

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**CIBELLE DE MELO BASTOS CAVALCANTE**

**INALAÇÃO DE CRACK AUMENTA A SUSCEPTIBILIDADE A CRISES  
EPILÉPTICAS VIA REDUÇÃO DA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE**

**MACEIÓ-AL**

**2018**

**CIBELLE DE MELO BASTOS CAVALCANTE**

**INALAÇÃO DE CRACK AUMENTA A SUSCEPTIBILIDADE A CRISES  
EPILEPTICAS VIA REDUÇÃO DA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Mestra em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Olagide Wagner de Castro  
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Urban Borbely

MACEIÓ-AL

2018

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

C376i Cavalcante, Cibelle de Melo Bastos.

Inalação de crack aumenta a susceptibilidade a crises epiléticas via redução da atividade da acetilcolinesterase / Cibelle de Melo Bastos Cavalcante. – 2018.

112 f. : il. color.

Orientador: Olagide Wagner de Castro.

Co-orientador: Alexandre Urban Borberly.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Maceió, 2018.

Bibliografia: f. 86-109.

Anexos: f. 111-112.

1. Ciências médicas. 2. Crack (Droga). 3. Cocaína. 4. Epilepsia. 4. Acetilcolina. 5. Encefalite límbica. I. Título.

CDU: 611.8:615.099



Universidade Federal de Alagoas  
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL - Campus A. C. Simões  
Av. Lourival Melo Mota, S/N  
Cidade Universitária - Maceió-AL  
CEP: 57072-900  
E-mail: ppgcs9@gmail.com  
Fone: 82 3214 1850

## Folha de Aprovação

Cibelle de Melo Bastos Cavalcante

Inalação de crack aumenta a susceptibilidade a crises epiléticas via redução da atividade da acetilcolinesterase

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 17 de outubro de 2018.

### Banca Examinadora

Prof. Dr. Olagide Wagner de Castro (Orientador)

Prof. Dr.ª Sônia Salgueiro Machado - (UFAL)

Prof. Dr. Victor Rodrigues Santos - (UFMG)

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa - LNFI, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - ICBS, da Universidade Federal de Alagoas - UFAL, sob orientação Prof. Dr. Olagide Wagner de Castro e coorientação do Prof. Dr. Alexandre Urban Borbely com auxílio dos seguintes institutos e instituições:

Instituto de Química e Biotecnologia – IQB/UFAL

Instituto de Ciências Biomédicas – ICB/UFU (Universidade Federal de Uberlândia)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

*Dedico ao meu maior bem, minha Família.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus e a minha família, em especial a mainha, Célia, pelo carinho e paciência que ouvia minhas lamúrias no decorrer desta caminhada e pela força que me transmitia para que pudesse seguir em frente.

Ao painho, Paulo, por ser minha referência de caráter e o homem do qual tanto me orgulho ser filha.

Ao meu marido, João Paulo, pela compreensão nas frequentes ausências, pelo carinho, preocupação e ajuda diária em momentos essenciais e principalmente por respeitar e apoiar meus sonhos, você não pode mensurar o quanto esse mestrado me fez te amar ainda mais!

Ao meu filho amado, Joãozinho, que de “inho” não tem mais nada, com seus 1.86m, por entender minhas ausências e preocupações com sua formação, por me distrair sempre nos piores momentos, me fazendo agradecer a Deus todos os dias por sua existência e principalmente por ser tão doce e gentil, inundando essa mãe de orgulho.

Aos meus irmãos, Cinthia e Júnior que nunca mediram esforços pra me ajudar nesta caminhada, amo vocês! Aos fofos dos meus sobrinhos, Netinho, que me fez a tia mais feliz do mundo ao aprender a me chamar de “titi bela” e me divertir com sua felicidade ingênua de ser criança nos fins de semana, e Márcio Henrique, bebê da titia que tem as bochechas mais gostosas do mundo.

À minha cunhada Laís, pelas conversas divertidas e “DRs” familiares, e ao meu cunhado Márcio, por sempre se disponibilizar a me ajudar.

Aos meus avós, Paulo e Carmelita, por sempre deixarem meus domingos mais felizes, onde me esquecia de todos os compromissos e problemas da semana, partilhando sorrisos e amenidades nas nossas conversas durante o jantar ou missa sagrada.

À minha prima, “lita” companheira de pesquisa e vizinha de laboratório pela força e serenidade nas conversas partilhadas, estas conversas ultrapassaram e reforçaram ainda mais nosso laço familiar.

A minha amiga e colaboradora, Élcia Maria, pelas conversas, almoços e gigante ajuda em manter meu lar sempre organizado e em harmonia.

Aos meus filhos de quatro patas, Marley e Bruce, que me recepcionavam com alegria ao chegar em casa e me entretiam com as mais desastradas brincadeiras e me consolavam nos momentos de desânimo, nunca vi amor tão puro e sincero.

Ao meu orientador Prof. Dr. Olagide Castro, pelas oportunidades concedidas e por me incentivar e ensinar a trilhar os primeiros passos na ciência.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Alexandre Borbely pelos sábios conselhos durante o estágio de docência e por incentivar sempre a “to think out the box”.

A Prof. Dr.a Sônia Salgueiro pela recepção em seu LBE, por seus ensinamentos e valiosas contribuições a este trabalho e pela gentileza e carinho que sempre me acolheu em seu grupo, e também por aceitar fazer parte da banca de qualificação e defesa.

Ao Prof. Dr. Marcelo Duzzioni, pela ajuda e observações nos momentos de sufoco em experimentos e na rotina do laboratório, que me fizeram ser mais atenta e cuidadosa em qualquer procedimento.

A Prof.a Dr.a Priscila Guimarães pela disponibilidade em sanar minhas dúvidas e pela gentileza de sempre.

A Prof.a Dr.a Silvana e sua colega de trabalho Tânia, por me ajudarem sempre na resolução de problemas relacionados ao CEUA.

Ao Prof. Timbó pelos conhecimentos partilhados ao longo da nossa revisão sistemática.

Aos meus Prof.s de inglês Tanzio e Marsha pelo auxílio e estímulo no aprimoramento do inglês.

Ao Prof. Dr. Ênio Bassi, por gentilmente aceitar fazer parte da banca de qualificação.

Ao Prof. Dr. Victor Santos, por se disponibilizar a vir a Maceió para participar da banca de defesa.

*To Ashok K. Shetty, PhD that received and treated me so nice in his laboratory at Texas A & M College of Medicine, where I got observe like to do Science in a terrific laboratory. In addition, I would like to thank the respect and affection in our reencounter at SfN's 47th annual meeting, Neuroscience 2017 and at Newroscience 2018.*

Aos colegas do LNFI “epilepsia”, Juci, Amanda, Igor, Shirley, Serejo e Maisa por me ajudarem nos experimentos, partilharem conhecimentos e por tornar o



ambiente laboral mais divertido. Em especial a Amanda, que se revelou uma amiga muito serena com sua doçura e molecagem e Juci, amiga que ganhei pra vida, com quem compartilhei os fardos mais pesados dessa caminhada, que mesmo com a vida atribulada, ouvia minhas lamúrias e me aconselhava de um modo, fazendo com que tudo parecesse mais leve. Ao infinito e além amiga! Nossa FeSBE ficou na história. Destaco ainda Igor, que se tornou um parceiro científico essencial nessa jornada e com quem compartilhei minha primeira apresentação internacional no *Neuroscience 2017* em Washington D. C., além das felicidades e desafios inerentes a viagem.

Aos colegas do LNFI “comportamento”, Neto, Fernanda, Danny, Dani, Gabi, Ricardo, Jardel, em especial ao Neto que me despertou a vontade de conhecer a ciência feita na Ufal e me apresentou ao meu orientador, além de compartilhar seus “venenos” que tanto nos fizeram rir ao longo desta trajetória.

Aos colegas do LBCM, por sempre se mostrarem solícitos, compartilhando conhecimentos, em especial a Thalita, Bruninha, Vanessa, Tay e Mykinha não tenho palavras para agradecer!

As colegas de LMC, Bruna Koike e May, em especial a May que neste finalzinho tem se tornado uma amiga muito especial e presente, exalamos afinidade desde sempre!

Aos colegas do LBE, Jaque, Álvaro, Gabriel, Ane, Fábio e Marcos por me recepcionarem com tanto apreço, sendo sempre prestativos e atenciosos a qualquer dúvida que me surgisse durante o tempo que trabalhamos juntos, em especial a Jaque que foi essencial para que compreendesse meus dados.

Ao Prof. Vieira do Laboratório de Fisiologia Vegetal de Arapiraca por abrir as portas para o nosso grupo de pesquisa, aos membros deste laboratório especialmente ao seu Pós doc Jessé, pela atenção e gentileza com que recebeu Bruna, May e eu nos dias de experimento compartilhados.

Ao Prof. Robinson Sabino, da Universidade de Uberlândia e sua aluna Emília pela disponibilidade em ajudar e colaboração essencial nos dados sobre saliva.

Aos funcionários do ICBS, destacando o galego, pela gentileza e disponibilidade em ajudar, a galega e a Paula, sempre muito atenciosa e irradiando alegria, pelas contribuições voluntárias e conversas divertidas no banheiro feminino e ao segurança, Ildson, sempre tão gentil e sorridente ora nas inspeções do

laboratório, ora nos corredores, onde me fazia sorrir mesmo em meio as dificuldades.

Ao meu instrutor de pilates, Dermeval Neto, pela força e paciência nas aulas em que mal respirava de tanto falar, desabafando sobre as dificuldades rotineiras inerentes ao mestrado e também à colega de pilates, Gessyca, que ouvia tudo por tabela e também me fazia rir com seus comentários mais hilários.

Aos meus amigos de coração, Wilma e Wilker, e Fernanda e Rocha que em nossas viagens e encontros de casais sempre me alegravam independente do momento em que estivesse atravessando, pois “*detalhes são com Roberto Carlos, Cibelle*”, como diz meu compadre Rocha.

E finalmente a minha melhor amiga Marta Emannuele *in memoriam*, que tanto torce por mim, mas infelizmente partiu no decorrer deste mestrado e só Deus sabe a falta que me faz e que me fez durante essa jornada.

Aos animais, o meu agradecimento e respeito, pois me permitiram realizar esta pesquisa.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de uma forma ou de outra na realização desta etapa da minha vida, meu abraço e sincero obrigada!

*"O impossível não é um fato: é uma opinião"*

*(Mario Sergio Cortella)*

*"Nunca tenha certeza de nada,  
porque a sabedoria começa com a dúvida."*

*(Sigmund Freud)*

## RESUMO

No Brasil, há relatos na literatura do uso do *crack* desde 1990. Nas últimas décadas seu consumo tem aumentado devido ao alto poder de adicção e baixo custo, causando um grave problema de saúde pública. O *crack* é uma droga psicoestimulante que pode provocar alterações neurológicas, bioquímicas e comportamentais. Estudos em animais têm mostrado que vias dopaminérgicas, glutamatérgicas e colinérgicas podem desempenhar papel na neurotoxicidade e comportamento, induzido pela inalação do *crack* e seus metabólitos. Dessa forma, o presente trabalho buscou avaliar latência, frequência, duração e gravidade para crises límbicas e expressão de wet dog shake (WDS) em ratos, 120min após microinjeção de baixa dose de pilocarpina (PILO) seguido da exposição aos produtos da pirólise do *crack*, bem como mensurar o fluxo salivar estimulado por administração de PILO (2 mg/Kg) 0h, 24h e 15 dias após exposição ao *crack*. Adicionalmente, buscando avaliar o mecanismo subjacente a crises e hipersalivação foi analisada a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo após 10 e 60min da microinjeção de baixa dose de PILO seguido da exposição ao *crack*. Nossos resultados revelam diminuição da latência para crises quando animais foram tratados com PILO e posteriormente expostos ao *crack* (PILO+CRACK). A frequência, duração e gravidade de crises epiléticas aumentaram no grupo PILO+CRACK em relação aos grupos expostos apenas à PILO ou ao *crack*. Quanto a expressão de WDS houve o aumento no grupo PILO+CRACK e PILO quando comparados ao CRACK. Aliado a isto, o peso das glândulas parótida e submandibular, não sofreram alterações durante a exposição 0h, 24h e 14 dias ao *crack*, apesar ter ser sido observado um expressivo aumento do fluxo salivar nos animais expostos durante 14 dias. Quando a atividade da AChE foi mensurada, no tempo de 10 min, mostrou-se aumentada no grupo CRACK quando comparado ao NAIVE e observou-se a inibição da AChE hipocampal, 60 min após a exposição ao *crack* nos grupos CRACK e PILO+CRACK quando comparado aos animais NAIVE. Em conjunto, estes achados sugerem que uma baixa dose de PILO seguida da inalação do *crack* aumenta a excitabilidade do tecido nervoso a ponto de promover diminuição do limiar para crises epiléticas, bem como o aumento do fluxo salivar, supostamente por meio da inibição de AChE.

Palavras chave: crises, crack, acetilcolina

## ABSTRACT

In Brazil, there have been reports in the literature on the use of crack cocaine since 1990. In the last decades its consumption has increased due to the high power of addiction and low cost, causing a serious public health problem. Crack cocaine is a psychostimulant drug that can cause neurological, biochemical and behavioral changes. Animal studies have shown that dopaminergic, glutamatergic and cholinergic pathways may play a role in the neurotoxicity and behavior induced by the inhalation of crack cocaine and its metabolites. Thus, the present study aimed to evaluate latency, frequency, duration and severity for limbic seizures and wet dog shake expression (WDS) in rats, 120 minutes after microinjection of low dose pilocarpine (PILO) followed by exposure to crack cocaine pyrolysis products, as well as to measure salivary flow stimulated by administration of PILO (2 mg / kg) 0h, 24h and 15 days after exposure to crack. In addition, the activity of acetylcholinesterase (AChE) in the hippocampus was analyzed after 10 and 60 minutes of microinjection of a low dose of PILO followed by exposure to crack cocaine. Our results show a decrease in latency for seizures when animals were treated with PILO and later exposed to crack cocaine (PILO + CRACK). The frequency, duration and severity of epileptic seizures increased in the PILO + CRACK group in relation to the groups exposed only to PILO or crack. As for the WDS expression, there was an increase in the PILO + CRACK and PILO groups when compared to the CRACK. In addition, the weight of the parotid and submandibular glands did not change during exposure (0h) and 24h and 14 days after exposure to crack, although an expressive increase in salivary flow was observed in animals exposed 14 days to inhalation of crack. The activity of AChE, in the time of 10 min, was increased in the CRACK group when compared to NAIVE and the inhibition of hippocampal AChE was observed 60 min after exposure to crack cocaine in the groups CRACK AND PILO + CRACK when compared to the animals NAIVE. Taken together, these findings suggest that a low dose of PILO followed by crack cocaine inhalation increases the excitability of nerve tissue to the extent of promoting lowering of the threshold for epileptic seizures, as well as increased salivary flow, presumably through inhibition of AChE.

Keywords: crises, crack cocaine, acetylcholine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- ESTIMATIVA DE ANOS SAUDÁVEIS PERDIDOS DA POPULAÇÃO MUNDIAL DEVIDO AO USO DE DROGAS EM 2015. ....	24
FIGURA 2 - NÚMERO DE PESSOAS QUE UTILIZARAM DROGAS ILÍCITAS E QUE ADQUIRAM PROBLEMAS DEVIDO AO USO DE DROGAS NO PERÍODO DE 2006-2013. ....	25
FIGURA 3 - NÚMERO DE USUÁRIOS EM MILHÕES EM 2015 E NÚMERO DE PAÍSES QUE RELATARAM APREENSÕES DE DROGAS ENTRE 2010 E 2015. ....	26
FIGURA 4 - PROPORÇÃO DE INDIVÍDUOS QUE UTILIZARAM DETERMINADA SUBSTÂNCIA ALGUMA VEZ NA VIDA NO BRASIL. ....	26
FIGURA 5 - FOLHETOS DE PROPAGANDA DO TÔNICO “COCA-COLA” .....	28
FIGURA 6 - PROPORÇÃO DE JOVENS E ADULTOS QUE UTILIZARAM DROGAS ILÍCITAS NO BRASIL.....	31
<b>FIGURA 7- USO DE “CRACK E/OU SIMILARES” NOS ÚLTIMOS 6 MESES, NAS CAPITALS, POR MACRORREGIÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>FIGURA 8 - VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DA COCAÍNA: ASPIRADA, INJETADA E INALADA. ....</b>	<b>33</b>
FIGURA 9 - FORMAS DE APRESENTAÇÃO DA COCAÍNA.....	33
FIGURA 10 – REAÇÃO DE PIRÓLISE OU DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA DA COCAÍNA.....	34
FIGURA 11 - DESENHO ESQUEMÁTICO DA VIA DOPAMINÉRGICA MESOLÍMBICA-CORTICAL.....	35
FIGURA 12 - BLOQUEIO DO TRANSPORTADOR DE DOPAMINA (DAT). ....	36
FIGURA 13 - EFEITO AUTO-RELATADO EM DIFERENTES ROTAS DE ADMINISTRAÇÃO DA COCAÍNA E TAXA DE OCUPAÇÃO DO DAT.....	37
FIGURA 14 - SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DA ACH.....	39
FIGURA 15 - NOVA CLASSIFICAÇÃO DAS EPILEPSIAS. ....	43
FIGURA 16 - PICOS CROMATOGRÁFICOS DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DO CRACK. ....	52
FIGURA 17 - APARATO DE EXPOSIÇÃO .....	54
<b>FIGURA 18 - PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO.....</b>	<b>54</b>
FIGURA 19 - LATÊNCIA PARA CRISES.....	58
FIGURA 20 - FREQUÊNCIA DE CRISES.....	60
FIGURA 21 - DURAÇÃO DAS CRISES.....	61
FIGURA 22 - QUANTIDADE DE WDS.....	62
FIGURA 23 – PESO DA SALIVA ESTIMULADA. ....	70
FIGURA 24 - PESO SUBMANDIBULAR. ....	71

FIGURA 25 - PESO PARÓTIDA. ....	71
FIGURA 26 - SALIVA ESTIMULADA. ....	72
FIGURA 27 - FÓRMULA PARA CÁLCULO DA ATIVIDADE A ACHE. ....	80
FIGURA 28 - DOSAGEM DE ACHE 10 MIN APÓS A EXPOSIÇÃO AO CRACK.....	84
FIGURA 29 - DOSAGEM DE ACHE 60 MIN APÓS A EXPOSIÇÃO AO CRACK.....	85

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESCALA DE RACINE.....	56
TABELA 2 - CLASSES DE RACINE MAIS FREQUENTES. ....	59



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACE</b>	<i>anhydroecgonine</i>
<b>ACh</b>	acetilcolina
<b>AChE</b>	acetilcolinesterase
<b>AEME</b>	<i>anhydroecgonine methyl ester</i>
<b>ATCh</b>	iodeto de acetiltiocolina ( )
<b>ChE</b>	colinesterase
<b>AP</b>	antero-posterior
<b>BChE</b>	butirilcolinesterase
<b>BTCh</b>	butiriltiocolina
<b>BIOCEN/UFAL</b>	Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas
<b>BZE</b>	<i>benzoylecgonina</i>
<b>CBD</b>	canabidiol
<b>CEBRID</b>	centro brasileiro de informações sobre drogas psicotrópicas
<b>ChAT</b>	colina acetiltransferase
<b>CRACK</b>	animais não submetidos à microinjeção de baixa dose de pilocarpina e expostos à fumaça do crack.
<b>CRE</b>	crises recorrentes e espontâneas
<b>CG-EM</b>	cromatográfica gasosa acoplada à espectrometria de massas
<b>DA</b>	dopamina
<b>DAE</b>	droga antiepiléptica
<b>DAG</b>	diacilglicerol
<b>DAT</b>	transportador de dopamina
<b>DTNB</b>	ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)
<b>DV</b>	dorso-ventral
<b>EEG</b>	eletroencefalograma
<b>EMA</b>	éster metil anidroecgonina
<b>e.v.</b>	endovenoso
<b>FIOCRUZ</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>GABA</b>	ácido gamma aminobutírico
<b>HIV</b>	vírus da imunodeficiência humana
<b>i.p</b>	intraperitoneal

<b>LNFI</b>	Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa
<b>ILAE</b>	International League Against Epilepsy
<b>IP3</b>	inositol trifosfato intracelular
<b>LENAD</b>	levantamento nacional de álcool e drogas
<b>mAChRs</b>	receptores muscarínicos metabotrópicos
<b>MEG</b>	metilecgonidida
<b>ML</b>	médio-lateral
<b>NAC</b>	núcleo accumbens
<b>nAChRs</b>	receptores nicotínicos ionotrópicos
<b>NAIVE</b>	animais não submetidos à microinjeção de baixa dose de pilocarpina e não expostos à fumaça do crack.
<b>NMDA</b>	n-metil-D-aspartato
<b>PILO+CRACK</b>	animais submetidos à microinjeção de baixa dose de pilocarpina e expostos à fumaça do crack.
<b>PILO</b>	animais submetidos à microinjeção de baixa dose de pilocarpina e não expostos à fumaça do crack.
<b>PFC</b>	córtex pré frontal
<b>SNA</b>	nervoso autônomo
<b>SNC</b>	sistema servoso central
<b>SNP</b>	sistema nervoso periférico
<b>SE</b>	<i>status epilepticus</i>
<b>s.c.</b>	subcutâneo
<b>UNODC</b>	united nations office on drugs and crime
<b>VTA</b>	área tegumentar ventral
<b>WDS</b>	<i>wet dog shake</i>
<b>5-HT</b>	serotonina

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	21
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	24
2.1. Drogas de abuso .....	24
2.2. Cocaína/crack .....	27
2.2.1. Histórico .....	27
2.2.2. Epidemiologia .....	31
2.2.3. Farmacologia e vias de administração .....	32
2.3. Dopamina e circuito recompensa .....	34
2.4. Sistema Colinérgico .....	38
2.5. Epilepsia.....	41
2.5.1 Epilepsia do lobo temporal .....	43
2.5.2. Modelos animais .....	44
3. Epilepsia e cocaína/crack.....	46
CAPÍTULO 1. EXPOSIÇÃO AOS PRODUTOS DA PIRÓLISE DO CRACK E AVALIAÇÃO PARA LIMIAR DE CRISES EPILÉPTICAS .....	48
1.1. Resumo .....	49
1.2. Introdução .....	49
1.3. Definição do problema.....	50
1.3.1 Hipóteses .....	50
1.3.2 Objetivos .....	50
1.3.2.1.Geral.....	50
1.3.2.2. Específicos .....	51
1.4. Materiais e Métodos .....	51
1.4.1. Aquisição do <i>crack</i> .....	51
1.4.1.1 Identificação da composição da fumaça do <i>crack</i> .....	52
1.4.1.2. Protocolo de segurança para manuseio do <i>crack</i> .....	52
1.4.2. Animais.....	53
1.4.3. Aparato de exposição.....	53
1.4.4. Protocolo da exposição da fumaça do <i>crack</i> .....	54
1.4.5. Cirurgia estereotáxica para implante de cânula .....	55
1.4.6. Microinjeções .....	55

1.4.7. Avaliação comportamental das crises .....	55
1.4.8. Delineamento experimental.....	56
1.4.9. Análises estatísticas .....	57
1.5. Resultados e discussões.....	57
1.5.1. Latência para crises .....	57
1.5.2. Frequência .....	59
1.5.3. Duração das crises.....	61
1.5.4. Wet dog shake (WDS).....	62
1.6. Conclusão .....	63
CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO DA SALIVA EM ANIMAIS EXPOSTOS À FUMAÇA DO CRACK.....	
2.1. Resumo .....	66
2.2. Introdução .....	66
2.2.1. Salivação.....	66
2.3. Definição do problema e hipóteses .....	67
2.3.1. Hipótese .....	68
2.3.2. Objetivos .....	68
2.3.2.1. Geral:.....	68
2.3.2.1. Específicos: .....	68
2.4. Materiais e Métodos .....	68
2.4.1. Animais.....	68
2.4.2. Protocolo da exposição da fumaça do <i>crack</i> .....	68
2.4.3. Coleta do fluxo salivar 0h, 24h e 14 dias após exposição à fumaça do <i>crack</i> .....	68
2.4.4. Coleta das glândulas.....	69
2.4.5. Delineamento experimental.....	69
2.4.6. Análises estatísticas.....	70
2.5. Resultados e discussões.....	70
2.6. Conclusão .....	73
CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA AChE NO HIPOCAMPO DE ANIMAIS EXPOSTOS A FUMAÇA DO CRACK.....	
3.1. Resumo .....	75
3.2. Introdução .....	75
3.3. Definição do problema.....	77
3.3.1. Hipótese .....	77

3.3.2. Objetivos .....	77
3.3.2.1. Geral:.....	77
3.3.2.2. Específicos: .....	77
3.4. Materiais e Métodos .....	78
3.4.1. Animais.....	78
3.4.2. Cirurgia estereotáxica.....	78
3.4.3. Microinjeções .....	78
3.4.4. Protocolo de exposição à fumaça do <i>crack</i> .....	78
3.4.5. Eutanásia e dissecação do hipocampo .....	78
3.4.6. Preparação do extrato livre de células .....	79
3.4.7. Atividade enzimática da AChE .....	79
3.4.8. Quantificação de proteínas.....	80
3.4.9. Delineamento experimental.....	80
3.4.10. Análises estatísticas.....	82
3.5. Resultados e discussões.....	82
3.5.1. Dosagem da AChE 10 min após a exposição ao <i>crack</i> .....	82
3.5.2. Dosagem da AChE 60 min após a exposição ao <i>crack</i> .....	84
3.6. Conclusão .....	86
REFERÊNCIAS .....	88
ANEXOS .....	112
ANEXO A.....	113
Parecer de aprovação na CEUA 27/2016.....	113
ANEXO B.....	114
Parecer de aprovação na CEUA 33/2016.....	114

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, drogas psicotrópicas tem se tornado um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, ocasionando transtornos de ordem física, psicológica e social nos usuários (CUNHA et al., 2004). A *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC) estima que em 2015, cerca de 250 milhões de pessoas da população adulta mundial, utilizou algum tipo de entorpecente, des milhões se tornaram usuários de drogas e apresentaram distúrb necessitaram de algum tipo de tratamento (UNODC, 2017a).

Existem múltiplas opções quando se trata de substâncias psicoativas que vão desde o tradicionalmente aceito para aqueles proibidos. Como o álcool, a anfetamina, cocaína, maconha, tabaco e, em menor escala, outras drogas populares (KODIROV, 2017). Entre essas drogas a cocaína tem se destacado devido ao aumento do consumo e problemas decorrentes de seu uso, evidenciando-a como uma preocupação de âmbito mundial (SAJJA; RAHMAN; CUCULLO, 2016; UNODC, 2017b).

