vezes encontram-se dilatados, o complexo de Golgi encontra-se aumentado e com atividade aumentada de nucleosídeo difosfatases, gerando lisossomos primários. Os autofagossomos associam-se com lisossomos, formando o autofagolisossomo (ou somente autolisossomo), que irá degradar o conteúdo e o autofagossomo (processo de autofagia);

- Tipo 3: Necrose. Fragmentação da célula sem o envolvimento do sistema lisossomal. Inicialmente as organelas intracelulares incham, o núcleo sofre rompimento de membrana (cariólise), a célula torna-se arredondada, seguido pela formação de espaços vazios no citoplasma que se fundem entre si e culminam no rompimento da membrana citoplasmática. Tal rompimento leva ao extravasamento do conteúdo citoplasmático para o meio extracelular.

A figura 7 ilustra as principais características morfológicas que distingue os processos de necrose, apoptose e autofagia.

Figura 7 - Características morfológicas dos principais tipos de morte celular após estímulo estressor



Fonte: Adaptado de ABURTO *et al.* (2012)

Embora as diferenças morfológicas sejam bem distintas entre si, ainda é difícil classificar seguramente o tipo de morte celular apenas pela sua morfologia, pois existem casos em que a fragmentação do DNA e o aspecto picnótico do citoplasma, característicos de apoptose, nem sempre estão presentes ao mesmo momento, células em processo de autofagia podem ser confundidas com fagócitos saudáveis, ou ainda, o início de necrose pode ser confundido com o início de autofagia (CLARKE, 1990). Além disso, muitos processos bioquímicos, característicos de um tipo de morte celular, pode não necessariamente levar a célula à morte (KROEMER *et al.*, 2009; PENG *et al.*, 2013; REYNOLDS, 2014; GALLUZZI *et al.*, 2015).

Dessa forma, a partir de 2009, a classificação dos tipos de morte celular ganhou novas dimensões quando o comitê de nomenclaturas de morte celular (*Nomenclature Committee on Cell Death - NCCD*) recomendou que fosse levado em consideração não apenas as características morfológicas como também os critérios enzimológicos (com ou sem o envolvimento de nucleases ou algumas proteases, como caspase, calpaina, catepsinas e transglutaminases), aspectos funcionais (morte programada, acidental, fisiológica ou patológica), características imunológicas

(imunogênica ou não imunogênica) e a sinalização inicial do processo de morte, sempre que possível, para melhor classificação do evento observado (MELINO, 2001; KROEMER *et al.*, 2009; GALLUZZI *et al.*, 2012; VURAL; CEBESOY e KARAKAS, 2013).

Assim, a morte celular pode ser classificada inicialmente como morte "acidental" (*Acidental Cell Death*), causada por fatores físicos (temperatura, pressão extremos), químicos (detergentes, variações extremas de pH) e/ou mecânicos (trituração, sonicação), de forma agressiva e não responde à intervenções farmacológicas ou genética; ou como morte "regulada" (*Regulated Cell Death* - RCD), ou programada, envolvida por mecanismos moleculares específicos como síntese de proteína e vias de sinalização, programados geneticamente. Esta resposta inicia-se como uma resposta adaptativa, na tentativa de se obter homeostase celular e/ou tecidual. Além disso, dependendo do estímulo inicial, a programação pode ser modulada pela inibição da transdução de sinais letais ou aumentando a capacidade de resposta adaptativa da célula, embora essa modulação não impeça a célula de morrer, apenas modifica o tempo e o tipo da morte (GREEN e KROEMER, 2005; BAEHRECKE, 2011; GALLUZZI *et al.*, 2012; BHATTACHARYYA *et al.*, 2014; GALLUZZI *et al.*, 2015).

A morte celular regulada ocorre por alterações no microambiente celular (interno e/ou externo), durante processos de desenvolvimento do embrião, por homeostase tecidual e na resposta imune (GALLUZZI *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2016).

Ainda, é importante destacar, que a apoptose não deve ser utilizada como sinônimo de morte celular programada, pois esta é apenas um dos processos que levam à morte, além disso, as células em qualquer processo de morte não devem ser consideradas mortas até que a primeira fase irreversível, ou "ponto sem retorno", seja alcançado (KROEMER *et al.*, 2009).

Os principais tipos de morte celular são necrose, apoptose, e autofagia, porém existem outras formas como: necroptose, piroptose, cornificação, parthanatos, Anoikis e modalidades atípicas (KROEMER *et al.*, 2009; GALLUZZI *et al.*, 2012; VURAL; CEBESOY e KARAKAS, 2013).

2.2.1 Necrose

A necrose é caracterizada morfologicamente pelo aumento do volume celular (oncose), inchaço das organelas, aumento irreversível na permeabilidade e perda de integridade da membrana plasmática, com depleção das reservas energéticas. Também se observa digestão da cromatina, hidrólise do DNA e, portanto, o núcleo não se cora com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole - um corante que se liga às porções A-T no DNA) e finalmente, lise celular. Com o rompimento da membrana plasmática, o conteúdo intracelular extravasa podendo causar inflamação no tecido (FINK e COOKSON, 2005; FESTJENS; BERGHE e VANDENABEELE, 2006; VANLANGENAKKER *et al.*, 2008; KROEMER *et al.*, 2009; SRIKRISHNA e FREEZE, 2009; ORRENIUS; GOGVADZE e ZHIVOTOVSKY, 2015).

Embora o processo de necrose tenha sido associado apenas a uma morte acidental, não controlada, já existem evidências de que esta também pode ocorrer por componentes reguladores, passando a ser chamado de necroptose (KROEMER *et al.*, 2009; MURAKAMI *et al.*, 2014; GALLUZZI *et al.*, 2015).

Segundo Festjens, Berghe e Vandenabeele (2006), o processo de necrose ocorre em três fases consecutivas: iniciação, propagação e execução, embora ainda não seja tão clara a distinção entre as fases. Vários mediadores, organelas e processos celulares estão envolvidos com a necrose, porém, ainda é incerto como eles interagem entre si e qual é o elemento iniciador. Apesar da incerteza sobre o início, sabe-se que os seguintes fenômenos estão comumente presentes nesse processo de morte (KROEMER *et al.*, 2009; ORRENIUS; GOGVADZE e ZHIVOTOVSKY, 2015):

- Alterações mitocondriais: como produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), não acoplamento de carga elétrica à cadeia oxidativa, estresse oxidativo por óxido nítrico ou compostos similares e permeabilização da membrana mitocondrial;
- Colapso do metabolismo energético mitocondrial, que leva a uma redução significativa nas concentrações de ATP e ao aumento de cálcio (Ca^{+2}) intracelular, favorecendo a ativação de enzimas catabólicas dependentes de Ca^{+2}, como fosfolipases, proteases (calpainas e catepsinas) e endonucleases;
- Mudanças lisossomais, como a produção de EROs por reações de Fenton e permeabilização da membrana lisossomal;

- Mudanças nucleares, como hiperativação de PARP-1 (Poli-ADP-ribose polimerase 1) e hidrólise concomitante de NAD^+; e
- Degradação lipídica, depois da ativação de fosfolipases, lipoxigenases e esfingomielinases.

2.2.2 Apoptose

A apoptose foi descrita pela primeira vez em 1972 como tipo I de morte celular programada, apresentando as seguintes características morfológicas (KROEMER; DALLAPORTA e RESCHE-RIGON, 1998; LIPPENS *et al.*, 2005; KROEMER *et al.*, 2009; LAMKANFI e DIXIT, 2010; GALLUZZI *et al.*, 2012):

- retração da célula, o que leva à perda da aderência com a matriz extracelular e com as células vizinhas;
- condensação e fragmentação da cromatina;
- fragmentação do DNA em grandes fragmentos, porém, em alguns casos, essa fragmentação pode não estar presente;
- permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP - *mitochondrial outer membrane permeabilization*);
- diminuição do potencial da membrana interna mitocondrial ($\Delta\psi_m$);
- translocação de fosfatidilserina (FS) para o exterior da membrana plasmática, o que torna a célula apoptótica reconhecível para degradação; e
- formação de vacúolos citoplasmáticos que levam à fragmentação da célula, formando os chamados corpos apoptóticos.

No processo apoptótico, as organelas perdem sua atividade, mas não apresentam alterações morfológicas e os corpos apoptóticos formados são identificados e fagocitados por macrófagos ou células vizinhas (GALLUZZI *et al.*, 2015).

Segundo Kroemer *et al* (2009), os vários subtipos de apoptose são classificados quanto aos fatores que iniciam a programação de morte, como por exemplo, ativação ou não das caspases, envolvimento ou não da mitocôndria e/ou do retículo endoplasmático (SZEGEZDI *et al.*, 2009; SAFA, 2012).

As caspases (***c**ysteine-**asp**artic prote**ases***) são proteases com um resíduo de cisteína capaz de clivar outras proteínas depois de um resíduo de ácido aspártico.

Elas são sintetizadas como proteases inativas na forma de pró-caspases e são ativadas por maturação proteolítica ou por interação com um ativador alostérico. Até o momento, sabe-se que 14 caspases humanas foram identificadas, sendo que sete delas (caspases -2, -3, -6, -7, -8, -9 e -10) participam da apoptose e as outras sete (caspases -1, -4, -5, -11, -12, -13, -14) estão envolvidas na maturação de citocinas e outros processos, no entanto suas contribuições na apoptose ainda são claras (PORTER, JANICKE, 1999; DENAULT e SALVESEN, 2002; PORTER e JANICKE, 1999; SZEGEZDI *et al.*, 2009).

As caspases podem ser divididas em duas classes: caspases iniciadoras e caspases executoras (LAMKANFI e DIXIT, 2010; VERBRUGGE; JOHNSTONE e SMYTH, 2010; WEN *et al.*, 2014; ORRENIUS; GOGVADZE e ZHIVOTOVSKY, 2015).

As iniciadoras apresentam um pró-domínio efetor longo de morte (DED - *Death-effector domais*) e são primeiramente recrutadas em um grande complexo proteico, onde passam por oligomerização e se ativam. O *Death-induced signaling complex* (DISC) e o apoptossomo são os principais complexos proteicos de auto-ativação das caspases iniciadoras, identificadas por caspases -2, -8, -9 e -10 (LAMKANFI e DIXIT, 2010).

As caspases efetoras, ou executoras (-3, -6 e -7), apresentam pró-domínio curto e são ativadas pelas caspases iniciadoras. Essas caspases clivam proteínas essenciais no: 1) citoesqueleto, como gelsolina, fodrina, proteína quinase de adesão focal (FAK), proteína quinase p21, isoformas da proteína quinase C e MEKK-1 (GARAY *et al.*, 2003); 2) no citoplasma, como mdm-2 (*murine double minute*) ligada à p53 que quando clivada, libera p53 que se transloca para o núcleo celular e ativa a transcrição de genes pró-apoptóticos como a *Bax* (SCHULER *et al.*, 2003); e 3) no núcleo celular, como por exemplo PARP-1 (clivada por caspase-3 ativada), que é responsável por reparações no DNA (ORRENIUS; GOGVADZE e ZHIVOTOVSKY, 2015).

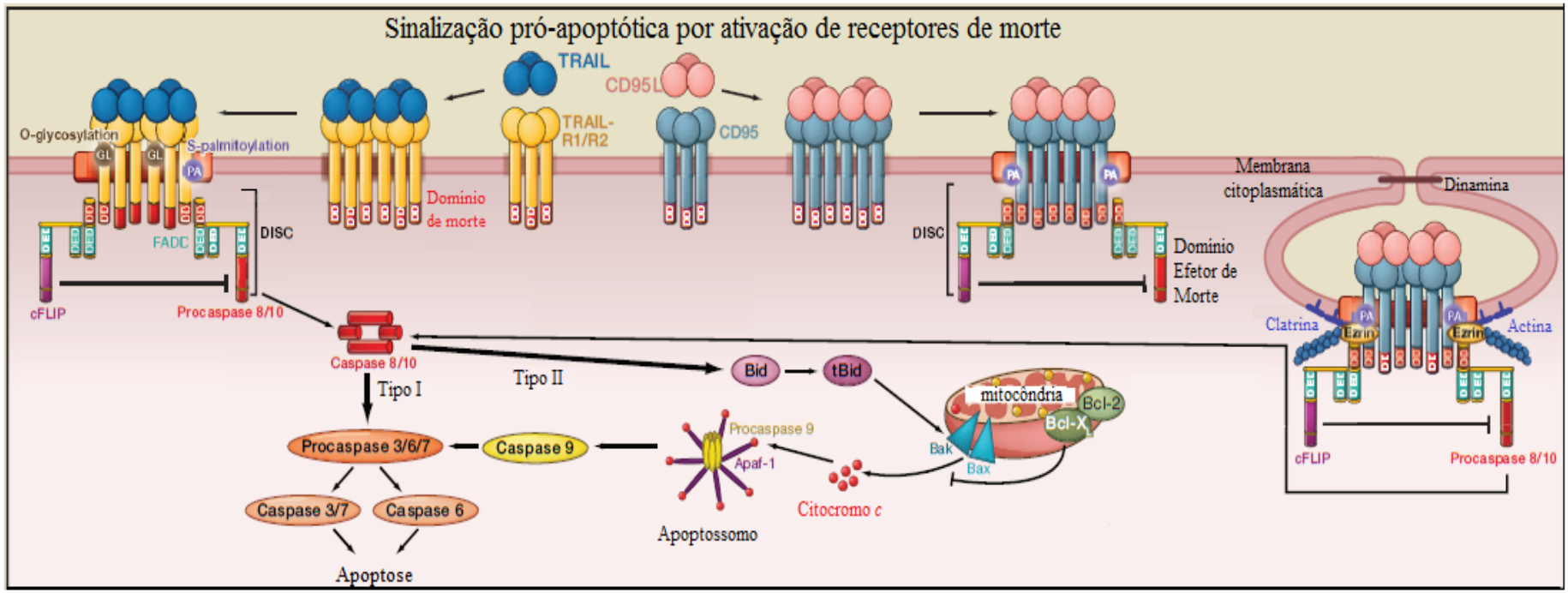
A apoptose extrínseca (Figura 8) inicia-se pela ativação de receptores de morte da família do fator de necrose tumoral (TNF - *Tumoral Necrosis Factor*), como TNF-R1, CD95 (*Cluter of differentiation 95*, também conhecido por Fas ou APO1 - *apoptosis antigen 1*), TRAIL-R1 e TRAIL-R2 (*TNF-related apoptosis-inducing ligand Receptor 1 e Receptor 2* também conhecidos por DR4 e DR5, respectivamente), DR3 e DR6. Esses receptores da membrana plasmática se ativam por seus ligantes

específicos, TNFα, FasL e TRAIL. Quando ativados, os receptores se agregam juntamente com FADD (*Fas-associated death domain*), uma proteína adaptadora, que recruta pró-caspase -8 ou -10, e juntos eles formaram um complexo indutor de sinalização de morte, o DISC (*Death-induced signaling complex*) (VERBRUGGE, JOHNSTONE, SMYTH, 2010; SAFA, 2012; KROEMER *et al.*, 2009).

Em alguns tipos celulares, como nos linfócitos, a ativação de caspase-8 leva à maturação e ativação de caspase-3. Em outras células, como em hepatócitos, a caspase-8 ativada leva à clivagem da proteína pró-apoptotica BID (*BH3-interacting domain death agonist*), que leva à formação de fragmentos permeabilizadores da membrana mitocondrial (conhecido por BID truncado, ou tBID) causando estresse e disfunção mitocondrial (GALLUZZI *et al.*, 2012).

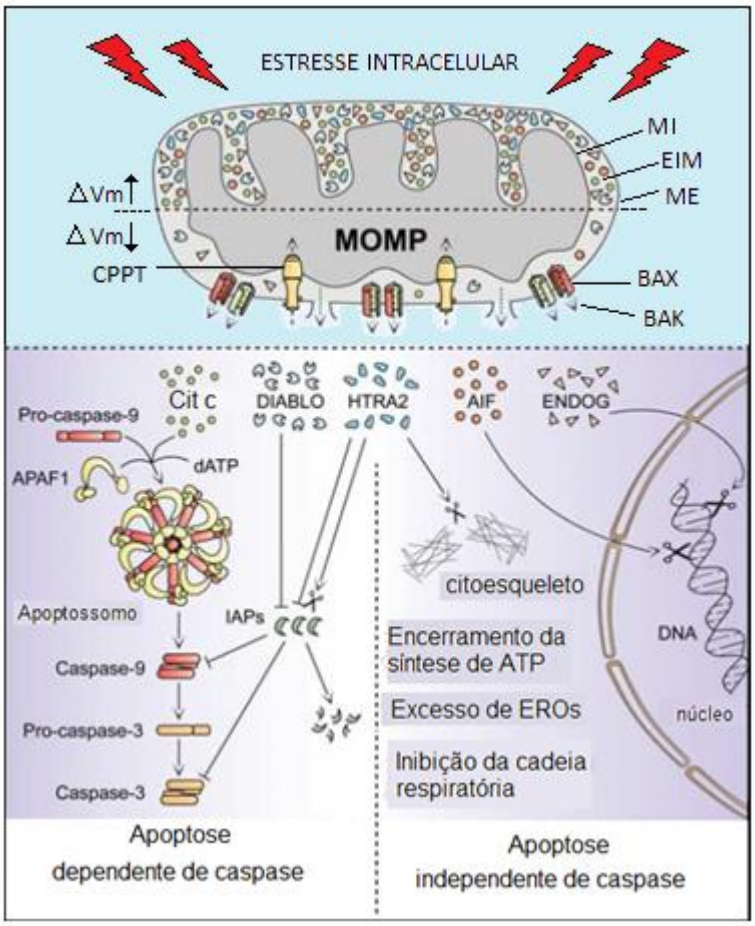
A apoptose intrínseca (Figura 9) é ativada por estresse intra ou extracelular como redução de fatores de crescimento, como IGF-1, PDGF, NGF e IL-3 (GARAY *et al.*, 2003), danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogênes, que levam a um distúrbio mitocondrial e o extravasamento de proteínas apoptogênicas do espaço intermembranas, como citocromo c, SMAC/Diablo, HtrA2/Omi, AIF (*Apoptosis inducing Factor*) e endonuclease G (ELMORE, 2007; LAMKANFI e DIXIT, 2010). AIF e endonucleases ativam a apoptose por uma via independente da ativação de caspases (MATTIOLO *et al.*, 2015).

Figura 8 – Ativação da apoptose pela via extrínseca. Ilustração da via de sinalização pró-apoptótica por ativação de receptores de morte na membrana plasmática. TRAIL - Ligante específica do receptor TRAIL; CD95L - Ligante específico do receptor CD95; DISC - *Death-inducing Signaling Complex*; Apaf-1 - *Apoptotic protease activating factor 1*



Fonte: Adaptado de VERBRUGGE; JOHNSTONE e SMYTH (2010)

Figura 9 – Ativação da apoptose pela via intrínseca. MI – membrana interna; EIM – espaço intermembranas; ME – membrana externa; MOMP – *mitochondrial outer membrane permeabilization* (permeabilização da membrana externa mitocondrial); CPPT – complexo de poros de permeabilidade transitória; Cit c - citocromo c.



Fonte: Adaptado de GALLUZZI *et al.* (2012)

O extravasamento de tais proteínas se dá quando poros de permeabilidade transitória (PTP - *permeability transition pore*) se abrem na membrana externa mitocondrial; esse processo é chamado de permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP - *mitochondrial outer membrane permeabilization*) que resultará no colapso no potencial da membrana (TAIT *et al.*, 2010; SAFA, 2012). A abertura desses poros é controlada por proteínas que são membros da família Bcl-2. Elas podem ser divididas em 4 tipos: 1) proteínas "efetoras": Bax e Bak, que quando oligomerizam-se criam os poros na membrana; 2) proteínas "inibidoras": Bcl-2, Mcl1 e Bcl-xL, que quando associadas com Bax e Bak as inativam; 3) proteínas "ativadoras" de Bax e Bak: Bid e Bim; e 4) proteínas "Sensibilizadoras": Bad, Bik e Noxa, que antagonizam as proteínas anti-apoptóticas tipo Bcl-2. Além disso, as proteínas efetoras só formam os poros quando estiverem em quantidades

suficientes para oprimir a ação das proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas (SHORE e NGUYEN, 2008; SPENCER e SORGER, 2011).

Quando o citocromo c encontra-se no citosol, ele se une com Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor 1*). Apaf-1 é uma proteína citoplasmática que possui um domínio de recrutamento de caspase (CARD - *Caspase activation and recruitment domains*) e um domínio ATPase. Quando ligada ao citocromo c, este recruta a pró-caspase-9 e juntos formam o apoptossomo. A estrutura do apoptossomo confere dimerização da pró-caspase-9, o que leva à auto ativação desta em caspase-9 (SPENCER e SORGER, 2011; SAFA, 2012).

A caspase-9 clivada ativa caspases efetoras (-3, -6 e -7) que, por sua vez, ativam endonucleases citoplasmáticas, degradaram substratos nucleares do citoesqueleto e do citoplasma como citoqueratinas, PARP-1, proteína alfa fodrina, a proteína nuclear NuMa e outras, que levaram às alterações bioquímicas e morfológicas da apoptose. A ativação das caspases efetoras, assim como o MOMP, são consideradas "pontos de não retorno" na programação da morte celular (ELMORE, 2007; VURAL; CEBESOY e KARAKAS, 2013; ORRENIUS; GOGVADZE e ZHIVOTOVSKY, 2015).

2.2.3 Autofagia

A autofagia é um processo de *turnover* de proteínas e organelas, essencial para a homeostase celular. Esse processo é característico pela atuação de lisossomos e autofagocitose, num processo de "reciclagem" de conteúdo citoplasmático. A indução da autofagia ocorre em resposta a estímulos diversos como restrição de nutrientes (*nutrient starvation*), citocinas e estresse oxidativo (SRIDHAR *et al.*, 2012; PENG *et al.*, 2013; DESCLOUX *et al.*, 2015).

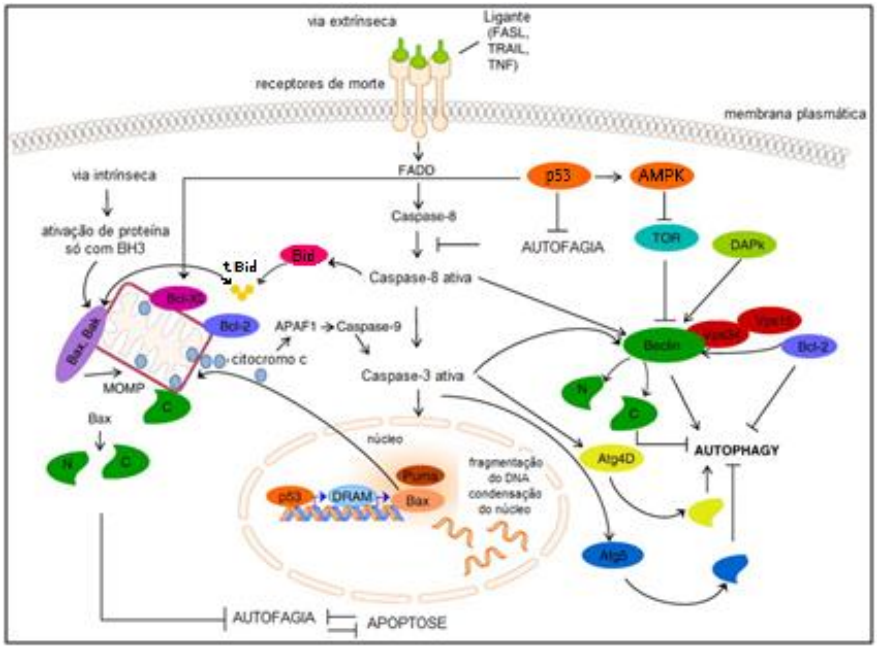
A autofagia pode ser classificada em três tipos: 1) microautofagia - implica o englobamento de partes do citoplasma diretamente pelo lisossomo; 2) macroautofagia, também sinônimo de autofagia - envolve a formação de vesículas de membrana dupla (ou autofagossomo) que englobam o conteúdo citoplasmático a ser degradado, mas a degradação só ocorre quando a membrana externa do autofagossomo se une com a membrana de um lisossomo (formando o autofagolisossomo) e o conteúdo lisossomal degrada a membrana interna da vesícula juntamente com o seu conteúdo; e 3) autofagia mediada por chaperona -

quando a proteína a ser degradada está ligada a uma chaperona (HSC70 - *Heat shock cognate 70kD*) e essa ligação faz com que a proteína inicial atravesse a membrana lisossomal por um receptor (LAMP2A - *Lysossomal associated mombrana protein 2A*) e seja degradada no lúmen lisossomal sem que seja englobada ou se formem vesículas autofágicas (HE e KLIONSKY, 2009; KROEMER *et al.*, 2009; PENG *et al.*, 2013; MARINO *et al.*, 2014; DESCLOUX *et al.*, 2015; KAUR e DEBNATH, 2015).

A autofagia ocorre em fases sequenciais controladas por proteínas específicas (as ATG). Todo o processo macroautofágico é iniciado pela formação de uma membrana em torno das proteínas e organelas a serem recicladas, chamada de fagórofo. O fagóforo pode ser originado a partir da membrana citoplasmática, do retículo endoplasmático ou a partir da membrana externa mitocondrial. A formação da vesícula (ou nucleação) é regulada por fosfatidil inositol 3 - quinase (PI3K) juntamente com a proteína Beclin-1. O elongamento das membranas depende das proteínas LC3 (*microtubule-associated proteín Light Chain 3 protein*) e Atg12, assim como de um complexo de proteínas (Atg12-Atg5-Atg16L) que recrutam e formam um sistema conjugado que aumentam o tamanho da membrana. Em seguida, LC3 se conjuga com a fosfatidiletanolamina da composição da membrana (forma LC3-II), onde passará a atuar como um receptor membranar. O conteúdo citoplasmático a ser degradado se conjuga com a proteína p62, que por sua vez é reconhecida e recrutada pela LC3II favorecendo assim o fechamento da vesícula autofágica (chamado de autofagossomo). Em seguida o autofagossomo se funde com lisossomos e o conteúdo citoplasmático é degradado juntamente com a membrana interna da vesícula autofágica e o LC3II volta para o citosol na forma de LC3 I (MAIURI *et al.*, 2007; NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013; MARINO *et al.*, 2014; DESCLOUX *et al.*, 2015).

A proteína Beclin-1 possui uma região homóloga a Bcl-2 (região BH3) que interage fisicamente com algumas proteínas da família Bcl-2. Assim, essa proteína pode inibir a atividade de Bcl-2 e Bcl-XL ou ativar as proteínas BAX e BAK, por causa dessa interação das regiões, fazendo com que os processos autofágicos e apoptóticos tenham um ponto em comum entre suas vias (NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013). A Figura 10 ilustra os pontos em comum entre esses dois processos.

Figura 10 - Vias de sinalização cruzada entre apoptose e autofagia. Os pontos em comum entre as duas vias é a caspase-8 ativada que pode ativar tanto Beclin-1, que levará à autofagia, quanto caspase-3 ou Bid que levarão a célula à apoptose



Fonte: Adaptado de NIKOLETOPOULOU *et al.* (2013)

2.2.4 Necroptose

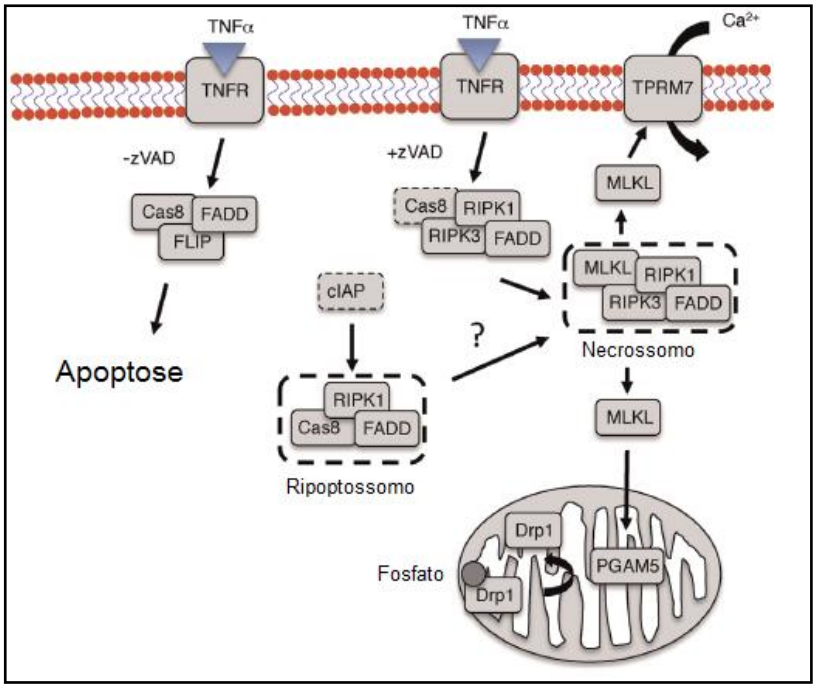
A necroptose, também conhecida por "necrose programada", caracteriza-se morfologicamente pelo aumento do volume celular, inchaço de organelas e ruptura da membrana plasmática, de forma semelhante ao processo de necrose, porém, assim como na apoptose extrínseca, seu início se dá pela estimulação de receptores de morte como TNF-R, CD95 e TRAIL-R. É também dependente da atividade das enzimas quinase RIPK1 e/ou RIPK3 (*Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase* 1 e/ou 3) e é geneticamente regulada (VURAL; CEBESOY e KARAKAS, 2013; PENG *et al.*, 2013; BERGHE *et al.*, 2014). Além disso, esse processo ocorre particularmente quando a apoptose está inibida ou quando há baixas concentrações de ATP (NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013).

Esse tipo de morte celular é mediado por uma via dependente do complexo (RIPK1)-RIPK3 e pode ser inibido por Necrostatina-1 (Nec-1), embora não haja um marcador bioquímico único de necroptose (GALLUZZI *et al.*, 2012; KACZMAREK; VANDENABEELE e KRYSKO, 2013).

Além disso, RIPK-1 pode participar da indução de apoptose por depleção ou inibição de cIAP (*cellular inhibitors of apoptosis protein* - inibidores celulares de proteínas apoptóticas) que resulta na formação de um complexo de FADD-RIPK1-caspase-8 e consequente ativação de caspase-8 seguida da ativação de caspases efetoras (KACZMAREK; VANDENABEELE e KRYSKO, 2013).

A Figura 11 ilustra a via de sinalização da necroptose quando a apoptose está inibida pela presença de zVAD (N-benziloxicarbonil-Val-Ala-Asp), um peptídeo inibidor de caspases.

Figura 11 - Via de ativação da necroptose. A ativação do receptor de morte (TNFR) ao ligante específico (TNFα) recruta FADD, FLIP e caspase-8 que culminará em apoptose. Na presença de zVAD (inibidor de caspases) caspase-8 não estará disponível portanto a ativação de TNFR formará o complexo de kinases que interagem com o receptor (receptor-interacting kinases1 and 3 - RIPK1 and RIPK3) que juntamente com FADD (proteína adaptadora) recrutam e ativam a MLKL (mixed lineage kinase-like), que irá translocar para a membrana plasmática e promover aumento no influxo de Ca^{+2} levando à ruptura da membrana.



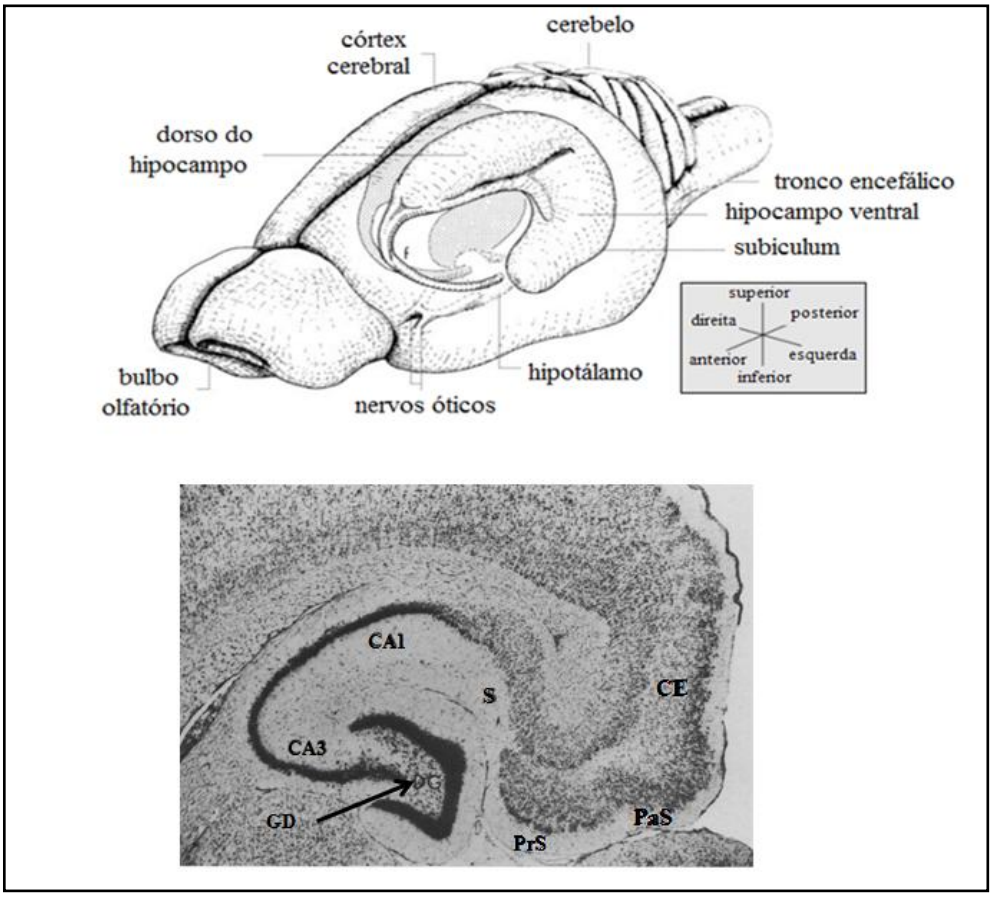
Fonte: Adaptado de AKI; FUNAKOSHI e UEMURA (2015)

Toda forma de morte celular depende de um estímulo inicial que resulte em disfunção irreversível na célula. Esses estímulos podem ser físicos ou químicos, assim, algumas intervenções farmacológicas, ou até mesmo os efeitos das drogas psicoativas (como a cocaína e o *crack*) podem levar a disfunções celulares culminando em morte celular (GALLUZZI *et al.*, 2012).

2.3 O hipocampo

O hipocampo (do grego *ιππόκαμποι*, *hippokampos* - Cavalo-marinho) é uma estrutura encefálica localizada no lobo temporal medial em ambos os hemisférios, abaixo do neocórtex e se estende da amígdala até o septo. Esta estrutura é composta por duas regiões: o giro denteado (GD) e o *Cornu Ammonis* (CA – também chamado de hipocampo propriamente), e este se divide em três sub-campos, CA1, CA2 e CA3 (Figura 12) (AMARAL e WITTER, 1989; KNOWLES, 1992; GIAP *et al.*, 2000; KIERNAN, 2012).

Figura 12 - Hipocampo de rato. Diagrama ilustrativo da organização tridimensional do hipocampo e estruturas relacionadas no encéfalo de rato. A imagem na parte superior ilustra a localização do hipocampo dentro do cérebro e a imagem na parte inferior mostram em um corte coronal as regiões: CA1 e CA3 - *Cornu Ammonisi* 1 e 3; GD – giro denteado; CE – córtex entorrinal; S - Subiculum; PrS – presubiculum; PaS – parasubiculum



Fonte: Adaptado de AMARAL e WITTER (1989); CHEUNG e CARDINAL (2005)

Filogeneticamente a estrutura mais antiga do cérebro, o hipocampo, desempenha papel fundamental na cognição, além de participar da formação, organização e retomada de memórias. Em relação à memória, esta função só é possível pela interação do hipocampo com outras áreas corticais adjacentes, principalmente o córtex entorrinal (CE) (AMARAL; SCHARFMAN e LAVENEX, 2007; TAUPIN, 2007; GRAVES *et al.*, 2012). Além disso, o sistema de consolidação de informação envolve reorganização de estruturas encefálicas, onde o hipocampo e os córtices adjacentes têm papel tempo-limitado na memória de longo prazo e o armazenamento propriamente se dá no neocortex (FRANKLAND e BONTEMPI, 2005; HUIJGEN e SAMSON, 2015). As regiões CA, GD e *subiculum* juntas, são conhecidas como formação hipocampal e cada uma delas mantém um padrão organizado de conexões intrínsecas e extrínsecas (CANTO; WOUTERLOOD e WITTER, 2008; WHEELER *et al.*, 2015).

O surgimento dos neurônios durante o desenvolvimento das diferentes áreas da formação hipocampal, em ratos, acontece quase ao mesmo tempo. O hipocampo primitivo se origina entre os dias embrionários 16 - 17 (E16 - E17); o CE se origina entre E15 - E17; as áreas para- e pré-*subiculum* entre E16 - E19; o *subiculum* entre E16 – E18. Muitas das células do *stratum oriens e stratum lacunosum-moleculare* de CA se desenvolvem entre E15 e E17; as células piramidais de CA se desenvolvem entre E17 – E19; muitas das células das camadas polimórfica e molecular do GD se desenvolvem entre E15 – E19; as células granulares do GD se originam no dia E17 e 10% da população se forma apenas no 18º dia pós-natal (BAYER, 1980).

Entre os dias 3 e 9 após o nascimento (DPN3 - 9) os cones de crescimento das células granulares alcançam o *stratum lucidum* de CA3 e no DPN9 as fibras musgosas (originadas no GD) começam o processo de inervação dos espinhos dendríticos dos neurônios piramidais de CA3; entre DPN10 - 14, essas fibras se consolidam e se tornam completamente desenvolvidas apenas no DPN21 (TAUPIN, 2007).

O GD se organiza em três camadas, da mais superficial para a mais profunda, em: 1) camada molecular (CM) - ocupada por dendritos de células granuladas, fibras da via perforante originadas no CE, um pequeno grupo de interneurônios e outras vias aferentes extrínsecas da formação hipocampal; 2) camada granular (CG): principal camada do GD - compreende grande densidade de células granulares; 3) camada polimórfica (CP) ou hiliar - compreende muitos tipos celulares, porém, as

mais proeminentes são as células musgosas. Na borda da camada granular encontram-se os corpos celulares das células piramidais em cesto (AMARAL; SCHARFMAN e LAVENEX, 2007).

