UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Efeitos neurodegenerativos da metilecgonidina e da cocaína em cultura celular primária de hipocampo

Raphael Caio Tamborelli Garcia

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Tania Marcourakis

São Paulo
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Efeitos neurodegenerativos da metilecgonidina e da cocaína em cultura celular primária de hipocampo

Raphael Caio Tamborelli Garcia

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Tania Marcourakis

São Paulo
2009

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Garcia, Raphael Caio Tamborelli
G216e Efeitos neurodegenerativos da metilecgonidina e da cocaína em cultura celular primária de hipocampo / Raphael Caio Tamborelli Garcia. -- São Paulo, 2009.
140p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Marcourakis, Tania

1. Toxicologia social 2. Estresse oxidativo : Toxicologia 3. Xenobiótico : Toxicologia I. T. II. Marcourakis, Tania, orientador.

615.9 CDD

Raphael Caio Tamborelli Garcia

Efeitos neurodegenerativos da metilecgonidina e da cocaína em cultura celular primária de hipocampo

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

_____
Profa. Dra. Tania Marcourakis
orientador/presidente

_____

1º. examinador

_____

2º. examinador

São Paulo, 28 de Setembro de 2009.

À minha querida e eterna avó ***Therezinha Martins Tamborelli***,
minha segunda **mãe**,
pelo amor, carinho e criação,
por ter me incentivado a nunca desistir dos meus sonhos,
por me encorajar em diversas situações,
por me ensinar o verdadeiro valor das palavras
respeito, **humildade**, **integridade**, **generosidade** e **determinação**,
e por toda a dedicação prestada durante toda a minha vida,
inclusive na minha graduação.

À minha mãe ***Claucineia Tamborelli Garcia***,
ao meu avô ***Antonio Tamborelli***
e ao meu pai ***Odair de Jesus Garcia***
por todo apoio e confiança,
e por acreditar na minha capacidade.

À minha irmã e meu ídolo,
Roberta Cássia Tamborelli Garcia Lessa,
por todo carinho, suporte e amizade,
e pelos bons momentos,
e ao meu cunhado ***Djalma Roque Lessa***,
o terceiro irmão que não tive.

À Profa. Dra. ***Tania Marcourakis***
pela amizade, orientação e paciência,
e por ter despertado em mim um grande interesse
pela neurotoxicologia.

Keep smiling, keep shining
Knowing you can always count on me for sure
That's what friends are for
For good times, and bad times
I'll be on your side forever more
That's what friends are for
Burt Bacharach & Carole Bayer Sager

When you think you have had enough of this life, well, hang on
R.E.M.

Agradecimentos

A Deus pela minha vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela bolsa concedida.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa, CNPq, pelo auxílio financeiro.

Ao Prof. Dr. Mauricio Yonamine pela colaboração e ajuda na obtenção de cocaína do Instituto de Criminalística de São Paulo.

À Dra. Maria Regina Lopes Sandoval e à Dra. Solange Castro Afeche do Instituto Butantan pela colaboração e parceria.

À Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro pelo auxílio na realização dos ensaios de formação de adutos com DNA.

Ao Dr. Sidnei Moura pela colaboração na síntese da AEME.

À aluna de graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas Suelen Fukuda pela parceria e amizade.

À aluna de pós-graduação do nosso grupo de pesquisa, Larissa Helena Lobo Torres, pela imensa colaboração e grande amizade.

À aluna Marli Roehsig do Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas pela amizade e companheirismo durante alguns cursos da Pós e também durante o PAE.

Ao aluno de pós-graduação do Prof. Dr. Rui Curi, Jarlei Fiamoncini, pela ajuda no ensaio de determinação da atividade da LDH.

À MSc. Cecília Café pela grande contribuição e amizade.

Aos alunos da Profa. Dra. Tania e membros da equipe *Neurotóxica*: Lívia, Wallace, Nathália, Gisele, Ana Carolina e Cristiane pelo constante apoio e amizade.

Ao pessoal do laboratório de Farmaco do Instituto Butantan: Nathália, Cássia, Daniel, Danielle, Mariana, Rodrigo, Lívia e Maria Cecília pela amizade e constante troca de informações.

Aos alunos da Dra. Catarina Teixeira do laboratório de Farmaco do Instituto Butantan por permitir a utilização do espectrofotômetro nos ensaios de MTT.

Aos funcionários, ex-funcionários e estagiários do LAT: Daniela Mendes, Carmen, Beatriz, Deise, Daniela e Felipe pelo apoio e amizade.

Aos alunos do Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas pela troca de informações e amizade conquistada.

Aos professores da Tóxico, especialmente à Profa. Dra. Elizabeth Nascimento, pelo auxílio na interpretação de alguns resultados.

Finalmente, mas não menos importante, aos funcionários da Tóxico, especialmente à Helena, Luzia, Dalva, Roseli e Ângelo, por todo o suporte durante a confecção do mestrado.

Índice de Figuras

Figura 1	Prevalência (em %) da utilização de drogas de abuso no Brasil em 2001 e 2005	**3**
Figura 2	Fluxograma do método de obtenção do cloridrato de cocaína e do *crack*	**6**
Figura 3	Decomposição térmica (pirólise) da cocaína	**7**
Figura 4	Produtos de biotransformação da cocaína	**10**
Figura 5	Produtos de biotransformação da AEME	**12**
Figura 6	Semelhança estrutural entre AEME, arecolina e anatoxina-A	**14**
Figura 7	Esquema ilustrativo da geração de estresse oxidativo a partir de um xenobiótico	**23**
Figura 8	Esquema ilustrando o processo de peroxidação lipídica	**26**
Figura 9	Formação de adutos com bases de DNA	**28**
Figura 10	Confirmação estrutural da AEME	**37**
Figura 11	Reação de redução de MTT à *formazan*	**43**
Figura 12	Padronização do ensaio de MTT	**44**
Figura 13	Percentual de células viáveis em relação ao grupo CTRL após 24 horas de incubação	**45**
Figura 14	Reação enzimática da conversão de piruvato a lactato pela lactato desidrogenase na presença de NADH	**46**
Figura 15	Padronização do ensaio de LDH	**47**
Figura 16	Ensaio para a determinação da atividade enzimática da GPx	**54**
Figura 17	Ensaio para a determinação da atividade enzimática da GR	**56**
Figura 18	Ensaio para a determinação da atividade enzimática da GST	**58**
Figura 19	Foto ilustrativa do ensaio de caracterização celular de cultura primária de hipocampo	**63**
Figura 20	Resultados dos ensaios de MTT	**65**
Figura 21	Resultados dos ensaios de LDH	**66**
Figura 22	Ensaio de MTT após 3, 6, 12, 24 e 48 horas de exposição	**68**
Figura 23	Curva de MTT	**69**
Figura 24	Ensaio de LDH após 24 e 48 horas de exposição	**70**
Figura 25	Resultados da microscopia confocal após 24 horas de exposição	**72**
Figura 26	Resultados da microscopia confocal após 48 horas de exposição	**73**
Figura 27	Formação de adutos com d-G	**74-76**
Figura 28	Formação de adutos com DNA	**77-79**
Figura 29	Atividade enzimática após 3 e 6 horas de exposição	**80**

Figura 30 Formação de MDA após 3, 6, 24 e 48 horas de exposição **82**

Índice de Tabelas

Tabela 1	Apoptose *versus* necrose: distinção morfológica e funcional	**19**
Tabela 2	Apoptose *versus* necrose: alterações bioquímicas	**19**
Tabela 3	Composição da fase móvel durante a análise de formação de adutos com a d-G	**51**
Tabela 4	Exemplo de equações de reta representando o consumo de NADPH durante o ensaio da GPx	**53**
Tabela 5	Exemplo de equações de reta representando o consumo de NADPH durante a padronização do ensaio da GPx	**54**
Tabela 6	Exemplo de equações de reta representando o consumo de NADPH durante a padronização do ensaio da GR	**57**
Tabela 7	Exemplo de equações de reta representando a formação de complexo GS-CDNB durante a padronização do ensaio da GST	**59**
Tabela 8	Atividade enzimática da GPx, GR e GST	**81**
Tabela 9	Produção de MDA após 3, 6, 24 e 48 horas de exposição	**82**

Lista de Anexos

Anexo 1 Protocolo n° 142 aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Anexo 2 Protocolo n° 372/07 aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan

Sumário

Resumo **i**

Abstract **iii**

1. Introdução **1**

1.1. Drogas de Abuso **2**

1.2. Cocaína **3**

1.3. Vias de Administração **5**

1.4. Metilecgonidina ou Anidroecgonina Metil Éster (AEME) **6**

1.5. Toxicocinética do *CRACK* **7**

1.5.1. Absorção **7**

1.5.2. Distribuição, Biotransformação e Eliminação **8**

1.6. Toxicodinâmica do *CRACK* **12**

1.7. *CRACK*: Efeitos no SNC e Dependência **15**

1.8. Efeitos da Cocaína/*CRACK* nas Funções Cognitivas **16**

1.9. Neurodegeneração e Cocaína **18**

1.9.1. Mecanismos de Morte Celular **18**

1.9.2. Dano Oxidativo e Cocaína **23**

1.9.3. Cultura Primária de Hipocampo como Modelo de Avaliação da Neurotoxicidade **28**

2. Objetivo **32**

3. Materiais e Métodos **34**

3.1. Equipamentos Utilizados **35**

3.2. Síntese da AEME **35**

3.3. Cultura Primária de Hipocampo **38**

3.3.1. Caracterização Celular da Cultura **41**

3.4. Ensaios de Viabilidade Celular e Morfologia **42**

3.4.1. Determinação da Viabilidade Celular (MTT) **43**

3.4.2. Determinação da Citotoxicidade (LDH) **45**

3.4.3. Microscopia de Fluorescência Confocal **48**

3.5. Avaliação do Dano Oxidativo **49**

3.5.1. Avaliação do Dano em DNA **49**

3.5.1.1. Formação de Adutos com Desoxiguanosina (d-G) **50**

3.5.1.2. Formação de Adutos com DNA **51**

3.5.2. Enzimas Antioxidantes **52**

3.5.2.1. Atividade Enzimática da Glutationa Peroxidase (GPx) **53**

3.5.2.2. Atividade Enzimática da Glutationa Redutase (GR) **56**

3.5.2.3. Atividade Enzimática da Glutationa S-Transferase (GST) **58**
3.5.3. Análise da Geração de Malonaldeído (MDA) **60**
3.5.4. Determinação da Concentração Protéica **61**
3.6. Análise Estatística **61**
4. Resultados **62**
4.1. Caracterização Celular da Cultura **63**
4.2. Ensaios de Viabilidade Celular e Morfologia **64**
4.2.1. Determinação da Viabilidade Celular (MTT) **64**
4.2.2. Determinação da Citotoxicidade (LDH) **65**
4.2.3. Associação entre Cocaína e AEME: MTT e LDH **67**
4.2.4. Microscopia de Fluorescência Confocal **70**
4.3. Avaliação do Dano Oxidativo **74**
4.3.1. Avaliação do Dano em DNA **74**
4.3.1.1. Formação de Adutos com Desoxiguanosina (d-G) **74**
4.3.1.2. Formação de Adutos com DNA **77**
4.3.2. Enzimas Antioxidantes **80**
4.3.3. Análise da Geração de Malonaldeído (MDA) **81**
5. Discussão **83**
6. Conclusão **96**
7. Referência Bibliográfica **98**

RESUMO

O uso da cocaína na forma de *crack* vem crescendo nos últimos anos quando comparado às demais vias de administração. Contribuem para esse fato a obtenção quase imediata de efeitos e a maior facilidade de uso, que dispensa a necessidade de material injetável. O usuário de *crack* sofre os efeitos não só da cocaína, mas também de seu produto de pirólise, a metilecgonidina (AEME). Existem evidências de que a cocaína leva à neurodegeneração, entretanto a participação da AEME nesse processo ainda não foi estudada. A proposta deste estudo foi investigar a participação da AEME no processo neurodegenerativo utilizando cultura primária de hipocampo realizada a partir de fetos de ratos. Foram realizados ensaios de viabilidade celular (MTT) e da atividade da lactato desidrogenase (LDH), além da avaliação morfológica por microscopia de fluorescência. Foi estudada também a participação do dano oxidativo no processo de neurodegeneração, como a formação de aduto de DNA; atividade das enzimas antioxidantes glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase (GR) e glutationa S-transferase (GST); e a produção de malonaldeído (MDA), um biomarcador de peroxidação lipídica. Tanto a cocaína quanto a AEME mostraram-se neurotóxicas. A partir dos ensaios de viabilidade e da avaliação morfológica foi possível inferir que, em células hipocampais, a cocaína leva à morte celular tanto por necrose quanto por apoptose e que a provável via envolvida na neurodegeneração da AEME é a apoptose. A AEME não causou lesão direta ao DNA, uma vez que não foi observada a formação de adutos nem com a desoxiguanosina (d-G), a base nitrogenada mais reativa, nem com DNA comercial. Mais ainda, nossos resultados mostraram que a AEME e a cocaína, nas concentrações de 1 e 2 mM, respectivamente, foram equipotentes e a incubação concomitante das duas substâncias nessas concentrações apresentou efeito aditivo

após 48 horas de exposição. A morte de células hopocampais evidenciada a partir de 24 horas de exposição foi precedida pela diminuição da atividade da GPx após 3 horas de incubação tanto com a AEME e a cocaína, quanto com a associação entre essas substâncias. A atividade da GST também diminuiu, no entanto, somente após 6 horas de exposição, antecedendo a morte celular. Não foi observada alteração na atividade da GR. Houve um aumento, porém, não estatisticamente significativo, de MDA após 48 horas de incubação. Nossos resultados sugerem uma maior susceptibilidade à neurodegeneração com o uso de *crack* do que com a cocaína isoladamente.

Palavras-chave: *metilecgonidina, produto de pirólise da cocaína, crack, neurotoxicidade, neurodegeneração, cultura primária de hipocampo.*

ABSTRACT

Smoking *crack* has increased in the last years when compared to the other routes of cocaine administration. Its advantage is the quicker and stronger high effects and its ease of use without the need of needles. Smoking *crack* involves inhaling not only cocaine, but also its pyrolysis product, methylecgonidine (AEME). There are evidences that cocaine causes neurodegeneration, but AEME involvement in this process has not been studied yet. The aim of this study was to investigate AEME participation in neurodegeneration using a primary hippocampus culture made from rat fetuses. Cellular viability assays (MTT), lactate dehydrogenase activity (LDH) and morphological evaluations with fluorescence microscopy were performed. The involvement of oxidative injury in the neurodegeneration process was also studied through DNA adduct formation; the evaluation of antioxidants enzymes activities as glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and glutathione S-transferase (GST); and the production of malonaldehyde (MDA), a lipoperoxidation biomarker. Both cocaine and AEME showed neurotoxic effects. Through viability assays and morphologic evaluations we can suggest that, in hippocampal cells, cocaine cell death mechanism involves not only necrosis, but also apoptosis and that AEME pathway involved in neurodegeneration is only apoptosis. AEME did not produce a direct DNA injury, as no DNA adduct was observed with desoxyguanosine (d-G), the most reactive nitrogenous base, nor with commercial DNA. Moreover, our results showed that 1 and 2 mM of AEME and cocaine, respectively, were equipotent and the concomitant incubation of both compounds in those concentrations showed additive effect after 48 hours of exposure. Hippocampal cell death at 24 hours was preceded by a decrease in GPx activity after 3 hours of incubation with AEME, cocaine and association between these two compounds. GST activity also decreased

but only after 6 hours of exposure, also before cell death. There was no alteration in GR activity. There was an increase, although not statistically significant, in MDA after 48 hours of exposure. As smoking *crack* abusers are exposed to both cocaine and AEME, our results suggest a higher susceptibility to neurodegeneration in smoking *crack* than with cocaine alone.

Keywords: *methylecgonidine, cocaine pyrolysis product, crack cocaine, neurotoxicity, neurodegeneration, hippocampal primary culture.*

1. Introdução

1. Introdução

1.1. Drogas de Abuso

A utilização inapropriada de qualquer substância, intencional ou inadvertidamente, pode causar problemas à saúde. Inserido neste contexto estão as drogas de abuso, que são substâncias ou preparação destas utilizadas indiscriminadamente com a finalidade de se obter um efeito prazeroso e/ou estimulante, porém não terapêutico. O uso de drogas de abuso é considerado um problema de saúde pública, afetando não só o indivíduo que as utiliza, mas também a sociedade ao seu redor (GIL et al., 2008).

O *I Levantamento Domiciliar Sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil* foi feito em 2001 pelo Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), avaliando 107 cidades, com população superior a 200 mil habitantes cada, sendo entrevistadas 8.589 pessoas entre 12 e 65 anos. O estudo estimou que 19,4% da população brasileira já fez uso de alguma substância química pelo menos uma vez na vida (*uso na vida*), excetuando-se o álcool e o tabaco. Esta porcentagem é próxima a do Chile (17,1%), cerca de três vezes maior que a da Colômbia (6,5%) e quase a metade do percentual dos Estados Unidos (38,9%). Comparando com os resultados da última pesquisa realizada em 2005 pelo CEBRID no *II Levantamento Domiciliar Sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil*, que entrevistou 7.939 pessoas, entre 12 e 65 anos, em 108 cidades, o *uso na vida* para qualquer droga, com exceção do álcool e do tabaco, foi de 22,8%, muito próximo ao Chile, que obteve 23,4%. O índice obtido pelo Brasil foi novamente a metade do valor obtido nos Estados Unidos, que foi 45,8%. Comparando os dados obtidos em 2001 com os dados de 2005, observa-se que houve um aumento importante de 3,4% no uso de drogas de abuso.

O gráfico apresentado na Figura 1 mostra a prevalência, em porcentagem, da utilização de drogas de abuso no Brasil em 2001 e 2005.

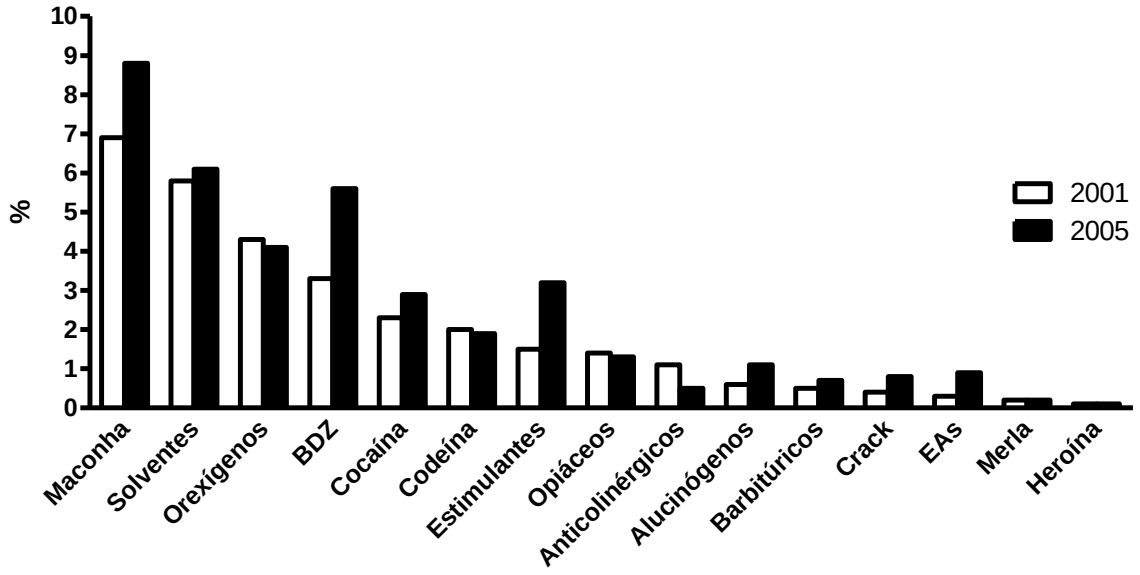


Figura 1 – Prevalência (em %) da utilização de drogas de abuso no Brasil em 2001 e 2005 (Adaptado do *II Levantamento Domiciliar Sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil* – CEBRID 2005). BDZ = benzodiazepínico; EAs = esteróides anabolizantes.

1.2. COCAÍNA

A cocaína, um alcalóide presente nas folhas provenientes de espécies do gênero *Erytroxylum* (*E. novogranatense* e *E. coca*), é um anestésico local potente, que também atua como um poderoso agente simpatomimético, cujos efeitos são estimulantes sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). Dentre os agentes naturais, a cocaína possui o maior poder estimulante central, razão pela qual é utilizada como fármaco de abuso, sendo atualmente considerada um problema de saúde pública mundial (CRITS-CHRISTOPH et al., 2008).

Estima-se que 14 milhões de pessoas no mundo utilizem indiscriminadamente a cocaína (CUNHA et al., 2004). Como pode ser observado na Figura 1, o *II Levantamento Domiciliar Sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil* (CEBRID 2005) aponta que a prevalência de utilização das diferentes formas de administração

de cocaína atinge 3,8%: 2,9% referente à administração pelas vias intranasal e intravenosa; 0,7 e 0,2% correspondentes ao uso do *crack* e da merla, respectivamente, ambas administradas pela via inalatória. As regiões do país que apresentaram maiores índices de uso de cocaína foram a Sul e a Sudeste, correspondendo a 3,1% e 3,7%, respectivamente. As mesmas regiões apresentaram as maiores prevalências em relação ao uso do *crack*, sendo 0,9% para a região Sudeste e 1,1% para a região Sul.

Mais ainda, dados epidemiológicos recentes mostraram que o uso de cocaína na forma de *crack* cresceu nos últimos anos, principalmente entre os estudantes do ensino médio e fundamental, além de ser a droga de abuso com mais procura por atendimento médico em clínicas especializadas (CUNHA et al., 2004; DUNN et al. 1996; FILHO et al., 2003).

A administração da cocaína na forma de *crack* traz algumas vantagens para o usuário, entre eles, a alta velocidade de absorção devido à extensa área de superfície pulmonar e sua irrigação. O início dos efeitos é quase imediato, alcançando sua intensidade máxima em cerca de 5 minutos, com duração aproximada de 30 minutos (JULIEN, 1995). A administração pela via respiratória é equivalente à intravenosa em relação à rapidez e intensidade dos efeitos farmacológicos (CHASIN & MÍDIO, 1997). Além disso, a conveniência e a facilidade de aquisição, a não utilização de aparatos relacionados às drogas injetáveis e a segurança quanto a não transmissão de doenças infecto-contagiosas constituem fatores sócio-ambientais que contribuem para o uso indiscriminado do *crack*.

1.3. VIAS DE ADMINISTRAÇÃO

A cocaína é frequentemente encontrada em sua forma salina, conjugada a uma molécula de cloridrato. O cloridrato de cocaína é obtido por meio da maceração das folhas de *Erytroxylum coca*, resultando em uma pasta de coca, seguido de seu tratamento com ácido clorídrico. Assim, a cocaína, na forma de cloridrato, é facilmente hidrossolúvel, permitindo a administração pela via intravenosa ou por aspiração nasal ("cafungar"). Em sua forma de base livre (cocaína base), a substância apresenta baixo ponto de fusão (96 a 98 °C) quando comparada ao cloridrato de cocaína (197 °C). O *crack* é a forma mais comum de comercialização da cocaína base e é preparado pelo aquecimento de uma solução aquosa de cloridrato de cocaína com uma substância básica, geralmente o bicarbonato de sódio (Figura 2). O aquecimento é mantido até a obtenção de uma substância oleosa, que posteriormente é resfriada em banho de gelo para que a base livre precipite. Os cristais formados são irregulares, adquirindo o formato de "pedras", nome pelo qual é vulgarmente conhecido. Assim, a via de administração do *crack* é a inalatória, através do ato de fumar.

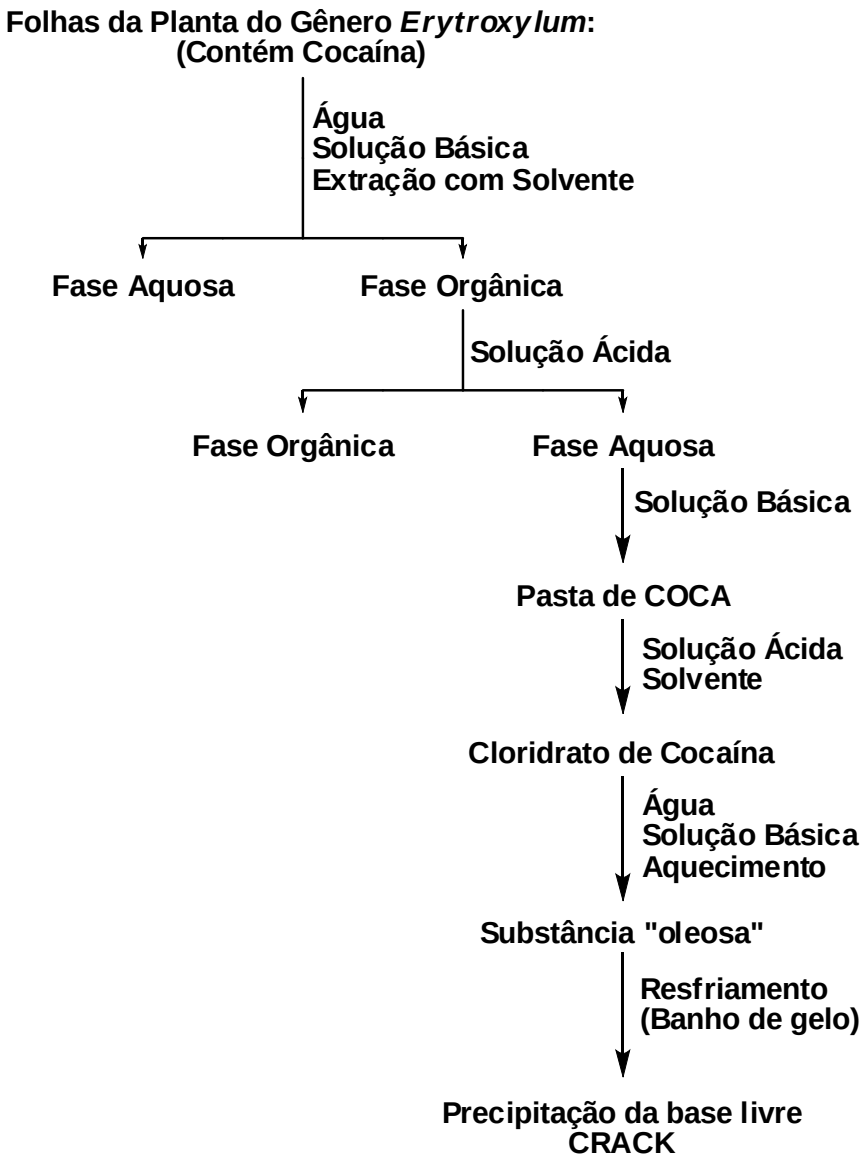


Figura 2 – Fluxograma do método de obtenção do cloridrato de cocaína e do *crack* a partir de folhas da planta do gênero *Erytroxylum* (Adaptado de CARVALHO, 2006; CHASIN et al., 2008).

1.4. METILECGONIDINA OU ANIDROECGONINA METIL ÉSTER (AEME)

O aquecimento da cocaína base durante o fumo de *crack* produz a metilecgonidina, também chamada de anidroecgonina metil éster (AEME), um composto proveniente da decomposição térmica, ou pirólise, da cocaína (Figura 3).

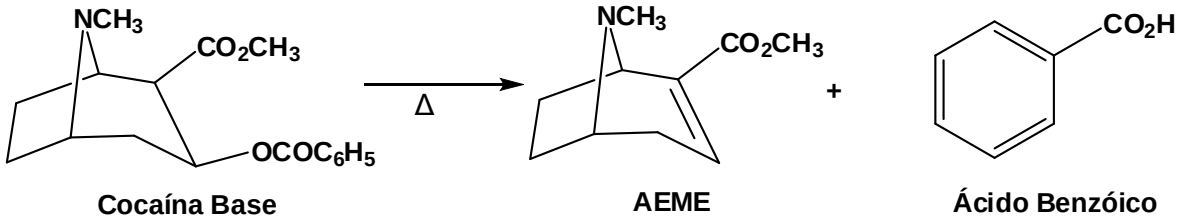


Figura 3 – Decomposição térmica (pirólise) da cocaína.

Ao fumar o *crack*, o usuário, além de se expor à cocaína, fica sujeito aos efeitos da AEME que é inalado concomitantemente. A presença dessa substância e de seus metabólitos em fluidos biológicos constitui uma ferramenta importante na diferenciação da forma de uso da cocaína, principalmente no contexto da Toxicologia Forense (TOENNES et al., 2003). De acordo com HATSUKAMI et al. (1996), os efeitos fisiológicos e psicoativos da cocaína são similares, quer ela seja administrada pela via intravenosa, quer pela via respiratória. No entanto, quando a cocaína é fumada, há um maior potencial de abuso da droga, maior propensão à dependência e consequências cardiovasculares, como isquemia ventricular, efeitos pró-trombóticos e aterosclerose coronariana acelerada, mais graves em comparação às demais vias de administração (AFONSO et al., 2007).

1.5. TOXICOCINÉTICA DO *CRACK*

1.5.1. Absorção

Tanto a cocaína quanto a AEME são volatizadas durante o fumo do *crack*, sendo inaladas e absorvidas pelo pulmão, que é um órgão extremamente vascularizado e com grande área superficial, levando a uma absorção instantânea. Através do pulmão, estas substâncias passam quase imediatamente para a circulação cerebral e chegam rapidamente ao SNC, justificando o rápido surgimento dos efeitos estimulantes da cocaína. Os primeiros efeitos ocorrem entre 10 a 15 segundos,

enquanto que os efeitos após a via nasal acontecem após 10 a 15 minutos. Essa característica faz do *crack* uma droga com *grande poder* do ponto de vista do usuário, já que o prazer acontece quase que instantaneamente após o uso.

Assim, durante a absorção da cocaína também ocorre a absorção da AEME em quantidades consideráveis através dos alvéolos pulmonares (FANDIÑO et al., 2002), que rapidamente atinge a corrente sanguínea, coincidindo com o aparecimento dos efeitos experimentados pelo usuário. De acordo com TOENNES et al. (2003), a concentração máxima ($C_{máx.}$) de AEME encontrada em amostras de sangue *post-mortem* de usuários foi de 472 µg/L. Segundo um estudo farmacocinético realizado em ovelhas, o tempo para atingir a $C_{máx.}$ da AEME é de, aproximadamente, 2 minutos (SCHEIDWEILER et al., 2003).

1.5.2. Distribuição, Biotransformação e Eliminação

Por ser altamente lipossolúvel, a cocaína possui rápida velocidade de distribuição, atravessando facilmente as barreiras hematoencefálica e placentária. Também possui alta afinidade às proteínas plasmáticas, preferencialmente à α-1-glicoproteína ácida (CHASIN et al., 2008).

De acordo com SCHEIDWEILER et al. (2003), o volume de distribuição médio encontrado após administração de 4 mg/kg de cocaína em ovelhas foi 3,11 L/kg, com meia-vida de 10,6 minutos. Neste mesmo estudo, o volume de distribuição médio para 3mg/kg de AEME foi 6,6–10,0 L/kg, com meia-vida entre 16,3 e 17,8 minutos. Ambas as substâncias apresentaram volume de distribuição aparente maior que o volume sanguíneo de uma ovelha, mostrando que as mesmas se distribuem do sangue para os demais tecidos.

As vias de biotransformação da cocaína e da AEME são semelhantes e compreendem hidrólise química e enzimática, reações oxidativas e, no caso de haver uso concomitante de cocaína e álcool, a transesterificação dependente de etanol (FANDIÑO et al., 2002; CHASIN et al., 2008).