Existem cerca de 17,1 milhões de usuários de cocaína no mundo, (UNODC, 2016a), e no Brasil, esta é a segunda droga ilícita mais consumida causando grande impacto na saúde pública. No contexto social, há o aumento da vulnerabilidade com relação às violências e crescimento da criminalidade (CHAVES et al., 2011; CHESNAIS, 1999; GOLDSTEIN et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2008, 2017; SANT'ANNA; AERTS; LOPES, 2005; SCHIFANO; CORKERY, 2008; SIEGAL et al., 2002).

Os usuários de cocaína podem apresentar complicações clínicas relevantes como: tremores incontroláveis, dor de cabeça, perda transitória da consciência, desmaios, acidente vascular cerebral (AVC), hemorragia cerebral, convulsões e morte, além de desordens psiquiátricas como a depressão e a ansiedade (CEBRID, 2014; DUALIBI; RIBEIRO; LARANJEIRA, 2008; GARCIA et al., 2012; KRAMER et al., 1990; LOWENSTEIN et al., 1987; PERAILE et al., 2010; VASCONCELOS, 2010).

A cocaína é o principal alcalóide extraído das folhas secas da planta *Erythroxylon coca* (*E. coca*), nomeada por Friedrich Gaedecke (Bahls, 2002), conhecida por suas propriedades anestésicas, normalmente de uso tópico devido ao

elevado risco de toxicidade sistêmica. As vias de administração mais utilizadas são: endovenosa, inalatória, intranasal e oral (DUALIBI; RIBEIRO; LARANJEIRA, 2008; JONES, 1997; LEITE; ANDRADE, 1999; WHO, 2013). Na sua forma fumada (ou inalada), a cocaína, recebe o nome de *crack*, devido aos estalos que emite ao ser aquecida, (BOGHDAI; HENNING, 1997; GOLDSTEIN; DESLAURIERS; BURDA, 2009). Os principais metabólitos da cocaína são *benzoylecgonina* (BZE), *anhydroecgonine* (ACE) e *anhydroecgonine methyl ester* (AEME) (FIORENTIN et al., 2017; TOENNES; FANDIÑO; KAUERT, 1999). O metabólito AEME é encontrado exclusivamente a partir da pirólise do crack e tem sido evidenciado na literatura por sua alta toxicidade. (AREAL et al., 2015; GARCIA et al., 2012, 2015). O abuso de cocaína/*crack* vem sendo associado a implicações neurológicas agudas como convulsões que podem ser desencadeadas na primeira utilização da droga ou após o seu uso contínuo. A literatura tem relacionado não somente a toxicidade da cocaína com a geração de crises, mas também do metabólito BZE (KONKOL et al., 1992) e AEME (AREAL et al., 2015; GARCIA et al., 2015). Dessa forma, crises isoladas ou autossustentadas provocadas por cocaína/*crack* e seus metabólitos pode o ser gatilho na geração do fenômeno da epileptogênese, que pode levar ao desenvolvimento crônico de epilepsia.

Diante destas problemáticas e apesar dos avanços relacionados aos efeitos agudos e crônicos do uso da cocaína na excitabilidade neuronal, no comportamento e em processos degenerativos, pouco se sabe sobre os efeitos da administração intrapulmonar da cocaína (*crack*). Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo testar a hipótese que o uso do *crack* aumenta a excitabilidade do tecido nervoso de modo a reduzir o limiar para crises epiléticas, bem como aumentar o fluxo salivar, possivelmente por alterações no sistema colinérgico subjacente.

Esta dissertação está dividida em três capítulos: o primeiro refere-se à análise comportamental de crises límbicas em modelo animal, seguida da exposição ao *crack*; o segundo, avalia parâmetros salivares de animais expostos ao crack e o terceiro, busca avaliar a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em animais expostos ao crack, revelando pistas do mecanismo de ação da via inalatória da cocaína.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Drogas de abuso

A expressão droga teve origem do vocábulo “*droog*” (holândes antigo) que tem significado de folha seca, uma vez que nos primórdios os medicamentos eram confeccionados à base de vegetais. Atualmente, a medicina define droga como qualquer substância capaz de modificar a função dos organismos vivos, resultando em mudanças fisiológicas e/ou comportamentais (CEBRID, 2014).

Um dos maiores problemas que afeta a sociedade atualmente é o consumo de drogas ilícitas. A utilização de substâncias psicoativas reflete na saúde, no convívio familiar e social do usuário, assim como também movimenta milhões por ano, estabelecendo um mercado financeiro ilícito altamente lucrativo em escala mundial (GOLDSTEIN; DESLAURIERS; BURDA, 2009; WHO, 2004).

O uso dessas substâncias está associado ao aumento da morbidade e mortalidade, doenças crônicas, infecciosas e desordens mentais (DEGENHARDT; HALL, 2012). Os danos ocasionados pelo abuso de drogas é sinalizado pelos 28 milhões de anos de vida saudável perdidos em todo o mundo em 2015 como resultado de morte prematura e deficiência, estimados pela UNODC (figura 1). Conseqüentemente, a expectativa de vida da população mundial tende a diminuir devido a complicações causadas pelo consumo de substâncias psicotrópicas.

**Figura 1-** Estimativa de anos saudáveis perdidos da população mundial devido ao uso de drogas em 2015.

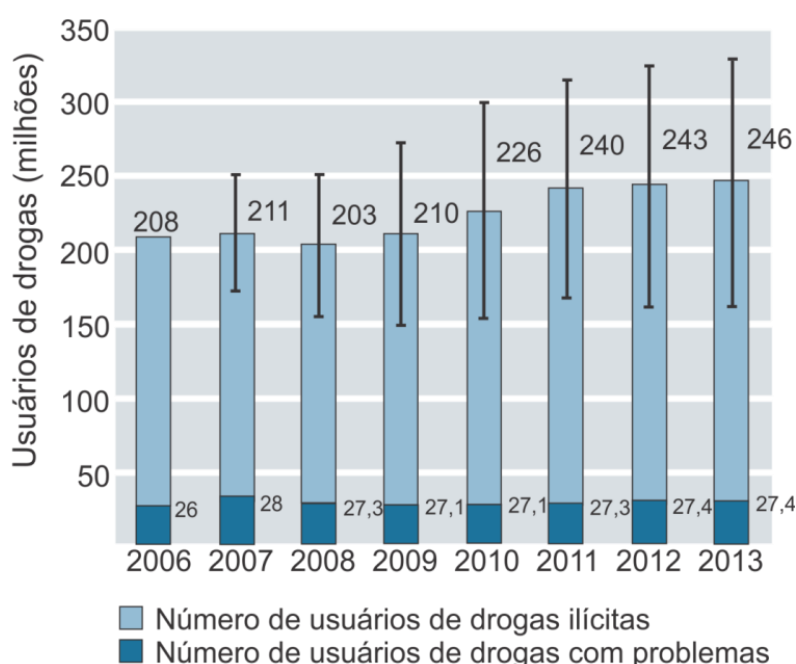


Fonte: Adaptado de World Drug Report, 2017.



Uma em cada vinte pessoas, entre 15 e 64 anos, utilizou drogas ilícitas em 2013 e cerca de 5% da população adulta global utilizou drogas ao menos uma vez em 2015 (UNODC, 2017b). A dimensão das implicações que as drogas causam para a população mundial fica mais evidente quando consideramos que mais de 1 em cada 10 usuários desenvolve problemas por uso de drogas (figura 2), desencadeando doenças e dependência química (UNODC, 2015).

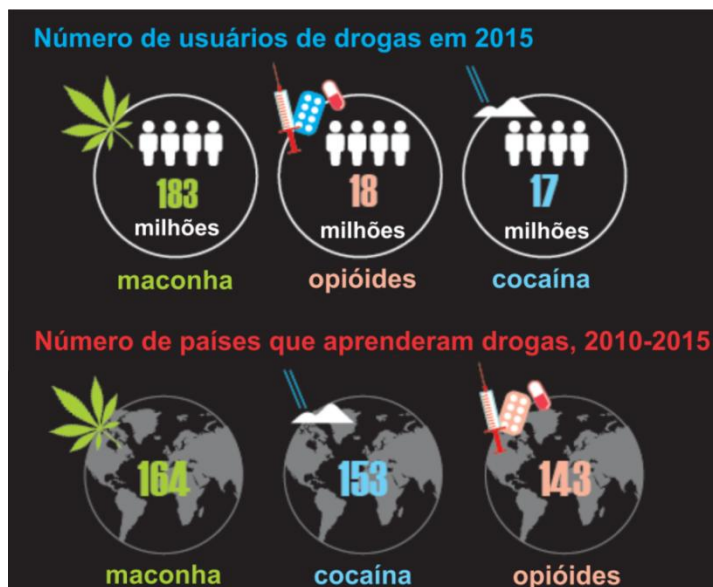
**Figura 2** - Número de pessoas que utilizaram drogas ilícitas e que adquiram problemas devido ao uso de drogas no período de 2006-2013.



Fonte: Adaptado de World Drug Report, 2015.

A UNODC dividiu as drogas psicotrópicas por sua origem: sintéticas e naturais. As drogas sintéticas são aquelas produzidas artificialmente em laboratório e as naturais são produzidas a partir da planta. Entre as drogas derivadas de plantas as de maior consumo mundialmente são: a maconha, os opióides e a cocaína respectivamente. Na figura 3, podem ser observados o número de usuários, assim como a quantidade de países que relatam apreensões, das drogas naturais mais consumidas (UNODC, 2017b).

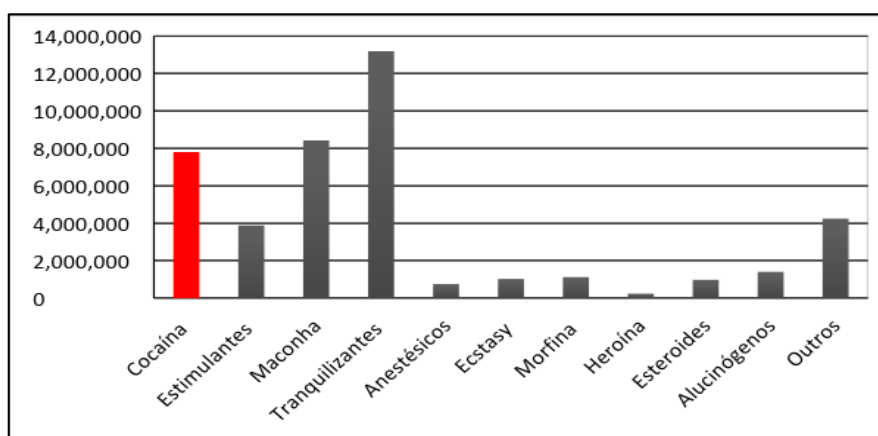
**Figura 3** - Número de usuários em milhões em 2015 e número de países que relataram apreensões de drogas entre 2010 e 2015.



Fonte: Adaptado de World Drug Report, 2017.

O Brasil foi mencionado como uma das nações emergentes onde o consumo de estimulantes como a cocaína está aumentando enquanto que na maioria dos países o consumo está diminuindo. No último levantamento brasileiro, a cocaína, em todas as suas formas de administração, foi a terceira substância ilícita mais mencionada entre os entrevistados, como pode ser observado na figura 4 (LENAD, 2014).

**Figura 4** - Proporção de indivíduos que utilizaram determinada substância alguma vez na vida no Brasil.



Fonte: Adaptado de LENAD, 2012

## 2.2. Cocaína/crack

### 2.2.1. Histórico

Há séculos os efeitos neurológicos da cocaína vêm sendo relatado. Há evidências que a cocaína foi utilizada há pelo menos 5.000 anos. A utilização de folhas de coca é atestada por inscrições sobre cerâmica e túmulos entre os incas e nas civilizações pré-incas (CHARLES-NICOLAS; LACOSTE; BALLON, 2009; SPIVEY; EUERLE, 1990).

A planta *E. coca*, que dá origem a cocaína, foi cultivada primeiramente na América do Sul, nas altas regiões dos Andes. Os índios bolivianos Aymara foram os primeiros a utilizar a palavra *coca* para identificar a planta, que significa planta ou árvore. Os Incas dominaram os Aymara e o monopólio da *E. coca*. A *civilização Inca* acreditava que a *coca* era uma planta medicinal e sagrada, portanto a utilizava em rituais religiosos, profecias, casamentos, funerais e nos rituais de iniciações de jovens nobres (GAY et al., 1975; SIEGEL, 1982).

Com o declínio do império Inca, o uso da coca perdeu seu significado religioso e seu uso se difundiu. No século XVI, quando os espanhóis conquistaram o império Inca, proibiram o uso da coca. No entanto, os espanhóis logo perceberam que sem coca, os índios escravizados expostos a longas jornadas de trabalho e escassez de comida, eram menos produtivos nas minas de ouro e no trabalho de campo. Com o objetivo de diminuir a fome, a fadiga e aumentar a força, eles permitiram aos escravos a mastigação das folhas da coca (CHARLES-NICOLAS; LACOSTE; BALLON, 2009).

O químico alemão Friedrich Gaedecke conseguiu, em 1855, o extrato das folhas de coca, chamando-o de *erythroxyline*. Em 1859, Albert Niemann, um químico alemão, conseguiu isolar o alcalóide cocaína, cerca de 80%, entre os numerosos alcalóides presentes na planta. Além da cocaína, Niemann identificou nicotina, cafeína e morfina e em concentrações menores, a tiamina, a riboflavina e o ácido ascórbico. Apenas em 1902, o ganhador do prêmio Nobel, Willstatt produziu sinteticamente a cocaína em laboratório, um pó branco cristalino na forma de cloridrato de cocaína (BENOWITZ, 1993; FERREIRA; MARTINI, 2001; SPIVEY; EUERLE, 1990; VASCONCELOS, 2010).

Seu uso foi difundido após uma publicação médica, de Sigmund Freud, propor seus benefícios em 1884. Este livro foi intitulado “Umber coca” no qual a cocaína era recomendada como estimulante sexual e para o tratamento de depressão, dependência de morfina, doenças digestivas e asma. A indústria farmacêutica da época declarou a cocaína como uma potencial descoberta terapêutica importante, promovendo-a como cura para várias doenças, enjoos e anemias. Freud colaborou para o entendimento das ações da cocaína, identificando-a como um estimulante do sistema nervoso central (SNC) e um euforizante (GAY et al., 1975; GOLDSTEIN; DESLAURIERS; BURDA, 2009; JOHANSON; FISCHMAN, 1989).

Durante o século XIX, a cocaína foi livremente comercializada nos Estados Unidos sendo empregada em algumas bebidas populares como o vinho Mariani e a coca-cola (figura 5). Em 1906, o alcalóide foi retirado da fórmula e atualmente, a cocaína foi substituída por cafeína (BAHLS; BAHLS, 2002; FERREIRA; MARTINI, 2001; GOLD; MILLER; SUMMERS, 1993; GOLDSTEIN; DESLAURIERS; BURDA, 2009).

**Figura 5** - Folhetos de propaganda do tônico “Coca-cola”.



Fonte: <http://guiadoscuriosos.uol.com.br/blog/2012/02/10/coca-cola-foi-por-36-anos-refrigerante-de-cocaina>, acessado em 30 de março de 2018.

O crescimento do uso da cocaína foi acompanhado pelo aumento dos efeitos danosos da droga (JOHANSON; FISCHMAN, 1989). O entusiasmo em relação à cocaína começou a desaparecer em 1887, quando Freud publicou um novo livro chamado “Fissura e medo da cocaína”, no qual relatava sintomas paranóides, alucinações, deterioração física e mental associada ao consumo contínuo. Relatos

abordando a dependência da cocaína, comportamento psicótico induzido, convulsões e mortes começaram a aparecer na literatura (BAHLS; BAHLS, 2002; FERREIRA; MARTINI, 2001; VASCONCELOS, 2010). Freud tentou excluir todo o episódio de abuso de cocaína de sua autobiografia, não obteve sucesso, e foi denunciado pelo prestigioso Erlenmeyer pela causa do "Terceiro flagelo da humanidade" (após o álcool e a morfina). Dessa forma, ele se tornou o primeiro cientista a ser culpado por um grande desastre envolvendo drogas (FERREIRA; MARTINI, 2001; GAY et al., 1975).

No início do século XX, as propriedades viciantes da cocaína tornaram-se amplamente conhecidas e foi criada a "Harrison Tax Act", aprovada em 1914, proibindo o uso e comercialização da cocaína entre outras substâncias (BENOWITZ, 1993; GOLDSTEIN; DESLAURIERS; BURDA, 2009; JOHANSON; FISCHMAN, 1989; SPIVEY; EUERLE, 1990). Com esta lei, a cocaína, assim como outras drogas se tornaram ilícitas, desaparecendo gradualmente, extinguindo qualquer tipo de controle de qualidade, criando simultaneamente um mercado ilícito para esta droga. A sociedade americana passou a substituir o consumo de cocaína por cafeína, iniciando a era "*coffee break*" (GAY et al., 1975).

Em 1910, no Brasil, a cocaína era comercializada sem restrições legais, inclusive como componente de remédios e até mesmo na sua forma pura. Após as restrições indicadas pela "Harrison Tax Act", a sociedade brasileira passou a se preocupar com a recente nocividade da cocaína. Assim como nos Estados Unidos, no Brasil foi criado o decreto lei 4.292, em 1921, que proibia o comércio da droga, além de criar penalidades para usuários e centros de tratamento (BAHLS; BAHLS, 2002; CICCARONE, 2011; MARTIN; LUE; BONI, 1989; STOLBERG, 2011).

No início do século XX houve uma diminuição do consumo da cocaína devido à repercussão dos vários efeitos indesejados da droga e as restrições legais impostas, finalizando a primeira era do abuso da cocaína (SPIVEY; EUERLE, 1990). O ressurgimento do consumo da cocaína ganhou destaque por volta dos anos 70 nos Estados Unidos em altas classes da sociedade, devido à ilegalidade e ao alto custo, porém o uso logo se difundiu para outras classes sociais e em outras formas de apresentação (JOHANSON; FISCHMAN, 1989; VASCONCELOS, 2010).

Em meados de 1985, nas Bahamas, surgiram sintomas clínicos de uma nova rota de administração da cocaína, nomeada de *crack*. No mesmo período esta forma

de administração surgiu em bairros pobres e marginalizados de Los Angeles, Nova York e Miami, cristais eram utilizados em cachimbos e estralavam quando expostos ao fogo, o que caracteriza o nome da droga. Iniciou-se assim mais uma era, potencialmente mais tóxica para esta droga (FERREIRA; MARTINI, 2001; KARCH, 1999; RIBEIRO; LARANJEIRA, 2010).

No Brasil, a partir da década de 90, derivados de coca começaram a ganhar preferência em algumas cidades brasileiras, principalmente o *crack* (pedra fumada em cachimbo) em bairros da Zona Leste de São Paulo para em seguida alcançar a região da Estação da Luz (conhecida como Cracolândia) e, a merla (pasta também fumada) em Brasília e, mais recentemente, o chamado "oxi" (pasta base de cocaína misturada a cal, querosene ou gasolina), nomeada pelos próprios consumidores da droga, no estado do Acre, aumentando ainda mais os problemas de saúde relacionados ao consumo da cocaína (BASTOS et al., 2011; NOTO; FORMIGONI, 2002; RIBEIRO; LARANJEIRA, 2010; SCHEIDWEILER et al., 2003).

O Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) observou na população brasileira um aumento progressivo no padrão de consumo da cocaína, concomitantemente ao surgimento do *crack* no país, e um alarmante crescimento no número de internações por transtornos mentais e de comportamento oriundos de substâncias psicoativas, identificando assim um grave problema de saúde pública (BAHLS; BAHLS, 2002; BOGHADADI; HENNING, 1997; CICCARONE, 2011). Nos últimos anos, alguns fatores contribuíram para o aumento no uso do *crack*, como o baixo custo de aquisição em relação ao cloridrato de cocaína e a intensidade e velocidade do efeito produzido pela droga fumada, caracterizando o quadro de fissura que está associado ao comportamento violento gerando aumento nos índices de criminalidade (HALPERN et al., 2017). Os efeitos nocivos do *crack* incluem o alto grau de desintegração da saúde, socioeconômico e mental; o envolvimento intenso com crime, marginalização, violência, prostituição e múltiplos parceiros sexuais; e o conseqüente aumento potencial de infecção pelo HIV (GONÇALVES; NAPPO, 2015; LEITE; ANDRADE, 1999).

Atualmente, o tráfico e consumo de cocaína/*crack* continua a ser uma preocupante questão social no Brasil e no mundo (BASTOS, 2012; CHAVES et al., 2011; GOBIRA et al., 2015; GOPAL DAS, 1993; GUIMARÃES et al., 2008; HALPERN et al., 2017)

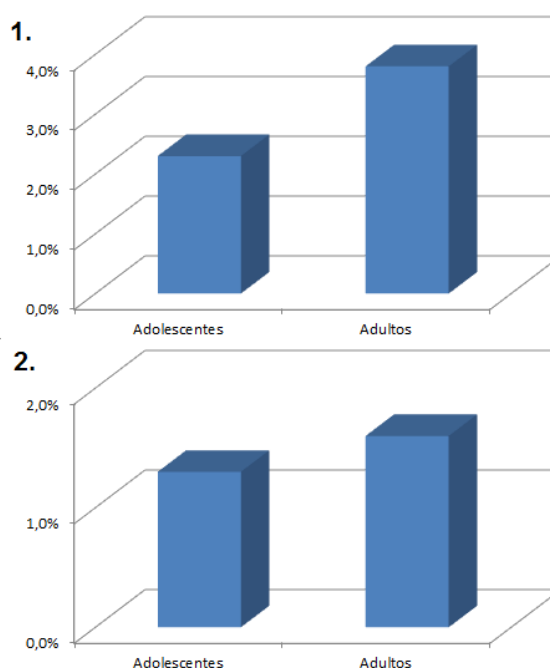
## 2.2.2. Epidemiologia

A prevalência global da utilização de cocaína, em todas as suas formas, permaneceu estável no período de 1998 a 2005 entre a população de 15 a 64 anos, enquanto que o número de usuários aumentou cerca de 30%, de 14 milhões em 2005 para 18,3 milhões em 2014 (UNODC, 2016b). Em geral, houve uma estagnação no número dos usuários de cocaína nos últimos anos em todos os continentes, porém na América do Sul o número de consumidores vem aumentando gradativamente, provavelmente pela popularização da forma fumada da cocaína (*crack*), devido ao baixo custo e alto poder de adicção (GOLDSTEIN; DESLAURIERS; BURDA, 2009; UNODC, 2016b).

O II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD, 2014) apresenta, entre outras drogas, a prevalência do uso da cocaína (figura 6) em todas as suas formas. Na população adulta observada, cerca de 5,4% utilizaram cocaína ao menos em um episódio da vida representando mais que 7 milhões de brasileiros com 18 anos ou mais. Enquanto que este índice entre os adolescentes representa 3,6%, o que corresponde a quase 500 mil jovens. Ainda na figura 6, podemos observar as prevalências de cocaína na forma aspirada, cloridrato de cocaína (figura 6.1) e fumada, *crack*, merla ou oxi (figura 6.2) na população brasileira.

**Figura 6** - Proporção de jovens e adultos que utilizaram drogas ilícitas no Brasil.

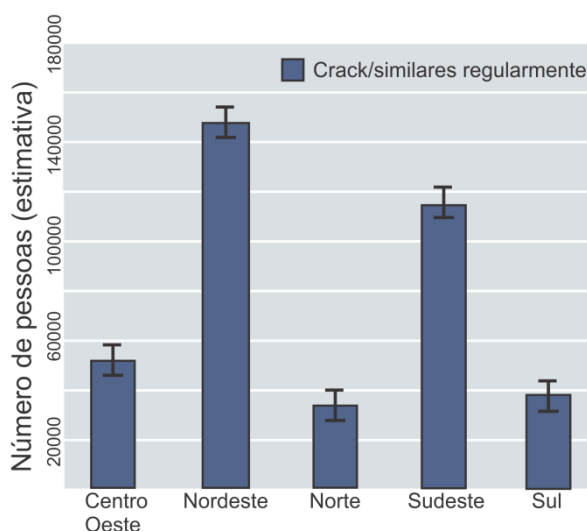
Substância (Consumo na vida)	Adolescentes		Adultos	
	%	N	%	N
Cocaína	2,3	316.040	3,8	5.131.954
Estimulantes	1,3	182.302	2,7	3.694.737
Ritalina	0,6	87.050	0,4	568.249
Crack	0,8	108.867	1,3	1.766.438
OXI	0,5	66.454	0,3	420.099
Tranquilizantes	2,5	342.209	9,6	12.842.014
Solventes	2	275.460	2,2	2.907.375
Ecstasy	0,5	70.985	0,7	949.804
Morfina	0,1	14.258	0,8	1.105.167
Heroína	0,2	25.854	0,2	208.958
Esteroides	0,8	112.212	0,6	862.833
Alucinógenos	1,4	191.646	0,9	1.208.616
Anestésicos	0,4	52.091	0,5	695.600
Cristal	0,3	40.079	0,3	364.322
Maconha	4,3	597.510	6,8	7.831.476
<b>Total População</b>		<b>13.947.197</b>		<b>134.370.019</b>



Prevalência do uso da cocaína em todas as suas formas. 1. Comparação entre consumo de cocaína aspirada. 2. Comparação entre consumo de cocaína fumada. fumada. Fonte: Adaptado de II LENAD.

A Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), realizou um estudo com intuito de identificar especificamente o perfil dos usuários de *crack* no Brasil. Quando o padrão de consumo é comparado entres gêneros, há uma oscilação nos últimos anos, porém o gênero masculino se mostra mais prevalente. Esta pesquisa também avaliou o uso regular de “*crack* e/ou similares (merla ou oxi)” nas capitais, por macrorregião (figura 7). O nordeste é a macrorregião com o maior número de indivíduos que utilizam o “*crack* e/ou similares” (BASTOS; BERTONI, 2014).

**Figura 7-** Uso de “*crack* e/ou similares” nos últimos 6 meses, nas capitais, por macrorregião.



Fonte: Adaptado de FIOCRUZ

### 2.2.3. Farmacologia e vias de administração

A cocaína é um alcalóide natural, pertencente à classe de drogas psicoestimulantes, que são drogas reconhecidas por seus efeitos de reforço, aumento de excitação, ativação motora e alta capacidade de causar dependência (BERRIDGE; ARNSTEN, 2013; BOGHDADI; HENNING, 1997). Geralmente esta droga é utilizada pelas seguintes vias de administração: intranasal (aspirada [figura 8A]), endovenosa (injetável [figura 8B]) e pulmonar (inalada [figura 8C]). (BOGHDADI; HENNING, 1997; JONES, 1997; NESTLER, 2005a; ZIMMERMAN, 2012).