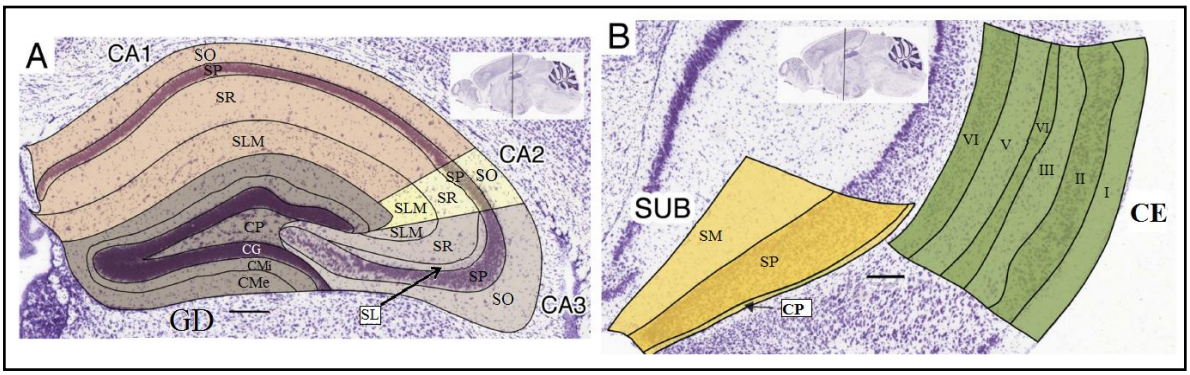
O *Cornu Ammonis* (CA) é uma região subdividida em CA1, CA2 e CA3, classificada por Rafael Lorente de Nó em 1934 a partir da técnica de coloração por impregnação de prata (TAUPIN, 2007; INIESTA, 2014; LARRIVA-SAHD, 2014). Essas regiões, assim como no GD, se organizam em camadas, ou *stratums*, da mais profunda para a mais superficial, em: 1) *stratum moleculare* (SM) – composta por dendritos apicais de células piramidais; 2) *stratum lacunosum (ou lacunosum-moleculare* - SLM) – composta por uma rede inibitória muito forte composta por vários tipos de interneurônios GABAérgicos; 3) *stratum radiatum* (SR) – composta por dendritos basais de células piramidais; 4) *stratum lucidum* (SL) – formada por dendritos de neurônios piramidais, fibras musgosas provenientes do GD, interneurônios e está presente somente na região CA3; 5) *stratum pyramidale* (SP) – composta por corpos de células piramidais; 6) *stratum oriens* (SO) – composta por dendritos de células piramidais; e 7) *alveus* (ALV). A região CA3 localiza-se adjacentemente ao plexo coroide e fórnix; CA2 é uma pequena região de ligação entre CA1 e CA3 (FREUND e BUZSÁKI, 1996; AARON; WILCOX e DICHTER, 2003; TAUPIN, 2007; KULLMANN, 2011; MACCAFERRI, 2011; WHEELER *et al.*, 2015).

A região do *subiculum* (SUB) está localizada entre as regiões CA1 e o CE, e também se organiza em camadas (camada polimórfica, piramidal e molecular). SUB e CA1 são as principais estruturas de vias aferentes que transmitem informação de volta ao CE e indiretamente para as demais áreas neocorticais (FREUND e BUZSÁKI, 1996).

O CE é formado por seis camadas (I-VI) e é a região de onde se originam as principais projeções que chegam ao GD e CA. Essas projeções, também chamadas de caminho perforante, passam pelas camadas molecular e piramidal do *subiculum* e chegam até a camada molecular do GD e ao *stratum lacunosum-moleculare* das regiões CA.

A Figura 13 ilustra as camadas celulares nas regiões da formação hipocampal, que compreende o giro denteado (GD), *Cornu Ammonis* (CA), córtex entorrinal (CE) e *subiculum* (SUB).

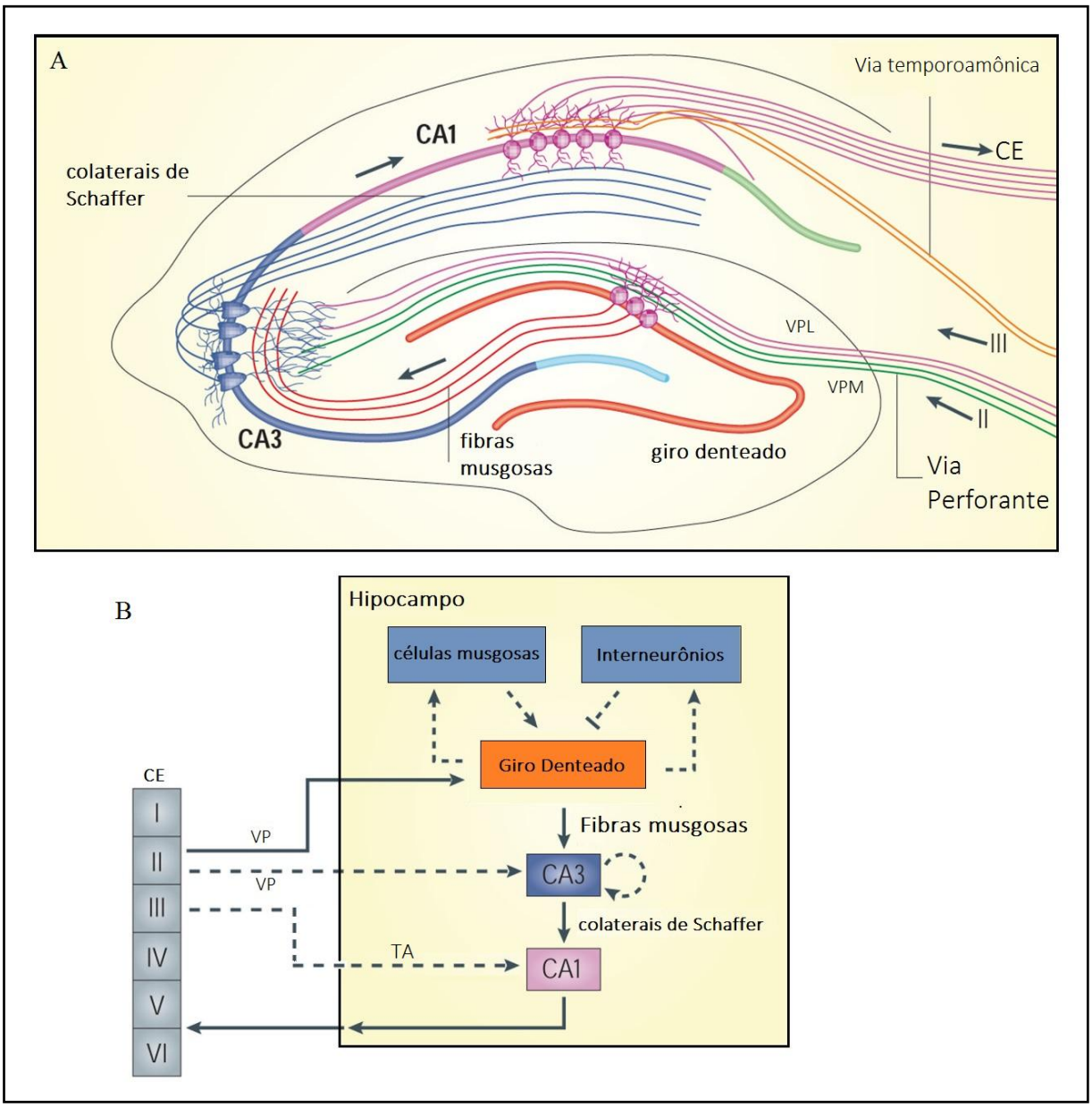
Figura 13 - Camadas celulares nas regiões da formação hipocampal. (A) *Cornu Ammonis* (CA) 1, 2 e 3 e giro denteado (GD): (SO) *stratum oriens*; (SP) *stratum pyramidale*; (SR) *stratum radiatum*; (SLM) *stratum lacunosu-moleculare*; (SL) *stratum lucidum*; (CP) camada polimórfica; (CG) camada granular; (CMi) camada molecular interna; (CMe) camada molecular externa. (B) as seis camadas (I-VI) do córtex entorrinal (CE) e subiculum (SUB): (SM) *stratum moleculare*; (SP) *stratum pyramidale*; (CP) camada polimórfica



Fonte: Adaptado de WHEELER *et al.* (2015)

A formação hipocampal possui um padrão único de conectividade conhecido por circuito tri-sináptico (Figura 14). Este circuito inicia-se com as células granulares do GD sendo alvo de conexão das fibras aferentes do CE, que trazem informações sensoriais. Essas fibras, também conhecidas por fibras perforantes, são os axônios das células piramidais do CE que inervam os dendritos das células granulares da camada molecular do CG. Por sua vez, as células granulares projetam seus axônios (também conhecidos por fibras musgosas) para as células piramidais da região CA3, que se projetam para a região CA1, constituindo a via colateral de Schaffer. As células piramidais da região CA1 projetam-se de volta para o CE, passando pelo *subiculum*, completando assim o circuito, que é mediado principalmente pelo sistema glutamatérgico. Além das conexões entre as regiões, existem ainda pequenos circuitos internos no CE, GD e em CA que interligam as camadas superiores e inferiores (AMARAL e WITTER, 1989; FREUND e BUZSÁKI, 1996; O'MARA *et al.*, 2001; KULLMANN, 2011). Segundo Amaral *et al.* (2007), as projeções vindas do CE inervam os dendritos das células granulares e os interneurônios no GD, que se ramificam até o *subiculum*.

Figura 14 - Circuito tri-sináptico na formação hipocampal de roedores. Ilustração do circuito hipocampal (A) e diagrama da rede neural na formação hipocampal (B). As setas continuas indicam as vias tradicionais excitatórias no circuito tri-sináptico (córtex entorrinal (CE) – giro denteado – CA3 – CA1 – CE). A informação sensorial é projetada para o giro denteado pelos axônios advindos dos neurônios da camada II do CE pela via perforante (VP), incluindo as vias lateral (VPL) e media (VPM). O giro denteado projeta para as células piramidais da região CA3 pelas fibras musgosas. CA3 manda a informação para a região CA1 pelas fibras colaterais de Schaffer e os neurônios piramidais da região CA1 mandam projeções de volta para o CE. CA3 também recebe projeções diretas do CE através da via perforante, assim como CA1, que recebe as projeções diretas do CE pela via temporoamônica (TA). As células granulares do giro denteado também fazem sinapses com as células musgosas e interneurônios da camada hiliar, que mandam projeções excitatórias e inibitórias de volta para as células granulares.



Fonte: Adaptado de DENG; AIMONE e GAGE (2010)

Embora os principais neurônios encontrados na formação hipocampal sejam os neurônios granulares do GD e os piramidais de CA, ambos glutamatérgicos, existem ainda vários tipos de interneurônios, além de vias aferentes de outros sistemas, como as projeções noradrenérgicas provenientes do *locus coeruleus*, as serotoninérgicas do núcleo da rafe, as colinérgicas do septo medial e as dopaminérgicas da susbtância nigra (AMARAL; SCHARFMAN e LAVENEX, 2007; TAUPIN, 2007; KULLMANN, 2011; GRAVES *et al.*, 2012; TELES-GRILO RUIVO e MELLOR, 2013).

O núcleo septal tem tanto projeções colinérgicas quanto GABAergicas para o GD. As projeções colinérgicas inervam tanto as células granulares quanto interneurônios GABAérgicos e as projeções GABAérgicas se conectam com as células de cesto e interneurônios. A área supramamilar do hipotálamo inerva as células granulares do GD com glutamato e substância P. O *locus coeruleus* tem projeções noradrenérgicas para o GD e para as fibras musgosas na região CA3. A área tegmental ventral (VTA) e a substância nigra projetam axônios dopaminérgicos para a camada polimórfica do GD. Existem também projeções GABAérgicas do CE que inervam os interneurônios GABAérgicos em CA1 (*Long-range inhibitory projections* - LRIP) facilitando o estado de ativação do circuito em CA1, muito importante para aquisição e retomada de memória recente e retomada de memória remota (ZEMLA e BASU, 2017).

Os vários tipos celulares encontrados no SNC são classificados por suas características dendríticas, como por exemplo, tamanho, forma, para onde se ramificam ou como interagem com outros neurônios. Ainda, deve-se considerar a localização do tipo neuronal, o tipo de axônio, para onde se projetam e qual o tipo de sinapse ou de neurotransmissor que estão envolvidos na transmissão da informação. Também é importante conhecer o padrão de ativação e potencial de ação de cada tipo neuronal. Assim, os tipos neuronais são classificados quanto a sua morfologia, localização e eletrofisiologia (GOLDING; STAFF e SPRUSTON, 2002; VAN WELIE *et al.*, 2006; GRAVES *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2012).

Sabe-se que a acetilcolina (Ach) é um neurotransmissor com grande papel na modulação da atividade hipocampal devido à presença de ambos os receptores colinérgicos, nicotínico (nAchRs) e muscarínico (mAchRs), distribuídos em todo o hipocampo. O núcleo septal medial e lateral, assim como as bandas diagonais de Broca projetam fibras colinérgicas para as regiões CA1, CA3 e GD, onde fazem

conexão sináptica com dendritos de células piramidais, corpos e dendritos de interneurônios do tipo GABAérgico e somatostatina positiva, e com as células granulares do GD. Contudo, a resposta modulatória irá depender da localização e do tipo de receptor colinérgico (TELES-GRILO RUIVO e MELLOR, 2013).

Ressalta-se aqui que neuromodulador é definido como qualquer tipo de neurotransmissão que não é um excitador ou inibidor direto, mas que tem tal capacidade, permitindo mudanças no estado de ativação do neurônio, ou em um grupo neuronal, levando à adaptações nos sistemas de transmissão (ITO e SCHUMAN, 2008).

O sistema colinérgico no SNC é mediado por neurônios que se projetam das áreas laterodorsal tegmental, pedunculopontine, e septo medial, e por interneurônios espalhados no estriado, núcleo accumbens, núcleo caudado e neocórtex. Além disso, os receptores ionotrópicos (nAchRs) são encontrados predominantemente em terminais pré-sinápticos, no corpo celular e em axônios enquanto que os metabotrópicos (mAchRs) são encontrados tanto pré quanto pós sinapticamente ao longo de todo o encéfalo (PICCIOTTO; HIGLEY e MINEUR, 2012).

Os nAchRs estão amplamente expressos nas células granulares do GD, nas células piramidais e nos interneurônios. Sua ativação resulta no influxo direto de cálcio através de abertura de poros levando à uma rápida despolarização. O acúmulo de cálcio nos terminais pré-sinápticos facilita a liberação de neurotransmissores; já no pós-sináptico, o influxo de cátions resulta em uma resposta excitatória rápida (TELES-GRILO RUIVO e MELLOR, 2013).

Os mAchRs são encontrados em cinco isoformas: M_1-M_5. Os receptores M_1, M_3 e M_5 são acoplados à proteína $G_{q/11}$ e os receptores M2 e M4 são acoplados à proteína $G_{i/o}$, ou seja, a ativação dos receptores do primeiro grupo leva à ativação de fosfolipase C, que cataliza a formação de diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP_3) a partir a fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2). O IP_3 atua em organelas intracelulares (como o reticulo endoplasmático) aumentando a liberação e concentração de cálcio intracelular (HAGA, 2013). Já a ativação dos receptores do segundo grupo, inibe a enzima adenilil ciclase, que impede a formação de AMPc e fosfoquinase A reduzindo a atividade metabólica celular (TIWARI *et al.*, 2013).

Os receptores colinérgicos muscarínicos do tipo M_1 e M_3 podem ser encontrados no corpo celular, dendritos e espinhos dos neurônios excitatórios (granulares de CA3 e piramidais de CA1), nos interneurônios GABAérgicos e células

associadas às fibras colaterais de Schaffer em CA1. O receptor M_2 está distribuído nos terminais pré-sinápticos das células em cesto e células axo-axonal em CA3 e CA1. Já o M_4 está presente na soma de células não-piramidais, nos terminais pré-sinápticos das fibras colaterais de Schaffer e o M_5 foi detectado em baixa concentração ao longo de todo o hipocampo (LEVEY *et al.*, 1995; MCQUISTON, 2014).

Assim como a acetilcolina, a dopamina (DA) também tem função moduladora da atividade hipocampal e está relacionada com memória espacial e aprendizado. Existem 3 principais fontes de dopamina: 1) região nigroestriatal – relacionada com funções motoras, onde projeções da substância nigra vão para o dorso do estriado e regulam a atividade neuronal dos gânglios da base; 2) região mesocorticolimbico – onde as projeções da VTA alcançam o núcleo accumbens, a amígdala, o bulbo olfatório, o hipocampo, o GD e os córtex pré-frontais orbital e medial, estando relacionado com funções cognitivas, motivação e emoções; e 3) região tuberoinfundibular – onde projeções hipotalâmicas inervam a pituitária anterior e controlam funções neuroendócrinas como a secreção de prolactina (RANGEL-BARAJAS; CORONEL e FLORÁN, 2015).

Os cinco subtipos de receptores dopaminérgicos são divididos em duas classes: os receptores tipo D_1 (compreende os receptores D_1 e D_5) e os tipo D_2 (compreende os receptores D_2, D_3 e D_4). Os receptores tipo D1 são acoplados à proteína G_s, ou seja, quando ativados, estes receptores irão ativar adenilil ciclase e aumentar a concentração de AMPc e fosfoquinase A, tendo uma resposta excitatória. Os receptores do tipo D_2 são acoplados à proteína $G_{i/o}$, ou seja, possuem ação inversa dos receptores tipo D_1, inibindo adenilil ciclase que reduz AMPc e a cascata de ativação de segundos e terceiros mensageiros na resposta celular (FORD, 2014; HERNÁNDEZ *et al.*, 2014; RANGEL-BARAJAS; CORONEL e FLORÁN, 2015).

Os receptores do tipo D_1 são encontrados exclusivamente nas regiões pós-sinápticas; os receptores D_2 e D_3 são expressos nas regiões pós-sinápticas de células alvo e pré-sinápticas de neurônios dopaminérgicos (BEAULIEU e GAINETDINOV, 2011). O hipocampo é uma região que expressa os cinco subtipos de receptores com predominância dos receptores D_2 e D_5. O estriado, o núcleo accumbens e a substância nigra apresentam altas concentrações dos receptores D_1, D_2 e D_3. O receptor D_4 é encontrado no córtex frontal, amigdala, substância nigra e tálamo.

O receptor D_5 é encontrado em baixas concentrações em regiões corticais (cingulado, pré-frontal, pré-motor e entorrinal), no hipotálamo e núcleo accumbens (BEAULIEU e GAINETDINOV, 2011; RANGEL-BARAJAS; CORONEL e FLORÁN, 2015).

2.4 Proteína associada ao microtúbulo tipo 2 (MAP2)

O citoesqueleto dos neurônios é composto por três estruturas distintas: microtúbulos, neurofilamentos e microfilamentos. Os microtúbulos são essenciais em muitos processos, como migração neuronal, polaridade e diferenciação celular, assim como atuar como uma plataforma para o transporte intracelular de vesículas secretoras, macromoléculas e organelas (KAPITEIN e HOOGENRAAD, 2015).

Durante o desenvolvimento do SNC, as células neuronais passam por várias mudanças estruturais desde sua migração, até a completa maturação. Um dos primeiros estágios desse desenvolvimento é o crescimento de neuritos, que depende da formação e alongamento do microtúbulo, que se estabiliza, dando resistência aos axônios e dendritos. A estabilidade e funcionalidade dos microtúbulos dependem de proteínas associadas a estes e que se dividem em duas classes: proteínas motoras (cinesina e dineínas) e proteínas ligadas à estrutura dos microtúbulos como catanina, estatimina e as proteínas promotoras de formação do microtúbulo, também referidas como MAPs (*Microtubule-associated protein*). MAP1, MAP2 e tau são os principais membros da família das MAPs, expressos em células neuronais. (SÁNCHEZ; DíAZ-NIDO e AVILA, 2000; KAPITEIN e HOOGENRAAD, 2015).

A MAP2 pode ser encontrada em três isoformas: MAP2a, MAP2b e MAP2c, onde MAP2c é expressa apenas em neurônios imaturos e tem sua expressão reduzida conforme o neurônio vai se maturando; MAP2a tem sua expressão aumentada conforme MAP2c vai reduzindo e MAP2b é a isoforma que está presente em todos os estágios do desenvolvimento do neurônio (SOLTANI *et al.*, 2005).

As proteínas MAP2 contribuem para o crescimento dos dendritos e é importante para a plasticidade do encéfalo adulto, tendo em vista o aumento expressivo desta proteína ao longo dos dias pós-nascimento de ratos, principalmente na camada molecular do GD, e no *stratum radiatum* de CA1 e CA3 a partir do oitavo dia pós-nascimento (JALAVA *et al.*, 2007).

Segundo Dehmelt e Halpain (2005) a MAP2 tem outras funções além de estruturar e estabilizar os microtúbulos, elas também se ligam aos filamentos de actina favorecendo a iniciação de neuritos, atuam no recrutamento de proteínas sinalizadoras e regulam o transporte de macromoléculas ao longo dos microtúbulos.

3 Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Investigar e caracterizar a via de ativação de morte celular decorrente da exposição à cocaína, anidroecgonina metil ester (AEME) e à associação de ambas, em cultura de neurônios hipocampais de fetos de rato.

3.2 ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS

Para se alcançar o objetivo geral os neurônios hipocampais foram expostos à 2mM de cocaína, 1mM de AEME e à associação de ambas as substâncias por 1, 3, 6 e 12h e foram avaliados quanto:

- Estudos de viabilidade celular pelos testes de MTT e azul de tripan;
- Investigação das vias de ativação da apoptose por citometria de fluxo e Western blotting;
- Investigação do processo autofágico por microscopia de fluorescência, citometria de fluxo e Western blotting; e
- Morfologia celular por imunofluorescência.

4 Material e Métodos

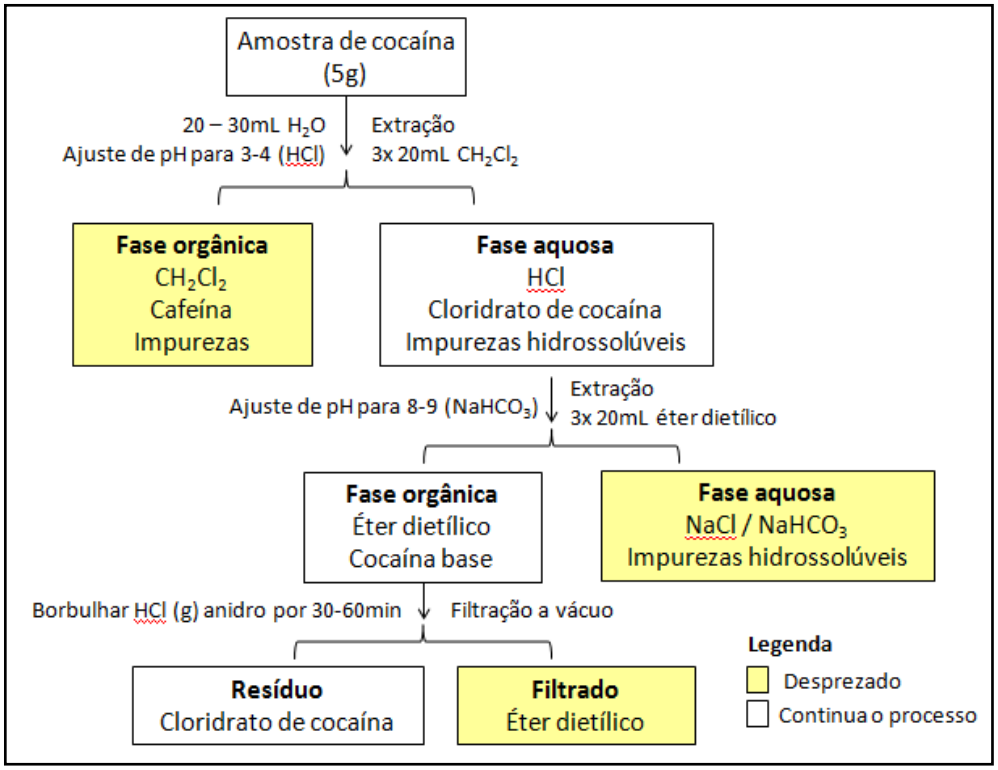
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PURIFICAÇÃO DA COCAÍNA

A cocaína utilizada nesse estudo foi cedida pela polícia científica por meio de apreensões de rua, assim, a primeira etapa desse trabalho foi purificar as amostras a fim de se eliminar seus contaminantes.

A cocaína foi purificada em nosso laboratório de acordo com o fluxograma a seguir (Figura 15).

Figura 15 - Fluxograma das etapas de purificação de cocaína. H_2O = água; HCl = ácido clorídrico; CH_2Cl_2 = diclorometano; $NaHCO_3$ = bicarbonato de sódio; NaCl = cloridrato de sódio



Após o processo de purificação, a identificação e quantificação do cloridrato de cocaína foram obtidas por cromatografia em fase gasosa (Agilent Technologies 6890N) acoplada a um detector de nitrogênio/fósforo (CG-NPD).

As condições cromatográficas empregadas foram: temperatura de 270ºC no injetor, fluxo de 10 mL/min, nitrogênio como gás de arraste, temperatura inicial de 148ºC no forno, com corrida de 1 min. Ainda nas condições do forno, foram empregadas duas rampas: rampa 1 (200ºC, taxa de 10ºC/min), rampa 2 (270ºC, taxa

de 20ºC/min e corrida de 7 min), com corrida total de 16,7 min. O detector estava ajustado à 280ºC, com fluxo de H_2 (3 mL/min) e fluxo de ar de 60 mL/min. A coluna utilizada foi uma Ultra 2 (5% fenil metil siloxano) medindo 25 m x 200 µm x 0,33 µm, volume de injeção de 2 µL e fluxo de 0,7 mL/min.

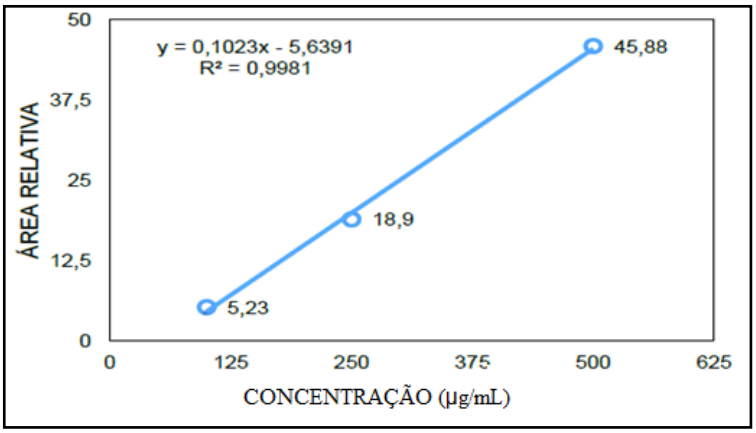
Inicialmente uma curva de calibração, de concentração por área relativa do pico cromatográfico, foi preparada a partir de uma solução de 1 mg/mL de cocaína padrão (Cerilliant®) de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 – Pontos da curva de calibração do padrão de cocaína. Os pontos da curva de calibração foram preparados a partir de uma solução de cocaína padrão (1 mg/mL – Cerilliant®) e analisados por cromatografia em fase gasosa (CG) (Agilent Technologies 6890N), com detector de nitrogênio/fósforo (CG-NPD). A difenilamina foi utilizada como padrão interno na concentração de 50 µg/ml

Concentração de cocaína (µg/mL)	Volume da solução 1mg/mL (µL)	Volume de difenilamina (µL)	Volume de metanol (µL)	Volume final (µL)
100	2	10	8	20
250	5	10	5	20
500	10	10	0	20

A curva de calibração das áreas relativas dos picos cromatográficos em relação às concentrações das soluções pode ser observada na Figura 16. A partir da equação da reta dessa calculou-se a concentração da amostra de cocaína purificada.

Figura 16 - Curva de calibração para análise da concentração de cocaína. A área relativa dos picos foi calculada pela razão entre as duplicatas, tanto do padrão de cocaína quanto do padrão interno.



4.2 Síntese da AEME

A síntese da AEME foi realizada conforme Garcia *et al*. (2012) com algumas modificações. Resumidamente, uma solução ácida de cloridrato de cocaína (50 mM) em ácido clorídrico foi refluxada por 24 h. Após o resfriamento à temperatura ambiente, a mistura foi diluída com água e extraída com éter dietílico (3 x 30 mL) para remoção do ácido benzoico. A fase aquosa foi evaporada sob vácuo até a secura. O resíduo seco foi dissolvido em uma solução de metanol com 5% de ácido sulfúrico. A mistura foi aquecida e refluxada por aproximadamente 24 h. Após este período, o álcool foi removido sob vácuo e o resíduo dissolvido em uma pequena quantidade de água. A solução aquosa foi então saturada com carbonato de sódio até atingir pH entre 8-9, filtrada e extraída com éter (3 x 20 mL). A fração orgânica foi coletada em um béquer com sulfato de magnésio anidro, filtrada em algodão e evaporada sob vácuo, resultando em um líquido viscoso amarelado.

Ao final do processo de síntese, uma alíquota do produto final foi analisada por CG-NPD e outra alíquota foi analisada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (CL-MS/MS).

4.3 Cultura de células hipocampais

As culturas celulares foram obtidas a partir de um *pool* de hipocampos coletados dos encéfalos de fetos de ratos no 18º dia de gestação.

4.3.1 Animais

Foram utilizadas ratas Wistar adultas (a partir de 90 dias de vida), que foram acasaladas com machos da mesma linhagem (a partir de 100 dias de vida). Esses animais foram provenientes do Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) e foram alojados em gaiolas moradias de polipropileno (38 x 32 x 16 cm), forradas com cama de maravalha. As fêmeas foram alojadas em número de três animais por gaiola e os machos individualmente.

As gaiolas foram mantidas em salas com exaustão e temperatura de 22 ± 2°C controlados por meio de aparelho de ar condicionado central, em um ciclo de 12 h

claro/escuro (luz acessa às 7 h 00). Água e ração foram fornecidas *ad libitum*[1] durante todo o procedimento experimental.

Os animais foram utilizados de acordo com as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais em laboratório da FMVZ/USP (Protocolo CEUA nº 5737050814 aceito em 17 de setembro de 2014 – Anexo A) e em acordo com o Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP - Protocolo nº 100.2014 aceito em 26 de setembro de 2014 – Anexo B).

O acasalamento dos animais foi realizado no período de uma noite, assim, na manhã seguinte, foi realizado um esfregaço vaginal e a presença de espermatozoides (Figura 17) confirmou a gestação, sendo designado como o dia zero de gestação (DG0).

Figura 17 - Espermatozoides de rato. Imagem obtida por microscopia de luz em objetiva de 20x, a partir de esfregaço vaginal das ratas permitidas ao acasalamento por uma noite. A presença dos espermatozoides confirma o dia zero de gestação

4.3.2 Cultura de neurônios hipocampais

O método utilizado para o isolamento e cultivo dos neurônios foi baseado nos trabalhos de Huettner e Baughman (1986), Banker e Cowan (1977) e Garcia *et al.* (2012).

No 18º dia de gestação, as ratas foram anestesia com uma mistura de xilasina:cetamina (7:60 mg/kg, i.p.) e foi realizada a cesariana. Após a retirada do

[1] *ad libitum*, do latim, à vontade

útero gravídico, os fetos foram imediatamente decapitados com tesoura, a caixa craniana aberta e os hemisférios encefálicos separados. Com auxílio de uma lupa, os hipocampos foram identificados e dissecados. Para a manutenção do tecido, a estrutura foi mantida em solução de meio neurobasal estéril (Gibco® 12348-017) com 1% de antibióticos (penicilina: estreptomicina 10.000U:10.000 µg/mL – Sigma-Aldrich® P4333); o tecido foi manuseado sobre um papel de filtro umedecido em solução de Hanks (Gibco® 14175-095) filtrada (filtro de 0,20 µm), sobre uma placa de *petri* e gelo por baixo.

4.3.3 Dissociação das células hipocampais

As células hipocampais foram isoladas utilizando o método de digestão proteolítica com tripsina (GARCIA *et al.*, 2012).

Os hipocampos, em fluxo laminar, foram lavados com solução de Hanks e picotados de modo a obter pequenos pedaços. O material foi então transferido para um erlenmeyer contendo 2,5 mL de tripsina estéril 0,25%, pH 7,4 - 7,6 (ajustado com carbogênio). O frasco contendo os fragmentos de hipocampo foi colocado em banho-maria de 37 ^{o}C com agitação plana por 10 min. Em seguida, a solução foi transferida para um tubo cônico tipo *Falcon* contendo 2 mL de solução de descanso (Tabela 3). Posteriormente, o tubo foi centrifugado a 300 x g por 3 min, a 20 ^{o}C. O sobrenadante foi desprezado e o restante foi ressuspendido em mais 2 mL de solução de descanso. O tecido foi então disperso com pipetas *Pasteur* em 3 diferentes diâmetros, por cerca de 30 vezes cada diâmetro. O frasco foi centrifugado a 300 x g por mais 5 min a 20 ^{o}C; após este período, o sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspendido em 1 mL de meio de cultura final e filtrado em peneira de 70 µm.

Tabela 3 - Composição das soluções utilizadas no processo de dissociação das células hipocampais

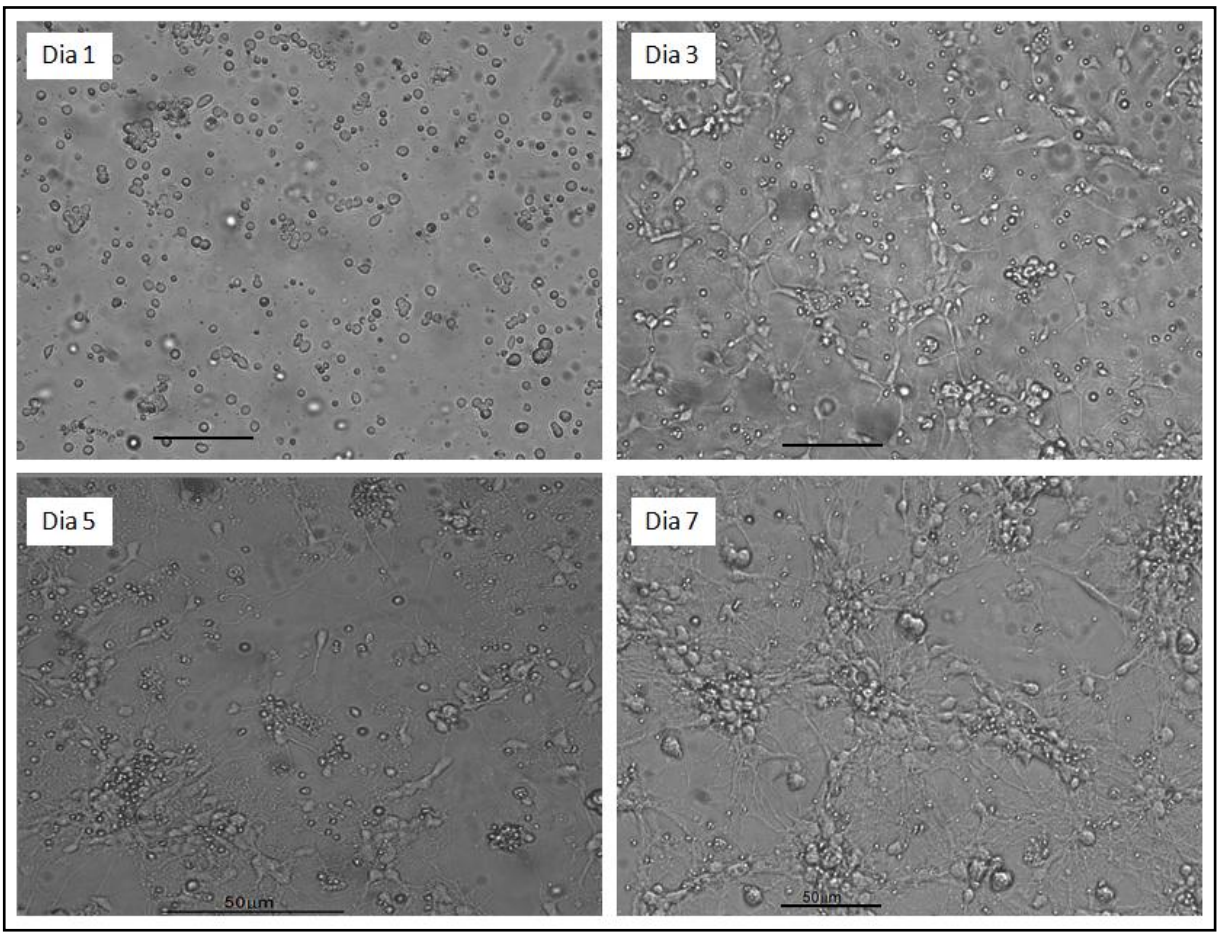
Solução	Composição
Solução de descanso	Solução de Hanks (Gibco®) + 10% de SFB (v/v) + 5% de DNAse (5000 U/mL – Sigma-Aldrich® D4527) – pH 7,4 - 7,6
Meio de cultura final	Meio neurobasal (Gibco® 12348-017) + 2% v/v de suplemento B27 (Gibco® 17504-044) + 50 µM de glutamina + 25 µM de glutamato + 1% de penicilina:estreptomicina (10.000U : 10.000 µg/mL – Sigma-Aldrich® P4333)

SFB = Soro Fetal Bovino; v/v = volume/volume

Uma alíquota de 10 µL foi retirada e corada com azul de tripan (1% em PBS) para contagem em câmara de Neubauer. Em seguida as células foram cultivadas em placas de cultivo onde os poços foram pré-tratados com poli-l-lisina (PLL), para melhorar a aderência dos neurônios à mesma. As placas com as células foram incubadas em estufa a 37 ^{o}C, com 5% de CO_2 por 7 dias para o desenvolvimento do fenótipo celular (Figura 18). A cada 48 h, metade do meio de cultura foi substituído por um novo meio de cultura final. Em média, foram obtidas 2 x 10^6 células/mL a cada 20 filhotes.

Para o preparo das placas de cultivo, adicionou-se PLL em quantidade suficiente para cobrir o fundo de cada poço. Após cerca de 30 min o excedente foi removido e aguardou-se 40 min para que placa estivesse totalmente seca.

Figura 18 - Desenvolvimento fenotípico dos neurônios hipocampais em cultura. As fotos registram as células nos dias 1, 3, 5 e 7 de cultivo. Imagens observadas em microscopia de luz invertida (Leica - LAS V3.7) com objetiva de 20x (barra na parte inferior das figuras representa escala de 50 µm)



4.3.4 Caracterização de neurônios por imunofluorescência

Para a caracterização do tipo celular em nossa cultura, utilizamos 5 x 10^4 células/poço que foram cultivadas em lâminas tipo *chamber* pré-condicionadas com PLL, durante 7 dias (5% CO_2, 37ºC) com troca de meio de cultura a cada 48 h.

No sétimo dia de cultura as células foram fixadas com metanol absoluto gelado (200 μL/poço) por 10 min. Em seguida, foram permeabilizadas com uma solução a 0,01% de Triton-X em tampão salina fosfato (PBS) por 30 min. Foram lavadas duas vezes com PBS + 1% de BSA (*Bovine Serum Albumine*) e bloqueadas com solução de bloqueio (2% soro normal de cabra (NGS); 0,01% Triton-X, 4% BSA em PBS) por 30 min. Após o bloqueio, as células foram lavadas duas vezes e incubadas por 2 h com o anticorpo primário anti-NeuN (Millipore® - MAB377) - diluição 1:50 em 1% NGS; 2% BSA; 0,01% Triton-X em PBS).