A cocaína absorvida é rapidamente biotransformada (Figura 4) a éster metilecgonina (EME), produto da hidrólise do grupo benzoato por ação de colinesterases plasmáticas e hepáticas, constituindo cerca de 32 a 49% da excreção urinária da substância; e a benzoilecgonina (BE), formada pela hidrólise espontânea ou por reações catalisadas por carboxilesterases, que constitui cerca de 29 a 45% da excreção urinária. Outros produtos resultantes da biotransformação da cocaína são: a norcocaína (NCOC), farmacologicamente ativa, resultado de uma N-desmetilação mediada pelo sistema enzimático do citocromo P-450, excretada pela urina em pequenas quantidades (2 a 6%); a N-hidroxinorcocaína (NHNC), produto de biotransformação da NCOC; o cocaetileno, produto de etil transesterificação, indicando o consumo concomitante de cocaína e etanol. Em média, menos que 10% da cocaína é excretada inalterada na urina, justificado pela sua extensa biotransformação (CHASIN et al., 2008).

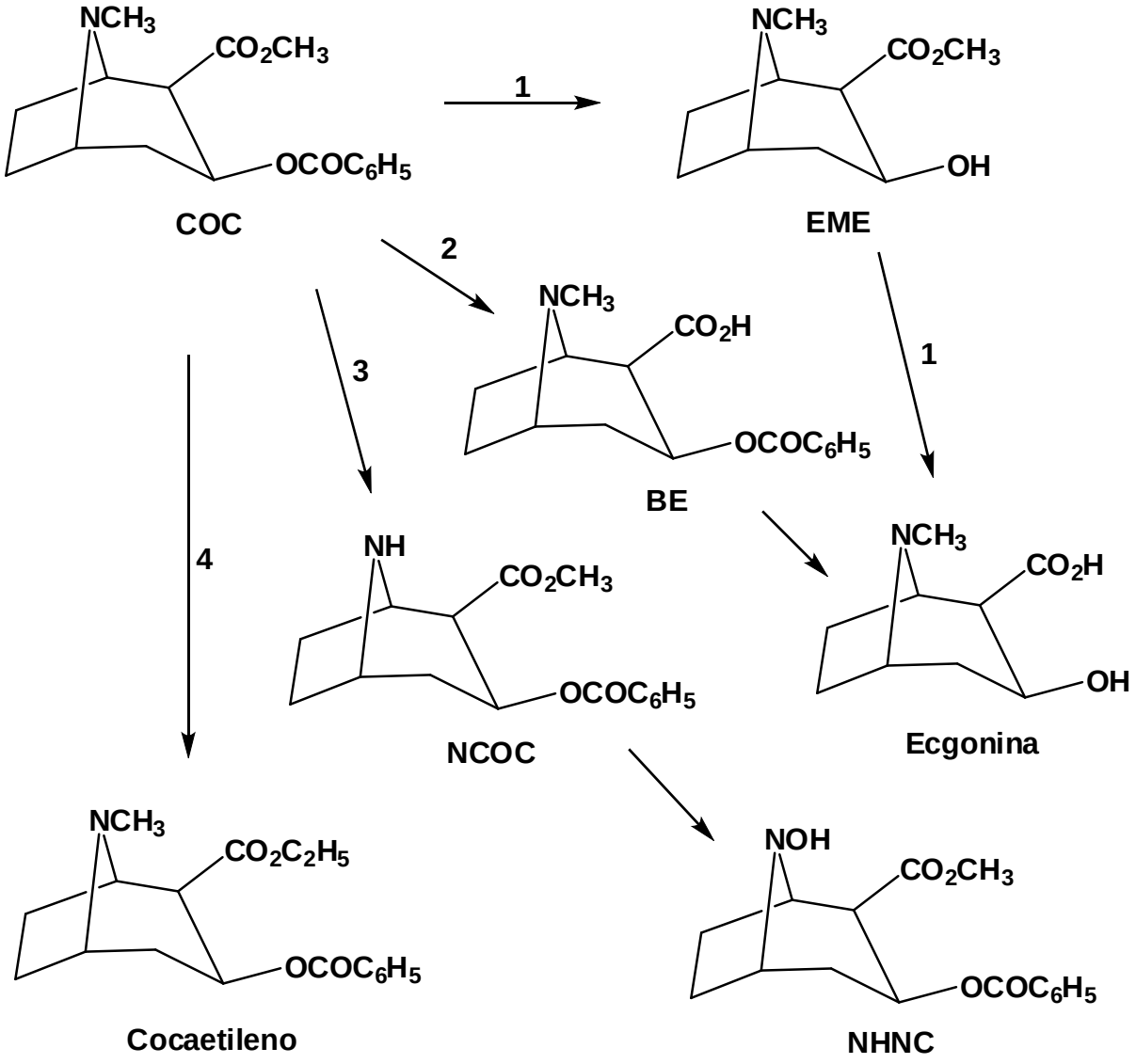


Figura 4 – Produtos de biotransformação da cocaína (COC). 1 = Colinesterases; 2 = carboxilesterases; 3 = citocromo P-450; 4 = etil transesterificação. EME = éster metilecgonina; BE = benzoilecgonina; NCOC = norcocaína; NHNC = N-hidroxinorcocaína (Adaptado de CHASIN et al., 2008).

Existem poucas informações a respeito das vias de biotransformação da AEME. De acordo com FANDIÑO et al. (2002), a extensão da biotransformação desta molécula depende da atividade das enzimas responsáveis por sua biotransformação nos órgãos e esta decresce na seguinte ordem: fígado, pulmões, rins e cérebro. A AEME é rapidamente biotransformada (Figura 5), tanto por hidrólise enzimática pela enzima butiril colinesterase quanto por processos não enzimáticos, à ecgonidina

(AE), principal metabólito excretado na urina (FANDIÑO et al., 2002). Esse mesmo estudo relatou que a maior produção deste metabólito ocorre no fígado e a menor no cérebro.

Estudos realizados em microssomas de órgãos de ratos mostraram que AEME também é biotransformada em anidronorecgonina metil éster (ANEME) e anidroecgonina metil éster N-óxido (AEMENO) no fígado e no pulmão. Na presença de etanol, AEME é metabolizada a anidroecgonina etil éster (AEEE) e anidronorecgonina etil éster (ANEEE) (FANDIÑO et al., 2002).

A detecção da AEME na urina pode ser utilizada como bioindicador na detecção de uso recente de *crack* e sua detecção no cabelo, quando utilizado como matriz biológica, pode evidenciar exposições anteriores ou ainda um usuário crônico de *crack*. Devido à sua rápida biotranformação à AE, a AEME pode não ser detectada em algumas amostras de urina. Neste caso, por estar em maior concentração que a AEME na urina, a AE passa a ser um melhor bioindicador de exposição ao *crack*. (CARVALHO, 2006).

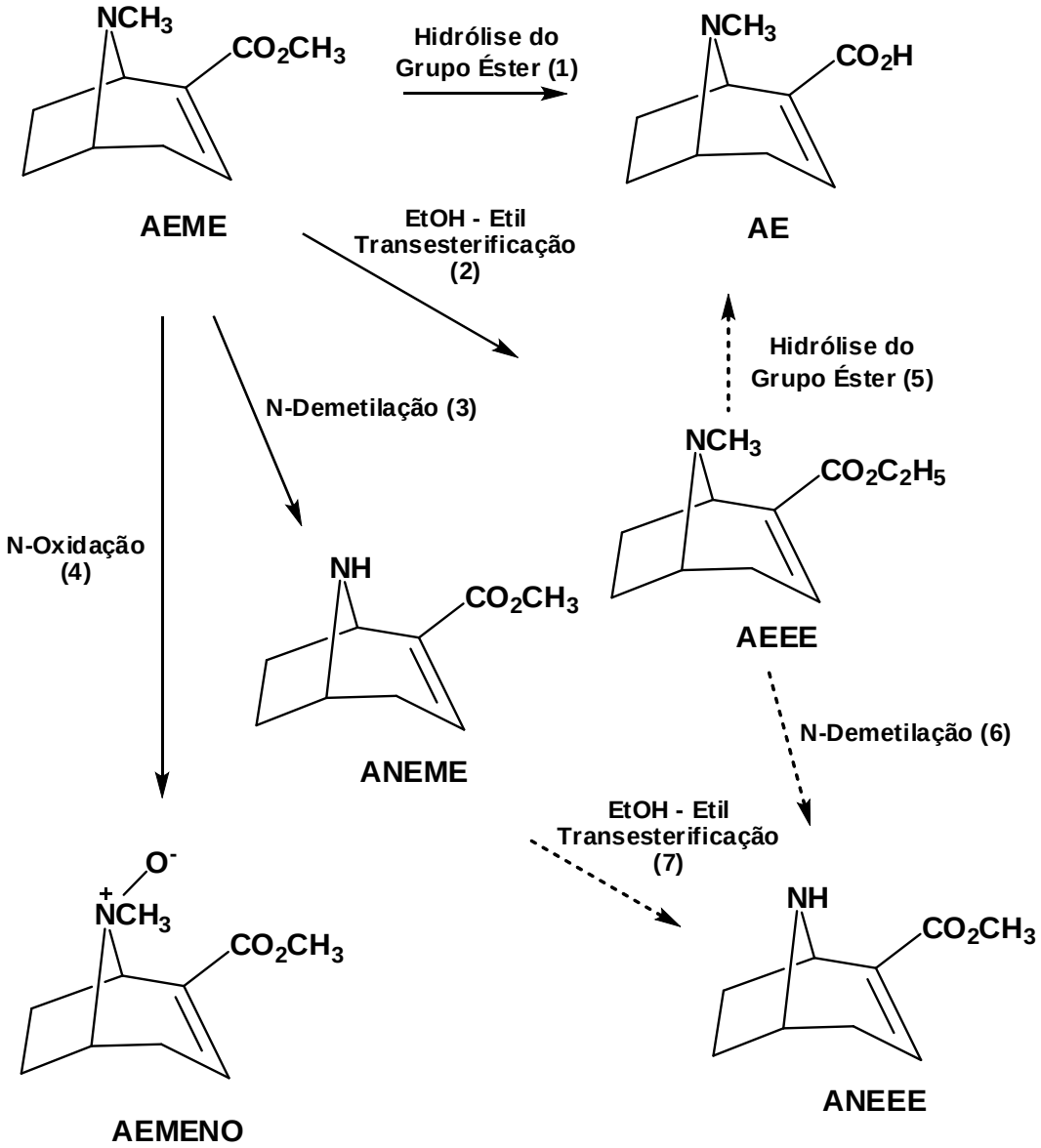


Figura 5 – Produtos de biotransformação da AEME. As setas 1, 2, 3 e 4 correspondem às vias cientificamente comprovadas, enquanto que as setas 5, 6 e 7 correspondem às postuladas. AEME = metilecgonidina; AE = anidroecgonina ou ecgonidina; AEEE = anidroecgonina etil éster; ANEME = anidronorecgonina metil éster; AEMENO = anidroecgonina metil éster N-óxido; ANEEE = anidronorecgonina etil éster (Adaptado de FANDIÑO et al., 2002).

1.6. TOXICODINÂMICA DO *CRACK*

O usuário de *crack* sofre o efeito tanto da cocaína base quanto de seus produtos de pirólise.

A cocaína inibe a recaptação de noradrenalina (NA) e de dopamina (DA) na fenda sináptica, promovendo o acúmulo destes neurotransmissores, desencadeando

o mecanismo fisiopatológico responsável pela euforia. Os efeitos tóxicos mais comuns decorrentes do uso da cocaína incluem arritmias cardíacas, isquemia miocárdica, miocardite, vasoconstrição cerebral, acidentes vasculares cerebrais, tontura e problemas respiratórios (O´BRIEN, 2006). De acordo com o *National Information on Drug Abuse* (NIDA), grandes quantidades podem causar comportamento bizarro e violento. Em alguns casos pode haver morte repentina no primeiro uso de cocaína.

Com a finalidade de compensar a intensificação causada pela atividade de NA e DA na fenda sináptica, ocorre ativação de receptores pré-sinápticos que participam do mecanismo de auto-regulação negativa, levando à diminuição de sua liberação. O quadro sintomatológico relacionado à síndrome de abstinência (cansaço, irritabilidade, sonolência e depressão) deve-se à depleção aguda desses neurotransmissores. Durante a abstinência, ocorre uma diminuição dos níveis de DA no corpo estriado em relação aos do cerebelo, semelhante ao que ocorre na doença de Parkinson, sugerindo que o uso abusivo de cocaína prejudica a atividade funcional nessa região do SNC. A redução dos níveis de DA cerebral pode levar a anormalidades das vias dopaminérgicas, resultando em transtornos psiquiátricos, como ansiedade, depressão e psicose (O´BRIEN, 2006).

Pouco se sabe a respeito do mecanismo de ação da AEME. JACOB et al. (1990), a partir da semelhança de sua estrutura química (Figura 6) com a arecolina, um agonista de receptores muscarínicos (XIE et al., 2004), e a anatoxina-*a*, uma cianotoxina que atua como bloqueador neuromuscular (WOOD et al., 2007), sugeriram um possível efeito colinérgico para a AEME.

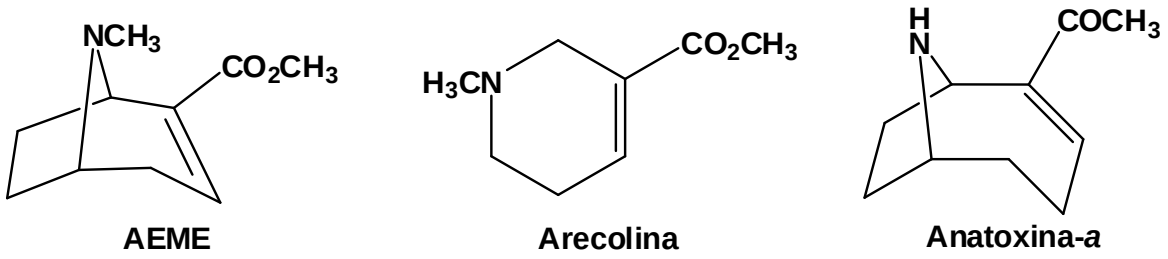


Figura 6 – Semelhança estrutural entre AEME (metilecgonidina), arecolina e anatoxina-*a*.

Posteriormente, ERZOUKI et al. (1995) mostraram que a administração intravenosa de AEME diminuiu a pressão arterial média e os batimentos cardíacos, aumentando a frequência respiratória em coelhos.

SCHEIDWEILER et al. (2003) em estudo realizado em ovelhas, demonstraram que a AEME produziu efeitos semelhantes aos agonistas muscarínicos, levando à hipotensão, causada pela vasodilatação generalizada, acompanhada de taquicardia reflexa. Foram propostos dois mecanismos para explicar a hipotensão causada pela AEME: 1) estimulação de receptores muscarínicos tipo 3 (M_3) no endotélio vascular, ativando a proteína G_q que, por sua vez, estimula a atividade da fosfolipase C, responsável pela quebra do fosfatidilinositol bifosfato em diacilglicerol e trifosfato de inositol. Este último promove a liberação de cálcio dos estoques intracelulares. O cálcio ativa a enzima óxido nítrico sintase (NOS) a produzir óxido nítrico (NO) levando ao relaxamento da musculatura adjacente; 2) estimulação de receptores muscarínicos tipo 2 (M_2), ativando a proteína G_i, resultando em inibição da adenilil ciclase e, posteriormente, inibição dos canais de cálcio voltagem dependentes, que diminuem a força de contração cardíaca e a pressão sanguínea. Ainda, a rápida hipotensão em ovelhas, induzida pela AEME, foi antagonizada competitivamente pelo metilbrometo de atropina, sustentando a hipótese do efeito muscarínico *in vivo*.

WOOLF et al. (1997) demonstraram um efeito inotrópico negativo da AEME em cultura celular de miocárdio ventricular humano, que seria decorrente da diminuição

da disponibilidade de cálcio durante o processo de contração muscular via estimulação de receptores M_2, sendo que este processo foi revertido pela atropina, reforçando a ação dessa substância em receptores muscarínicos.

WILLETTS et al. (1995), em estudo realizado em porcos da Índia, observaram que a inalação de partículas de aerosol de AEME induziu broncoconstrição, levando a um dano pulmonar evidenciado pela presença de sangue, elevação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), um marcador geral de dano celular, e pela presença de altos níveis de proteína sérica transudada no lavado bronco alveolar. De acordo com WILLETS et al. (1995), usuários com histórico de utilização de *crack* apresentaram dano epitelial ou da membrana capilar, levando à alterações persistentes na função pulmonar. Assim, é possível que a AEME produzida durante o fumo do *crack* possa contribuir para o dano pulmonar.

1.7. *CRACK*: EFEITOS NO SNC E DEPENDÊNCIA

Estudos experimentais em voluntários demonstraram que 50 mg de cocaína base fumada em intervalos de 30 segundos durante 5 minutos, produzem efeitos psicológicos e cardíacos da mesma ordem de magnitude que 20 mg de cloridrato de cocaína pela via intravenosa. As doses habituais de usuários de *crack* ou cocaína por via intravenosa variam entre 25 e 50 mg, enquanto que, pela via intranasal, as quantidades variam entre 30 e 70 mg. Os fumantes de *crack* chegam a utilizar quantidades que excedem 1 g, dose considerada letal para um indivíduo adulto (CHASIN et al., 2008). Essa diminuição da resposta à cocaína decorrente do uso prolongado é chamada de tolerância (O´BRIEN, 2006). Este fenômeno, também conhecido como tolerância farmacodinâmica, pode ser explicado pela alteração da quantidade de receptores ou da eficiência do acoplamento do receptor às vias de

transdução do sinal, induzidas pela cocaína, necessitando um aumento de dose para obtenção dos efeitos anteriormente experimentados pelo usuário.

Os efeitos prazerosos do *crack* se iniciam logo após o uso e ocorre uma sensação de grande prazer, intensa euforia e poder. O efeito é tão agradável que, logo após seu desaparecimento, o usuário volta a utilizar a droga, fazendo isso inúmeras vezes. Essa compulsão para utilizar a droga repetidamente recebe o nome de "fissura", que é uma vontade incontrolável de sentir os efeitos prazerosos da droga. A "fissura", no caso do *crack*, é avassaladora, já que seus efeitos são muito rápidos e intensos. O *crack* também provoca um estado de excitação, hiperatividade, insônia, perda da sensação de cansaço e falta de apetite. Este último efeito é muito característico do usuário de *crack*, sendo que, em menos de um mês, o usuário perde em torno de 8 a 10 Kg, perdendo, após um tempo um pouco maior de uso, todas as noções básicas de higiene. Após o uso intenso e repetitivo ocorrem sensações desagradáveis como cansaço e depressão intensa (CEBRID 2003).

Pelo exposto acima, pode-se notar que o *crack* apresenta maior potencial de abuso quando comparado às demais formas de administração de cocaína. Como ocorre a inalação de AEME junto com a cocaína no uso do *crack*, é possível que este produto de pirólise da cocaína participe tanto nos mecanismos prazerosos quanto nos deletérios do *crack*.

1.8. EFEITO DA COCAÍNA/*CRACK* NAS FUNÇÕES COGNITIVAS

Alterações das funções cognitivas podem ocorrer com o uso de fármacos como, por exemplo, os benzodiazepínicos e os anticolinérgicos; na vigência de quadros psiquiátricos como o transtorno depressivo; e na presença de doenças

neurodegenerativas como a doença de Alzheimer. Nas duas primeiras situações o quadro é reversível, sendo irreversível na terceira.

BOLLA et al. (1999) investigaram as funções cognitivas de 30 usuários de cocaína, onde 29 utilizavam o *crack* como forma de administração de cocaína. Foram observados danos na função executiva, ou seja, em processos cognitivos de controle e integração destinados à execução de um comportamento (BANHATO et al., 2007), e na memória. Outro estudo sobre o desempenho neuropsicológico de indivíduos dependentes foi realizado em dois momentos: após 6 semanas e após 6 meses de abstinência, mostrando que a dependência pelo *crack* e a associação de *crack* e álcool pode levar à deficiências neuropsicológicas graves e persistentes, dentro de uma extensa faixa de domínios, e que os danos causados ao encéfalo estão diretamente relacionados à dose (DI SCLAFANI et al., 2002). Estudo em nosso meio mostrou evidências de que o abuso de cocaína está associado a déficits cognitivos, semelhantes aos que ocorrem em transtornos cognitivos, possivelmente relacionados a problemas em regiões encefálicas pré-frontais e temporais (CUNHA et al. 2004).

CHANG et al. (1999) mostraram que as alterações neuroquímicas no lobo frontal de sujeitos com histórico de dependência ao *crack* são permanentes, mesmo após a descontinuação do uso da droga.

A real participação da AEME e de seus metabólitos, como a AE, no prejuízo das funções cognitivas ainda não está clara (SCHEIDWEILER et al., 2003). Entretanto, é possível que a exposição repetida à AEME atue na deficiência cognitiva associada ao *crack* por meio de processos neurodegenerativos.

Uma vez que são descritos prejuízos em domínios como a memória em usários de *crack*, o hipocampo passa a ser uma estrutura de fundamental importância, uma

vez que alterações neurodegenerativas nessa região afetam os processos cognitivos (FATTORE et al., 2002; JAYALAKSHMI et al., 2005).

1.9. NEURODEGENERAÇÃO E COCAÍNA

1.9.1. Mecanismos de Morte Celular

A morte celular pode ocorrer de duas maneiras distintas: necrose e apoptose. O processo de morte celular por necrose é caracterizado como sendo uma morte celular patológica, ou seja, ocorre quando existem danos na membrana plasmática das células decorrente de variações fisiológicas extremas, tais como hipóxia, anóxia ou isquemia, intoxicação, abuso de drogas e reações imunológicas. As células necróticas apresentam um aumento do volume citoplasmático e mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo intra para o extracelular. Este processo gera uma resposta inflamatória que pode causar lesão tecidual e até morte de células adjacentes (CURTIN et al., 2002).

Já a apoptose é definida como morte celular programada, processo importante para a embriogênese, desenvolvimento e depleção de células antigas ou infectadas, sem sinalizar um processo inflamatório (MCCONKEY, 1998). As características morfológicas de uma célula em apoptose incluem a condensação da cromatina, a fragmentação celular em pequenos corpos que, por fim, são fagocitados por macrófagos. A Tabela 1 mostra, resumidamente, a distinção morfológica e funcional entre apoptose e necrose.

Tabela 1 – Apoptose *versus* necrose: distinção morfológica e funcional (Adaptado de MCCONKEY, 1998).

	Apoptose	**Necrose**
Tipo de processo	Fisiológico / Patológico	Patológico
Citoplasma	Diminui	Aumenta
Membrana plasmática	Intacta	Ruptura
Núcleo	Condensa	
Resposta inflamatória	Ausente	Presente

Apesar da diferença morfológica entre apoptose e necrose, alguns mecanismos bioquímicos, como consumo de ATP, alteração na concentração de cálcio (Ca^{2+}) intracelular, aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) e depleção de glutationa, são compartilhados por essas duas respostas (Tabela 2).

Tabela 2 – Apoptose *versus* necrose: alterações bioquímicas (Adaptado de MCCONKEY, 1998).

	Apoptose	**Necrose**
Depleção de ATP	25 – 70%	70 – 100%
Aumento [Ca^{2+}]	200 – 400 nM	> 1 μM
Gene *Bcl-2*	Inibido pela *Bcl-2*	
Via das caspases	Requer	Pode não requerer
Produção de EROS	Moderada	Alta
Depleção de glutationa	Progressiva	Rápida e extensa

De acordo com a revisão realizada por MCCONKEY (1998), células apoptóticas não apresentam alterações bruscas nos níveis de ATP, ao passo que a necrose leva à depleção de ATP. Esse autor relata ainda que os níveis de ATP podem alterar os mecanismos de morte celular, ou seja, um processo apoptótico pode desencadear um necrótico. A explicação desse processo está baseada na alteração de alguns eventos bioquímicos importantes decorrentes da depleção de ATP, como a

supressão de proteases (caspases) e endonucleases responsáveis pela fragmentação do DNA.

Alterações na homeostasia de Ca^{2+} intracelular também podem desencadear apoptose e necrose. A diferença reside na concentração e/ou na natureza do Ca^{2+} citosólico. O aumento moderado (200 – 400 nM) e a liberação do estoque de Ca^{2+} armazenado no retículo endoplasmático caracterizam uma morte celular programada pela ativação de uma protease dependente de Ca^{2+} conhecida como calpaína, enquanto que o influxo massivo e descontrolado de Ca^{2+} (concentrações acima de 1 μM) está associado à necrose, o qual promove uma sobrecarga mitocondrial levando ao colapso do gradiente eletroquímico e subsequente depleção de ATP. Especula-se que essa alta concentração de Ca^{2+} seja capaz de inibir endonucleases, reforçando o potencial necrótico nessa situação (MCCONKEY, 1998).

O processo de morte celular por apoptose é caracterizada pela ativação sequencial de caspases, uma classe de enzimas proteolíticas, resultando na clivagem de proteínas e na fragmentação do DNA. As caspases 8 e 9 controlam diferentes vias de sinalização de morte culminando com a ativação de uma caspase efetora, a caspase 3, responsável pela morte celular (HENGARTNER, 2000). A caspase 8 é a protease iniciadora da via de receptores de morte, enquanto que a caspase 9 é ativada pela liberação do citocromo-c da mitocôndria. As proteínas que são originadas pela família de genes *Bcl-2* apresentam funções importantes para o desenvolvimento e o progresso do processo de morte celular. A ativação das proteínas antiapoptóticas *Bcl-2* (propriamente dita) e *Bcl-x_L* impedem a formação do apoptossomo, uma estrutura formada pela ligação de dois cofatores, citocromo-c e ATP, a um fator de ativação de protease apoptótica denominado Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor 1*), impedindo a ativação da caspase 9 e,

subsequentemente, da caspase 3. Contudo, essa mesma família de genes apresenta proteínas pró-apoptóticas, como a proteína *Bax*, permitindo a associação do citocromo-c com a Apaf-1. Essa ligação promove uma mudança conformacional fazendo com que a Apaf-1 se ligue ao ATP, formando o apoptossomo, que medeia a ativação da caspase 9, levando à ativação da cascata das caspases, culminando com a morte celular (RIEDL & SHI, 2004). De acordo com SHIMIZU et al. (1996a, b), a superexpressão da proteína *Bcl-2* pode inibir drasticamente a necrose induzida por hipóxia química, mostrando que, tanto a apoptose quanto a necrose, não são reguladas por mecanismos moleculares independentes. Essa proteína regula ainda o fluxo de Ca^{2+} citosólico, impedindo a depleção do cátion armazenado no retículo endoplasmático e, por conseguinte, a apoptose. Acredita-se também que a *Bcl-2* interfira com a necrose mediada pelo influxo de Ca^{2+} (MCCONKEY, 1998).

De maneira semelhante ao Ca^{2+}, o estresse oxidativo pode promover ou inibir a apoptose, dependendo da intensidade. Conceitualmente, o estresse oxidativo refere-se ao estado em que a produção de agentes oxidantes ultrapassa as capacidades antioxidantes, entre elas a glutationa, a vitamina E, o ascorbato, a superóxido dismutase (SOD), a catalase, entre outras, gerando dano oxidativo de constituintes celulares, como lipídeos, proteínas e DNA, podendo levar à morte celular (FLOYD, 1999). Níveis baixos a moderados de EROS são capazes de estimular a fragmentação do DNA, enquanto que altas concentrações inibem componentes da via apoptótica, como a atividade das caspases, levando à necrose sem a fragmentação do DNA. O mesmo ocorre com os níveis de glutationa, ou seja, sua oxidação moderada está relacionada à apoptose, enquanto que a depleção excessiva predispõe a célula a um processo necrótico (MCCONKEY, 1998).

Todos os organismos vivos podem sofrer danos oxidativos. De maneira geral, o encéfalo e os tecidos nervosos estão mais propensos aos danos oxidativos devido a fatores como o alto fluxo de cálcio pelos neurônios, a presença de neurotransmissores excitatórios, principalmente o glutamato, além da alta taxa de consumo de oxigênio molecular (O_2) pelos tecidos nervosos (MARKESBERY, 1999). Além disso, o sistema nervoso central (SNC) possui poucas defesas antioxidantes, alto teor de ferro e metais de transição que podem catalisar a formação do radical hidroxila (·OH), além de lipídeos facilmente oxidáveis em comparação a outros tecidos (FLOYD, 1999). A Figura 7 apresenta os mecanismos envolvidos na geração de estresse oxidativo.

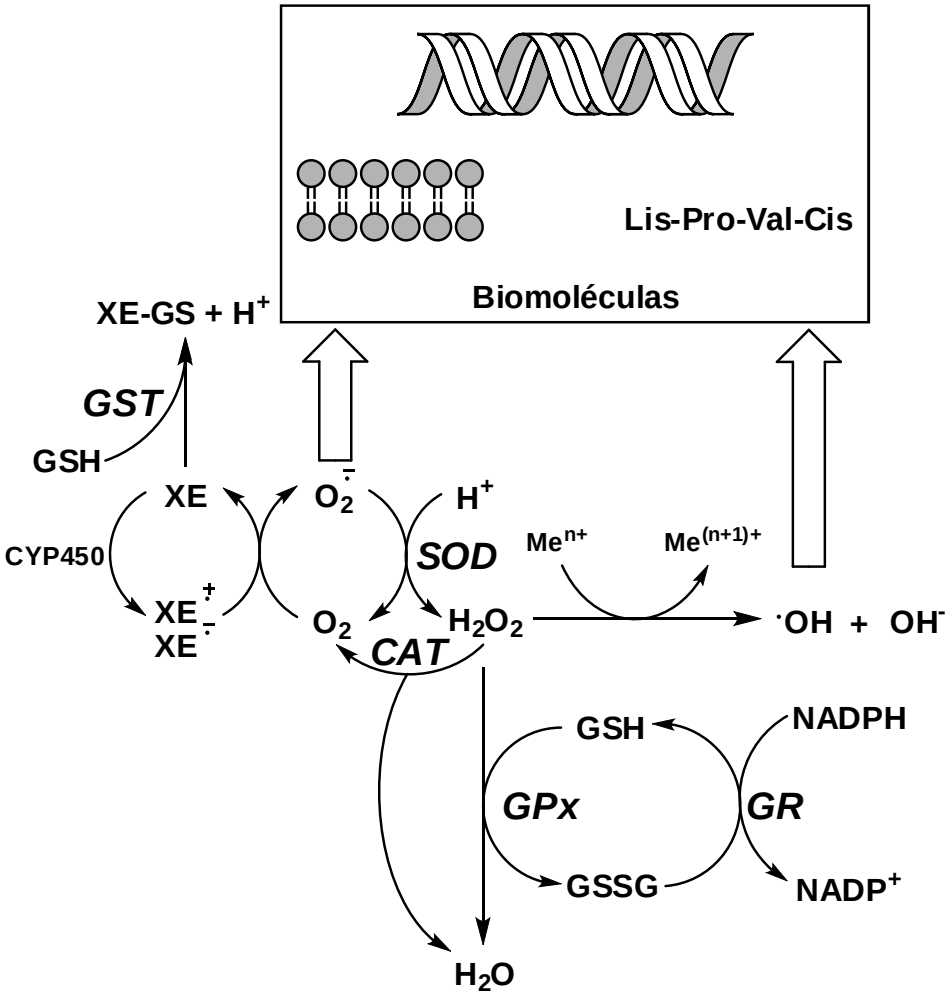


Figura 7 – Esquema ilustrativo da geração de estresse oxidativo a partir de um xenobiótico (XE) e da ação das enzimas antioxidantes. Durante a reação de biotransformação de fase 1, um XE pode sofrer a ação de redutases do citocromo P450 (CYP450), recebendo um elétron, originando um radical livre. Esse radical transfere o elétron adquirido para o oxigênio molecular, formando o ânion radicalar superóxido ($\cdot O_2^-$), regenerando a molécula de XE original, que pode novamente receber um elétron e reiniciar o ciclo "redox". A detoxificação do XE está representada pela conjugação do XE com a glutationa catalisada pela GST. O $\cdot O_2^-$ formado é dismutado pela SOD, gerando H_2O_2, o qual pode ser eliminada pela GPx, oxidando a GSH em GSSG, ou diretamente pela ação da CAT. Se houver um acúmulo de H_2O_2, por meio da reação de *Fenton*, pode haver a formação de hidroxila radicalar ($\cdot OH$) pela oxidação de um metal de transição (Me^{n+}) como Fe^{2+} e o Mn^{2+}. SOD = superóxido dismutase; CAT = catalase; GPx = glutationa peroxidase; GR = glutationa redutase e GST = glutationa S-transferase.