**Figura 8** - Vias de administração da cocaína: aspirada, injetada e inalada.

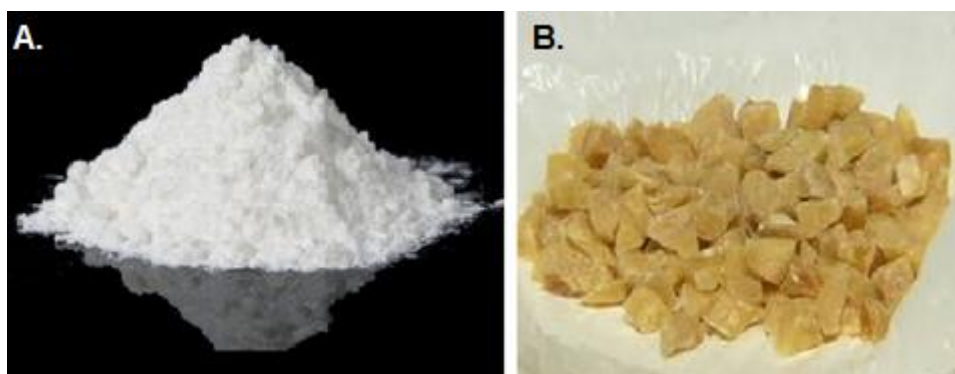


Fonte: <http://cienciasecognicao.org>, <http://www.papodepm.com>, <http://mais24hrs.blogspot.com.br>, respectivamente.

O início e a duração dos efeitos da cocaína dependem da via de administração que foi utilizada (HAVAKUK; REZKALLA; KLONER, 2017). O usuário pode consumi-la sob a forma de um sal, cloridrato de cocaína (pó), vulgo “farinha”, “neve” ou “branquinha” (figura 9A). O pó, por ser solúvel em água, pode ser aspirado ou dissolvido para utilização endovenosa ou ainda na forma de base que origina a pedra de *crack* (figura 9 B), merla ou oxi, pouco solúvel em água, que quando aquecido vaporiza, o que o permite ser fumado em “cachimbos” (BEHNKE et al., 2002; CEBRID, 2014; GOPAL DAS, 1993; SCHIFANO; CORKERY, 2008; ZIMMERMAN, 2012).

A produção da pasta base de cocaína é obtida a partir das folhas de coca, que geralmente contém entre 0,1 e 0,9% de cocaína. Quando as folhas de coca são processadas com solvente (álcool, benzina, parafina ou querosene), a cocaína é extraída como uma pasta, passando a se chamar de sulfato de cocaína. A pasta possui cerca de 60 a 80% de pureza (GOLDSTEIN; DESLAURIERS; BURDA, 2009; LEITE; ANDRADE, 1999; RIBEIRO; LARANJEIRA, 2010).

**Figura 9** - Formas de apresentação da cocaína.

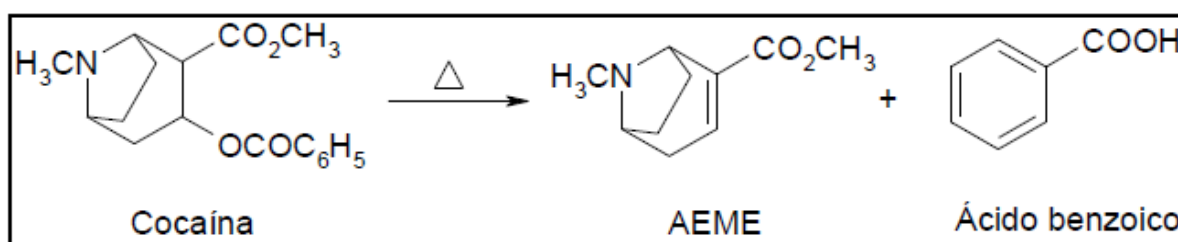


A. cloridrato de cocaína. B. pedra de crack Fonte: <http://www.campoverdenews.net.br>, <http://uipi.com.br>, respectivamente.

A partir da pasta base são obtidas as demais formas de utilização da droga que também pode ser fumada devido as suas propriedades alcalinas. Para a obtenção de cloridrato de cocaína (pó), é adicionado ácido clorídrico, éter e acetona ao sulfato de cocaína, que após filtração e secagem, transforma-se na forma aspirada e injetada da droga e possui em torno de 89% de cocaína. O *crack* pode ser produzido a partir do cloridrato de cocaína, adicionando água quente e amônia ou bicarbonato de sódio, ou pela pasta base, aquecida diretamente com bicarbonato de sódio (RIBEIRO; LARANJEIRA, 2010).

Durante a pirólise do *crack* é gerado um produto exclusivo desta via de administração, denominado metilecgonidina (MEG), também conhecido como anidroecgonina metil éster (AEME) ou éster metil anidroecgonina (EMA) (figura 10). Este metabólito tem sido proposto como um marcador analítico do uso do *crack* (FANDIÑO; TOENNES; KAUERT, 2002; SCHUELKE et al., 1996; TOENNES; FANDINO, 2003; TOENNES; FANDIÑO; KAUERT, 1999). A AEME apresenta um potencial neurotóxico ainda maior do que o da cocaína e quando associados ocorre um efeito aditivo, sugerindo que o uso do *crack* representa maior risco de neurotoxicidade em relação ao uso do pó da cocaína (GARCIA et al., 2012).

**Figura 10** – Reação de pirólise ou decomposição térmica da cocaína.



Produtos da queima do *crack*. Fonte: GARCIA, 2009.

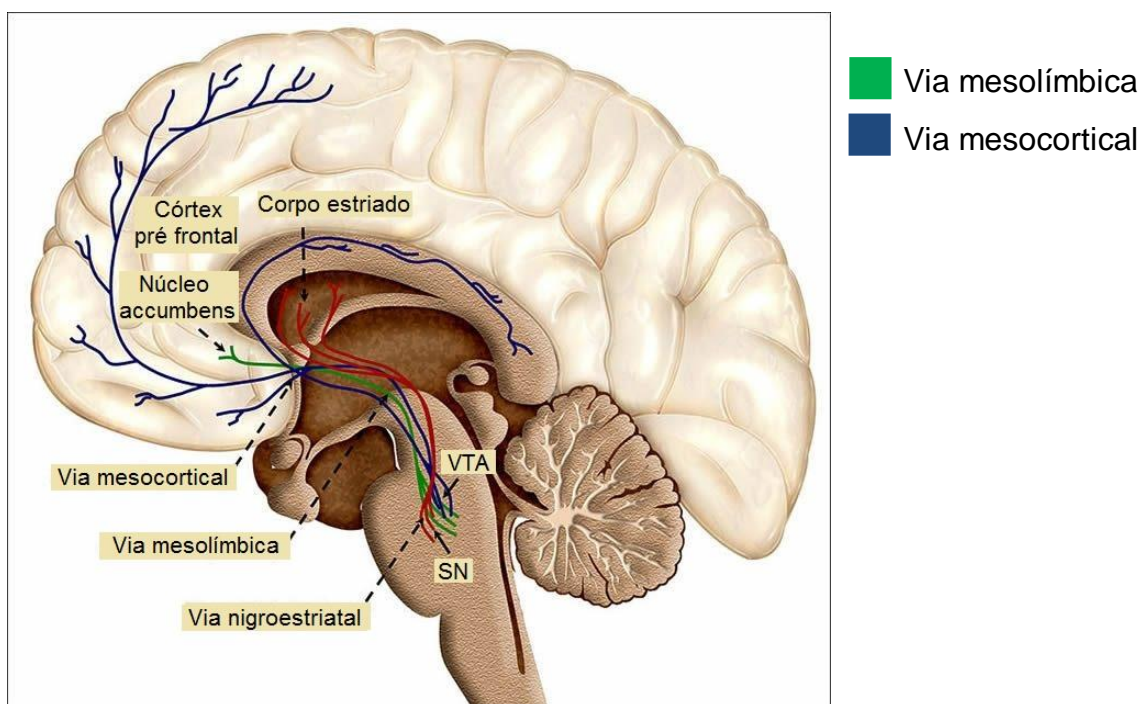
### 2.3. Dopamina e circuito recompensa

Vários sistemas neuronais estão envolvidos na dependência de drogas, no entanto, a maioria das substâncias psicoativas atuam especialmente na via dopaminérgica mesolímbica e mesocortical, modulando as catecolaminas, principalmente o neurotransmissor dopamina (DA) (NIDA, 2014; WIDMAIER; RAFF; STRANG, 2012).

Os sistemas mesolímbico e mesocortical originam-se dos neurônios dopaminérgicos presentes na área tegumentar ventral (VTA). Ambos os sistemas estão envolvidos em comportamentos relacionados a emoções, incluindo motivação e recompensa (ARIAS-CARRIÓN et al., 2010). No sistema mesolímbico células dopaminérgicas do VTA se projetam principalmente para o núcleo accumbens (NAc), mas também inervam o septo, a amígdala e o hipocampo. No sistema mesocortical, o VTA estende suas fibras especialmente para o córtex pré-frontal (PFC), devido a sobreposição entre estes dois sistemas, eles são conhecidos como sistema mesocorticolímbico ou circuito de recompensa (ARIAS-CARRION; POPPEL, 2007; WISE, 2004).

O circuito de recompensa (figura 11) é ativado em comportamentos biológicos de sobrevivência e reprodução. Por exemplo, quando uma pessoa está com sede e bebe água, células dopaminérgicas secretam DA no NAc, proporcionando bem estar, seguido do desejo de repetir a atividade e reviver o prazer. No entanto, o excesso de estimulação do sistema com substâncias psicotrópicas, como a cocaína, produz efeitos eufóricos, que reforçam fortemente o comportamento do uso de drogas (NESTLER, 2005a, 2005b; NIDA, 2014; NUTT et al., 2015).

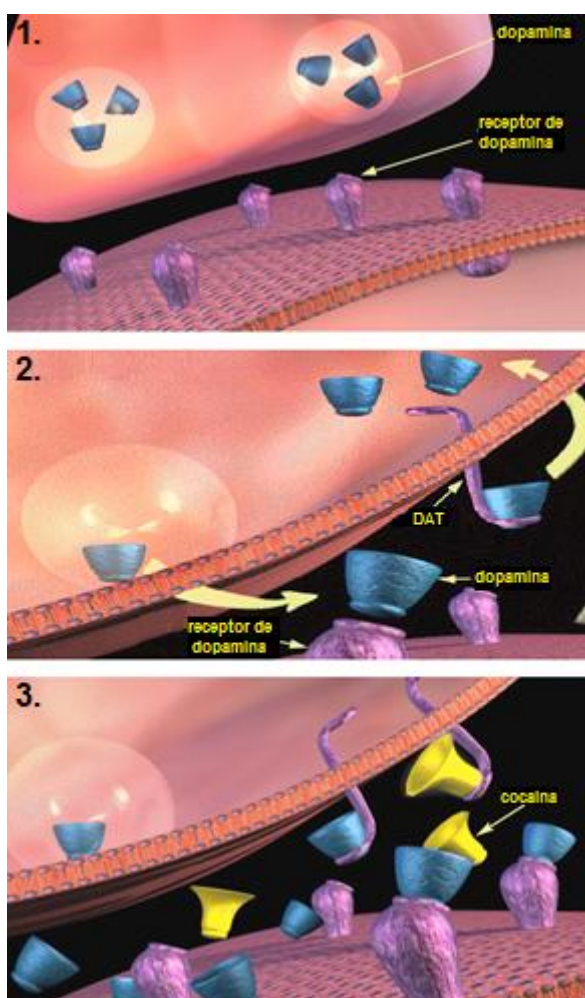
**Figura 11** - Desenho esquemático da via dopaminérgica mesolímbica-cortical.



Fonte: adaptado de ARIAS-CARRIÓN et al., 2010.

Os efeitos no SNC da cocaína são mediados principalmente pelas monoaminas: DA, norepinefrina, e serotonina, que estão intimamente envolvidas na expressão de comportamentos e emoções (FOWLER et al., 2001; PIERCE; KUMARESAN, 2006; SCHWARTZ; REZKALLA; KLONER, 2010; VOLKOW, 2007; VOLPE, 1992; WOLF; KUHN, 1991). A cocaína bloqueia essencialmente o transportador de dopamina (DAT), responsável pela recaptção da DA na fenda sináptica direcionando para o terminal pré-sináptico. Esta ação provoca acúmulo de DA (figura 12) na fenda, que produz estimulação contínua dos receptores dopaminérgicos (ARIAS-CARRIÓN et al., 2010; CHEN et al., 2006; HYMAN; MALENKA; NESTLER, 2006; VOLKOW; FOWLER, 1999).

**Figura 12 - Bloqueio do transportador de dopamina (DAT).**



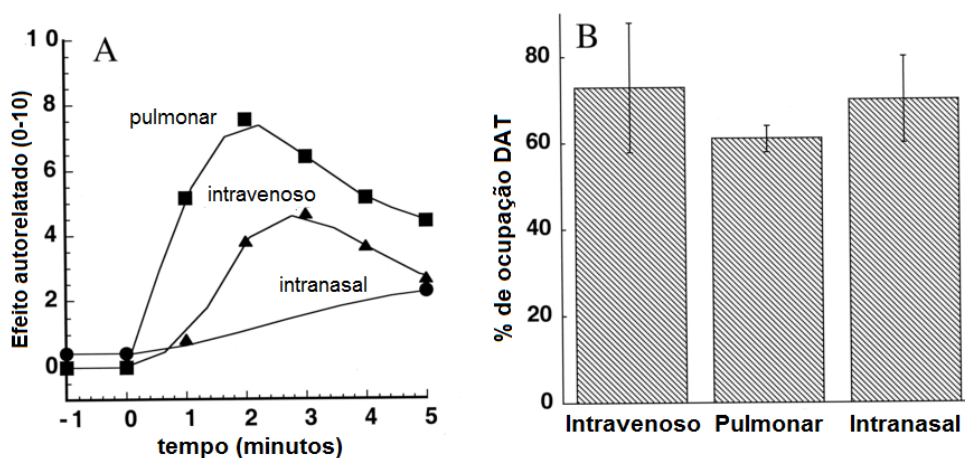
1. DA na vesícula sináptica, antes da fusão da vesícula a membrana pré-sináptica, para liberação do neurotransmissor. 2. Liberação de DA com recaptção pelo DAT e ligação aos receptores de DA pós sinápticos. 3. Bloqueio dos DAT pela cocaína, impedindo a recaptção de DA pelos DAT. Fonte: Adaptado de NIDA, 2007.

Desta forma, a droga produz euforia intensa, estado de alerta aprimorado e maior autoconfiança (BOGHDADI; HENNING, 1997; DACKIS; O'BRIEN, 2001). A cocaína também suprime a atividade do núcleo pontino e do locus coeruleus, suprimindo sentimentos de medo e pânico, podendo intensificar a euforia (BOGHDADI; HENNING, 1997). Outra implicação da cocaína são os efeitos anestésicos locais, alcançados por competitividade bloqueando canais de sódio, em células neuronais, piorando a condução do impulso nervoso (BOGHDADI; HENNING, 1997).

O consumo repetitivo de cocaína gradualmente depleta os estoques de DA nos neurônios pré-sinápticos por inibição do seu mecanismo de recaptação. Portanto, o número de receptores de DA aumenta para compensar sua diminuição. O esgotamento da DA no SNC produz o desejo de consumir cocaína e pode ativar fatores de transcrição, alterando a expressão de genes a longo prazo (VOLKOW; FOWLER, 1999). Além disso, os usuários crônicos de cocaína desenvolvem tolerância à euforia induzida por drogas.

O aumento na euforia está relacionado às propriedades farmacocinéticas da cocaína e não à intensidade de bloqueio da DAT (figura 13), o que reforça uma maior toxicidade da forma inalada ou fumada (VOLKOW et al., 2000). Assim, o indivíduo adicto em *crack* deve usar doses cada vez maiores para produzir os mesmos efeitos euforizantes (BOGHDADI; HENNING, 1997; DACKIS; O'BRIEN, 2001; KOOB; SANNA; BLOOM, 1998).

**Figura 13** - Efeito auto-relatado em diferentes rotas de administração da cocaína e taxa de ocupação do DAT.



**A.** Intensidade do efeito, em minutos, da cocaína em diferentes vias de administração. **B.** Taxa de ocupação dos DAT em diferentes vias de administração da cocaína. Fonte: FOWLER et al., 2001.

O grau de euforia relatado pelos usuários tem sido correlacionado com a velocidade que a droga ultrapassa a barreira hematoencefálica, quanto maior a velocidade, maior a capacidade de provocar dependência.

Nos últimos anos vêm sendo desenvolvidas pesquisas que demonstram mudanças neuroadaptativas e neuroquímicas em decorrência do uso da cocaína/*crack* (AREAL et al., 2015; GARCIA et al., 2012, 2015). A forma inalada da droga promoveu mudanças distintas no PFC que não foram observadas em modelos animais de uso injetado de cocaína, o que carece de uma maior compreensão dos distintos mecanismos de ação da cocaína e do AEME subjacentes às suas propriedades aditivas (AREAL et al., 2015). Em outra pesquisa o *crack* e os produtos de sua pirólise modulam não somente o sistema dopaminérgico, mas também outros sistemas, como o colinérgico, pois foram observadas implicações cardíacas e centrais (neurotoxicidade) relacionados a acetilcolina (ACh), que foram atribuídos não somente a cocaína/*crack*, mas também ao metabólito potencialmente mais tóxico do que a própria cocaína, o AEME (GARCIA et al., 2012).

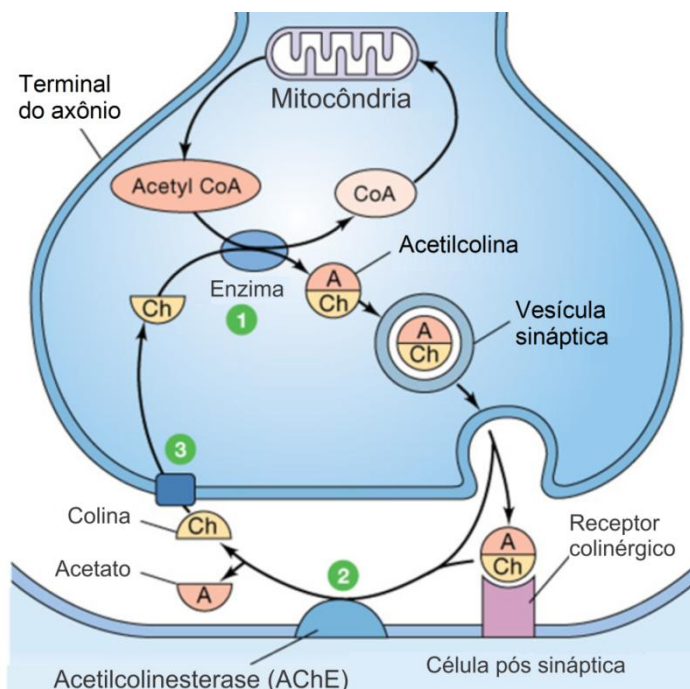
#### **2.4. Sistema Colinérgico**

A ACh é um importante neurotransmissor do SNC e SNP e foi identificada por Henry Dale em torno de 1915. No entanto, seu papel como mensageiro químico foi demonstrado primeiramente por Otto Loewi. Neurônios colinérgicos tem a capacidade de sintetizar, liberar e metabolizar a ACh presentes em vários núcleos que se projetam em longas distâncias, innervando quase todas as regiões cerebrais (PRADO; MARCHOT; SILMAN, 2017; WIDMAIER; RAFF; STRANG, 2012). Este neurotransmissor está envolvido na regulação do sono, em processos cognitivos, como memória e aprendizado, em distúrbios neurológicos, tais como doença de Alzheimer e esquizofrenia, e ainda nos mecanismos da adicção (BLOKLAND, 1995; DREVER; RIEDEL; PLATT, 2011; GOLD, 2003; MICHEAU; MARIGHETTO, 2011).

A síntese da ACh é processada no neurônio a partir da acetilcoenzima A e da colina, catalisada pela colina acetiltransferase (ChAT). A transmissão sináptica ocorre quando a ACh é liberada das vesículas na fenda e se liga a receptores nicotínicos e muscarínicos. Em seguida, a ACh disponível é hidrolizada pela

acetilcolinesterase (AChE) produzindo colina e acetato (figura 14) que serão reaproveitados para a síntese de acetilcolina (CALDAS, 2000).

**Figura 14 - Síntese e degradação da ACh.**



1. A ACh é sintetizada a partir da colina e acetilcoenzima A, catalisada pela ChAT 2. Na fenda sináptica pode se ligar a receptores colinérgicos e é rapidamente metabolizada pela enzima AChE, gerando colina e acetado. 3. Colina é transportada de volta para o neurônio pré-sináptico e utilizada para sintetizar mais ACh. Fonte: Adaptado de <http://faculty.pasadena.edu>.

Quando há a inibição da AChE, ocorre um acúmulo de acetilcolina na fenda, levando a uma hiperestimulação colinérgica. Os sintomas de excesso de estimulação colinérgica incluem hipersalivação e lacrimejamento dos olhos, seguido de espasmos musculares e morte (CALDAS, 2000; KANDEL et al., 2014; SANTOS; MOSTARDEIRO, 2008; SANTOS et al., 2010; WHITEHOUSE, 2014).

Enquanto que maioria dos neurotransmissores são removidos da fenda sináptica por recaptção (sinapses dopaminérgicas, noradrenérgicas, glutamatérgicas, GABAérgicas e serotoninérgicas), na transmissão colinérgica, a ACh é removida por hidrólise de ACh pela enzima AChE (ZIMMERMAN; SOREQ, 2006). Porém, existem dois tipos de colinesterases: 1) enzimas com alta afinidade para a Ach ligadas à membrana neuronal e presentes nas sinapses colinérgicas em geral; 2) enzimas com alta afinidade para a butirilcolina, também chamadas de butirilcolinesterases (BchE) presentes em todos os tecidos. Atualmente a AChE é a

enzima de maior eficiência catalítica por apresentar diferentes isoformas, classificadas como globulares ou assimétricas, dependendo da sua conformação espacial (VENTURA et al., 2010). A BChE é conhecida como pseudocolinesterase, colinesterase inespecífica ou simplesmente colinesterase. A AChE hidrolisa a acetilcolina mais rapidamente do que as outras. A BChE atua preferencialmente na butirilcolina, mas também hidrolisa a acetilcolina (CHATONNET; LOCKRIDGE, 1989; EKHOLM, 2001). A inibição da AChE pelo excesso de substrato é uma das principais características que a distingue da BChE. A BChE exibe a ativação do substrato em excesso de substrato (MASSON et al., 2001; TOUGU, 2001). A BChE desempenha um papel importante no metabolismo da cocaína, produzindo metabólitos, metil ester ecgonina e o ácido benzóico que são rapidamente excretados da circulação pelo rim (MATTER et al., 1996; SUN et al., 2001).

A sinalização colinérgica é realizada por duas classes de receptores: muscarínicos metabótrópicos (mAChRs) e nicotínicos ionotrópicos (nAChRs). Os mAChRs são acoplados a proteína G e foram classificados 5 subtipos: M1, M2, M3, M4 e M5. São amplamente distribuídos por diversos sistemas biológicos, no qual participam de várias funções vitais. No SNC, estão envolvidos no controle da função extrapiramidal, vestibular, em funções cognitivas como memória, aprendizado e atenção, em respostas emocionais, na modulação do estresse, no sono e na vigília. Os receptores muscarínicos M1, M3 e M5 se ligam preferencialmente com a proteína Gq/11, induzindo a ativação da fosfolipase C, que promove a hidrólise de fosfoinosítídeos presentes na membrana e a produção de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato intracelular (IP3). Já os receptores muscarínicos M2 e M4, acoplam-se preferencialmente à proteína G inibitória, Gi/o, que inibe a atividade da adenilciclase e diminui os níveis intracelulares de AMP cíclico (CAULFIELD, 1993; SLEPAK; SANDIFORD, 2013). Os nAChRs quando ativados adquirem a conformação de canal aberto permeável aos íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>. Quando comparado à transmissão sináptica mediada por mAChRs, percebe-se que os nAChRs medeiam uma transmissão excitatória rápida. Esses receptores são constituídos por cinco subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$ ) proteicas e estão distribuídos em vários tecidos, incluindo o cérebro e o tecido muscular (PICCIOTTO; HIGLEY; MINEUR, 2012; VAN DER ZEE; LUITEN, 1999; VENTURA et al., 2010; WHITEHOUSE, 2014).



Neurônios dopaminérgicos da VTA expressam mAChRs e nAChRs, e a ativação colinérgica nessa estrutura está associada ao aumento da descarga de DA, o que reforça que há uma interação no circuito de recompensa do cérebro entre os sistemas dopaminérgicos e colinérgicos na VTA, no PFC e NAc (GOMES et al., 2017; LEACH; MOHANRAJ; BORLAND, 2012; SOFUOGLU; MOONEY, 2009; WILLIAMS; ADINOFF, 2008).

Estudos recentes demonstram que mAChRs desempenham um papel importante na plasticidade comportamental induzida por cocaína. Estes estudos sugerem que os receptores M1 e M5 desempenham papéis críticos na adicção da cocaína (SCHMIDT; PIERCE, 2010; THOMSEN, 2005; YEE et al., 2011). Além do mais, há vários estudos relacionando *crack* e AEME a modulação da atividade colinérgica (GARCIA et al., 2012, 2015; GOMES et al., 2017).

Os mecanismos colinérgicos supracitados, além do envolvimento na adicção, têm sido associados desde a década de 30 com o fenômeno convulsivo (TURSKI; CAVALHEIRO, 1992). A relação da ACh com a epilepsia foi especulada quando percebeu-se que a ACh ou seus análogos, os inibidores da acetilcolinesterase e os precursores da ACh, quando administrados no cérebro de animais experimentais, resultaram em intensa atividade convulsiva (TURSKI et al., 1984).

## 2.5. Epilepsia

Cerca de 50 milhões de pessoas no mundo sofrem de epilepsia, o que a torna um dos distúrbios neurológicos mais comuns nos dias atuais (FISHER et al., 2005; MORIMOTO; FAHNESTOCK; RACINE, 2004; WHO, 2017). Embora estudos epidemiológicos sejam escassos, estima-se que cerca de 2% a 4% da população brasileira, aproximadamente três milhões de pessoas em diferentes idades e classes sociais, são acometidas por epilepsia (FERNANDES, 2013).

Epilepsia é definida como um distúrbio cerebral caracterizado por uma predisposição duradoura para gerar crises epilépticas com consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais decorrentes deste transtorno (FISHER et al., 2005). Existia uma falta de consenso sobre a definição dos termos crises epilépticas e epilepsia, devido a esse fato, a *International League Against*

*Epilepsy* (ILAE) definiu ambos os termos em uma publicação em 2005 e estabeleceu crises epilépticas como a ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas devido à atividade neuronal anormal excessiva ou síncrona no cérebro, com ou sem perda da consciência. Qualquer mecanismo que perturbe o sistema neuronal de inibição ou promova a excitação pode levar ao surgimento das crises. (FISHER et al., 2005, 2014; SILVA; SOUZA; SILVA, 2014). A crise epiléptica é usada para distinguir uma crise causada por um disparo neuronal anormal de um evento não epiléptico (STAFSTROM; CARMANT, 2015).