Finalizado o tempo de incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS + 1% BSA e incubadas com anticorpo secundário marcado com um fluoróforo de cor verde (*Goat Anti-Mouse IgG H&L Alexa Fluor® 488 – ab150114*) por 40 min, protegido da luz. Foram então lavadas mais duas vezes e incubadas com DAPI (1 µg/mL em PBS – Sigma-Aldrich®, código D9542) por 20 min, protegido da luz. Após essa etapa, as células foram novamente lavadas duas vezes, a *chamber* foi aberta e a lâmina coberta com uma gota de glicerol, em seguida colocou-se uma lamínula e esta foi selada com esmalte. Depois de três dias, foi realizada a leitura da lâmina por microscopia de fluorescência (AXIO ImagerA2 – ZEISS®) no aumento de 40x. Todo o procedimento de marcação foi realizado em temperatura ambiente.

4.3.5 Condições experimentais

Foram avaliadas as respostas celulares decorrentes das exposições à 2 mM de cocaína, 1 mM de AEME e à associação de ambas as substâncias (C + A) dissolvidas no meio de exposição (meio neurobasal + 50 µM de glutamina + 1% de penicilina:estreptomicina) por 1, 3, 6 e 12h. O grupo controle foi exposto apenas ao meio de exposição. Todas as exposições foram realizadas no 7º dia *in vitro*.

4.4 Ensaio de viabilidade celular pela atividade da enzima succinato desidrogenase (ensaio de MTT)

Para esse ensaio, as células foram cultivadas em placas de 96 poços, com $5x10^5$ células/poço. Após o período de exposição, o sobrenadante foi descartado e uma solução de MTT 5 μg/mL foi adicionado às células e incubado por 3h à 37ºC (5% de CO_2). Em seguida foram adicionados 100 μL de DMSO em cada poço, e deixada em agitação continua por 30 min para solubilizar os cristais de formazan formado. A placa foi então analisada por espectrofotometria (Synergy H1) à 595 nm. Foram utilizadas três culturas independentes em quintuplicata.

4.5 Análise da integridade da membrana plasmática (teste de azul de tripan)

Para esse ensaio, as células foram cultivadas em placas de 6 poços com $1,8x10^6$ células/poço, que foram utilizadas para os ensaios de azul de tripan e para a avaliação da externalização de fosfatidilserina, que será apresentado no item 4.6.

No 7º dia de cultura, após o período de exposição, as células foram retiradas da placa por tripsinização (0,25%), neutralizadas com 10% de soro fetal bovino (SFB) em PBS, e transferidas para tubos do tipo *Eppendorf*®, centrifugadas a 250 x g por 3 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 1 mL de PBS. 10 μL da suspensão de células foram diluídas em 10 μL de azul de tripan (1% em PBS) e foram realizadas contagens do número de células coradas e não coradas em azul na câmara de Neubauer.

4.6 Análise da externalização de fosfatidilserina

Para essa análise foram utilizadas 9 culturas independentes ($1,8 \times 10^6$ células/poço) e o kit comercial de diagnóstico de apoptose (*FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I* - BD Biosciences®, código 556547).

Após os períodos de exposição as células foram retiradas da placa por tripsinização, neutralizadas com 10% de SFB em PBS, e transferidas para tubos do tipo *Eppendorf*®, centrifugadas a 250 x g por 3 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 1 mL de PBS. Um total de 1×10^5 células foram

transferidas para tubos de citometria e incubadas com 100 µL de tampão de ligação + 1 µL de Anexina V conjugada com o fluoróforo FITC + 1 µL do corante PI (*propidium iodide* - iodeto de propídio), por 15 min ao abrigo de luz, em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados mais 100 µL de tampão de ligação e as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (BD Accuri™C6®).

Para a calibração dos parâmetros foram utilizadas células induzidas à apoptose (100 nM de estaurosporina por 24 h) e induzidas à necrose (células aquecidas à 60ºC por 5 min).

4.7 Análise de proteínas por Western blotting

As células foram cultivadas em placas de 6 poços ($1{,}8 \times 10^6$ células/poço) e após os períodos de exposição, as células foram lisadas com solução de RIPA modificada (60 µL/poço), acrescida de CIP (cocktail inbidor de proteases – 1 µl/mL) e 0,1 mM de PMSF (*Phenylmethylsulfonyl fluoride*) e sonicação. Os extratos celulares foram centrifugados a 10.000 rpm durante 10 min à 4 ^{o}C. A concentração proteica do sobrenadante foi obtida pelo kit Pierce BCA (Thermo Scientific) usando albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão. Foi adicionado aos extratos celulares o tampão Laemmli e em seguida as amostras foram aquecidas à 99 ^{o}C durante 5 min antes de aplicar a amostra no gel de eletroforese.

Aproximadamente 40 µg de proteínas totais foram aplicadas em um gel de 15% ou 17% de acrilamida. As proteínas migraram no gel por aproximadamente 2h40, submetidas a uma diferença de potencial elétrico de 100 V. A transferência foi realizada em membrana de PVDF (Millipore®), previamente ativadas com metanol, por via úmida, por 1h30 ou 2h00, em 0,4 ampères. Após a transferência, as membranas foram incubadas com solução bloqueadora para saturar os sítios de ligação inespecífica da membrana. A Tabela 4 apresenta resumidamente a composição das soluções utilizadas na técnica de Western blotting.

Após o bloqueio, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas *overnight* à 4 ^{o}C, sob agitação constante, com os anticorpos primários específicos, seguindo as especificações de diluição recomendada pelo fabricante. Após incubação, as membranas foram lavadas com TBS-T (3 vezes de 10 min) e então incubadas com o anticorpo secundário por 2 h, em temperatura ambiente. Foram utilizados anticorpos secundários conjugados com peroxidase *horseradish* (Santa

Cruz Biotechnology®). O sinal foi detectado com o uso do kit de detecção luminescente *ECL Western blot detection reagents* (Thermos Scientific®), as imagens foram digitalizadas (IQuantCapture 400, v.a.0.0, GE Healthcare) e quantificadas pelo software Image Studio Lite RSS (Li-COR Bioscience©). O anticorpo anti-β-actina (1:10.000 - Sigma-Aldrich®) foi utilizado como controle endógeno.

Após a quantificação da densidade ótica das bandas, os dados obtidos foram analisados quanto a porcentagem em relação ao controle.

Tabela 4 - Composição das soluções utilizadas na técnica de Western blotting

Solução	Composição
Tampão de eletroforese	25 mM Tris-HCl; 192 mM Glicina; 20% SDS, pH 8,3
Tampão de transferência	25 mM Tris-HCl; 192 mM Glicina; 20% Metanol, pH 8,3
TBS-T	20 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 0,2% Tween, pH 7,6
Solução bloqueadora	5% leite desnatado ou BSA em TBS-T (p/v)
Tampão Laemmli 1x	50 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 10% Glicerol; 0,02% azul de bromofenol; 5% 2-mercaptoetanol
Tampão RIPA modificado	50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% NP-40 (v/v); 0,25% Ácido deoxicolato (p/v)

SDS = Dodecil Sulfato de Sódio; NaCl = Cloreto de sódio; BSA = (*bovine serum albumine*) albumina de soro bovino; EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético; NP-40 = 4-Nonilfenil Polietileno Glicol; p/v = peso/volume; v/v = volume/volume

Os anticorpos primários específicos utilizados estão listados na Tabela 5.

Tabela 5 - Anticorpos primários utilizados nos ensaios de Western blotting

Anticorpo primário	Diluição	Anticorpo secundário	Fabricante	Código do fabricante
Anti Bax	1:2000	Anti Rabbit	Cell Signalling	2772
Anti Bcl2	1:2000	Anti Rabbit	Cell Signalling	2876
Anti Caspase 8	1:1000	Anti Mouse	Abcam	ab119892
Anti Caspase 9	1:1000	Anti Mouse	Abcam	ab28131
Anti Caspase 3	1:1000	Anti Mouse	Abcam	ab32351
Anti LC3 A/B	1:2000	Anti Rabbit	Cell Signalling	12741P

4.8 Detecção de caspases ativas por citometria de fluxo

Para a realização desse ensaio foram utilizados kits comerciais de detecção de caspases ativas: Caspase-8 *Detection Kit* (FITC-IETD-FMK) - QIA113, Caspase-9 *Detection Kit* (FITC-LEHD-FMK) - QIA115 e Caspase-3 *Detection Kit* (FITC-DEVD-FMK) – QIA91 da empresa Calbiochem®, Merck Millipore.

Um total de 3 x 10^5 células foram marcadas com 1 µL de anticorpo anti-caspase -8, -9, ou -3, conjugados com FITC e incubados por 30 min à 37ºC. Após o período de incubação, as amostras foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem, e centrifugadas a 600 x g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em mais 200 µL de tampão de lavagem e analisado por citometria de fluxo (BD Accuri™C6®). Os resultados foram analisados pela mediana da intensidade de fluorescência (MFI).

4.9 Análise de vesículas ácidas por citometria de fluxo

Para essa técnica foram cultivadas 5 x 10^5 células/poço. Após o período de exposição com as substâncias de interesse, o meio foi descartado e as células foram incubadas com uma solução de 1 µg/mL de laranja de acridina (Sigma-Aldrich® - A8097) em PBS por 15 min. Em seguida a solução foi descartada e as células lavadas uma vez com PBS. As células foram retiradas por tripsinização e depois diluídas em 200 µL de PBS para serem analisadas por citometria de fluxo logo em seguida. Foram analisadas as fluorescências nos canais de FL1 (verde) e FL3 (vermelho), e quantificadas as porcentagens de células marcadas para laranja.

4.10 Análise de vesículas ácidas por microscopia de fluorescência

Foram cultivadas 3,4 x 10^5 células/poço em placa de cultura celular com quatro compartimentos (35 mm de diâmetro – Cellview™ – Greiner Bio-One®, ref. 627870). Após o período de exposição com as substâncias de interesse, o meio foi descartado e as células foram incubadas com uma solução de 1 µg/mL de laranja de acridina em PBS por 15 min. Em seguida a solução foi descartada, as células foram lavadas uma vez com PBS e observadas em microscopia de fluorescência (microscópio AXIO ImagerA2 - ZEISS) em até 45 min, sob incidência da luz azul,

sem filtros. As imagens foram capturadas usando a câmera integrada AXIO Cam MRc (60N-C 1” 1,0x – ZEISS) e foram analisados 4 campos de cada poço, em 3 experimentos independentes, considerando a porcentagem de células marcadas em laranja em razão do número total de células.

4.11 Análise da expressão de MAP2 por microscopia de fluorescência

Para esse ensaio foram cultivadas 5 x 10^5 células/poço sobre lamínulas de vidro. Após o período de exposição com as substâncias de interesse, o meio foi descartado e as células foram fixadas com uma solução de 2% de paraformoldeido em PBS (pH 7,4) por 30 min, em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com uma solução de 0,1 M de glicina em PBS e permeabilizadas com uma solução 0,001% de Triton-X por 25 min. As células foram lavadas duas vezes com 1% de BSA em PBS e incubadas com o anticorpo primário anti-MAP2 (Abcam® – ab92434) por 2 h, em temperatura ambiente. O anticorpo foi diluído na proporção de 1:500 em uma solução de PBS + 1% BSA + 0,01% de azida sódica. Após o período de incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS + 1% BSA e o anticorpo secundário (Goat Anti-chicken IgY H&L Alexa Fluor® 488 – ab150169) foi incubado por 40 min, em temperatura ambiente e protegido da luz. O anticorpo secundário foi diluído na proporção de 1:500 em PBS + 1% BSA + 0,01% de azida sódica. Em seguida as células foram novamente lavadas duas vezes e incubadas com DAPI (1 µm/mL em PBS) por 20 min. Depois de lavar as células mais duas vezes, as lamínulas foram retiradas do fundo da placa de cultivo e montadas em lâminas de microscopia com uma gota de glicerol.

As lâminas montadas foram seladas com esmalte e analisadas por microscopia de fluorescência (microscópio AXIO ImagerA2 - ZEISS) nos filtros verde e azul. As imagens foram capturadas usando a câmera integrada AXIO Cam MRc (60N-C 1” 1,0x – ZEISS) e processadas pelo software ImageJ (NIH, http://imagej.nih.gov/ij). Foram analisadas as características morfológicas da cultura celular em dois campos aleatórios de duas culturas independentes.

4.12 Análise estatística

Para as análises estatísticas foi utilizado o software *GraphPad Prism* v6.00© para Windows, San Diego, Califórnia. Foram utilizados os testes e análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas sempre que $p<0,05$.

5 Resultados

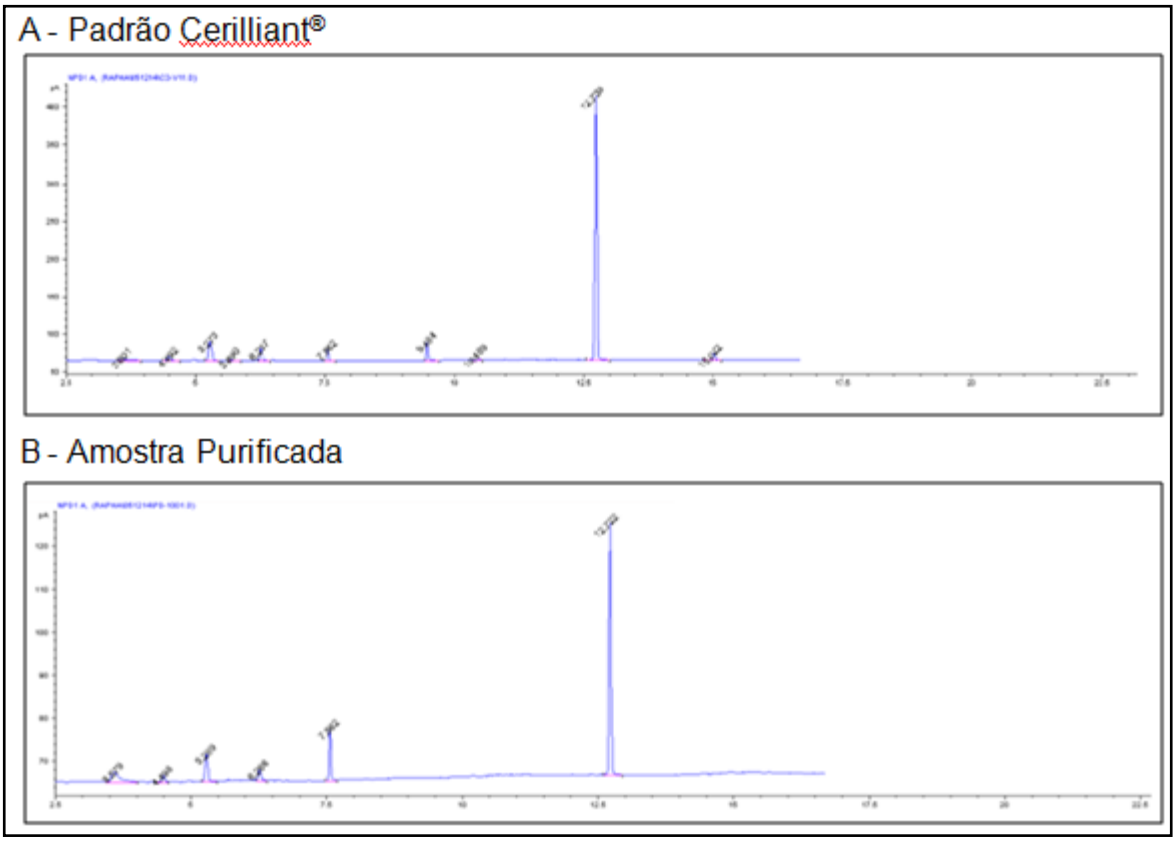
5 Resultados

5.1 Purificação da cocaína

Após o processo de purificação da cocaína, esta foi analisada por CG/NPD. A Figura 19 ilustra os cromatogramas representativos das análises da cocaína padrão (Cerilliant®) e da amostra purificada, utilizando difenilamina como padrão interno de análise.

Podemos observar que os picos cromatográficos, tanto da amostra padrão (Figura 19A) quanto da amostra de interesse (Figura 19B), apresentaram-se em tempos de retenção semelhantes de 12,7 min. Portanto, a amostra purificada confirmou-se cocaína.

Figura 19 - Cromatogramas representativos da cocaína, por CG/NPD. Cromatogramas representativos da solução padrão de cocaína (Ceriliant® -100µg/mL) (A) e da amostra purificada (B). Tempos de retenção de 12,7 min para cocaína e 7,5 min para o padrão interno (difenilamina).



A partir da construção da curva de calibração com a cocaína padrão (Cerilliant®) e comparando a área relativa do pico cromatográfico da amostra de

interesse, observamos que nossa amostra purificada apresentou-se com 95% de pureza. Assim, conhecendo o grau de pureza da nossa amostra, passamos a empregá-la nas etapas seguintes: exposição das células e síntese da molécula de AEME.

5.2 Síntese da AEME

Ao final do processo de síntese, uma alíquota do produto final foi analisada por CG-NPD e outra alíquota foi analisada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (CL-MS/MS).

Pela análise de CG-NPD (Figura 20) obtivemos um pico cromatográfico característico de AEME em torno de 5,3 min de retenção, da mesma forma que Lowe *et al*. (2006) e Garcia *et al*. (2012). Para tal confirmação, obtivemos por CL-MS/MS (Figura 21), um pico cromatográfico retido entre 4 e 5,5 min e fragmentos iônicos, originados da quebra da molécula, em 182, 122 e 118 m/z, estando de acordo com os achados de CASTIGLIONI *et al*. (2008) e GARCIA *et al*. (2012) caracterizando assim, o sucesso na síntese da molécula de AEME.

Figura 20 - Cromatogramas representativos da AEME, por CG/NPD. Análise do produto final da síntese de AEME, em duplicata. Pico cromatográfico com tempo de retenção de 5,37 min.

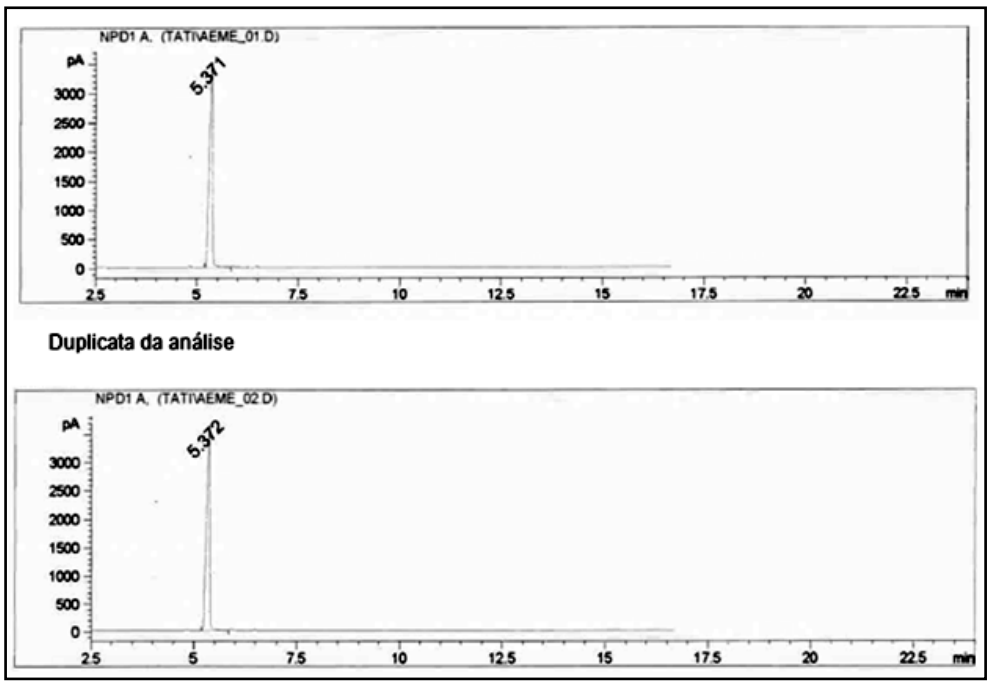
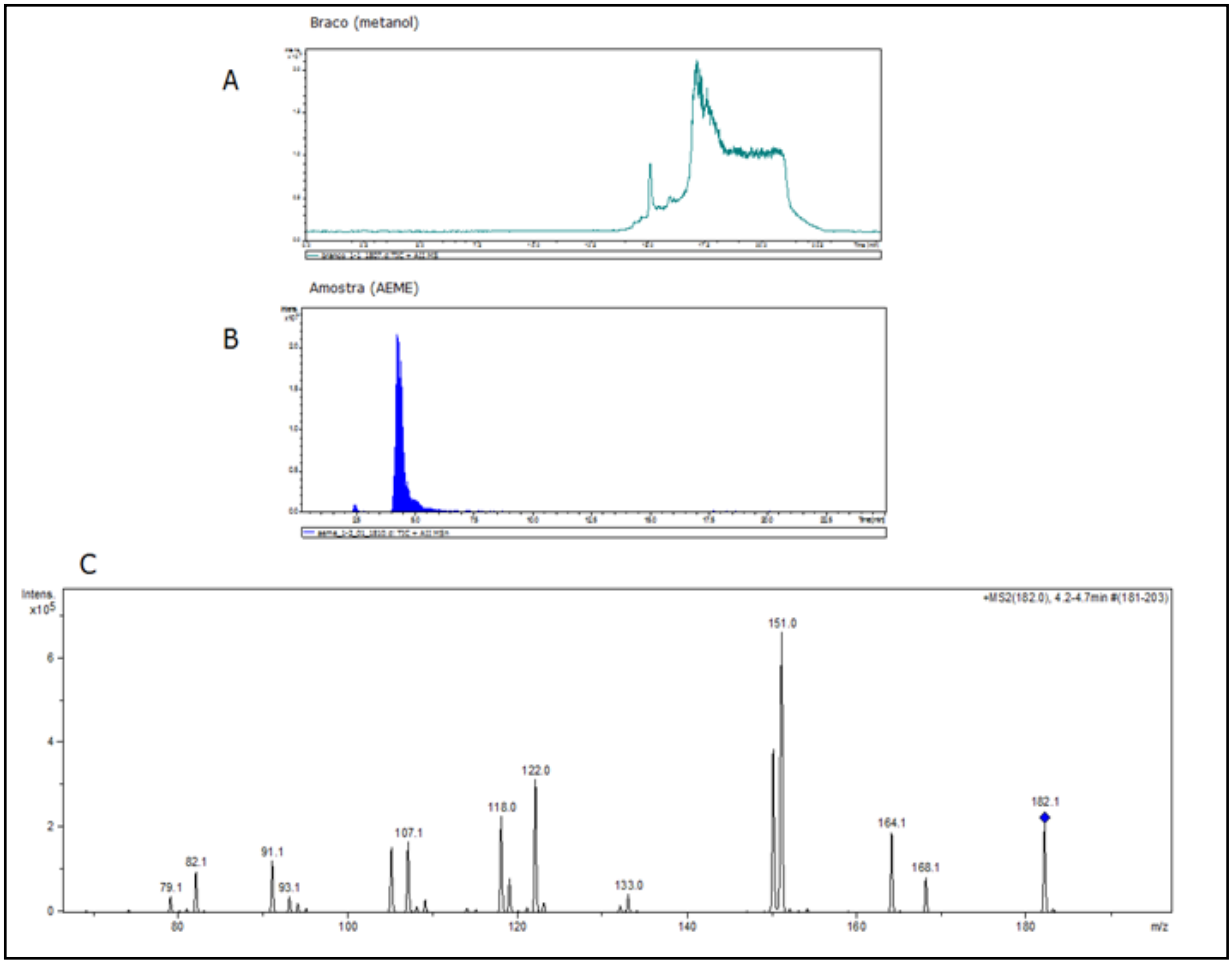


Figura 21 - Perfil cromatográfico da AEME. Cromatogramas representativos do produto final da síntese de AEME. (A) Perfil cromatográfico do branco (metanol); (B) Perfil cromatográfico da amostra de AEME; (C) Espectro dos fragmentos da molécula de AEME. Análise por CL-MS/MS



5.3 Caracterização da cultura celular por imunofluorescência

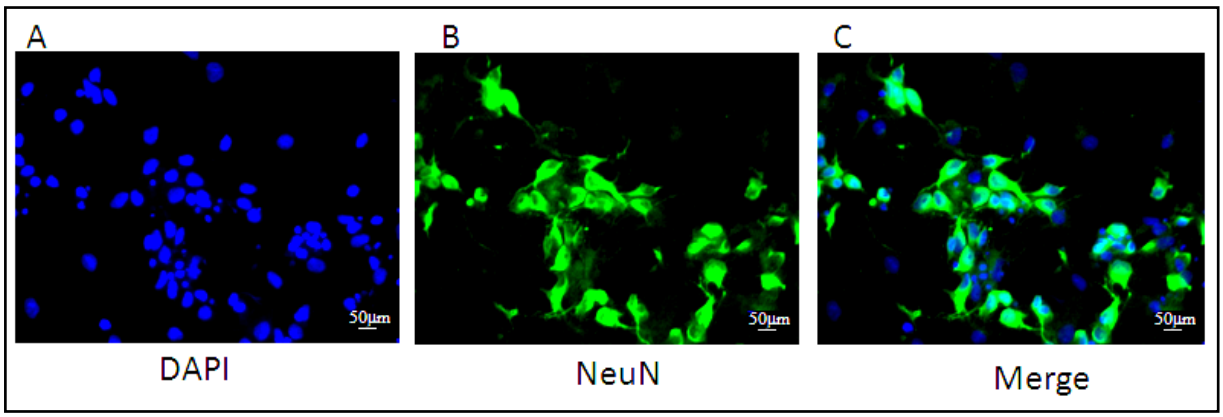
Para o ensaio de caracterização celular, utilizamos 5 *chambers*. Inicialmente foram contadas as células marcadas apenas com DAPI e depois as células marcadas apenas com NeuN em cada uma das 5 *chambers* cultivadas.

O anticorpo Anti-NeuN reconhece a proteína NeuN, neurônio específico. Sua distribuição está aparentemente restrita ao núcleo neuronal, pericário e alguns processos neuronais proximais, embora não seja reconhecido nas células de retina, Purkinje e células do gânglio simpático (MULLEN; BUCK e SMITH, 1992).

As células marcadas com DAPI foram consideradas 100% e a porcentagem de células marcadas com NeuN foi calculada. Assim, em média, as culturas apresentaram 93% de células tipo neurônio.

A Figura 22 ilustra todos os núcleos celulares marcados apenas com DAPI (A), as células somente marcadas com NeuN (B) e a sobreposição de imagens (C).

Figura 22 - Caracterização do tipo celular na cultura primária hipocampal. Imagens representativas obtidas por microscopia de fluorescência (Axio Imager A2 – Zeiss®) em objetiva de 40 x para a caracterização das populações celulares. Células no 7º dia de cultura onde é possível observar os núcleos celulares marcados com DAPI (A), as células tipo neurônio marcados com NeuN (B) e as imagens sobrepostas (C).



5.4 Estudo de viabilidade celular pelo teste de MTT

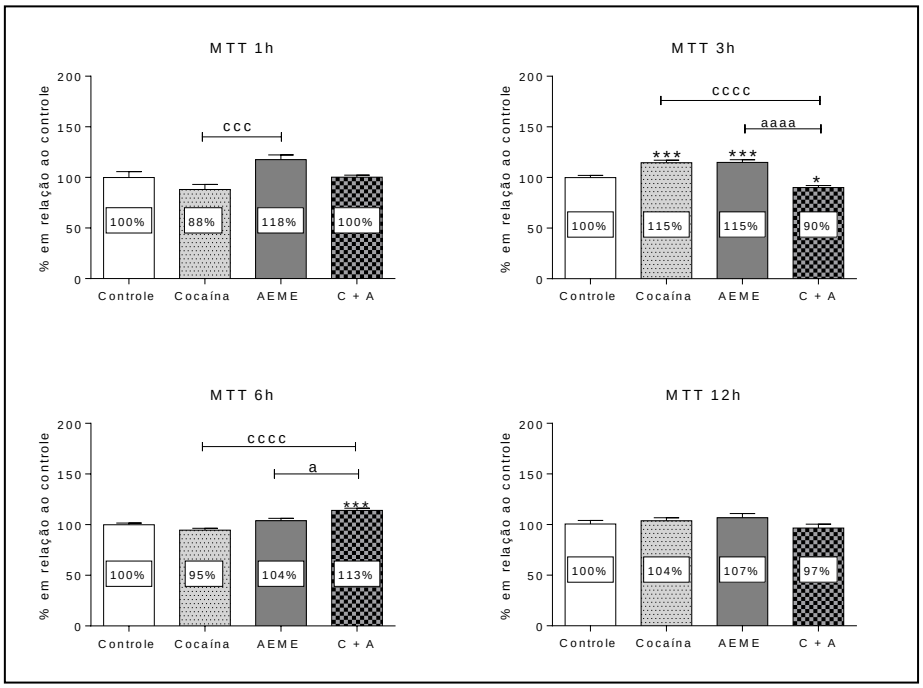
O teste de MTT avalia a atividade metabólica das células, que pode ser considerado um reflexo de viabilidade celular. O brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio ou MTT) é um substrato amarelado que quando reduzido à formazan pela enzima succinato desidrogenase, torna-se azul escuro com absorbância máxima em 595 nm. Succinato desidrogenase, ou complexo II, é uma flavoproteína ligada à membrana interna mitocondrial que intervém no ciclo de Krebs e na cadeia respiratória (OYEDOTUN e LEMIRE, 2004). Células viáveis apresentam atividade metabólica intacta, portanto, reduzem o MTT à formazan. Assim, quando esse substrato não é reduzido, entende-se que a célula perdeu sua capacidade metabólica e viabilidade. Porém, algumas células já mortas ainda apresentam atividade parcial intacta da succinato desidrogenase, assim, o ensaio de MTT não

deve ser utilizado sozinho, mas em conjunto com outros testes (BERGHE *et al.*, 2013).

A Figura 23 ilustra os resultados obtidos no ensaio de MTT.

Podemos observar que em 1 h de exposição não houve diferenças estatísticas em relação ao controle, contudo, as células expostas à AEME apresentaram atividade metabólica maior do que a do grupo exposto à cocaína ($p<0,001$). Em 3 h de exposição, tanto a cocaína quanto a AEME promoveram maior conversão de MTT do que o controle (ambos $p<0,001$) e do que a associação (ambos $p<0,0001$); ainda sobre C + A, observamos redução da atividade metabólica em relação ao controle ($p<0,05$). A partir de 6 h de exposição houve uma inversão de atividade metabólica para as células expostas à associação das substâncias, onde estas apresentaram aumento de metabolismo em relação ao controle ($p<0,001$) e em relação à cocaína ($p<0,0001$) e AEME ($p<0,05$). A partir de 12 h de exposição, não observamos diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

Figura 23 - Atividade metabólica celular medida pelo teste de MTT. Análise da atividade metabólica dos neurônios expostos ou não (controle) à 2 mM de cocaína, 1 mM de AEME e à associação das substâncias (C + A) pelos períodos de 1, 3, 6 e 12 h. Dados expressos em médias ± erro padrão da porcentagem em relação ao grupo controle. Ensaio realizado em 3 experimentos independentes, em quintuplicata.



ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni. *$p<0,05$, ***$p<0,001$ em relação ao controle. $^{c}p<0,05$, $^{ccc}p<0,001$, $^{cccc}p<0,0001$ em relação ao grupo cocaína; $^{a}p<0,05$, $^{aaaa}p<0,0001$ em relação ao grupo AEME

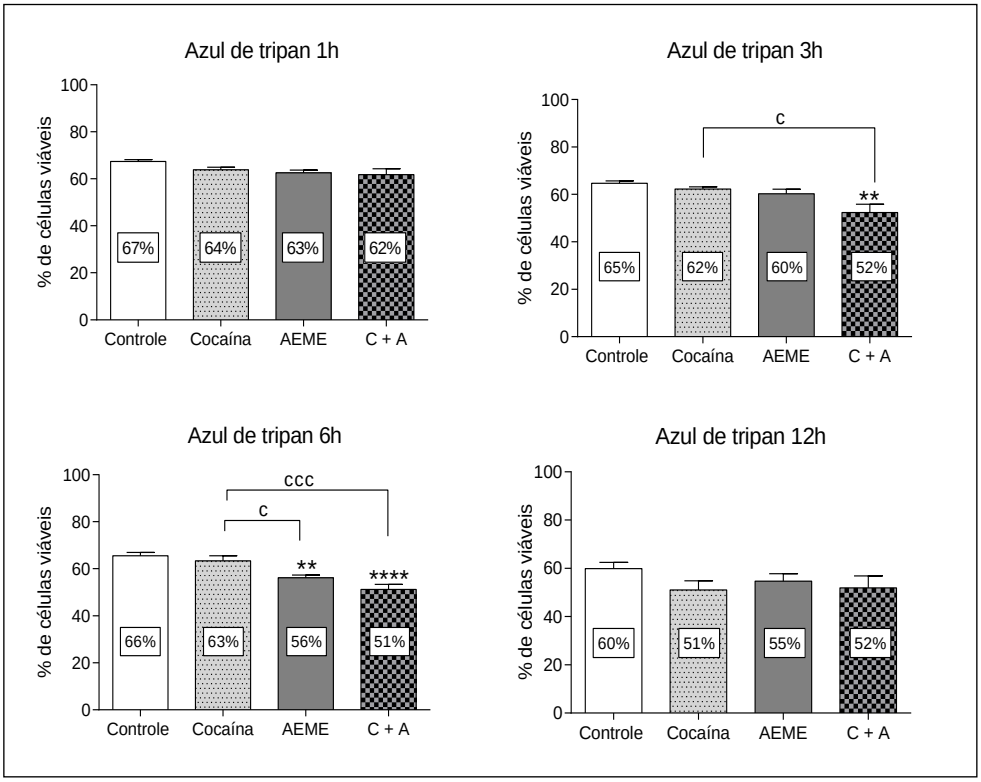
5.5 Estudo de viabilidade celular por azul de tripan

Uma célula é considerada morta quando esta perde a integridade de sua membrana plasmática (KROEMER *et al.*, 2009; BERGHE *et al.*, 2013). O azul de tripan é um corante diazo usado para corar células mortas. Ele possui carga negativa, portanto, não interage com as células, ao menos que estas apresentem danos na membrana plasmática. Todas as células que não são coradas pelo azul de tripan são consideradas viáveis enquanto que as com danos na membrana se coram e podem ser observadas por microscopia de luz (TRAN *et al.*, 2011).

A Figura 24 ilustra os resultados obtidos nesse ensaio.

Podemos observar diferenças estatísticas significativas em 3 h, com a associação das substâncias apresentando menor porcentagem de células viáveis do que o controle ($p<0,01$) e do que o grupo cocaína ($p<0,05$) assim como em 6 h, onde C+A mostrou-se menos viável do que o controle ($p<0,0001$) e do que o grupo cocaína ($p<0,001$). Além disso, observamos nesse período, redução da porcentagem de células viáveis quando expostas à AEME, em relação ao controle ($p<0,01$) e em relação ao grupo cocaína ($p<0,05$). Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos após 1 e 12 h de exposição.

Figura 24 - Ensaio de viabilidade celular por coloração com azul de tripan. Os gráficos apresentam as porcentagens de células não coradas (ou viáveis) pelo corante azul tripan após exposição, ou não (controle), à 2 mM de cocaína, 1 mM de AEME e à associação de ambas as substâncias (C+A) por 1, 3, 6 e 12 h. Dados expressos em média ± erro padrão, em 10 experimentos independentes



ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. **p<0,01; ****p<0,0001 em comparação ao controle; ^{c}p<0,05; ^{ccc}p<0,001 em comparação com o grupo cocaína

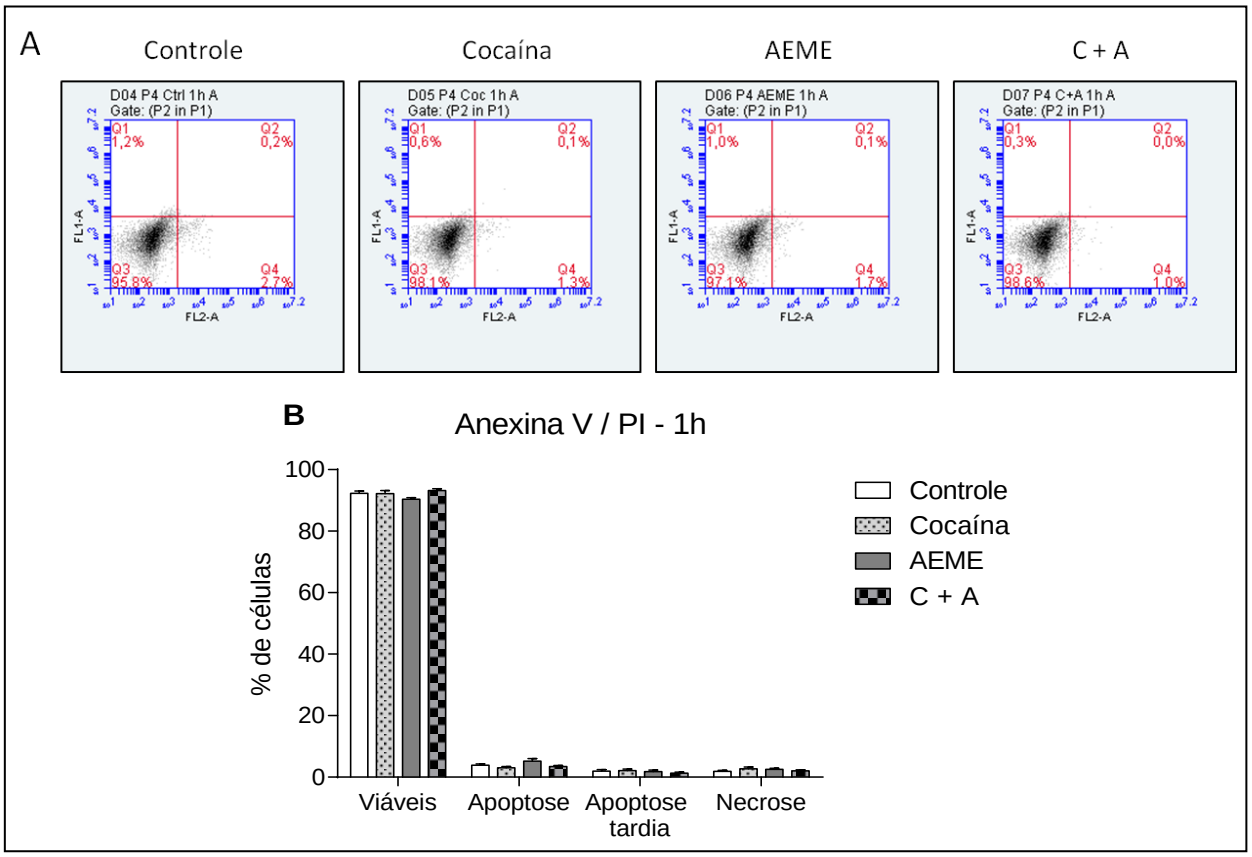
5.6 Análise da externalização de fosfatidilserina (FS)

Nas fases iniciais de apoptose, sinalizações de morte levam à desorganização da membrana plasmática promovendo alterações como a translocação de fosfatidilserina (FS). A FS é uma proteína predominantemente observada na superfície interna da bicamada lipídica, voltada para o citosol, mas quando translocada para a superfície externa faz com que esta célula seja reconhecida por fagócitos ou células vizinhas que a removem do microambiente. A anexina V é uma proteína que se liga à fosfolipídeos e possui alta afinidade por FS na presença de íons cálcio, utilizada como uma sonda sensível à FS exposta na membrana celular. Mudanças na assimetria da membrana plasmática podem ser detectadas antes mesmo das alterações morfológicas associadas ao início da apoptose e da perda da integridade da membrana, em casos de necrose celular (VERMES *et al.*, 1995).