1.9.2. Dano Oxidativo e Cocaína

Existem evidências apontando para o envolvimento da cocaína na produção de estresse oxidativo e no dano em DNA no SNC. Mais ainda, tem sido demonstrado o envolvimento dos produtos de biotransformação da cocaína na produção de

estresse oxidativo. Vale destacar que a cocaína é metabolizada por duas vias distintas: 1) a hidrólise do grupo éster, que apesar de ser a via principal, aparentemente não possui importância em manifestações tóxicas, e 2) a oxidação do grupamento amina, cuja importância toxicológica é grande (KOVACIC et al., 1988).

O metabolismo oxidativo da cocaína (Figura 4) produz norcocaína por meio da formação de um composto intermediário, uma imina (KOVACIC et al., 1988). Estes autores mostraram que microssomas de cérebro e de fígado são capazes de formar nitróxido a partir da oxidação de norcocaína, cujo potencial de redução é -0,48V, indicando uma importante participação no ciclo redox *in vivo*, com a produção de estresse oxidativo pela formação de EROS (KOVACIC et al., 1988). Outro metabólito de importância, a N-hidroxinorcocaína (NHNC), cuja molécula precursora é a norcocaína, é formado a partir da captura de um próton e de um elétron. As aminas cíclicas terciárias podem resultar em lesões bioquímicas pela formação de metabólitos reativos como, por exemplo, as iminas, podendo ser a causa primária de neurotoxicidade (RAPAKA et al., 1997). Assim, as iminas parecem estar envolvidas em ações tóxicas pela via de transferência de elétrons e estresse oxidativo.

BENUCK et al. (1988) relataram que a produção de uma substância com radical nitróxido livre a partir da NHNC leva à hepatotoxicidade em indivíduos usuários de cocaína, sendo o sistema enzimático P450 a via metabólica responsável pela formação deste produto. Estes autores também destacam a presença de norcocaína em encéfalo de ratos após administração de cocaína pela via intravenosa, porém, pequenas quantidades de NHNC foram encontradas neste tecido.

Estudos realizados com microssomas encefálicos mostram que existem evidências de que, a conversão de norcocaína em NHNC e o nitróxido de cocaína *in*

vitro, originam radicais envolvidos no processo de peroxidação lipídica. Mesmo que estes radicais livres se formem em menores quantidades no tecido encefálico em comparação com o fígado, eles provavelmente contribuem com a toxicidade do SNC (BENUCK et al., 1988).

Outras vias importantes de biotransformação da cocaína que podem contribuir com a toxicidade incluem a reação de nitróxido ou do cátion nitrosônio ($R_2N^+=O$) com o óxido nítrico ou o ânion peroxinitrito (GOLDSTEIN et al., 2004). A redução de nitróxido de norcocaína gera ânion superóxido (KLOSS et al., 1984), cujo efeito deletério é evidenciado quando se faz a incubação dos derivados nitróxido e N-hidróxi com microssomas de fígado, levando à peroxidação lipídica (KLOSS et al., 1983).

De acordo com o exposto acima, o metabolismo N-oxidativo da cocaína leva à alterações deletérias, por exemplo, no fígado. Como existem evidências da formação desses metabólitos no tecido encefálico (BENUCK et al., 1988), é provável que essas alterações também ocorram no encéfalo.

A ocorrência de peroxidação lipídica pode ser evidenciada pela produção, por exemplo, de malonaldeído (MDA), que é formado enzimaticamente durante a oxidação de ácidos graxos com mais de duas ligações duplas (Figura 8).

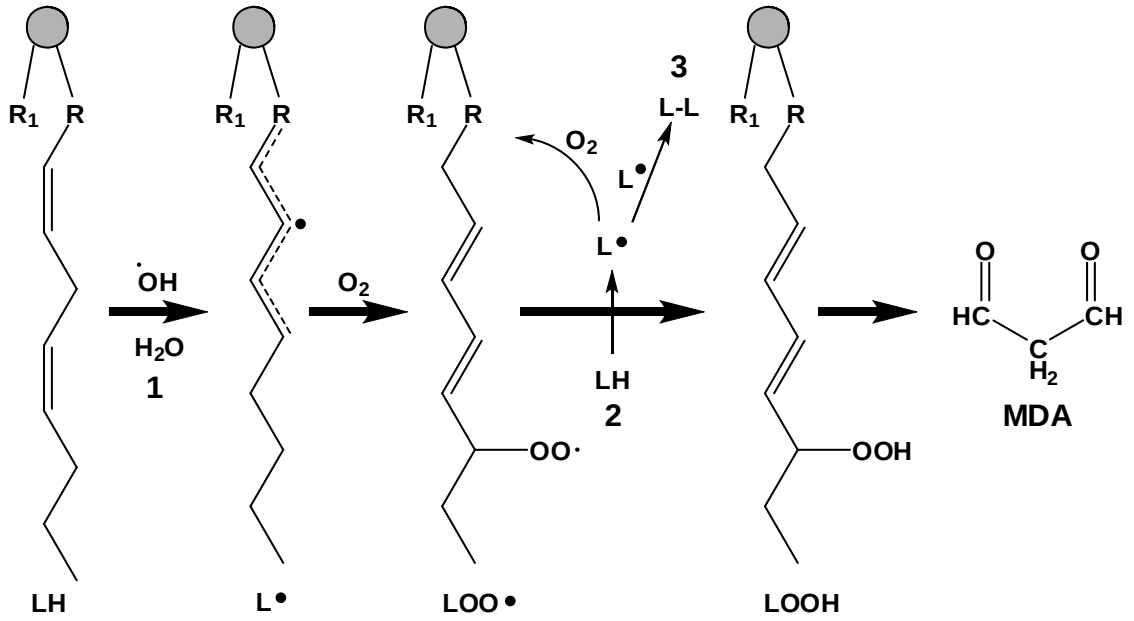


Figura 8 – Esquema ilustrando o processo de peroxidação lipídica culminando com a produção de MDA. Na fase de iniciação (1), o radical hidroxila (·OH) remove hidrogênio de um ácido graxo insaturado (LH), formando um radical de lipídeo (L·). O L· reage com o oxigênio molecular, formando um radical peróxido (LOO·) que, por sua vez, retira hidrogênio de outro lipídeo. Na fase de propagação (2), forma-se um hidroperóxido de lipídeo (LOOH) e outro L·, que reage com oxigênio, reiniciando novamente o ciclo. Na última fase, ou seja, na terminação (3), dois radicais L· se combinam e formam um não radical (L-L). O LOOH pode sofrer reações degradativas, culminando com a produção de MDA. R e R_1 constituem grupamentos alquílicos contendo duas ou mais insaturações (Adaptado de AUGUSTO, 2006).

DAS et al. (1987) mostraram que a cocaína estimulou a formação de MDA no encéfalo de ratos. Reforçando que a cocaína está envolvida na produção de estresse oxidativo, LLOYD et al. (1993) demonstraram que múltiplas baixas doses de cocaína geraram EROS, como o radical hidroxila no tecido encefálico de ratos.

MACEDO et al. (2005) descreveram redução na atividade da catalase, que deve refletir um aumento na produção de H_2O_2, no córtex pré-frontal e no estriado de ratos. DIETRICH et al. (2005) destacam que tanto uma dose única ou a administração crônica (1 injeção/dia) de 20 mg/kg de cocaína por 10 dias, são capazes de aumentar a produção de EROS no córtex pré-frontal e no estriado. A formação de radicais livres induzida pela cocaína foi acompanhada pela indução da atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPx nos dois tipos de tratamento. Os

autores destacam que é possível que o desenvolvimento de mecanismos compensatórios, como a atividade das enzimas antioxidantes em resposta ao aumento da formação das espécies reativas de oxigênio, possa ser o responsável pela prevenção do dano celular, uma vez que não foi detectada morte celular nas estruturas encefálicas estudadas.

A fim de avaliar se o estresse oxidativo está associado aos efeitos amnésticos decorrentes da exposição de ratos jovens à cocaína ainda no útero, BASHKATOVA et al. (2005) dosaram a produção de óxido nítrico e a geração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como índice de peroxidação lipídica. Tanto o óxido nítrico quanto a peroxidação lipídica mostraram-se elevadas no hipocampo de ratos expostos à cocaína ainda no útero, mostrando significativo prejuízo no aprendizado. Os autores concluem que a exposição intra-uterina de cocaína resulta em significativo estresse oxidativo nas condições basais, que podem estar relacionadas ao prejuízo do aprendizado.

O dano da cocaína no DNA foi pouco estudado. De acordo com MARTIN (2008), o dano em DNA pode ser definido como qualquer modificação que altere sua propriedade codificante ou suas funções normais de transcrição ou replicação. A formação de adutos de DNA, um processo de lesão do DNA, ocorre pela atração de substâncias eletrofílicas por moléculas com alta densidade eletrônica, como as bases nitrogenadas, principalmente a guanina (LOUREIRO et al., 2002). A reação do MDA com as bases de DNA, representada na Figura 9, é um exemplo de dano causado ao DNA em decorrência da peroxidação lipídica.

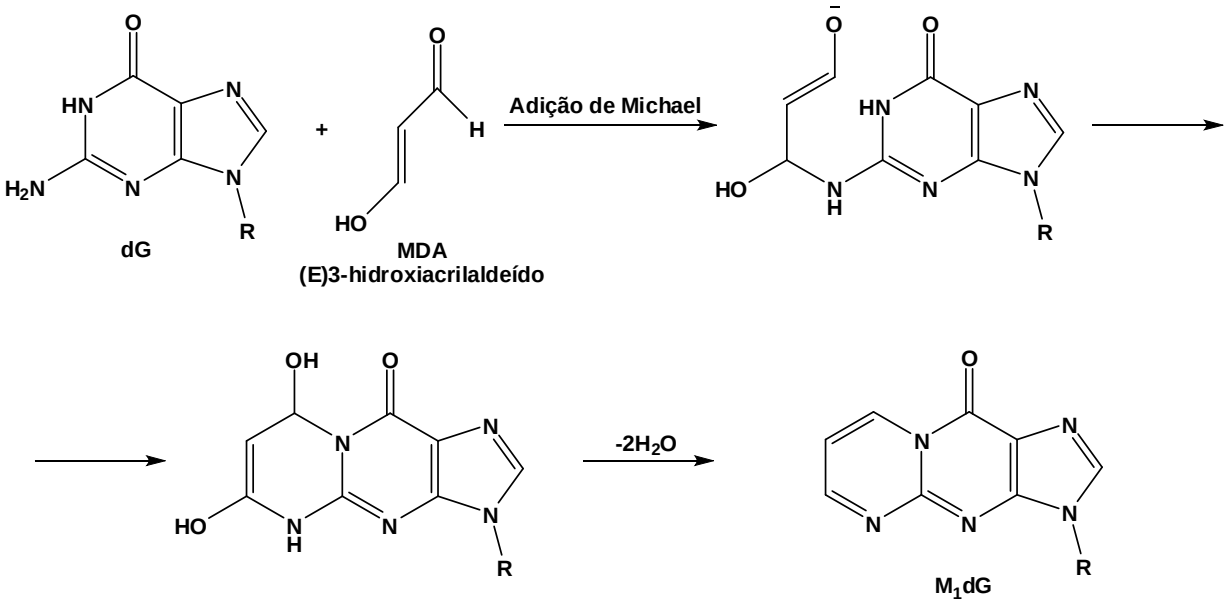


Figura 9 – Formação de adutos com bases de DNA: reação entre o MDA e a guanina (adaptado de LOUREIRO et al., 2002).

A exposição perinatal à cocaína mostrou anormalidades morfológicas e neurocomportamentais (ANDERSON-BROWN et al., 1990). De acordo com este estudo, a cocaína inibiu a síntese de DNA no cerebelo e no córtex de ratos neonatos. Quanto mais jovem o animal, maior a diminuição da síntese de DNA. Após 15 dias de vida, o efeito da cocaína não foi mais significativo. Os dados sugerem que a cocaína afeta o desenvolvimento encefálico, pelo menos em parte, por meio da interferência direta com a síntese de DNA.

1.9.3. Cultura Primária de Hipocampo como Modelo de Avaliação da Neurotoxicidade

A cultura primária de células do sistema nervoso constitui uma ferramenta muito importante utilizada na avaliação da neurotoxicidade e do mecanismo de ação tóxico de xenobióticos. A compreensão desses mecanismos é de suma importância não somente para a avaliação do risco, mas também para o desenvolvimento de estratégias que visam evitar ou minimizar os danos causados após exposição à

agentes tóxicos. Nas culturas primárias do sistema nervoso, as células são extraídas de organismos vivos, utilizando estruturas encefálicas de fetos de ratos (cultura neuronal) ou de ratos com 2 dias de vida (cultura de macro e microglia), e cultivadas com meio de cultura específico para cada modelo por um período superior a 24 horas. Geralmente a similaridade entre um sistema experimental e uma situação *in vivo* está diretamente relacionada ao grau de complexidade de um modelo *in vitro*. Uma vez que as linhagens celulares são menos complexas, elas se assemelham pouco a uma condição *in vivo* e, sob esse ponto de vista, a cultura primária é um modelo *in vitro* mais próximo ao fisiológico (SILVA et al., 2006).

O hipocampo é uma estrutura encefálica curva, localizada no meio do lobo temporal, envolvida em processos cognitivos, como a memória; tem participação direta em doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer; e está envolvida em prejuízo cognitivo associado ao uso de drogas (BOLLA et al., 1999; DI SCLAFANI et al., 2002; FATTORE et al., 2002; CUNHA et al. 2004). Essa estrutura apresenta múltiplas camadas, sendo constituída pelo *giro dentado* (GD), que contém a *fascia dentata* e o *hilus*; e o *cornu ammonis* (CA), que é subdividido em CA1, CA2 e CA3. Ambos apresentam estratos com variação da composição celular e da projeção neuronal. Existem basicamente dois tipos celulares: as *células piramidais*, principais neurônios excitatórios do hipocampo, cujos corpos celulares encontram-se no estrato piramidal; e as *células granulares*, cujos corpos celulares estão localizados no estrato granuloso do GD (AMARAL, 1978; AMARAL & LAVENEX, 2007).

Na cultura de neurônios hipocampais há predominância de células piramidais uma vez que as células granulares ainda não estão presentes no período pré-natal (ARACAVA et al., 1987). Aproximadamente dois terços das células podem

responder aos agonistas nicotínicos via subunidade α7 de receptores nicotínicos ionotrópicos (nAChRs), além de receptores para *N*-metil-D-aspartato (NMDA), que são receptores ionotrópicos ativados pelo glutamato, cuja ativação está envolvida em mecanismos de aquisição de memória e aprendizado (ARACAVA et al., 2005; LENDVAI & VIZI, 2008). ARACAVA et al. (1987) demonstraram que agonistas de nAChRs, como a anatoxina-*a* e a acetilcolina (ACh), foram capazes de ativar esses receptores em células de cultura de hipocampo neonatal. Comparado aos nAChRs periféricos, o autor menciona ainda que é necessário uma concentração de 5-10 vezes maior de ambas as substâncias para ativar esses receptores em neurônios hipocampais. O hipocampo é uma estrutura límbica com conexões estruturais bem definidas, compostas por neurônios principais excitatórios e interneurônios inibitórios (ALKONDON & ALBUQUERQUE, 2002). Por causa das sinapses formadas entre os interneurônios GABAérgicos e ambos os neurônios piramidais e interneurônios, a ativação de nAChRs presentes em certos interneurônios pode induzir tanto inibição quanto desinibição do circuito hipocampal. Neurônios piramidais do hipocampo mostraram imunorreatividade para diferentes subunidades de nAChRs, incluindo as subunidades α7 e β2. Ainda, esses neurônios expressam as subunidades α4, α5, β2, β3 e β4 de nAChRs. Em cultura celular, a imunocoloração da subunidade α7 de nAChRs mostrou que apenas 17% dos neurônios imunopositivos eram GABAérgicos, enquanto que os 83% restantes, presumivelmente, eram compostos por neurônios piramidais glutamatérgicos (LENDVAI & VIZI, 2008).

Baseado nos estudos mencionados anteriormente, a cultura primária de hipocampo é muito bem caracterizada na literatura e constitui um modelo experimental interessante na avaliação da neurotoxicidade de substâncias. Sabe-se que a cocaína causa deficiências cognitivas e neurodegeneração por meio de

mecanismos como o estresse oxidativo (FANTEL et al., 2002; SHARAN et al., 2003), no entanto, pouco se sabe a respeito do dano que a cocaína possa causar no DNA. Mais ainda, nenhuma informação existe referente aos possíveis efeitos neurodegenerativos, nem na produção de estresse oxidativo ou dano em DNA pela AEME. É importante também destacar que não existem estudos avaliando o efeito da cocaína em neurônios hipocampais.

2. Objetivo

2. Objetivo

OBJETIVO GERAL

Avaliar os possíveis efeitos neurotóxicos da cocaína e do seu produto de pirólise, a metilecgonidina (AEME), em cultura primária de hipocampo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar, após exposição à AEME, à cocaína e à associação entre essas substâncias:

- ⇨ A viabilidade celular, utilizando o ensaio de redução de MTT;
- ⇨ A citotoxicidade, por meio da liberação da enzima LDH;
- ⇨ A morfologia celular, por microscopia de fluorescência confocal.
- ⇨ A atividade de enzimas antioxidantes (GPx, GR e GST);
- ⇨ A formação de MDA.

Avaliar a formação de adutos entre a cocaína, a AEME com o DNA.

3. Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Para a confirmação estrutural da AEME, foi utilizado um equipamento de Ressonância Magnética Nuclear de ^{1}H (RMN-^{1}H) *Bruker® (Karls-ruhe, Germany) DPX 300*, o qual opera a uma frequência de 300,1 MHz para o núcleo de hidrogênio e de 75,1 MHz de para o núcleo de ^{13}C; e um espectrômetro de massas com ionização por *eletrospray* (ESI-MS) *Bruker® (Karls-ruhe, Germany)*.

Os ensaios envolvendo espectrofotometria foram realizados em um espectrofotômetro da *Bio-Tek Instruments INC*, modelo *Power Wave x 340* e *software KC4 v3.0*.

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da *Shimadzu (Kyoto, Japão)* equipado com duas bombas *LC-20AT*, um detector de arranjo de fotodiodos *PDA-20AV*, um auto-injetor *(Proeminence SIL-20AC)* e um forno para colunas *(CTO-10AS/VP)*, todos controlados por um módulo de comunicação *CBM-20A* e o *software LC-Solution*.

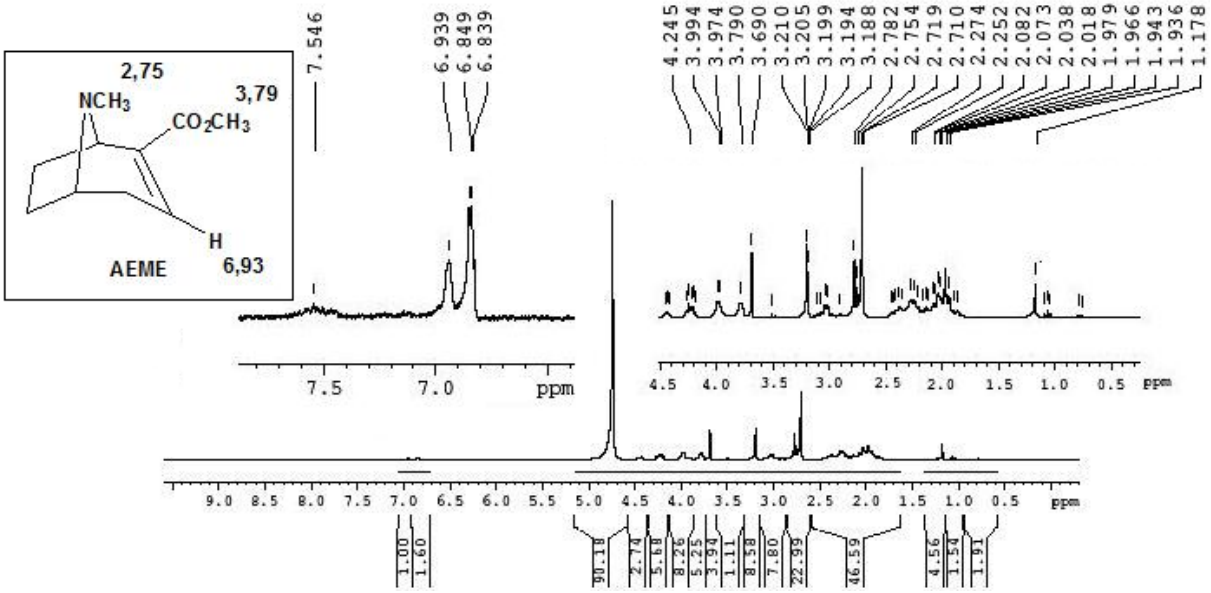
3.2. SÍNTESE DA AEME

A síntese da AEME foi realizada utilizando-se cocaína como material de partida. A cocaína foi gentilmente cedida pelo Núcleo de Exames de Entorpecentes do Instituto de Criminalística de São Paulo para fins de pesquisa do Laboratório de Análises Toxicológicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Uma solução de cloridrato de cocaína foi refluxada em ácido clorídrico concentrado por 24 horas. Após o resfriamento à temperatura ambiente, a mistura foi diluída com água e extraída com éter dietílico para remoção do ácido benzóico. A

fase aquosa foi evaporada sob vácuo até a secura. O sólido branco obtido foi então secado sob vácuo a 100°C por 24 horas (ZHANG et al., 1997). O resíduo seco foi dissolvido em metanol absoluto e adicionou-se ácido clorídrico concentrado. A mistura foi aquecida e refluxada por aproximadamente 24 horas. Após este período, removeu-se o álcool sob vácuo e dissolveu-se o resíduo em uma pequena quantidade de água. A solução aquosa foi saturada com carbonato de potássio, filtrada e extraída com éter. As frações orgânicas foram combinadas, secadas com sulfato de magnésio, filtradas e evaporadas sob vácuo, resultando em um líquido amarelado. O produto foi purificado por destilação a pressão reduzida e identificado por RMN-^{1}H e por ESI-MS (Figura 10) (KLINE et al., 1990). Na análise por RMN-^{1}H (Figura 10 A), o equipamento foi ajustado a 300 MHz e o solvente utilizado foi o metanol deuterado (CD_3OD). Os deslocamentos químicos (δ) obtidos, em ppm, foram registrados em relação ao padrão interno, o trimetilsilano (TMS; δ 0,00 ppm). O ESI-MS foi realizado em dois modos: no modo *scan* (Figura 10 B1) para verificação do íon *quasi* molecular, que representa normalmente a massa molecular da substância de interesse; e no de fragmentação desse íon, também conhecido com MS2 (Figura 10 B2), que quebra a molécula em fragmentos de massa molecular previsíveis, caracterizando a estrutura química.

A



B

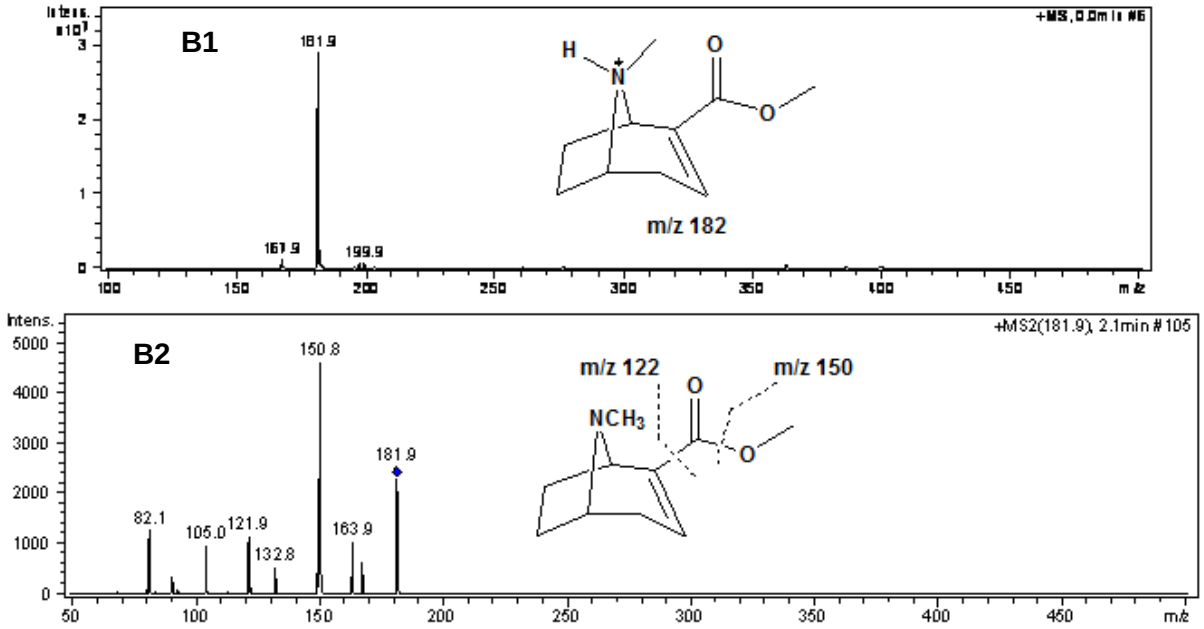


Figura 10 – Confirmação estrutural da AEME por: (A) Ressonância magnética nuclear de ^{1}H – RMN-^{1}H (300 MHz, CH_3OD): δ_H 6,93 (1H, s) referente ao átomo de H da dupla ligação; 3,79 (3H, s) referente à metoxila; 2,75 (3H, s) referente à metila ligada ao nitrogênio; 1,93 a 2,78 referente aos demais átomos de H do anel; e (B) Espectrometria de Massas (ESI-MS). Espectro de massas: (B1) modo *scan* e (B2) modo MS2. (m/z): 182 [M + H^+]; 150 [M – OCH_3]; 122 [M – $COOCH_3$].

3.3. CULTURA PRIMÁRIA DE HIPOCAMPO

Foram utilizadas ratas *Wistar* grávidas mantidas no Biotério do Laboratório de Farmacologia, fornecidas pelo Biotério Central do Instituto Butantan. As culturas foram realizadas em parceria com o Laboratório de Farmacologia da Unidade de Farmacologia do Instituto Butantan, com o apoio da Profa. Dra. Maria Regina Lopes Sandoval e da Profa. Dra. Solange Castro Afeche.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA protocolo n° 142 – ANEXO 1) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB protocolo n° 372/07 – ANEXO 2).

Os animais foram mantidos sob condições de livre acesso a água e a comida (ração para roedores – Nuvilab CR1®), com temperatura controlada (21 ± 2 °C) e ciclo claro-escuro de doze horas (luz ligada às 7h00). Os animais foram mantidos em caixas de polietileno (16 cm de altura, 30 cm de largura e 38 cm de comprimento) forradas com maravalha e com 2 fêmeas. Todos os experimentos foram realizados no período claro (8h00 – 12h00). Para o cruzamento, é colocado 1 macho para cada 2 fêmeas, permanecendo por uma noite. Na manhã seguinte, os animais são separados e é feito o lavado vaginal das ratas para verificação da prenhez. Uma vez constatada a prenhez, as ratas são separadas e identificadas.

Para cada placa de cultura de 12 ou 96 poços foram utilizados cerca de 10 fetos de ratos Wistar com 18-19 dias de vida embrionária. A rata grávida foi anestesiada com pentobarbital (45 mg/kg) e foi feita uma cesariana para retirada dos filhotes.

Os fetos foram decapitados com tesoura, a caixa craniana foi aberta e, após separação dos hemisférios cerebrais, os hipocampos foram visualizados, com o auxílio de uma lupa, e dissecados, sobre papel de filtro umedecido em solução de

Hanks, em cima de uma placa de Petri mantida resfriada com gelo por baixo. Os hipocampos foram então transferidos para um Falcon contendo 100 U/mL de penicilina e 100 μg/mL de estreptomicina em uma solução de meio neurobasal estéril.

O isolamento das células hipocampais foi feito utilizando-se o método de digestão proteolítica com tripsina (BANKER & COWAN, 1977; HUETTNER et al., 1986; JAHR et al., 1987; SILVA et al., 2006). Assim, sob fluxo laminar, os hipocampos foram transferidos para uma placa de Petri, onde foram lavados com solução de Hanks e picotados de modo a se obter pedaços menores de tecido. O material foi então transferido, com uma pipeta Pasteur, para um tubo de centrífuga (50 mL) contendo uma solução de tripsina (0,25%), a qual teve o seu pH acertado para 7,4 com carbogênio. O tubo contendo os fragmentos de hipocampo foi colocado em banho com agitação plana a 37 °C, permanecendo por 10 minutos. Em seguida, foi feita aspiração da solução resultante da digestão com tripsina e este foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL com 2 mL de solução de descanso [4 mL de solução balanceada de Earle (Earle's Balanced Salt Solution – EBSS), 222 μL de DNAse 5000 U/mL ressuspensa em EBSS e 444 μL de soro fetal bovino (SFB) 10%, ajustando o pH para 7,2-7,4 com carbogênio]. O tubo foi centrifugado a 1.258 rpm (300g) por 2 minutos a 20 ºC. O sobrenadante foi desprezado e ressuspenso nos 2 mL restantes da solução de descanso. Posteriormente o tecido foi disperso com 3 pipetas Pasteur de diâmetros decrescentes, cerca de 20 vezes cada. O frasco foi centrifugado a 1258 rpm (300g) por 5 minutos a 20 ºC sendo que o sobrenadante foi desprezado e o restante foi ressuspenso em 1 mL de *meio pronto* constituído de 40 mL de meio neurobasal, com ou sem fenol, 100 μL de glutamina 200 mM, 400 μL de penicilina/estreptomicia (10000 U/mL de penicilina e 10000 μg/mL de estreptomicina

em 0,85% de solução salina), 800 μL de suplemento B27 e 100 μL de glutamato 10 mM. O suplemento B27 acrescentado ao meio de cultura, além de aumentar a sobrevivência celular e promover o desenvolvimento de neuritos de neurônios hipocampais, diminui a proliferação de células gliais (XIE et al., 2000). Além disso, a utilização de fetos com 18-19 dias de vida embrionária também minimiza a contaminação da cultura com células da glia (SILVA et al., 2006). Para comprovar a predominância de neurônios na cultura, foi realizada a caracterização da mesma por imuno-histoquímica, conforme item 3.3.1.

Uma alíquota de 10 μL foi retirada e corada com 10 μL de azul de Tripan (concentração de 1% em PBS) para a contagem das células obtidas em câmara de Neubauer. De acordo com o número de células contadas (**n**), temos que:

Número de células/mL = **n**x2x10^4	Onde: 2 corresponde à diluição e 10^4 corresponde ao volume de células na câmara de Neubauer.

Em função do número de células obtido, foi realizada diluição com *meio pronto* de modo a obter o número de células adequado para cada tipo de experimento, conforme padronização prévia para cada ensaio (ver itens 3.3.3., 3.4.1 e 3.4.2). Posteriormente, as células foram incubadas em estufa com 5% de CO_2 a 37 °C por 40 minutos e, então, foi adicionado *meio pronto* de modo que o volume final fosse de 1,5; 1,0 e 0,2 mL nas placas de 12, 24 e 96 poços, respectivamente.