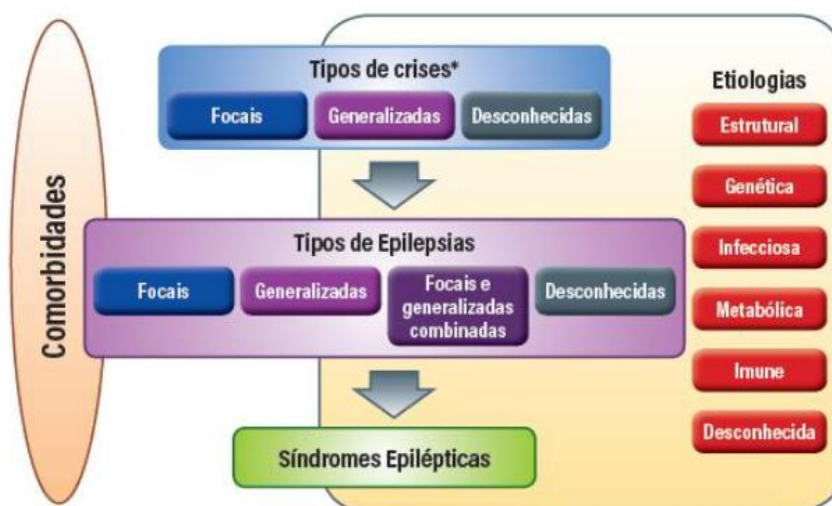
As crises podem ser não provocadas (espontâneas) ou provocadas. As não provocadas ocorrem em doença cerebral persistente. As crises provocadas são desencadeadas por processos metabólicos agudos, insulto neurológico agudo, drogas ou condições fisiológicas excessivas. Sendo a epilepsia uma doença caracterizada por crises não provocadas de recorrência espontânea, crises e epilepsia são diferentes distúrbios que não podem ser interpretados com o mesmo significado. Existem outros termos utilizados para se referir-se a crises ex: convulsão, ictos, feitiço, ataque e acesso, porém crise é o termo mais utilizado (SHNEKER; FOUNTAIN, 2003). Convulsão descreve as contrações musculares que podem ocorrer durante uma crise. Portanto, nem toda convulsão é uma crise epiléptica e nem toda crise epiléptica significa epilepsia (BEN et al., 2016; SHNEKER; FOUNTAIN, 2003).

As crises podem variar de episódios muito breves de ausência ou contrações musculares, a crises prolongadas e graves. Sua frequência também pode variar de menos de uma por ano a várias por dia. Uma única crise não significa epilepsia, pois até 10% da população mundial pode sofrer uma crise durante toda a sua vida. Porém, duas ou mais crises não provocadas definem o paciente como portador da doença (FISHER et al., 2014; SHNEKER; FOUNTAIN, 2003; WHO, 2017).

Em termos de classificação das epilepsias, houve uma atualização recente da ILAE em 2017. A classificação das epilepsias é fundamental na avaliação de um indivíduo que apresenta crises epilépticas. A nova classificação (figura 15) serve a vários propósitos e as propostas atuais são baseadas em uma combinação dos últimos conhecimentos científicos acoplados à opinião de especialistas. Apesar de anos de esforços em pesquisa, até hoje, a etiologia das epilepsias ainda não é

totalmente compreendida e as pesquisas na área são constantes (FISHER et al., 2017; SILVA; SOUZA; SILVA, 2014).

**Figura 15** - Nova classificação das Epilepsias.



Fonte: FISHER et al., 2017

### 2.5.1 Epilepsia do lobo temporal

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é o tipo mais frequente de epilepsia, com origem no lobo temporal e adjacências, caracterizada por uma hiperexcitabilidade neuronal crônica e estado de hipersincronia que se manifesta por meio de crises recorrentes e espontâneas (CRE) (BAE et al., 2010; LIEFFERINGE et al., 2013; MELO et al., 2016; SHARMA et al., 2007; ZHAO et al., 2014).

Em geral, a ELT é iniciada por um insulto precipitante inicial, como trauma cranioencefálico, infecção cerebral, AVC, convulsões febris, e mais frequentemente por *status epilepticus* (SE), definido como uma crise com duração maior ou igual a 5 minutos ou duas ou mais crises discretas entre as quais há recuperação incompleta da consciência. (BETJEMANN; LOWENSTEIN, 2015; LIEFFERINGE et al., 2013; POBLETE; SUNG, 2017). Este insulto desencadeia uma cascata de eventos neurobiológicos devastantes, alterações histológicas e bioquímicas durante um período de latência que pode durar entre 5 a 10 anos em humanos, semanas e meses em animais (FERNANDES, 2013; PRIEL; ALBUQUERQUE, 2002; SHARMA et al., 2007). O paciente permanece livre de sintomas físicos ou complicações, neste período, embora um estado epiléptico esteja sendo estabelecido no cérebro,

chamado epileptogênese, levando à ocorrência de crises recorrentes e espontâneas (CRE) e ao diagnóstico de epilepsia crônica. O tratamento com drogas antiepilépticas (DAEs) pode ser bem sucedido no início das CREs (período latente), no entanto, à medida que a doença progride, muitos pacientes tornam-se refratários ao tratamento medicamentoso.

A ELT é suspeita de ser o resultado da recorrência de excitação ou inibição de circuitarias cerebrais. A excitação recorrente e o desenvolvimento de crises têm sido associado ao brotamento de fibras musgosas no hipocampo, para entender melhor esse mecanismo, foram desenvolvidos modelos animais para investigar a patogênese da ELT (SHARMA et al., 2007).

### **2.5.2. Modelos animais**

Para que o processo de ictogênese e epileptogênese sejam melhor compreendidos e, eventualmente, novas ferramentas para a prevenção e tratamento da epilepsia sejam descobertas, grupos de pesquisa vem estudando há décadas fatores que podem estar envolvidos nas alterações patológicas subjacentes à ELT. Para isto são utilizados modelos animais de epilepsia, pois podem fornecer esclarecimentos sobre as redes neurais que são afetadas (DE FURTADO et al., 2002; FURTADO et al., 2011; TILELLI et al., 2005).

Existe uma variedade de modelos animais para investigar ELT. Os dois modelos animais mais utilizados são *kindling* e SE. Sabe-se que crises podem ser desencadeadas por estimulação elétrica ou por um agente químico, e produzem um grande número de efeitos pós-ativação, incluindo alterações de mRNA, neurotransmissores, receptores, canais iônicos, sistemas mensageiros intracelulares e fatores neurotróficos (MORIMOTO; FAHNESTOCK; RACINE, 2004). Em comparação com o *kindling*, SE é mais fácil de produzir, geralmente injetando altas doses de um agente convulsivante como ácido cáínico ou pilocarpina (MORIMOTO; FAHNESTOCK; RACINE, 2004). A epileptogênese é induzida por meio do SE, que mimetiza fenômenos comportamentais, eletroencefalográficos e morfológicos, como aqueles observados em humanos (DE FURTADO et al., 2002; FURTADO et al., 2011; TILELLI et al., 2005).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um modelo de SE induzido por microinjeção intra-hipocampal de pilocarpina (H-PILO). Este modelo reproduz aspectos comportamentais, eletroencefalográficos e morfológicos agudos e crônicos da ELT similares ao sistêmico, além de apresentar um perfil de baixa mortalidade animal (DE FURTADO et al., 2002; FURTADO et al., 2011; MELO et al., 2016).

Resumidamente, a pilocarpina liga-se a receptores metabotrópicos muscarínicos M1, M3 e M5. Quando estes receptores se acoplam a proteínas G, ativam a enzima fosfolipase C aumentando os segundo-mensageiros DAG e IP3 (VENTURA et al., 2010) que produzem uma diminuição na condutância de  $K^+$  e aumentam a concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  (DREVER; RIEDEL; PLATT, 2011). Desse modo, é provocada uma despolarização sustentada, excitotoxicidade e morte celular. Secundariamente, é produzida uma ativação do sistema glutamatérgico por meio da ativação de receptores do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) contribuindo para mudanças nas propriedades eletrofisiológicas neuronais e em circuitos inibitórios (TURSKI et al., 1989). A administração de pilocarpina produz crises que podem evoluir para o SE resultando em alterações neuropatológicas compatíveis com as encontradas em pacientes com ELT. Periféricamente, a pilocarpina ativa o sistema parassimpático, o que resulta em piloereção, salivação, tremor e diarreia (TURSKI et al., 1989, 1983)

O SE induzido por pilocarpina parece ativar de forma dependente os receptores muscarínicos M1, já que em camundongos “knockout” para receptores M1 os animais não desenvolvem crises em resposta a droga (MASLANSKI et al., 1994). Estudos recentes relataram que o receptor muscarínico M1 poderia mediar a atividade epiléptica de PILO. Pesquisadores observaram que a atividade epiléptica de pilocarpina é mediada por receptores muscarínicos colinérgicos M1, pois o efeito é bloqueado pela pirenzepina, antagonista específico destes receptores (MASLANSKI et al., 1994). Outro grupo de pesquisa estudou camundongos mutantes sem receptores de acetilcolina M1 no prosencéfalo e observaram que eles não apresentavam crises após a aplicação da PILO (HAMILTON et al., 1997). Em culturas de neurônios hipocâmpais foi demonstrado que a pilocarpina, mediada por receptores muscarínicos, provoca um desequilíbrio entre excitação e a transmissão inibitória resultando na geração do estado epilético. Em estudos de microdiálise *in*

*vivo* a pilocarpina parece induzir, no hipocampo, o aumento dos níveis de glutamato após o aparecimento das crises, sugerindo que o disparo é de origem colinérgica e a manutenção das crises parece ser glutamatérgica (BEHNKE et al., 2001; PRIEL; ALBUQUERQUE, 2002; SMOLDERS et al., 1997; TURSKI et al., 1983, 1984).

Estudos relacionam a liberação de glutamato na VTA ao uso de cocaína, assim como alterações de resposta nos receptores de glutamato após a utilização repetida da droga (KALIVAS; DUFFY, 1995; ZHANG et al., 1997). Além destes, há relatos na literatura que mencionam episódios de SE, assim como os induzidos por PILO, e aumento da frequência de crises decorrentes do uso da cocaína/*crack* (OGUNYEMI et al., 1989; PASCUAL-LEONE et al., 1990; TANEN; GRAEME; CURRY, 2000).

### **3. Epilepsia e cocaína/*crack***

Na epilepsia, a atividade glutamatérgica é desregulada desencadeando excitotoxicidade pelo excesso de ativação glutamatérgica, podendo gerar crises recorrentes e espontâneas (CRE) e morte neuronal pós sináptica (LENT, 2010; MELDRUM, 2000). O uso de drogas, especialmente as estimulantes do SNC, podem causar diversos comprometimentos neurológicos importantes como crises, isquemia cerebral, hemorragias cerebrais, infarto, neuropatia óptica, atrofia cerebral, comprometimento cognitivo, transtornos de humor e de movimento (KOPPEL; SAMKOFF; DARAS, 1996; MACEDO et al., 2010; MAJEWSKA, 1996), alguns desses episódios podem ser caracterizados como um insulto para desencadear crises e posteriormente epilepsia.

Um estudo retrospectivo de crises induzidas por drogas recreacionais realizado em São Francisco identificou a cocaína, entre outras drogas, como indutora de crises. As crises ocorreram independente da via de administração e da frequência de uso do indivíduo (iniciante ou veterano) (KUTLUAY; EDWARDS, 2015; ZAGNONI; ALBANO, 2002).

Há o relato de caso de uma mulher que utilizou *crack* por 3 dias consecutivos, sem história de crise ou doença mental na família. A paciente apresentou sinais neurológicos anormais, letargia, confusão mental, desorientação e incontinência urinária, devido ao uso excessivo de *crack* (OGUNYEMI et al., 1989).

As crises ocorrem frequentemente no primeiro uso da droga. Um estudo relatou crises em 40% dos 44 usuários que utilizaram a droga pela primeira vez. Nestes casos crises motoras generalizadas isoladas são mais comuns, porém crises múltiplas e SE ocorrem imediatamente ou em menos de 2 h após o uso, coincidindo com o pico de níveis sanguíneos da droga. Estudos de imagem demonstraram um metabolismo cerebral alterado durante estas crises, especialmente nos lobos temporais. Além de crises, lesões cerebrais resultantes de eventos cerebrovasculares associados ao uso de cocaína, podem desencadear epilepsia (ZAGNONI; ALBANO, 2002).

Existe escassez de trabalhos na literatura que correlacionem o uso do *crack* a geração de crises e possivelmente epilepsia. Devido a essa carência os mecanismos que estão envolvidos na epilepsia e no uso de cocaína/*crack* ainda não estão bem estabelecidos e precisam ser urgentemente investigados.

**CAPÍTULO 1. EXPOSIÇÃO AOS PRODUTOS DA PIRÓLISE DO CRACK E  
AVALIAÇÃO PARA LIMAR DE CRISES EPILÉPTICAS**



## 1.1. Resumo

Neste capítulo mimetizamos em modelo experimental, a susceptibilidade de animais expostos aos produtos da pirólise do *crack* à crises convulsivas. Para isto, foram utilizados ratos machos submetidos à microinjeção de baixa dose de PILO seguido de exposição aos produtos da pirólise do *crack*. Foram analisadas latência, gravidade, frequência e duração das crises desenvolvidas pelos animais. Além disso, foi observada ainda a presença de um comportamento típico, no qual os animais agitam fortemente a cabeça juntamente com o tronco, sendo este movimento denominado de *wet dog shake* (WDS) que possui relevância importante para o fenômeno epilético. Foram observados a diminuição da latência e o aumento da duração e frequência das crises no grupo PILO+CRACK quando comparado aos grupos PILO e CRACK. Já em relação ao WDS, houve aumento nos grupos PILO e PILO+CRACK. Estes dados sugerem que os animais são mais susceptíveis a ictogênese quando há associação entre baixa dose de PILO seguida da exposição ao *crack*.

## 1.2. Introdução

O equilíbrio entre sistemas de controle, que impedem uma descarga de potencial de ação excessiva nos neurônios, e outros sistemas que facilitam a excitação, mantém o bom funcionamento do SN. O mal funcionamento de mecanismos que regulem a inibição ou propiciem excitação podem gerar crises epiléticas. (SILVA; SOUZA; SILVA, 2014).

A geração de crises a partir do uso da cocaína tem sido bastante relatada nas últimas décadas a fim de alertar a comunidade científica na busca pela elucidação de sua fisiopatologia. Existem vários trabalhos que indicam este psicoestimulante como causador de crises em humanos e animais (ARAÚJO et al., 2018; BARAT; ABDEL-RAHMAN, 1996; ITZHAZ, 1995; KONKOL et al., 1992; KRAMER et al., 1990; LASOÑ, 2001; MACEDO et al., 2010; MAJLESI et al., 2010; MURPHY et al., 1997; PASCUAL-LEONE et al., 1990; SCHECHTER; MEEHAN, 1995; SORDO et al., 2013; TSENG; DERLET; ALBERTSON, 1992) porém, a maior parte das publicações em animais relatam o surgimento de crises com a cocaína (cloridrato) na forma

endovenosa. A única publicação que avalia crises induzidas pelo *crack* em animais foi uma recente publicação do nosso grupo de pesquisa (ARAÚJO et al., 2018) que avaliou os efeitos cardíacos, desenvolvimento de crises e o tratamento de animais expostos ao *crack* com produtos naturais.

### **1.3. Definição do problema**

Devido ao fato do *crack* ter se tornado um grande problema de saúde pública, esta droga tem sido alvo de muitas pesquisas, geralmente em humanos. Em animais, o cloridrato de cocaína vem sendo estudado como indutor de crises, porém devido a dificuldades metodológicas (geração de fumaça e segurança na exposição), pesquisa com *crack* em animais vem sendo realizada mais recentemente. Desse modo se faz urgente a análise das consequências da exposição à forma inalada da cocaína, o *crack*, pois ainda há escassez na literatura acerca das alterações fisiológicas que consumo desta droga possa causar no sistema nervoso, alterações estas que podem culminar em crises, o que faz necessário o desenvolvimento de novas pesquisas científicas nessa área de pesquisa.

#### **1.3.1 Hipóteses**

- Exposição aos produtos da pirólise do *crack* induzem crises não convulsivas e convulsivas em ratos;
- Ratos expostos à inalação dos produtos da pirólise do *crack* possuem menor limiar para crises epiléticas, devido ao aumento da excitabilidade do tecido nervoso.

#### **1.3.2 Objetivos**

##### **1.3.2.1 Geral**

Analisar a susceptibilidade para crises epiléticas em animais submetidos à baixa dose de pilocarpina e à fumaça do *crack*.

### **1.3.2.2. Específicos**

- Categorizar crises de acordo com a escala de Racine (1972);
- Verificar a latência para crises epilépticas;
- Analisar frequência, gravidade e a duração de crises epilépticas;
- Avaliar a frequência de WDS presentes durante as crises.

## **1.4. Materiais e Métodos**

### **1.4.1. Aquisição do *crack***

As amostras de *crack* foram previamente obtidas na delegacia de entorpecentes da cidade de Maceió - AL, mediante a autorização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e ordem judicial determinando a entrega e armazenamento da substância ao Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa da Universidade Federal de Alagoas (LNFI/UFAL). Todos os documentos foram organizados pela Procuradoria Federal com sede na UFAL, por meio de solicitação por parte do Magnífico reitor. Os documentos necessários para o desenvolvimento do protocolo foram:

- Declaração da Polícia Federal de conhecimento sobre o desenvolvimento do protocolo experimental na UFAL;
- Autorização ANVISA para o uso do *crack*;
- Petição para a liberação do *crack* expedida pela procuradoria da UFAL e autorizada pelo juiz competente (décima quinta vara criminal da capital), conforme solicitação da ANVISA;
- Declaração de ciência do protocolo desenvolvido pelo Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS);
- Alterações ou adequação da infraestrutura e segurança do laboratório LNFI para realização dos experimentos de acordo com as exigências da procuradoria Federal.

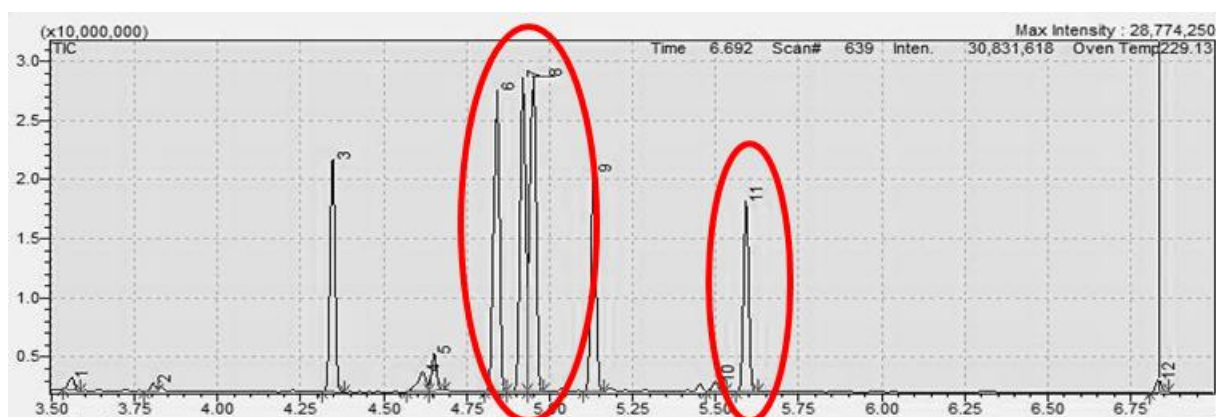
### 1.4.1.1 Identificação da composição da fumaça do crack

A identificação dos produtos da pirólise do *crack* foi necessária, pois as amostras utilizadas na pesquisa foram cedidas pela polícia federal, por apreensão. Dessa forma, através da técnica de cromatográfica gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foi possível obter um perfil químico das amostras apreendidas, detectando tanto a droga quanto os interferentes que a constituem.

Os picos cromatográficos de compostos voláteis obtidos da fumaça proveniente da pirólise (200 a 280°C) do *crack* (800mg) foram: ácido benzóico (picos 6, 7, 8) e AEME (pico 11), que totalizaram 55.68% e 11.18%, respectivamente, da composição (figura 16) da amostra (ARAÚJO et al., 2018).

A AEME é um metabólito exclusivo proveniente da pirólise da crack, sendo, portanto, um marcador analítico (JACOB III et al., 1990; TOENNES; FANDIÑO; KAUERT, 1999). Esta análise comprova a presença desses compostos, em especial a metil éster anidroecgonina (AEME), a quem tem sido atribuído os efeitos neurotóxicos do *crack* (GARCIA et al., 2012, 2015).

**Figura 16** - Picos cromatográficos de compostos voláteis do *crack*.



Picos cromatográfico de compostos voláteis obtidos após a pirólise (200 a 280 °C) do *crack*. Os números indicam: 1) Monóxido de carbono; 2) Níquel tetracarbonil; 3) Metilester ácido benzóico; 4) Magnésio; 5) Vanádio; **6, 7 e 8) 2-metil ácido benzóico (cocaína)**; 9) 2-metil ácido benzóico; 10) p-fenetidina níquel; **11) metil ester ecgonina (crack)**; 12) Níquel. Fonte: ARAÚJO et al., 2018

### 1.4.1.2. Protocolo de segurança para manuseio do *crack*

Durante a manipulação da substância, os pesquisadores estiveram devidamente equipados com os respectivos equipamentos de proteção individual (EPI's): roupas específicas para a manipulação de agentes químicos, toucas e respirador com filtros apropriados.

#### **1.4.2. Animais**

Foram utilizados ratos (n= 24) da linhagem *Wistar*, machos adultos jovens, 12 semanas, com peso entre 240 e 340g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (BIOCEN/UFAL). Durante o período de experimentos, os animais foram acondicionados em caixas de acrílico com tampa de ferro cromado, subdivididos em grupos de, no máximo, 5 animais por caixa e acomodados no biotério Setorial do LNFI/ICBS. Os animais foram mantidos sob temperatura controlada ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), submetidos a um ciclo claro-escuro de 12h cada, tratados com água e ração *ad libitum*. Todos os esforços foram realizados para evitar o sofrimento desnecessário dos animais. Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFAL (protocolo #27/2016, ANEXO III).

#### **1.4.3. Aparato de exposição**

Para a exposição dos animais ao *crack* foi utilizado um modelo modificado do sistema de Petros (YPSILANTIS et al., 2012). Resumidamente, o aparelho consiste em um ventilador (VETERINARY ANESTHESIA VENTILATOR MODEL, 2000, Hallowell EMC, Pittsfield, MA) setado para geração de 150 mL de ar a cada 10 segundos. Uma bomba geradora de fumaça esteve acoplada em uma das extremidades a um cachimbo (local onde a substância foi queimada) e na outra a uma câmara de acrílico (local de alojamento dos animais). As caixas estiveram serialmente conectadas por tubos de silicone interligados por válvulas heimlich (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), para evitar a regressão da fumaça. A câmara apresentou uma tampa superior e dois conjuntos de orifícios para eliminação da fumaça do lado contralateral ao tubo por onde esta foi fornecida. Estes orifícios foram bloqueados com dois retângulos de acrílicos contidos no sistema (figura 17). O aparato de exposição fica localizado em uma capela de exaustão.

**Figura 17 - Aparato de exposição**

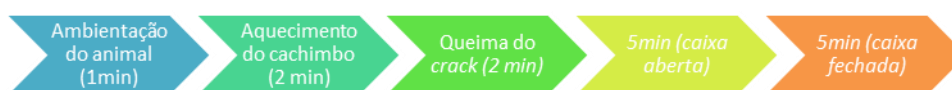


Fonte: autora, 2017

#### 1.4.4. Protocolo da exposição da fumaça do crack

Cada animal foi inserido individualmente em uma caixa de acrílico do aparato de exposição à fumaça do *crack* durante 1 minuto para ambientação. Após a ambientação do animal, o aquecimento do cachimbo foi iniciado com o auxílio de um maçarico, totalizando 2 minutos. Em seguida o sistema foi acionado, com o maçarico ligado e a pedra de *crack* ajustada no cachimbo e queimada por 2 minutos. Após a queima, o maçarico foi desligado e o animal permaneceu por 10 minutos na caixa de acrílico, 5 minutos com a caixa totalmente fechada e 5 minutos parcialmente aberta de modo a permitir fluxo de ar (figura 18).

**Figura 18 - Protocolo de**



exposição

Fonte: autora, 2017.

#### **1.4.5. Cirurgia estereotáxica para implante de cânula**

De acordo com o protocolo utilizado por CASTRO et al., 2011; DE FURTADO et al., 2002 o animal foi anestesiado com xilazina (80 mg/Kg; intraperitoneal [i.p.]) e cetamina (8 mg/Kg;i.p.). Além disso, recebeu 0,1mL/100g de pentabiótico veterinário subcutâneo (s.c.) antes do início da cirurgia e logo em seguida foram tricotomizados na cabeça. Após a tricotomia, o animal foi fixado no estereotáxico, e recebeu anestésico local (xilocaína com epinefrina 0,2 mL/100g, s.c.) no local da cirurgia. Em seguida, foi realizada uma incisão na cabeça para implantação de uma cânula, confeccionada a partir de uma agulha descartável de 0,55 mm de diâmetro e possuía o tamanho de 12 mm. Esta cânula foi estereotaxicamente colocada no hilus do giro denteado no hipocampo, seguindo coordenadas pré-determinadas - 6,30 mm AP (em relação ao bregma); 4,50 mm LL (em relação ao seio sagital) e - 4,50 mm DV (em relação à dura-máter) (PAXINOS; WATSON, 1997). Foi também confeccionado um mandril de fio de aço para fechar a cânula evitando assim sua obstrução e isolando o encéfalo do animal do meio exterior com o objetivo de evitar infecções. Após a cirurgia estereotáxica, os animais permaneceram no Biotério setorial do LNFI durante 3 – 7 dias para recuperação.

#### **1.4.6. Microinjeções**

Após uma semana de recuperação, os animais foram cuidadosamente imobilizados para receber microinjeções (1  $\mu$ L) de salina (0,9%) ou baixa dose de PILO (0,75 mg/ $\mu$ L) no hipocampo. Para isto, foi utilizada seringa de 5  $\mu$ L (Hamilton – Sigma) manuseada manualmente a com velocidade de 0,5  $\mu$ L/minuto.

Após 120 minutos de filmagem, os animais foram acondicionados no Biotério setorial do LNFI para recuperação das crises.

#### **1.4.7. Avaliação comportamental das crises**

A descrição comportamental de crises epilépticas vem sendo há muito tempo estudada (GARCIA-CAIRASCO et al., 1996; RACINE, 1972a, 1972b). Foram criados

índices baseados no comportamento que retratariam, de forma arbitrária, no entanto crescente, a gravidade de crises. Para categorizar as crises exibidas pelos animais foi utilizada a escala (tabela 3) de Racine (RACINE, 1972b).