O PI é um corante que se liga ao DNA, intercalando com pares de bases, mas que só consegue atingir o núcleo celular se as membranas celulares não estiverem íntegras (CROMPTON *et al.*, 1992).

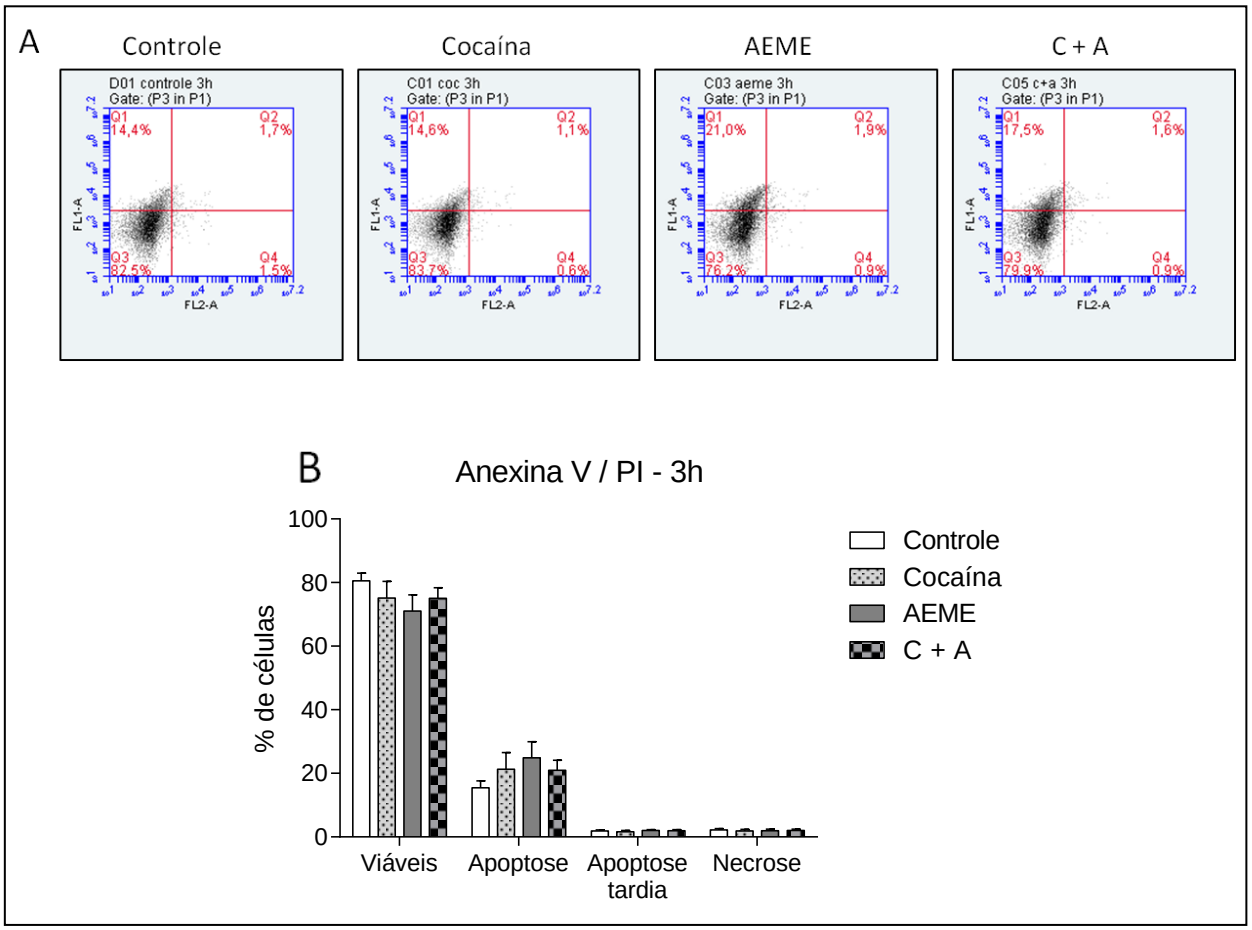
Nossos resultados não mostram diferenças estatísticas significativas em 1 h bem como em 3 h de exposição (Figuras 25 e 26, respectivamente). Porém, em 6 h (Figura 27), observamos redução na porcentagem de células viáveis no grupo C + A ($p<0,01$) em relação ao controle e em relação ao grupo cocaína ($p<0,05$), bem com aumento na porcentagem de células em apoptose, tanto em relação ao grupo controle ($p<0,01$) quanto em relação à cocaína ($p<0,05$). Ainda, também observamos aumento na porcentagem de células em necrose na associação das substâncias (em relação ao controle - $p<0,05$).

Figura 25 - Avaliação de apoptose pelo teste de anexina V/PI após 1 h de exposição. Neurônios hipocampais expostos ou não (controle) à 2 mM de cocaína, 1 mM de AEME e à associação de ambas (C + A). Teste realizado com o kit comercial de diagnóstico de apoptose (FITC *Annexin V Apoptosis Detection Kit I - BD* 556547) por citometria de fluxo (BD Accuri™ C6®). (A) Imagens representativas das porcentagens de células em início de apoptose (Q1 – superior esquerdo), em necrose (Q4 – inferior direito), em apoptose tardia (Q2 – superior direito) ou viáveis (Q3 – inferior esquerdo). (B) Gráfico da análise das porcentagens, expressos em média ± erro padrão (n = 7 culturas independentes).



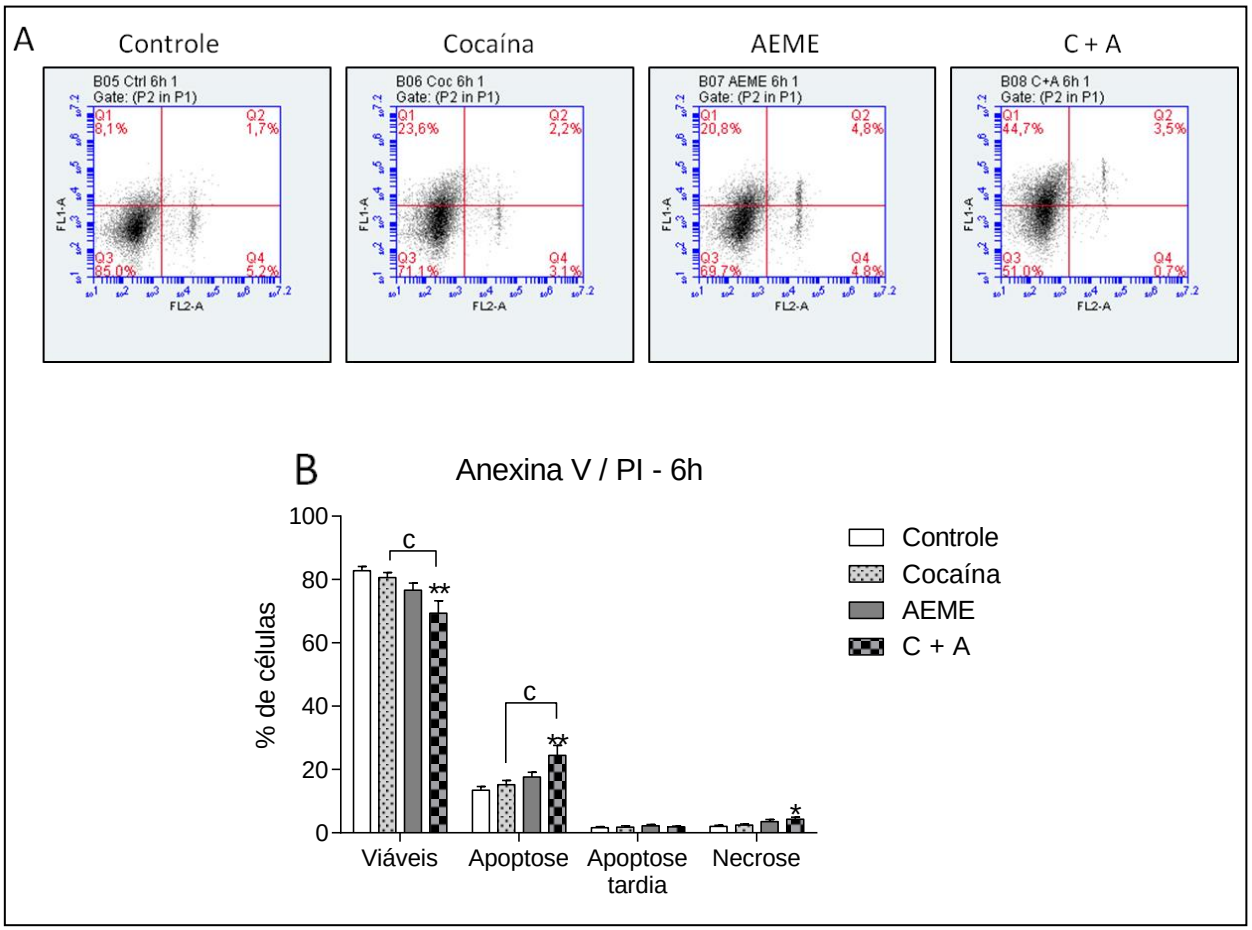
ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni

Figura 26 - Avaliação de apoptose pelo teste de anexina V/PI após 3 h de exposição. Neurônios hipocampais expostos ou não (controle) à 2 mM de cocaína, 1 mM de AEME e à associação de ambas (C + A). Teste realizado com o kit comercial de diagnóstico de apoptose (FITC *Annexin V Apoptosis Detection Kit I - BD* 556547) por citometria de fluxo (BD Accuri™ C6®). (A) Imagens representativas das porcentagens de células em início de apoptose (Q1 – superior esquerdo), em necrose (Q4 – inferior direito), em apoptose tardia (Q2 – superior direito) ou viáveis (Q3 – inferior esquerdo). (B) Gráfico da análise das porcentagens, expressos em média ± erro padrão (n = 9 culturas independentes).



ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni

Figura 27 - Avaliação de apoptose pelo teste de anexina V/PI após 6 h de exposição. Neurônios hipocampais expostos ou não (controle) à 2 mM de cocaína, 1 mM de AEME e à associação de ambas (C + A). Teste realizado com o kit comercial de diagnóstico de apoptose (FITC *Annexin V Apoptosis Detection Kit I - BD* 556547) por citometria de fluxo (BD Accuri™ C6®). (A) Imagens representativas das porcentagens de células em início de apoptose (Q1 – superior esquerdo), em necrose (Q4 – inferior direito), em apoptose tardia (Q2 – superior direito) ou viáveis (Q3 – inferior esquerdo). (B) Gráfico da análise das porcentagens, expressos em média ± erro padrão (n = 9 culturas independentes).



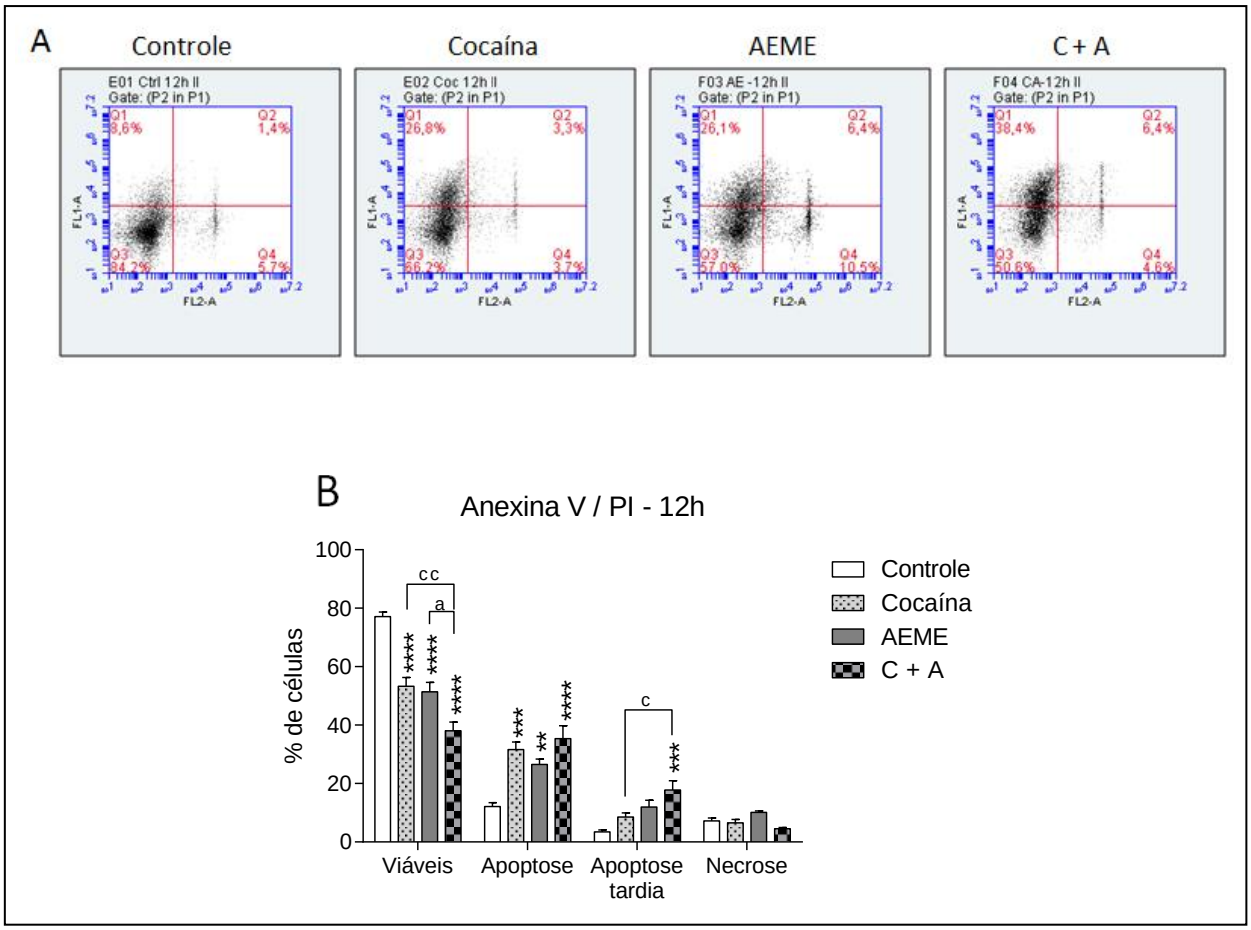
ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. *p<0,05, **p<0,01 em relação ao controle; ^{c}p<0,05 em relação à cocaína

Em 12 h de exposição (Figura 28) observamos que a redução na porcentagem de células viáveis se acentuou para o grupo C + A em relação ao controle (p<0,0001) e esta foi ainda menor do que o grupo cocaína (p<0,01) e o grupo AEME (p<0,05) isoladamente. Observamos ainda que as substâncias isoladas também levaram à redução de células viáveis (ambas p<0,0001 em relação ao controle), mas quando associadas esse efeito foi mais evidente. Essa redução pode ser justifica pelo aumento na porcentagem de células em apoptose, onde o aumento entre o

grupo cocaína e o grupo controle foi de p<0,001; entre o grupo AEME e grupo controle foi de p<0,01 e a associação da substâncias mostrou aumento de p<0,0001.

Ainda, houve aumento na porcentagem de células em apoptose tardia no grupo C + A em relação ao controle (p<0,001) e este foi ainda maior do que o grupo cocaína (p<0,05).

Figura 28 - Avaliação de apoptose pelo teste de anexina V/PI após 12 h de exposição. Neurônios hipocampais expostos ou não (controle) à 2 mM de cocaína, 1 mM de AEME e à associação de ambas (C + A). Teste realizado com o kit comercial de diagnóstico de apoptose (FITC *Annexin V Apoptosis Detection Kit I - BD* 556547) por citometria de fluxo (BD Accuri™ C6®). (A) Imagens representativas das porcentagens de células em início de apoptose (Q1 – superior esquerdo), em necrose (Q4 – inferior direito), em apoptose tardia (Q2 – superior direito) ou viáveis (Q3 – inferior esquerdo). (B) Gráfico da análise das porcentagens, expressos em média ± erro padrão (n = 7 culturas independentes).



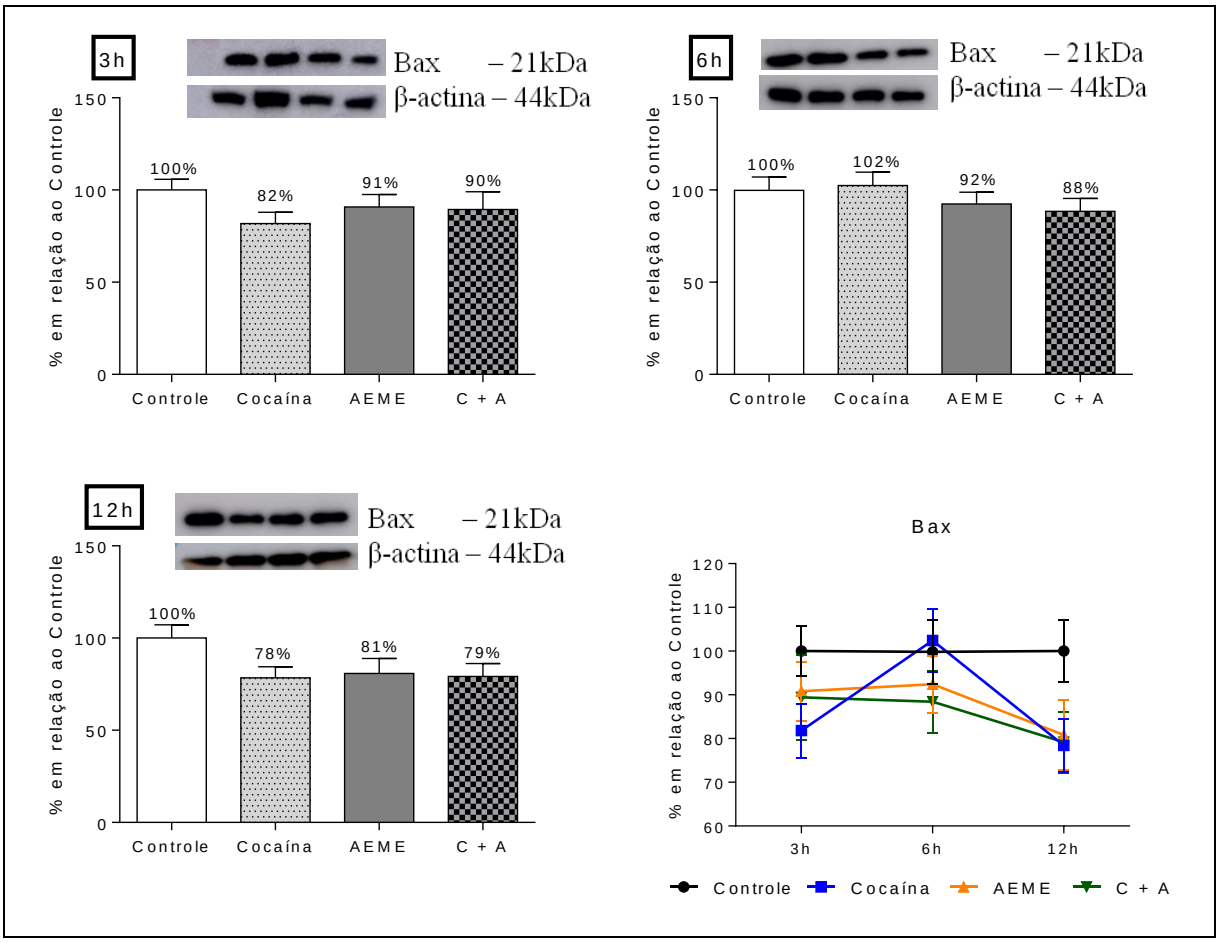
ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni; **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 em relação ao controle; ^{c}p<0,05, ^{cc}p<0,01 em relação à cocaína; ^{a}p<0,05 em relação à AEME

5.7 Análise de proteínas anti e pró-apoptóticas por Western blotting

Pela técnica de Western blotting foram quantificadas as seguintes proteínas envolvidas com o processo apoptótico: Bcl-2 (anti-apoptótica), Bax, caspase-3, -8 e -9 (pró-apoptóticas).

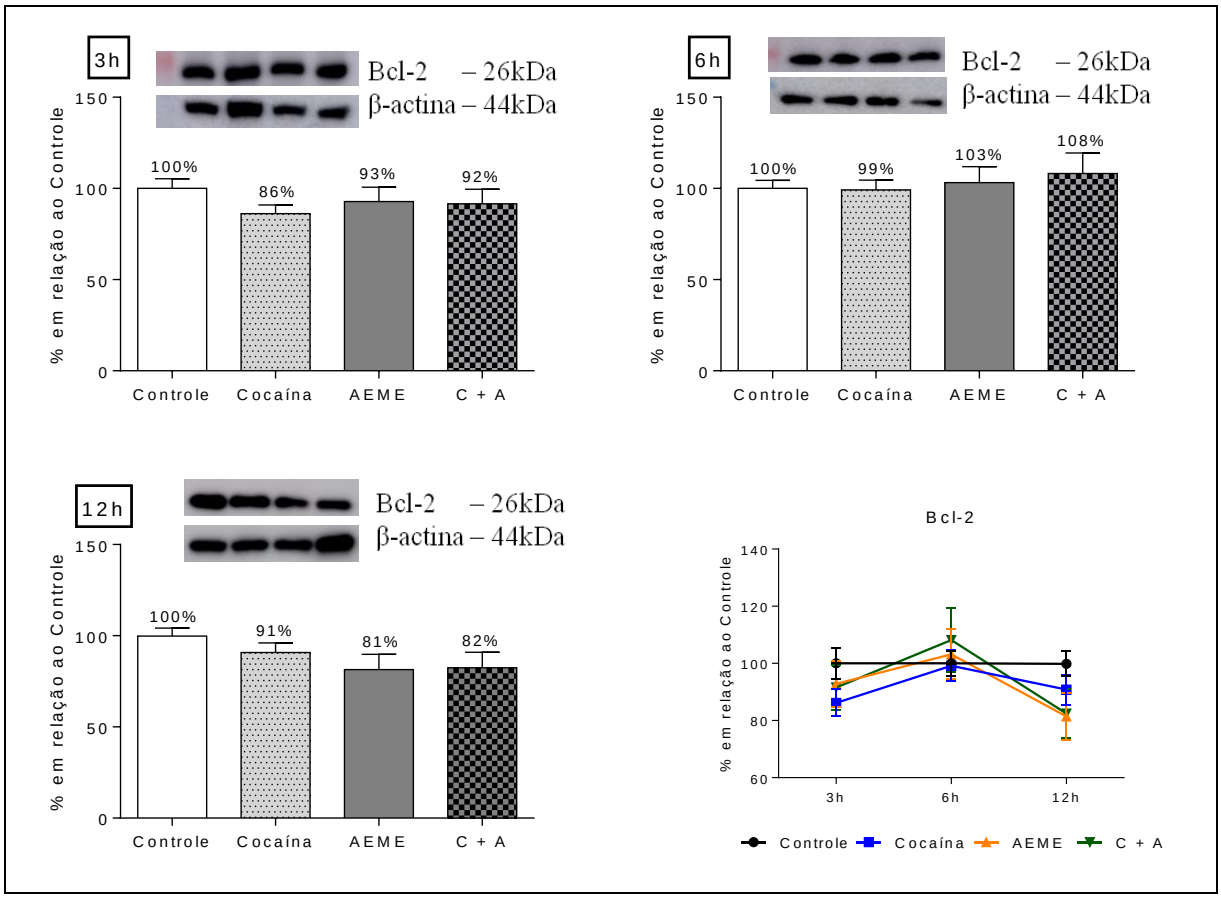
Embora nossos resultados de Bax (Figura 29) e Bcl-2 (Figura 30) não tenham mostrado diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em nenhum dos horários, nem na razão entre as proteínas (Figura 31), observamos que em 6h de exposição houve um leve aumento na quantificação de Bcl-2 para todos os grupos (exceto controle), mas que se reduz em 12 h, assim como observamos um leve aumento em 6 h, seguido de redução em 12 h para Bax no grupo cocaína.

Figura 29 – Quantificação da proteína Bax, pela técnica de Western blotting. Células hipocampais expostas ou não (controle) à 2mM de cocaína, 1mM de AEME e à associação de ambas (C + A) por 3, 6 e 12 h. Dados expressos em média ± erro padrão da porcentagem em relação ao controle (n = 5 culturas independentes)



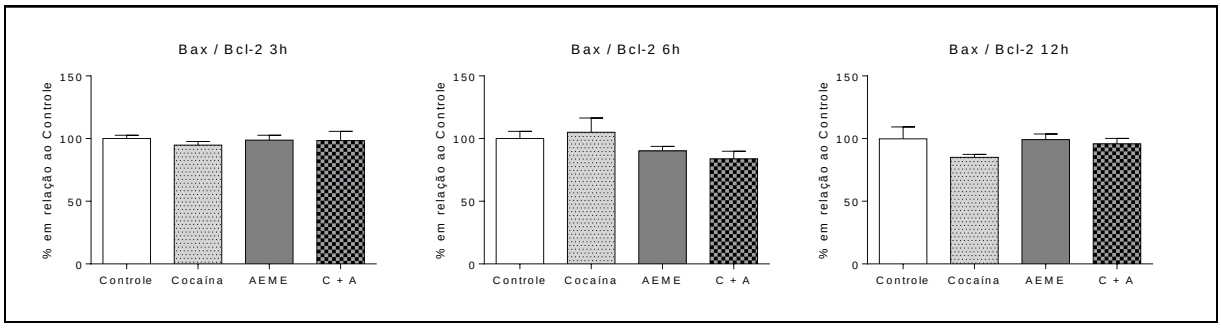
Anova de uma via seguida pelo teste de Bonferroni

Figura 30 – Quantificação da proteína Bcl-2, pela técnica de Western blotting. Células hipocampais expostas ou não (controle) à 2mM de cocaína, 1mM de AEME e à associação de ambas (C + A) por 3, 6 e 12 h. Dados expressos em média ± erro padrão da porcentagem em relação ao controle (n = 5 culturas independentes)



Anova de uma via seguida pelo teste de Bonferroni

Figura 31 – Análise quantitativa da razão entre as proteínas Bax e Bcl-2. Células hipocampais expostas ou não (controle) à 2mM de cocaína, 1mM de AEME e à associação de ambas (C + A) por 3, 6 e 12 h. Dados expressos em média ± erro padrão da porcentagem em relação ao controle (n = 5 culturas independentes)

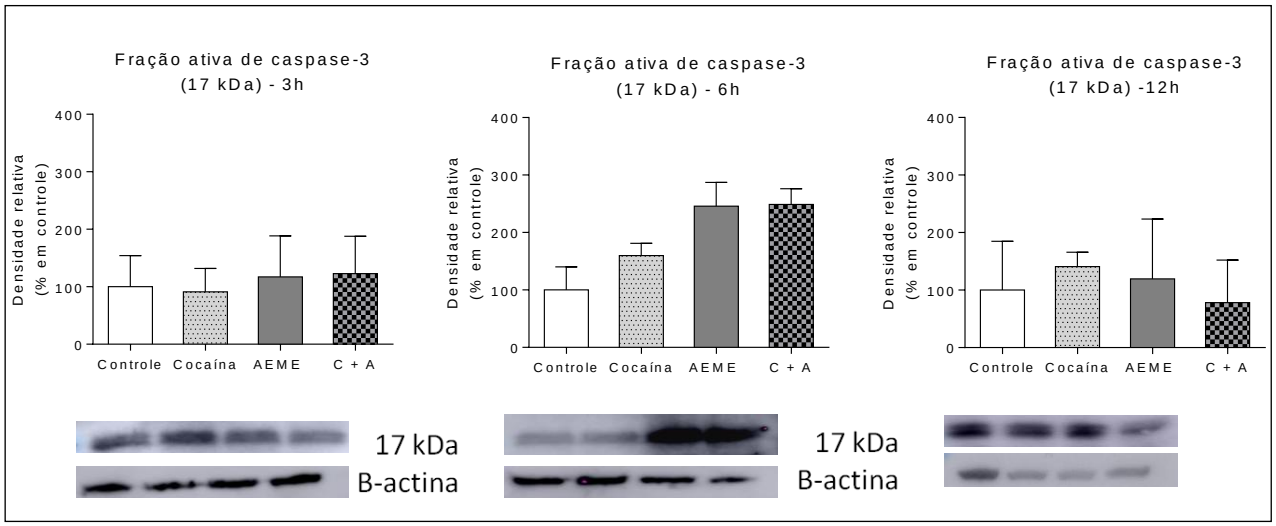


Anova de uma via seguida pelo teste de Bonferroni

Nas investigações da caspase-3 em 3 h, das seis membranas analisadas, duas não apresentaram a fração de 32 kDa em nenhuma das condições experimentais e das quatro restantes, três não apresentaram esta fração nas amostras do grupo AEME (as membranas inteiras podem ser vistas no anexo IV). Nas investigações em 6 h, das cinco membranas analisadas somente uma não apresentou a fração de 32 kDa e duas apresentaram a fração de 17 kDa. Já em 12h, das cinco membranas analisadas apenas uma não apresentou a fração mais alta e somente duas apresentaram 17 kDa.

Observamos que todas as substâncias causaram a clivagem de caspase-3 (Figura 32); embora a diferença estatística não tenha sido observada, o período de 6h foi o que apresentou maior diferença na quantificação da fração ativa de caspase-3 nos grupos AEME e C+A.

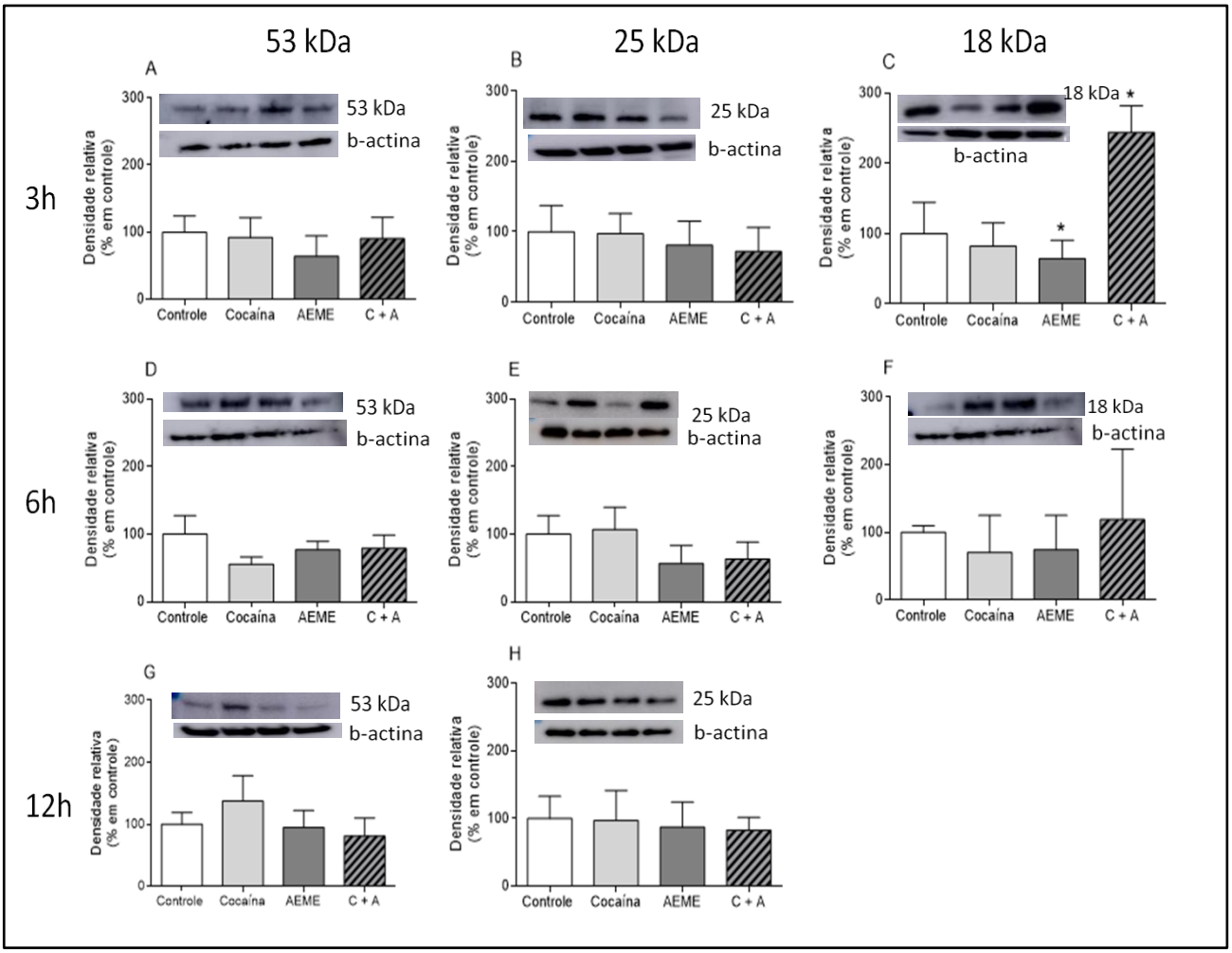
Figura 32 - Análise da fração ativa de caspase-3 (17 kDa) por Western blotting. Neurônios hipocampais expostos ou não (controle) à 2 mM de cocaína, 1 mM de AEME e à associação de ambas (C + A) por 3, 6 e 12h. Dados expressos em média ± erro padrão (n = 3 para 3 h; n = 2 para 6 h e 12 h)



ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni

Nas investigações da caspase-8 (Figura 33), todas as membranas de 3 h apresentaram todas as frações, com aumento na quantificação da fração de 18 kDa no grupo C + A em relação ao controle ($p<0,05$). Em 6 h, 2 membranas apresentaram todas as frações e 3 não apresentaram 18 kDa; e em 12 h, nenhuma das membranas apresentaram a fração menor (as membranas inteiras podem ser vistas no anexo IV).

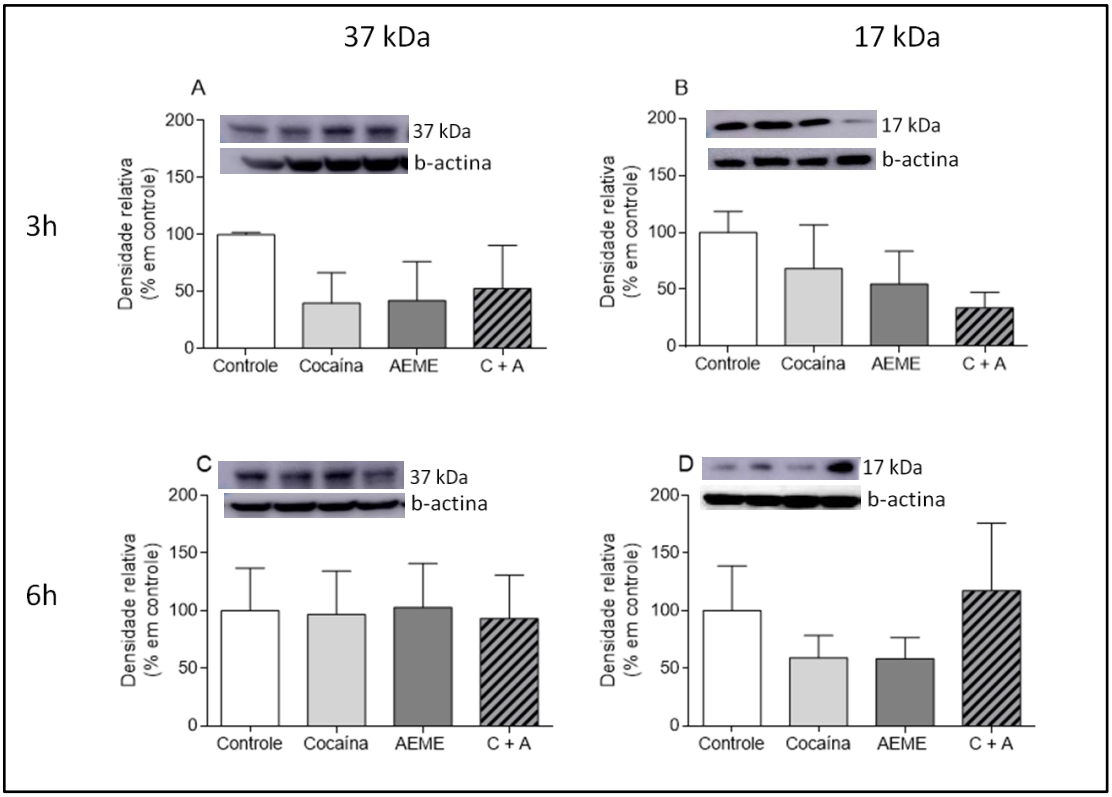
Figura 33 - Análise das frações de caspase-8 (53, 25 e 18 kDa) por Western blotting. Neurônios hipocampais expostos ou não (controle) à 2 mM de cocaína, 1 mM de AEME e à associação de ambas (C + A) por 3 h (A, B e C), 6 h (D, E e F) e 12 h (G e H). Dados expressos em média ± erro padrão. Apenas uma membrana de 12 h apresentou a fração de 18 kDa.



ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. *p<0,05 em relação ao controle

Em relação a caspase-9, nossos resultados não mostraram diferenças estatísticas significativas em nenhuma das condições experimentais (Figura 34). Ainda, nas amostras de 12 h apenas uma membrana apresentou as frações de 37 e 17 kDa e as outras duas apresentaram apenas a pró-caspase-9 (46 kDa), por esse motivo não foram analisadas.

Figura 34 - Análise das frações de caspase-9 (37 e 17 kDa) por Western blotting. Neurônios hipocampais expostos ou não (controle) à 2 mM de cocaína, 1 mM de AEME e à associação de ambas (C + A) por 3 h (A e B) e 6 h (C e D). Dados expressos em média ± erro padrão (n=4 para todos os gráficos). As amostras de 12 h apresentaram apenas a pró-caspase (46 kDa) e portanto não foram analisadas (n = 3).