As células permaneceram em estufa, nas mesmas condições descritas anteriormente, e foram armazenadas em *meio pronto* por 6 dias, sendo que, no segundo dia, metade do meio de cultura foi substituído por um *meio pronto* novo. No 7º dia, foi feita incubação com cocaína e AEME por 3, 6, 12, 24 e 48 horas, de acordo com o experimento realizado.

Para melhor aderência dos neurônios, tanto as lamínulas colocadas na placa de 12 poços quanto os poços da placa de 24 e de 96 poços foram previamente tratados com poli-L-lisina (PLL). Em fluxo laminar, foi colocado nos poços de uma placa esterilizada (24 ou 96 poços) ou em lamínulas autoclavadas (12 poços) quantidade suficiente de PLL para cobrí-los. Após cerca de meia hora, toda PLL foi retirada e foi aguardado cerca de 30 minutos para que os poços e/ou as lamínulas estivessem secos. A placa foi lavada com água Milli-Q filtrada, retirando-se o excedente de água e, após a evaporação de toda a água, a placa foi embrulhada em papel alumínio e armazenada em refrigerador.

3.3.1. Caracterização Celular da Cultura

A caracterização celular da cultura foi realizada por imuno-histoquímica, de acordo com KIVELL et al. (2001). As células foram cultivadas em placa de 12 poços contendo uma lamínula com cerca de $2{,}65 \times 10^5$ células por poço. No 7° dia de cultura, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com uma solução de PBS gelado sendo, posteriormente, fixadas com uma solução contendo acetona e metanol (1:1) por 10 minutos a -20°C. Após esse período, as células foram permeabilizadas com uma solução de PBS contendo Triton 0,2% por 30 minutos a temperatura ambiente. Para prevenir a ligação não específica dos anticorpos, as lamínulas foram bloqueadas, por 30 minutos a temperatura ambiente, com uma solução de PBS contendo NGS (*normal goat serum*) 2%, BSA (*bovine serum albumin*) 4% e Triton 0,2%. As células neuronais foram marcadas com anticorpo primário de camudongo antiproteína associada ao microtúbulo 2 (anti-MAP-2, Sigma®), diluído 2.000 vezes, por 24 horas a 4°C, enquanto que, para a astroglia, foi utilizado anticorpo de coelho antiproteína glial fibrilar ácida (anti-GFAP), diluído

1.500 vezes, por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS (3 vezes de 5 minutos) e incubadas por mais 1 hora com anticorpo secundário anticamundongo (fluoresceína, 1:200, Jackson®) e anticoelho (vermelho, 1:200, Jackson®). Após lavagem (3 vezes de 5 minutos), as lamínulas foram colocadas sobre as lâminas contendo 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI, Vector®), que cora o núcleo de todas as células da cultura. Finalmente, as células foram visualizadas por microscopia de fluorescência.

3.4. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR E MORFOLOGIA

Como parâmetros quantitativos de viabilidade celular, foram utilizados os métodos de viabilidade celular do MTT e da liberação da lactado desidrogenase (LDH). Estes métodos foram previamente padronizados para se estabelecer o número de células que deveria ser utilizado em cada ensaio (ver itens 3.4.1 e 3.4.2).

Após a padronização do número de células, foram realizados ensaios com concentrações variadas (10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2}, 10^{-1}, 1, 2, 4, 6, 8 e 10 mM) de cocaína e AEME para a verificação das doses que levam à neurodegeneração, bem como para o estabelecimento do tempo de exposição das células (3, 6, 12, 24 e 48 horas). As concentrações e os tempos de exposição tiveram como base os trabalhos de IMAM et al. (2005) e NASSOGNE et al. (1997). Após a definição das doses e do tempo de exposição adequados, foram realizados os seguintes grupos experimentais: controle (sem adição de substância), grupo cocaína (COC), grupo AEME e, para verificar a existência ou não de interação entre as substâncias, foi realizado o grupo COC + AEME. Tanto no teste do MTT quanto no LDH, as amostras foram analisadas em quintuplicata (5 poços/grupo).

Foram avaliadas também as alterações morfológicas desencadeadas pelos agentes toxicantes (COC e AEME) por microscopia de fluorescência confocal após 24 e 48 horas de exposição.

3.4.1. Determinação da Viabilidade Celular (MTT)

O brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólio, ou simplesmente brometo de tetrazólio (MTT), pode ser utilizado para medir a atividade metabólica das células viáveis (MOSMANN, T., 1983; LIU et al., 1997). O MTT é reduzido a *formazan* (precipitado de coloração violeta), pela succinato desidrogenase mitocondrial, uma enzima que é ativa em células com metabolismo da cadeia respiratória intacto (Figura 11). Assim, o *formazan* é quantificado espectrofotometricamente e possui correlação direta com o número de células viáveis.

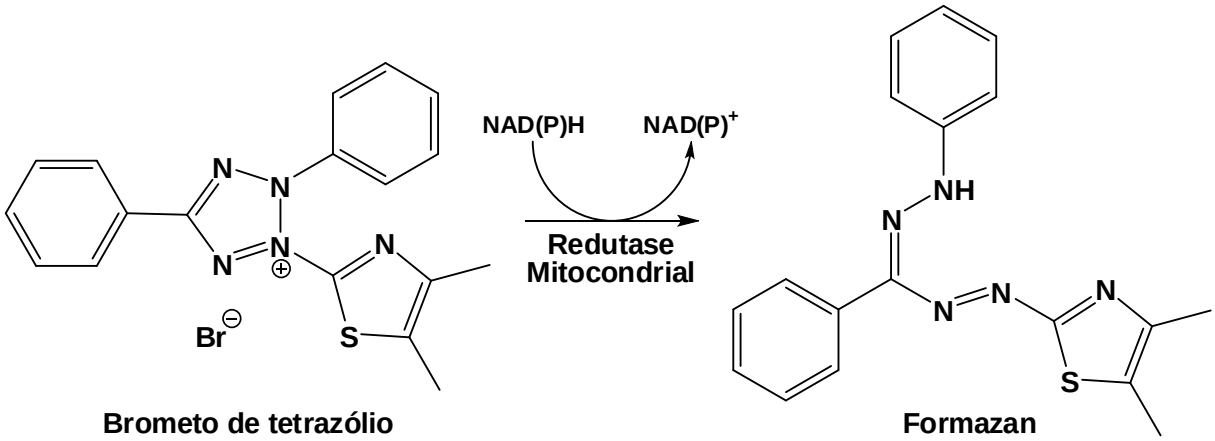


Figura 11 – Reação de redução de MTT à *formazan* pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial.

Para a padronização do método, foram feitos testes com diferentes números de células. Foi utilizado um controle (CTRL) e dois controles positivos: glutamato 2 mM (GLU 2 mM) e cloreto de potássio 250 mM (KCl 250 mM). Os resultados estão

expressos em % de células que reduziram quimicamente o MTT a *formazan* em relação ao grupo CTRL (Figura 12).

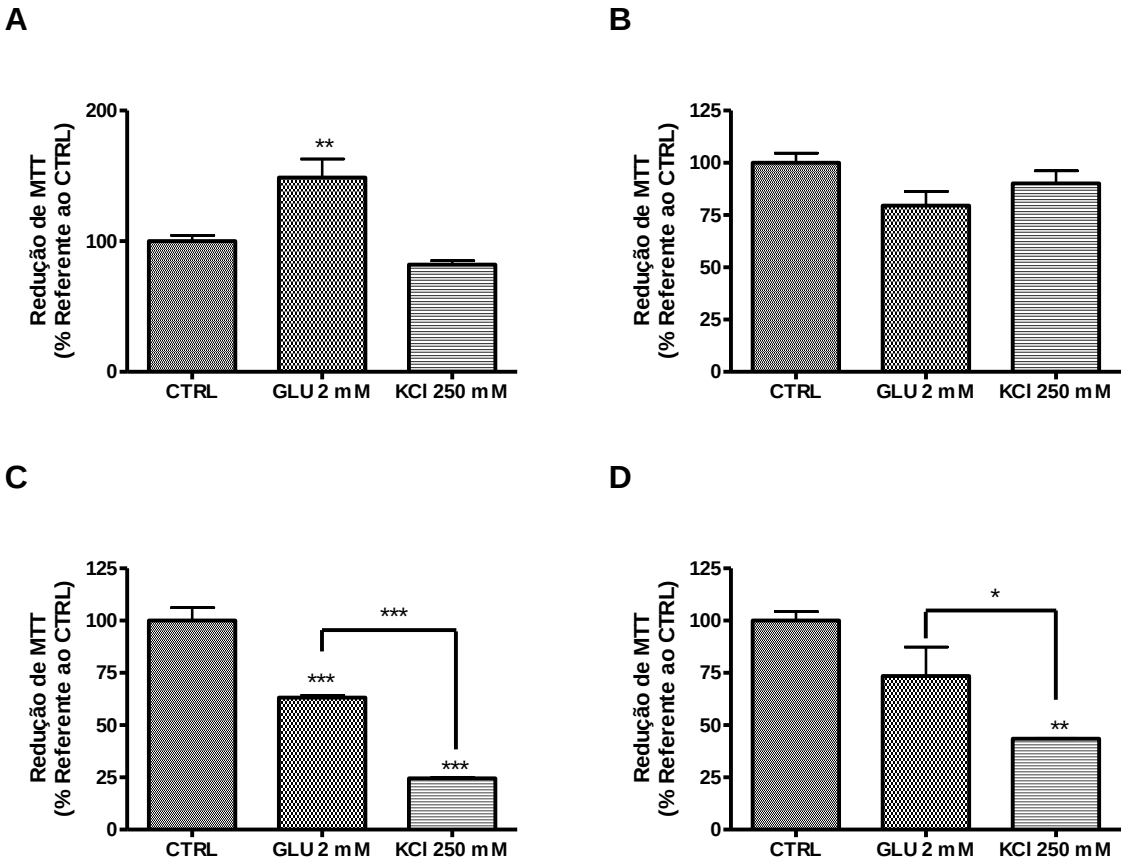


Figura 12 – Padronização do ensaio de MTT (n = 5). Variação da quantidade de células por poço: A) 10^2; B) 10^3; C) 10^4 e D) 10^5 células. CTRL = controle; GLU = glutamato; KCl = cloreto de potássio. *$*p < 0,05$; $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ (ANOVA e comparação múltipla de Newman-Keuls)*.

A partir deste resultado, concluiu-se que, para o ensaio do MTT, deve-se utilizar uma concentração de 10^4 células/poço, tendo em vista que foi o resultado mais reprodutível; e KCl 250 mM como grupo controle positivo, uma vez que atingiu altos níveis de mortalidade celular.

Outro parâmetro que foi avaliado durante a padronização foi o percentual de células viáveis do grupo CTRL após 24 e 48 horas de incubação. A Figura 13 mostra que não houve morte celular entre o intervalo de 24 e 48 horas.

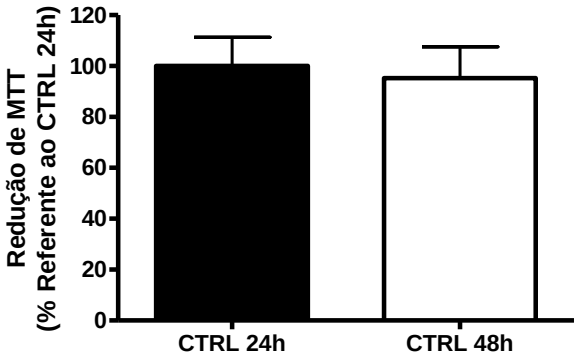


Figura 13 – Percentual de células viáveis em relação ao grupo CTRL após 24 horas de incubação, utilizando 10^4 células/poço (n = 5). CTRL = controle. *Teste "t" de Student*.

O ensaio do MTT foi realizado conforme descrito a seguir. Após o período de incubação com as substâncias de interesse, todo o meio foi retirado, adicionando-se 100 μL de solução de MTT [MTT 5 mg/mL em tampão fosfato salina (PBS) e meio Neurobasal sem fenol; proporção 1:9 v/v]. Após três horas de incubação a 5% de CO_2 e 37 °C, foi adicionado 100 μL da solução de lise (dimetilsulfóxido – DMSO) a cada poço. A placa foi agitada por, aproximadamente, 30 minutos para a solubilização dos precipitados e, em seguida, foi feita a medida de absorbância a 540 nm (IOUDINA et al., 2004; ABE et al., 1999).

3.4.2. Determinação da Citotoxicidade (LDH)

A citotoxicidade ou morte celular por necrose pode ser determinada pela integridade da membrana. A enzima intracelular lactato desidrogenase (LDH) é liberada rapidamente para o meio de cultura quando a membrana celular é danificada. Essa enzima converte piruvato a lactato, consumindo NADH (Figura 14). O consumo de NADH, medido cineticamente no sobrenadante, está diretamente relacionado ao LDH liberado (SILVA et al., 2006; JIN et al., 2007). Portanto, a viabilidade celular é inversamente proporcional à quantidade de LDH liberado. O

consumo de NADH exibe uma reta descendente cujo valor de sua tangente é utilizado nos cálculos.

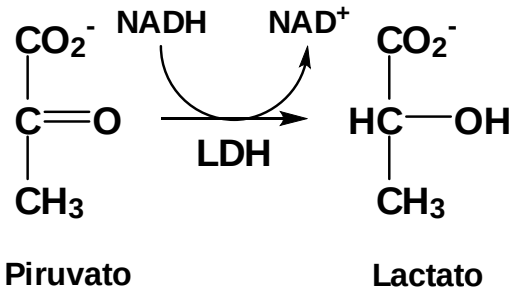


Figura 14 – Reação enzimática da conversão de piruvato a lactato pela lactato desidrogenase na presença de NADH.

Assim como no ensaio do MTT, para a padronização deste método foram feitos testes com diferentes números de células. Nesta padronização, não foi utilizado glutamato (2 mM), pois precisávamos de uma substância que sabidamente rompesse a membrana celular. Os resultados estão descritos na Figura 15.

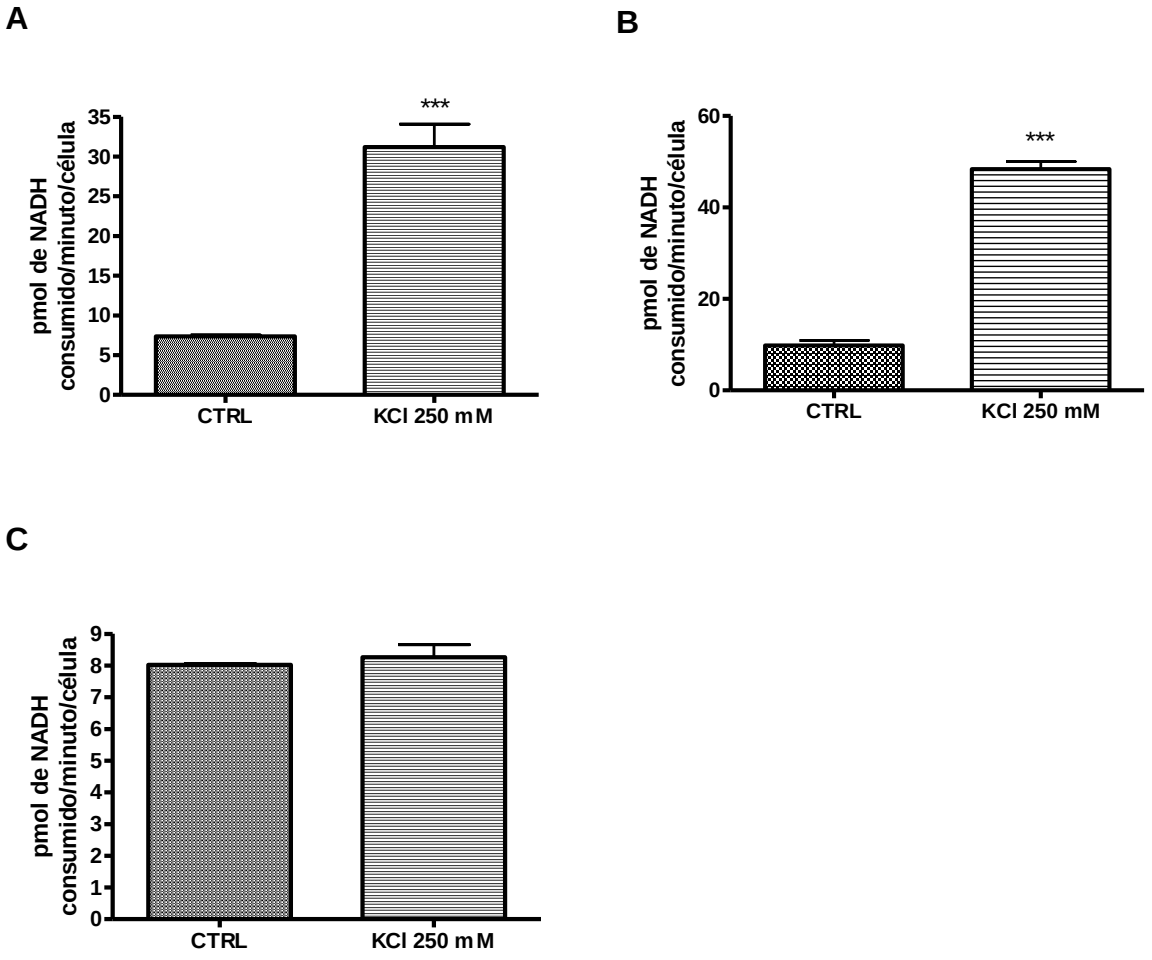


Figura 15 – Padronização do ensaio de LDH (n = 5). Variação da quantidade de células por poço: A) 10^4, B) 10^5 e C) 10^6 células. CTRL = controle; KCl = cloreto de potássio. ****p < 0,001 (Teste "t" de Student)*.

A partir dos resultados, conclui-se que, para o ensaio da enzima LDH, deve-se usar uma concentração de 10^4 ou 10^5 células/poço. A utilização de 10^6 células/poço foi inviável uma vez que as células aderiram à placa, mas não sobreviveram. Desta maneira, com a finalidade de aumentar a sensibilidade do método, foi utilizado, para este teste, a maior quantidade de células possível, ou seja, 10^5 células/poço.

O ensaio de LDH foi realizado conforme descrito a seguir. Foram adicionados 20 μL do sobrenadante da amostra em uma placa de 96 poços e adicionou-se 170 μL de tampão composto por: tris HCl 120 mM, NADH 3,4 mM, antimicina-A 50 μg/mL em etanol, triton-X 100 a 1% e água Mili-Q na proporção 50:5:1:5:32. Foi feita a

medida de absorbância das amostras a 340 nm com intervalos de 20 segundos por 15 a 20 minutos, ou até verificar a estabilização da leitura. Este procedimento é realizado para garantir que todo o piruvato existente na amostra tenha sido consumido e não interfira na reação posterior. Após a estabilização das amostras, foram adicionados 10 μL da solução de piruvato (20 mM) a cada amostra e imediatamente mediu-se a absorbância a 340 nm por, no mínimo 5 minutos, com intervalos de 20 segundos. A curva de cinética enzimática foi traçada a partir de uma região linear do gráfico de, no mínimo, 3 minutos (JAYALAKSHMI et al., 2005).

3.4.3. Microscopia de Fluorescência Confocal

Em um microscópio de fluorescência convencional, toda a amostra é atingida por uma fonte luminosa. De acordo com a conservação e a propagação da intensidade luminosa, todas as partes da amostra que estiverem no caminho óptico serão excitadas e a fluorescência será detectada por um fotodetector ou uma câmera. Paralelamente, a microscopia confocal utiliza a iluminação pontual e um pequeno orifício, chamado *pinhole*, em um plano conjugado opticamente em frente ao detector para eliminar toda a informação fora do foco, detectando-se apenas a luz dentro do plano focal, aumentando a qualidade da imagem.

A morfologia da morte celular é observada em microscópio de fluorescência utilizando um filtro azul e aumento de 40 vezes. Laranja de acridila (LA) e brometo de etídio (BE) são corantes que se intercalam ao DNA celular, os quais exibem fluorescência sob excitação de uma luz ultravioleta. LA tem a característica de penetrar no interior celular, independente de sua integridade, enquanto que BE somente penetra em células que apresentam danos de membrana celular. Por meio de um filtro azul e da luz ultravioleta, as células coradas com LA são visualizadas em

verde, enquanto que as células coradas com BE são visualizadas em laranja. Como BE é um corante mais potente, sua coloração encobre a coloração do LA quando ambos estão no interior das células, tornando as células totalmente coradas em laranja (MERCILLE et al., 1994).

As amostras dos cultivos celulares em lamínulas dentro de microplacas de 12 poços, cada um contendo cerca de $2,65x10^5$ células, foram misturadas em igual volume com uma solução contendo 100 μg/mL de LA e 100 μg/mL de BE. Como conservante de fluorescência, foi utilizado MOWIOL-DABCO.

As amostras foram analisadas em duplicata (2 lâminas/grupo), sendo tiradas 10 fotos/campo.

3.5. AVALIAÇÃO DO DANO OXIDATIVO

Na tentativa de se verificar o envolvimento do estresse oxidativo no mecanismo de morte neuronal, foram avaliados os seguintes parâmetros: formação de adutos com o ácido desoxirribonucléico (DNA); análise das atividades das principais enzimas antioxidantes que compõe o SNC, como a glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase (GR) e glutationa S-transferase (GST) (Figura 7) e ocorrência de peroxidação lipídica pela mensuração de malonaldeído (MDA).

3.5.1. Avaliação do Dano em DNA

As análises de dano em DNA foram realizadas em duas etapas: 1) incubação das substâncias de interesse com a mais reativa das bases nitrogenadas, a desoxiguanosina (d-G); 2) incubação das substâncias de interesse com DNA comercial (SIGMA®). Na primeira etapa, testa-se o grau de afinidade das substâncias de interesse pela base nitrogenada mais reativa, a d-G. No entanto, é

necessário realizar o teste na presença de DNA, em função de sua estrutura helicoidal e da presença de outras bases nitrogenadas, como adenina, timina e citosina. Assim, a incubação com DNA comercial avalia se houve ou não reação com outras bases nitrogenadas, ou se as substâncias intercalaram-se entre as mesmas (LOUREIRO et al., 2002).

Estes ensaios foram realizados com a colaboração da Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

3.5.1.1. Formação de Adutos com Desoxiguanosina (d-G)

A avaliação de aduto com a mais reativa das bases nitrogenadas, a desoxiguanosina (d-G), com as substâncias de interesse foi realizada na proporção 5 d-G: 1 substância (LOUREIRO et al., 2002). O ensaio com a d-G foi realizado conforme descrito a seguir: 300 µL de uma solução 1,7 mg de d-G/mL foi incubada com 300 µL de uma solução 0,34 mg da substância (cocaína ou AEME)/mL a 50 °C por 24 horas. Este procedimento foi repetido tanto para pH 7,4 (tampão fosfato 0,2 M) quanto para pH 11 (tampão carbonato 50 mM). Em pH elevado, a d-G encontra-se completamente ionizada, facilitando qualquer reação química entre a substância de interesse com a base nitrogenada. Após o período de incubação, a mistura foi injetada em um CLAE equipado com uma coluna de fase reversa (C-18; 250 mm x 4,6 mm, 5 µm), gradiente de fase móvel (Tabela 3), composta por água e acetonitrila, fluxo de 1 mL/minuto e detector espectrofotométrico (λ = 254 nm).

As amostras foram analisadas em triplicata.

Tabela 3 – Composição da fase móvel durante a análise de formação de adutos com a d-G.

Tempo (minutos)	Acetonitrila (%)
0	5
5	5
50	100
55	100
57	5
67	5

3.5.1.2. Formação de Adutos com DNA

Experimentos com DNA comercial (SIGMA®) foram realizados de maneira semelhante ao item anterior. O ensaio para verificar a formação de adutos com o DNA compõe-se basicamente de 3 etapas: incubação, precipitação e hidrólise do DNA.

O ensaio de incubação com DNA comercial foi realizado conforme descrito a seguir: 500 μL de uma solução 1,0 mg de DNA/mL foi incubada com 100 μL de uma solução 10,0 mg da substância (cocaína ou AEME)/mL a 50 °C por 24 horas. Este procedimento foi repetido tanto para pH 7,4 (tampão fosfato 0,2 M) quanto para pH 11 (tampão carbonato 50 mM) pelos mesmos motivos mencionados no item anterior.

Após o período de incubação, procedeu-se a precipitação do DNA. À mistura foi adicionado acetato de sódio 3 M e 1 mL de isopropanol. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 5.000g por 15 minutos e o sobrenadante foi desprezado. O precipitado foi lavado 2 vezes com etanol 70% (ressuspenso e centrifugado a 5.000g por 15 minutos). Foram adicionados 500 μL de água para solubilizar o precipitado formado e a mistura foi mantida em geladeira por 30 minutos. Posteriormente, 20 μL dessa amostra foram diluídos em água q.s.p. 1,0 mL. Essa amostra foi lida em espectrofotômetro (varredura de 200 a 400 nm) para se determinar a concentração

de DNA presente na amostra após a etapa de precipitação (em 260 nm, uma solução contendo 50 μg de DNA/mL apresenta uma absorbância de 1,000).

A hidrólise enzimática do DNA para análise por CLAE foi feita segundo o procedimento descrito a seguir. A uma alíquota de solução contendo 100 μg de DNA foram adicionados 10 μL de tampão Tris-HCl 0,2 M (pH 7,4) e 10 μL de $MgCl_2$ 2 M. Em seguida, foi adicionada 1,25 U de DNAse 1 e a amostra foi incubada a 37 °C por 1,5 horas. Foram então adicionados 10 μL de tampão glicina-acetato 0,2 M (pH 10) e 0,008 U de fosfodiesterase 1 (PDE 1) e feita nova incubação a 37 °C por 1,5 horas. Finalmente, foram adicionados 25 μL de tampão Tris-HCl-$MgCl_2$ 0,2 M (pH 7,4) e 3 U de fofatase alcalina. A amostra foi incubada a 37 °C por 1 hora. O volume final da solução foi ajustado para 200 μL com água. A mistura foi injetada em um CLAE nas mesmas condições que o item anterior.

As amostras foram analisadas em triplicata.

3.5.2. Enzimas Antioxidantes

Para a realização dos ensaios de atividade enzimática, as células foram descoladas dos poços de uma placa de 24 poços, cada um contendo cerca de $5x10^5$ células, de duas maneiras distintas: remoção mecânica e química. Na primeira, as células foram descoladas com um aparato específico (semelhante a um “rodo”) e submetidas à centrifugação (5 minutos a 10.000 rpm), sendo, posteriormente, lavadas e mantidas em solução tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3). Na remoção química, todo o meio de cultura foi removido e uma solução de tripsina 0,25% foi adicionada, por 5 minutos, para descolar as células dos poços da placa de cultura, sendo adicionada, posteriormente, uma solução de SFB 10% para interromper a reação da tripsina. Os frascos contendo as células removidas foram submetidos à

centrifugação, lavagem e armazenamento seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente.

Apesar de ser mais trabalhosa, a remoção química mostrou-se mais eficiente, uma vez que, na mesma cultura, o coeficiente angular foi maior, em módulo, assim como a concentração protéica, mostrando que um maior número de células foi removido com este procedimento (Tabela 4).

Tabela 4 – Exemplo de equações de reta representando o consumo de NADPH durante o ensaio da GPx (n = 3). Foram utilizados, nesta padronização, 30 μL de amostras controle (CTRL) 48 horas.

Método de remoção	Equação de reta ($y = a \cdot x + b$)	Coeficiente de correlação linear (R^2)	[Proteína] (μg/mL)
Mecânico	a = -0,0058 b = 0,0625	0,9924	3,89
	a = -0,0057 b = 0,0617	0,9931	4,31
Químico	a = -0,0089 b = 0,0803	0,9976	7,92
	a = -0,0085 b = 0,0644	0,9978	7,67

Os procedimentos descritos a seguir foram padronizados para garantir a maior sensibilidade, utilizando a remoção química, e os resultados foram expressos em relação ao conteúdo de proteína das amostras (item 3.5.4)

3.5.2.1. Atividade Enzimática da Glutationa Peroxidase (GPx)

A atividade da GPx é medida indiretamente pela reação conjunta com a glutationa redutase (GR), onde a oxidação de NADPH a $NADP^+$ é acompanhada pelo decaimento da absorbância a 340 nm e à 37 °C (FLOHÉ & GÜNZLER, 1984). A

glutationa oxidada (GSSG), produzida pela redução de hidroperóxidos pela GPx, é reciclada para gerar seu estado reduzido (GSH) pela GR e NADPH, conforme a Figura 16.

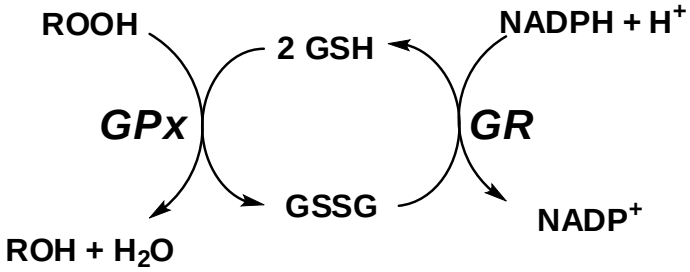


Figura 16 – Ensaio para a determinação da atividade enzimática da GPx. O terc-butil hidroperóxido, representado por ROOH, é o substrato da reação catalisada pela GPx. Álcool terc-butílico (ROH) é um dos produtos da reação.

Para a padronização do método, foram feitos testes com volumes de amostra diferentes (30 e 40 μL) de uma solução contendo $2{,}5 \times 10^6$ células lisadas/mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,3. Foram utilizadas amostras controle (CTRL) 48 horas para o ensaio de padronização.

A Tabela 5 mostra a cinética da GPx em célula hipocampal após utilização de diferentes volumes de amostra.

Tabela 5 – Exemplo de equações de reta representando o consumo de NADPH durante a padronização do ensaio da GPx (n = 3).

Grupo	Volume de amostra (μL)	Equação de reta ($y = a \cdot x + b$)	Coeficiente de correlação linear (R^2)
CTRL	30	a = -0,0129 b = 0,023	0,9973
		a = -0,0133 b = 0,0235	0,9990
	40	a = -0,0190 b = 0,0457	0,9960
		a = -0,0192 b = 0,0545	0,9954

Como o coeficiente de correlação linear foi muito semelhante entre as amostras, escolheu-se 40 μL de volume de amostra contendo $2{,}5 \times 10^6$ células lisadas/mL para aumentar a sensibilidade do método.

As condições ótimas para a realização do método estão descritas a seguir. Foram adicionados, em cada poço de uma microplaca de 96 poços, tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 e EDTA 1,0 mM (q.s.p. 200 μL); 40 μL de amostra; 5 μL de solução de glutationa reduzida (GSH) 80 mM; 0,048 U de glutationa redutase (5 μL da solução 0,0096 U/μL). Essa mistura foi incubada por 5 minutos a 37 ºC. Posteriormente, foram adicionados 10 μL de solução de terc-butil hidroperóxido 0,46% e 30 μL de solução de NADPH 1,20 mM. O decréscimo na absorbância foi monitorado a 340 nm por 5 minutos. As amostras foram analisadas em triplicata.

O cálculo da atividade enzimática foi feito a partir da fórmula:

$$Atividade = \left(\frac{k}{\xi_{NADPH} \times b} \times \frac{200}{V_a} \times 10^{-3} \right) \Big/ [proteína]$$

Onde:

- *Atividade*: atividade específica da GPx dado em μmol de NADPH consumido/minuto/mg de proteína;

- *k*: coeficiente angular da reta de decaimento dado em 1/minuto;

- ξ_{NADPH} : coeficiente de absortividade molar do NADPH ($6{,}22 \cdot 10^{-3}$/μM/cm);

- *b*: caminho óptico (0,524 cm);

- $\frac{200}{V_a}$: diluição da amostra na microplaca;

- 10^{-3}: equivalente, em L, a 1 mL;

- $[proteína]$: concentração de proteína, em mg/mL, na amostra.