**Tabela 1** - Escala de Racine.

Índice	Comportamento(s)
0	Imobilidade
1	Automatismos faciais
2	Mioclonias de cabeça e pescoço
3	Clonias de patas anteriores
4	Elevação sobre as patas posteriores
5	Elevação e queda

Fonte: RACINE, 1972

A atividade comportamental dos animais foi registrada por câmera de vídeo (filmadora Digital Full HD Sony DCR-PJ6) durante 120min após a microinjeção de PILO e/ou exposição do animal ao *crack*.

#### 1.4.8. Delineamento experimental

Os animais foram divididos em quatro grupos (n=24):

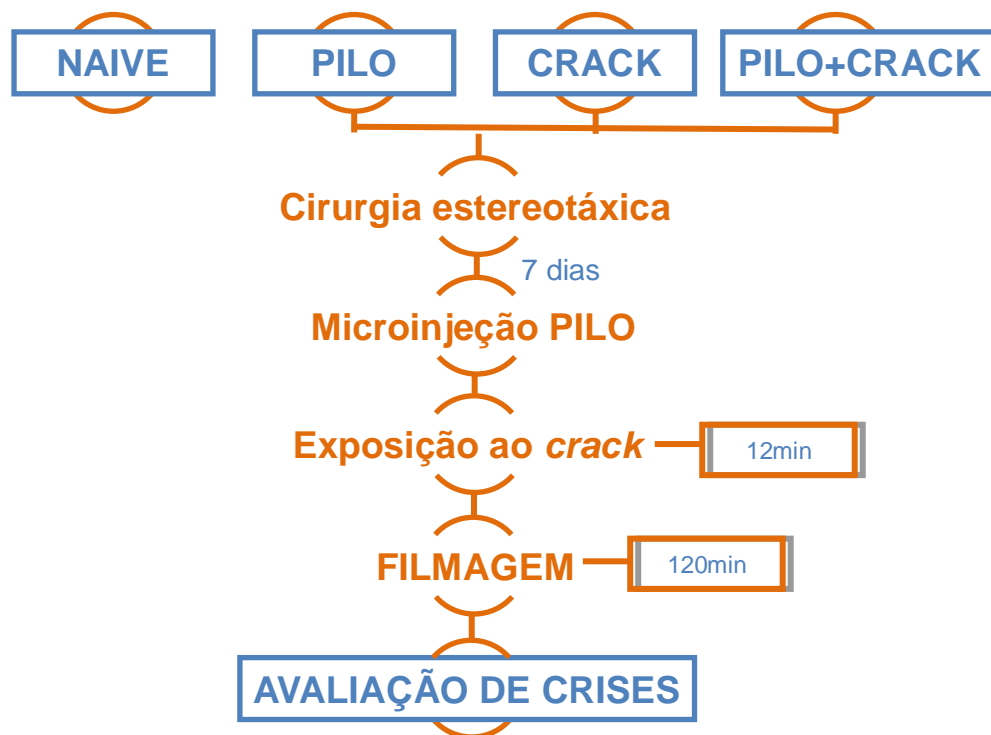
**NAIVE** (n=6) – animais não submetidos à microinjeção de baixa dose de pilocarpina e não expostos à fumaça do crack.

**PILO** (n=6) – animais submetidos à microinjeção de baixa dose de pilocarpina e não expostos à fumaça do crack.

**CRACK** (n=6) – animais não submetidos à microinjeção de baixa dose de pilocarpina e expostos à fumaça do crack.

**PILO+CRACK** (n=6) – animais submetidos à microinjeção de baixa dose de pilocarpina e expostos à fumaça do crack.





#### 1.4.9. Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Estes foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via para dados independentes, utilizando-se o pós-teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls. Essas análises foram feitas com o auxílio do programa computacional *GraphPad Prism®*, v. 6 (GraphPad, USA). O nível de significância estabelecido foi de 5% (valor descrito de  $p < 0,05$ ).

### 1.5. Resultados e discussões

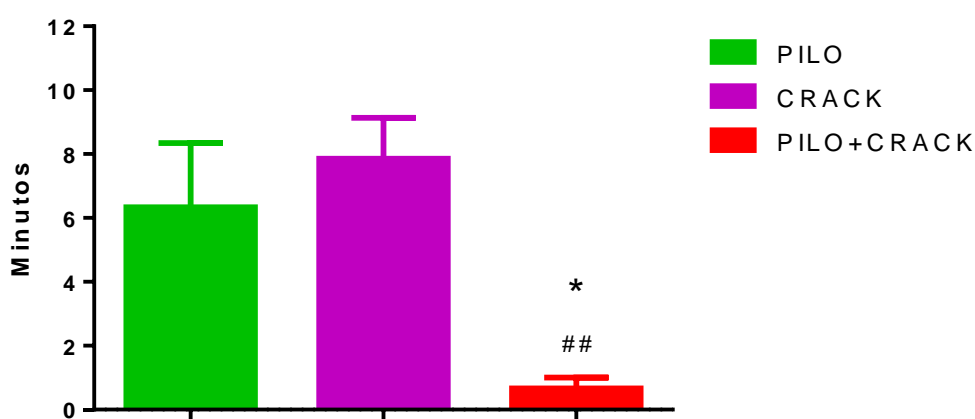
Os animais do grupo NAIVE não foram submetidos a microinjeções e não foram expostos a fumaça do *crack*, conseqüentemente não exibiram crises, portanto não foi realizado análise comportamental neste grupo.

#### 1.5.1. Latência para crises

Pode ser observado na figura 19 que houve diminuição da latência para crises no grupo PILO+CRACK quando comparado a CRACK e a PILO.

Conseqüentemente os animais que foram expostos seguidamente às duas drogas levaram um tempo menor para desenvolver crises. Já os tratamentos onde tanto a PILO quanto o *crack* são administrados isoladamente não ficou evidenciado diferenças estatisticamente significantes. A cocaína/*crack* pode induzir crises ou exacerbar uma desordem preexistente reduzindo o limiar para geração de crises (KOPPEL; SAMKOFF; DARAS, 1996).

**Figura 19** - Latência para crises.



Latência para crises dos animais submetidos ou não a administração de baixa dose de PILO intrahipocampal (0,75 mg/ $\mu$ L). e expostos, ou não a fumaça do *crack* (400 mg). ANOVA uma via seguida do teste pós teste de Newman Keuls.  $p < 0,0052$ . \*comparado a PILO ## comparado a CRACK.

Em um estudo com pacientes que abusavam de álcool foi verificado a diminuição para a latência de crises quanto os pacientes se encontravam em abstinência (HOLLAND et al., 1992; KOPPEL et al., 1992). KONKOL et al. compararam a capacidade de cocaína e BE induzirem crises em ratos e verificaram que houve uma menor latência nos grupos tratados somente com cocaína, sugerindo que crises induzidas por cocaína e BE possuem mecanismos diferentes.

O mecanismo pelo qual a cocaína provoca crises é complexo, SCHECHTER et. al., 1995 (SCHECHTER; MEEHAN, 1995) observaram a latência pra crises diminuída em camundongos machos e fêmeas quando associaram altas doses de cocaína a um agonista serotoninérgico sugerindo que seus efeitos nos níveis de serotonina (5-HT) aceleraram a indução de crises tônico-clônicas, porém não a promoveram. A cocaína em baixas doses acelerou significativamente

disseminação das descargas de crises no hipocampo e na amígdala diminuído o limiar necessário para evocar crises, causando um efeito excitatório nas estruturas límbicas, aumentando sua sensibilidade a descargas neuronais que surgem em locais distantes do cérebro e aumentando sua tendência a responder com descargas repetitivas (LESSE; COLLINS, 1979). MACÊDO et al., 2004 testaram entre outras drogas, antidepressivos e ansiolíticos que diminuíram a latência para crises induzidas por cocaína. Em uma outra pesquisa, camundongos injetados exclusivamente com cocaína endovenosa tiveram a latência para crise diminuída, e após o tratamento com canabidiol (CBD) houve o aumento da latência, esses autores sugerem o CBD como potencial tratamento pra crises induzidas por cocaína (GOBIRA et al., 2015; VILELA et al., 2015).

### 1.5.2. Frequência

As classes mais frequentes da Escala de Racine (1972) entre os grupos PILO e CRACK foram as classe 0, 1 e 2 enquanto que no tratamento PILO+CRACK as classes mais visualizadas foram 0, 1, 2 e 3 (tabela 3). Pacientes usuários de cocaína/*crack* que relataram histórico de crises, fatores de risco para crises ou epilepsia, geralmente desenvolvem crises com maior frequência após o uso da droga (KOPPEL; SAMKOFF; DARAS, 1996). Nossos resultados mostraram que todos os grupos expostos à baixa dose de PILO e/ou *crack* foram capazes de gerar crises nos animais e sugerem ainda que a PILO e o *crack* quando administrados isoladamente são menos eficientes em desencadear manifestações motoras, porém quando administrados em conjunto podem gerar crises límbicas e motoras generalizadas (classes 1,2,3,4 e 5).

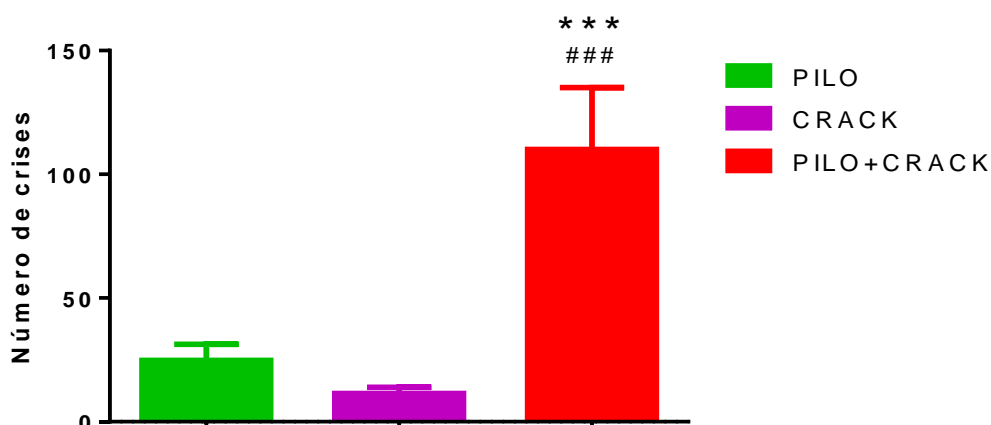
**Tabela 2** - Classes de Racine mais frequentes.

<b>GRAVIDADE DAS CRISES</b>	
PILO	<b>0,1,2,3,4,5</b>
CRACK	<b>0,1</b>
PILO+CRACK	<b>0,1,2,3,4,5</b>

Classes da escala de Racine apresentadas pelos animais expostos a fumaça do *crack* (400 mg) e submetidos ou não a administração de dose subconvulsivante de pilocarpina intrahipocampal (0,75 mg/ $\mu$ L). Em negrito as classes mais frequentes.

O abuso de cocaína têm sido historicamente associado a crises (SORDO et al., 2013). Estas têm sido relatadas após o uso de cocaína em todas as suas vias de administração (HOLLAND et al., 1992). A cocaína/*crack* pode induzir crises ou exacerbar uma desordem preexistente (KOPPEL; SAMKOFF; DARAS, 1996). Além disso, pode também causar isquemia ou AVC cerebral que podem acarretar no desenvolvimento de crises (MERIGIAN et al., 1994; NEIMAN; HAAPANIEMI; HILLBOM, 2000). Nos casos mais graves, as crises predizem o início do AVC (LEVINE et al., 1990). Foram relatadas crises em 1% a 10% dos pacientes com uso agudo de cocaína, mas há relatos conflitantes sobre o verdadeiro impacto na incidência de crises em comparação com a incidência em usuários e não usuários de cocaína (CHANG et al., 2016; SORDO et al., 2013).

**Figura 20** - Frequência de crises.



Frequência para crises, observadas durante 120 min, dos animais submetidos ou não a administração de baixa dose de PILO intrahipocampal (0,75 mg/ $\mu$ L). e expostos, ou não a fumaça do *crack* (400 mg). ANOVA uma via seguida do teste pós teste de Newman Keuls.  $p < 0,0003$ .\*\*\*comparado a PILO ### comparado a CRACK.

Foi observado ainda o aumento no número de crises no grupo PILO+CRACK (107.7  $\pm$  24.41), quando comparado com os grupos PILO (24.83  $\pm$  6.44) e o grupo CRACK (11.43  $\pm$  2.44) como observado na figura 20. Cocaína oral, intranasal ou intravenosa por si só pode causar crises parciais ou generalizadas (NNADI et al., 2005). Dez por cento dos pacientes que se apresentam em hospitais de emergência com intoxicação aguda por cocaína apresentam distúrbios convulsivos (DHUNA; PASCUAL-LEONE, 1990). As crises relacionadas à cocaína ocorrem mais frequentemente após o uso crônico, porém também podem ocorrer após o primeiro uso da droga, ocorrendo poucos minutos após o início, o que corresponde ao pico

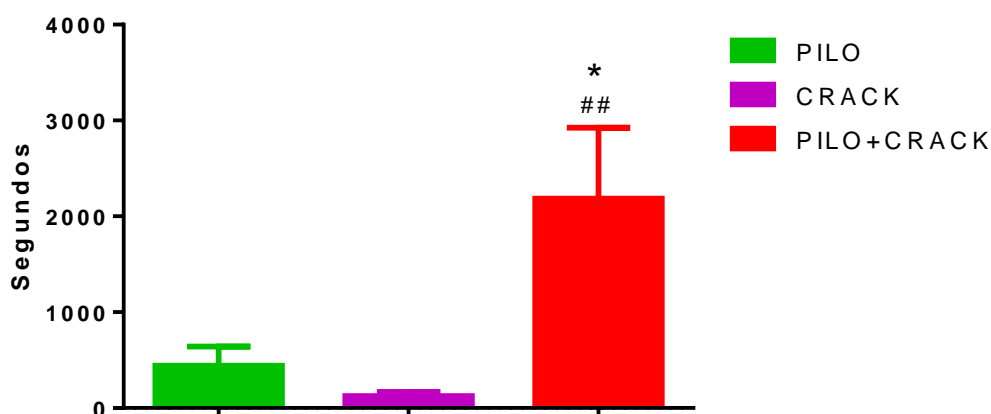
de concentração de cocaína no plasma (DHUNA; PASCUAL-LEONE, 1990). Vale destacar que animais submetidos apenas ao crack apresentaram crises epilépticas, fato inédito e de relevante importância mostrado em nossos resultados.

### 1.5.3. Duração das crises

O tempo de duração das crises foi menor entre os grupos PILO ( $442,0 \pm 198,5$ ) e CRACK ( $124,9 \pm 42,49$ ) quando comparado ao grupo PILO+CRACK ( $2138 \pm 723,9$ ) como pode ser visualizado na figura 21. Semelhantemente aos resultados de frequência. O aumento da frequência e duração de crises pode estar associado ao aumento do dano neuronal (LOPIM et al., 2016).

Em um estudo realizado com 12.579 pacientes que desenvolveram crises, foi visto que 549 citaram uso de cocaína, e 43 relacionaram o uso da cocaína a deflagração da crise. Todos os 43 pacientes tiveram crises tônico-clônicas generalizadas e somente 1 desenvolveu SE (MAJLESI et al., 2010). Vários eventos podem ocorrer após o uso agudo de cocaína, estudos com animais tratados com cocaína endovenosa, relataram o desenvolvimento de acidose láctica, hipertensão e hipertermia, repetidas crises e morte (SPIVEY; EUERLE, 1990).

**Figura 21** - Duração das crises.



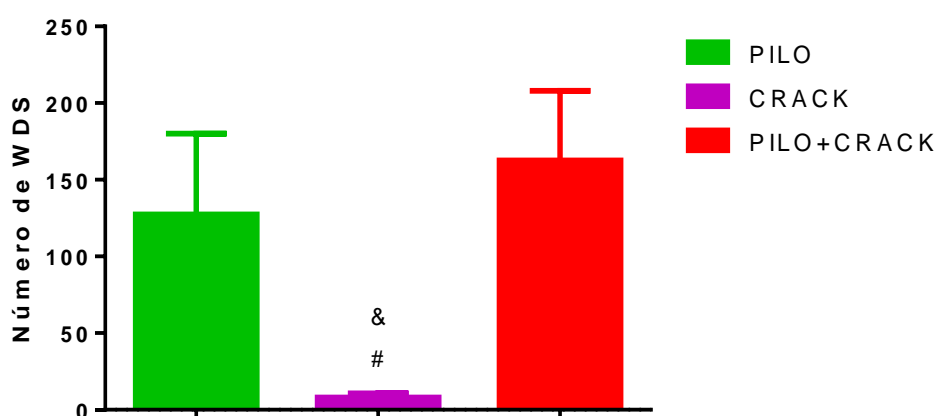
Duração das crises dos animais submetidos ou não a administração de baixa dose de PILO intrahipocampal (0,75 mg/ $\mu$ L) e expostos, ou não a fumaça do crack (400 mg). ANOVA uma via seguida do teste pós teste de Newman Keuls.  $p < 0,0066$ . \*comparado a PILO ## comparado a CRACK.

Muitas das ações conhecidas da cocaína podem levar a mudanças de excitação sináptica, ou não, geradas de forma não sináptica, que podem facilitar a disseminação de descargas epileptiformes dentro no sistema límbico. Estes incluem ações sobre membranas que interferem com aumentos transitórios na permeabilidade ao sódio e liberação de cálcio, bem como as ações da cocaína em vários neurotransmissores, incluindo a dopamina, serotonina, norepinefrina e acetilcolina (LESSE; COLLINS, 1979). Desse modo, a cocaína na forma fumada e seus produtos desempenham potencial papel facilitador para desenvolvimento de crises epiléticas, devido à hiperexcitabilidade cerebral gerada a partir da exposição dos animais aos produtos da pirólise do *crack*.

#### 1.5.4. Wet dog shake (WDS)

Os animais apresentaram WDS durante e após o período de exposição ao *crack*. O grupo PILO ( $127,3 \pm 52,73$ ) mostrou um aumento significativo quando comparado ao grupo CRACK ( $8,00 \pm 2,64$ ). Similarmente, foi observado aumento em PILO+CRACK ( $162,7 \pm 45,40$ ) quando comparado ao CRACK (Figura 22).

**Figura 22** - Quantidade de WDS.



WDS apresentados pelos animais submetidos ou não a administração de baixa dose de PILO intrahipocampal ( $0,75 \text{ mg}/\mu\text{L}$ ). e expostos, ou não a fumaça do *crack* ( $400 \text{ mg}$ ). ANOVA uma via seguida do teste pós teste de Newman Keuls.  $p < 0,0238$ . & comparado a PILO # comparado a PILO+CRACK.

Existem duas hipóteses principais na literatura que poderiam explicar os circuitos envolvidos na expressão do WDS (JAHODOVA et al., 2012). Na primeira o

WDS indicaria a progressão de crises límbicas para generalizadas (RONDOUIN; LERNER-NATOLI; HASHIZUME, 1987) e a segunda hipótese o aparecimento de WDS caracterizaria a expressão de processos inibitórios associados a crises límbicas (LE GAL LA SALLE; CAVALHEIRO, 1981).

Em experimentos com ratos, Turski et al. observaram que WDS foram raramente visualizados durante a fase de crises límbicas motoras, este comportamento apareceu apenas após episódios de crises límbicas motoras, e nunca os precederam (TURSKI et al., 1983). Esse dado vai de encontro aos nossos resultados onde podemos verificar uma maior expressão de WDS tanto no grupo CRACK quanto no PILO isoladamente, onde verifica-se maior quantidade e frequência de crises límbicas. A expressão de WDS durante a análise comportamental também pode ser explicada como uma estratégia para controle de crises, sendo considerado um comportamento anticonvulsivante (DAGCI et al., 2002; RODRIGUES et al., 2005). Estudos em que foram induzidas crises epiléticas por administração de altas doses de PILO apontaram aumento no número de WDS (MELO et al., 2016), indicando que a gravidade das crises pode estar correlacionada a frequência deste comportamento.

## **1.6. Conclusão**

Os principais achados deste capítulo corroboram com as informações existentes na literatura, de que o uso de cocaína pode desencadear crises em animais predispostos ou não, assim como em humanos, independente da frequência de uso droga. Neste estudo foi observado pela primeira vez, em rota alternativa de administração de cocaína, aumento de susceptibilidade para crises epiléticas quando animais foram expostos ao *crack*.

Observou-se, principalmente, que machos expostos à baixa dose de PILO seguida de exposição única aos produtos da pirólise do *crack* apresentaram crises límbicas mais frequentes e duração mais prolongadas que animais expostos unicamente à PILO ou ao *crack*, sugerindo que o tecido nervoso torna-se mais susceptível a crises. Aliado a isto, e igualmente inédito, foi observado o desenvolvimento de crises epiléticas e presença de WDS em animais submetidos apenas ao *crack*, sugerindo um novo modelo experimental indutor de crises epiléticas.

Apesar do importante resultado relativo ao componente gerador de crises do *crack*, existe apenas um estudo desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa que relaciona o uso do crack com a presença de crises autossustentáveis (ARAÚJO et al., 2018). Dessa forma, novos estudos são necessários para estabelecer entendimento claro e objetivo dos padrões fisiopatológicos e comportamentais associados ao uso do crack.



**CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO DA SALIVA EM ANIMAIS EXPOSTOS À FUMAÇA DO  
*CRACK***

## 2.1. Resumo

Os efeitos do *crack* sobre o SNC ainda não são totalmente esclarecidos. No último capítulo foi verificado que o *crack* é uma droga potencialmente causadora e facilitadora de crises. Dessa forma podemos inferir que este psicoestimulante pode ter a capacidade de causar efeitos colinérgicos exarcebados em animais expostos a esta droga. Com base nas informações supracitadas será abordado neste capítulo possíveis alterações relacionadas às glândulas salivares e ao fluxo salivar em animais expostos aos produtos da pirólise do *crack* em diferentes momentos: 0h, 24h e 14 dias após a exposição aos produtos da pirólise do *crack*. Foram coletadas glândulas parótidas, submandibulares e fluxo salivar estimulado destes animais. Não houve diferenças nos pesos das glândulas, porém após 14 dias de exposição o fluxo salivar mostrou-se aumentado, possivelmente mediado pelo sistema colinérgico.

## 2.2. Introdução

### 2.2.1. Salivação

A saliva é um fluido excretado de glândulas exócrinas e contém aproximadamente 99% de água, e uma variedade de eletrólitos (sódio, potássio, cálcio, cloreto, magnésio, bicarbonato, fosfato) e proteínas, representadas por enzimas, imunoglobulinas e outros fatores antimicrobianos, glicoproteínas mucosas, vestígios de albumina, polipéptidos e oligopéptidos de importância para a saúde bucal. Produtos de glicose e nitrogênio, como ureia e amônia também são componentes desta secreção. (DE ALMEIDA et al., 2008; HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; KAUFMAN; LAMSTER, 2002).

As glândulas salivares são responsáveis pela secreção salivar e reguladas pelo SNA. A mistura da saliva é secretada 90% pelas glândulas maiores: parótida, submandibular e sublingual e os 10% restantes pelas centenas glândulas salivares menores espalhadas na mucosa oral. O sistema nervoso autônomo (SNA) simpático e parassimpático controla a secreção salivar, porém suas condições patológicas ainda são pouco conhecidas (SABINO-SILVA et al., 2010). O nervo parassimpático, mediado pela acetilcolina, é o principal responsável pela secreção de água e eletrólitos, provocando uma secreção fluida e abundante, enquanto que o nervo

simpático, mediado pelas catecolaminas, é o principal responsável pela secreção de proteínas, produzindo uma saliva viscosa e rica em amilase (CARPENTER, 2013; LENT, 2010; MESE; MATSUO, 2007)(HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; KAUFMAN; LAMSTER, 2002; MESE; MATSUO, 2007).

O fluxo normal para saliva não estimulada é acima de 0,1 mL/min. Para saliva estimulada, o volume mínimo para a norma aceita aumenta para 0,2 mL/min. Esses números foram projetados a partir de pesquisas sobre populações em geral. Qualquer fluxo abaixo de 0,1 mL/min é considerado hipossalivação (DE ALMEIDA et al., 2008; HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001)

A diminuição do fluxo salivar e as alterações na composição salivar causam um desequilíbrio clinicamente oral, manifestado pelo aumento da incidência de cárie, susceptibilidade à candidíase oral, xerostomia, dificuldades de fala, mastigação e deglutição, alteração da percepção do sabor e halitose (MESE; MATSUO, 2007). Nos últimos anos, alguns estudos têm relacionado mecanismos envolvidos na salivação ao uso de psicotrópicos e a maioria destas pesquisas identificaram alterações induzidas por drogas de abuso (MATEOS-MORENO et al., 2013; MCGRATH; CHAN, 2005; SORDI et al., 2017; WOYCEICHOSKI et al., 2013).

Alterações na produção salivar são características importantes em várias doenças. Portadores de Epilepsia apresentam hipersalivação na fase ictal da doença, mediada pelo sistema colinérgico.

Vários agentes terapêuticos e drogas recreativas têm sido citados como causadores de alteração no fluxo salivar, como a cocaína. O *crack*, antes de chegar aos pulmões, entra em contato com a mucosa bucal. No entanto, existem poucos estudos sobre os efeitos orais induzidos por esta droga. (WOYCEICHOSKI et al., 2013).

### **2.3. Definição do problema e hipóteses**

Hipossalivação é causada geralmente por medicamentos que causam efeitos anticolinérgicos, via bloqueio da ligação da ACh aos receptores muscarínicos nas células acinares. Qualquer droga que iniba a ligação do neurotransmissor aos receptores de membrana acinares, ou que perturbe as vias de transporte de íons, também pode afetar adversamente a qualidade e quantidade do débito salivar (SHIP, 2002). Dessa forma, o principal objetivo deste capítulo foi avaliar possíveis

alterações na secreção salivar de ratos expostos de forma aguda e sub-crônica aos produtos da pirólise do *crack*.

### **2.3.1. Hipótese**

Animais expostos aos produtos da pirólise do *crack* expressam aumento do fluxo salivar.

### **2.3.2. Objetivos**

#### **2.3.2.1. Geral:**

Investigar as possíveis alterações glandulares e no fluxo salivar de ratos expostos aguda e sub-cronicamente à fumaça do *crack*.

#### **2.3.2.1. Específicos:**

- Avaliar o peso das glândulas parótida e submandibular;
- Avaliar o fluxo salivar.

## **2.4. Materiais e Métodos**

### **2.4.1. Animais**

Foram utilizados ratos (n= 32) da linhagem Wistar, machos, 12 semanas, com peso entre 240 e 340g, provenientes do BIOCEN/UFAL. Este projeto foi submetido ao CEUA/UFAL e aprovado sob protocolo 33/2016 (ANEXO B). Os animais foram acondicionados nas mesmas condições descritas na metodologia do capítulo 1.