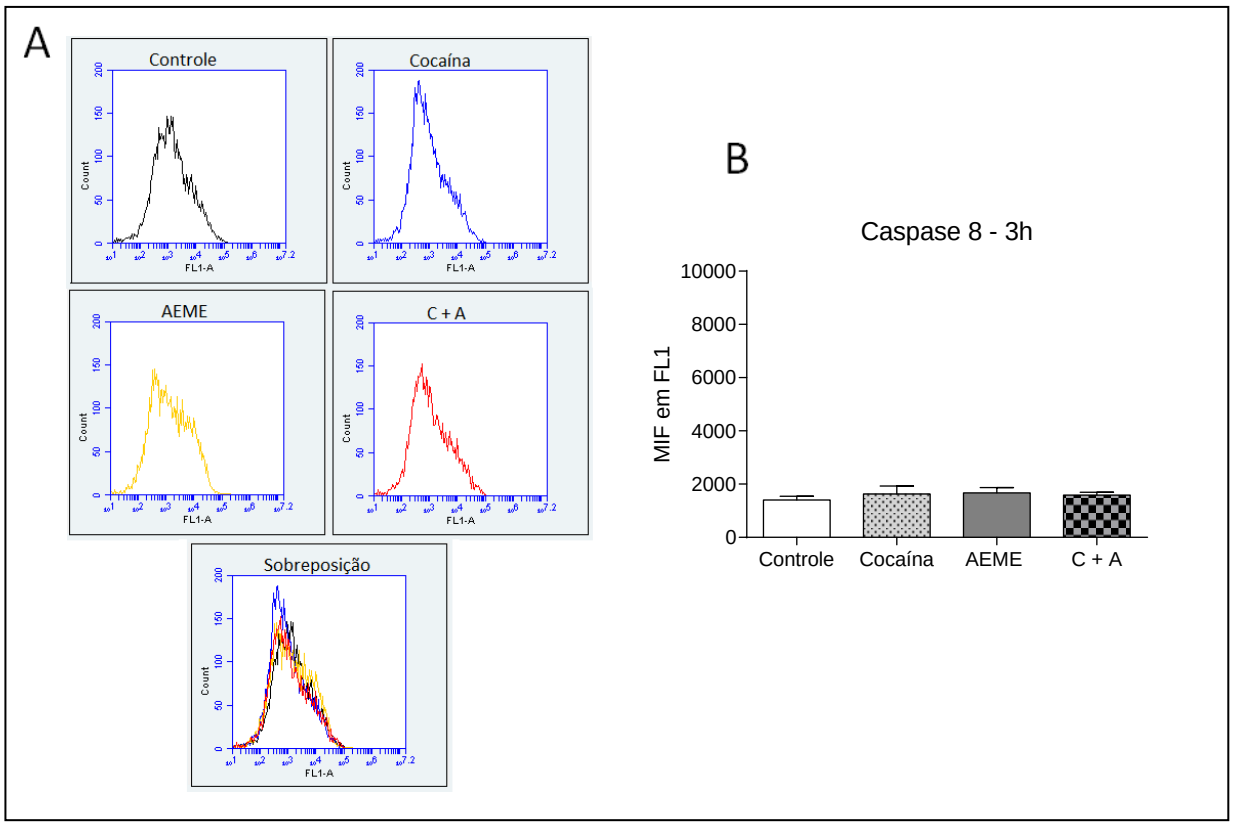
ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni

5.8 Análise de caspases ativas por citometria de fluxo

Tendo em vista a dificuldade em se analisar os resultados das caspases pela técnica de Western blotting, optamos por utilizar a técnica de citometria de fluxo para as caspases ativas. Nessa metodologia, quanto maior for a intensidade de fluorescência para o fluoróforo FITC, maior será a quantidade caspase ativa na amostra.

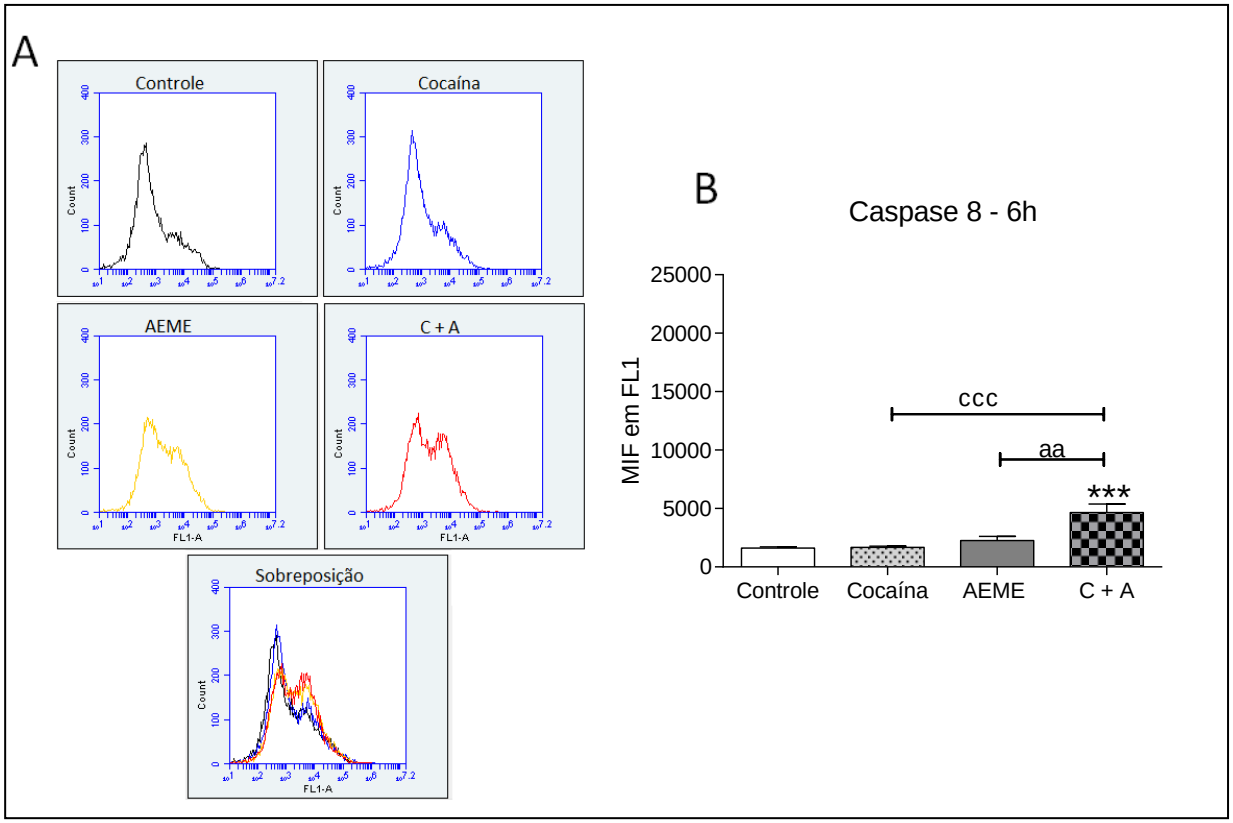
Em relação à caspase-8, nossos resultados não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos após 3 h de exposição (Figura 35). Porém, a partir de 6 h (Figura 36) houve aumento desta caspase no grupo C + A em relação ao controle ($p<0,001$) e esse aumento foi ainda maior do que as substâncias isoladamente ($p<0,001$ em relação à cocaína e $p<0,01$ em relação ao AEME).

Figura 35 - Avaliação de caspase-8 ativa após 3 h de exposição. Neurônios hipocampais expostos ou não (controle) à 2 mM de cocaína, 1 mM de AEME e à associação de ambas (C + A). Teste realizado com o kit comercial para detecção de caspase-8 ativa (FITC-IETD-FMK) – QIA113 (Calbiochem®, Merck Milipore) em citometria de fluxo (BD Accuri™ C6®). (A) Imagens representativas da intensidade de fluorescência no canal FL1 (FITC) (B) Análise das medianas de intensidade de fluorescência (MIF). Dados expressos em média ± erro padrão (n = 7 culturas independentes)



ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. MIF – Mediana da intensidade de fluorescência.

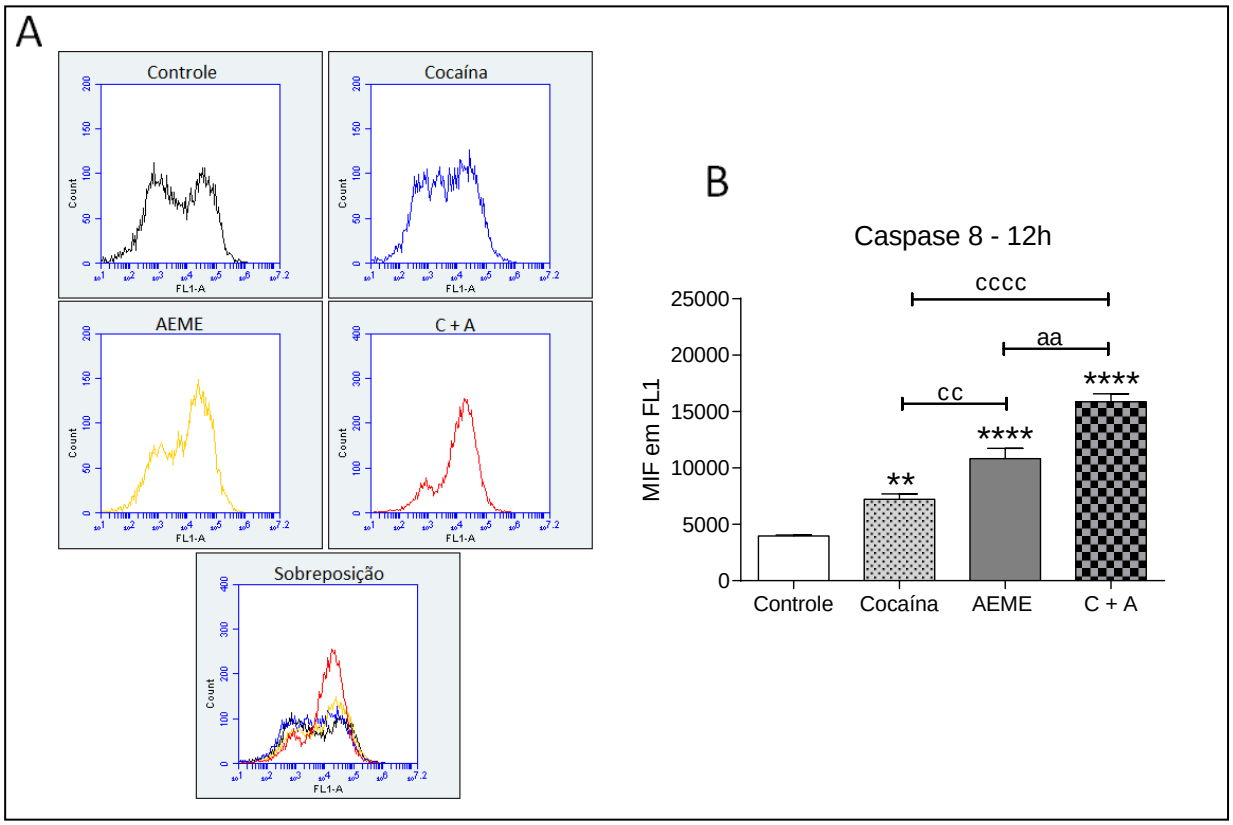
Figura 36 - Avaliação de caspase-8 ativa após 6 h de exposição. Neurônios hipocampais expostos ou não (controle) à 2 mM de cocaína, 1 mM de AEME e à associação de ambas (C + A). Teste realizado com o kit comercial para detecção de caspase-8 ativa (FITC-IETD-FMK) – QIA113 (Calbiochem®, Merck Milipore) em citometria de fluxo (BD Accuri™ C6®). (A) Imagens representativas da intensidade de fluorescência no canal FL1 (FITC) (B) Análise das medianas de intensidade de fluorescência (MIF). Dados expressos em média ± erro padrão (n = 7 culturas independentes)



Anova de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. ***p<0,001 em relação ao controle. ^{ccc}p<0,001 em relação à cocaína. ^{aa}p<0,01 em relação à AEME. MIF - Mediana da intensidade de fluorescência.

A partir de 12 h de exposição (Figura 37), houve aumento significativo de caspase-8 ativa para todos os grupos experimentais, em relação ao grupo controle (cocaína - p<0,01; AEME e C + A - ambos p<0,0001) e a associação apresentou-se ainda mais ativa do que o grupo cocaína (p<0,0001) e o grupo AEME (p<0,01) isoladamente. Além disso, o grupo AEME apresentou maior expressão de caspase-8 ativa do que o grupo cocaína (p<0,01).

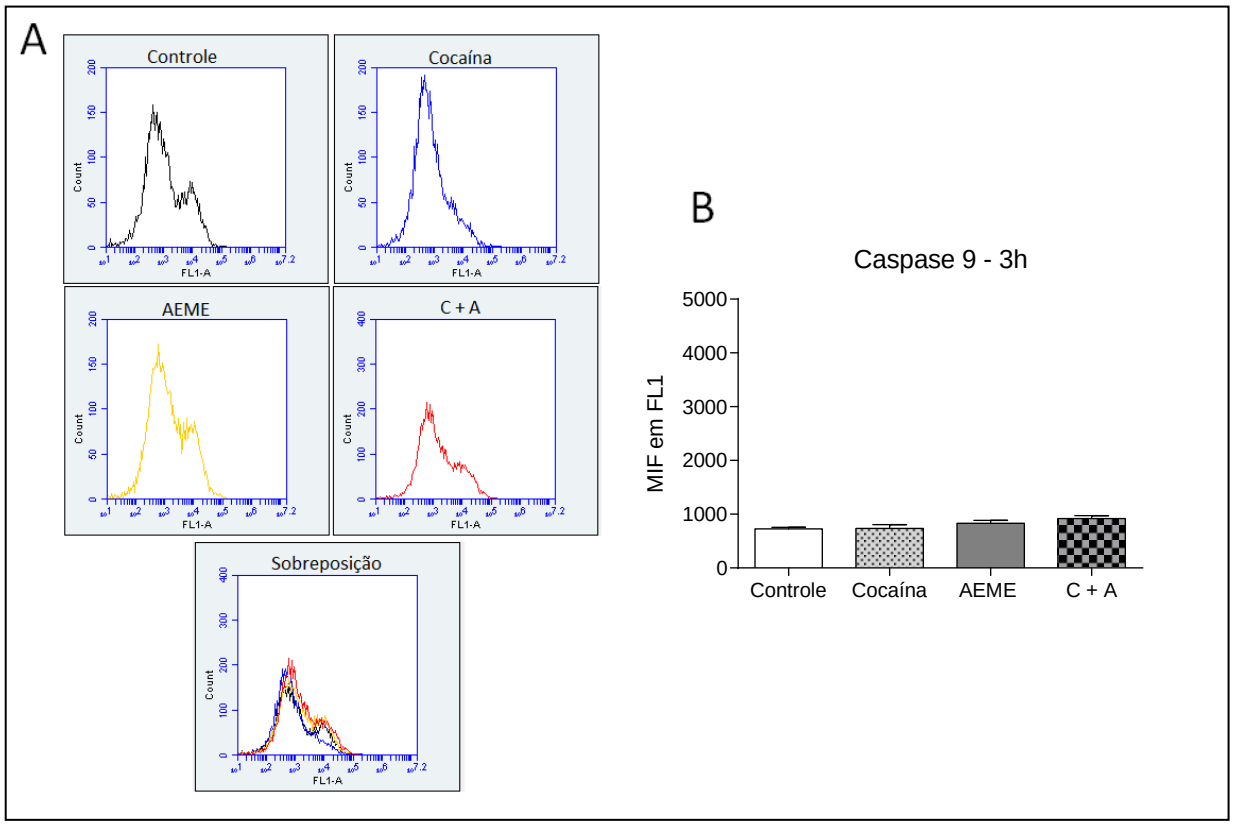
Figura 37 - Avaliação de caspase-8 ativa após 12 h de exposição. Neurônios hipocampais expostos ou não (controle) à 2 mM de cocaína, 1 mM de AEME e à associação de ambas (C + A). Teste realizado com o kit comercial para detecção de caspase-8 ativa (FITC-IETD-FMK) – QIA113 (Calbiochem®, Merck Milipore) em citometria de fluxo (BD Accuri™ C6®). (A) Imagens representativas da intensidade de fluorescência no canal FL1 (FITC) (B) Análise das medianas de intensidade de fluorescência (MIF). Dados expressos em média ± erro padrão (n = 6 culturas independentes)



ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni; **p<0,01, ****p<0,0001 em relação ao controle; ^{cc}p<0,01, ^{cccc}p<0,0001 em relação à cocaína; ^{aa}p<0,01 em relação à AEME. MIF - Mediana da intensidade de fluorescência.

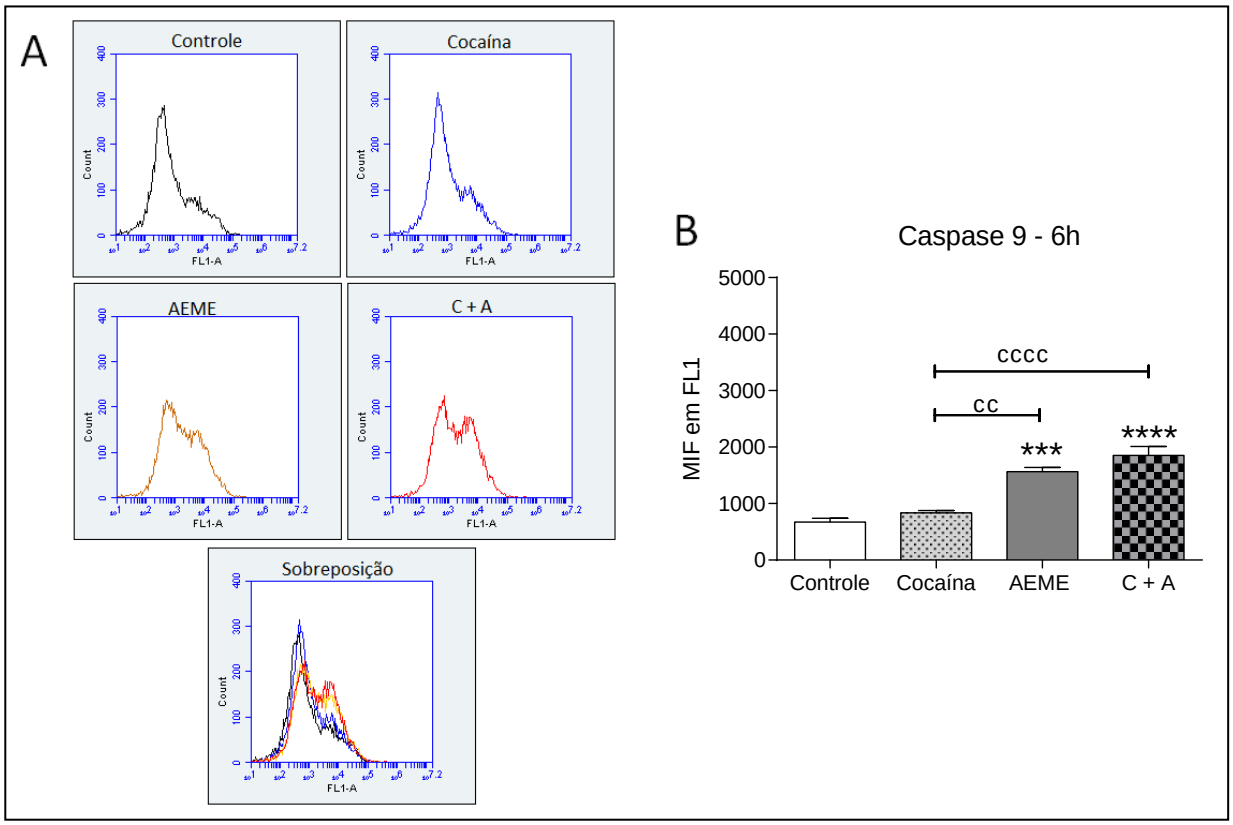
Quanto à caspase-9, nossos resultados não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos a partir de 3 h de exposição (Figura 38), mas a partir de 6 h (Figura 39), tanto AEME quanto C + A apresentaram maior quantidade de caspase-9 ativa do que o controle (p<0,001 e p<0,0001, respectivamente), e a associação foi ainda maior do que o grupo cocaína (p<0,0001).

Figura 38 - Avaliação de caspase-9 ativa após 3 h de exposição. Neurônios hipocampais expostos ou não (controle) à 2 mM de cocaína, 1 mM de AEME e à associação de ambas (C + A). Teste realizado com o kit comercial para detecção de caspase-9 ativa (FITC-LEHD-FMK) – QIA115 (Calbiochem®, Merck Milipore) em citometria de fluxo (BD Accuri™ C6®). (A) Imagens representativas da intensidade de fluorescência no canal FL1 (FITC) (B) Análise das medianas de intensidade de fluorescência (MIF). Dados expressos em média ± erro padrão (n = 4 culturas independentes)



ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. MIF - Mediana da intensidade de fluorescência.

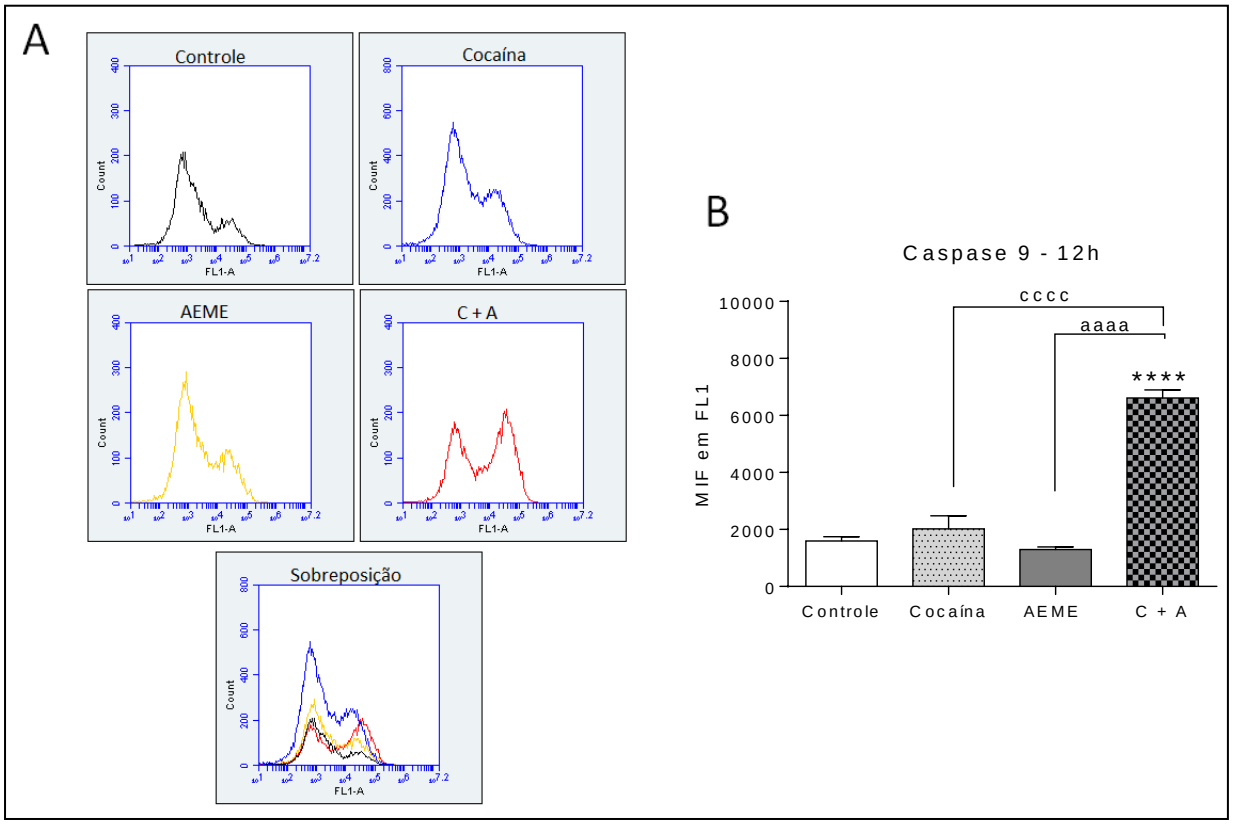
Figura 39 - Avaliação de caspase-9 ativa após 6 h de exposição. Neurônios hipocampais expostos ou não (controle) à 2 mM de cocaína, 1 mM de AEME e à associação de ambas (C + A). Teste realizado com o kit comercial para detecção de caspase-9 ativa (FITC-LEHD-FMK) – QIA115 (Calbiochem®, Merck Milipore) em citometria de fluxo (BD Accuri™ C6®). (A) Imagens representativas da intensidade de fluorescência no canal FL1 (FITC) (B) Análise das medianas de intensidade de fluorescência (MIF). Dados expressos em média ± erro padrão (n = 4 culturas independentes)



ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni; ***p<0,001, ****p<0,0001 em relação ao controle; ^{cc}p<0,01, ^{cccc}p<0,0001 em relação à cocaína. MIF - Mediana da intensidade de fluorescência.

Quanto aos resultados a partir de 12 h (Figura 40), observamos que somente o grupo C + A apresentou maior quantidade de caspase-9 ativa do que o controle e do que as substâncias isoladamente (todos p<0,0001).

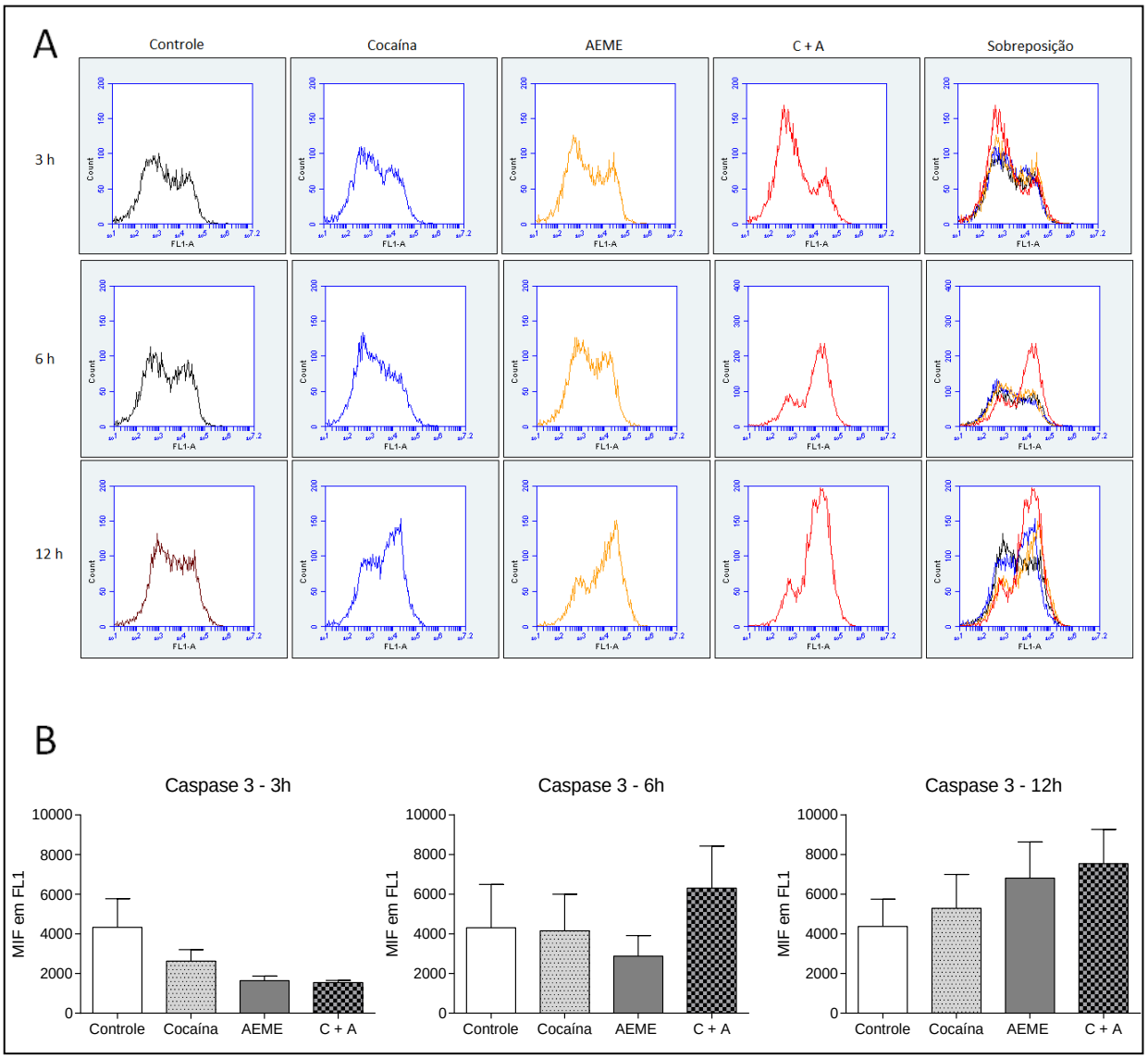
Figura 40 - Avaliação de caspase-9 ativa após 12 h de exposição. Neurônios hipocampais expostos ou não (controle) à 2 mM de cocaína, 1 mM de AEME e à associação de ambas (C + A). Teste realizado com o kit comercial para detecção de caspase-9 ativa (FITC-LEHD-FMK) – QIA115 (Calbiochem®, Merck Milipore) em citometria de fluxo (BD Accuri™ C6®). (A) Imagens representativas da intensidade de fluorescência no canal FL1 (FITC) (B) Análise das medianas de intensidade de fluorescência (MIF). Dados expressos em média ± erro padrão (n = 4 culturas independentes)



ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni; ****p<0,0001 em relação ao controle; ^{cccc}p<0,0001 em relação à cocaína; ^{aaaa}p<0,0001 em relação à AEME. MIF - Mediana da intensidade de fluorescência.

Em relação à caspase-3, nossos resultados não mostraram diferenças estatísticas significativas em nenhuma condição experimental, em nenhum dos horários de exposição (Figura 41).

Figura 41 - Avaliação de caspase-3 ativa. Neurônios hipocampais expostos ou não (controle) à 2 mM de cocaína, 1 mM de AEME e à associação de ambas (C + A), por 3, 6 e 12 h. Teste realizado com o kit comercial para detecção de caspase-3 ativa (FITC-IETD-FMK) – QIA91 (Calbiochem®, Merck Milipore) em citometria de fluxo (BD Accuri™ C6®). (A) Imagens representativas da intensidade de fluorescência no canal FL1 (FITC) (B) Análise das medianas de intensidade de fluorescência (MIF). Dados expressos em média ± erro padrão (n = 4 culturas independentes)



ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni.

Resumindo, nossos resultados indicam que a cocaína e a AEME ativam a via extrínseca da apoptose somente a partir de 12 h de exposição. Embora a AEME tenha aumentando a quantidade de caspase-9 ativa em 6 h, essa não se manteve em 12 h, diferentemente de C + A, que apresentou ativação de ambas as vias da apoptose já a partir de 6 h. Ainda, apesar das substâncias estudadas terem ativado

as caspases iniciadoras, 12 h de exposição não foram suficientes para ativar a caspase efetora (caspase-3).

5.9 Investigações do processo autofágico

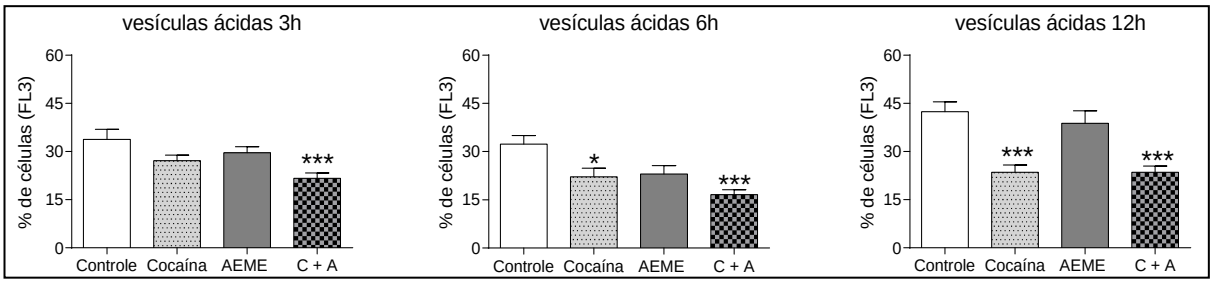
O processo autofágico foi investigado pelas técnicas de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência com laranja de acridina para quantificação da porcentagem de células com vesículas ácidas e, pela quantificação da proteína LC3 por Western blotting.

Neste processo, quando o autofagossomo se une a um lisossomo e se torna um autofagolisossomo, este apresentará características ácidas e será reconhecido como uma vesícula ácida (GUMP e THORBURN, 2011).

A laranja de acridina é um reagente versátil de aplicação histórica, com relatos antigos de uso (ALLISON e YOUNG, 1964; CANONICO e BIRD, 1969). Esse reagente é um corante fluorescente metacromático de baixo peso molecular que quando no citosol celular, e na presença de luz azul, emite florescência na cor verde, mas tem a capacidade e a preferência por entrar em compartimentos ácidos (como endossomos e lisossomos) onde se protona e emite fluorescência em laranja (ROBBINS e MARCUS, 1963). Assim, ele se torna uma boa ferramenta de investigação de autofagolisossomos, embora deva ser utilizado juntamente com outras técnicas, como por exemplo, Western blotting para as proteínas LC3 I/II e p62, e análise morfológica por microscopia eletrônica para a confirmação das vesículas com dupla membrana (KUSUZAKI *et al.*, 2007; MIZUSHIMA; YOSHIMORIM e LEVINE, 2010; KLIONSKY *et al.*, 2016).

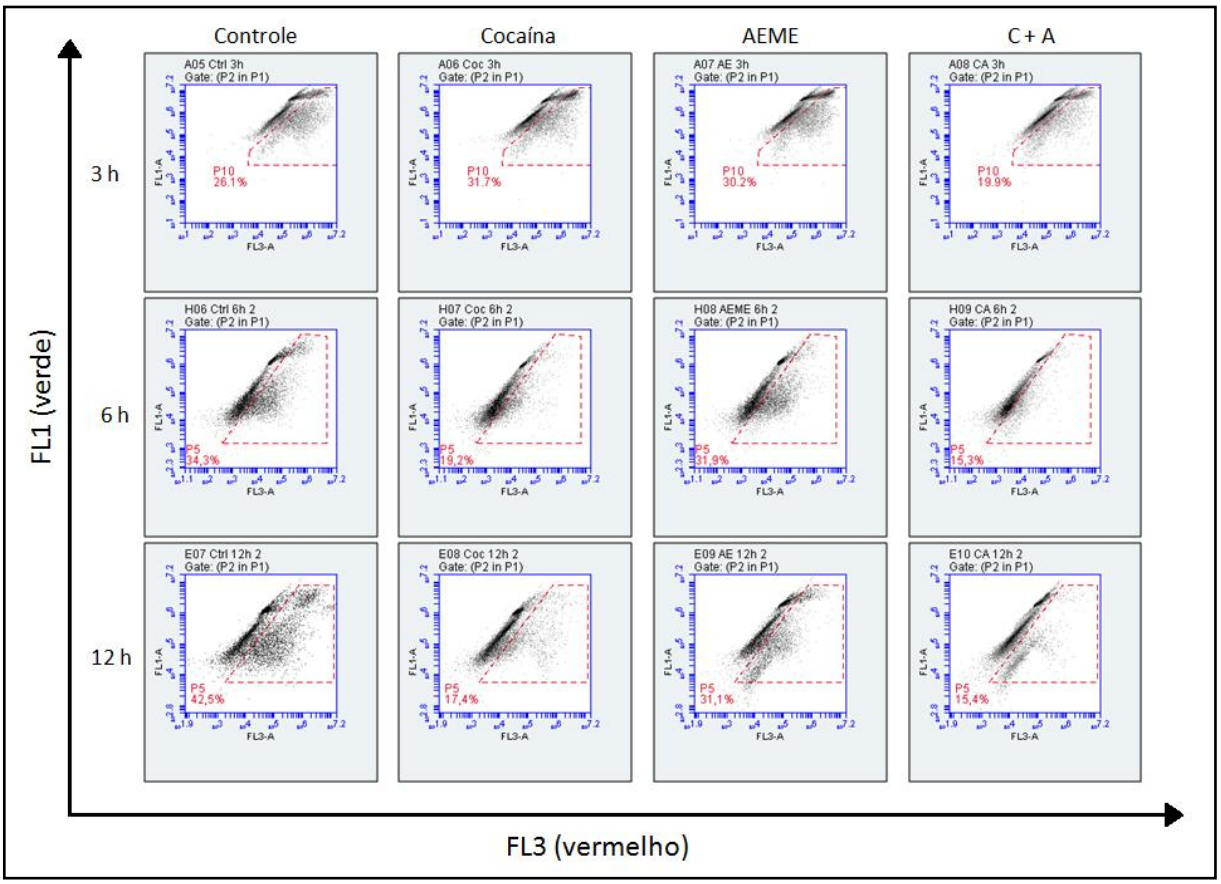
Nossos resultados de citometria de fluxo (Figuras 42 e 43) não mostraram diferenças significativas entre os grupos AEME e controle em nenhum dos horários experimentais. Quanto ao grupo cocaína, este reduziu a porcentagem de células alaranjadas em 6 h ($p<0,05$) e 12 h ($p<0,001$) e o grupo C + A apresentou redução da porcentagem de células com vesículas ácidas já a partir de 3 h ($p<0,001$ em todos os horáros).

Figura 42 – Análise da porcentagem de células com vesículas ácidas por citometria de fluxo. Neurônios hipocampais expostos ou não (controle) à 2 mM de cocaína, 1 mM de AEME e à associação de ambas (C + A) por 3, 6 e 12 h e incubados com laranja de acridina (1 µg/mL) por 15 min e analisados por citometria de fluxo (BD Accuri™ C6). Dados expressos em média ± erro padrão (n= 10 culturas independentes)



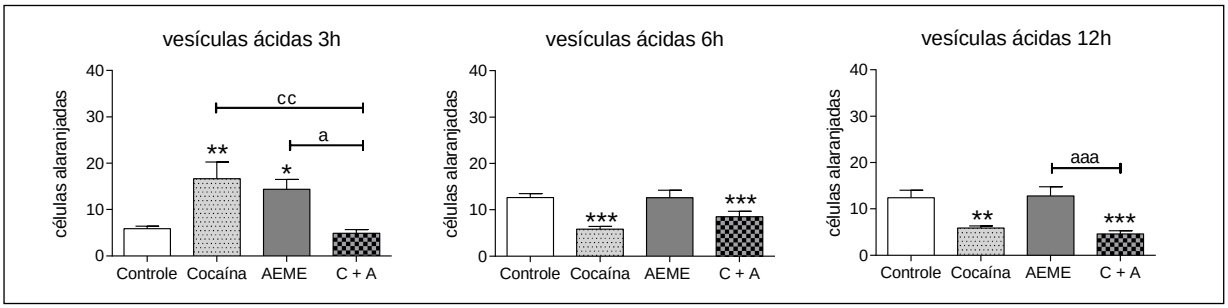
ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 em relação ao controle.

Figura 43 – Porcentagem de células marcadas com laranja de acridina por citometria de fluxo. Imagens representativas do teste de vesículas ácidas com laranja de acridina pela técnica de citometria de fluxo (BD Accuri™ C6®). Neurônios hipocampais expostos ou não (controle) à 2 mM de cocaína, 1 mM de AEME e à associação de ambas (C + A) por 3, 6 e 12 h. O eixo x indica a porcentagem de células fluorescentes no canal FL3 (vermelho) e o eixo y indica a porcentagem de células fluorescentes no canal FL1 (verde).