3.5.2.2. Atividade Enzimática da Glutationa Redutase (GR)

A atividade da GR é medida diretamente utilizando NADPH como co-fator na redução da GSSG a GSH. De maneira semelhante ao ensaio da GPx, a oxidação de NADPH a $NADP^+$ (Figura 17) é acompanhada pelo monitoramento da absorbância nas mesmas condições da GPx (CARLBERG & MANNERVIK, 1975).

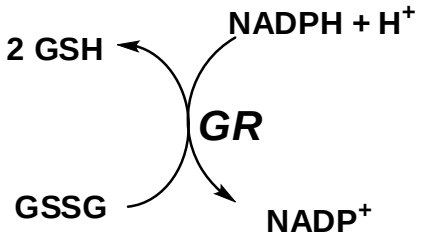


Figura 17 – Ensaio para a determinação da atividade enzimática da GR. GSSG é o substrato dessa reação.

Para a padronização do método, foram feitos testes com volumes de amostra diferentes (40 e 50 μL) de uma solução contendo $2,5x10^6$ células lisadas/mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. Foram utilizadas amostras controle (CTRL) 48 horas para o ensaio de padronização.

A Tabela 6 mostra a cinética da GR em célula hipocampal após utilização de diferentes volumes de amostra.

Tabela 6 – Exemplo de equações de reta representando o consumo de NADPH durante a padronização do ensaio da GR (n = 3).

Grupo	Volume de amostra (μL)	Equação de reta ($y = a \cdot x + b$)	Coeficiente de correlação linear (R^2)
CTRL	40	a = -0,0052 b = -0,3776	0,9300
		a = -0,0043 b = -0,3775	0,9880
	50	a = -0,0071 b = -0,4247	0,9788
		a = -0,0062 b = -0,4493	0,9970

Foi escolhido 50 μL de volume de amostra contendo $2{,}5 \times 10^6$ células lisadas/mL pois, além de aumentar a sensibilidade do método, apresentou um coeficiente de correlação linear melhor.

As condições ótimas para realização do método estão descritas a seguir. Foram preparados 2,5 mL de meio reagente no momento do uso, contendo 1 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 e EDTA 1,0 mM; 0,75 mL de EDTA 0,005 M; 0,75 mL de água deionizada, 5 mg de glutationa oxidada (GSSG) e 1 mg de NADPH. Foram adicionados, em cada poço de uma microplaca de 96 poços, 50 μL de amostra e meio reacional (q.s.p. 200 μL).

O decréscimo na absorbância foi monitorado a 340 nm por 10 minutos. As amostras foram analisadas em triplicata.

O cálculo da atividade enzimática foi feito a partir da fórmula:

$$Atividade = \left(\frac{k}{\xi_{NADPH} \times b} \times \frac{200}{V_a} \times 10^{-3} \right) \Big/ [proteína]$$

Onde:

- *Atividade*: atividade específica da GR dado em μmol de NADPH consumido/minuto/mg de proteína;

- *k*: coeficiente angular da reta de decaimento dado em 1/minuto;

- ξ_{NADPH} : coeficiente de absortividade molar do NADPH ($6{,}22 \cdot 10^{-3}$/μM/cm);

- *b*: caminho óptico (0,524 cm);

- $\frac{200}{V_a}$: diluição da amostra na microplaca;

- 10^{-3}: equivalente, em L, a 1 mL;

- $[proteína]$: concentração de proteína, em mg/mL, na amostra.

3.5.2.3. Atividade Enzimática da Glutationa S-Transferase (GST)

A atividade da GST é determinada pela formação de um complexo entre a GSH e o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), o qual é medido espectrofotometricamente (Figura 18). O aumento de absorbância é monitorado a 340 nm e à 25 °C e é diretamente proporcional à atividade da GST na amostra (HABIG et al., 1974).

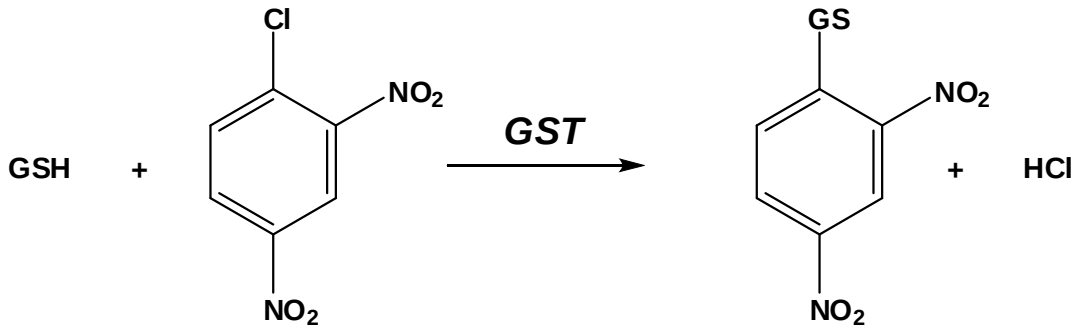


Figura 18 – Ensaio para a determinação da atividade enzimática da GST, que catalisa a reação entre GSH e CDNB.

Para a padronização do método, foram feitos testes com volumes de amostra diferentes (30 e 40 μL) de uma solução contendo $2{,}5 \times 10^6$ células lisadas/mL de

tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. Foram utilizadas amostras controle (CTRL) 48 horas para o ensaio de padronização.

A Tabela 7 mostra a atividade da GST em célula hipocampal após utilização de diferentes volumes de amostra.

Tabela 7 – Exemplo de equações de reta representando a formação de complexo GS-CDNB durante a padronização do ensaio da GST (n = 3).

Grupo	Volume de amostra (μL)	Equação de reta ($y = a \cdot x + b$)	Coeficiente de correlação linear (R^2)
CTRL	30	a = 0,0492 b = 0,0394	0,9979
		a = 0,0479 b = -0,0204	0,9930
	40	a = 0,0682 b = 0,1214	0,9989
		a = 0,0739 b = 0,0899	0,9990

Como o coeficiente de correlação linear foi muito semelhante entre as amostras, escolheu-se 40 μL de volume de amostra contendo $2,5 \times 10^6$ células lisadas/mL para aumentar a sensibilidade do método.

As condições ótimas para realização do método estão descritas a seguir. Foram adicionados, em cada poço de uma microplaca de 96 poços, 40 μL de amostra, tampão fosfato 0,1 M pH 6,5 (q.s.p. 200 μL) e 5 μL de solução de CDNB 0,1 M. Essa mistura foi pré-incubada por 2 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 15 μL de GSH 0,1 M. O aumento de absorbância foi monitorado a 340nm por 5 minutos à 25ºC. As amostras foram analisadas em triplicata.

O cálculo da atividade enzimática foi feito a partir da fórmula:

$$Atividade = \left(\frac{k}{\xi_{CDNB} \times b} \times \frac{200}{V_a} \times 10^{-3} \right) \Big/ [proteína]$$

Onde:

- *Atividade*: atividade específica da GST dado em μmol de complexo formado/minuto/mg de proteína;

- *k*: coeficiente angular da reta de decaimento dado em 1/minuto;

- ξ_{CDNB}: coeficiente de absortividade molar do CDNB ($9{,}60 \cdot 10^{-3}$/μM/cm);

- *b*: caminho óptico (0,524 cm);

- $\frac{200}{V_a}$: diluição da amostra na microplaca;

- 10^{-3}: equivalente, em L, a 1 mL;

- $[proteína]$: concentração de proteína, em mg/mL, na amostra.

3.5.3. Análise da Geração de Malonaldeído (MDA)

As células foram cultivadas em placa de 24 poços, com 5×10^5 células/poço, e incubadas por 48 horas com as substâncias de interesse (concentrações e períodos de incubação definidos nos ensaios de viabilidade). Após a incubação, as células foram removidas das placas com uma solução de tripsina 0,25% em EBSS por 5 minutos, seguida de adição de uma solução de soro fetal bovino (SFB) 10% em meio de cultura e centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi removido e às células foi adicionado solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 para posterior lise por sonicação.

Reação com ácido tiobarbitúrico (TBA): a 200 μL de amostra foram adicionados o mesmo volume de TBA 0,4% (dissolvido em HCl 0,2 M e água na proporção 2:1), preparada imediatamente antes do uso. As soluções foram

incubadas por 45 minutos a 90°C em banho-maria. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos e 100 μL foram filtrados em SPIN-X (CORNING ®) e injetados no sistema de CLAE.

Condições cromatográficas para análise do aduto TBA-MDA: coluna C-18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm); fluxo de 1 mL/min; fase móvel: 65% de tampão KH_2PO_4 50 mM pH 7,0 e 35% de metanol; detecção espectrofotométrica (λ = 532 nm).

Para a quantificação do aduto MDA-TBA, foi feita uma curva de calibração utilizando-se uma solução estoque de MDA e os resultados foram expressos em relação ao conteúdo de proteína das amostras (item 3.4.4).

As amostras foram analisadas em triplicata (3 poços/grupo).

3.5.4. Determinação da Concentração Protéica

A determinação da concentração de proteínas foi realizada utilizando-se o método de BRADFORD (1976), cujo princípio consiste na adição de um corante ácido a uma solução de proteínas e, subsequente, aferição da absorbância do complexo formado em 595 nm. A concentração foi determinada pela comparação com uma curva padrão de albumina de soro bovino.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram comparados pela análise de variância (ANOVA), seguido do teste *Student-Newman-Keuls*, onde as diferenças foram consideradas significativas para o valor $p \leq 0,05$. No caso da existência de somente dois grupos experimentais, a comparação foi feita por meio do teste "*t*" de *Student* para amostras não pareadas, onde as diferenças foram consideradas significativas para o valor $p \leq 0,05$. Os valores numéricos foram colocados sob a forma *média ± erro padrão da média*.

4. Resultados

4.1. CARACTERIZAÇÃO CELULAR DA CULTURA

A Figura 19 ilustra o ensaio de caracterização celular da cultura primária de hipocampo.

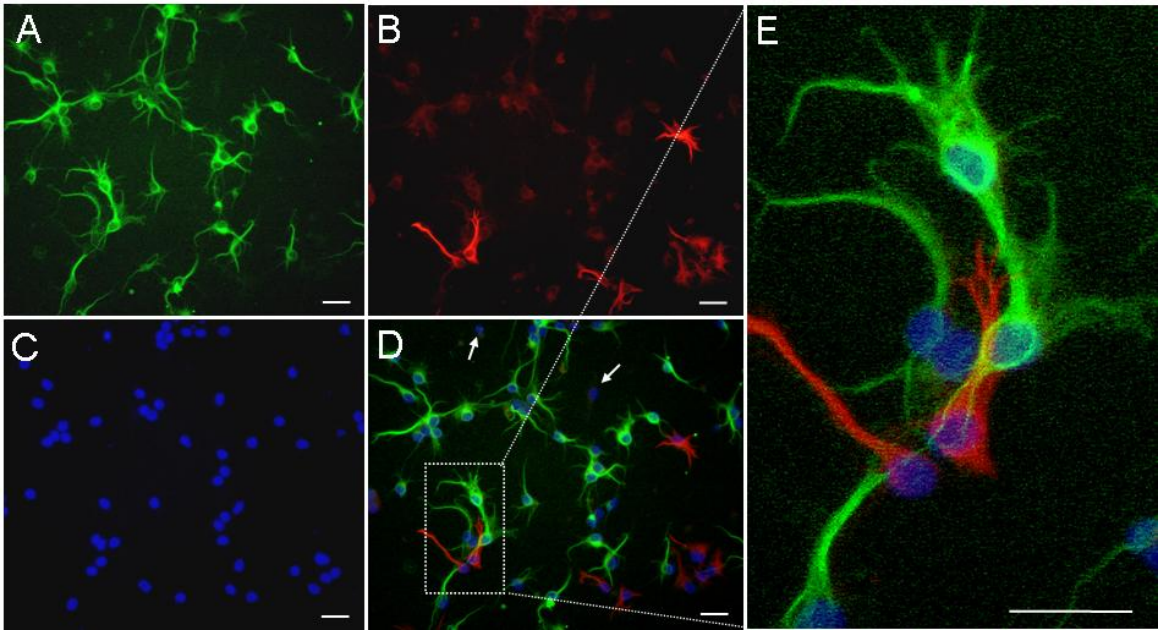


Figura 19 – Foto ilustrativa do ensaio de caracterização celular de cultura primária de hipocampo (n = 5). A) Células imunopositivas para MAP-2, que reconhece neurônios (marcação verde); B) Células imunopositivas para GFAP, que reconhece os astrócitos (marcação vermelha); C) Células coradas com DAPI, um marcador nuclear (marcação azul) que cora todas as células; D) Sobreposição de células neuronais (A), astrócitos (B) e células totais (C); E) Ampliação da imagem correspondente ao retângulo branco da região D. Poucas células não específicas para MAP-2 e GFAP estão presentes na cultura (seta branca na região D). Escala : 30 µm.

Para este ensaio, foram utilizadas 4 lâminas, sendo coletadas 10 fotos por lâmina em diferentes campos. O valor médio de astrócitos obtido foi de 7,1 ± 0,2%, mostrando que o predomínio celular é de neurônios (próximo a 93%).

4.2. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR E MORFOLOGIA

4.2.1. Determinação da Viabilidade Celular (MTT)

A Figura 20 representa os resultados dos ensaios de viabilidade celular após exposição à metilecgonidina (AEME) e à cocaína (COC) por 24 e 48 horas.

Houve diminuição estatisticamente significativa do metabolismo mitocondrial (MTT), após exposição por 24 horas, com concentrações a partir de 10^{-1} mM de AEME ($p<0,05$) e 8 mM de cocaína ($p<0,001$), representando 64,6 ± 8,2% e 43,5 ± 8,5%, respectivamente (Figura 20 A e C). No caso da exposição por 48 horas, a diferença estatisticamente significativa da diminuição do metabolismo mitocondrial se deu nas concentrações de 10^{-3} mM de AEME ($p<0,05$) e 6 mM de cocaína ($p<0,001$), representando 64,3 ± 3,9% e 30,3 ± 4,2%, respectivamente (Figura 20 B e D).

Conforme pode ser observado, a concentração de 10^{-4} mM de cocaína após 24 horas de exposição apresentou valores de redução do MTT maiores que o controle (152,2 ± 18,2%; $p<0,01$) (Figura 20 C). A mesma situação ocorreu com a concentração de 10^{-3} mM após 48 horas de exposição (136,6 ± 5,1%; $p<0,05$) (Figura 20 D).

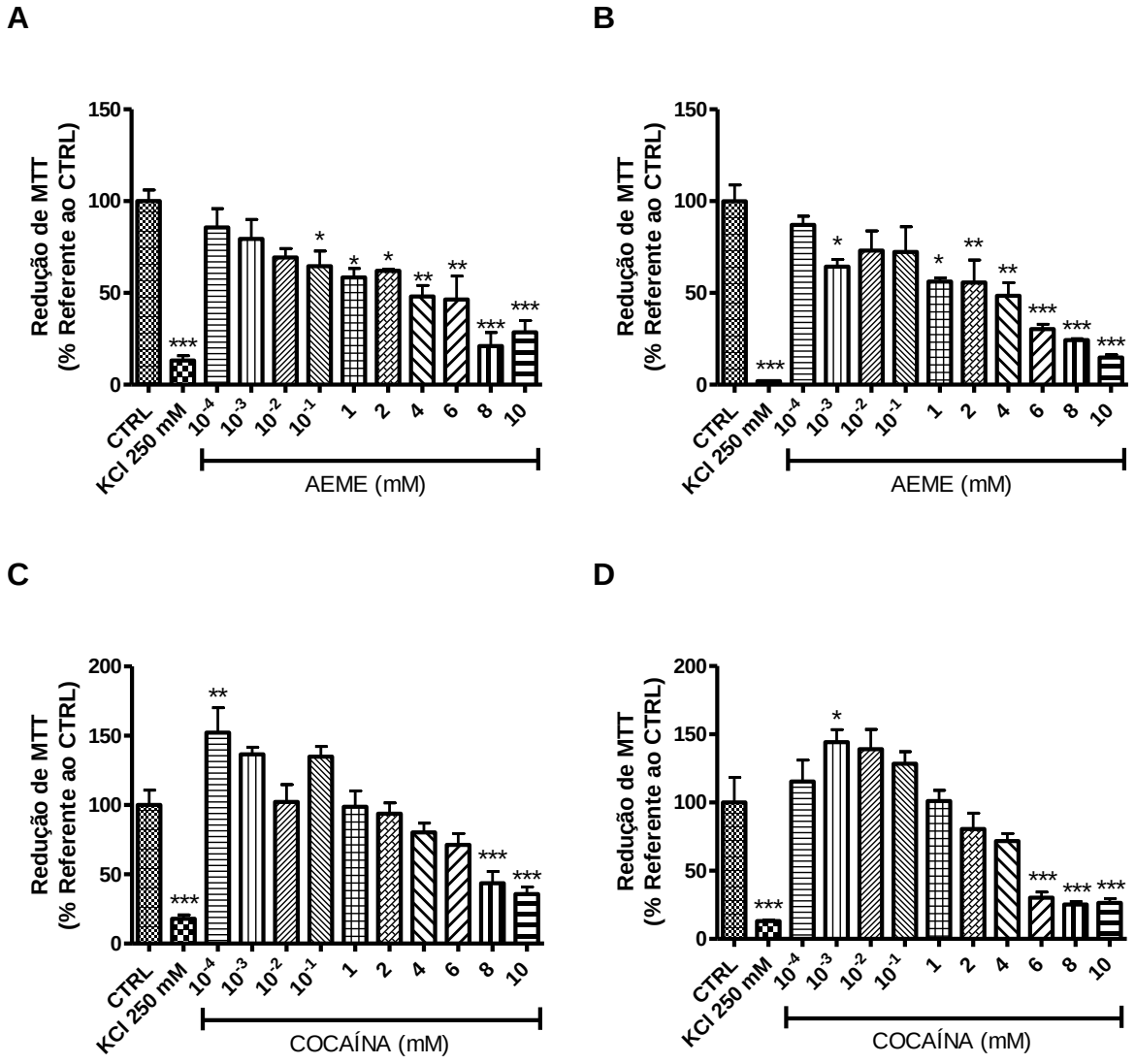


Figura 20 – Resultados dos ensaios de viabilidade (MTT) (n = 5). A) 24 horas de exposição à AEME; B) 48 horas de exposição à AEME; C) 24 horas de exposição à COC; D) 48 horas de exposição à COC. CTRL = controle; KCl = cloreto de potássio; AEME = metilecgonidina. **p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001* em relação ao CTRL *(ANOVA e comparação múltipla de Newman-Keuls)*.

4.2.2. Determinação da Citotoxicidade (LDH)

Os gráficos apresentados na Figura 21 mostram a atividade da enzima lactato desidrogenase, que foi liberada no citoplasma, frente a diferentes concentrações de cocaína e de AEME após exposições de 24 e 48 horas.

Os resultados mostraram que a liberação de LDH para o meio de cultura ocorreu, de forma estatisticamente significativa, a partir da concentração de 2 mM para a

cocaína tanto após exposição por 24 (21,8 ± 0,5 pmol/minuto/célula; p<0,05) quanto 48 horas (32,1 ± 1,6 pmol/minuto/célula; p<0,001). Não houve alteração significativa com a AEME.

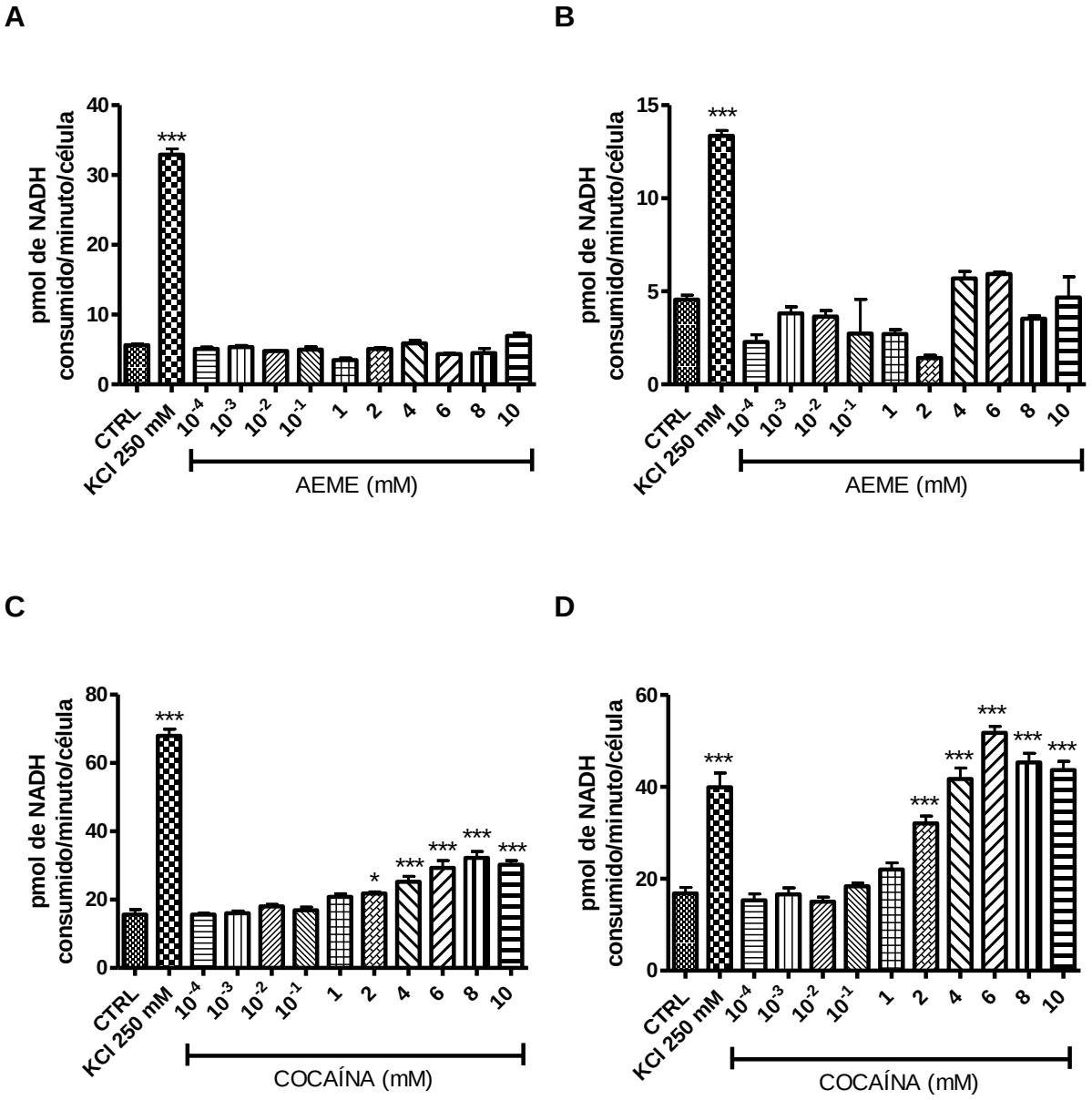


Figura 21 – Resultados dos ensaios de citotoxicidade (LDH) (n = 5). A) 24 horas de exposição à AEME; B) 48 horas de exposição à AEME; C) 24 horas de exposição à COC; D) 48 horas de exposição à COC. CTRL = controle; KCl = cloreto de potássio; AEME = metilecgonidina. **p<0,05 e ***p<0,001* em relação ao CTRL *(ANOVA e comparação múltipla de Newman-Keuls)*.

4.2.3. Associação entre Cocaína e AEME: MTT e LDH

Com base nos resultados apresentados, foram escolhidas as concentrações de 1 e 2 mM de AEME e de cocaína, respectivamente. Essas concentrações foram consideradas na faixa da CL50, ou seja, a concentração que mata 50% da população da cultura primária de hipocampo. No caso do MTT, foram realizadas incubações em diferentes tempos, variando de 3 a 48 horas, para a avaliação temporal da ocorrência da morte neuronal.

De acordo com os resultados (Figura 22), exposições de 3 e 6 horas não provocaram morte celular, mesmo após associação das substâncias (Figura 22 A e B). Já após 12 horas de exposição, apenas a associação entre cocaína e AEME apresentou morte neuronal estatisticamente significativa, com valor de viabilidade celular de 68,9 ± 5,6% ($p<0,001$) (Figura 22 C). Durante a exposição de 24 horas, tanto a cocaína quanto a AEME apresentaram aumento estatisticamente significativo da morte celular, apresentando 77,0 ± 2,4% ($p<0,001$) e 76,8 ± 3,9% ($p<0,001$) de viabilidade celular, respectivamente. Este percentual foi semelhante à associação entre as duas substâncias, cuja viabilidade celular ficou em 73,3 ± 2,5% ($p<0,001$) (Figura 22 D). Após a exposição de 48 horas, a cocaína e a AEME também apresentaram aumento estatisticamente significativo da morte celular. A cocaína apresentou 41,4% ($p<0,001$) e a AEME 38,5% ($p<0,001$) de morte celular, representando 58,6 ± 5,3% e 61,5 ± 3,6% de viabilidade celular, respectivamente. A associação entre as duas substâncias apresentou 78,5% de morte celular ($p<0,001$), o que representa 21,5 ± 5,9% de viabilidade celular. Neste caso, pode-se dizer que houve uma interação aditiva, pois a soma das respostas individuais, 79,9% de morte celular, é muito próxima da associação, 78,5% (Figura 21 E).

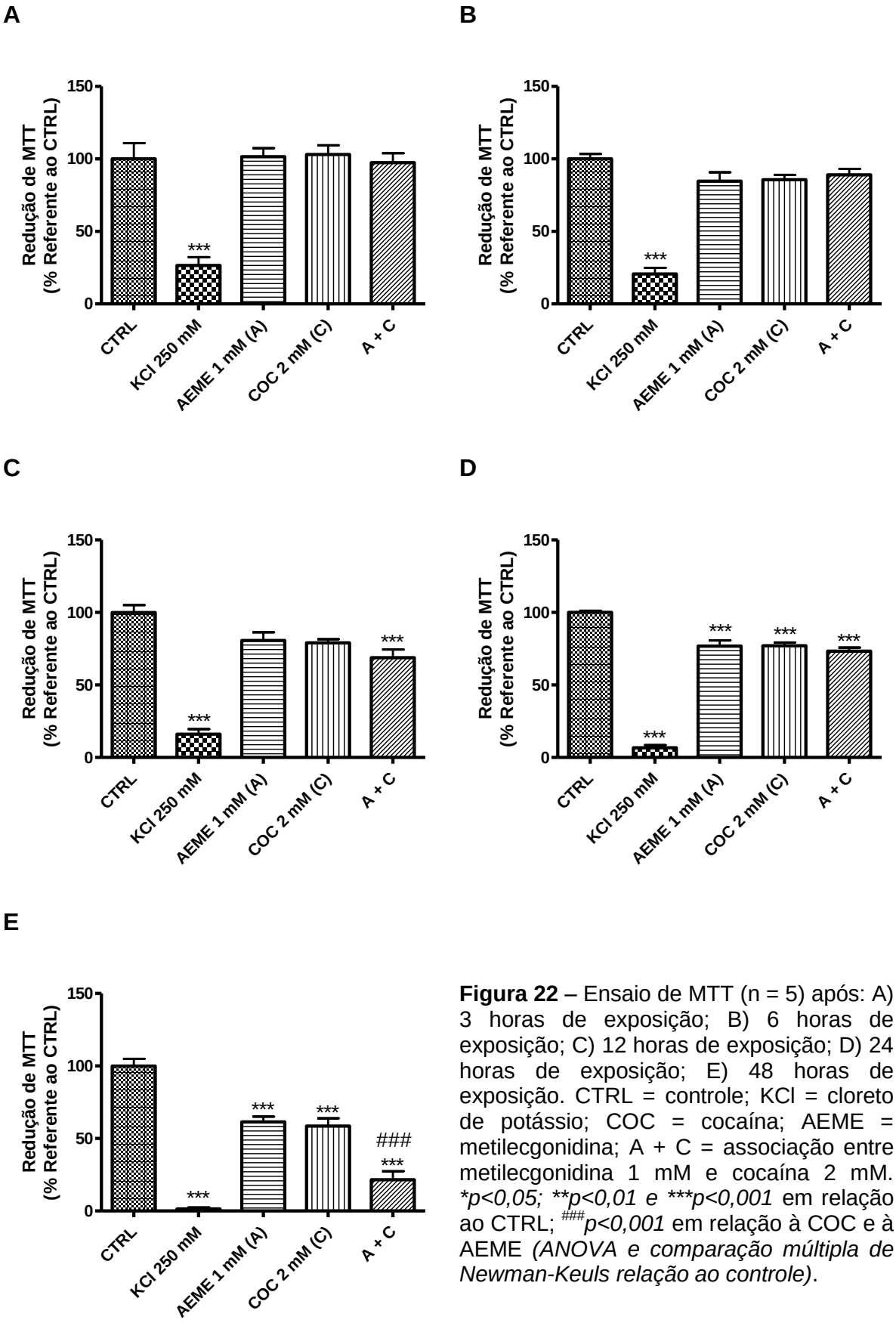


Figura 22 – Ensaio de MTT (n = 5) após: A) 3 horas de exposição; B) 6 horas de exposição; C) 12 horas de exposição; D) 24 horas de exposição; E) 48 horas de exposição. CTRL = controle; KCl = cloreto de potássio; COC = cocaína; AEME = metilecgonidina; A + C = associação entre metilecgonidina 1 mM e cocaína 2 mM. **p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001* em relação ao CTRL; ###*p<0,001* em relação à COC e à AEME *(ANOVA e comparação múltipla de Newman-Keuls relação ao controle)*.

Para melhor visualização dos efeitos da associação entre cocaína e AEME no MTT, foi construída uma curva com os resultados obtidos nos diferentes tempos de incubação (Figura 23). A partir desta curva, pode-se confirmar que as concentrações de ambas as substâncias escolhidas mostraram-se equipotentes em todos os períodos de incubação. A associação apresentou a mesma magnitude que as substâncias isoladas até um período de 24 horas de exposição, mostrando seu efeito aditivo após esse período (Figura 22 E e 23).

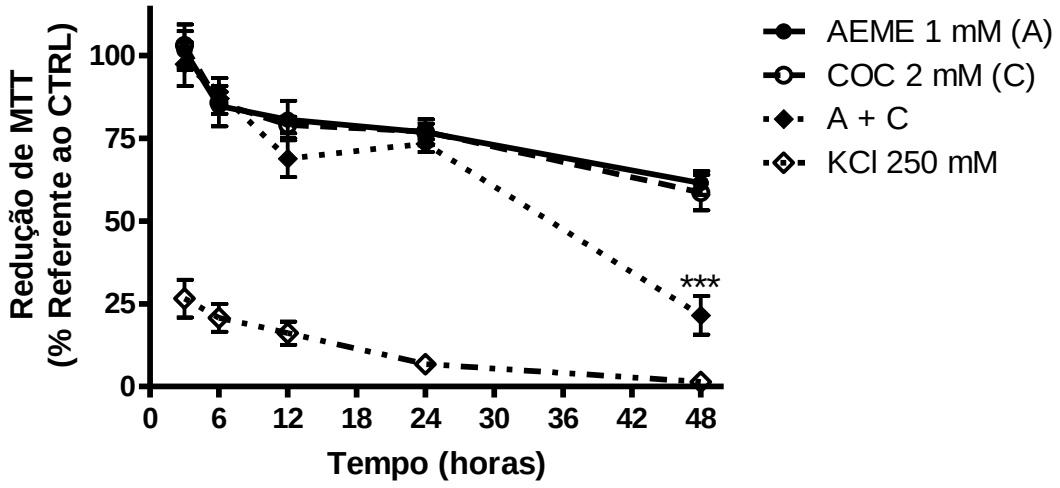


Figura 23 – Curva de MTT (n = 5) após exposição de 3; 6; 12; 24 e 48 horas a concentrações equipotentes de AEME e COC e a associação das mesmas (A+C). ***$p<0,001$ em relação à COC e à AEME *(ANOVA e comparação múltipla de Newman-Keuls)*.