### **2.4.2. Protocolo da exposição da fumaça do *crack***

Protocolo idêntico ao mencionado no capítulo 1.

### **2.4.3. Coleta do fluxo salivar 0h, 24h e 14 dias após exposição à fumaça do *crack***

Imediatamente após o término da exposição ao crack 0h, e 24 horas ou 14 dias após exposição à fumaça do *crack*, os animais foram anestesiados intraperitonealmente (tiopental sódico, 40 mg/kg) e, em seguida, foi realizado um estímulo parassimpático da secreção salivar por meio da injeção de pilocarpina (2 mg/Kg, ip), que é um agonista muscarínico. A saliva foi coletada durante 10 minutos após o início da sua secreção (ZOUKHRI; KUBLIN, 2001) e posteriormente pesada. Para obter o fluxo da saliva estimulada foi utilizado o seguinte cálculo:

$$\text{Fluxo salivar} = \frac{\text{peso da saliva estimulada}}{\text{peso da parótida} + \text{peso da submandibular}}$$

#### 2.4.4. Coleta das glândulas

Com os animais anestesiados, conforme protocolo descrito acima, as glândulas parótidas e submandibular foram coletadas para análises morfológicas e em seguida o animal foi adequadamente eutanasiado.

#### 2.4.5. Delineamento experimental

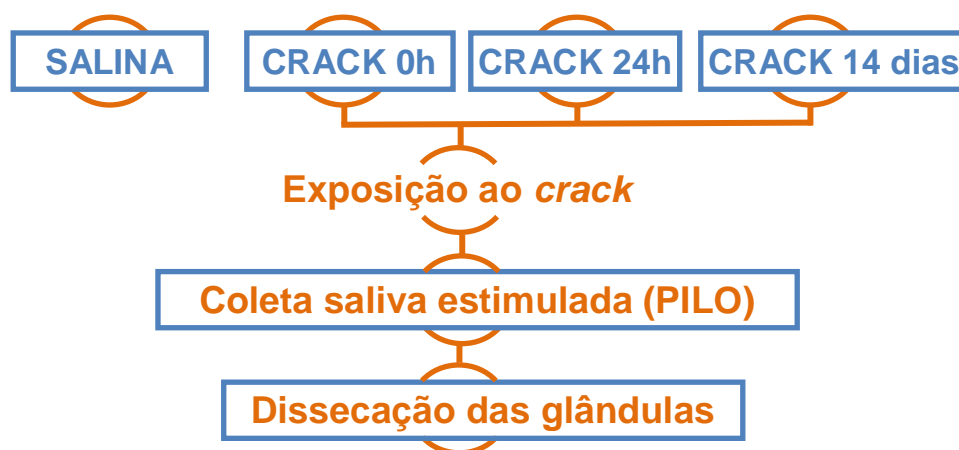
Os animais (n=32) foram divididos em quatro grupos experimentais:

**SALINA** (n=8) - não expostos à fumaça do *crack*;

**CRACK 0h** (n=8) - expostos à fumaça do *crack* por 12 minutos e eutanasiados imediatamente após a exposição;

**CRACK 24h** (n=8) - expostos à fumaça do *crack* por 12 minutos e eutanasiados 24h após a exposição;

**CRACK 14 dias** (n=8) - expostos à fumaça do *crack* por 12 minutos durante 14 dias consecutivos e eutanasiados no último dia de exposição.



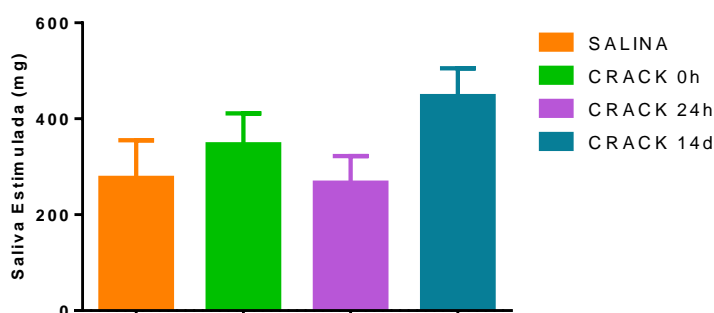
#### 2.4.6. Análises estatísticas

As análises estatísticas realizadas foram idênticas às descritas nos Materiais e Métodos do Capítulo 1 desta dissertação.

#### 2.5. Resultados e discussões

Nossos resultados não indicaram diferenças no peso da saliva estimulada em nenhum dos períodos analisados 0h ( $346,8 \pm 64,39$ ), 24h ( $266,8 \pm 55,48$ ), 14 dias ( $447,3 \pm 58,11$ ) quando comparado ao do grupo salina ( $276,9 \pm 78,48$ ) (figura 23). A hipertrofia ou hiperplasia do tecido glandular é possível, e conseqüentemente resulta em uma composição salivar alterada (APS; MARTENS, 2005).

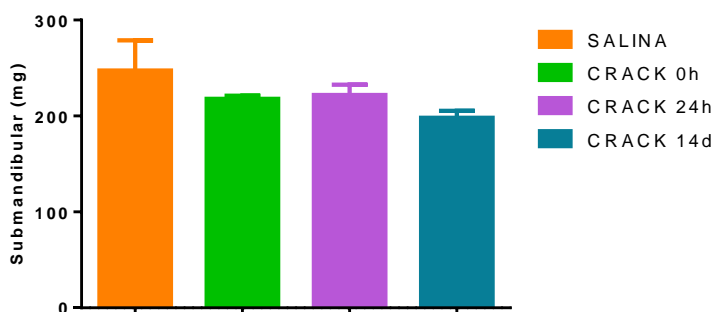
**Figura 23** – Peso da saliva estimulada.



Peso da saliva estimulada em animais expostos, ou não a fumaça do *crack* (400 mg). ANOVA uma via seguida do teste pós teste de Newman Keuls.  $p < 0,1887$ .

Assim como também não houve diferenças nos pesos da glândula submandibular (figura 24) entre o grupo salina ( $247,4 \pm 31,47$ ) e os diferentes períodos de exposição, 0h ( $217,8 \pm 3,31$ ), 24h ( $221,8 \pm 10,96$ ) e 14 dias ( $198,2 \pm 7,16$ ).

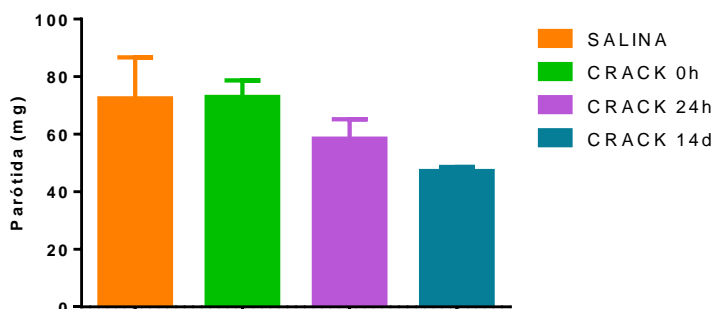
**Figura 24 - Peso submandibular.**



Peso da glândula sub-mandibular em animais expostos, ou não, a fumaça do crack (400 mg). ANOVA uma via seguida do teste pós teste de Newman Keuls.  $p < 0,2335$ .

Da mesma forma que as submandibulares, o peso das glândulas parótidas (figura 25) permaneceram inalterados, não sendo evidenciado nenhuma diferença entre os grupos: SALINA ( $72,48 \pm 14,20$ ) e os diferentes períodos de exposição, 0h ( $72,96 \pm 5,75$ ), 24h ( $58,42 \pm 6,81$ ) e 14 dias ( $47,18 \pm 1,46$ ). Estudos em ratos indicam que a glândula parótida é a mais responsiva a variações na dieta, de tal forma que durante os períodos de inanição nutricional, as glândulas podem se tornar menores e atroficas, mas podem regenerar durante a retomada da alimentação (CARPENTER, 2013)

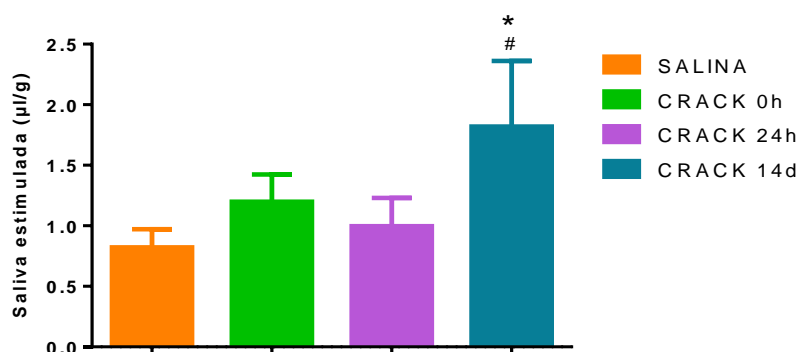
**Figura 25 - Peso parótida.**



Peso da glândula parótida em animais expostos, ou não, a fumaça do *crack* (400 mg). ANOVA uma via seguida do teste pós teste de Newman Keuls.  $p < 0,0925$ .

Na avaliação da saliva estimulada por grama de tecido glandular (Figura 26), que equivale à razão entre o volume de secreção salivar e a soma do peso glandular de parótida e submandibular, não foi observado diferenças nos tratamentos 0h ( $1,198 \pm 0,226$ ) e 24h ( $0,997 \pm 0,232$ ), porém, observou-se o aumento da secreção salivar estimulada no tratamento de 14 dias ( $1,820 \pm 0,221$ ) em relação ao grupo SALINA ( $0,821 \pm 0,151$ ), e curiosamente uma diferença significativa entre os grupos 24h ( $0,997 \pm 0,232$ ) e 14 dias quando comparados entre si.

**Figura 26** - Saliva estimulada.



Saliva estimulada em animais expostos, ou não, a fumaça do *crack* (400 mg). ANOVA uma via seguida do teste pós teste de Newman Keuls.  $p < 0,0169^*$  comparado a SALINA, # comparado a CRACK 24h

A regulação neuronal da salivação é direcionada tanto pelo SNA simpático quanto pelo parassimpático, portanto, todas as drogas que interferem nos SNC e SNP, independentemente de sua finalidade, terão influência na produção de saliva. Estes efeitos podem ser hipersalivação ou hipossalivação. Para aumentar a taxa de fluxo salivar, é necessário aumentar a quantidade dos neurotransmissores acetilcolina e noradrenalina. Esses neurotransmissores são degradados muito rapidamente pelo organismo e causam a secreção de grande volume de saliva, porém secreção terá um alto teor de água e um baixo teor de proteína. (APS; MARTENS, 2005). Em humanos, um estudo que investigou o fluxo salivar em usuários de *crack* encontrou redução significativa no fluxo salivar e uma maior



ocorrência de hipossalivação em comparação aos não usuários (ANTONIAZZI et al., 2017). Porém, outro estudo em usuários de *crack* (WOYCEICHOSKI et al., 2013) não identificou diferenças no fluxo, corroborando assim com os nossos dados de 0h e 24h, no entanto contradiz os resultados encontrados no tratamento 14 dias.

## **2.6. Conclusão**

Nossos resultados sugerem que o *crack*, promove o aumento do fluxo salivar por meio de modificações no processo fisiológico da secreção salivar, via parassimpático, após tratamento sub-crônico.

**CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA AChE NO  
HIPOCAMPO DE ANIMAIS EXPOSTOS A FUMAÇA DO CRACK**

### 3.1. Resumo

O presente capítulo investigou os efeitos da administração de PILO e *crack*, associados ou não, sobre a atividade da enzima AChE em hipocampo de ratos adultos jovens. Os animais foram microinjetados com baixa dose de PILO, seguida de exposição aos produtos da pirólise do *crack*. Posteriormente foram eutanasiados em diferentes tempos, 10min e 60 min, após a exposição ao *crack*. A AChE apresentou um perfil variável de inibição em todos os tratamentos no tempo de 60min, exceto no grupo NAIVE o que explicaria o excesso de ACh na fenda sináptica, resultando em um aumento na atividade colinérgica central, levando ao aumento da excitabilidade do tecido nervoso (capítulo 1) e do fluxo salivar (capítulo 2). Dessa maneira, o presente estudo fornece importantes pistas para os mecanismos adjacentes a crises convulsivas e hipersalivação causada pela exposição ao *crack*.

### 3.2. Introdução

A ACh é um dos neurotransmissores excitatórios mais estudados no SNC, onde é amplamente distribuída e funciona como um sinal para circuitos locais e neurônios de projeção. Estes neurônios colinérgicos estão envolvidos nas funções de aprendizado e recompensa do cérebro. Conseqüentemente, antagonistas colinérgicos nicotínicos ou muscarínicos podem perturbar a aprendizagem e a memória e tem o efeito revertido por meio da restauração da função da ACh. Tanto inibidores da colinesterase como agonistas colinérgicos com seletividade nicotínica ou muscarínica podem melhorar o aprendizado em condições nas quais a função colinérgica é diminuída, mas interrompem os mesmos comportamentos quando administrados em doses mais altas o que pode estar associado a sinais de bocejo, tremor e movimentos involuntários (GRASING, 2016).

Os níveis sinápticos de ACh são regulados pela AChE e a transmissão colinérgica é terminada pela hidrólise da ACh pela enzima AChE, catalisando a ACh em colina e ácido acético (SOREQ; SEIDMAN, 2001; TEODORAK et al., 2015). Apesar da complexidade do sistema colinérgico, tem sido possível associar sua participação na modulação de respostas relacionadas à memória, atenção, emoções e a alteração da sua transmissão pode estar associada a transtornos do SNC como

a epilepsia, a doença de Alzheimer, a ansiedade e depressão. Sabe-se que a manipulação experimental do sistema colinérgico, por meio de tratamentos com agonistas muscarínicos pode induzir o modelo animal de ELT. Quando a ACh é liberada ativa o receptor muscarínico M1 e bloqueia as correntes de saída de potássio, provocando lesão neuronal devido ao efeito excitotóxico dos receptores de glutamato e influxo de  $Ca^{2+}$  (CAULFIELD, 1993; SILVA, 2016).

No hipocampo, a maioria dos receptores pós-sinápticos é do subtipo M1. Alterações genômicas do receptor M1 prejudica a ativação de várias vias de transdução de sinal e explica por que a excitação muscarínica é a principal causa de convulsões. Sabe-se ainda que a ACh modula circuitos adicionais, por exemplo, a atividade hipocampal mediada pelo glutamato (ZIMMERMAN; SOREQ, 2006).

Substâncias anticolinesterásicas inibem as enzimas colinesterases, impedindo a hidrólise da ACh, o que leva a um acúmulo desta na fenda sináptica. Este acúmulo é deletério à saúde, pois acarreta hiperestimulação colinérgica (SANTOS; MOSTARDEIRO, 2008). As principais manifestações clínicas no SNC decorrentes de excesso de ACh na fenda sináptica são: cefaleia, ansiedade, agitação, tremores, sonolência, dificuldade de fala, instabilidade emocional, coma e crises epiléticas (OLIVEIRA; BURÍOLA, 2009).

A cocaína induz múltiplos efeitos fisiológicos e toxicidade em animais e humanos envolvendo vários mecanismos pouco esclarecidos na literatura. A toxicidade induzida por cocaína pode levar a crises e SE tanto em modelos animais quanto em humanos (TSENG; DERLET; ALBERTSON, 1993). Em animais, crises ou as ações sinérgicas de crises e depressão respiratória são a principal causa de morte induzida por cocaína (MACEDO et al., 2010). Devido a esses fatos, nas últimas décadas tem-se verificado um maior interesse no sistema colinérgico, além do dopaminérgico, na fisiopatologia do abuso de drogas, já que a ACh parece estar intimamente envolvida em mecanismos dopaminérgicos e glutamatérgicos.

Neste contexto, pesquisas recentes vêm investigando o envolvimento colinérgico da cocaína/*crack* na neurotoxicidade causada por esta droga (CAMARINI et al., 2017; DALL et al., 2017; GARCIA et al., 2012, 2015; RITZ; GEORGE, 1993; THOMSEN et al., 2010).

### **3.3. Definição do problema**

Já é bem estabelecido na literatura que crises límbicas e motoras podem ser provocadas por altas doses de PILO (DE FURTADO et al., 2002; FURTADO et al., 2011; TURSKI; CAVALHEIRO, 1992; TURSKI et al., 1983, 1984). Assim como, a administração de cocaína em doses tóxicas e em repetidas doses, modelo de *kindling*, podem produzir crises em animais (DACKIS; O'BRIEN, 2001). No primeiro capítulo deste estudo foram avaliadas crises decorrentes tanto de baixas doses de PILO como pelos produtos da pirólise do *crack*, assim como a associação entre essas duas drogas. Assim como foi avaliado a salivação dos animais expostos ao *crack*. As informações mostradas nos capítulos anteriores nos permitem inferir que o envolvimento do sistema colinérgico na produção salivar, assim como a geração de crises é evidente. Sendo assim neste capítulo resolvemos investigar a atividade enzimática da AChE nestes dois indutores de crises límbicas, associados ou não, em animais submetidos a uma baixa dose de PILO e logo após, a uma exposição única aos produtos da pirólise do *crack*.

#### **3.3.1. Hipótese**

A administração de baixa dose de pilocarpina seguida da exposição ao *crack* provocam inibição da enzima AChE levando ao aparecimento de crises convulsivas, bem como hipersalivação nos animais.

#### **3.3.2. Objetivos**

##### **3.3.2.1. Geral:**

Avaliar a atividade da AChE em animais microinjetados com baixa dose de pilocarpina seguida de exposição aos produtos da pirólise do *crack*.

##### **3.3.2.2. Específicos:**

- Avaliar a atividade da AChE no hipocampo dos animais após 10 min do início de exposição;

- Avaliar a atividade da AChE no hipocampo dos animais após 60 min do início de exposição;

### **3.4. Materiais e Métodos**

#### **3.4.1. Animais**

Foram utilizados ratos (n= 50) da linhagem Wistar, machos, 12 semanas, com peso entre 240 e 340g, provenientes do BIOCEN/UFAL. Este projeto foi submetido ao CEUA/UFAL e aprovado sob protocolo 27/2016 (ANEXO A). Os animais foram acondicionados nas mesmas condições descritas na metodologia do capítulo 1.

#### **3.4.2. Cirurgia estereotáxica**

As cirurgias estereotáxicas realizadas foram idênticas às descritas nos Materiais e Métodos do Capítulo 1 desta dissertação.

#### **3.4.3. Microinjeções**

As microinjeções realizadas foram idênticas às descritas nos Materiais e Métodos do Capítulo 1 desta dissertação.

#### **3.4.4. Protocolo de exposição à fumaça do *crack***

O protocolo de exposição aos produtos da pirólise do *crack* realizado foi idêntico ao descrito nos Materiais e Métodos do Capítulo 1 desta dissertação.

#### **3.4.5. Eutanásia e dissecação do hipocampo**

Os animais foram eutanasiados por decapitação com o auxílio de uma guilhotina e em seguida, os cérebros foram coletados e postos em papel filtro embebidos com salina sobre gelo para dissecação dos hipocampos. Seguindo a fissura sagital mediana, a camada cortical cerebral foi retirada com auxílio de pinça reta de microdissecação e espátula boleada. O córtex foi exposto e rebatido para os lados para retirada do hipocampo, tanto o direito quanto o esquerdo. Terminada a

dissecação, os hipocampos foram armazenados em papel alumínio devidamente identificado, pesados e imersos em nitrogênio líquido e em seguida transferidos para freezer -80°C para posterior preparo do extrato bruto.

#### **3.4.6. Preparação do extrato livre de células**

Os cérebros foram descongelados em gelo, pesados e macerados sob banho de gelo em uma solução refrigerada de NaCl a 0,9% (80mg de cérebro: 1 mL de solução de NaCl) e em seguida transferidos para homogeneizador de vidro Potter-Elvehjem, parcialmente submerso em banho de gelo. Para ruptura final das células o extrato bruto foi submetido a 5 ciclos em aparelho de ultrassom (Fisher Scientific Sonic Dismembrator Model 100) por 15 segundos cada ciclo, com intervalos de 15 segundos em banho de gelo.

#### **3.4.7. Atividade enzimática da AChE**

A atividade da enzima AChE foi determinada segundo o método de ELLMAN et al., 1961. Foram utilizadas as seguintes diluições para determinação da atividade da AChE: 1:2, 1:5 e 1:10, e posteriormente foi feita triplicata da diluição de menor variação. A mistura reacional na cubeta continha: 93mM de tampão fosfato de potássio ( $K_2HPO_4$ ) 0,1M, pH 8,0; 100  $\mu$ L de amostra diluída em tampão de suspensão; 3,3 mM de ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) 0,01M; 0,5mM dos substratos, iodeto de acetilticolina (ATCh) para atividade colinesterase (ChE) e iodeto de butirilticolina (BTCh) para atividade butirilcolinesterase (BChE), 0,075M. As leituras de absorbância foram lidas à 412 nm, utilizando espectrofotômetro UV/VIS (Specord 200 Plus) por um período de 5 minutos. Atividade enzimática foi expressa em  $\mu$ mol de substrato hidrolisado por minuto ( $\mu$ mol.min<sup>-1</sup>.mL<sup>-1</sup>) e calculada conforme a fórmula abaixo (figura 27):

**Figura 27** - Fórmula para cálculo da atividade a AChE.

$$U / mL = \frac{\Delta A / \Delta t}{\varepsilon} \times \frac{V}{Ve/D}$$

**V** é o volume total da mistura reacional ( $V = 3$  mL),  $\Delta A/\Delta t$  é a inclinação da reta; **e** é o coeficiente de extinção molar do DTNB ( $\varepsilon = 14,15 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), **Ve** é o volume do extrato enzimático e **D** é a diluição do extrato.

#### **3.4.8. Quantificação de proteínas**

A quantificação de proteína foi determinada segundo método de Bradford *et al* (1976). No preparo do reagente de Bradford, dissolveu-se 102,4 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50 mL de etanol 95%, a solução foi agitada durante 60 minutos, seguido de adição de 100 mL de ácido fosfórico 85%. A solução obtida completou-se para 1 L com água deionizada e manteve-se sobre agitação durante 10 minutos. Após duas filtrações em papel de filtro, o reagente de Bradford foi armazenado protegido da luz. A curva de calibração de proteínas foi construída empregando-se albumina de soro bovino (1mg/mL) como padrão na faixa de concentração de 5µg/100µL à 55µg/100µL. Adicionou-se 2500µL de reagente de Bradford em cubeta de 3 mL, seguido de 100µL de solução padrão de albumina, incubando por 5 minutos. A leitura de absorvância a 595 nm foi determinada em espectrofotômetro, utilizando 100 µL de água em lugar de solução padrão para referência. As diluições utilizadas para quantificação de proteínas totais foram: 1:25 e 1:50.

#### **3.4.9. Delineamento experimental**

Os animais foram divididos em 2 grupos experimentais, sendo o primeiro grupo eutanasiado por decapitação após 10min de exposição ao *crack* (n=24) e o segundo após 60min de exposição ao *crack* (n=26):

**Grupo 1** (eutanasiados após 10min de exposição):



**NAIVE** (n=6) – animais não submetidos à microinjeção de pilocarpina subconvulsivante e não expostos à fumaça do *crack*, eutanasiados após 10min;

**SE** (n=2) – animais submetidos à microinjeção de pilocarpina convulsivante e não expostos à fumaça do *crack*, eutanasiados após 10min;

**PILO** (n=6) – animais submetidos à microinjeção de pilocarpina subconvulsivante e não expostos à fumaça do *crack*, eutanasiados após 10min;

**CRACK** (n=6) – animais não submetidos à microinjeção de pilocarpina subconvulsivante e expostos à fumaça do *crack*, eutanasiados após 10min de exposição;

**PILO + CRACK** (n=6) – animais submetidos à microinjeção de pilocarpina subconvulsivante e expostos à fumaça do *crack*, eutanasiados após 10min de exposição.

**Grupo 2 ( eutanasiados após 60min de exposição):**

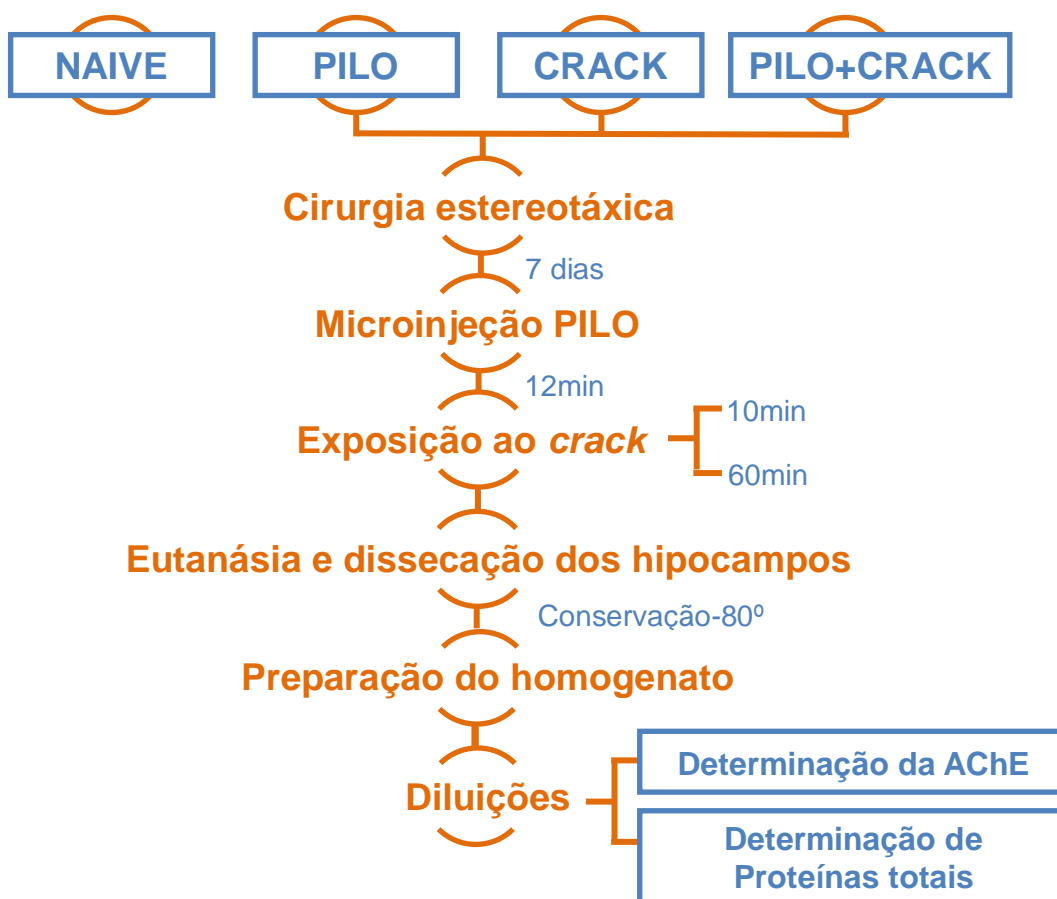
**NAIVE** (n=6) – animais não submetidos à microinjeção de pilocarpina subconvulsivante e não expostos à fumaça do *crack*, eutanasiados após 60min;

**SE** (n=2) – animais submetidos à microinjeção de pilocarpina convulsivante e não expostos à fumaça do *crack*, eutanasiados após 60min.