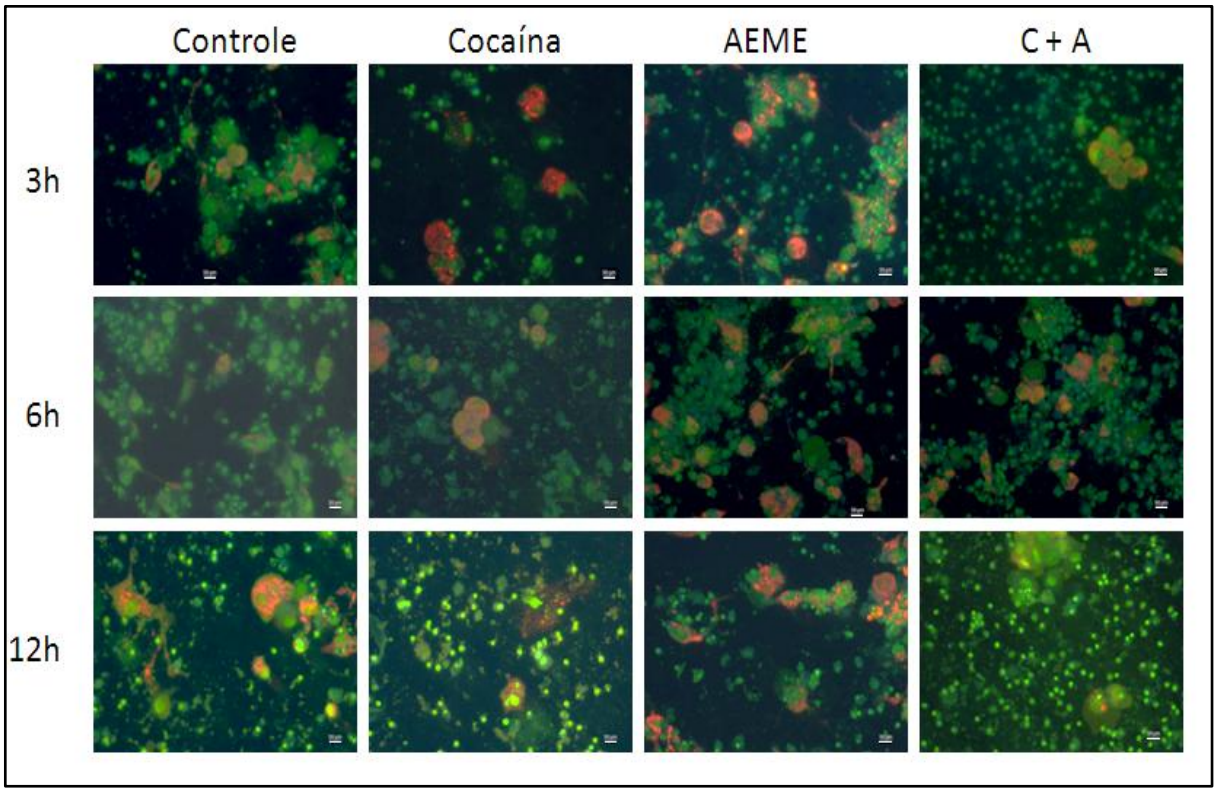
Os resultados por microscopia de fluorescência (Figuras 44 e 45) mostram que em 3 h de exposição houve maior quantidade de células com vesículas ácidas nos grupos cocaína e AEME em relação ao controle ($p<0,01$ e $p<0,05$ respectivamente) e ambas foram maior do que com a associação das substâncias. Em 6 h e 12 h, os resultados foram semelhantes aos resultados obtidos por citometria de fluxo, com redução no número de células com vesículas ácidas nos grupos cocaína ($p<0,001$ em 6 h e $p<0,01$ em 12 h) e C + A ($p<0,001$ em ambos os horários) em relação ao grupo controle.

Figura 44 - Células com vesículas ácidas por microscopia de fluorescência. Ensaios com laranja de acridina (1 µg/mL) por microscopia de fluorescência. Neurônios primários hipocampais expostos ou não (controle) à 2 mM de cocaína, 1 mM de AEME e associação de ambas (C + A) por 3, 6 e 12 h. Dados estatísticos expressos em média ± erro padrão (n = 3 culturas independentes, em 4 campos aleatórios)



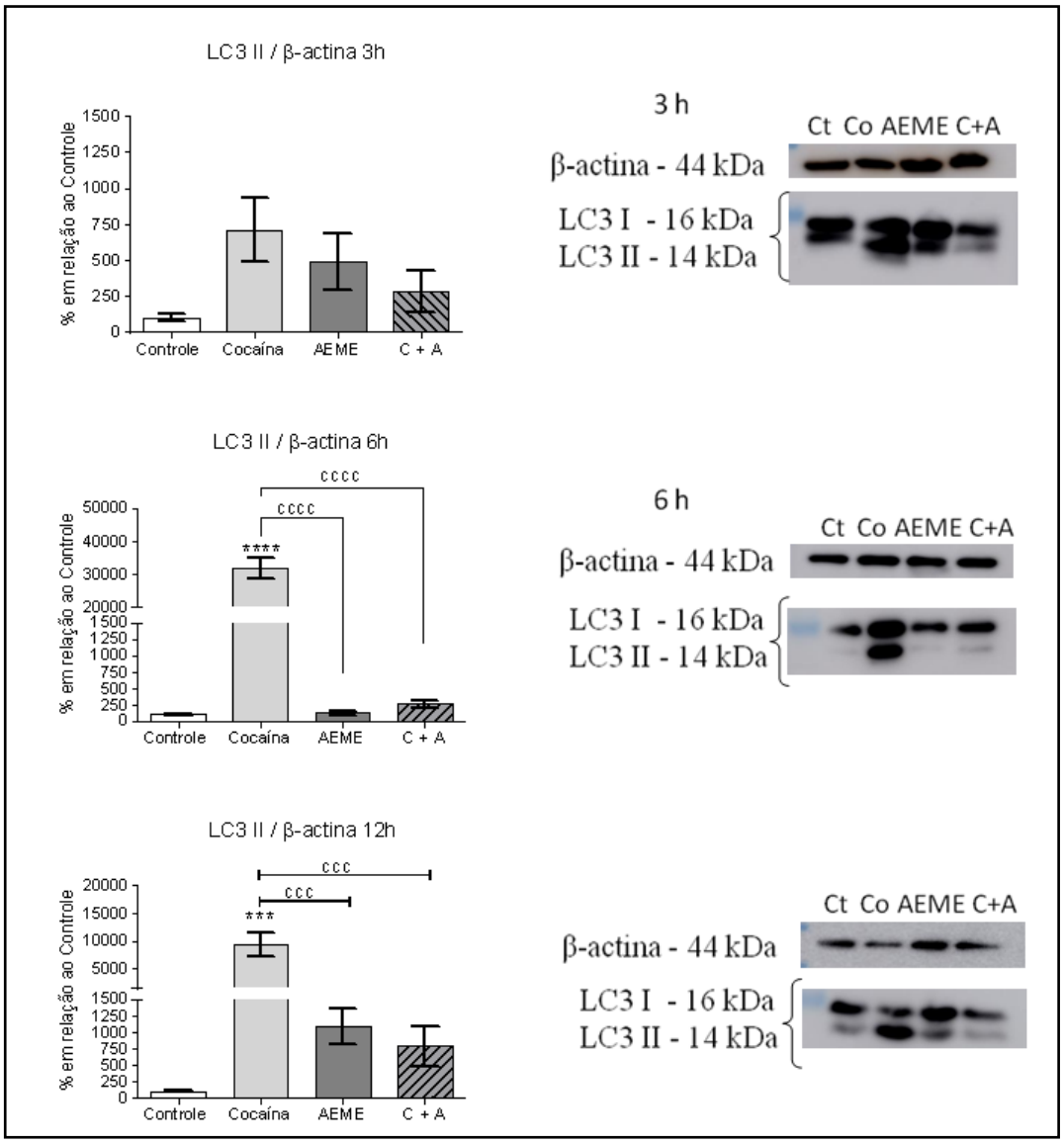
ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni. *$p<0,05$, **$p<0,01$, ***$p<0,001$ em relação ao controle; $^{cc}p<0,01$ em relação à cocaína; $^{aaa}p<0,001$ em relação ao AEME

Figura 45 – Células com vesículas ácidas por microscopia de fluorescência. Imagens representativas do ensaio de vesículas ácidas com laranja de acridina por microscopia de fluorescência (objetiva 40 x). Neurônios primários hipocampais expostos ou não (controle) à 2 mM de cocaína, 1 mM de AEME e associação de ambas (C + A) por 3, 6 e 12 h e incubados com 1 µg/mL de laranja de acridina por 15 min. As células coradas em verde são consideradas viáveis, sem vesículas ácidas e as células alaranjadas são aquelas que apresentam as vesículas autofágicas (Barra de escala no inferior das imagens representa 50 µm).



Em relação à proteína LC3 (Figura 46), observamos em 3 h que, embora não tenha havido diferenças estatísticas significativas entre os grupos, todas elas apresentaram a fração LCE II mais intensa do que o controle. Em 6 e 12 h, apenas a cocaína apresentou tal aumento, agora de maneira significativa, em relação ao controle ($p<0,0001$ em 6 h, $p<0,001$ em 12 h) e em relação à AEME e C + A ($p<0,0001$ em 6 h e $p<0,001$ em 12 h).

Figura 46 – Análise quantitativa da proteína LC3 II por Western blotting. Neurônios primários hipocampais expostos ou não (controle - Ct) à 2 mM de cocaína (Co), 1 mM de AEME e associação de ambas (C + A) por 3, 6 e 12 h. Dados expressos em média ± erro padrão das porcentagens em relação ao controle. Os gráficos das análises de LC3 II em razão de b-actina (esquerda) e bandas representativas (direita) (n=5 culturas independentes)



ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. ***p<0,001; ****p<0,0001 em relação ao controle; ^{ccc}p<0,001; ^{cccc}p<0,0001 em relação à cocaína

De modo resumido nossos resultados mostraram no grupo cocaína, aumento no número de células com vesículas ácidas apenas em 3 h de exposição e redução em 6 h e 12 h, acompanhando do aumento na quantidade de LC3 II nestes dois últimos horários. Quanto à AEME, observamos apenas aumento no número de células com vesículas ácidas em 3 h, sem alterações na quantidade de LC3II. Já a associação das substâncias apresentou redução no número de células com

vesículas ácidas já a partir de 3 h, o que permaneceu até 12 h, sem evidências de formação de autofagossomos em nenhum dos períodos investigados.

5.10 Análise da morfologia celular pela expressão protéica de MAP2

Podemos observar em 3 h de exposição que os neurônios dos grupos controle (Figura 47A) e cocaína (Figura 47B) apresentam, na cor verde, uma rede de longas prolongações de neuritos (setas brancas) e corpo celular bem definido (setas amarelas). AEME (Figura 47C) e C + A (Figura 47D) apresentam redução no tamanho do neurito, soma pouco definida e, ao que parece, resto de material celular no espaço onde deveriam haver células (setas vermelhas), mais evidente em AEME, do que na associação.

A partir de 6 h de exposição, nossas imagens de imunofluorescência de MAP2 mostraram que o grupo controle (Figura 48A) apresenta uma vasta rede de neuritos bem definidos, assim como o corpo celular. A cocaína (Figura 48B) apresentou tamanho reduzido de neuritos, mas corpos celulares bem definidos. A AEME (Figura 48C) apresentou poucos neuritos, corpos celulares bem definidos, mas ainda apresentou restos de material celular. A associação das substâncias (Figura 48D) apresentou redução no número de neuritos, corpos celulares disformes e não definidos, com muitos restos de material celular e núcleos celulares intumescidos.

A partir de 12 h de exposição, nossos resultados mostram que o grupo controle (Figura 49A) continuava a apresentar corpo celular e uma rede de neuritos bem definidos, mas também apresentou pequenos núcleos azulados, sem soma definida. O grupo cocaína (Figura 49B) apresentou comprometimento na rede de neuritos, sem conexões, corpos celulares disformes e restos de material celular. O grupo AEME (Figura 49C) também apresentou comprometimento da rede de neuritos, corpos celulares pequenos, núcleos sem soma e restos celulares. O grupo C + A (Figura 49D) apresentou muitos restos celulares, poucos neuritos, e estes estão dispersos, sem formar rede alguma; corpos celulares pequenos e núcleos sem soma definida.

Além disso, observamos que a quantidade de restos celulares aumenta conforme vai aumento o tempo de exposição, em todas as condições, exceto para o controle.

Figura 47 - Morfologia celular após 3 h de exposição. Neurônios hipocampais expostos ou não (controle – A) à 2 mM de cocaína (B), 1 mM de AEME (C) e à associação de ambas as substâncias (C + A – D). As células foram imunomarcadas para a proteína associada a microtúbulos, tipo 2 (MAP2 + AlexaFluor® 488) e analisadas por microscopia de fluorescência (AXIO ZEISS® – objetiva de 40x). Setas brancas indicam prolongamentos de neuritos; setas amarelas indicam o corpo celular do neurônio, com o núcleo em azul (DAPI); setas vermelhas indicam restos celulares (barra na parte inferior das figuras representa escala de 50µm – n= 2 culturas independentes em dois campos aleatórios)

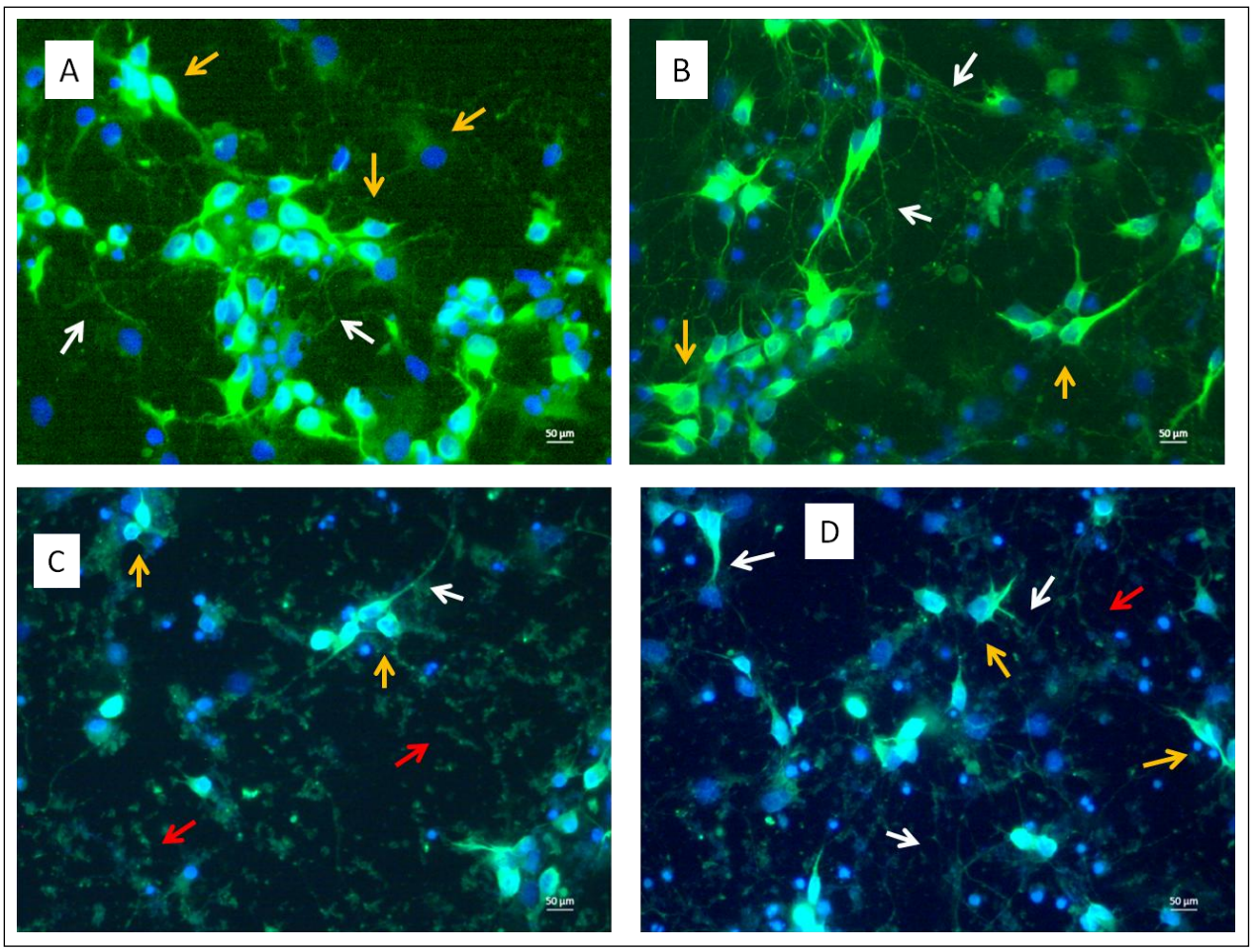


Figura 48 - Morfologia celular após 6 h de exposição. Neurônios hipocampais expostos ou não (controle – A) à 2 mM de cocaína (B), 1 mM de AEME (C) e à associação de ambas as substâncias (C + A – D). As células foram imunomarcadas para a proteína associada a microtúbulos, tipo 2 (MAP2 + AlexaFluor® 488) e analisadas por microscopia de fluorescência (AXIO ZEISS® – objetiva de 40x). Setas brancas indicam prolongamentos de neuritos; setas amarelas indicam o corpo celular do neurônio; o núcleo está corado em azul (DAPI); setas vermelhas indicam restos celulares (barra na parte inferior das figuras representa escala de 50µm - n= 2 culturas independentes em dois campos aleatórios)

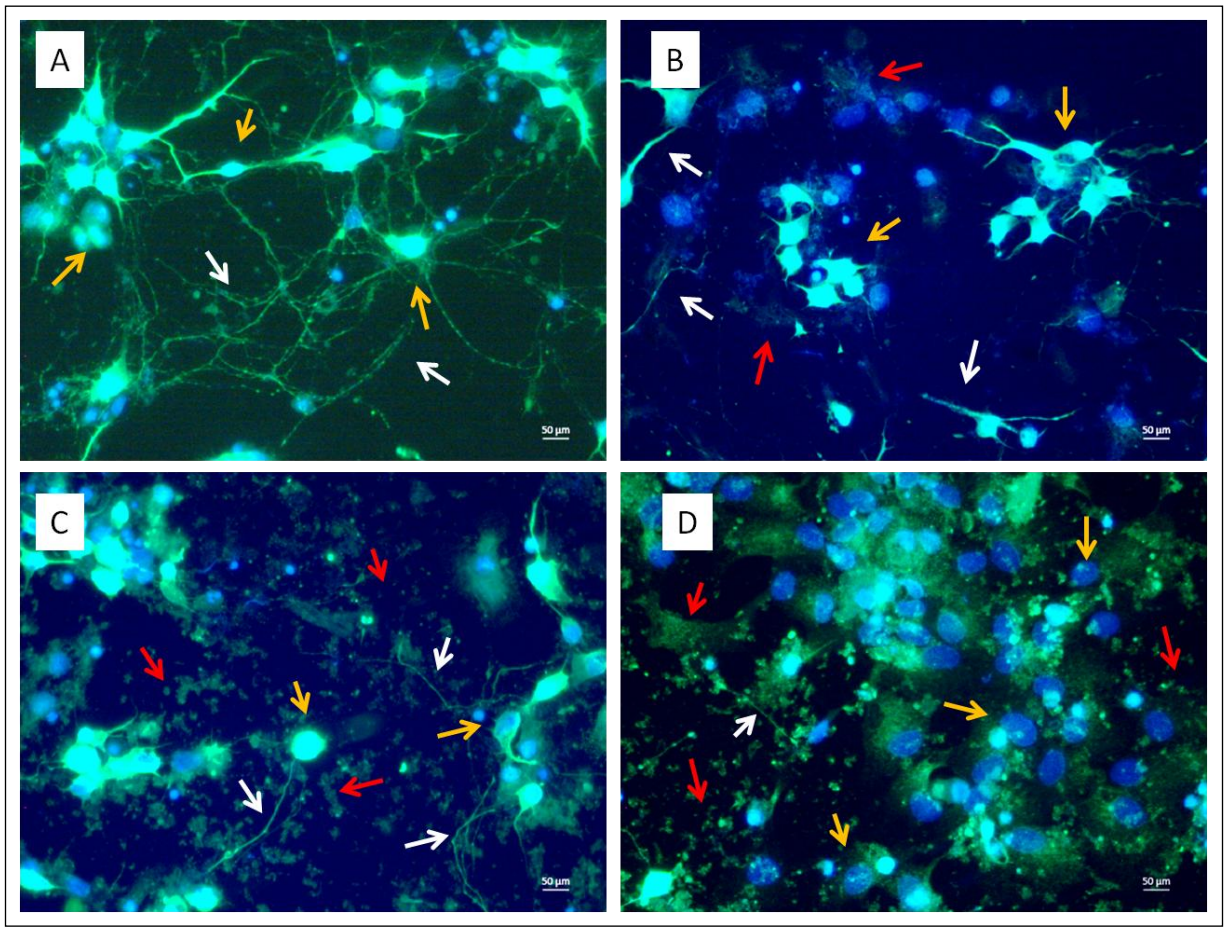
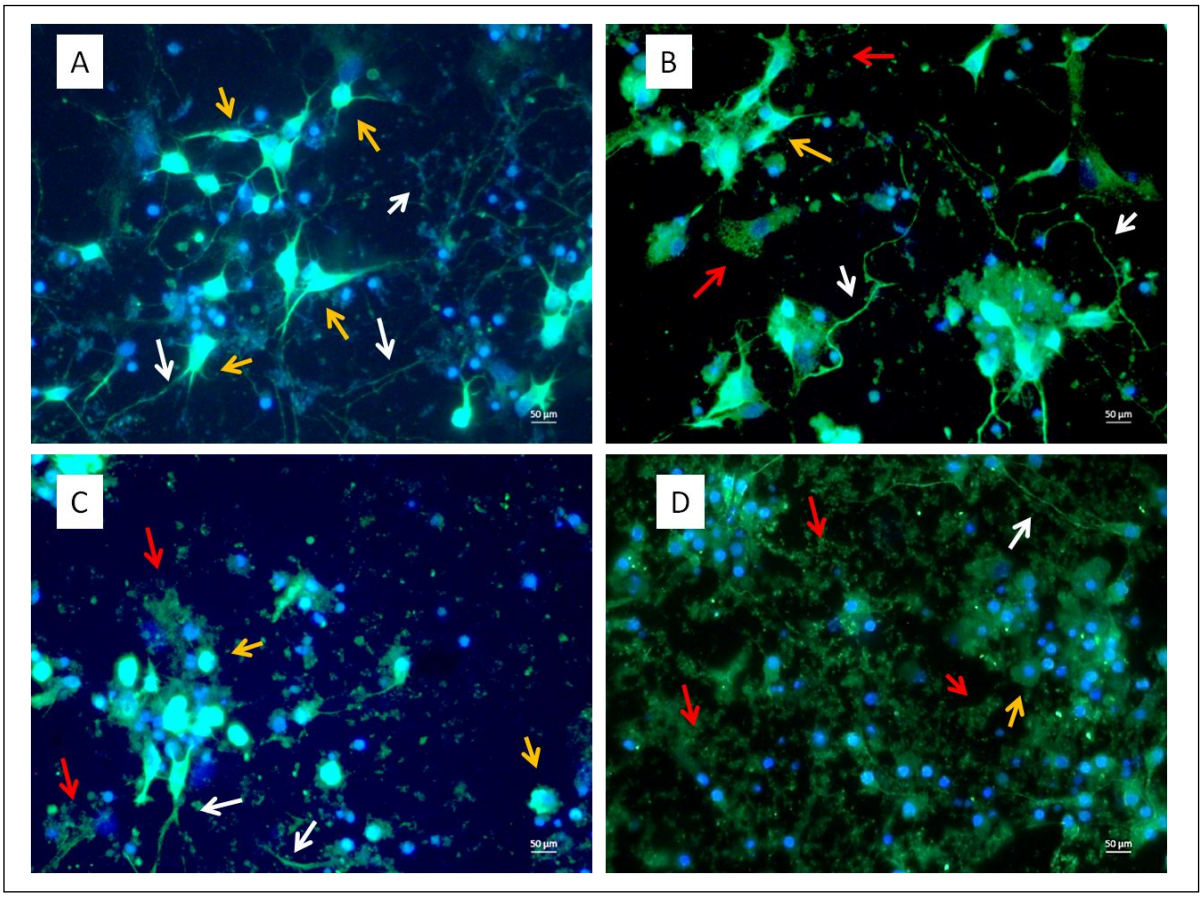


Figura 49 - Morfologia celular após 12h de exposição. Neurônios hipocampais expostos ou não (controle – A) à 2 mM de cocaína (B), 1 mM de AEME (C) e à associação de ambas as substâncias (C + A – D). As células foram imunomarcadas para a proteína associada a microtúbulos, tipo 2 (MAP2 + AlexaFluor® 488) e analisadas por microscopia de fluorescência (AXIO ZEISS® – objetiva de 40x). Setas brancas indicam prolongamentos de neuritos; setas amarelas indicam o corpo celular do neurônio; o núcleo está corado em azul (DAPI); setas vermelhas indicam restos celulares (barra na parte inferior das figuras representa escala de 50µm - n= 2 culturas independentes em dois campos aleatórios)



6 Discussão

6 DISCUSSÃO

O mercado consumidor de cocaína vem crescendo e já está com 17,1 milhões de usuários em todo o mundo (UNODC, 2017b). No Brasil, esse número chegou a 2 milhões de indivíduos acima de 18 anos, sendo que destes, 370 mil usam *crack* regularmente, tornando essa substância um grande problema de saúde pública nos dias de hoje (FIOCRUZ, 2014).

A cocaína, em suas diversas formas, é um estimulante com alto potencial de abuso que atua nos sistemas dopaminérgico, noradrenérgico e serotoninérgico, bloqueando a recaptura desses neurotransmissores, promovendo euforia e excitação (JAVAID *et al.*, 1978; GOLDSTEIN *et al.*, 2009; DIECKMANN *et al.*, 2014).

A forma básica da cocaína, ou *crack*, tem se mostrado mais prejudicial aos seus usuários do que as demais formas de uso da cocaína, tanto na esfera social quanto na saúde física e mental. Usuários de *crack* estão sujeitos à marginalização, envolvimento em atos ilícitos e violentos, prostituição e crimes (DUAILIBI; RIBEIRO e LARANJEIRA, 2008; DEGENHARDT *et al.*, 2011). Alem disso, também apresentam maiores riscos de contraírem infecções por tuberculose (DEISS; RODWELL e GARFEIN, 2009) e hepatite C (FISCHER *et al.*, 2008), doenças sexualmente transmissíveis, assim como desenvolvem maiores complicações cardiovasculares, respiratórias, entre outras (EMCDDA e EUROPOL, 2010). Em relação à saúde mental, esses indivíduos também podem apresentar prejuízos nas funções de atenção, memória, tomadas de decisão, abstração, planejamento e complicações psiquiátricas (HOFF *et al.*, 1996; MORTON, 1999; RONCERO *et al.*, 2016).

Embora os efeitos fisiológicos do *crack* sejam farmacocineticamente semelhantes aos efeitos da cocaína pela via intravenosa, os efeitos subjetivos (euforia, sensação de bem estar e agitação) são mais intensos e se iniciam mais rapidamente, entretanto a sensação de bem estar tem curta duração. Tal característica faz com que o usuário busque pela droga em intervalos mais curtos de tempo, deixando-o mais propenso a desenvolver dependência (PEREZ-REYES *et al.*, 1982; JENKINS *et al.*, 2002; SPRONK *et al.*, 2013).

É importante destacar que os usuários de *crack* estão expostos tanto à cocaína volatilizada quanto à AEME, principal produto formado durante o processo de

aquecimento da cocaína e, portanto, estão sujeitos aos efeitos simultâneos dessas duas substâncias (SCHEIDWEILER *et al.*, 2003).

A literatura é vasta a respeito da neurotoxicidade induzida pela cocaína. Existem relatos de comprometimento de atividade cerebral em humanos, com redução no metabolismo de glicose (LONDON *et al.*, 1986; LONDON *et al.*, 1990) e comprometimento de fibras, mielina e integridade celular com redução da matéria branca nos usuários crônicos de cocaína (MA *et al.*, 2009; MA *et al.*, 2015). Esses últimos efeitos na integridade encefálica, podem ainda estar relacionados com o comprometimento nas tomadas de decisão (LANE *et al*., 2010).

Mudanças tipicamente associadas com o envelhecimento como o declínio cognitivo e atrofia cerebral também são observadas nos usuários crônicos de cocaína, porém essas mudanças são até duas vezes mais severas do que nos indivíduos saudáveis de mesma idade (ERSCHE *et al.*, 2013).

Estudos em animais observaram que a cocaína é capaz de reduzir o fluxo de sódio na atividade elétrica do núcleo *accumbens* durante o período de abstinência (em ratos - ZHANG; HU e WHITE, 1998); causar microisquemias no córtex frontal (REN *et al.*, 2012) entre outras várias alterações comportamentais, como prejuízo de memória espacial (PEREZ *et al.*, 2010; TERRY JR *et al.*, 2014; FOLE *et al.*, 2015; GARCÍA-CABRERIZO; KELLER e GARCÍA-FUSTER, 2015).

A neurotoxicidade da cocaína tem sido investigada em diferentes culturas celulares. A maior parte dos estudos utiliza linhagens dopaminérgicas (por exemplo a PC12) e culturas primárias de diferentes estruturas do SNC (CUNHA-OLIVEIRA *et al.*, 2006; CUNHA-OLIVEIRA; REGO e OLIVEIRA, 2008; LEPSCH *et al.*, 2009). Lepsch, Planeta e Scavone (2015) observaram em culturas primárias de mesencefalo (com 90% de neurônios GABAérgicos) e estriado (com 10% de neurônios dopaminérgicos), que a cocaína (1 mM por 24 h) promoveu fragmentação de DNA, inibição da extenção dos neuritos e morte por apoptose. DEY *et al.* (2007) relataram que a exposição à 1,5 µM de cocaína por 24 h e 48 h promoveu apoptose de neurônios primários do *Locus coeruleus* e na ubstância nigra, com fragmentação de DNA e desbalanço na razão entre as proteínas Bax/Bcl-2 com ativação de caspse-3. Ainda, Guha, Harraz e Snyder (2016) observaram que neurônios corticais de camundongos expostos por 3 h à 1 µM de cocaína ativou o sistema autofágico, aumentando o número de vesículas autofágicas, da fração LC3 II e reduzindo p62.

Ao contrário da cocaína, as informações a respeito da neurotoxicidade da AEME são escassas. Os primeiros estudos da ação desse composto no SNC foram desenvolvidos por nosso grupo (Garcia *et al.* 2012, 2015). Foi observada redução da viabilidade de neurônios hipocampais após 24 e 48 h de exposição, com fragmentação do DNA e aumento da atividade de caspase-3 em 6 h. Ainda, foi relatado efeito aditivo na associação de cocaína com AEME a partir de 48 h de exposição, que reduziu aproximadamente 80% das células viáveis. Porém, em relação à caspase-3, a associação das substâncias reduziu a atividade dessa protease em 6 h, sugerindo uma via de morte celular diferente da apoptose dependente de caspase. De fato, a inibição da via das caspases durante o processo de apoptose pode desencadear outro processo, como por exemplo, a necroptose (NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013). Pensando nisso, no presente trabalho buscamos investigar as vias de ativação e resposta celular que precedem a morte neuronal quando os neurônios hipocampais estiverem expostos a essas substâncias.

Todas as investigações aqui empregadas foram realizadas em culturas hipocampais primárias mistas com 93% de neurônios, caracterizadas por imunofluorescência e em acordo com Garcia *et al*. (2012), com trocas de meio de nutrição a cada 48 h e expostas no sétimo dia *in vitro* (DIV7),

A cultura primária de neurônios tem como objetivo cultivar células neuronais diretamente do animal, o que é particularmente desafiador tendo em vista que neurônios maduros não se dividem após o isolamento e plaqueamento. Com o desenvolvimento das sinapses, os neurônios se tornam eletricamente ativos, atingindo o fenótipo neuronal, assim a cultura irá caminhar para a senescência e morte. Essas características são diferentes das células imortalizadas de linhagens celulares, que se dividem, atingem a confluência e começam a se diferenciar, porém, por serem células transformadas, estas irão apresentar características diferentes de uma célula primária, principalmente em relação aos mecanismos de sobrevivência celular (GIODANO; COSTA, 2011). Além disso, estas células irão apresentar diferenças fisiológicas importantes até mesmo das células de onde se originaram (GORDON; AMINI e WHITE, 2013).

No caso da cultura primária hipocampal, a sobrevivência celular *in vitro* estende-se por até duas semanas. Células que já apresentavam síntese completa de DNA em até 48 h antes da dissecação e isolamento, apresentam melhores taxas de sobrevivência em cultura enquanto que as células no início do estágio pós-

mitótico e que ainda estavam nas zonas ventriculares pouco se desenvolvem (BANKER e COWAN, 1977).

Nossos resultados de viabilidade celular mostraram que a escolha de 12 h de exposição foi um tempo ideal para se estudar a resposta celular antes da morte propriamente. Apesar de nossos resultados de azul de tripan mostrarem populações com até 51% de células viáveis (C + A em 6 h de exposição), nossos resultados de MTT mostraram que as células ainda apresentavam alta atividade metabólica. Ainda, embora o ensaio com azul de tripan reflita a porcentagem de células vivas que apresentam membranas íntegras, sabe-se que nem todo processo de aumento de permeabilidade de membrana plasmática possa indicar morte imediata, mas sim o início do processo (BERGHE *et al.*, 2013).

O ensaio de MTT avalia a capacidade da enzima succinato desidrogenase (ou complexo II da cadeia respiratória) em reduzir o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) à formazan. Além disso, este composto também pode ser convertido por lisossomos e endossomos; portanto, quanto maior a taxa de conversão, maior é a atividade enzimática, estando relacionada com viabilidade, proliferação e diferenciação celular (LIU *et al.*, 1997; SIMS e PLATTNER, 2009).

Como os neurônios não se dividem, o aumento de formazan observado não reflete proliferação celular, mas sim aumento de resposta enzimática. Ainda, o aumento dessa atividade também pode ser justificado pelo aumento da atividade mitocondrial em resposta a um processo de estresse oxidativo e/ou aumento de cálcio intracelular, tendo em vista que a cadeia respiratória é o principal mecanismo de homeostase celular para o controle de cálcio intracelular (GIORGI *et al.*, 2012).

De fato, a indução de estresse oxidativo pela cocaína já foi descrita por Costa *et al.* (2013) que observaram que a exposição à cocaína reduziu a viabilidade celular de microglias (microglias imortalizadas de camundongo - BV2) por favorecer a fosforilação de mediadores que sinalizam o estresse oxidativo envolvidos com o retículo endoplasmático. Mais ainda, Poon *et al.* (2007) observaram estresse oxidativo em células progenitoras neuronais de humano (HNPC) por meio do aumento da concentração das proteínas carbonil e 4-hidroxinonenal. Já em relação à AEME, sabe-se que esta pode promover aumento da concentração de cálcio intracelular por ser um agonista colinérgico parcial em receptores M_1 acoplados à proteína Gq com consequente formação de segundos mensageiros que favorecem a

saída de cálcio do retículo endoplasmático culminando em estresse oxidativo (SHIH *et al.*, 2010; GARCIA *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2015).

Considerando que os neurônios da nossa cultura apresentaram alterações na membrana plasmática a partir de 3 h de exposição, investigamos se essas alterações poderiam levar à ativação do processo de apoptose. Assim, observamos pelo teste de marcação com anexina V/PI que a externalização de FS acontece a partir de 6 h para as substâncias associadas e a partir de 12 h para as substâncias isoladamente, indicando que as alterações membranares observadas no teste de azul de tripan se traduziram em estímulo apoptótico, com a associação promovendo resposta mais cedo do que as substâncias isoladamente. Destaca-se aqui que a externalização de FS indica o início de apoptose que pode ser revertida, desde que o ponto de não retorno, como a clivagem de caspase -3, não tenha se ativado (LANGLEY; HAWROT e KENNEDY, 1982; VERMES *et al.*, 1995).

Muitos estímulos que levam à morte celular também ativam o processo autofágico, mecanismo este que precede outras vias de sinalização agindo como um mecanismo de sobrevivência celular (DAS; SHRAVAGE e BAEHRECKE, 2012). No entanto, a autofagia mantém uma ligação íntima com a apoptose, sendo ativada por esta, ou ativando-a, dependendo do curso das vias de sinalização e do tipo de estímulo que a célula está recebendo (NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013; MATTIOLO *et al.*, 2015).

Uma revisão bem detalhada sobre a autofagia e apoptose foi realizada por Marino *et al.* (2014). Nesse trabalho é apresentado que em um processo de apoptose celular, iniciado pela via intrínseca, onde existe disfunção mitocondrial com abertura de poros e extravasamento de proteína pró-apoptóticas pode ser controlado pela ativação do processo de mitofagia, ou seja, essas mitocôndrias disfuncionais são recicladas pelo processo autofágico aumentando assim o limite de indução da apoptose. Ainda, a autofagia pode reduzir a concentração de proteínas pró-apoptóticas no citosol, como acontece nas células tumorais de câncer de colón, onde a autofagia seletivamente remove caspase-8 ativa do citosol tornando essa célula resistente à morte induzida por TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligant* – ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF) (AMIR *et al.*, 2013).

O contrário também ocorre, onde a apoptose inibe a autofagia acelerando o processo de morte celular. Isso ocorre quando os estímulos estressores são intensos e/ou duradouros ao ponto de ultrapassarem os limites adaptativos

celulares. Caspases ativadas no processo apoptótico clivam proteínas essenciais para a autofagia, como ATG3 e Beclin 1, inibindo esse processo (LUO e RUBINSZTEIN, 2010; ORAL *et al.*, 2012). Ainda, ATG5 clivada por calpaina gera fragmentos de amino-terminais que se translocam para a mitocôndria e sensibilizam a célula para a apoptose (YOUSEFI *et al.*, 2006).

Considerando que nossa primeira evidência de apoptose foi vista a partir de 6 h para C + A e em 12 h para as substâncias isoladas, buscamos por indícios do envolvimento do processo autofágico e das vias de ativação da apoptose.

Sobre o processo autofágico, este se inicia com a formação de um fagóforo, onde a proteína LC3 I (citosólica) se une com as fosfoetanolaminas na membrana do fagóforo (tornando-se LC3 II) e, juntamente com outras proteínas, favorece o fechamento de uma vesícula de duas camadas em torno da molécula a ser reciclada. Após o fechamento dessa vesícula (autofagossomo), esta irá se fundir com um lisossomo (tornando-se um autofagolisossomo) e as enzimas ácidas lisossomais irão degradar e reciclar o material fagocitado, juntamente com a membrana interna do autofagossomo. Assim, o LC3 II volta à LC3 I retornando para o citosol, finalizando o ciclo autofágico, também conhecido por fluxo autofágico (KLIONSKY *et al.*, 2016).

Nossos resultados mostraram que somente a cocaína foi capaz de forma autofagossomos a partir de 6 h, diferentemente de Guha, Harraz e Snyder (2016) que mostrou aumento de LC3 II a partir de 3 h. Tal diferença pode ser justificado pelos tipos celulares empregados nas investigações: Guha, Harraz e Snyder (2016) utilizaram neurônios corticais, que por sua natureza são dopaminérgicos, enquanto que nosso estudo foi realizado com neurônios hipocampais isolados, que são em sua maioria glutamatérgicos e gabaérgicos.

O reagente laranja de acridina identifica compartimentos ácidos, como os lisossomos (THOMÉ *et al.*, 2016). Considerando que os autofagolisossomos são lisossomos unidos com autofagossomos, esse reagente identifica uma das fases finais do fluxo autofágico.

Apesar de nossos resultados por citometria de fluxo terem mostrado apenas redução na porcentagem de células com vesículas ácidas para C + A em todos os horários e redução no grupo cocaína em 6 h e 12 h, os resultados de microscopia de fluorescência mostraram aumento da porcentagem de células com essas vesículas

em 3 h para cocaína e AEME, e redução nessa porcentagem para cocaína e C + A em 6 h e 12 h.