Como não houve alteração significativa da viabilidade celular nos períodos inferiores a 24 horas de exposição à AEME e à cocaína, o ensaio de LDH foi realizado apenas após 24 e 48 horas de exposição. A Figura 24 mostra os resultados do ensaio de LDH. A associação entre as substâncias promoveu redução estatisticamente significativa da enzima LDH após 24 (19,3 ± 2,1 pmol de NADH consumido/minuto/célula; $p<0,01$) e 48 horas (29,4 ± 0,6 pmol de NADH consumido/minuto/célula; $p<0,001$) de exposição. Assim, não foi observado efeito de

associação entre cocaína e AEME, uma vez que o aumento da LDH evidenciado é decorrente somente do efeito da cocaína (18,0 ± 1,6 pmol de NADH consumido/minuto/célula após 24 horas e 28,4 ± 1,3 pmol de NADH consumido/minuto/célula após 48 horas).

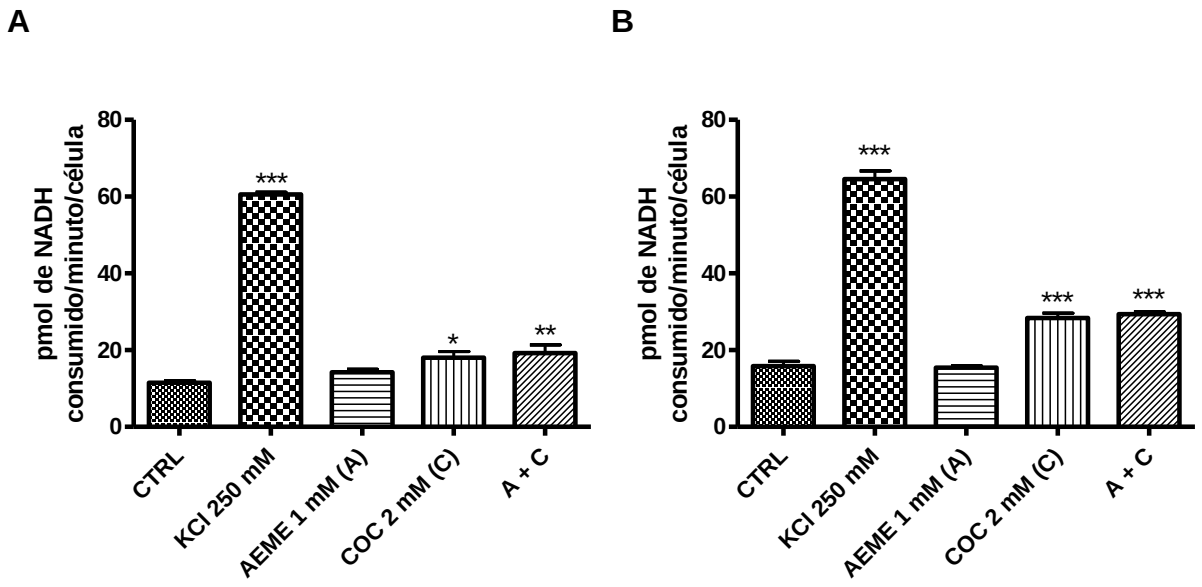


Figura 24 – Ensaio de LDH (n = 5) após: A) 24 horas de exposição; B) 48 horas de exposição. CTRL = controle; KCl = cloreto de potássio; COC = cocaína; AEME = metilecgonidina; A + C = associação entre metilecgonidina 1 mM e cocaína 2 mM. **p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001* em relação ao CTRL *(ANOVA e comparação múltipla de Newman-Keuls)*.

4.2.4. Microscopia de Fluorescência Confocal

As Figuras 25 e 26 evidenciam as alterações morfológicas desencadeadas por cada substância, bem como a associação entre as mesmas, após 24 e 48 horas de exposição, respectivamente. Conforme pode ser observado, as células neuronais do hipocampo apresentaram diferentes características morfológicas após coloração com LA e BE. As células viáveis foram coradas uniformemente em verde, sem alteração morfológica do núcleo (Figura 25 A e 26 A). As células necróticas (seta vermelha) coraram-se intensamente em vermelho, de uma maneira uniforme, apresentando um citoplasma maior e o núcleo completamente desintegrado ou

inexistente (Figura 25 E). As células em processo de apoptose (seta branca) apresentaram, em uma primeira etapa, o citoplasma corado em verde e o núcleo em laranja (Figura 25 B). Em um estágio mais avançado, toda a célula apresentou-se corada em vermelho ou laranja (Figura 25 C, D e E e 26 D).

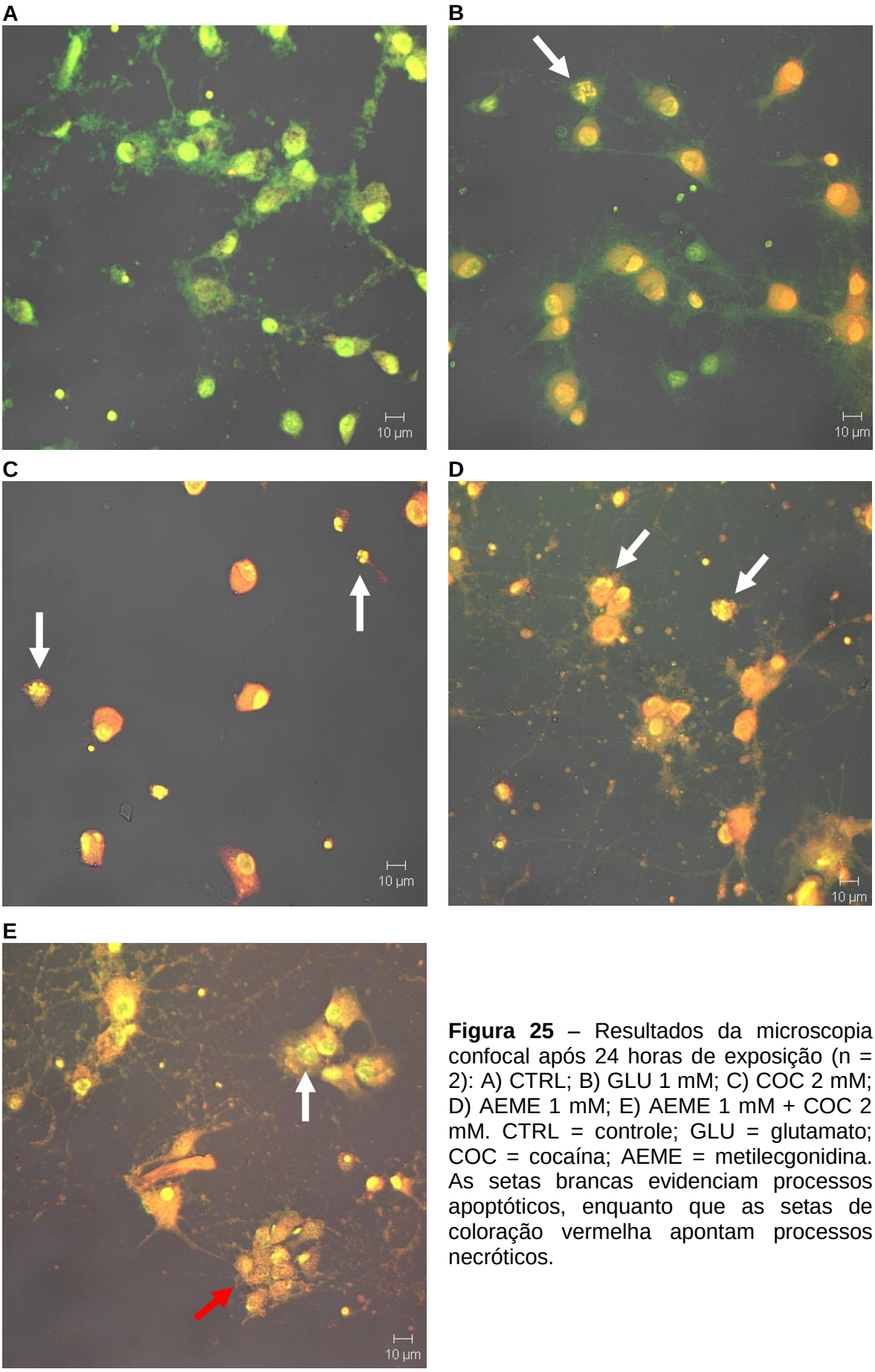


Figura 25 – Resultados da microscopia confocal após 24 horas de exposição (n = 2): A) CTRL; B) GLU 1 mM; C) COC 2 mM; D) AEME 1 mM; E) AEME 1 mM + COC 2 mM. CTRL = controle; GLU = glutamato; COC = cocaína; AEME = metilecgonidina. As setas brancas evidenciam processos apoptóticos, enquanto que as setas de coloração vermelha apontam processos necróticos.

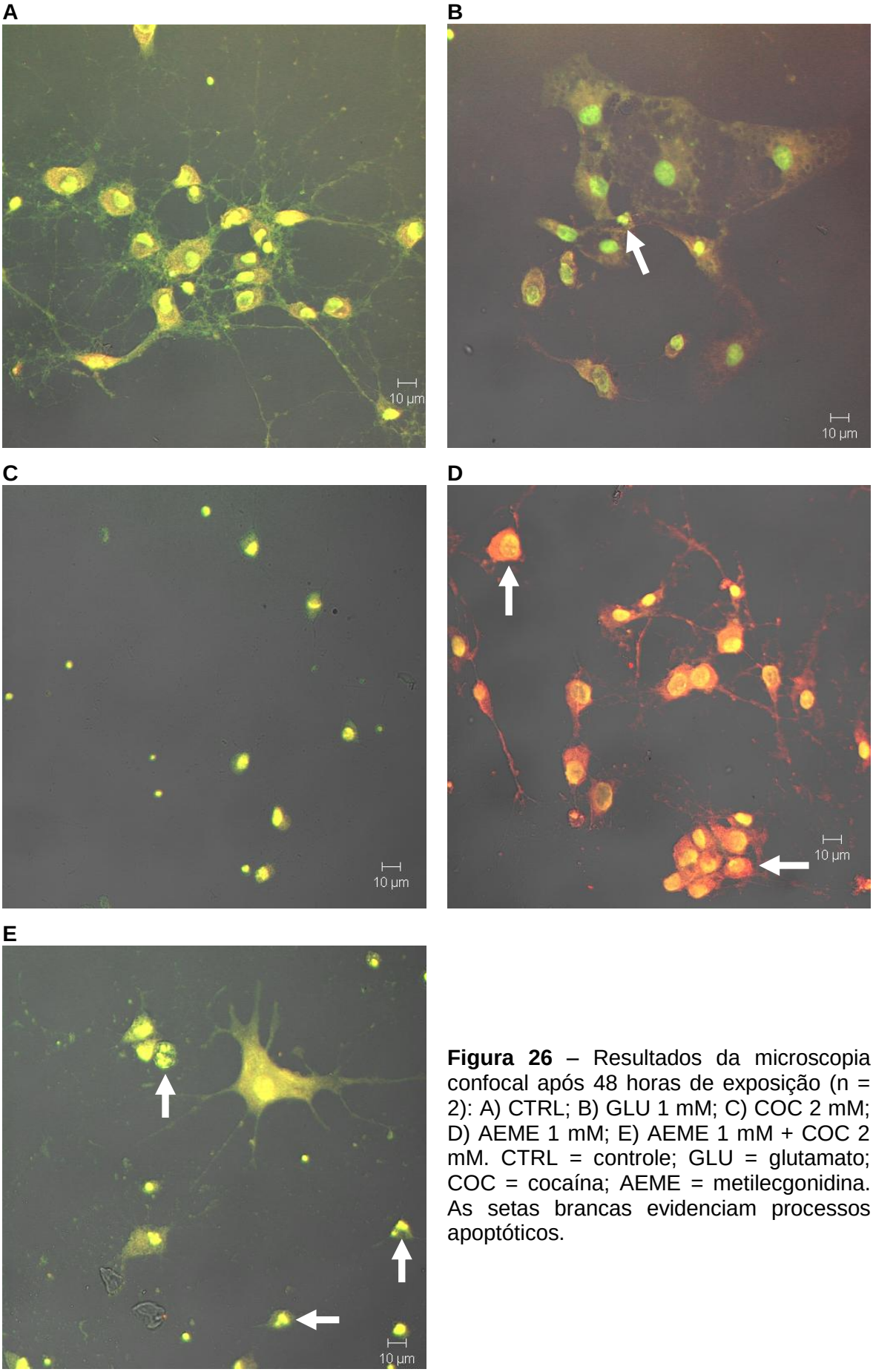


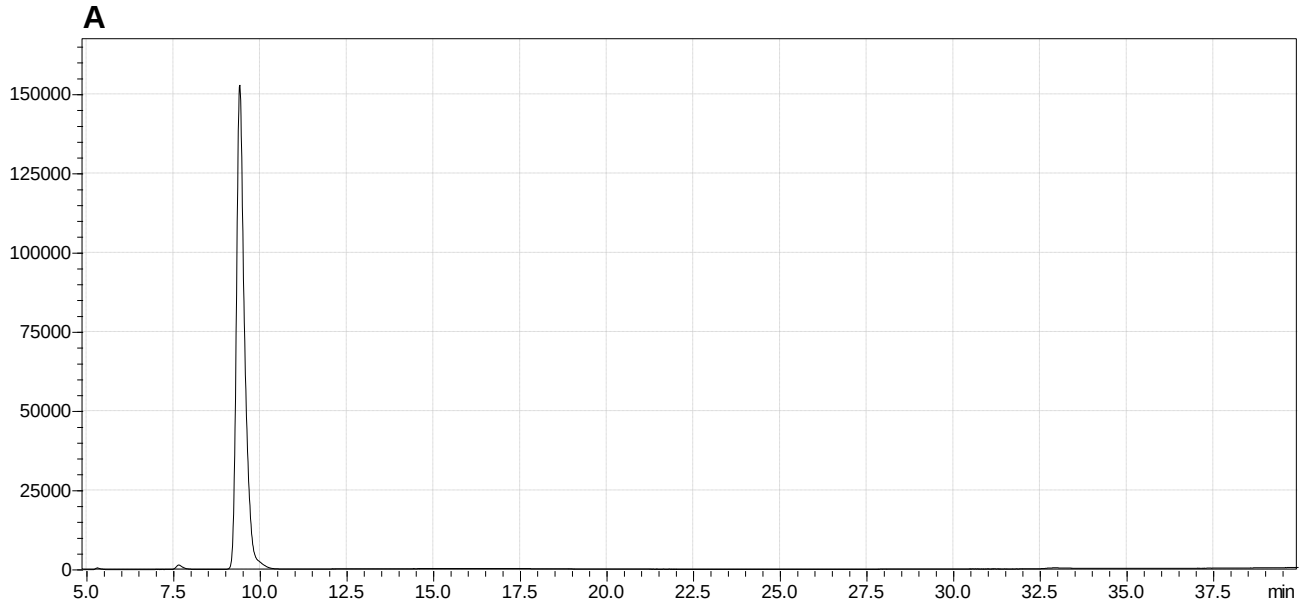
Figura 26 – Resultados da microscopia confocal após 48 horas de exposição (n = 2): A) CTRL; B) GLU 1 mM; C) COC 2 mM; D) AEME 1 mM; E) AEME 1 mM + COC 2 mM. CTRL = controle; GLU = glutamato; COC = cocaína; AEME = metilecgonidina. As setas brancas evidenciam processos apoptóticos.

4.3. AVALIAÇÃO DO DANO OXIDATIVO

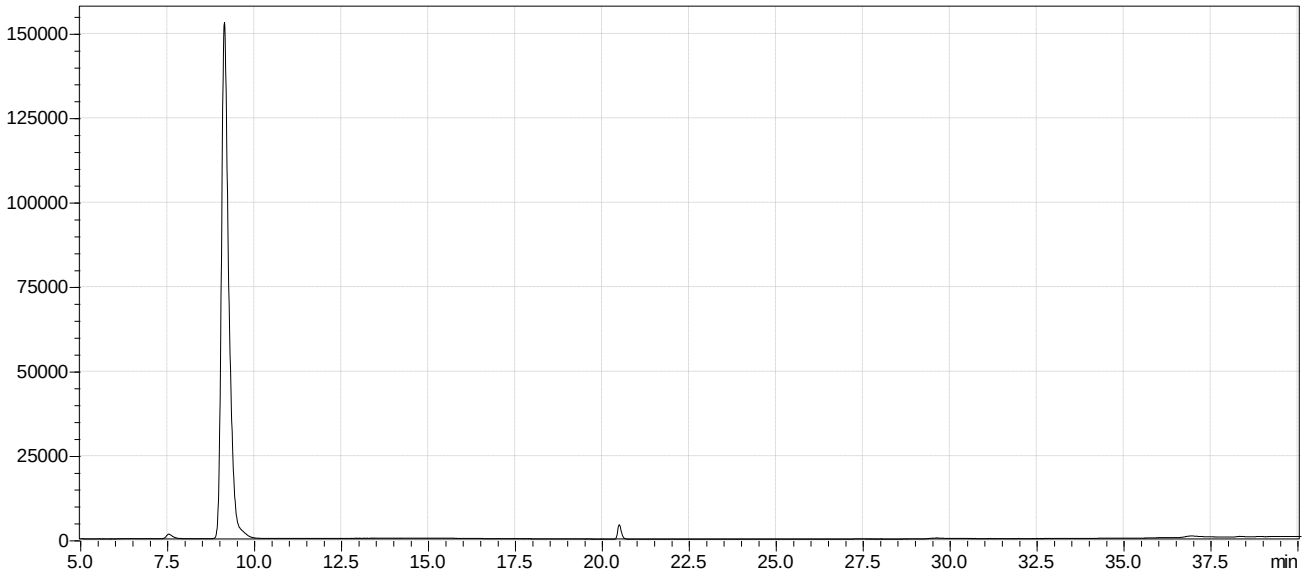
4.3.1. Avaliação do Dano em DNA

4.3.1.1. Formação de Adutos com Desoxiguanosina (d-G)

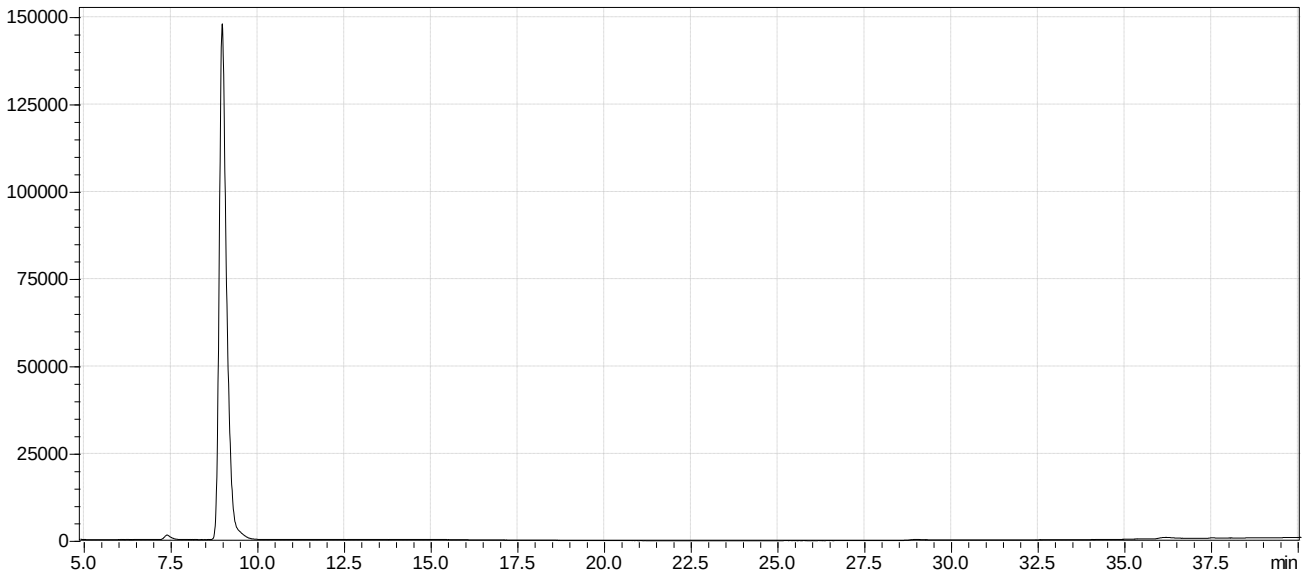
Os cromatogramas apresentados a seguir correspondem ao controle (CTRL) e às incubações da d-G com cocaína e AEME. Pela análise dos cromatogramas (Figura 27), pode-se observar que não houve alteração da intensidade do pico da d-G, mudança no tempo de retenção (cerca de 9 minutos em pH 7,4 e 10 minutos em pH 11) ou formação de outros compostos que resultariam em outros picos, não havendo, portanto, formação de adutos com a d-G.

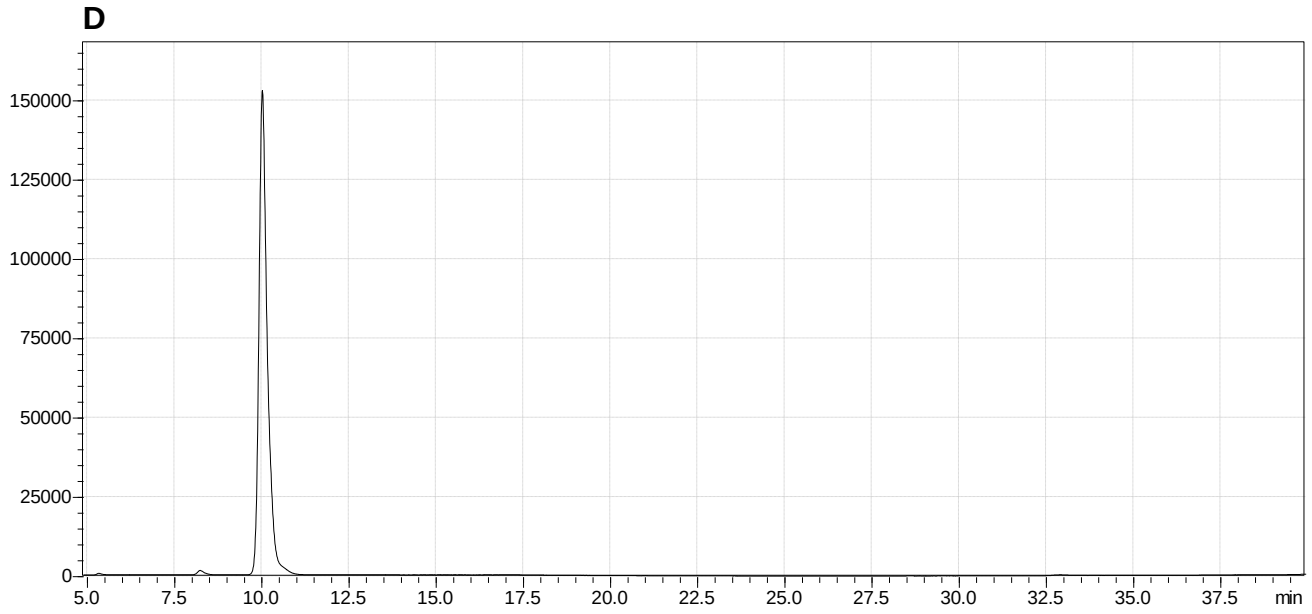


B


150000
125000
100000
75000
50000
25000
0
5.0
7.5
10.0
12.5
15.0
17.5
20.0
22.5
25.0
27.5
30.0
32.5
35.0
37.5
min

C


150000
125000
100000
75000
50000
25000
0
5.0
7.5
10.0
12.5
15.0
17.5
20.0
22.5
25.0
27.5
30.0
32.5
35.0
37.5
min



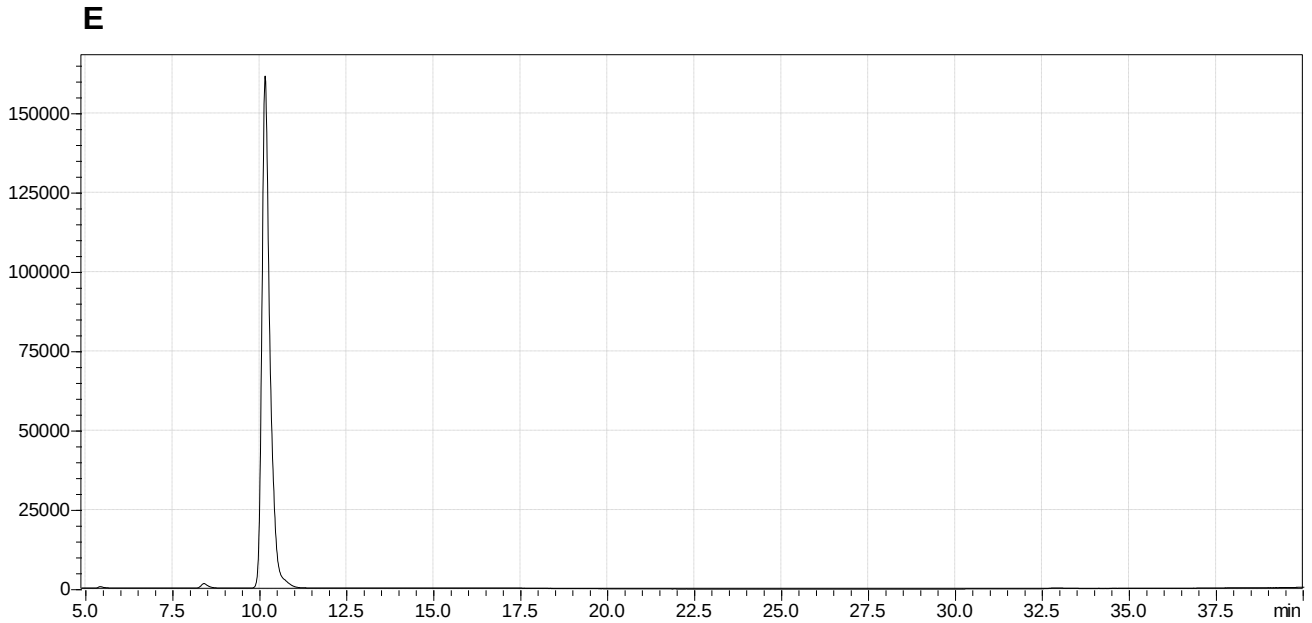
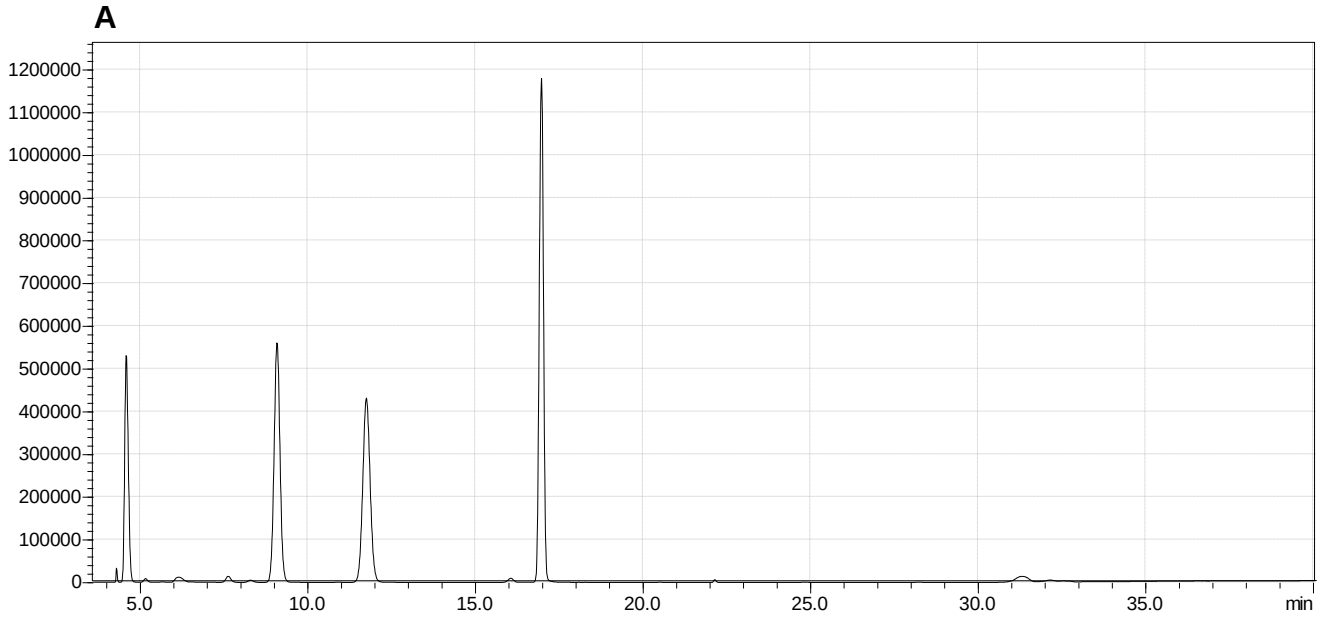


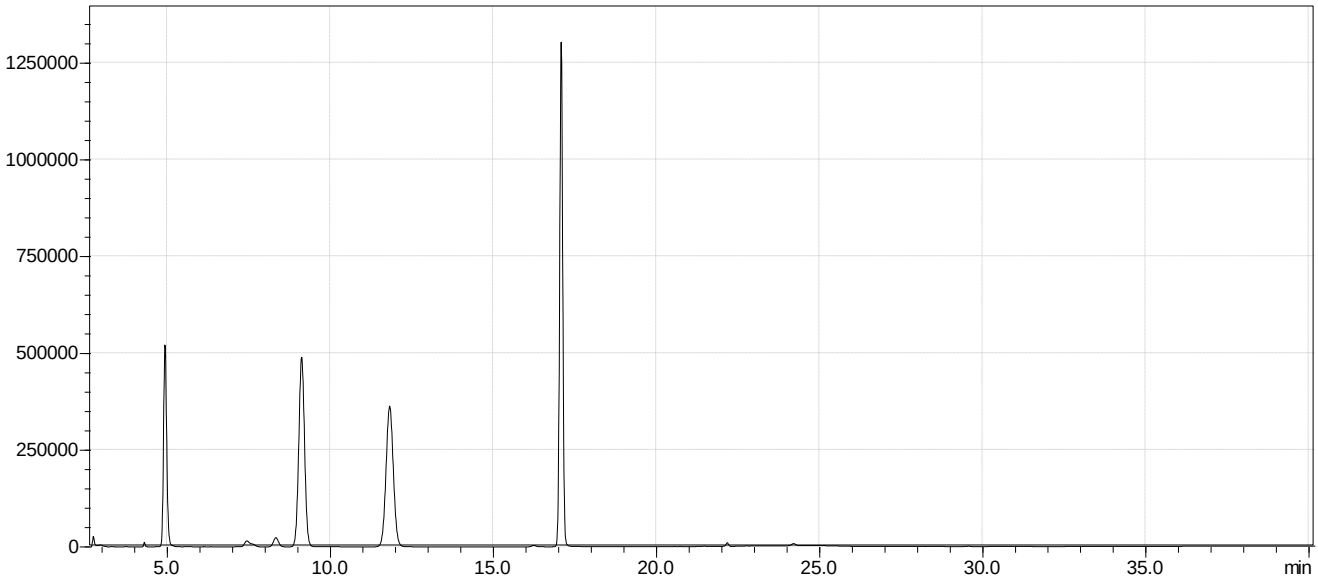
Figura 27 – Formação de adutos com d-G (n = 2). Incubação em tampão fosfato 0,2 M pH 7,4: A) CTRL; B) COC; C) AEME. Incubação em tampão carbonato 50 mM pH 11: D) CTRL e E) AEME. CTRL = controle; COC = cocaína; AEME = metilecgonidina.