**PILO** (n=6) - animais submetidos à microinjeção de pilocarpina subconvulsivante e não expostos à fumaça do *crack*, eutanasiados após 60min.

**CRACK** (n=6) – animais não submetidos à microinjeção de pilocarpina subconvulsivante e expostos à fumaça do *crack*, eutanasiados após 60min de exposição;

**PILO + CRACK** (n=6) – animais submetidos à microinjeção de pilocarpina subconvulsivante e expostos à fumaça do *crack*., eutanasiados após 60min de exposição.



### 3.4.10. Análises estatísticas

As análises estatísticas realizadas foram idênticas às descritas nos Materiais e Métodos do Capítulo 1 desta dissertação.

## 3.5. Resultados e discussões

### 3.5.1. Dosagem da AChE 10 min após a exposição ao crack

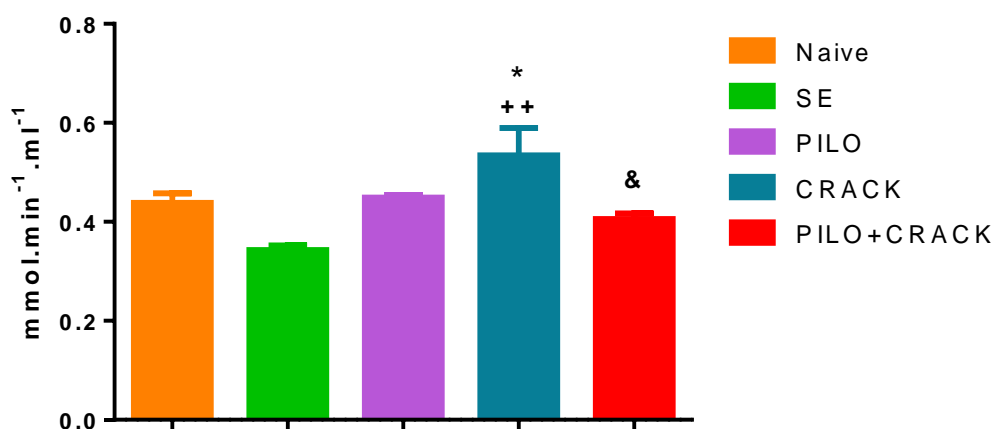
Durante as crises epilépticas, a enzima AChE encontra-se inibida no hipocampo (SANTOS et al., 2010), desse modo utilizamos dois grupos como controles, o grupo NAIVE (controle negativo) e SE (controle positivo). As colinesterases estão envolvidas na ativação glial moduladora e no fluxo sanguíneo cerebral, caracterizando-as como importante enzima a ser investigada (FREITAS et al., 2006). Nas análises realizadas nos grupos 10 min (figura 28), curiosamente, observa-se aumento da AChE no grupo CRACK ( $0,534 \pm 0,055$ ) em relação ao NAIVE ( $0,438 \pm 0,019$ ). É sabido que a BChE é uma enzima capaz de hidrolisar muitos substratos, incluindo a cocaína, e que ocorre inibição da AChE por excesso de

substrato, características que a distingue da BChE. (LOCKRIDGE, 1990; MASSON et al., 2001; TOUGU, 2001). Esse aumento no grupo CRACK pode ser devido a BChE, já que esta enzima tem a capacidade de metabolizar a cocaína. Estudos em animais mostraram que a administração de BChE sérica humana purificada protegeu camundongos e ratos dos efeitos letais da cocaína, bem como da hipertensão e arritmia (MATTESS et al., 1997; SUN et al., 2001). Outros estudos (HOFFMAN; MORASCO; GOLDFRANK, 1996; LYNCH et al., 1997) relatam a capacidade da BChE em reduzir efeitos psicológicos e comportamentais da cocaína, resultando na alteração do metabolismo da droga. Em ratos e camundongos a BChE (i.p.) reduziu a incidência de convulsões e letalidade após a administração (i.p.) de cocaína (HOFFMAN; MORASCO; GOLDFRANK, 1996). Em ratos, a BChE (e.v.) reduziu hipertensão e taxa cardíaca da cocaína (LYNCH et al., 1997; MATTESS et al., 1997), e diminuiu a atividade locomotora e a quantidade de cocaína no plasma (CARMONA et al., 1998; MATTESS et al., 1997).

Um estudo realizado por Silveira et. al. (2006), também observou o aumento da atividade da AChE no PFC e corpo estriado observada após SE induzido por cocaína endovenosa (e.v.) e pode estar relacionado a um aumento no conteúdo de ACh nessa área do cérebro, contribuindo para a atividade convulsiva.

Quando analisamos SE comparado aos demais tratamentos também observamos a mesma alteração. Já em relação as análises entre grupos, há uma forte inibição quando comparamos PILO+CRACK ( $0,406 \pm 0,010$ ) a CRACK. Vale ressaltar que o possível sinergismo entre as drogas do grupo PILO+CRACK foi que mais se aproximou as características inibitórias do grupo SE ( $0,342 \pm 0,009$ ), hipocampo convulsivo. Porém, o tempo de 10min após o início da exposição ao *crack* mostrou-se insuficiente para ser capaz de gerar inibição significativa nos grupos PILO+CRACK em relação ao grupo NAIVE.

**Figura 28** - Dosagem de AChE 10 min após a exposição ao *crack*.



Dosagem de AChE 10 min animais submetidos ou não a administração de baixa dose de PILO intrahipocampal (0,75 mg/ $\mu$ L). e expostos, ou não, a fumaça do *crack* (400 mg). ANOVA uma via seguida do teste pós teste de Newman Keuls.  $p < 0,0042$ . \* comparado a NAIVE, \*\* comparado a SE e & comparado a CRACK

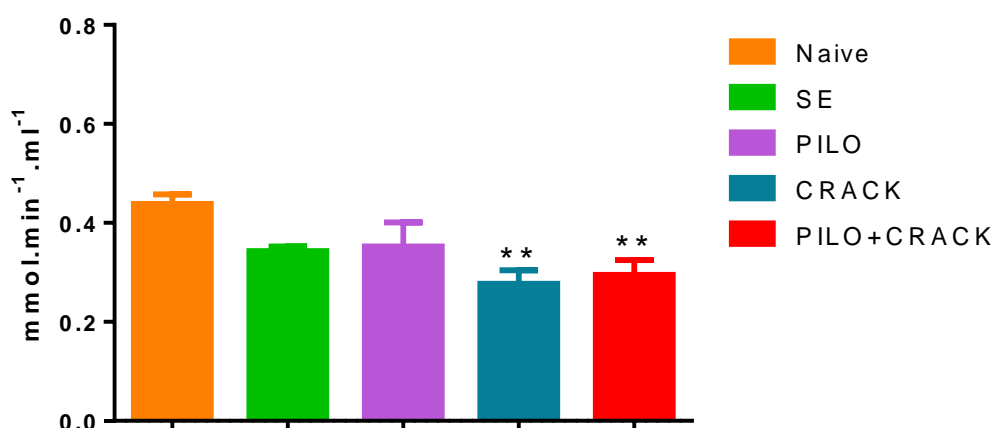
É sábio que crises epilépticas diminuem as atividades de ChAT e AChE, o que leva a constante inibição dessas enzimas que por consequência aumenta os níveis de ACh, o que poderia estar associado ao déficit de memória observado em ratos que apresentam crises (SANTOS et al., 2010). Em um estudo que investigou a atividade da AChE em líquido cefalorraquidiano (LCR) em crises naturais de cachorros, com o intuito de examinar potenciais correlações entre crises e disfunção colinérgica, não foram identificados diferenças entre os grupos (CHAI et al., 2013), porém os autores sugeriram um novo estudo com um número maior de animais.

A quantidade de ACh central elevada pode ser acompanhada por diminuição compensatória imediata na atividade enzimática da AChE e esta ação foi observada durante SE no córtex frontal, estriado e hipocampo, bem como essa redução pode estar relacionada a outros mecanismos compensatórios, incluindo modulação da atividade de enzimas relacionadas ao catabolismo da acetilcolina (FREITAS et al., 2006). Este efeito reduzido se mostrou ameno no hipocampo de animais eutanasiados 10min após a exposição em todos os tratamentos que utilizaram PILO, o que corrobora com dados descritos na literatura.

### 3.5.2. Dosagem da AChE 60 min após a exposição ao *crack*

Os grupos 60 min mostraram um aumento progressivo da inibição da AChE. Quando observamos CRACK (0,277±0,027) a PILO+CRACK (0,294±0,030) é notável a diminuição desta enzima quando comparados ao grupo NAIVE (0,438±0,019). Não foram identificados diferenças entre os tratamentos quando comparados ao grupo SE (0,342±0,009), figura 29.

**Figura 29** - Dosagem de AChE 60 min após a exposição ao *crack*.



Dosagem de AChE 60 min animais submetidos ou não a administração de baixa dose de PILO intrahipocampal (0,75 mg/μL). e expostos, ou não, a fumaça do *crack* (400 mg). ANOVA uma via seguida do teste pós teste de Newman Keuls. p < 0,0023.\*\*comparado a NAIVE.

Em relação ao tempo de 60 min, é importante ressaltar que foi suficiente para inibir significativamente a AChE nos grupos CRACK e PILO+CRACK quando comparados ao NAIVE, inferindo que há uma modulação importante do sistema colinérgico mesmo após o período de 60 min da utilização da droga. Desse modo, é possível sugerir que tanto o *crack* quanto PILO, isolados ou associados, parecem alterar mecanismos colinérgicos de modo mais eficiente após 60 min da administração destas drogas. Vale destacar ainda que o *crack* quando associado à PILO mostrou um maior poder de inibição desta enzima, em relação a CRACK e PILO tanto no menor tempo de análise, quanto no mais longo, o que poderia explicar o aumento da frequência e duração das crises neste grupo na nossa análise comportamental.

Existem evidências convincentes para o envolvimento da atividade enzimática da AChE na ativação de neurônios colinérgicos em ratos adultos no cérebro durante

o estabelecimento de SE (FREITAS et al., 2006) e nossos resultados no tempo de 60 min, no grupo SE, demonstraram esse perfil, indicando que tanto a PILO quanto o *crack* de alguma maneira inibem a AChE, e esta inibição é mais fortemente evidenciada quando há o sinergismo entre as duas drogas tempo-dependente.

Acredita-se que a predominância de ações de dopamina no NAc seja responsável pelo reforço e vício da cocaína. Alguns estudos sugerem que ACh liberada no NAc atua de forma oposta à dopamina (HIKIDA et al., 2001) assim, as interações convergentes entre dopamina e ACh contribuiriam para a regulação das respostas neurais e adaptação no NAc. Estudos revelam que ACh desempenha um papel crucial no reforço e dependência de cocaína e morfina, pois, inibidores ativos centralmente da AChE bloquearam o desenvolvimento e a persistência de alterações comportamentais associadas à dependência dessas drogas (HIKIDA et al., 2001, 2003). Esta inibição foi derivada do aumento da ACh no NAc, porque a depleção de fontes de ACh pela eliminação de células colinérgicas atenuou acentuadamente os efeitos de bloqueio do inibidor da AChE sobre comportamentos anormais induzidos por drogas. Assim, inibidores AChE não são úteis apenas para uma melhor compreensão dos mecanismos comuns subjacentes às toxicodependências, mas também podem ser potenciais agentes terapêuticos para pacientes que utilizam drogas de abuso (HIKIDA et al., 2001, 2003)

Estudos recentes investigaram o papel da transmissão colinérgica central na geração e propagação de descargas epiléticas (GARCIA-CAIRASCO et al., 1996; PERNOT et al., 2009; ZIMMERMAN et al., 2008). As crises podem resultar tanto da administração *in vivo* de agonistas muscarínicos quanto de inibidores da acetilcolinesterase (AChE) (FRIEDMAN; BEHRENS; HEINEMANN, 2007). Outros estudos propõem a administração sistêmica de inibidores da AChE como indutores de comportamentos depressivos, que são revertidos por antagonistas muscarínicos, levando à euforia (LUCKI, 1997).

### **3.6. Conclusão**

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que a administração aguda de baixa dose de pilocarpina associada aos produtos da pirólise do *crack* exerce efeito no sistema colinérgico após 10min e causa inibição na atividade da AChE, após 60 min de exposição as drogas, no hipocampo. Assim, sugere-se que o

desequilíbrio na homeostase colinérgica pode ser considerado um importante mecanismo fisiopatológico subjacente ao possível dano cerebral em pacientes que fazem uso do *crack*.

## REFERÊNCIAS

ANTONIAZZI, R. P. et al. Association between crack cocaine use and reduced salivary flow. **Brazilian Oral Research**, v. 31, p. 1–7, 2017.

APS, J. K. M.; MARTENS, L. C. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. **Forensic Science International**, v. 150, n. 2–3, p. 119–131, 2005.

ARAÚJO, M. S. et al. Crack cocaine inhalation induces cardiac atrophy and facilitates limbic-motor seizures in mice submitted to subconvulsive dose of pilocarpine. **International Journal of Advanced Scientific Research and Management**, v. 3, n. 5, p. 7–11, 2018.

AREAL, L. B. et al. Behavioural, biochemical and molecular changes induced by chronic crack-cocaine inhalation in mice: The role of dopaminergic and endocannabinoid systems in the prefrontal cortex. **Behavioural Brain Research**, v. 290, p. 8–16, 2015.

ARIAS-CARRIÓN, O. et al. Dopaminergic reward system : a short integrative review. **Internacional Archives od Medicine**, v. 3, n. 24, p. 1–6, 2010.

ARIAS-CARRION, Ó.; POPPEL, E. Dopamine, learning and reward-seeking behavior. **Acta Neurobiologia e Experimentalis**, v. 67, p. 481–488, 2007.

BAE, E.-K. et al. Neuropathologic and clinical features of human medial temporal lobe epilepsy. **Journal of clinical neurology (Seoul, Korea)**, v. 6, n. 2, p. 73–80, 2010.

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

BARAT, S. A.; ABDEL-RAHMAN, M. S. Cocaine and lidocaine in combination are synergistic convulsants. **Brain Research**, v. 742, p. 157–162, 1996.



BASTOS, F. I. et al. SMOKED CRACK COCAINE IN CONTEMPORARY BRAZIL: THE EMERGENCE AND SPREAD OF “OXI”. **Addiction**, v. 106, p. 1190–1193, 2011.

BASTOS, F. I. Crack no Brasil: uma emergência de saúde. **Caderno de Saúde Pública - RJ**, v. 28, n. 6, p. 1016–1017, 2012.

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

BEHNKE, M. et al. The Search for Congenital Malformations in Newborns With Fetal Cocaine Exposure. v. 107, n. 5, p. 1–6, 2001.

BEHNKE, M. et al. Cocaine exposure and developmental outcome from birth to 6 months. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 24, p. 283–295, 2002.

BEN, A. J. et al. Resumo Clínico - Crise Epilética e Epilepsia. **RegulaSUS**, p. 9, 2016.

BENOWITZ, N. Clinical Pharmacology and Toxicology of Cocaine. **Pharmacology & Toxicology**, v. 72, n. 6, p. 3–12, 1993.

BERRIDGE, C. W.; ARNSTEN, A. F. T. Neuroscience and Biobehavioral Reviews Psychostimulants and motivated behavior: Arousal and cognition. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 9, p. 1976–1984, 2013.

BETJEMANN, J. P.; LOWENSTEIN, D. H. Status epilepticus in adults. **The Lancet. Neurology**, v. 14, n. 6, p. 615–24, 1 jun. 2015.

BLOKLAND, A. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? **Brain Research Reviews**, v. 21, n. 3, p. 285–300, 1995.

BOGHDADI, M. S.; HENNING, R. J. Cocaine: Pathophysiology and clinical toxicology. **Heart & Lung: The Journal of Acute and Critical Care**, v. 26, n. 6, p. 466–483, 1997.

CALDAS, LUIZ QUERINO DE ARAÚJO. Intoxicações Exógenas Agudas Por Carbamatos, Organofosforados, Compostos Biperidílicos E Piretroides. **Centro de Controle de Intoxicações**, p. 1–43, 2000.

CAMARINI, R. et al. Anhydroecgonine methyl ester, a cocaine pyrolysis product, may contribute to cocaine behavioral sensitization. **Toxicology**, v. 376, p. 44–50, 2017.

CARMONA, G. et al. Attenuation of cocaine-induced locomotor activity by butyrylcholinesterase. **Exp Clin Psychopharmacol**, n. 6, p. 274–279, 1998.

CARPENTER, G. H. The Secretion, Components, and Properties of Saliva. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 4, n. 1, p. 267–276, 2013.

CASTRO, O. W. et al. Comparative neuroanatomical and temporal characterization of FluoroJade-positive neurodegeneration after status epilepticus induced by systemic and intrahippocampal pilocarpine in Wistar rats. **Brain Research**, v. 1374, p. 43–55, 2011.

CAULFIELD, M. P. Muscarinic Receptors-Characterization, coupling and function. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 58, n. 3, p. 319–379, 1993.

CEBRID. Livroto informativo sobre Drogas Psicotrópicas. p. 1–64, 2014.

CHAI, O. et al. Acetylcholinesterase activity in the cerebrospinal fluid of dogs with seizures. **The Veterinary Journal**, v. 198, n. 1, p. 292–294, 2013.

CHANG, T. R. et al. Cocaine use as an independent predictor of seizures after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Journal of Neurosurgery**, 2016.

CHARLES-NICOLAS, A.; LACOSTE, J.; BALLON, N. Le point sur l'addiction à la cocaïne et au crack. **Annales Medico-Psychologiques**, v. 167, n. 7, p. 504–507, 2009.

CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **Biochem. J.**, v. 260, p. 625–634, 1989.

CHAVES, T. V et al. Fissura por crack : comportamentos e estratégias de controle de usuários e ex- usuários. **Revista de Saúde Pública**, v. 45, n. 6, p. 1168–1175, 2011.

CHEN, R. et al. Abolished cocaine reward in mice with a cocaine-insensitive dopamine transporter. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - PNAS**, n. 24, 2006.

CHESNAIS, J. C. A violência no Brasil: causas e recomendações políticas para a sua prevenção. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 4, p. 53–69, 1999.

CICCARONE, D. Stimulant Abuse: Pharmacology, Cocaine, Methamphetamine, Treatment, Attempts at Pharmacotherapy. **Primary Care - Clinics in Office Practice**, v. 38, n. 1, p. 41–58, 2011.

CUNHA, P. J. et al. Neuropsychological impairments in crack cocaine-dependent inpatients: preliminary findings. **Revista brasileira de psiquiatria Sao Paulo Brazil 1999**, v. 26, n. 2, p. 103–106, 2004.

DACKIS, C. A.; O'BRIEN, C. P. Cocaine dependence: A disease of the brain's reward centers. **Journal of Substance Abuse Treatment**, v. 21, n. 3, p. 111–117, 2001.

DAGCI, T. et al. THE EFFECT OF OCTREOTIDE ON KAINATE-INDUCED WET DOG SHAKES AND SEIZURE ACTIVITY IN MALE AND FEMALE RATS. **International Journal of Neuroscience**, v. 112, n. 7, p. 829–839, 2002.

DALL, C. et al. Muscarinic receptor M4 positive allosteric modulators attenuate central effects of cocaine. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 176, n. February, p. 154–161, 2017.

DE ALMEIDA, P. D. V. et al. Saliva composition and functions: A comprehensive review. **Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 9, n. 3, p. 072–080, 2008.

DE FURTADO, M. A. et al. Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. **Epilepsia**, v. 43, n. SUPPL. 5, p. 37–39, 2002.

DEGENHARDT, L.; HALL, W. Extent of illicit drug use and dependence, and their contribution to the global burden of disease. **The Lancet**, v. 379, n. 9810, p. 55–70, 2012.

DHUNA, A.; PASCUAL-LEONE, A. Cocaine-Associated Status Epilepticus. **Epilepsy**, p. 165–169, 1990.

DREVER, B. D.; RIEDEL, G.; PLATT, B. The cholinergic system and hippocampal plasticity. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 2, p. 505–514, 2011.

DUALIBI, L. B.; RIBEIRO, M.; LARANJEIRA, R. Profile of cocaine and crack users in Brazil Perfil dos usuários de cocaína e crack no Brasil. **Caderno de Saude Pública - RJ**, v. 24, n. 4, p. 545–557, 2008.

EKHOLM, M. Predicting relative binding free energies as substrate and inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase. **Theo. chem.**, v. 572, p. 25–34, 2001.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.

FANDIÑO, A. S.; TOENNES, S. W.; KAUERT, G. F. Studies on hydrolytic and oxidative metabolic pathways of anhydroecgonine methyl ester (methylecgonidine) using microsomal preparations from rat organs. **Chemical Research in Toxicology**, v. 15, n. 12, p. 1543–1548, 2002.

FERNANDES, M. J. DA S. Epilepsia do lobo temporal: mecanismos e perspectivas. **Estudos Avançados**, v. 27, n. 77, p. 85–96, 2013.

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

FIORENTIN, T. R. et al. Simultaneous determination of cocaine/crack and its metabolites in oral fluid, urine and plasma by liquid chromatography-mass spectrometry and its application in drug users. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 86, n. April, p. 60–66, 2017.

FISHER, R. S. et al. Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 470–472, 2005.

FISHER, R. S. et al. A practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475–482, 2014.

FOWLER, J. S. et al. [ 11 ] Cocaine : PET studies of cocaine pharmacokinetics , dopamine transporter availability and dopamine transporter occupancy. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 28, p. 561–572, 2001.

FREITAS, R. M. et al. Acetylcholinesterase activities in hippocampus , frontal cortex and striatum of Wistar rats after pilocarpine-induced status epilepticus. **Neuroscience Letters**, v. 399, p. 76–78, 2006.

FRIEDMAN, A.; BEHRENS, C. J.; HEINEMANN, U. Pathophysiology of Chronic

Epilepsy Cholinergic Dysfunction in Temporal Lobe Epilepsy. v. 48, p. 126–130, 2007.

FURTADO, M. A. et al. Study of spontaneous recurrent seizures and morphological alterations after status epilepticus induced by intrahippocampal injection of pilocarpine. **Epilepsy and Behavior**, v. 20, n. 2, p. 257–266, 2011.

GARCIA-CAIRASCO, N. et al. Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. **Epilepsy Research**, v. 26, n. 1, p. 177–192, 1 dez. 1996.

GARCIA, R. **Efeitos neurodegenerativos da metilecnonidina e da cocaína em cultura celular primária de hipocampo. Dissertação para obtenção do grau de mestre.** [s.l: s.n.].

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

GARCIA, R. C. T. et al. M1 and M3 muscarinic receptors may play a role in the neurotoxicity of anhydroecgonine methyl ester, a cocaine pyrolysis product. **Scientific Reports**, v. 5, n. November, p. 17555, 2015.

GAY, G. et al. Cocaine: History, Epidemiology, Human Pharmacology, and Treatment. **Clinical Toxicology**, v. 8, n. 2, p. 149–178, 1975.

GOBIRA, P. H. et al. Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, inhibits cocaine-induced seizures in mice: Possible role of the mTOR pathway and reduction in glutamate release. **NeuroToxicology**, v. 50, p. 116–121, 2015.

GOLD, M.; MILLER, N.; SUMMERS, G. Cocaine Dependence: Alcohol and Other Drug Dependence and Withdrawal Characteristics. **Journal of Addictive Diseases**, v. 12, n. 1, p. 55–64, 1993.

GOLD, P. E. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 80, n. 3, p. 194–210, 2003.

GOLDSTEIN, P. J. et al. Gender differences in substance use disorders. **Addiction**, v. 37, n. 1, p. 241–52, 2014.

GOLDSTEIN, R. A.; DESLAURIERS, C.; BURDA, A. M. Cocaine: History, Social Implications, and Toxicity-A Review. **Disease-a-Month**, v. 55, n. 1, p. 6–38, 2009.

GOMES, E. F. et al. Anhydroecgonine Methyl Ester (AEME), a Product of Cocaine Pyrolysis, Impairs Spatial Working Memory and Induces Striatal Oxidative Stress in Rats. **Neurotoxicity Research**, 15 set. 2017.

GONÇALVES, J. R.; NAPPO, S. A. Factors that lead to the use of crack cocaine in combination with marijuana in Brazil: A qualitative study Health behavior, health promotion and society. **BMC Public Health**, v. 15, n. 1, 2015.

GOPAL DAS, M. Cocaine abuse in North America: A milestone in history. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 33, n. 4, p. 296–310, 1993.

GRASING, K. A threshold model for opposing actions of acetylcholine on reward behavior: Molecular mechanisms and implications for treatment of substance abuse disorders. **Behavioural Brain Research**, v. 312, p. 148–162, 2016.

GUIMARÃES, C. F. et al. Perfil do usuário de crack e fatores relacionados à criminalidade em unidade de internação para desintoxicação no Hospital Psiquiátrico São Pedro de Porto Alegre ( RS ). **Revista de Psiquiatria - RS**, v. 30, n. 2, p. 101–108, 2008.

GUIMARÃES, R. A. et al. Prevalence and Factors Associated With Criminal Behavior Among Illicit Drug Users: A Cross- Sectional Study Prevalence and Factors Associated With Criminal Behavior Among Illicit Drug Users: A Cross-Sectional Study. **Substance Use & Misuse ISSN:**, n. April, p. 3–7, 2017.

HALPERN, S. C. et al. Vulnerabilidades clínicas e sociais em usuários de crack de acordo com a situação de moradia: um estudo multicêntrico de seis capitais brasileiras. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 33, n. 6, 2017.

HAMILTON, S. E. et al. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 24, p. 13311–13316, 1997.

HAVAKUK, O.; REZKALLA, S. H.; KLONER, R. A. The Cardiovascular Effects of Cocaine. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 1, p. 101–113, 2017.

HIKIDA, T. et al. Increased sensitivity to cocaine by cholinergic cell ablation in nucleus accumbens. **PNAS**, v. 98, n. 23, p. 13351–13354, 2001.

HIKIDA, T. et al. Acetylcholine enhancement in the nucleus accumbens prevents addictive behaviors of cocaine and morphine. **PNAS**, v. 100, n. 10, p. 6169–6173, 2003.

HOFFMAN, R. S.; MORASCO, R.; GOLDFRANK, L. R. Administration of purified human plasma cholinesterase protects against cocaine toxicity in mice. **Toxicol. Clin. Toxicol.**, n. 34, p. 259–266, 1996.

HOLLAND, R. W. et al. Grand Mal Seizures Temporally Related to Cocaine Use: Clinical and Diagnostic Features. **Annals of Emergency Medicine**, v. 21, n. 7, p. 772–779, 1992.

HUMPHREY, S. P.; WILLIAMSON, R. T. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 85, n. 2, p. 162–169, 2001.

HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C.; NESTLER, E. J. Neural Mechanisms of Addiction: The Role of Reward-Related Learning and Memory. **The Annual Review of**



**Neuroscience**, v. 29, p. 565–98, 2006.

ITZHAZ, Y. Cocaine Kindling in Mice. **Molecular Neurobiology**, v. 11, p. 217–222, 1995.

JAHODOVA, A. et al. Frontal lobe epilepsy with atypical seizure semiology resembling shuddering attacks or wet dog shake seizures. **Epileptic Disorders**, v. 14, n. 1, p. 69–75, 2012.

JOHANSON, C.; FISCHMAN, M. W. The Pharmacology of Cocaine Related to Its Abuse. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 41, 1989.

JONES, R. T. Pharmacokinetics of cocaine: considerations when assessing cocaine use by urinalysis. **NIDA research monograph**, v. 175, p. 221–34, 1997.

KALIVAS, P. W.; DUFFY, P. D1 Receptors Modulate Tegmental Area Glutamate Transmission in the Ventral Tegmental Area. **The Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 7, p. 5379–5388, 1995.

KANDEL, E. et al. **Princípios de Neurociências**. 5 edição ed. [s.l.] Artmed, 2014.

KARCH, S. Cocaine: history, use, abuse. **JOURNAL OF THE ROYAL SOCIETY OF MEDICINE**, v. 92, n. August, p. 393–397, 1999.

KAUFMAN, E.; LAMSTER, I. B. The diagnostic applications of saliva - a review. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 13, n. 2, p. 197–212, 2002.

KODIROV, S. A. Addictive neurons. **Ther.Targets.Neurol.Dis.**, v. 4, n. 2376–0478 (Print), p. 1–20, 2017.

KONKOL, R. J. et al. Seizures Induced by the Cocaine Metabolite Benzoyllecgonine in Rats. **Epilepsia**, v. 33, n. 3, p. 420–427, 1992.

KOOB, G. F.; SANNA, P. P.; BLOOM, F. E. Neuroscience of Addiction Review. v. 21, p. 467–476, 1998.

KOPPEL, B. S. et al. Relationship between alcohol and seizures in a city hospital population. **Journal of Epilepsy**, v. 5, n. 1, p. 31–37, jan. 1992.

KOPPEL, B. S.; SAMKOFF, L.; DARAS, M. Relation of Cocaine Use to Seizures and Epilepsy. **Epilepsia**, v. 37, n. 9, p. 85–878, 1996.

KRAMER, L. D. et al. Cocaine-Related Seizures in Adults. **The American Journal of Drug and Alcohol Abuse**, v. 16, n. 3–4, p. 309–317, 1990.

KUTLUAY, E.; EDWARDS, J. C. Epilepsy and alcohol and substance abuse. In: LOUIS, E. K. ST.; FICKER, D. M.; O'BRIEN, T. J. (Eds.). . **Epilepsy and the Interictal State: Co-morbidities and Quality of Life**. 1. ed. Oxford: Wiley Blackwell, 2015. p. 1–273.

LASOÑ, W. Neurochemical and pharmacological aspects of cocaine-induced seizures. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 53, p. 57–60, 2001.

LEACH, J. P.; MOHANRAJ, R.; BORLAND, W. Alcohol and drugs in epilepsy: Pathophysiology , presentation , possibilities , and prevention. **Epilepsia**, v. 53, n. 4, p. 48–57, 2012.

LE GAL LA SALLE, G.; CAVALHEIRO, E. A. Stimulation of septal and amygdaloid nuclei: EEG and behavioral responses during early development of kindling with special reference to wet dog shakes. **Experimental Neurology**, v. 74, n. 3, p. 717–727, 1981.

LEITE, M. C.; ANDRADE, A. G. **Cocaína e crack: dos fundamentos ao tratamento**. Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul LTDA., 1999.

LENAD. Laranjeira [et al.], Ronaldo. **II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas**

- 2012. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas de Álcool e Outras Drogas (INPAD), UNIFESP, 2014.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios**. 2 edição ed. Rio de Janeiro: Artmed, 2010.

LESSE, H.; COLLINS, J. Effects of Cocaine on Propagation of Limbic Seizure Activity. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 11, p. 689–694, 1979.

LEVINE, S. R. et al. Cerebrovascular Complications of the Use of the “Crack” Form of Alkaloidal Cocaine. **The New England Journal of Medicine**, v. 323, p. 699–704, 1990.

LIEFFERINGE, J. VAN et al. Are vesicular neurotransmitter transporters potential treatment targets for temporal lobe epilepsy? **Cellular Neuroscience**, v. 7, n. August, p. 1–24, 2013.

LOCKRIDGE, O. Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. **Pharmacol Ther**, n. 47, p. 35–60, 1990.

LOPIM, G. M. et al. Relationship between seizure frequency and number of neuronal and non-neuronal cells in the hippocampus throughout the life of rats with epilepsy. **Brain Research**, v. 1634, p. 179–186, 2016.

LOWENSTEIN, D. H. et al. Acute neurologic and psychiatric complications associated with cocaine abuse. **The American Journal of Medicine**, v. 83, n. 5, p. 841–846, 1987.

LUCKI, I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. **Behavioural pharmacology**, v. 8, n. 6–7, p. 523–32, nov. 1997.

LYNCH, T. et al. Cocaine detoxification by human plasma butyrylcholinesterase.

**Toxicol Appl Pharmacol**, n. 145, p. 363–371, 1997.

MACEDO, D. S. et al. Cocaine-induced status epilepticus and death generate oxidative stress in prefrontal cortex and striatum of mice. **Neurochemistry International**, v. 56, p. 183–187, 2010.

MACÊDO, D. S. et al. Effect of anxiolytic, antidepressant, and antipsychotic drugs on cocaine-induced seizures and mortality. **Epilepsy and Behavior**, v. 5, n. 6, p. 852–856, 2004.

MAJEWSKA, M. D. Neurotoxicity and Neuropathology Associated with Cocaine Abuse. 1996.

MAJLESI, N. et al. Cocaine-associated seizures and incidence of status epilepticus. **The western journal of emergency medicine**, v. 11, n. 2, p. 157–160, 2010.

MARTIN, B. R.; LUE, L. P.; BONI, J. P. Pyrolysis and volatilization of cocaine. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 13, n. 3, p. 158–162, 1989.

MASLANSKI, J. A. et al. Assessment of the muscarinic receptor subtypes involved in pilocarpine-induced seizures in mice. **Neuroscience letters**, v. 168, p. 225–228, 1994.

MASSON, P. et al. Effects of mutations of active site residues and amino acids interacting with loop on substrate activation of butyrylcholinesterase. **Biochim. Biophys.**, n. 1544, p. 166–176, 2001.

MATEOS-MORENO, M. V. et al. Dental profile of a community of recovering drug addicts: Biomedical aspects. Retrospective cohort study. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 18, n. 4, 2013.

MATTER, C. et al. Cocaine and butyrylcholinesterase (BChE): Determination of enzymatic parameters. **Life Sci.**, n. 58, p. 257–261, 1996.

MATTES, C. E. et al. Therapeutic use of butyrylcholinesterase for cocaine intoxication. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, n. 145, p. 372–380, 1997.

MCGRATH, C.; CHAN, B. Oral health sensations associated with illicit drug abuse. **British Dental Journal**, v. 198, n. 3, p. 159–162, 2005.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 4S Suppl, p. 1007S–15S, 2000.

MELO, I. S. et al. Inhibition of sodium glucose cotransporters following status epilepticus induced by intrahippocampal pilocarpine affects neurodegeneration process in hippocampus. **Epilepsy and Behavior**, v. 61, p. 258–268, 2016.

MERIGIAN, K. S. et al. Adrenergic crisis from crack cocaine ingestion: Report of five cases. **Journal of Emergency Medicine**, v. 12, n. 4, p. 485–490, 1994.

MESE, H.; MATSUO, R. Salivary secretion, taste and hyposalivation. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 34, n. 10, p. 711–723, 2007.

MICHEAU, J.; MARIGHETTO, A. Acetylcholine and memory: A long, complex and chaotic but still living relationship. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 2, p. 424–429, 2011.

MORIMOTO, K.; FAHNESTOCK, M.; RACINE, R. J. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: Rewiring the brain. **Progress in Neurobiology**, v. 73, n. 1, p. 1–60, 2004.

MURPHY, E. H. et al. Effects of Cocaine-Induced Seizures During Pregnancy in the Rabbit. v. 62, n. 3, p. 597–604, 1997.

NEIMAN, J.; HAAPANIEMI, H. M.; HILLBOM, M. Neurological complications of drug abuse: pathophysiological mechanisms. **Eur J Neurol**, v. 7, n. 6, p. 595–606, 2000.

NESTLER, E. J. Is there a common molecular pathway for addiction ? **Neurobiology of addiction**, v. 8, n. 11, p. 1445–1449, 2005a.

NESTLER, E. J. The neurobiology of cocaine addiction. **Science & practice perspectives**, v. 3, n. 1, p. 4–10, 2005b.

NIDA. **The Science of Addiction**. [s.l: s.n.].

NNADI, C. U. et al. Neuropsychiatric effects of cocaine use disorders. **J Natl Med Assoc**, v. 97, n. 11, p. 1504–1515, 2005.

NOTO, A.; FORMIGONI, M. A política de Saúde pública no Brasil. **Ciência Hoje**, v. 31, n. 181, p. 45–47, 2002.

NUTT, D. J. et al. The dopamine theory of addiction: 40 years of highs and lows. **Nature Publishing Group**, v. 16, n. 5, p. 305–312, 2015.

OGUNYEMI, A. O. et al. Complex partial status epilepticus provoked by “crack” cocaiane. **American Neurological Association**, v. 26, n. 1, p. 785–786, 1989.

OLIVEIRA, M.; BURÍOLA, A. Gravidade das intoxicações por inseticidas inibidores das colinesterases no noroeste do estado do Paraná, rasil. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 30, n. 4, p. 648–655, 2009.

PASCUAL-LEONE, A. et al. Cocaine-induced seizures. n. March, 1990.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. [s.l: s.n.].

PERAILE, I. et al. Dopamine transporter down-regulation following repeated cocaine: Implications for 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced acute effects and long-term neurotoxicity in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 159, n. 1, p. 201–211, 2010.

PERNOT, F. et al. INTRAHIPPOCAMPAL CHOLINESTERASE INHIBITION INDUCES EPILEPTOGENESIS IN MICE WITHOUT EVIDENCE OF NEURODEGENERATIVE EVENTS. **NSC**, v. 162, n. 4, p. 1351–1365, 2009.

PICCIOTTO, M. R.; HIGLEY, M. J.; MINEUR, Y. S. Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. **Neuron**, v. 76, n. 1, p. 116–129, 2012.

PIERCE, R. C.; KUMARESAN, V. The mesolimbic dopamine system: The final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** 30, v. 30, p. 215–238, 2006.

POBLETE, R.; SUNG, G. Status Epilepticus and Beyond: A Clinical Review of Status Epilepticus and an Update on Current Management Strategies in Super-refractory Status Epilepticus. **The Korean Journal of Critical Care Medicine**, v. 32, n. 2, p. 89–105, 31 maio 2017.

PRADO, M. A. M.; MARCHOT, P.; SILMAN, I. Preface: Cholinergic Mechanisms. **Journal of Neurochemistry**, v. 142, n. 2011, p. 3–6, 2017.

PRIEL, M. R.; ALBUQUERQUE, E. X. Short-term effects of pilocarpine on rat hippocampal neurons in culture. **Epilepsia**, v. 43, n. SUPPL. 5, p. 40–46, 2002.

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation: I. after-discharge threshold. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 32, p. 269–279, 1972a.

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. motor seizure. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 32, p. 281–294, 1972b.

RIBEIRO, M.; LARANJEIRA, R. **O Tratamento do usuário de crack**. São Paulo: Casa Leitura Médica, 2010. v. 1

RITZ, M. C.; GEORGE, F. R. Cocaine-induced seizures and lethality appear to be associated with distinct central nervous system binding sites. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 264, n. 3, p. 1333–43, 1993.

RODRIGUES, M. C. A. et al. Correlation between shaking behaviors and seizure severity in five animal models of convulsive seizures. **Epilepsy and Behavior**, v. 6, n. 3, p. 328–336, 2005.

RONDOUIN, G.; LERNER-NATOLI, M.; HASHIZUME, A. Wet dog shakes in limbic versus generalized seizures. **Experimental Neurology**, v. 95, n. 2, p. 500–505, 1987.

SAJJA, R. K.; RAHMAN, S.; CUCULLO, L. Drugs of abuse and blood-brain barrier endothelial dysfunction: A focus on the role of oxidative stress. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 36, n. 3, p. 539–554, 2016.

SANT'ANNA, A.; AERTS, D.; LOPES, M. J. Homicídios entre adolescentes no Sul do Brasil: situações de vulnerabilidade segundo seus familiares. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 1, p. 120–129, 2005.

SANTOS, A. C.; MOSTARDEIRO, C. P. Padronização de metodologia analítica para avaliação da colinesterase plasmática. **Revista Contexto e Saúde**, v. 7–8, n. 14–15, p. 23–30, 2008.

SANTOS, D. S. et al. Pilocarpine-induced seizures produce alterations on choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities and deficit memory in rats. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 30, n. 4, p. 569–575, 2010.

SCHECHTER, M. D.; MEEHAN, S. M. Serotonergic mediation of cocaine seizures in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 51, n. 2–3, p. 313–316, 1995.

SCHEIDWEILER, K. B. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of



methylecgonidine, a crack cocaine pyrolyzate. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 307, n. 3, p. 1179–1187, 2003.

SCHIFANO, F.; CORKERY, J. Cocaine/crack cocaine consumption, treatment demand, seizures, related offences, prices, average purity levels and deaths in the UK (1990-2004). **Journal of Psychopharmacology**, v. 22, n. 1, p. 71–79, 2008.

SCHMIDT, H. D.; PIERCE, R. C. Cocaine-induced neuroadaptations in glutamate transmission: Potential therapeutic targets for craving and addiction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1187, p. 35–75, 2010.

SCHUELKE, G. U. Y. S. et al. Effect of Cocaine Metabolites on Behavior : Possible Neuroendocrine Mechanisms. **Brain Research Bulletin**, v. 39, n. 1, p. 43–48, 1996.

SCHWARTZ, B. G.; REZKALLA, S.; KLONER, R. A. Cardiovascular effects of cocaine. **Circulation**, v. 122, n. 24, p. 2558–2569, 2010.

SHARMA, A. K. et al. Mesial Temporal Lobe Epilepsy : Pathogenesis , Induced Rodent Models and Lesions. **Toxicologic Pathology**, v. 35, p. 984–999, 2007.

SHIP, J. Diagnosing, managing, and preventing salivary gland disorders. **Oral diseases**, v. 8, n. 2002, p. 77–89, 2002.

SHNEKER, B. F.; FOUNTAIN, N. B. Epilepsy. **Disease-a-Month**, v. 49, n. 7, p. 426–478, 2003.

SIEGAL, H. A. et al. Predictors of drug abuse treatment entry among crack-cocaine smokers. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 68, n. 2, p. 159–166, 2002.

SIEGEL, R. Cocaine smoking. **Journal Psychoactive Drugs**, v. 14, n. 4, p. 271–359, 1982.

SILVA, M. L. DE G. **Células-tronco neurais em modelos de epilepsia no rato**

**Wistar: ensaio pré-clínico.** [s.l: s.n.].

SILVA, A. S. DA; SOUZA, I. L. L. DE; SILVA, B. A. DA. Canais iônicos na epilepsia. **Medicina (Brazil)**, v. 47, n. 4, p. 370–376, 2014.

SLEPAK, V. Z.; SANDIFORD, S. L. Gβ5-RGS7 selectively inhibits muscarinic M3 receptor signaling via the interaction between the third intracellular loop of the receptor and the DEP domain of RGS7. **Biochemistry**, v. 31, n. 9, p. 1713–1723, 2013.

SMOLDERS, I. et al. NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis. **British journal of pharmacology**, v. 121, n. 6, p. 1171–1179, 1997.

SOFUOGLU, M.; MOONEY, M. Cholinergic functioning in stimulant addiction: Implications for medications development. **CNS Drugs**, v. 23, n. 11, p. 939–952, 2009.

SORDI, M. B. et al. Oral health assessment for users of marijuana and cocaine / crack substances. **Braz. Oral Res.**, v. 31, p. 1–11, 2017.

SORDO, L. et al. A systematic review of evidence on the association between cocaine use and seizures. **Drug & Alcohol Dependence**, v. 133, n. 3, p. 795–804, 2013.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase — new roles for an old actor. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. April, p. 294–302, 2001.

SPIVEY, W.; EUERLE, B. Neurologic Complications of Cocaine Abuse. **Emergency Medicine**, v. 19, n. December, p. 1422–1428, 1990.

STAFSTROM, C. E.; CARMANT, L. Seizures and epilepsy: An overview for neuroscientists. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 6, 2015.

STOLBERG, V. B. The Use of Coca : Prehistory , History , and Ethnography The Use of Coca : Prehistory , History , and Ethnography. **Journal of Ethnicity in Substance Abuse**, n. November 2012, p. 37–41, 2011.

SUN, H. et al. Predicted Michaelis-Menten complexes of cocaine-butylcholinesterase. **J. Biol. Chem.**, n. 276, p. 9330–9336, 2001.

TANEN, D. A.; GRAEME, K. A.; CURRY, S. C. Crack cocaine ingestion with prolonged toxicity requiring electrical pacing. **Journal of Toxicology - Clinical Toxicology**, v. 38, n. 6, p. 653–657, 2000.

TEODORAK, B. P. et al. Acute administration of fenproporex increased acetylcholinesterase activity in brain of young rats. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 87, n. 2, p. 1389–1395, 2015.

THOMSEN, M. Reduced Cocaine Self-Administration in Muscarinic M5 Acetylcholine Receptor-Deficient Mice. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 36, p. 8141–8149, 2005.

THOMSEN, M. et al. Attenuation of Cocaine ' s Reinforcing and Discriminative Stimulus Effects via Muscarinic M 1 Acetylcholine Receptor Stimulation □. **Journal of Pharmacology and Ex**, v. 332, n. 3, p. 959–969, 2010.

TILELLI, C. Q. et al. Different types of status epilepticus lead to different levels of brain damage in rats. **Epilepsy and Behavior**, v. 7, p. 401–410, 2005.

TOENNES, S. W.; FANDINO, A. S. Artifact production in the assay of anhydroecgonine methyl ester in serum using gas chromatography – mass spectrometry. v. 792, p. 345–351, 2003.

TOENNES, S. W.; FANDIÑO, A. S.; KAUERT, G. Gas chromatographic-mass spectrometric detection of anhydroecgonine methyl ester (methylecgonidine) in human serum as evidence of recent smoking of crack. **Journal of Chromatography**

**B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 735, n. 1, p. 127–132, 1999.

TOUGU, V. Acetylcholinesterase: Mechanism of catalysis and inhibition. **Curr. Med. Chem**, n. 1, p. 155–170, 2001.

TSENG, C.-C.; DERLET, R. W.; ALBERTSON, T. E. Acute Cocaine Toxicity: The Effect of Agents in Non-Seizure-Induced Death. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 46, p. 61–65, 1993.

TSENG, C.; DERLET, R. W.; ALBERTSON, T. E. Cocaine-Induced Respiratory Depression and Seizures are Synergistic Mechanisms of Cocaine-Induced Death in Rats. p. 486–493, 1992.

TURSKI, L. et al. Review: Cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: A novel experimental model of intractable epilepsy. **Synapse**, v. 3, n. 2, p. 154–171, 1989.

TURSKI, L. W.; CAVALHEIRO, E. Seizures Induced by Pilocarpine: Relevance in Epilepsy. **Current Aspects of the Neurosciences**, v. 4, p. 127–128, 1992.

TURSKI, W. A. et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: Behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behavioural Brain Research**, v. 9, n. 3, p. 315–335, 1983.

TURSKI, W. A. et al. Seizures produced by pilocarpine in mice: A behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. **Brain Research**, v. 321, n. 2, p. 237–253, 1984.

UNODC. World Drug Report 2015. **United Nations publication**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2015.

UNODC. UNODC ANNUAL REPORT Covering activities during 2016. **UNODC Annual Report**, 2016a.

UNODC. World Drug Report 2016. **Annual drug report**, v. chapter I, p. 35–42, 2016b.

UNODC. World Drug Report 2015. **UNODC Annual Report**, 2017a.

UNODC. World Drug Report 2017. **United Nations Office on Drugs and Crime**, p. 1–36, 2017b.

VAN DER ZEE, E. A.; LUITEN, P. G. M. Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: A review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. **Progress in Neurobiology**, v. 58, n. 5, p. 409–471, 1999.

VASCONCELOS, P. F. COCAÍNA História , Acções Neurobiológicas do Vício e Recaída e Perspectivas Terapêuticas. **Acta Medica Portuguesa**, v. 23, n. 2, p. 247–258, 2010.

VENTURA, A. L. M. et al. Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 37, n. 2, p. 74–80, 2010.

VILELA, L. R. et al. Cannabidiol Rescues Acute Hepatic Toxicity and Seizure Induced by Cocaine. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1–12, 2015.

VOLKOW, N. Cocaine. **National Institute On Drug Abuse**, p. 1–8, 2007.

VOLKOW, N. D. et al. Effects of route of administration on cocaine induced dopamine transporter blockade in the human brain. **Life sciences**, v. 67, n. 12, p. 1507–15, 11 ago. 2000.

VOLKOW, N.; FOWLER, J. Role of dopamine in drug reinforcement and addiction as revealed by imaging studies in humans. **European Neuropsychopharmacology**, v. 9, n. 4, p. 171, 1999.

VOLPE, J. Effect of cocaine use on the fetus. **The New England journal of medicine**, v. 327, p. 399–407, 1992.

WHITEHOUSE, P. J. Acetylcholine. **Encyclopedia of the Neurological Sciences**, v. 1, p. 19–21, 2014.

WHO. Neuroscience of Psychoactive Substance Use and Dependence. **World Health Organization**, p. 1–40, 2004.

WHO. **Basic Analytical Toxicology**. Disponível em: <[http://www.who.int/ipcs/publications/training\\_poisons/basic\\_analytical\\_tox/en/index9.html#.WWqKYAE9rBw.mendeley](http://www.who.int/ipcs/publications/training_poisons/basic_analytical_tox/en/index9.html#.WWqKYAE9rBw.mendeley)>. Acesso em: 15 jul. 2017.

WHO. **Epilepsia**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/es/>>. Acesso em: 20 mar. 2018.

WIDMAIER, E. P.; RAFF, H.; STRANG, K. T. **Fisiologia Humana - Os mecanismos das funções corporais**. [s.l: s.n.].

WILLIAMS, M. J.; ADINOFF, B. The role of acetylcholine in cocaine addiction. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 8, p. 1779–1797, 2008.

WISE, R. A. DOPAMINE , LEARNING AND MOTIVATION. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 6, p. 1–12, 2004.

WOLF, W. A.; KUHN, D. M. Cocaine and Serotonin Neurochemistry. **Neurochemistry International**, v. 18, n. 1, p. 33–38, 1991.

WOYCEICHOSKI, I. E. C. et al. Salivary buffer capacity, pH, and stimulated flow rate of crack cocaine users. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, v. 4, n. 3, p. 160–163, 2013.

YEE, J. et al. Muscarinic acetylcholine receptors in the nucleus accumbens core and

shell contribute to cocaine priming-induced reinstatement of drug seeking. **European Journal of Pharmacology**, v. 650, n. 2–3, p. 596–604, 2011.

YPSILANTIS, P. et al. A rat model of cigarette smoke abuse liability. **Comparative medicine**, v. 62, n. 5, p. 395–9, out. 2012.

ZAGNONI, P. G.; ALBANO, C. Psychostimulants and Epilepsy. **Epilepsia**, v. 43, n. 6, p. 28–31, 2002.

ZHANG, X. F. et al. Increased responsiveness of ventral tegmental area dopamine neurons to glutamate after repeated administration of cocaine or amphetamine is transient and selectively involves AMPA receptors. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 281, n. 2, p. 699–706, 1997.

ZHAO, F. et al. Neuropsychological deficits in temporal lobe epilepsy: A comprehensive review. **Annals of Indian Academy of Neurology**, v. 17, n. 4, 2014.

ZIMMERMAN, G. et al. Acetylcholine-induced seizure-like activity and modified cholinergic gene expression in chronically epileptic rats. v. 27, n. December 2007, p. 965–975, 2008.

ZIMMERMAN, G.; SOREQ, H. Termination and beyond: Acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. **Cell and Tissue Research**, v. 326, n. 2, p. 655–669, 2006.

ZIMMERMAN, J. L. Cocaine Intoxication. **Critical Care Clinics**, v. 28, n. 4, p. 517–526, 2012.

ZOUKHRI, D.; KUBLIN, C. L. Impaired neurotransmitter release from lacrimal and salivary gland nerves of a murine model of Sjögren's syndrome. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 42, n. 5, p. 925–932, 2001.

## **ANEXOS**



## ANEXO A

### Parecer de aprovação na CEUA 27/2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

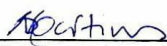


#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Efeitos da inalação dos produtos da pirólise do crack nos processo neuroplásticos e cardíacos em modelo experimental de epilepsia”, registrada com o n° 27/2016, sob a responsabilidade do pesquisador **Olagide Wagner de Castro**, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 22.07.2016.

Finalidade	( )Ensino (X)Pesquisa científica
Vigência da autorização	01.08.2016 a 01.08.2020
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico /Wistar
N° de animais	312
Peso/idade	240g /60 dias
Sexo	Machos e fêmeas
Origem/Local de manutenção	Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas / Biotério Setorial do Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas

Maceió, 28 de julho de 2016.

  
Prof.ª. Dr.ª. Silvana Ayres Martins  
Coordenadora CEUA/UFAL

Prof.ª. Dra. Silvana Ayres Martins  
Coordenadora da Comissão de  
Ética no uso de Animais  
SIAPE 1120858

## ANEXO B

### Parecer de aprovação na CEUA 33/2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

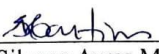


#### CERTIFICADO

Certificamos que o proposta intitulada “Avaliação biomecânica, histomorfométrica e molecular de tecidos em modelo experimental de crack”, registrada com o nº 33/2016, sob a responsabilidade de Olagide Wagner de Castro, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 01.07.2016.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	21.07.2016 a 21.07.2018
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico/Wistar
Nº de animais	32
Peso/idade	150-300g
Sexo	Macho
Origem/Local de manutenção	Biotério Central da UFAL/Biotério do Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS/UFAL)

Maceió, 07 de julho de 2016.

  
Prof. Dr. Silvana Ayres Martins  
Coordenadora CEUA/UFAL  
Prof. Dra. Silvana Ayres Martins  
Coordenadora da Comissão de  
Ética no uso de Animais  
SIAPE 1120858