Podemos sugerir que no grupo cocaína foi observado o final de um fluxo autofágico em 3 h, mas a partir de 6 h os neurônios produziram novos autofagossomos. O fato dessa exposição reduzir o número de vesículas ácidas a partir de 6 h mostra que a cocaína causa um distúrbio no fluxo autofágico, com possível acúmulo de vesículas que não são degradadas e, portanto, levam à ativação de outras programações de morte, como por exemplo a apoptose (MATTIOLO *et al.*, 2015).

A autofagia é um processo de degradação e reciclagem de componentes citosólicos dentro de lisossomos, podendo acontecer de três maneiras: 1) pela macroautofagia (também chamada apenas de autofagia), onde, como já apresentado anteriormente, o componente à ser degradado é englobado pelo autofagossomo e este se funde com o lisossomo; 2) pela microautofagia, onde a membrana lisossomal ou endossomal engloba diretamente o substrato a ser reciclado; e 3) autofagia mediada por chaperonas, onde o conteúdo citosólico se liga à uma proteína do tipo chaperona e esta atravessa o conteúdo por um receptor expecífico (LAMP-2) sem precisar de uma vesícula (KAUR e DEBNATH, 2015).

O fato de a AEME apresentar apenas aumento de células com vesículas ácidas em 3 h, sem alterar a quantificação de LC3, pode indicar que essa substância promove aumento da atividade lisossomal (também observada nos resultados de MTT) que pode culminar em apoptose somente após 12 h de exposição, sem envolver a formação de autofagossomos.

Ainda, existem evidências que o próprio sistema lisossomal pode desencadear a morte celular ativando tanto os processos de necrose quanto de apoptose por meio do extravasamento de hidrolases e proteases lisossomais para o citosol (JOHANSSON *et al.*, 2003; ZENÓN *et al.*, 2014; STOKA; TURK e TURK, 2016). Segundo Johansson *et al*. (2003), a catepsina D, uma protease lissosomal, é um mediador chave na ativação da apoptose induzida por estaurosporina (padrão ouro de indução de apoptose), atuando em vias anteriores à liberação de citocromo c e ativação de caspases.

Quanto a exposição simultânea de cocaína com AEME nossos resultados mostraram redução de vesículas ácidas sem indícios de formação de autofagossomos. Segundo Busch, Lang e Lang (1996), em um estudo com células

musculares, observou-se que a alcalinização de lisossomos pode ocorrer por um desequilíbrio osmótico causado por aumento de cálcio intracelular. Esse desequilíbrio leva a um intumescimento celular, bem como de compartimentos intracelulares, modificando o pH do meio. Segundo Garcia *et al.* (2015) exposições de neurônios hipocampais a associação de cocaína com AEME promoveu aumento de cálcio intracelular concentração dependente. Assim, podemos sugerir que a redução de vesículas ácidas observadas em nosso resultado possa ser em função de uma alcalinização de lisossomos por aumento da concentração de cálcio intracelular o que pode ativar outras programações de morte celular e não envolver o processo autofágico.

Como nossos resultados de anexina V/PI indicaram aumento na porcentagem de células em apoptose a partir de 6 h de exposição, investigamos por qual via esta ativação poderia ter se iniciado. Primeiramente, com base nos resultados de MTT, pensamos que a via intrínseca fosse a via iniciadora, porém, não encontramos diferenças estatísticas significativas entre os grupos em relação à quantificação de Bax e Blc-2 em nenhum horário experimental, diferentemente de Lepsch *et al* (2009) que observou redução da expressão de Bcl-2 em células PC12 após 6 h de exposição à 1 mM de cocaína e aumento da atividade de caspase-3 com redução de viabilidade somente após 24 h.

Devemos considerar que as diferenças com a literatura se dá pelo fato de que nossos resultados são baseados em uma cultura mista com predominância de neurônios hipocampais glutamatérgicos, que ainda possui interneurônios GABAergicos e colinérgicos, diferente uma cultura de PC12, que é composta somente por um tipo celular dopaminérgico imortalizado (GREENE, 1978).

Apesar da cultura utilizada em nossos estudos apresentar receptores dopaminérgicos (BEAULIEU e GAINETDINOV, 2011), os neurônios cultivados estão isolados dos aferentes desse neurotransmissor fazendo com que não ocorra liberação de dopamina nas nossas condições experimentais.

Visto que a dopamina é um neuromodulador ativador do sistema glutamatérgico no hipocampo (GARDONI e BELLONE, 2015) e que também é considerada uma neurotoxina endógena, uma vez que seus produto de metabolismo são substâncias tóxicas, como peróxido de hidrogênio e quinonas, que desencadeiam estresse oxidativo (CANTUTI-CASTELVETRI; SHUKITT-HALE;

JOSEPH, 2003), a falta desta nas nossas condições experimentais pode ser a razão pela qual os resultados obtidos tenham se mostrado diferentes da literatura.

A via intrínseca da apoptose se ativa quando proteínas apoptogênicas do espaço intermembranas da mitocondria, como o citocormo c, extravasam para o citosol e, juntamente com ATP e pró-caspase-9 (46kDa), formam o apoptossomo - um complexo proteico que cliva (37kDa) e ativa caspase-9 (17kDa) (SAFA, 2012). Esse extravasamento só é possível quando a membrana externa mitocondrial apresenta poros que favorecem essa saída de proteínas e esta abertura é controlada por um balanço entre proteínas efetoras (Bax e Bak) e inibidoras (Bcl-2, McL e Bcl-xL) (SPENCER e SORGER, 2011). A proteína Bax, quando oligomerizada tem a capacidade de promover a abertura de poros na membrana da mitocôndria, porém, a sua conjugação com Bcl-2 impede tal ação, assim a melhor forma de analisar essas proteínas é por meio da razão entre elas (KHODAPASAND *et al.*, 2015).

Como não houve alteração na razão de Bax e Bcl-2 era de se esperar que a caspase-9, assim como a via intrínseca, não estivessem envolvidas com o processo apoptótico. Realmente, a caspase-9 não se mostrou diferente do controle em nenhum dos horários quando as células foram expostas às substâncias isoladamente, porém, C + A, a partir de 12 h, apresentou aumento na porcentagem de células com caspase-9 ativa, indicando mais uma vez que a associação das substâncias possui um mecanismo neurotóxico diferente das substâncias isoladas.

Embora Garcia *et al*. (2012) tenham observado aumento de atividade de caspase-3 em 6 h na exposição à AEME, nas mesmas condições empregadas no atual trabalho, nossos resultados não mostraram tal ativação, possivelmente pelas técnicas aqui empregadas. Garcia *et al*. (2012) utilizaram o método de quantificação da atividade enzimática com o lisado celular por espectrofotometria e no presente trabalho, utilizamos marcação intracelular para caspase-3 ativa por citometria de fluxo que mostra a porcentagem de células que apresentam a fração ativa dessa caspase.

Em relação à caspase-8, nossos resultados mostraram mais uma vez que a associação de cocaína com AEME promoveu alterações celulares antes do que as substâncias isoladas.

Após a ativação de caspase-8 esta poderá tanto ativar caspases efetoras, como a caspase-3, quanto clivar a proteína BID, levando à formação de fragmentos

permeabilizadores da membrana externa mitocondrial (Bid truncado) ativando a via intrínseca da apoptose mais tardiamente (GALLUZZI *et al.*, 2012). Nossos resultados sugerem que este pode ser o mecanismo celular para a associação das substâncias que apresentou aumento da porcentagem e células marcadas para caspase -9 ativa apenas após 12 h de exposição.

A avaliação da morfologia celular dos neurônios da cultura primária de hipocampo mostrou alterações significativas na estrutura neuronal, como redução no tamanho dos dendritos no grupo cocaína, assim como observaram Lepsch, Planeta e Scavone (2015). Também foram observadas células disformes no grupo C + A que apresentou características tipo necróticas, com aumento do núcleo e corpo celular em 6 h. Já em 12 h, observamos no mesmo grupo, núcleos picnóticos sem delimitação de corpo celular.

A degeneração de dendritos, com redução da extensão e da densidade é observada em várias condições patológicas, como nas doenças de Alzheimer e de Parkinson (ZAJA-MILATOVIC *et al.*, 2005; ŠIŠKOVÁ *et al.*, 2014). Períodos longos de estresse também podem causar tais alterações, como foi observado por Watanabe; Gould e Mcewen (1992), em que 6 h de contenção, por 3 semanas consecutivas causaram redução do comprimento e da densidade de dendritos apicais nos neurônios piramidais da região CA3 em ratos Sprague-Dawley.

Vários estudos mostram que o estresse crônico pode alterar a morfologia dos dendritos na formação hipocampal, causando um desbalanço na circuitaria neuronal o que resulta em alterações comportamentais com comprometimento da cognição e da capacidade de tomada de decisões (SOUSA *et al.*, 2000; VYAS *et al.*, 2002; MCEWEN, 2016; CONRAD; ORTIZ e JUDD, 2017).

Deste modo, podemos sugerir que as alterações morfológicas observadas antes da morte celular, poderiam causar alterações comportamentais antes mesmo de causar comprometimento cognitivo, decorrente de perda neuronal. Além disso, nossos resultados mostraram que, para cocaína e AEME, a morte celular inicia-se pela ativação da via extrínseca da apoptose a partir de 12 h, embora a morte propriamente ocorra após 24 h (SU *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2009; GARCIA *et al.* 2012; LEPSCH; PLANETA e SCAVONE, 2015; GARCIA *et al*., 2015) e a associação dessas substâncias mostrou-se potencialmente mais neurotóxica do que as substâncias isoladamente.

7 Conclusão

Considerando nossos resultados como um todo, podemos concluir que a neurotoxicidade induzida pela AEME se dá por ativação da via extrínseca da apoptose com os primeiros sinais apoptóticos iniciando-se em 12 h de exposição, sem a participação de vesículas autofágicas. A cocaína também ativa a via extrínseca da apoptose a partir de 12 h de exposição, mas seu mecanismo neurotoxico ocorre por falha no fluxo autofágico. A associação das substâncias tem mecanismo neurotóxico diferente e maior neurotoxicidade do que as substâncias isoladas, iniciando-se mais precocemente, ativando tanto a via extrínseca quanto a intrínseca, sem envolver o processo autofágico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS[2]

AARON, G. B.; WILCOX, K. S.; DICHTER, M. A. Different patterns of synaptic transmission revealed between hippocampal CA3 stratum oriens and stratum lucidum interneurons and their pyramidal cell targets. **Neuroscience,** v. 117, n. 1, p. 169-181, 2003/03/17/ 2003.

ABURTO, M. R. *et al.* Autophagy During Vertebrate Development. **Cells,** v. 1, n. 3, p. 428-448, 2012.

AKI, T.; FUNAKOSHI, T.; UEMURA, K. Regulated necrosis and its implications in toxicology. **Toxicology,** v. 333, p. 118-126, 2015.

ALLISON, A. C.; YOUNG, M. R. Uptake of dyes and drugs by living cells in culture. **Life Sciences,** v. 3, n. 12, 1964.

ALMEIDA, P. P. *et al.* Attention and memory deficits in crack-cocaine users persist over four weeks of abstinence. **Journal of Substance Abuse Treatment,** v. 81, p. 73-78, 2017.

AMARAL, D. G.; WITTER, M. P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. **Neuroscience,** v. 32, n. 3, p. 571 - 591, 1989.

AMARAL, D. G.; SCHARFMAN, H. E.; LAVENEX, P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). **Progress in brain research,** v. 163, p. 3-22, 2007.

AMIR, M. *et al.* Inhibition of hepatocyte autophagy increases tumor necrosis factor-dependent liver injury by promoting caspase-8 activation. **Cell death and differentiation,** v. 20, n. 7, p. 878-887, 2013.

BAEHRECKE, E. H. The Grand Finale. **Cell,** v. 144, n. 4, p. 463-464, 2011.

BANKER, G. A.; COWAN, W. M. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. **Brain Research,** v. 126, n. 3, p. 397-425, 1977.

BAYER, S. A. Development of the Hippocampal Region in the Rat I. Neurogenesis Examined With ^{3}H-Thymidine Autoradiography. **Journal of Comparative Neurology,** v. 190, p. 87-114, 1980.

BEAULIEU, J.-M.; GAINETDINOV, R. R. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. **Pharmacological Reviews,** v. 63, n. 1, p. 182, 2011.

BERGHE, T. V. *et al.* Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. **Methods,** v. 61, n. 2, p. 117-129, 2013.

[2] De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

BERGHE, T. V. *et al.* Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. **Nature Reviews. Molecular Cell Biol,** v. 15, n. 2, p. 135-147, 2014.

BHATTACHARYYA, S. *et al.* Regulated protein turnover: snapshots of the proteasome in action. **Nature Reviews. Molecular Cell biology,** v. 15, n. 2, p. 122-133, 2014.

BUSCH, G. L.; LANG, H.J.; LANG, F. Studies on the mechanism of swelling-induced lysosomal alkalinization invascular smooth muscle cells. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 431, p. 690-696, 1996.

CANONICO, P. G.; BIRD, J. W. C. The use of acridine orange as a lysosomal marker in rat skeletal muscle. **The Journal of cell biology,** v. 43, n. 2, p. 367-371, 1969.

CANTO, C. B.; WOUTERLOOD, F. G.; WITTER, M. P. What Does the Anatomical Organization of the Entorhinal Cortex Tell Us? **Neural Plasticity,** v. 2008, p. 381243, 2008.

CANTUTI-CASTELVETRI, I.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J. A. Dopamine neurotoxicity: age-dependente behavioral and histological effects. **Neurobiology of Aging**, v.24, n.5, p.687-706, 2003.

CARRERA, M. R. A.; MEIJLER, M. M.; JANDA, K. D. Cocaine pharmacology and current pharmacotherapies for its abuse. **Bioorganic & Medicinal Chemistry,** v. 12, n. 19, p. 5019-5030, 2004.

CARTER, L. P.; GRIFFITHS, R. R. Principles of laboratory assessment of drug abuse liability and implications for clinical development. **Drug and Alcohol Dependence,** v. 105S1, p. S14-S25, 2009.

Castiglioni, S. *et al.* Mass spectrometric analysis of illicit drugs in wastewater and surface water. **Mass Spectrometry Reviews**. v. 27, p. 378–394, 2008.

CHEUNG, T. H. C.; CARDINAL, R. N. Hippocampal lesions facilitate instrumental learning with delayed reinforcement but induce impulsive choice in rats. **BMC Neuroscience,** v. 6, p. 36-36, 2005.

CICCARONE, D. Stimulant Abuse: Pharmacology, Cocaine, Methamphetamine, Treatment, Attempts at Pharmacotherapy. **Primary care,** v. 38, n. 1, p. 41-58, 2011.

CLARKE, P. G. H. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. **Anatomy and Embryology,** v. 181, n. 3, p. 195-213, 1990.

CONE, E. J. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cocaine. **Journal of Analytical Toxicology,** v. 19, n. 6, p. 459-478, 1995.

CONRAD, C. D.; ORTIZ, J. B.; JUDD, J. M. Chronic stress and hippocampal dendritic complexity: Methodological and functional considerations. **Physiology & Behavior,** v. 178, n. Supplement C, p. 66-81, 2017/09/01/ 2017.

COSTA, B. M. *et al.* Role of Endoplasmic Reticulum (ER) Stress in Cocaine-Induced Microglial Cell Death. **Journal of neuroimmune pharmacology**, v. 8, n. 3, p. 705-714, 2013.

CROMPTON, T. *et al.* Propidium iodide staining correlates with the extent of DNA degradation in isolated nuclei. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 183, n. 2, p. 532-537, 1992.

CUNHA-OLIVEIRA, T. *et al.* Mitochondrial dysfunction and caspase activation in rat cortical neurons treated with cocaine or amphetamine. **Brain Research,** v. 1089, n. 1, p. 44-54, 2006.

CUNHA-OLIVEIRA, T.; REGO, A. C.; OLIVEIRA, C. R. Cellular and molecular mechanisms involved in the neurotoxicity of opioid and psychostimulant drugs. **Brain Research Reviews,** v. 58, n. 1, p. 192-208, 2008.

DAS, G.; SHRAVAGE, B. V.; BAEHRECKE, E. H. Regulation and Function of Autophagy during Cell Survival and Cell Death. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology,** v. 4, n. 6, June 1, 2012 2012.

DE GIOVANNI, N.; MARCHETTI, D. Cocaine and its metabolites in the placenta: A systematic review of the literature. **Reproductive Toxicology,** v. 33, n. 1, p. 1-14, 2012.

DEGENHARDT, L. *et al.* Mortality among cocaine users: A systematic review of cohort studies. **Drug and Alcohol Dependence,** v. 113, n. 2–3, p. 88-95, 2011.

DEHMELT, L.; HALPAIN, S. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. **Genome Biology**, v. 6, n.1, p. 1-10, 2005.

DEISS, R. G.; RODWELL, T. C.; GARFEIN, R. S. Tuberculosis and Drug Use: Review and Update. **Clinical infectious diseases,** v. 48, n. 1, p. 10.1086/594126, 2009.

DENAULT, J.-B.; SALVESEN, G. S. Caspases: Keys in the Ignition of Cell Death. **Chemical Reviews,** v. 102, n. 12, p. 4489-4500, 2002.

DENG, W.; AIMONE, J. B.; GAGE, F. H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? **Nature reviews. Neuroscience,** v. 11, n. 5, p. 339-350, 2010.

DESCLOUX, C. *et al.* Neuronal death after perinatal cerebral hypoxia-ischemia: Focus on autophagy—mediated cell death. **International Journal of Developmental Neuroscience,** v. 45, p. 75-85, 2015.

DIAS, A. C. *et al.* Mortality rate among crack/cocaine-dependent patients: A 12-year prospective cohort study conducted in Brazil. **Journal of Substance Abuse Treatment,** v. 41, n. 3, p. 273-278, 2011.

DIECKMANN, L. H. J. *et al.* Effects of biperiden on the treatment of cocaine/crack addiction: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **European Neuropsychopharmacology,** v. 24, n. 8, p. 1196-1202, 2014.

DOYA, K. Modulators of decision making. **Nature Reviews. Neuroscience**, v.11, n.4, p. 410-416, 2008.

DUAILIBI, L. B.; RIBEIRO, M.; LARANJEIRA, R. Profile of cocaine and crack users in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública,** v. 24, p. s545-s557, 2008.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology,** v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

EMCDDA - European Monitoring Center of Drugs and Drug Addiction. **Cocaine: A European Union perspective in the global context**. EUROPOL. 2010.

ERSCHE, K. D. *et al.* Cocaine dependence: a fast-track for brain ageing? **Molecular Psychiatry,** v. 18, n. 2, p. 134-135, 2013.

ERZOUKI, H. K. *et al.* Effects of cocaine, cocaine metabolites and cocaine pyrolysis products on the hindbrain cardiac and respiratory centers of the rabbit ag. **Life Sciences,** v. 57, n. 20, p. 1861-1868, 1995/10/06/ 1995.

FALCK, R. S.; WANG, J.; CARLSON, R. G. Among long-term crack smokers, who avoids and who succumbs to cocaine addiction? **Drug and Alcohol Dependence,** v. 98, n. 1–2, p. 24-29, 2008.

FANDIÑO, A. S.; TOENNES, S. W.; KAUERT, G. F. Studies on Hydrolytic and Oxidative Metabolic Pathways of Anhydroecgonine Methyl Ester (Methylecgonidine) Using Microsomal Preparations from Rat Organs. **Chemical Research in Toxicology,** v. 15, n. 12, p. 1543-1548, 2002a.

FANDIÑO, A. S.; TOENNES, S. W.; KAUERT, G. F. Studies on In Vitro Degradation of Anhydroecgonine Methyl Ester (Methylecgonidine) in Human Plasma. **Journal of Analytical Toxicology,** v. 26, n. 8, p. 567-570, 2002b.

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

FESTJENS, N.; BERGHE, T. V.; VANDENABEELE, P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics,** v. 1757, n. 9–10, p. 1371-1387, 2006.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. **Infection and Immunity,** v. 73, n. 4, p. 1907-1916, 2005.

FIOCRUZ. **Pesquisa Nacional sobre o uso de crack: quem são os usuários de crack e/ou similares do Brasil? Quantos são nas capitais brasileiras?** BASTOS, F. I. e BERTONI, N. Rio de Janeiro: Editora ICICT/FIOCRUZ. 2014. 224p.

FISCHER, B. *et al.* Hepatitis C virus transmission among oral crack users: viral detection on crack praphernalia. **European Journal of Gatroenterology & Hepatology,** v. 20, n. 1, p. 29-32, 2008.

FITZGERALD, P. J. Elevated Norepinephrine May Be a Unifying Etiological Factor in the Abuse of a Broad Range of Substances: Alcohol, Nicotine, Marijuana, Heroin, Cocaine, and Caffeine. **Substance Abuse: Research and Treatment,** v. 7, p. 171-183, 2013.

FOLE, A. *et al.* Effects of chronic cocaine treatment during adolescence in Lewis and Fischer-344 rats: Novel location recognition impairment and changes in synaptic plasticity in adulthood. **Neurobiology of Learning and Memory,** v. 123, p. 179-186, 2015.

FOLTIN, R. W.; FISCHMAN, M. W. Smoked and intravenous cocaine in humans: acute tolerance, cardiovascular and subjective effects. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,** v. 257, n. 1, p. 247-261, April 1, 1991 1991.

FORD, C. P. The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission. **Neuroscience,** v. 282, n. Supplement C, p. 13-22, 2014/12/12/ 2014.

FRANKLAND, P. W.; BONTEMPI, B. The organization of recent and remote memories. **Nature Reviews. Neuroscience,** v. 6, n. 2, p. 119-130, 2005.

FREUND, T. F.; BUZSÁKI, G. Interneurons of the hippocampus. **Hippocampus,** v. 6, p. 347-470, 1996.

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell death and differentiation,** v. 19, n. 1, p. 107-120, 2012.

GALLUZZI, L. *et al.* Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. **Cell Death Differentiation,** v. 22, n. 1, p. 58-73, 2015.

GARAY, H. M. *et al.* Degradação seletiva de proteínas e suas implicações no câncer. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento,** v. 30, p. 60-70, 2003.

GARCÍA-CABRERIZO, R.; KELLER, B.; GARCÍA-FUSTER, M. J. Hippocampal cell fate regulation by chronic cocaine during periods of adolescent vulnerability: Consequences of cocaine exposure during adolescence on behavioral despair in adulthood. **Neuroscience,** v. 304, p. 302-315, 2015.

GARCIA, Raphael Caio Tamboreli. **Efeitos neurodegenerativos da metilecgonidina e da cocaína emcultura celular primária de hipocampo**. 2009. 114f. Dissertação (mestrado em ciências) - Programa de pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - USP. 2009.

GARCIA, R. C. T. *et al.* Neurotoxicity of anhydroecgonine methyl ester, a crack cocaine pyrolysis product. **Toxicological Sciences,** v. 128, n. 1, p. 223-234, 2012.

GARCIA, R. C. T. *et al.* M1 and M3 muscarinic receptors may play a role in the neurotoxicity of anhydroecgonine methyl ester, a cocaine pyrolysis product. **Scientific Reports,** v. 5, n. November, p. 1-12, 2015.

GARDONI, F.; BELLONE, C. Modulation of the glutamatergic transmission by Dopamine: a focus on Parkinson, Huntington and Addiction diseases. **Frontiers in Cellular Neuroscience,** v. 9, p. 25, 2015.

GIAP, B. T. *et al.* The hippocampus: Anatomy, pathophysiology and Regenerative Capacity. **Journal of Head and Trauma Rehabil,** v. 15, n. 3, p. 875-894, 2000.

GIORGI, C. *et al.* Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine. **Mitochondrion,** v. 12, n. 1, p. 77-85, 2012.

GOLDING, N. L.; STAFF, N. P.; SPRUSTON, N. Dendritic spikes as a mechanism for cooperative long-term potentiation. **Nature,** v. 418, n. 6895, p. 326-331, 2002.

GOLDSTEIN, R. A. *et al.* Cocaine: history, social implications, and toxicity: a review. **Seminars in Diagnostic Pathology,** v. 26, n. 1, p. 10-17, 2009.

GORDON, J.; AMINI, S.; WHITE, M. K. General overview of neuronal cell culture. **Methods in Molecular Biology,** v. 1078, p. 1-8, 2013.

GRAVES, A. R. *et al.* Hippocampal Pyramidal Neurons Comprise Two Distinct Cell Types that Are Countermodulated by Metabotropic Receptors. **Neuron,** v. 76, n. 4, p. 776-789, 2012.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight? **Journal of Clinical Investigation,** v. 115, n. 10, p. 2610-2617, 2005.

GREENE, L. A nerve growth factor prevents the death and stimulates the neuronal differentiation of clonal PC12 pheochromocytoma cells in serum-free medium. **Journal of Cell Biology**, v. 78, n.3, p. 747-755, 1978.

GUHA, P.; HARRAZ, M. M.; SNYDER, S. H. Cocaine elicits autophagic cytotoxicity via a nitric oxide-GAPDH signaling cascade. **Pnas,** v. 113, n. 5, p. 1-6, 2016.

GUMP, J. M.; THORBURN, A. Autophagy and apoptosis: what is the connection? **Trends in Cell Biology,** v. 21, n. 7, p. 387-392, 2011.

HAGA, T. Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. **Proceedings of the Japan Academy.** Series B, Physical and Biological Sciences, v. 89, n. 6, p. 226-256, 2013.

HAILE, C. N. *et al.* Pharmacotherapeutics directed at deficiencies associated with cocaine dependence: Focus on dopamine, norepinephrine and glutamate. **Pharmacology & therapeutics,** v. 134, n. 2, p. 260-277, 2012.

HE, C.; KLIONSKY, D. J. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. **Annual review of genetics,** v. 43, p. 67-93, 2009.

HERNÁNDEZ, V. S. *et al.* Dopamine receptor dysregulation in hippocampus of aged rats underlies chronic pulsatile l-Dopa treatment induced cognitive and emotional alterations. **Neuropharmacology,** v. 82, n. Supplement C, p. 88-100, 2014.

HOFF, A. L. *et al.* Effects of crack cocaine on neurocognitive function. **Psychiatry Research,** v. 60, n. 2-3, p. 167-176, 1996.

HUANG, L. *et al.* Effect of cocaine and methylecgonidine on intracellular Ca2+ and myocardial contraction in cardiac myocytes. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology,** v. 273, n. 2, p. 893-901, 1997.

HUETTNER, J. E.; BAUGHMAN, R. W. Primary culture of identified neurons from the visual cortex of postnatal rats. **Journal of Neuroscience,** v. 6, n. 10, p. 3044-3060, 1986.

HUIJGEN, J.; SAMSON, S. The hippocampus: A central node in a large-scale brain network for memory. **Revue Neurologique,** v. 171, n. 3, p. 204 - 2016, 2015.

INIESTA, I. On the origin of Ammon's horn. **Neurología (English Edition),** v. 29, n. 8, p. 490-496, 2014.

ITO, H. T.; SCHUMAN, E. M. Frequency-Dependent Signal Transmission and Modulation by Neuromodulators. **Frontiers in Neuroscience,** v. 2, n. 2, p. 138-144, 2008.

JALAVA, N. S. *et al.* Changes in microtubule-associated protein-2 (MAP2) expression during development and after status epilepticus in the immature rat hippocampus. **International Journal of Developmental Neuroscience,** v. 25, n. 2, p. 121-131, 2007.

JATLOW, P. Cocaine: analysis, pharmacokinetics, and metabolic disposition. **The Yale Journal of Biology and Medicine,** v. 61, n. 2, p. 105-113, 1988.

JAVAID, J. I. *et al.* Cocaine plasma concentration: relation to physiological and subjetive effects in humans. **Science,** v. 202, n. 4364, p. 227-228, 1978.

JENKINS, A. J. *et al.* Correlation beteween pharmacological effects and plasma cocaine concentrations after smoked administration. **Journal of Analytical Toxicology,** v. 26, p. 383 - 392, 2002.

JOHANSSON, A. C. *et al.* Cathepsin D mediates cytochrome c release and caspase activation in human fibroblast apoptosis induced by staurosporine. **Cell Death Differentiation,** v. 10, n. 11, p. 1253-1259, 2003.

KACZMAREK, A.; VANDENABEELE, P.; KRYSKO, DMITRI V. Necroptosis: The Release of Damage-Associated Molecular Patterns and Its Physiological Relevance. **Immunity,** v. 38, n. 2, p. 209-223, 2013.

KAPITEIN, LUKAS C.; HOOGENRAAD, CASPER C. Building the Neuronal Microtubule Cytoskeleton. **Neuron,** v. 87, n. 3, p. 492-506, 2015.

KAUR, J.; DEBNATH, J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. **Nature Reviews. Mollecular Cell Biology,** v. 16, n. 8, p. 461-472, 2015.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. **British Journal of Cancer,** v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.

KHAN, I. *et al.* Epithelial atrophy in oral submucous fibrosis is mediated by copper (II) and arecoline of areca nut. **Journal of Cellular and Molecular Medicine,** v. 19, n. 10, p. 2397-2412, 2015.

KHODAPASAND, E. *et al.* Is Bax/Bcl-2 Ratio Considered as a Prognostic Marker with Age and Tumor Location in Colorectal Cancer? **Iranian Biomedical Journal,** v. 19, n. 2, p. 69-75, 2015.

KIERNAN, J. A. Anatomy of the Temporal Lobe. **Epilepsy Research and Treatment,** v. 2012, p. 176157, 2012.

KLIONSKY, D. J. *et al.* Guidelines for use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). **Autophagy,** v. 12, n. 1, p. 1-222, 2016.

KNOWLES, W. D. Normal Anatomy and Neurophysiology of the Hippocampal Formation. **Journal of clinical Neurophysiology,** v. 9, n. 2, p. 252-263, 1992.

KOLLING, N. D. M. *et al.* Avaliação neuropsicológica em alcoolistas e dependentes de cocaína. **Avaliação Psicológica,** v. 6, p. 127-137, 2007.

KROEMER, G.; DALLAPORTA, B.; RESCHE-RIGON, M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. **Annual Review of Physiology,** v. 60, n. 1, p. 619-642, 1998.

KROEMER, G. *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell death and differentiation,** v. 16, n. 1, p. 3-11, 2009.

KÜBLER, A.; MURPHY, K.; GARAVAN, H. Cocaine dependence and attention switching within and between verbal and visuospatial working memory. **European Journal of Neuroscience,** v. 21, n. 7, p. 1984-1992, 2005.

KULLMANN, D. M. Interneuron networks in the hippocampus. **Current opinion in neurobiology,** v. 21, n. 5, p. 709-716, 2011.

KUSUZAKI, K. *et al.* Acridine Orange could be an Innovative Anticancer Agent under Photon Energy. **In Vivo,** v. 21, n. 2, p. 205-214, March 1, 2007 2007.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Manipulation of Host Cell Death Pathways during Microbial Infections. **Cell Host & Microbe,** v. 8, n. 1, p. 44-54, 2010.

LANE, S. D. *et al.* Diffusion Tensor Imaging and Decision Making in Cocaine Dependence. **PLoS ONE,** v. 5, n. 7, p. e11591, 2010.

LANGLEY, K. E.; HAWROT, E.; KENNEDY, E. P. Membrane assembly: Movement of phosphatidylserine between the cytoplasmic and outer membranes of Escherichia coli. **Journal of Bacteriology,** v. 152, n. 3, p. 1033-1041, 1982.

LARRIVA-SAHD, J. A. Some predictions of Rafael Lorente de Nó 80 years later. **Frontiers in Neuroanatomy,** v. 8, p. 147, 2014.

LEE, C.-T. *et al.* Gene Expression Profiling Reveals Distinct Cocaine-Responsive Genes in Human Fetal CNS Cell Types. **Journal of addiction medicine,** v. 3, n. 4, p. 218-226, 2009.

LENAD. **II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD)**. LARANJEIRA, R.*, et al*. São Paulo: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia pra Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD), UNIFESP. 2014. 85p.

LEPSCH, L. B. *et al.* Cocaine induces cell death and activates the transcription nuclear factor kappa-B in PC12 cells. **Molecular brain,** v. 2, p. 3-3, 2009.

LEPSCH, L. B.; PLANETA, C. S.; SCAVONE, C. Cocaine Causes Apoptotic Death in Rat Mesencephalon and Striatum Primary Cultures. **BioMed Research International,** v. 2015, p. 1-7, 2015.

LEVEY, A. I. *et al.* Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation. **The Journal of Neuroscience,** v. 15, n. 5, p. 4077, 1995.

LIPPENS, S. *et al.* Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification. **Cell Death Differentiation,** v. 12, n. S2, p. 1497-1508, 2005.

LIU, Y. *et al.* Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of neurochemistry,** v. 69, n. 2, p. 581-93, 1997.

LONDON, E. D. *et al.* Effects of l-cocaine on local cerebral glucose utilization in the rat. **Neuroscience Letters,** v. 68, n. 1, p. 73-78, 1986.

LONDON, E. D. *et al.* Cocaine-Induced Redoppuction of Glucose Utilization in Human BrainA Study Using Positron Emission Tomography and [Fluorine 18]-Fluorodeoxyglucose. **Arch Gen Psychiatry,** v. 47, n. 6, p. 567-574, 1990.

LUO, S.; RUBINSZTEIN, D. C. Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis – an effect rescued by Bcl-xL. **Cell death and differentiation,** v. 17, n. 2, p. 268-277, 2010.

MA, L. *et al.* Diffusion tensor imaging in cocaine dependence: Regional effects of cocaine on corpus callosum and effect of cocaine administration route. **Drug & Alcohol Dependence,** v. 104, n. 3, p. 262-267, 2009.

MA, L. *et al.* Altered white matter in cocaine-dependent subjects with traumatic brain injury: A diffusion tensor imaging study. **Drug and Alcohol Dependence,** v. 151, p. 128-134, 2015.

MACCAFERRI, G. Modulation of hippocampal stratum lacunosum-moleculare microcircuits. **The Journal of Physiology,** v. 589, n. Pt 8, p. 1885-1891, 2011.

MAIURI, M. C. *et al.* Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology,** v. 8, n. 9, p. 741-752, 2007.

MARINO, G. *et al.* Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. **Nature Revews. Molecular Cell Biology,** v. 15, n. 2, p. 81-94, 2014.

MARTIN, S. J.; HENRY, C. M. Distinguishing between apoptosis, necrosis, necroptosis and other cell death modalities. **Methods,** v. 61, n. 2, p. 87-89, 2013.

MATTIOLO, P. *et al.* Autophagy exacerbates caspase-dependent apoptotic cell death after short times of starvation. **Biochemical Pharmacology,** v. 98, n. 4, p. 573-586, 2015.

McEWEN, B. S. Stress-induced remodeling of hippocampal CA3 pyramidal neurons. **Brain Research,** v. 1645, n. Supplement C, p. 50-54, 2016/08/15/ 2016.

McQUISTON, A. R. Acetylcholine release and inhibitory interneuron activity in hippocampal CA1. **Frontiers in Synaptic Neuroscience,** v. 6, p. 20, 2014.

MELINO, G. The Sirens' song. **Nature,** v. 412, n. 6842, p. 23-23, 2001.

MIN, M. O. *et al.* Effects of prenatal cocaine exposure on early sexual behavior: Gender difference in externalizing behavior as a mediator. **Drug and Alcohol Dependence,** v. 153, p. 59-65, 2015.

MITCHELL, E. S.; SNYDER-KELLER, A. Blockade of D1 dopaminergic transmission alleviates c-fos induction and cleaved caspase-3 expression in the brains of rat pups exposed to prenatal cocaine or perinatal asphyxia. **Experimental Neurology,** v. 182, n. 1, p. 64-74, 2003.

MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORIM, T.; LEVINE, B. Methods in mammalian autophagy research. **Cell,** v. 140, n. 3, p. 313-326, 2010.

MORENO, E. *et al.* Cocaine Disrupts Histamine H(3) Receptor Modulation of Dopamine D(1) Receptor Signaling: σ(1)-D(1)-H(3) Receptor Complexes as Key Targets for Reducing Cocaine's Effects. **The Journal of Neuroscience,** v. 34, n. 10, p. 3545-3558, 2014.

MORTON, W. A. Cocaine and Psychiatric Symptoms. **Primary Care Companion to The Journal of Clinical Psychiatry,** v. 1, n. 4, p. 109-113, 1999.

MULLEN, R. J.; BUCK, C. R.; SMITH, A. M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. **Development,** v. 116, n. 1, p. 201-211, 1992.

MURAKAMI, Y. *et al.* Programmed necrosis, not apoptosis, is a key mediator of cell loss and DAMP-mediated inflammation in dsRNA-induced retinal degeneration. **Cell Death and Differentiation,** v. 21, n. 2, p. 270-277, 2014.

NAKAHARA, Y.; ISHIGAMI, A. Inhalation Efficiency of Free-Base Cocaine by Pyrolysis of ‘Crack’ and Cocaine Hydrochloride. **Journal of Analytical Toxicology,** v. 15, n. 3, p. 105-109, 1991.

NIKOLETOPOULOU, V. *et al.* Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research,** v. 1833, n. 12, p. 3448-3459, 2013.

O'MARA, S. M. *et al.* The subiculum: a review of form, physiology and function. **Progress in Neurobiology,** v. 64, n. 2, p. 129-155, 2001.

O'NEILL, B.; TILLEY, M. R.; GU, H. H. Cocaine produces conditioned place aversion in mice with a cocaine insensitive dopamine transporter. **Genes, brain, and behavior,** v. 12, n. 1, p. 34-38, 2013.

OLIVEIRA, M. T. *et al.* Drugs of Abuse Induce Apoptotic Features in PC12 Cells. **Annals of the New York Academy of Sciences,** v. 1010, n. 1, p. 667-670, 2003.

ORAL, O. *et al.* Cleavage of Atg3 protein by caspase-8 regulates autophagy during receptor-activated cell death. **Apoptosis,** v. 17, n. 8, p. 810-820, 2012.

ORRENIUS, S.; GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 460, n. 1, p. 72-81, 2015.

OYEDOTUN, K. S.; LEMIRE, B. D. The Quaternary Structure of the Saccharomyces cerevisiae Succinate Dehydrogenase: Homology modeling, cofactor docking, and molecular dynamics simulation studies. **Journal of Biological Chemistry,** v. 279, n. 10, p. 9424-9431, 2004.

PAQUETTE, C. *et al.* Predictors of crack cocaine initiation among Montréal street youth: A first look at the phenomenon. **Drug & Alcohol Dependence,** v. 110, n. 1, p. 85-91, 2010.

PENG, Z. *et al.* Resilience of death: intrinsic disorder in proteins involved in the programmed cell death. **Cell death and differentiation,** v. 20, n. 9, p. 1257-1267, 2013.

PEREZ-REYES, M. *et al.* Free-base cocaine smoking. **Clinical Pharmacology & Therapeutics,** v. 32, n. 4, p. 459-465, 1982.

PEREZ, M. F. *et al.* Different chronic cocaine administration protocols induce changes on dentate gyrus plasticity and hippocampal dependent behavior. **Synapse,** v. 64, n. 10, p. 742-753, 2010.

PICCIOTTO, M. R.; HIGLEY, M. J.; MINEUR, Y. S. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. **Neuron,** v. 76, n. 1, p. 116-129, 2012.