4.3.1.2. Formação de Adutos com DNA

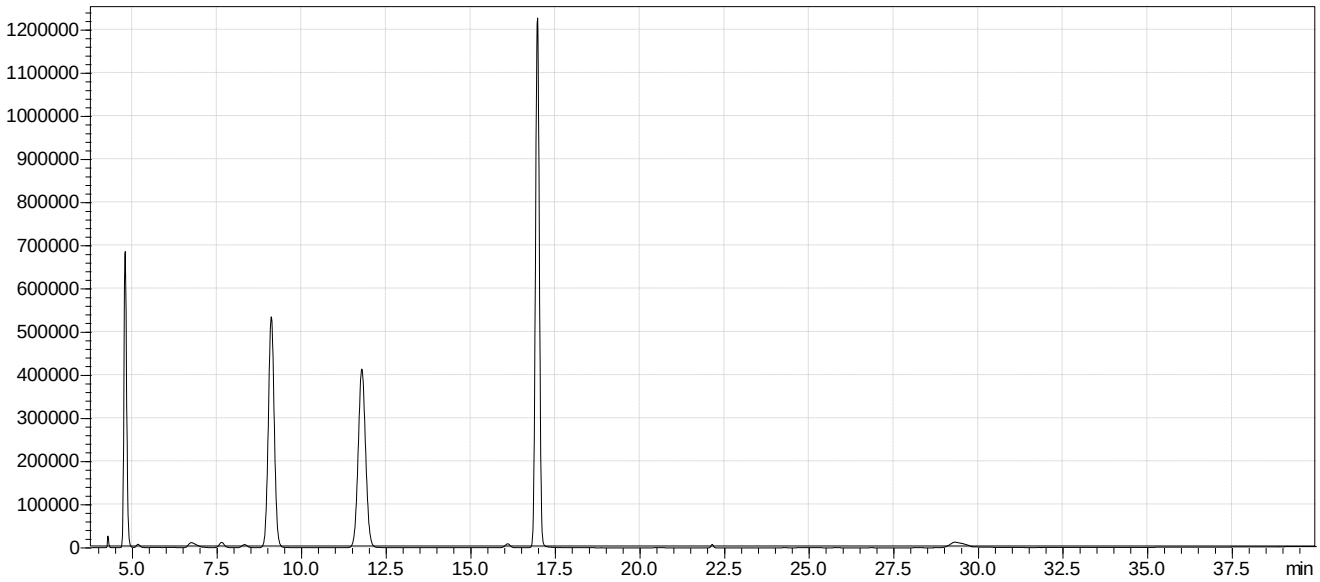
Os cromatogramas apresentados a seguir correspondem ao controle (CTRL) e às incubações de DNA comercial com cocaína e AEME. A análise foi feita de maneira semelhante à realizada nos cromatogramas da d-G: intensidade dos picos, alteração no tempo de retenção de cada pico ou formação de outros compostos que resultariam em outros picos. Não houve formação de adutos com DNA comercial.



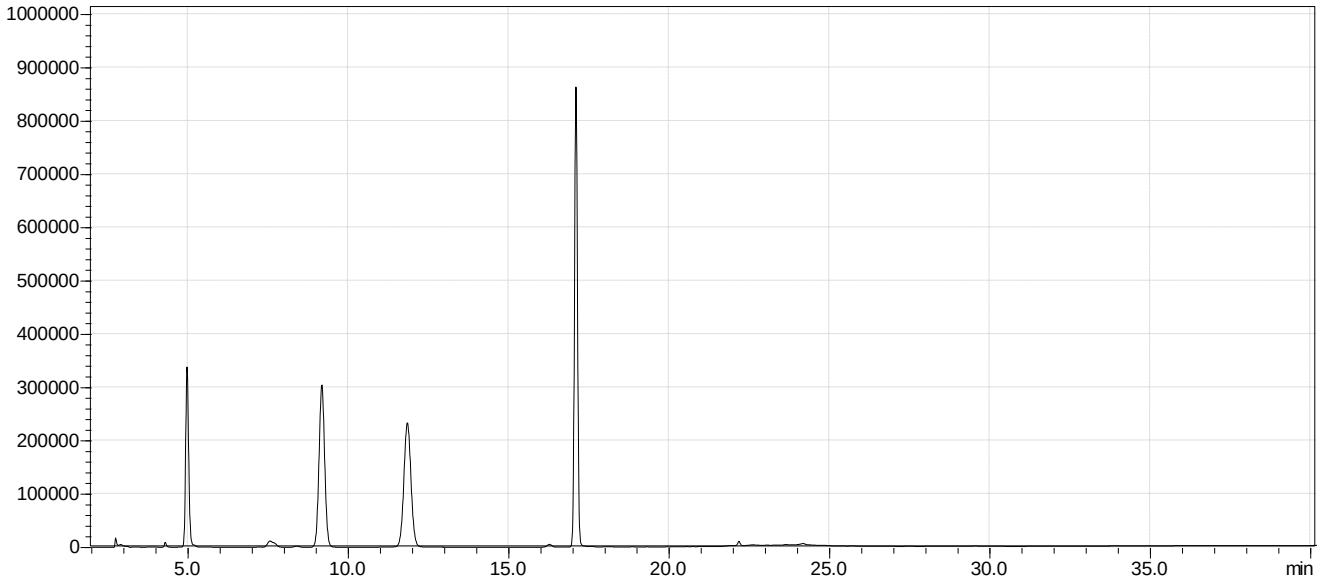
B


1250000
1000000
750000
500000
250000
0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
min

C


1200000
1100000
1000000
900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
5.0
7.5
10.0
12.5
15.0
17.5
20.0
22.5
25.0
27.5
30.0
32.5
35.0
37.5
min

D



E

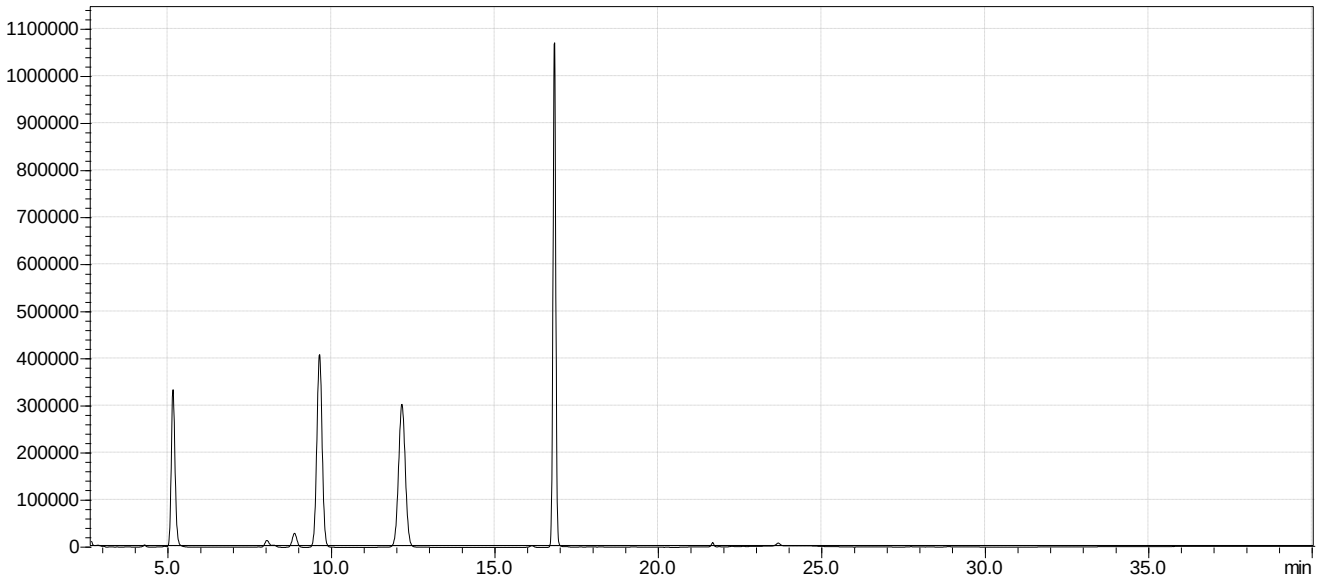


Figura 28 – Formação de adutos com DNA (n = 2). Incubação em tampão fosfato 0,2 M pH 7,4: A) CTRL; B) COC; C) AEME. Incubação em tampão carbonato 50 mM pH 11: D) CTRL e E) AEME. CTRL = controle; COC = cocaína; AEME = metilecgonidina.

4.3.2. Enzimas Antioxidantes

As determinações das atividades enzimáticas foram realizadas somente após 3 e 6 horas de incubação, uma vez que, após 24 horas, houve redução da viabilidade celular demonstrada pelo ensaio de MTT. A Figura 29 mostra a atividade das enzimas GPx, GR e GST após 3 e 6 horas de incubação.

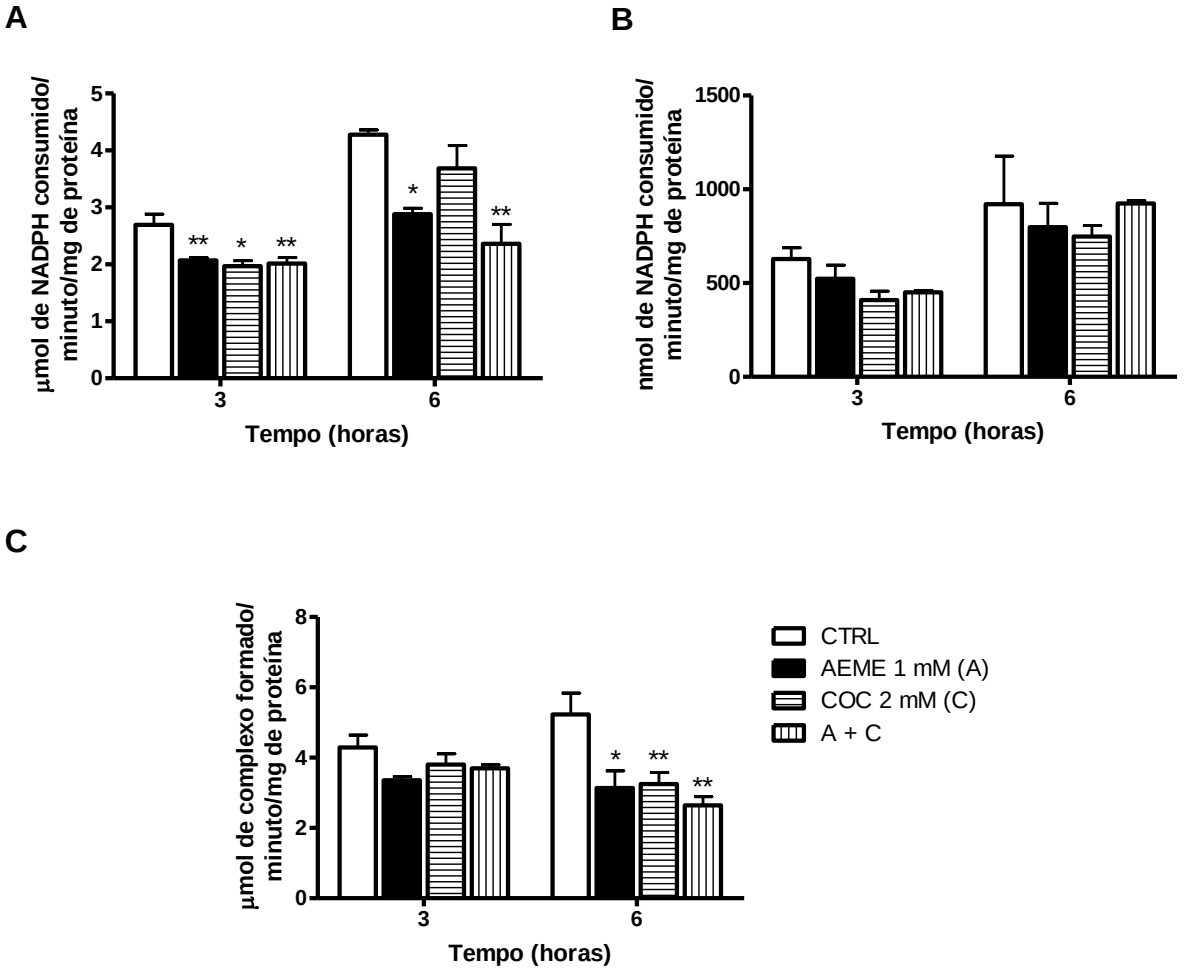


Figura 29 – Atividade enzimática após 3 e 6 horas de exposição a concentrações equipotentes de AEME e COC (n = 3). A) GPx; B) GR) e C) GST. CTRL = controle; AEME = metilecgonidina; COC = cocaína; A + C = associação entre metilecgonidina 1 mM e cocaína 2 mM. **p<0,05 e **p<0,01* em relação ao CTRL *(ANOVA e comparação múltipla de Newman-Keuls)*.

Após 3 horas de exposição, foi observado, em todos os grupos experimentais, um decréscimo estatisticamente significativo somente na atividade da GPx, não sendo observadas alterações nas atividades da GR e da GST.

Após 6 horas de incubação, houve redução estatisticamente significativa na atividade da GPx após exposição à associação entre AEME e cocaína ($p<0,05$). Apesar de haver uma diminuição da atividade da GPx após a exposição à AEME, esta não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$). Também não foi observada alteração significativa após incubação com cocaína. Da mesma forma que a GPx, houve diminuição da atividade da GST em todos os grupos experimentais após 6 horas de exposição. Em contrapartida, a atividade da GR permaneceu inalterada neste período de incubação. A Tabela 8 mostra o valor da atividade dessas enzimas após 3 e 6 horas de exposição.

Tabela 8 – Atividade enzimática da GPx, GR e GST.

	Atividade enzimática					
	3 horas			**6 horas**		
Grupos	**GPx**	**GR**	**GST**	**GPx**	**GR**	**GST**
CTRL	2,7 ± 0,2	628,3 ± 59,3	4,3 ± 0,4	4,3 ± 0,1	920,2 ± 256,3	5,2 ± 0,6
AEME (A)	2,1 ± 0,1 (**)	523,3 ± 72,6	3,4 ± 0,1	2,9 ± 0,1(*)	798,5 ± 127,8	3,1 ± 0,5 (*)
COC (C)	2,0 ± 0,1 (*)	409,3 ± 47,9	3,8 ± 0,3	3,7 ± 0,4	747,6 ± 59,6	3,3 ± 0,3 (**)
A + C	2,0 ± 0,1 (**)	450,3 ± 9,0	3,7 ± 0,2	2,4 ± 0,3 (**)	924,9 ± 14,2	2,6 ± 0,2 (**)

Nota: Atividade expressa em: μmol de NADPH consumido/minuto/mg de proteína (GPx); nnmol de NADPH consumido/minuto/mg de proteína (GR); e μmol de complexo formado/minuto/mg de proteína (GST). CTRL = controle; AEME = metilecgonidina; COC = cocaína; A + C = associação entre metilecgonidina 1 mM e cocaína 2 mM. **p<0,05 e **p<0,01* em relação ao CTRL *(ANOVA e comparação múltipla de Newman-Keuls)*.

4.3.3. Análise da Geração de Malonaldeído (MDA)

A produção de MDA foi avaliada após 3, 6, 24 e 48 horas de exposição (Figura 30).

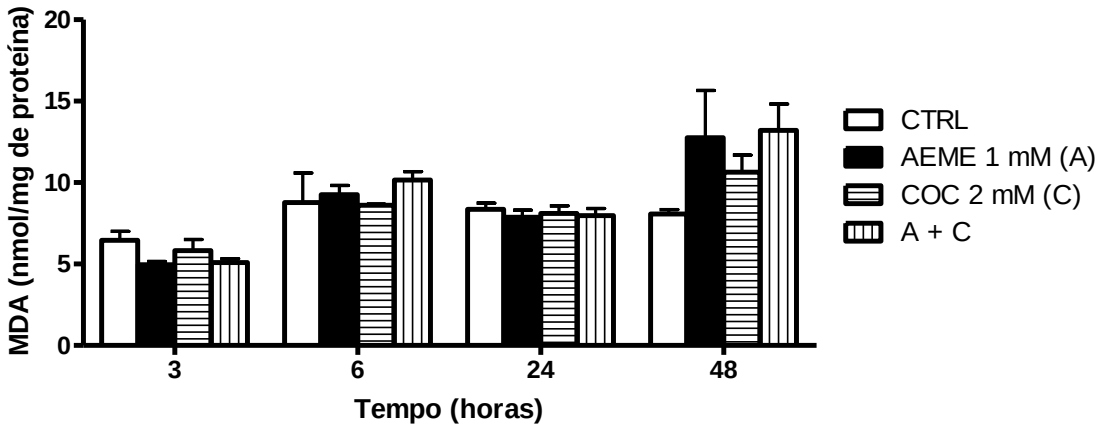


Figura 30 – Formação de MDA após 3, 6, 24 e 48 horas de exposição (n = 3). CTRL = controle; KCl = cloreto de potássio; COC = cocaína; AEME = metilecgonidina; A + C = associação entre metilecgonidina 1 mM e cocaína 2 mM. *(ANOVA e comparação múltipla de Newman-Keuls)*.

O gráfico da Figura 30 mostrou que não ocorre peroxidação lipídica após 3, 6 e 24 horas de incubação. Após 48 horas de exposição, há um aumento na formação de MDA, porém esse aumento não foi estatisticamente significativo, conforme pode ser evidenciado na Tabela 9.

Tabela 9 – Produção de MDA após 3, 6, 24 e 48 horas de exposição.

	nmol de MDA formado / mg de proteína			
Grupos	**3 horas**	**6 horas**	**24 horas**	**48 horas**
CTRL	6,5 ± 0,5	8,8 ± 1,8	8,4 ± 0,4	8,1 ± 0,3
AEME (A)	5,0 ± 0,2	9,3 ± 0,6	7,9 ± 0,4	12,8 ± 2,9
COC (C)	5,8 ± 0,7	8,6 ± 0,1	8,1 ± 0,5	10,6 ± 1,1
A + C	5,1 ± 0,2	10,2 ± 0,5	8,0 ± 0,4	13,2 ± 1,6

Nota: CTRL = controle; AEME = metilecgonidina; COC = cocaína; A + C = associação entre metilecgonidina 1 mM e cocaína 2 mM. *(ANOVA e comparação múltipla de Newman-Keuls)*.

5. Discussão

5. Discussão

A utilização de drogas de abuso constitui, atualmente, um problema de saúde pública mundial, pois, além de gerar gastos públicos no tratamento do usuário, promove o aumento da violência e o tráfico ilegal dessas substâncias.

Dentre as diversas drogas de abuso, a cocaína se destaca pelo seu elevado potencial em causar dependência. No Brasil, a cocaína é utilizada por 2,3% da população, principalmente nas regiões sul e sudeste, sendo utilizada preferencialmente por adolescentes do gênero masculino e adultos jovens (DUAILIBI et al., 2008).

Um fenômeno que tem sido observado recentemente é a transição entre as formas de uso de uma droga. Normalmente, a transição ocorre na busca de vias que possuem maior potencial de dependência. DUNN & LARANJEIRA (1999) avaliaram as transições que ocorrem em usuários de cocaína em nosso meio. A via de administração inicial da maior parte dos usuários foi a intranasal (87%), assim, as transições mais comuns foram em direção ao crack (68%) e à via intravenosa (20%). As transições associaram-se a indivíduos que tiveram início precoce do uso de cocaína, via de administração inicial intranasal ou injetável e baixo nível de escolaridade. Interessante destacar que os que faziam uso da via intravenosa migraram para o *crack* em função de seus efeitos e não pela facilidade da via de administração. Estes dados reforçam a necessidade de estudos a respeito dos efeitos do *crack*, principalmente em função do crescimento de seu uso na população jovem, o que, além de causar sérios prejuízos pessoais, causa importantes consequências econômicas para o país. Vale ressaltar que o *crack* é considerado a droga mais devastadora para seu usuário causando, entre outros efeitos,

irritabilidade, depressão, atos de violência, além de importante perda de peso, culminando com uma deterioração funcional geral do usuário.

Além dos efeitos tóxicos da cocaína, como a possibilidade de ocorrência de ataques cardíacos, problemas respiratórios, acidentes vasculares cerebrais, existem evidências apontando o envolvimento da cocaína e de seus metabólitos na neurodegeneração, semelhante ao que ocorre em muitas doenças do SNC.

Um dos principais mecanismos que levam à morte neuronal é o estresse oxidativo, que pode ser induzido de diversas maneiras. Uma delas é mediada pela ação exacerbada do glutamato, um neurotransmissor excitatório do SNC que, em condições fisiológicas, está envolvido na plasticidade neuronal, na memória, no aprendizado e no comportamento (ALBRIGHT et al., 2000). A ativação excessiva de receptores NMDA causada pelo excesso de glutamato, fenômeno conhecido como excitotoxicidade (WODJA et al., 2008), promove um aumento de Ca^{2+} citosólico que ativa enzimas dependentes de Ca^{2+}, como a NOS, aumentando a formação de EROS que, finalmente, pode culminar com a peroxidação lipídica e a morte neuronal (KOO et al., 2006; MONCADA et al., 2006). A produção de EROS pode ocorrer também por intermédio de processos neuroinflamatórios decorrentes de fatores de risco como alterações genéticas, traumas na região craniana, isquemias agudas e a exposição aos poluentes ambientais (FLOYD, 1999).

Diversos estudos destacam que a cocaína produz estresse oxidativo no SNC (KLOSS et al., 1983; KLOSS et al., 1984; DAS et al., 1987; BENUCK et al., 1988; KOVACIC et al., 1988; LLOYD et al., 1993; RAPAKA et al., 1997; GOLDSTEIN et al., 2004; BASHKATOVA et al., 2005; DIETRICH et al., 2005; MACEDO et al., 2005; POON et al., 2007). Entretanto, sabe-se que, ao fumar o *crack*, o sujeito está exposto, além da cocaína, ao seu produto de pirólise, como a AEME. No entanto,

pouco se sabe a respeito desta substância. A maior parte das informações levam a crer que, pelo menos perifericamente, ela exerça atividade colinérgica (JACOB et al.,1990; ERZOUKI et al., 1995; WOOLF et al.,1997; SCHEIDWEILER et al., 2003), porém, nada se sabe a respeito de seus efeitos neurotóxicos.

Assim, o objetivo do nosso estudo foi avaliar a participação da AEME e da cocaína na degeneração de células neuronais do hipocampo e verificar o envolvimento do estresse oxidativo. Mais ainda, por meio de análises morfológicas e de viabilidade celular, foi possível inferir qual processo de morte celular estava envolvido. Nossa intenção foi, além de comparar os efeitos desencadeados pela AEME e pela cocaína, verificar a interação desencadeada após associação dessas substâncias. Esta informação é extremamente importante, uma vez que um possível efeito aditivo entre cocaína e AEME pode ajudar a explicar os grandes prejuízos causados pelo *crack*. Vale a pena destacar que não existem estudos avaliando o efeito da cocaína em células hipocampais.

A informação de que usuários de *crack* têm prejuízos cognitivos (FATTORE et al., 2002; JAYALAKSHMI et al., 2005) vem reforçar nossa escolha pela cultura primária de hipocampo, uma vez que o esta é uma estrutura com grande participação nesses processos, como a memória, e tem participação direta em doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer.

Além de estarem envolvidas em processos importantes que ocorrem no SNC, como neuromodulação, neuroproteção, manutenção do pH, homeostase e remoção de íons e neurotransmissores da fenda sináptica, as células da glia são responsáveis também pela liberação de mediadores químicos, como citocinas pró-inflamatórias, que estão envolvidos em processos neurodegenerativos (ULLIAN et al., 2001; FATTORE et al., 2002). Como a nossa intenção foi estudar a ação direta

das substâncias nos neurônios, foi necessária a utilização de fetos e a adição do suplemento B27 ao meio de cultura para diminuir a proliferação de células da glia (XIE et al., 2000; SILVA et al., 2006). Para verificar a participação da glia nesse modelo experimental, foi realizado um ensaio imuno-histoquímico que revelou a presença de cerca de 7% deste tipo de célula, resultado próximo ao encontrado na literatura (XIE et al., 2000), demonstrando o predomínio de células neuronais na cultura.

O ensaio de MTT, utilizado para avaliar a viabilidade celular, mostrou que a concentração de 10^{-4} mM de cocaína após 24 horas de exposição apresentou valores de redução do MTT maiores que o controle, da mesma maneira que a concentração de 10^{-3} mM após 48 horas de exposição. De acordo com MOSMANN (1983), o MTT é reduzido a *formazan* por toda célula metabolicamente ativa, mas não por células mortas. Desta maneira, a quantidade de *formazan* gerado é diretamente proporcional ao número de células em uma população celular homogênea. Células ativadas produzem mais *formazan* que as células controle, assim, esse aumento pode ser interpretado de duas formas: 1) proliferação celular; ou 2) aumento da fosforilação oxidativa mitocondrial, que pode aumentar os produtos intermediários, que são espécies radicalares, sugerindo um desfecho para morte celular. Descartamos a possibilidade de neurogênese, que sabidamente ocorre no hipocampo, uma vez que o modelo de cultura adotado não apresenta células granulares as quais são responsáveis por esse processo. (BANKER & COWAN, 1977).

Com o aumento das concentrações tanto de cocaína quanto de AEME, houve diminuição do metabolismo mitocondrial (MTT) evidenciando morte neuronal. Fica claro que a AEME possui maior potencial em causar morte neuronal do que a

cocaína, uma vez que, após exposição de 24 horas, as concentrações que se mostraram diferentes do grupo controle foram a partir de 8 e 10^{-1} mM para cocaína e AEME, respectivamente. No caso da exposição após 48 horas, as concentrações iniciais que se mostraram diferentes do grupo controle foram 6 e 10^{-3} mM, respectivamente, evidenciando maior neurotoxicidade da AEME em comparação à cocaína. A partir dos resultados de MTT foi estimada, para este tipo de cultura, a CL50 para a cocaína, que se situou entre 2 e 8 mM, e para a AEME, que ficou entre 10^{-1} e 4 mM.

Uma vez evidenciada morte celular tanto pela cocaína quanto pela AEME, é importante fazer a diferenciação dos mecanismos subjacentes à este processo. Na tentativa de discriminar os processos de morte celular, MCCONKEY (1998) mostrou que alguns eventos bioquímicos pertencem tanto à apoptose quanto à necrose. Dentre eles, destacam-se o consumo de ATP, a concentração intracelular de Ca^{2+} e a produção de EROS. Esse mesmo autor destacou algumas diferenças morfológicas entre esses dois processos e, uma delas, foi em relação à integridade da membrana plasmática, a qual permanece íntegra na apoptose, mas não na necrose. Com o rompimento da membrana celular, diversos componentes citoplasmáticos são liberados para o meio extracelular, como a enzima LDH, a qual pode ser encontrada no meio de cultura, sendo que o aumento de sua atividade é um indicativo de necrose (SILVA et al., 2006; JIN et al., 2007). Assim, nossos resultados referentes à cocaína corroboram aos de POON et al. (2007), que mostraram aumento da atividade da LDH 72 horas após a exposição por 30 minutos de cocaína 1 μM em cultura progenitora de neurônios humanos. Estes dados sugerem que uma das vias pela qual a cocaína causa morte celular é a necrose (POON et al., 2007; SILVA et al., 2006). É interessante notar que, no nosso modelo experimental, somente a

incubação com a cocaína causou aumento desta enzima no meio de cultura, a AEME não causou alteração significativa. Assim, pode-se inferir que a AEME não causou necrose.

Com o objetivo de verificar a existência de interação entre a cocaína e a AEME, mais próximo ao que pode ocorrer a um usuário de *crack*, foram realizados experimentos com uma solução contendo ambos os compostos. As concentrações utilizadas nestes ensaios foram as que se encontravam dentro da faixa da CL50 para cada substância, isto é, 1 e 2 mM para AEME e cocaína, respectivamente. Mais ainda, foram realizadas incubações variando o tempo de exposição de 3 a 48 horas para determinar o menor tempo necessário para a observação de algum tipo de efeito destas duas substâncias.

Nossos resultados do ensaio do MTT mostraram que o efeito da associação da cocaína e AEME é dependente do tempo de incubação. Após 3 e 6 horas de exposição, as células mantiveram-se viáveis mesmo após associação das substâncias. A associação apresentou redução da viabilidade celular a partir de 12 horas de exposição, mantendo-se após 24 e 48 horas. Entretanto, após 48 horas de exposição, houve um efeito aditivo entre as substâncias. É importante destacar que as concentrações de cocaína e AEME escolhidas mostraram-se equipotentes durante todos os períodos de incubação, reforçando a associação encontrada. Esses resultados sugerem que um usuário de *crack* pode apresentar uma neurodegeneração mais intensa com o uso prolongado da droga.

Este efeito aditivo entre as substâncias do *crack* evidenciado em nosso estudo pode ajudar a explicar as afirmações de que os efeitos da utilização de *crack* são mais intensos quando comparados às demais vias de administração da cocaína

(HATSUKAMI et al., 1996; CHEN et al., 2004; CUNHA et al., 2004; AFONSO et al., 2007).

Outra evidência de que a AEME provavelmente não causa necrose é o resultado da enzima LDH após incubação com ambas as substâncias. Apesar da associação ter promovido alteração da enzima LDH, o aumento foi proveniente do efeito necrótico da cocaína, já que não houve diferença entre na atividade da LDH entre o grupo cocaína e a associação das duas substâncias.

A avaliação morfológica das células pode fornecer informações adicionais a respeito dos mecanismos envolvidos na morte neuronal causada pela cocaína e pela AEME. A apoptose apresenta, morfologicamente, fases bem características, iniciando pela diminuição da célula e a agregação de seus componentes. A cromatina nuclear se condensa à carioteca (picnose), apresentando um aspecto mais denso, podendo levar à *cariorréxis*, ou seja, a fragmentação do núcleo picnótico. Em seguida, formam-se bolhas de citoplasma a partir da membrana plasmática celular que se desprendem e formam pequenos corpos, conhecidos como corpos apoptóticos, que são por fim fagocitados (GALLUZZI et al., 2009). Assim, diferentemente da apoptose, a necrose é caracterizada por um aumento do volume celular que culmina com a ruptura da membrana plasmática e, consequentemente, degradação desorganizada do conteúdo citosólico (GALLUZZI et al., 2009). A microscopia confocal permite a visualização de algumas dessas etapas. As análises das fotos obtidas das células hipocampais expostas à cocaína e AEME mostraram células em processo de necrose e de apoptose. A característica que evidenciou o processo apoptótico dessas células foi a fragmentação da cromatina celular em grandes grumos e a formação de corpos apoptóticos presentes principalmente nas células expostas à AEME. Observou-se também que a projeção

e a ramificação axonal foram danificadas com a administração tanto de cocaína quanto de AEME, em ambas as doses e na associação, quando comparadas ao CTRL. Uma grande quantidade de debris celulares também foi encontrada nestes grupos. Essas análises reforçam os resultados do ensaio de LDH, mostrando que o efeito necrótico evidenciado no ensaio de LDH no grupo da associação entre cocaína e AEME foi proveniente da ação da cocaína. No caso da AEME, foram observadas alterações morfológicas condizentes com um mecanismo apoptótico de morte neuronal e não necrótico o que, mais uma vez confirma os ensaios de LDH. O efeito aditivo mostrado nos ensaios de MTT também pode ser visualizado morfologicamente pela quantidade de debris celulares.