POON, H. F. et al. Cocaine-induced oxidative stress precedes cell death in human neuronal progenitor cells. **Neurochemistry International**, v. 50, n. 1, p. 69-73, 2007.

PORTER, A.; JANICKE, R. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. **Cell Death Differentiation,** v. 6, n. 2, p. 99-104, 1999.

QUINN, D. I.; WODAK, A.; DAY, R. O. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Principles of Illicit Drug Use and Treatment of Illicit Drug Users. **Clinical Pharmacokinetics,** v. 33, n. 5, p. 344-400, 1997.

RANGEL-BARAJAS, C.; CORONEL, I.; FLORÁN, B. Dopamine Receptors and Neurodegeneration. **Aging and Disease,** v. 6, n. 5, p. 349-368, 2015.

REN, H. *et al.* Cocaine induced cortical microischemia in the rodent brain: Clinical implications. **Molecular psychiatry,** v. 17, n. 10, p. 1017-1025, 2012.

REYNOLDS, A. S. The deaths of a cell: How language and metaphor influence the science of cell death. **Studies in History and Philosophy of Science.** Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences**,** v. 48, Part B, p. 175-184, 2014.

ROBBINS, E.; MARCUS, P. I. Dynamics of acridine orange - cell interaction. **Journal of Cell Biology,** v. 18, n. 2, p. 237-250, 1963.

RONCERO, C. *et al.* Cocaine-induced Psychosis and Brain-derived Neurothrophic Factor in Patients with Cocaine Dependence: Report of Two Cases. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience,** v. 14, n. 1, p. 109-113, 2016.

SAFA, A. R. c-FLIP, a master anti-apoptotic regulator. **Exp Oncol,** v. 34, n. 3, p. 176-184, 2012.

SÁNCHEZ, C.; DíAZ-NIDO, J.; AVILA, J. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. **Progress in Neurobiology,** v. 61, n. 2, p. 133-168, 2000/06/01/ 2000.

SCHEFFER, M.; PASA, G. G.; ALMEIDA, R. M. M. D. Dependência de álcool, cocaína e crack e transtornos psiquiátricos. **Psicologia: Teoria e Pesquisa,** v. 26, p. 533-541, 2010.

SCHEIDWEILER, K. B. *et al.* Stability of Methylecgonidine and Ecgonidine in Sheep Plasma in Vitro. **Clinical Chemistry,** v. 46, n. 11, p. 1787-1795, 2000.

SCHEIDWEILER, K. B. *et al.* Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Methylecgonidine, a Crack Cocaine Pyrolyzate. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,** v. 307, n. 3, p. 1179-1187, 2003.

SCHULER, M. *et al.* p53 triggers apoptosis in oncogene-expressing fibroblasts by the induction of Noxa and mitochondrial Bax translocation. **Cell Death Differentiation,** v. 10, n. 4, p. 451-460, 2003.

SCHWEICHEL, J. U.; MERKER, H. J. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. **Teratology,** v. 7, n. 3, p. 253-266, 1973.

SHARKEY, J. *et al.* Cocaine inhibits muscarinic cholinergic receptors in heart and brain. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,** v. 246, n. 3, p. 1048-1052, September 1, 1988 1988.

SHIH, Y.-T. *et al.* Arecoline, a major alkaloid of the areca nut, causes neurotoxicity through enhancement of oxidative stress and suppression of the antioxidant protective system. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 49, n. 10, p. 1471-1479, 2010.

SHORE, G. C.; NGUYEN, M. Bcl-2 Proteins and Apoptosis: Choose Your Partner. **Cell,** v. 135, n. 6, p. 1004-1006, 2008.

SIMS, J. T.; PLATTNER, R. MTT ASSAYS CANNOT BE UTILIZED TO STUDY THE EFFECTS OF STI571/GLEEVEC ON THE VIABILITY OF SOLID TUMOR CELL LINES. **Cancer chemotherapy and pharmacology,** v. 64, n. 3, p. 629-633, 2009.

ŠIŠKOVÁ, Z. *et al.* Dendritic structural degeneration is functionally linked to cellular hyperexcitability in a mouse model of Alzheimer disease. **Neuron,** v. 84, n. 5, p. 1023-1033, 2014.

SMART, R. G. Crack cocaine use: A review of prevalence and adverse effects. **American Journal of Drug Alcohol Abuse,** v. 17, n. 1, p. 13-26, 1991.

SO, E. C. *et al.* Arecoline inhibits intermediate-conductance calcium-activated potassium channels in human glioblastoma cell lines. **European Journal of Pharmacology,** v. 758, p. 177-187, 2015.

SOLTANI, M. H. *et al.* Microtubule-Associated Protein 2, a Marker of Neuronal Differentiation, Induces Mitotic Defects, Inhibits Growth of Melanoma Cells, and Predicts Metastatic Potential of Cutaneous Melanoma. **The American Journal of Pathology,** v. 166, n. 6, p. 1841-1850, 2005.

SOUSA, N. *et al.* Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. **Neuroscience,** v. 97, n. 2, p. 253-266, 2000.

SPENCER, SABRINA L.; SORGER, PETER K. Measuring and Modeling Apoptosis in Single Cells. **Cell,** v. 144, n. 6, p. 926-939, 2011a.

SPRONK, D. B. *et al.* Characterizing the cognitive effects of cocaine: A comprehensive review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews,** v. 37, n. 8, p. 1838-1859, 2013.

SRIDHAR, S. *et al.* Autophagy and disease: always two sides to a problem. **The Journal of Pathology,** v. 226, n. 2, p. 255-273, 2012.

SRIKRISHNA, G.; FREEZE, H. H. Endogenous Damage-Associated Molecular Pattern Molecules at the Crossroads of Inflammation and Cancer. **Neoplasia,** v. 11, n. 7, p. 615-628, 2009.

STEWART, D. J. *et al.* Hydrolysis of cocaine in human plasma by cholinesterase. **Life Sciences,** v. 20, n. 9, p. 1557-1563, 1977.

STOKA, V.; TURK, V.; TURK, B. Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration. **Ageing Research Reviews,** v. 32, n. Supplement C, p. 22-37, 2016/12/01/ 2016.

SU, J. *et al.* Cocaine induces apoptosis in cerebral vascular muscle cells: potential roles in strokes and brain damage. **European Journal of Pharmacology,** v. 482, n. 1, p. 61-66, 2003/12/15/ 2003.

SUDAI, E. *et al.* High cocaine dosage decreases neurogenesis in the hippocampus and impairs working memory. **Addiction Biology,** v. 16, n. 2, p. 251-260, 2011.

SZEGEZDI, E. *et al.* Bcl-2 family on guard at the ER. **American Journal of Physiology - Cell Physiology,** v. 296, n. 5, p. C941-C953, 2009.

TAIT, S. W. G. *et al.* Resistance to Caspase-Independent Cell Death Requires Persistence of Intact Mitochondria. **Developmental Cell,** v. 18, n. 5, p. 802-813, 2010.

TAUPIN, P. **The hippocampus: Neurotransmission and plasticity in the nervous system**. New York: Nova Biomedical Books. 2007. 144p.

TELES-GRILO RUIVO, L. M.; MELLOR, J. R. Cholinergic modulation of hippocampal network function. **Frontiers in Synaptic Neuroscience,** v. 5, p. 2, 2013.

TERRY JR, A. V. *et al.* Alpha 2A adrenergic receptor agonist, guanfacine, attenuates cocaine-related impairments of inhibitory response control and working memory in animal models. **Pharmacology Biochemistry and Behavior,** v. 126, p. 63-72, 2014.

THOMÉ, M. P. *et al.* Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. **Journal of Cell Science,** v. 129, n. 24, p. 4622, 2016.

TILSON, H. A. Neurotoxicology in the 1990s. **Neurotoxicology and Teratology,** v. 12, n. 4, p. 293-300, 1990.

TIWARI, P. *et al.* Basic and modern concepts on cholinergic receptor: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease,** v. 3, n. 5, p. 413-420, 2013.

TOENNES, S. W. *et al.* Artifact production in the assay of anhydroecgonine methyl ester in serum using gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B,** v. 792, n. 2, p. 345-351, 2003.

TRAN, S.-L. *et al.* Trypan Blue Dye Enters Viable Cells Incubated with the Pore-Forming Toxin HlyII of Bacillus cereus. **PLoS ONE,** v. 6, n. 9, p. e22876, 2011.

UNODC. **World Drug Report 2016**. United Nations publication, Sales No E.16.XI.7. New York: United Nation. 2016. 107p.

UNODC. **World Drug Report 2017. Book 2**. United Nation Publication. Sales No E.17.XI.6. New York: United Nation. 2017a. 67p.

UNODC. **World Drug Report 2017. Book 3**. United Nation Publication. Sales No. E.17. XI.9. New York: United Nation. 2017b. 66p.

VAN WELIE, I. *et al.* Different levels of I(h) determine distinct temporal integration in bursting and regular-spiking neurons in rat subiculum. **The Journal of Physiology,** v. 576, n. Pt 1, p. 203-214, 2006.

VANLANGENAKKER, N. *et al.* Molecular Mechanisms and Pathophysiology of Necrotic Cell Death. **Current Molecular Medicine,** v. 8, n. 3, p. 207-220, 2008.

VERBRUGGE, I.; JOHNSTONE, R. W.; SMYTH, M. J. SnapShot: Extrinsic apoptosis pathways. **Cell,** v. 143, n. 7, p. 004, 2010.

VERMES, I. *et al.* A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods,** v. 184, n. 1, p. 39-51, 1995.

VONMOOS, M. *et al.* Cognitive dysfunctions in recreational and dependent cocaine users: role of attention-deficit hyperactivity disorder, craving and early age at onset. **The British Journal of Psychiatry,** v. 203, n. 1, p. 35-43, 2013.

VURAL, F.; CEBESOY, S.; KARAKAS, M. Classification of Cell Death. **Journal of Entomology and Zoology Studies,** v. 1, n. 5, p. 120-126, 2013.

VYAS, A. *et al.* Chronic Stress Induces Contrasting Patterns of Dendritic Remodeling in Hippocampal and Amygdaloid Neurons. **The Journal of Neuroscience,** v. 22, n. 15, p. 6810, 2002.

WATANABE, Y.; GOULD, E.; MCEWEN, B. S. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. **Brain Research,** v. 588, n. 2, p. 341-345, 1992/08/21/ 1992.

WEN, S. *et al.* Androgen receptor (AR) positive vs negative roles in prostate cancer cell deaths including apoptosis, anoikis, entosis, necrosis and autophagic cell death. **Cancer Treatment Reviews,** v. 40, n. 1, p. 31-40, 2014.

WERB, D. *et al.* MODELLING CRACK COCAINE USE TRENDS OVER 10 YEARS IN A CANADIAN SETTING. **Drug and alcohol review,** v. 29, n. 3, p. 271-277, 2010.

WHEELER, D. W. *et al.* Hippocampome.org: a knowledge base of neuron types in the rodent hippocampus. **eLife,** v. 4, p. 1-28, 2015.

WONNACOTT, S.; GALLAGHER, T. The chemistry and pharmacology of anatoxin-a and related homotropanes with respect to nicotinic acetylcholine receptors. **Marine Drugs,** v. 4, n. 3, p. 228-254, 2006.

WOOLF, J. H. *et al.* Negative inotropic effect of methylecgonidine, a major product of cocaine base pyrolysis, on ferret and human myocardium. **Journal of Cardiovascular Pharmacology,** v. 30, n. 3, p. 352-359, 1997.

XIE, X.; WELLS, A. M.; FUCHS, R. A. Cocaine Seeking and Taking: Role of Hippocampal Dopamine D1-like Receptors. **The international journal of neuropsychopharmacology,** v. 17, n. 9, p. 1533-1538, 2014.

XU, W. *et al.* Distinct Neuronal Coding Schemes in Memory Revealed by Selective Erasure of Fast Synchronous Synaptic Transmission. **Neuron,** v. 73, n. 5, p. 990-1001, 2012.

YANG, Y. *et al.* Evidence for cocaine and methylecgonidine stimulation of M2 muscarinic receptors in cultured human embryonic lung cells. **British Journal of Pharmacology,** v. 132, n. 2, p. 451-460, 2001.

YOUSEFI, S. *et al.* Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. **Nature Cell Biology,** v. 8, n. 10, p. 1124-1132, 2006.

ZAJA-MILATOVIC, S. *et al.* Dendritic degeneration in neostriatal medium spiny neurons in Parkinson disease. **Neurology,** v. 64, p. 545-547, 2005.

ZEMLA, R.; BASU, J. Hippocampal function in rodents. **Current opinion in neurobiology,** v. 43, n. Supplement C, p. 187-197, 2017.

ZENÓN, F. *et al.* Cocaine potentiates cathepsin B secretion and neuronal apoptosis from HIV-infected macrophages. **Journal of neuroimmune pharmacology,** v. 9, n. 5, p. 703-715, 2014.

ZHANG, X. F.; HU, X. T.; WHITE, F. J. Whole-cell plasticity in cocaine withdrawal: reduced sodium currents in nucleus accumbens neurons. **The Journal of neuroscience,** v. 18, n. 1, p. 488-498, 1998.

ZHANG, Y. *et al.* Tousled-like kinase mediated a new type of cell death pathway in Drosophila. **Cell Death Differ,** v. 23, n. 1, p. 146-157, 2016.

ZHAO, Q. *et al.* Prenatal cocaine exposure impairs cognitive function of progeny via insulin growth factor II epigenetic regulation. **Neurobiology of Disease,** v. 82, p. 54-65, 2015.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética para o uso de animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo - USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF **100**.2014

CIÊNCIA

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em 10/10/2014, tomou ciência do projeto de pesquisa **Neurotoxicidade da metil ester anidroecgonina in vitro: caracterização da via de ativação da apoptose e o envolvimento do processo autofágico**, vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, que tem aprovação prévia do(a) Comitê de Ética em Pesquisa do(a) **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo** (conforme registro CEUA/FMVZ/USP nº 5737050814), em 17/09/2014.

Orientador(a): **Profa. Dra. Tania Marcourakis**
Pesquisador(a): **Mariana Sayuri Berto Udo**

São Paulo, 15 de setembro de 2014.

Prof. Dr. Jolson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Cidade Universitária, CEP 05508-900, São Paulo, SP
Telefone: (11) 3091-3622 - e-mail: ceuafcf@usp.br

ANEXO B – Certificado do Comitê de Ética para o uso de animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo – USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 22 de setembro de 2014
CEUA N 5737050814

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a): Profa Dra Tania Marcourakis
Executante: Mariana Sayuri Berto Udo
Depto/Disc: Análises Clínicas E Toxicológicas
Pesquisadores associados: Prof Dra Helenice De Souza Spinosa (dep. Patologia - Fmvz/usp); Profa Dra Tania Marcourakis (orientador)

Título do projeto: "Neurotoxicidade da metil ester anidroecgonina in vitro: caracterização da via de morte por apoptose e o envolvimento do processo autofágico".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

Projeto de doutorado que objetiva estudar, em cultura primária de neurônios de ratos, a via de ativação da apoptose celular, decorrente da exposição à cocaina, AEME (produto de pirólise do crack) e a associação de ambas.

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 17/09/2014, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.
1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Etica no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária: Armando de Salles Oliveira CEP 05508-270 São Paulo/SP - Brasil - tel: 55 (11) 3091-7676/0904 / fax: 55 (11) 3032-2224
Horário de atendimento: das 8h as 17h : e-mail:ceuavet@usp.br
CEUA Nº 5737050814

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 22 de setembro de 2014

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Neurotoxicidade da metil ester anidroecgonina in vitro: caracterização da via de morte por apoptose e o envolvimento do processo autofágico", protocolado sob o CEUA nº 5737050814, utilizando 160 Ratos heterogênicos (40 machos e 120 femeas), sob a responsabilidade de Profa Dra Tania Marcourakis, foi aprovado na reunião de 17/09/2014, e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Methyl esther anydroecgonine neurotoxicity in vitro: apoptosis death pathway caracterization and the autophagic process involvent", protocol number CEUA 5737050814, utilizing 160 Heterogenics rats (40 males and 120 females), under the responsibility Profa Dra Tania Marcourakis, was approved in the meeting of day 09/17/2014, and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

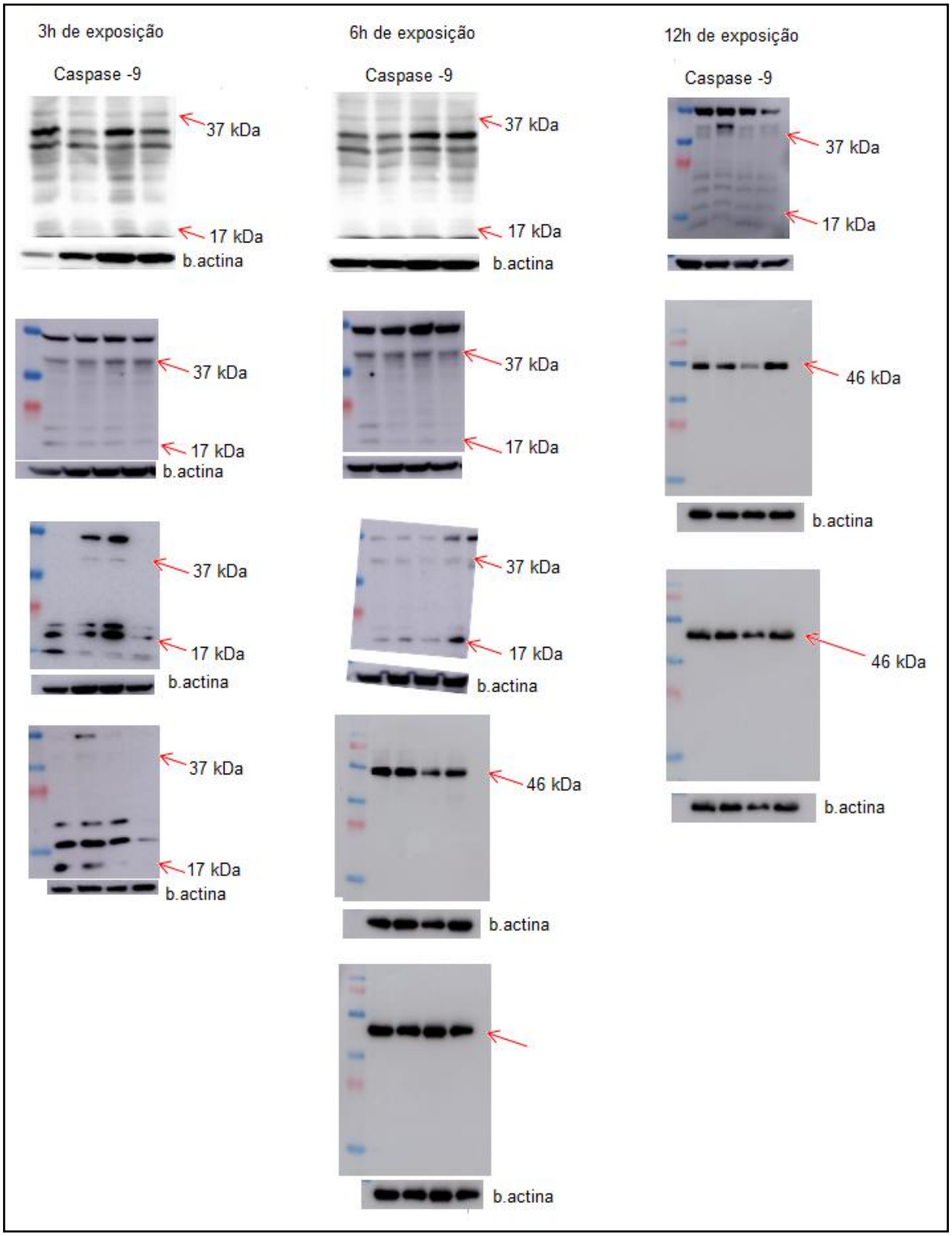
Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

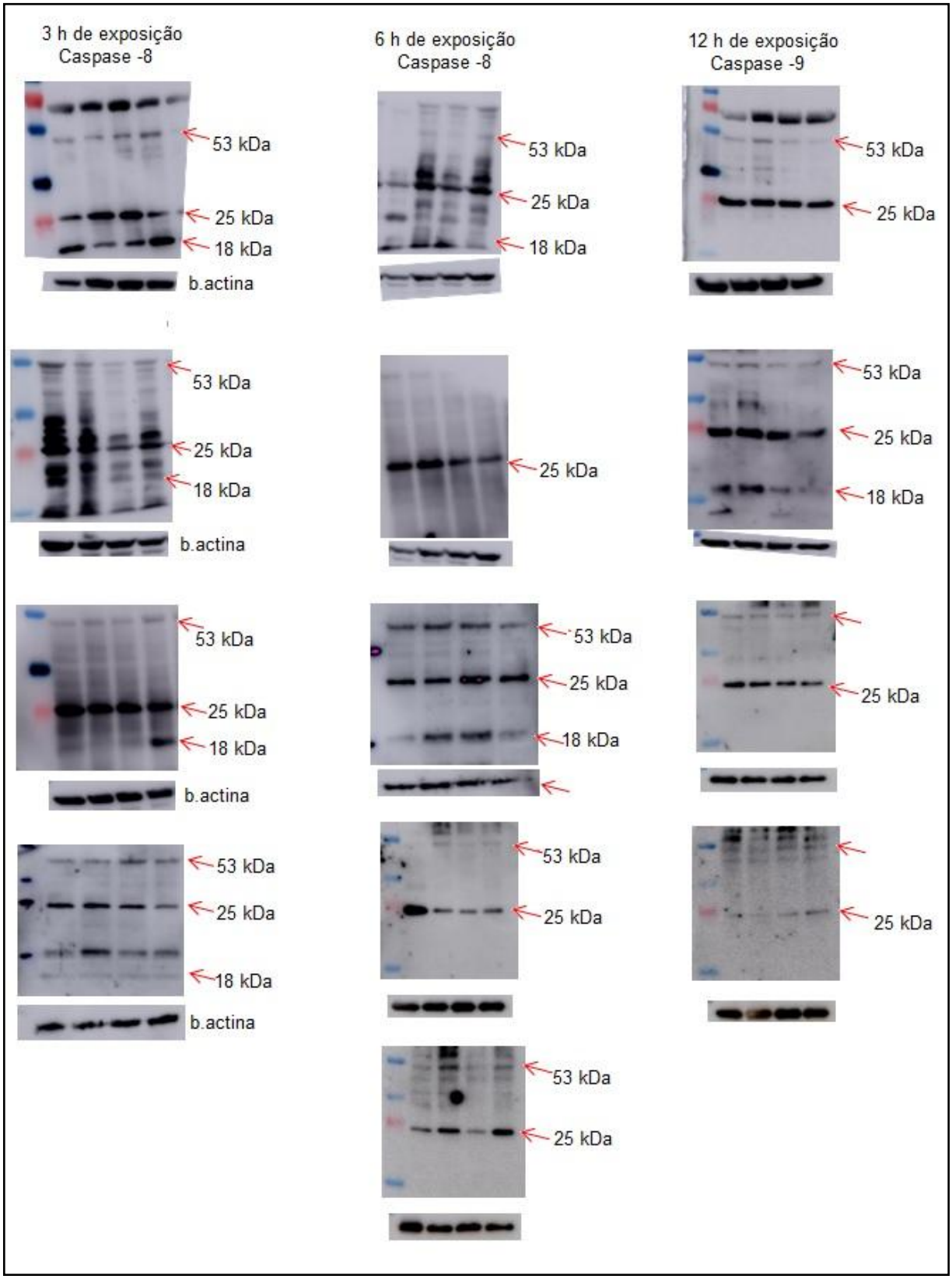
Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária: Armando de Salles Oliveira CEP 05508-270 São Paulo/SP - Brasil - tel: 55 (11) 3091-7676/0904 / fax: 55 (11) 3032-2224
Horário de atendimento: das 8h as 17h : e-mail:ceuavet@usp.br
CEUA Nº 5737050814

ANEXO C – Membranas inteiras de Western blotting dos resultados das caspases

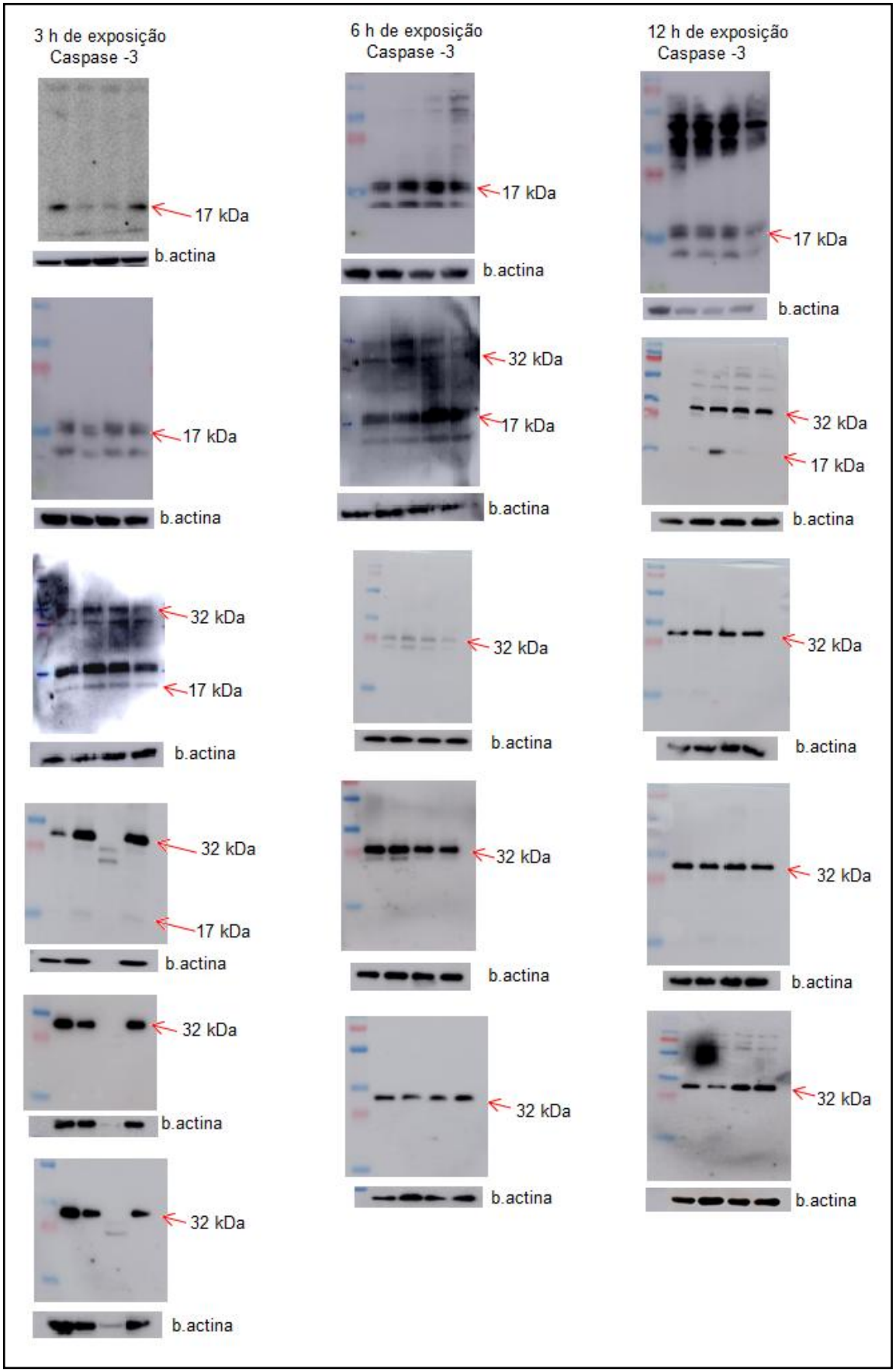
Membranas de caspase -9



Membranas de caspase -8

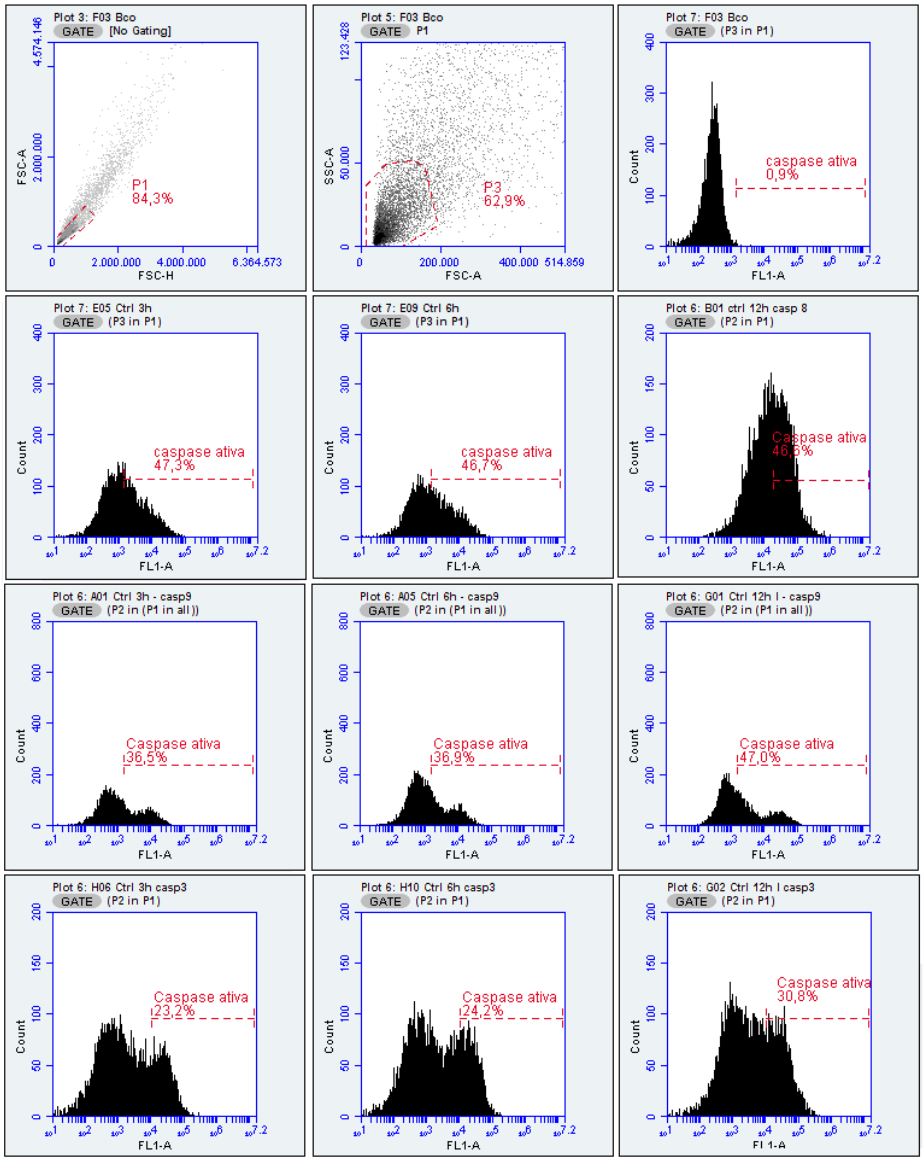


Membranas de caspase -3



ANEXO D - Estratégias de *Gates* nas análises de citometria de fluxo

Para caspases



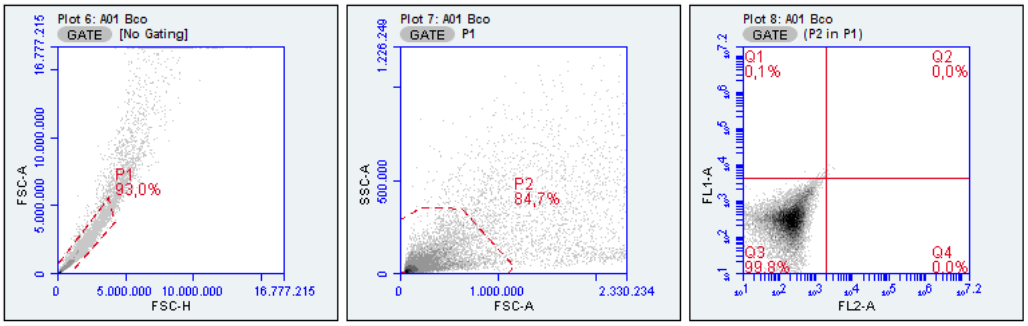
Estratégia de *Gate*
Amostra branco (Bco):
Sem tratamento e sem marcação

Amostras do grupo controle
Caspase-8 em 3, 6 e 12h

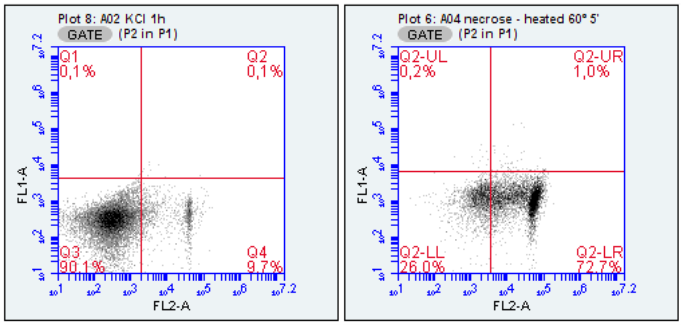
Amostras do grupo controle
Caspase-9 em 3, 6 e 12h

Amostras do grupo controle
Caspase-3 em 3, 6 e 12h

Para Anexina V / PI

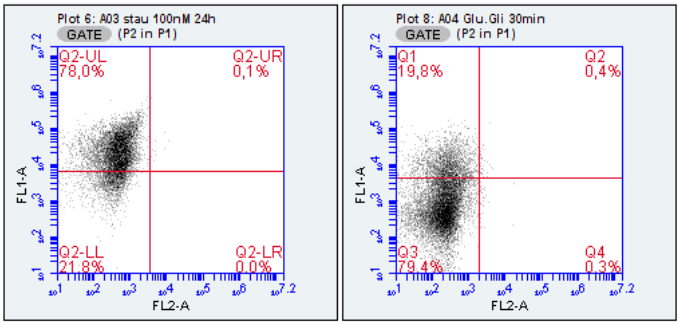


Gate no calibrador Branco sem tratamento e sem marcação



Calibradores controle positivo de necrose

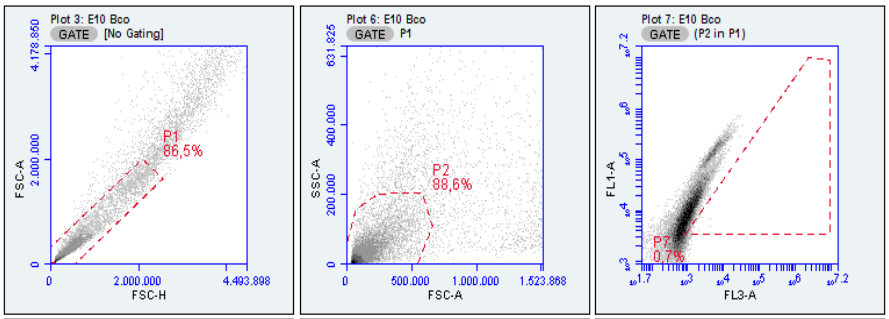
KCl 50µM por 1h e aquecimento por 5min à 60ºC



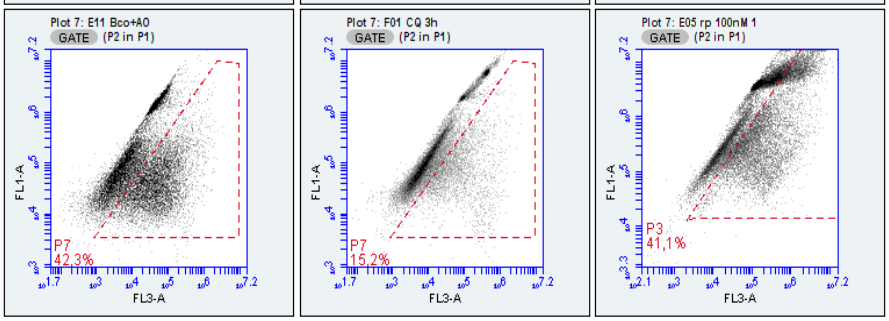
Calibradores controle positivo de apoptose

Staurosporina 100nM por 24h e 25µM de glicina + 50µM de glutamato por 30min

Para Laranja de acridina



Gate no branco Sem tratamento e sem marcação



Controles:

1) Branco + laranja de acridina (1µg/mL) por 15min
2) 40µM de cloroquina por 3h – inibidor de autofagia
3) 100nM de Rapamicina por 12h – indutor autofágico

ANEXO E – FICHA DO ALUNO

31/10/2017

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 7080688/2 - Mariana Sayuri Berto Udo

Email:	sayuri.udo@usp.br
Data de Nascimento:	24/02/1984
Cédula de Identidade:	RG - 44.030.366-7 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutica - Universidade Metodista de Piracicaba - São Paulo - Brasil - 2007
Mestrado:	Mestra em Ciências - Área: Toxicologia e Análises Toxicológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2012

Curso:	Doutorado
Programa:	Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula:	06/09/2013
Início da Contagem de Prazo:	06/09/2013
Data Limite para o Depósito:	04/01/2018
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Tania Marcourakis - 06/09/2013 até o presente. Email: tmarcour@usp.br
Co-orientador:	Prof(a). Dr(a). Silvya Stuchi Maria Engler - 11/03/2015 até o presente. Email: silvya@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 06/09/2013
Prorrogação(ões):	120 dias Período de 06/09/2017 até 04/01/2018
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Reprovado em 29/10/2015 / Aprovado em 09/03/2016
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 06/09/2013 Prorrogação em 25/08/2017

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).
Última ocorrência: Prorrogação em 25/08/2017
Impresso em: 31/10/2017 14:11:27

31/10/2017

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 7080688/2 - Mariana Sayuri Berto Udo

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BTC5703-6/1	Biologia Molecular (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	21/10/2013	29/12/2013	90	6	100	A	N	Concluída
NEC5756-1/2	Procedimentos Comportamentais em Neurociências (Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo)	11/03/2014	02/06/2014	120	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5784-3/4	Tópicos Avançados em Toxicologia II	11/03/2014	23/06/2014	15	1	90	A	N	Concluída
BMB5795-4/3	Neurociência Básica (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	24/04/2014	03/07/2014	120	8	100	A	N	Concluída
QBQ5781-7/1	Fundamentos da Citometria de Fluxo – Aplicações em Biologia Celular, Molecular e Bioquímica (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	26/05/2014	01/06/2014	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5818-1/2	Neurotoxicidade Provocada por Xenobióticos e sua Relação com Doenças Neurodegenerativas	29/09/2014	02/11/2014	45	3	100	A	N	Concluída
BMF5862-4/1	Ciclo Celular e Apoptose (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	03/11/2014	23/11/2014	90	6	90	A	N	Concluída
BIO5791-1/3	Tráfego Intracelular e Neurodegeneração (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	30/03/2015	10/05/2015	90	6	90	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	10	20	32
Estágios:			
Total:	10	20	32

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Prorrogação em 25/08/2017
Impresso em: 31/10/2017 14:11:27

31/10/2017

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 7080688/2 - Mariana Sayuri Berto Udo

Comissão julgadora da tese de doutorado:

NUSP	Nome	Vínculo	Função
1754705	Tania Marcourakis	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Prorrogação em 25/08/2017
Impresso em: 31/10/2017 14:11:27