A avaliação de alguns parâmetros do estresse oxidativo teve a intenção de verificar se este processo precederia a morte neuronal. Assim, as análises foram realizadas em tempos onde não foi evidenciada redução de viabilidade celular. As EROS são constantemente produzidas em condições normais como consequência do metabolismo aeróbico. Para combatê-las, as células apresentam um extenso sistema de defesa antioxidante quer seja pela interceptação direta, quer seja por mecanismos indiretos de reparo do dano oxidativo (CURTIN et al., 2002). O envolvimento desse processo como mecanismo neurodegenerativo foi realizado avaliando-se três parâmetros, sendo o primeiro a formação de adutos entre as substâncias de interesse e a desoxiguanosina (d-G) e o DNA. Nesta etapa, não foram observadas evidências de formação de adutos com a d-G, a base nitrogenada mais reativa presente no DNA, nem com o DNA comercial. Pela análise dos cromatogramas, pode-se observar que não houve alteração da intensidade do pico da d-G. Também não houve mudança no tempo de retenção ou formação de outros compostos que resultariam em outros picos. A avaliação foi feita comparando-se o

espectro de absorção realizada pelo detector UV acoplado ao cromatógrafo de cada pico formado. Este espectro é uma espécie de “impressão digital” para cada pico. Qualquer pico suspeito, por menor que fosse, teve seu espectro comparado com o espectro do controle correspondente no mesmo tempo de retenção. Em todos os casos o pico da substância presente na amostra era o mesmo presente no controle. A cocaína (pK_a = 8,61) só pode ser testada em pH 7,4 pois, em pH muito elevado, tornou-se insolúvel em solução aquosa. Apesar de NASSOGNE et al. (1997) terem demonstrado fragmentação do DNA após tratamento de células corticais com cocaína 0,5 mM, a não observação de adutos com as bases nitrogenadas do DNA em nosso estudo sugere que essas substâncias não atuam diretamente lesionando o DNA. Tendo em vista que a apoptose é, provavelmente, um dos mecanismos que levam à morte neuronal e que não houve dano das substâncias de interesse diretamente ao DNA, é possível que a AEME atue de maneira indireta, culminando com a fragmentação do DNA. Em relação à cocaína, a produção de EROS originada durante sua biotransformação poderia indiretamente levar à neurotoxicidade. (IMAM et al., 2005). De acordo com MARTIN (2008), hidroxilas radicalares formadas pelo estresse oxidativo podem extrair bases purínicas e pirimidínicas do DNA, liberando-as. Essa despurinização ou despirimidização pode ser mutagênica e levar à morte celular.

O segundo parâmetro avaliado foi a atividade das enzimas antioxidantes que podem ajudar a explicar o mecanismo envolvido na morte neuronal tanto da cocaína, quanto da AEME. POON et al. (2007) descreveram que o estresse oxidativo precedeu a morte neuronal, uma vez que a liberação de LDH, que ocorreu 72 horas após a exposição a cocaína 1 μM, ocorreu 24 horas após as alterações bioquímicas, como o aumento dos níveis de proteínas carboniladas e de 4-hidroxinonenal e

diminuição dos níveis de GSH. Na tentativa de elucidar se há envolvimento do estresse oxidativo em nosso modelo experimental, foi avaliada a atividade das enzimas GPx, GR e GST. As concentrações utilizadas nesses ensaios foram as mesmas que nos ensaios anteriores, ou seja, 1 e 2 mM para AEME e cocaína, respectivamente. Nossos resultados mostram uma redução da atividade da GPx, após 3 horas de incubação, tanto após exposição à AEME e à cocaína, quanto para a associação entre as mesmas. Talvez essa redução seja decorrente da diminuição das quantidades de GSH, conforme observado por POON et al. (2007). Interessante observar que, em nosso modelo, não houve alteração nem da atividade da GR e nem da GST nesse período de incubação, sugerindo que a atividade desta última só é possível devido à capacidade da GR em manter os estoques de GSH. Após 6 horas de incubação, o decréscimo da atividade da GPx se manteve somente no grupo da associação. Apesar da diferença observada entre o grupo exposto à AEME e o grupo controle, esta não foi estatisticamente significativa, provavelmente devido ao baixo número de amostras analisadas. A atividade da GR permaneceu inalterada também neste período, no entanto, a atividade da GST diminuiu após exposição à AEME, à cocaína e à associação. Uma possível explicação para este achado reside na utilização da GSH no ciclo redox, composto pela GPx e pela GR, na tentativa de eliminar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formado pela ação persistente das substâncias, o contrário do que foi observado após 3 horas de exposição, onde a prioridade era utilizar os estoques de GSH em reações de conjugação para eliminar os xenobióticos presentes sem ocasionar a produção de substâncias radicalares. Ainda, como não ocorre aumento da atividade da GR, a diminuição das atividades da GPx e da GST poderia ser decorrente de uma produção insuficiente de GSH, uma vez que as duas competem pelo mesmo substrato. É importante enfatizar que

esta diminuição das atividades enzimáticas após 3 e 6 horas de exposição aos xenobióticos pode ter sido precedida por um aumento imediato destas atividades, conforme já observamos em outros estudos de nosso grupo. Em um modelo de exposição de animais à fumaça de cigarro, ocorre, em praticamente todas as estruturas encefálicas, aumento das atividades da GST e da GPx quando a eutanásia é realizada imediatamente após a exposição. Porém, essas atividades diminuem quando ela é realizada 3 horas após a exposição.

A geração de EROS pode levar à peroxidação lipídica que, por sua vez, pode produzir cetonas, epóxidos e aldeídos, como o MDA. Além de alterar a fluidez da membrana, alguns compostos formados durante a peroxidação lipídica, como o próprio MDA, podem interagir com o DNA, por exemplo, provocando alterações nas funções dessa macromolécula (LOUREIRO et al., 2002). O terceiro e último parâmetro avaliado, portanto, foi a formação de MDA. Nossos resultados mostraram que não houve aumento significativo de MDA em nenhum período de exposição aos xenobióticos. Apesar de não significativo estatisticamente, podemos observar um aumento na formação de MDA após 48 horas de exposição à AEME, à cocaína e à associação, porém, provavelmente devido ao alto erro padrão e ao baixo número de amostra, esta diferença não atingiu o nível de significância necessário. Uma explicação para esse possível aumento seria decorrente das alterações do sistema enzimático antioxidante, corroborando com o aumento da peroxidação lipídica pelo aumento de espécies reativas de oxigênio.

Além do metabolismo N-oxidativo da cocaína, seus próprios mecanismos toxicodinâmicos também podem favorecer a produção de EROS, uma vez que o aumento dos níveis de dopamina, a qual é removida da fenda sináptica via auto-oxidação ou pela ação da monoaminooxidase (MAO), produzem H_2O_2 (KLOSS et al.,

1983; KLOSS et al., 1984; DAS et al., 1987; BENUCK et al., 1988; KOVACIC et al., 1988; LLOYD et al., 1993; RAPAKA et al., 1997; GOLDSTEIN et al., 2004; BASHKATOVA et al., 2005; DIETRICH et al., 2005; MACEDO et al., 2005; POON et al., 2007). A toxicodinâmica da AEME no SNC ainda não foi estudada, mas, caso sua ação muscarínica seja confirmada, é possível que esta substância leve à neurodegeneração pela estimulação de receptores muscarínicos tipo M_3 (SCHEIDWEILER et al., 2003). Esta subclasse de receptores está acoplada a uma proteína G_q que, quando ativada, estimula a atividade da fosfolipase C, responsável pela clivagem do fosfatidilinositol bifosfato presente na membrana celular. Um dos produtos resultantes desta quebra é o trifosfato de inositol, o qual promove a liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático. De acordo com MCCONKEY (1998), a liberação do estoque de Ca^{2+} intracelular pode levar tanto à apoptose pela ativação da calpaína, uma protease dependente de Ca^{2+}, quanto à necrose, onde ocorre uma liberação massiva de Ca^{2+} que sobrecarrega a atividade mitocondrial levando ao colapso do gradiente eletroquímico e subsequente depleção de ATP.

Nossos resultados sugerem que a AEME e a cocaína, nas concentrações testadas e no modelo experimental empregado, atuem no processo neurodegenerativo por mecanismos diferentes, sendo precedida pela produção de EROS. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos na ação tóxica da AEME.

6. Conclusão

6. Conclusão

A AEME é mais neurotóxica que a cocaína em cultura de células primárias de hipocampo, já que concentrações mais baixas de AEME promoveram a morte neuronal, evidenciado no ensaio de MTT.

As prováveis vias envolvidas no mecanismo de morte das células hipocampais causada pela cocaína na concentração de 2 mM são apoptose e a necrose. Porém, no caso da AEME 1 mM, a provável via é a apoptose, uma vez que não houve liberação da enzima LDH.

Em ambos os casos houve diminuição da atividade enzimática antioxidante, o que sugere que o estresse oxidativo possa preceder a morte neuronal.

A fragmentação do DNA, observada na microscopia, ocorre por mecanismos indiretos como, por exemplo, o estresse oxidativo, uma vez que não foi observada a formação de adutos entre as substâncias de interesse e o DNA.

O efeito aditivo observado entre a cocaína e a AEME nas células hipocampais, após 48 horas de exposição, no ensaio de MTT, sugere que o usuário de *crack* pode estar exposto a uma maior neurodegeneração que o usuário de cocaína pelas demais vias de administração.

7. Referência Bibliográfica

7. Referência Bibliográfica

ABE, K.; SAITO, H. Both oxidative stress-dependent and independent effects of amyloid β protein are detected by (3-4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay. **Brain Research**, v. 830: 146-154, 1999.

AFONSO, L.; MOHAMMAD, T.; THATAI, D. *Crack* whips the heart: a review of the cardiovascular toxicity of cocaine. **Am J Cardiol.**, v. 100:1040-1043, 2007.

ALBRIGHT, T. D.; JESSEL, T. M.; KANDEL, E. R.; POSTER, M. I. Neural science: a century of progress and the mysteries that remain. **Cell**, v. 18 (100):1-55, 2000.

ALKONDON, M.; ALBUQUERQUE, E. X. A non-α7 nicotinic acetylcholine receptor modulates excitatory input to hippocampal CA1 interneurons. **J. Neurophysiol.**, v. 87:1651-1654, 2002.

AMARAL, D. G. A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 15:851-914, 1978.

AMARAL, D; LAVENEX P. Hippocampal Neuroanatomy. In: P. ANDERSEN; R. MORRIS; D. AMARAL; T. BLISS; J. O'KEEFE (Eds.). **The Hippocampus Book**. Oxford University Press (Oxford), 37-114, 2007.

ANDERSON-BROWN, T.; SLOTKIN, T. A.; SEIDLER, F. J. Cocaine acutely inhibits DNA synthesis in developing rat brain regions: evidence for direct actions. **Brain Research**, v. 537 (1-2):197-202, 1990.

ARACAVA, Y.; DESHPANDE, S. S.; SWANSON, K. L.; RAPOPORT, H.; WONNACOTT, S.; LUNT, G.; ALBUQUERQUE, E. X. Nicotinic acetylcholine receptors in cultured neurons from the hippocampus and brain stem of the rat characterized by single channel recording. **FEBS Lett.**, v. 222 (1):63-70, 1987.

ARACAVA, Y.; PEREIRA, E. F. R.; MAELICKE, A.; ALBUQUERQUE, E. X. Memantine blocks α7* nicotinic acetylcholine receptors more potently than N-methyl-D-aspartate receptors in rat hippocampal neurons. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 312 (3):1195-1205, 2005.

AUGUSTO, O. Radicais livres como maus à vida. In: O. AUGUSTO (Ed.). **Radicais livres: bons, maus e naturais**, Oficina de Textos (SP), 35-70, 2006.

BANHATO, E. F. C.; DO NASCIMENTO, E. Função executiva em idosos: um estudo utilizando subtestes da Escala WAIS-III. **Psico-USF**, v. 12 (1):65-73, 2007.

BANKER, G. A.; COWAN, W. M. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. **Brain Research**, v. 126 (3):397-42, 1977.

BENUCK, M.; REITH, M. E. A.; LAJTHA, A. Presence of toxic metabolite N-hydroxy-norcocaine in brain and liver of the mouse. **Bioch. Pharmacol.**, v. 37 (6):1169-1172, 1988.

BASHKATOVA, V.; MEUNIER, J.; MAURICE, T.; VANIN, A. Memory impairments and oxidative stress in the hippocampus of in-utero cocaine-exposed rats. **Neuroeport**, v. 16 (11):1217-21, 2005.

BOLLA, K. I.; ROTHMAN, R.; CADET, J. L. Dose-related neurobehavioral effects of chronic cocaine use. **J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.**, v. 11:361-369, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., v. 72:248-54, 1976.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. J. Biol. Chem., v. 250 (14):5475-5480, 1975.

CARLINI, E. A.; GALDURÓZ, J. C. F.; NOTO, A. R.; NAPO, S. A. I Levantamento Domiciliar sobre o uso de drogas Psicotrópicas no Brasil. São Paulo: [**CEBRID**] Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas, Departamento de Psicobiologia, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal Paulista; 2001.

CARLINI, E. A.; GALDURÓZ, J. C. F.; NOTO, A. R.; NAPO, S. A. II Levantamento Domiciliar sobre o uso de drogas Psicotrópicas no Brasil. São Paulo: [**CEBRID**] Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas, Departamento de Psicobiologia, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal Paulista; 2005.

CARVALHO, V. M. Pesquisa dos bioindicadores de uso do *crack* em amostras de urina de indivíduos submetidos a exame médico-legal. Dissertação para obtenção do grau de MESTRE, 2006.

CEBRID – Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas: http://www.cebrid.epm.br/index.php, 2003.

CHANG, L.; ERNST, T.; STRICKLAND, T.; MEHRINGER, C. M. Gender effects on persistent cerebral metabolite changes in the frontal lobes of abstinent cocaine users. **Am. J. Psychiatry**, v. 156:716-722, 1999.

CHASIN, A. A. M. & MIDIO, A. F. Cocaína como agente de *causa mortis*. **Revista Saúde, Ética e Justiça**, v. 2 (1):47-59, 1997.

CHASIN, A. A. M.; SILVA, E. S.; CARVALHO, V. M. Estimulantes do Sistema Nervoso Central. In: S. OGA; M. M. A. CAMARGO; J. A. O. BATISTUZZO (Eds.). **Fundamentos de Toxicologia**, 3 ed., Atheneu (SP), 353-374, 2008.

CHEN, C-Y; ANTHONY, J. C. Epidemiological estimates of risk in the process of becoming dependent upon cocaine: cocaine hydrochloride powder versus *crack* cocaine. **Psychopharmacology**, v. 172:78-86, 2004.

CRITS-CHRISTOPH, P.; NEWBERG, A.; WINTERING, N.; PLOESSL, K.; GIBBONS, M. B. C.; RING-KURTZ, S.; GALLOP, R.; PRESENT, J. Dopamine transporter levels in cocaine dependent subjects. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 98:70-76, 2008.

CUNHA, P. J.; NICASTRI, S.; GOMES, L. P.; MOINO, R. M.; PELUSO, M. A. Neuropsychological impairments in *crack* cocaine-dependent inpatients: preliminary findings. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 26 (2):103-6, 2004.

CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **J. Immunol. Methods**, v. 265:49-72, 2002.

DAS, N. P.; RATTY, A. K. Studies on the effects of the narcotic alkaloids, cocaine, morphine, andcodeine on nonenzymatic lipid peroxidation in rat brain mitochondria. Biochem. **Med. Metab. Biol.**, v. 37:258-264, 1987.

DEL OLMO, N.; MIGUENS, M.; HIGUERA-MATAS, A.; TORRES, I.; GARCIA-LECUMBERRI, C.; SOLIS, J. M.; AMBROSIO, M. Enhancement of hippocampal long-term potentiation induced by cocaine self-administration is maintained during the extinction of this behavior. **Brain Research**, v. 1116:120-126, 2006.

DI SCLAFANI, V.; TOLOU-SHAMS, M.; PRICE, L. J.; FEIN, G. Neuropsychological performance of individuals dependent on *crack*-cocaine, *crack*-cocaine and alcohol, at 6 week and 6 months of abstinence. **Drug Alcohol Depend.**, v. 66:161-171, 2002.

DIETRICH, J. B.; MANGEOL, A.; REVEL, M. O.; BURGUN, C.; AUNIS, D.; ZWILLER, J. Acute or repeated cocaine administration generates reactive oxygen species and induces antioxidant enzyme activity in dopaminergic rat brain structures. **Neuropharmacology**, v. 48 (7):965-74, 2005.

DUAILIBI, L. B.; RIBEIRO, M.; LARANJEIRA, R. Profile of cocaine and crack users in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 24 (4):S545-S557, 2008.

DUNN, J.; LARANJEIRA, R. R.; DA SILVEIRA, D. X.; FORMIGONI, M. L.; FERRI, C. P. Crack cocaine: an increase in use among patients attending clinics in São Paulo: 1990 – 1993. **Substance Use & Misuse**, v. 31:519-527, 1996.

DUNN, J.; LARANJEIRA, R. R. Transitions in the route of cocaine administration – characteristics, direction and associated variables. **Addiction**, v. 94 (6):813-824, 1999.

ERZOUKI, H. K., ALLEN, A. C., NEWMAN, A. H., GOLDBERG, S. R., SCHINDLER, C. W. Effects of cocaine, cocaine metabolites and cocaine pyrolysis products on the hindbrain cardiac and respiratory centers of the rabbit. **Life Sci.**, v. 57:1861-1868, 1995.

FANDIÑO, A. S.; TOENNES, S. W.; KAUERT, G. F. Studies on hydrolytic and oxidative metabolic pathways of anhydroecgonine methyl ester (methylecgonidine) using microssomal preparations from rat organs. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 15:1543-1548, 2002.

FANTEL, A. G.; PERSON, R. E. Involvement of mitochondria and other free radicals sources in normal and abnormal fetal development. **Ann NY Acad. Sci.**, v. 959:424-433, 2002.

FATTORE, L.; PUDDU, M. C.; PICCIAU, S.; CAPPAI, A.; FRATTA, W.; SERRA, G. P.; SPIGA, S. Astroglial in vivo response to cocaine in mouse dentate gyrus: a quantitative and qualitative analysis by confocal microscopy. **Neuroscience**, v. 110 (1):1-6, 2002.

FILHO, O. F. F.; TURCHI, M. D.; LARANJEIRA, R.; CASTELO, A. Perfil sociodemográfico e de padrões de uso entre dependentes de cocaína hospitalizados. **Rev. Saúde Pública**, v. 37 (6):751-759, 2003.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione preoxidase. Methods Enzymol., v. 105:114-21, 1984.

FLOYD, R. A. Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: an hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and

nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26 (9/10):136-1355, 1999.

FLOYD, R. A. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 222:236-245, 1999.

GALLUZZI, L.; BLOMGREN, K.; KROEMER, G. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 10 (7):481-94, 2009.

GIL, H. L. B.; MELLO, D. F.; FERRIANI, M. G. C.; SILVA, M. A. I. Perceptions of adolescents students on the consumption of drugs: a case study in Lima, Peru. **Rev Lat Am Enfermagem**, v. 16:551-557, 2008.

GOLDSTEIN, S.; SAMUNI, A.; MERENYI, G. Reactions of nitric oxide, peroxynitrite, and carbonate radicals with nitroxides and their oxoammonium corresponding cations. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 17:250-257, 2004.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem., v. 249 (22):7130-7139, 1974.

HATSUKAMI, D. K.; FISCHMAN, M. W. *Crack* cocaine and cocaine hydrochloride. Are the differences myth or reality? **J Am Med Association**, v. 276 (19):1580-1588, 1996.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407 (6805):770-6, 2000.

HUETTNER, J. E.; BAUGHMAN, R. W. Primary culture of identified neurons from the visual cortex of postnatal rats. **J. Neurosc.**, v. 6:3044-3060, 1986.

IMAM, S. Z.; DUHART, H. M.; SKINNER, J. T.; ALI, S.F. Cocaine induces a differential dose-dependent alteration in the expression profile of immediate early genes, transcription factors, and caspases in PC12 cells: a possible mechanism of neurotoxic damage in cocaine addiction. **Ann NY Acad Sci**, v. 1053:482-90, 2005.

IOUDINA M.; UEMURA E.; GREENLEE, H. W. Glucose insufficiency alters neuronal viability and increases susceptibility to glutamate toxicity. **Brain Research**, v. 1004: 188-192, 2004

JACOB, P. III., LEWIS, E. R., ELIAS-BAKER, B. A., JONES, R. T. A pyrolysis product, anhydroecgonine methyl ester (methylecgonidine), is in the urine of cocaine smokers. **J. Anal. Toxicol.**, v. 14:353-357, 1990.

JAHR, C. E.; STEVENS, C. F. Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons. **Nature**, v. 325 (6104):522-5, 1987.

JAYALAKSHMI, K.; SAIRAM, M.; SINGH, S. B.; SHARM, S. K.; ILAVAZHAGAN, G.; BANERJEE, P. K. Neuroprotective effect of N-acetyl cysteine on hypoxia-induced

oxidative stress in primary hippocampal culture. **Brain Research**, v. 1046:97-104, 2005.

JIN, Y.; WU, H.; COHEN, E. M.; WEI, J.; JIN, H.; PRENTICE, H.; WU, J-Y. Genistein and daidzein induce neurotoxicity at high concentrations in primary rat neuronal cultures. **J. Biomedical Sci.**, v. 14:275-284, 2007.

JULIEN, R. M. A primer of drug action: a concise, nontechnical guide to the actions, uses and side effects of psychoactive drugs. 7ed. New York: W. H. Freeman, 125-143, 1995.

KIVELL, B. M.; MCDONALD, F. J; MILLER, J. H. Method for serum-free culture of late fetal and early postnatal rat brainstem neurons. **Brain Res. Protoc.**, v. 6(3):91-9, 2001.

KLINE, R. H.; WRIGTH, J.; FOX, K. M.; ELDEFRAWI, M. E. Synthesis of 3-Arylecgonine Analogues as Inhibitors of Cocaine Binding and Dopamine Uptake. **J. Med. Chem.**, v. 33:2024-2027, 1990.

KLOSS, M. W.; ROSEN, G. M., RAUCKMAN, E. U. Biotransformation of norcocaine to norcocaine nitroxide by rat brain microssomes. **Psychopharmacology**, v. 84:221-224, 1984.

KLOSS, M. W.; ROSEN, G. M., RAUCKMAN, E. J. Evidence of enhanced in vivo lipid peroxidation after acute cocaine administration. **Toxicol. Lett.**, v. 15:65-70, 1983.

KOO, K. A.; KIM, S. H.; OH, T. H.; KIM, Y. C. Acteoside and its aglycones protect primary cultures of rat cortical cells from glutamate-induced excitotoxicity. **Life Sci.**, v. 79:709-716, 2006.

KOVACIC, P.; AMES, J. R.; JAWDOSLUK, M.; RYAN, M. D. Electron transfer mechanism for cocaine action. **Redox Chemistry and Interfacial Behavior of Biological Molecules**, 323-331, 1988.

LENDVAI, B.; VIZI, E. S. Nonsynaptic chemical transmission through nicotinic acetylcholine receptors. **Physiol. Rev.**, v. 88:333-349, 2008.

LIU, Y.; PETERSON, D. A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **J. Neurochem.**, v. 69:581-593, 1997.

LLOYD, R. V.; SHUSTER, L.;MASON, R. P. Reexamination of the microsomal transformation of N-hydroxynorcocaine to norcocaine nitroxide. **Mol. Pharmacol.**, v. 43:645-648, 1993.

LOUREIRO, A. P. M.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M. H. G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. **Quim. Nova**, v. 25 (5):777-793, 2002.

MACEDO, D. S.; DE VASCONCELOS, S. M.; DOS SANTOS, R. S.; AGUIAR, L. M.; LIMA, V. T.; VIANA, G. S.; DE SOUSA, F. C. Cocaine alters catalase activity in prefrontal cortex and striatum of mice. **Neurosci. Lett.**, v. 387 (1):53-6, 2005.

MARKESBERY, W. R. The role of oxidative stress in Alzheimer Disease. **Arch Neurol**, 56:1449-1452, 1999.

MARTIN, L. J. DNA damage and repair: relevance to mechanisms of neurodegeneration. **J Neuropathol Exp Neurol.**, v. 67 (5):377-387, 2008.

MERCILLE, S.; MASSIE, B. Induction of apoptosis in oxygen-deprived cultures of hybridoma cells. **Cytotechnology**, v. 15 (1-3):117-128, 1994.

MCCONKEY, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicol. Letters**, v. 99:157-168, 1998.

MONCADA, S.; BOLAÑOS, J. P. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. **J. Neurochem.**, v. 97:1676-1689, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65:55-63, 1983.

NASSOGNE, M. C.; LOUAHED, J.; EVRARD, P.; COURTOY, P. J. Cocaine induces apoptosis in cortical neurons of fetal mice. **J. Neurochem.**, v. 68 (6):2442-50, 1997.

NIDA – National Institute on Drug Abuse: http:// www.nida.nih.gov/ drugpages/cocaine.html.

O´BRIEN, C. P. Drogação e Uso Abusivo de Drogas. In: L. L. BRUNTON; J. S. LAZO; K. L. PARKER (Eds.). **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 11 ed., McGraw-Hill Interamericana do Brasil (RJ), 543-562, 2006.

PACIFICI, R.; FIASCHI, A. I.; MICHELI, L.; CENTINI, F.; GIORGI, G.; ZUCCARO, P. et al. Immunosuppression and oxidative stress induced by acute and chronic exposure to cocaine in rat. **Int. Immunopharmacol.**, v. 3:581-592, 2003.

POON, H. F.; ABDULLAH, L.; MULLAN, M. A., MULLAN, M. J.; CRAWFORD, F. C. Cocaine-induced oxidative stress precedes cell death in human neuronal progenitor cells. **Neurochem. Int.**, v. 50:69-73, 2007.

RAPAKA, R. S.; CHIANG, N.; MARTIN, B. R. Introduction: Pharmacokinetics, metabolism, and pharmaceutics of drugs of abuse. **NIDA**, v. 173:106-27, 1997.

RENVOIZE, C.; BIOLA, A.; PALLARDY, M.; BREARD, J. Apoptosis: identification of dying cells. **Cell Biol. Toxicol.**, v. 14 (2):111-20, 1998.

RIEDL, S. J.; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nature**, v. 5:897-907, 2004.

SCHEIDWEILER, K. B.; PLESSINGER, M. A.; SHOJAIE, J.; WOOD, R. W.; KWONG, T. C. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methylecgonidine, a *crack* cocaine pyrolyzate. **JPET**, v. 307:1179-1187, 2003.

SHARAN, N.; CHONG, V. Z.; NAIR, V. D.; MISHRA, R. K.; HAYES, R. J.; GARDNER, E. L. Cocaine treatment increases expression of a 40 kDa catecholamine-regulated protein in discrete brain regions. **Synapse**, v. 47:33-44, 2003.

SHIMIZU, S.; EGUCHI, Y.; KAMIIKE, W.; WAGURI, S.; UCHIYAMA, Y.; MATSUDA, H.; TSUJIMOTO, Y. BCL-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors. **Oncogene**, v. 13:21–29, 1996a.

SHIMIZU, S.; EGUCHI, Y.; KAMIIKE, W.; WAGURI, S.; UCHIYAMA, Y.; MATSUDA, H.; TSUJIMOTO, Y. Retardation of chemical hypoxia-induced necrotic cell death by BCL-2 and ICE inhibitors: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transductions. **Oncogene**, v. 12:2045–2050, 1996b.

SILVA, R. F. M.; FALCÃO, A. S.; FERNANDES, A., GORDO, A. C.; BRITO, M. A.; BRITES, D. Dissociated primary nerve cell cultures as models for assessment of neurotoxicity. **Toxicol. Letters**, v. 163:1-9, 2006.

THOMPSON, A. M.; SWANT, J.; GOSNELL, B. A.; WAGNER, J. J. Modulation of long-term potentiation in the rat hippocampus following cocaine self-administration. **Neuroscience**, v. 127 (1):177-85, 2004.

THOMPSON, A. M.; GOSNELL, B. A.; WAGNER, J. J. Enhancement of long-term potentiation in the rat hippocampus following cocaine exposure. **Neuropharmacology**, v. 42 (8):1039-42, 2002.

TOENNES, S. W.; FANDIÑO, A. S.; HESSE, F. J.; KAUERT, G. F. Artifact production in the assay of anhydroecgonine methyl ester in serum using gás chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, v. 792:345-351, 2003.

ULLIAN, E. M.; SAPPERSTEIN, S. K.; CHRISTOPHERSON, K. S.; BARRES, B. A. Control of synapse number by glia. **Science**, v. 291:657-661, 2001.

WILLETTS, J.; CHEN, L. C.; GREFE, J. F.; WOOD, R. W. Effects of methylecgonidine on acetylcholine-induced bronchoconstriction and indicators of lung injury in guinea pigs. **Life Sci.**, v. 57 (15):225-230, 1995.

WODJA, U.; SALINSKA, E.; KUZNICKI, J. Calcium ions in neuronal degeneration. **Life**, v. 60 (9):575-590, 2008.

WOOD, S. A.; RASMUSSEN, J. P.; HOLLAND, P. T.; CAMPBELL, R.; CROWE, A. L. M. First Report of the Cyanotoxin Anatoxin-A from *Aphanizomenon issatschenkoi* (cyanobacteria), **Journal of Phycology**, v. 43:356-365, 2007.

WOOLF, J. H.; HUANG, L.; ISHIGURO, Y.; MORGAN, J. P. Negative Inotropic Effect of Methylecgonidine, a Major Product of Cocaine Base Pyrolysis, on Ferret and Human Myocardium. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v.30 (3):352-359, 1997.

XIE, C.; MARKESBERY, W. R.; LOVELL, M. A. Survival of hippocampal and cortical neurons in a mixture of MEM+ and B27-supplemented neurobasal medium. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28 (5):665-672, 2000.

XIE, D. P.; CHEN, L. B.; LIU, C. Y.; ZHANG, C. L.; LIU, K. J.; WANG, P. S. Arecoline excites the colonic smooth muscle motility via M3 receptor in rabbits, **Chin J Physiol.**, v. 47 (2):89-94, 2004.

ZHANG, C.; LOMENZO, S. A.; BALLAY II, C. J.; TRUDELL, M. L. An Improved Synthesis of (+)-2-Tropinone. **J. Org. Chem.**, v. 62, 7888-7889, 1997.

Anexo 1

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

CEEA nº 13 /2007

CERTIFICADO

*Certificamos que o Projeto "**Efeitos da metilecgonidina (Produto de pirólise da cocaína) e de seus metabólicos na neurodegeneração**" (Protocolo CEEA nº142), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). **Raphael Caio Tamborelli Garcia** e da orientadora Profa. Tânia Marcourakis, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 12/03/2007.*

São Paulo, 12 de março de 2007.

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3677 / Fax: (11) 3813-5093 - e-mail: rtrigo@usp.br

Anexo 2

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN
Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos da metilecgonidina (produto de pirólise da cocaína) e de seus metabólitos na neurodegeneração", protocolo nº **372/07**, sob a responsabilidade de Solange Castro Afeche e Raphael Caio Tamborelli Garcia, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de **13/03/2007.**

"We certify that the Research entitled Effects of methylecgonidine (cocaine pyrolysis product) and metabolites on neurodegeneration, protocol n° 372/07, under the responsibility of Solange Castro Afeche and Raphael Caio Tamborelli Garcia, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 03/13/2007".

São Paulo, 16 de março de 2007.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan