

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A BAIXAS DOSES DE PILOCARPINA E AO *CRACK*
SOBRE SISTEMA DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

MILENNA MARIA JATOBÁ HASTEN REITER

Maceió

2023

MILENNA MARIA JATOBÁ HASTEN REITER

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A BAIXAS DOSES DE PILOCARPINA E AO *CRACK*
SOBRE SISTEMA DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES**

Monografia apresentada ao corpo docente do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

Orientador: Dr. Olagide Wagner de Castro

Coorientadora: Ma. Amanda Larissa Dias Pacheco

Maceió

2023

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

R379e Reiter, Milenna Maria Jatobá Hasten.
Efeitos da exposição a baixas doses de pilocarpina e ao *crack* sobre sistema de enzimas antioxidantes / Milenna Maria Jatobá Hasten Reiter. – Maceió, 2023. 58 f. : il.

Orientador: Olagide Wagner de Castro.

Co-orientadora: Amanda Larissa Dias Pacheco.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas: bacharelado) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 48-58.

1. Estresse oxidativo. 2. Drogas ilícitas. 3. Epilepsia. I. Título.

CDU: 616.853

Dedico esse trabalho à minha mãe, Luciana, que sempre me incentivou a buscar o caminho do conhecimento e à minha avó, Dona Noélia, que cuidou de mim em todos os momentos da minha vida.

Foi graças ao esforço e dedicação das duas que hoje concluo este ciclo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a mim por não ter desistido, mesmo diante das adversidades que surgiram ao longo do caminho. Eu encontrei sentido para continuar, enfrentando minhas fraquezas, medos e ansiedades. Agradeço a mim, principalmente pois sempre tive dificuldade em valorizar e celebrar minhas conquistas, muitas vezes diminuindo sua importância. Finalizo essa etapa com a mesma determinação que tive ao iniciar minha graduação e que sempre mantive em todos os aspectos da minha vida, ensinamento esse que aprendi com minha avó, Dona Noélia.

À minha mãe, Luciana, e à minha avó Dona Noélia. Sem vocês nada disso seria possível e eu não teria desenvolvido as qualidades que sempre destacam em mim. Obrigada por me ensinarem o verdadeiro valor das palavras amor, integridade, perseverança, coragem, respeito, resiliência, generosidade, determinação e humildade. Sou grata por toda a dedicação e cuidado que sempre me concederam ao longo da minha vida, inclusive durante a minha graduação.

Ao meu fiel escudeiro, Lucas, meu namorado, a personificação da palavra parceria. Amor, você foi a melhor coisa que aconteceu na minha vida. Obrigada por estar presente em todos os momentos felizes e, principalmente, nos mais tristes e conturbados, me dando suporte e acreditando em mim quando eu já não acreditava mais. Agradeço por priorizar minha felicidade e por sempre me acompanhar e incentivar a perseguir meus sonhos. Eu te amo infinitamente.

A minha família que é meu chão e apoio. Sempre encontrei consolo, amor e carinho em vocês. Agradeço aos meus tios Everaldo, Fernando, assim como, minhas tias Betinha, Edjane, meu avô Edmilson, minha mãe-sogra Andreia, minha mãe-dra Vívian, tia Joana, Ena e Danilo. Vocês são parte da minha trajetória e do meu sucesso. Agradeço também à minha família paterna: tia Nana, tia Kamila, Juciano, tia Kaká, Guilherme, tio Júnior, Tatá, Juju, Alícia, Mel e vó Liene. Esse trio de tias sempre fez de tudo pela minha felicidade, desde a organização de festas até deixar claro que estariam sempre disponíveis para ajudar no que eu precisasse. Agradeço também à família Elias, tia Maria, tia Cicinha, tia Izabel, tia Poly, tio Cicero (Cabeçinha), dona Geralda, sr. Elias e meus primos do coração Bia, Gui e Yasmim, por todo o amor e carinho. Agradeço aos amores da minha vida, minha irmã Marina e meu primo Luís Otávio. Vocês são a alegria da minha vida, tudo o que faço também é pensando no futuro de vocês. Aos meus amigos, Amanda, Bia Melo, Bia Paes, Caio, Joane, João Bruno, Daniel (Bananinha) e Thi, sou grata pela alegria, compreensão e apoio ao longo dessa jornada.

Finalmente, vocês não precisarão mais me ouvir falar sobre o TCC. Amo muito vocês! Minha vida é mais alegre por tê-los ao meu lado.

A todos os membros e ex-membros do LNFI, Bianca, Bruno, Cibelle, Edite, Nanda, Iasmim, Keylla, Letícia, Maisa, Rayssa e Yngrid. Obrigada pelo apoio, carinho, paciência, dedicação, companheirismo, e principalmente, pelos momentos de surtos em conjunto, pelos sábados e domingos compartilhados na UFAL fazendo experimentos. Vocês tornaram a caminhada mais leve e enriquecedora. Agradeço especialmente ao meu orientador Olagide, que sempre acreditou em mim, e à coorientadora Amanda, pelo conhecimento compartilhado e pela amizade. Sou eternamente grata pela oportunidade de aprender com vocês.

À banca examinadora, Prof. Igor e Profa. Juci, por fazerem parte desse momento importante na minha vida acadêmica, fico muito feliz por ter pessoas que admiro na finalização desta etapa.

Também agradeço à Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS), assim como a todos os membros do curso de Ciências Biológicas Bacharelado. Em especial, agradeço aos professores Gilberto Justino, Vanessa Kozlowiski, Renato Gaban, Graziela Cury e Denise, que foram essenciais para completar esse ciclo. Obrigada por estarem presentes e se preocuparem comigo e com a minha família. E agradeço à Melba por sempre me auxiliar com carinho e dedicação em todas as burocracias do curso.

Por fim, embora não estejam mais entre nós, quero agradecer ao meu pai, Élede Junior, e ao meu avô, sr. Élede. Pai, gostaria tanto que estivesse aqui para comemarmos essa conquista juntos. Obrigada pois, mesmo doente e no hospital, você fazia questão de ouvir meus treinos de apresentação de seminários, assim como, fazia questão de elogiar o meu esforço e estar presente nas cerimônias de entrega de certificados de olimpíadas ou encerramento de semestres no colégio. Grande parte desse trabalho foi feito pensando em você. Sr. Élede, ah, o que falar do senhor mais rabugento que já conheci? Voinho era sinônimo de cuidado, um cuidado silencioso, mas sempre presente. A influência de vocês continua a guiar minha vida e essa conquista é, em parte, devido ao legado que deixaram. Agradeço por tudo que fizeram por mim, e saibam que o amor e ensinamentos de vocês continuam vivos em mim.

RESUMO

O cérebro é altamente suscetível a danos oxidativos, isso se configura pelo elevado consumo de oxigênio contrastado com a capacidade antioxidante. Além disso, a autooxidação de neurotransmissores, a presença de altos níveis de teor de metais em transição e a abundância de ácidos graxos poliinsaturados nas membranas celulares contribuem para essa vulnerabilidade cerebral. Estudos já demonstraram que a exposição à cocaína/*crack* e a administração de pilocarpina (PILO) para indução de epilepsia em modelos animais *in vivo* resultam em um desequilíbrio do status redox, levando ao desenvolvimento de estresse oxidativo. O *crack*, forma potente e viciante da cocaína, tem sido associado a convulsões e ao aumento da atividade cerebral. Essas substâncias podem desencadear crises convulsivas isoladas ou persistentes, independente da frequência de uso droga, contribuindo para o desenvolvimento de crises convulsivas. Este estudo investigou os impactos da exposição a baixas doses de PILO e ao *crack* sobre o sistema de enzimas antioxidantes no tecido cerebral. Para isso, ratos *Wistar* foram submetidos à microinjeção de uma baixa dose de pilocarpina intrahipocampal [H-PILO (0,75 mg/ μ L)], seguida pela exposição aos produtos da pirólise do *crack* [CRK 400 mg]. Foram realizadas investigações através da mensuração da concentração de GSH e GSSG, dos níveis de compostos sulfidrílicos, bem como das atividades das enzimas superóxido dismutase e catalase. Observou-se uma tendência de aumento na concentração dos compostos sulfidrílicos e na enzima catalase nos grupos tratados com H-PILO, *crack* ou ambos subsequentes. Quanto à glutatona, houve uma tendência de aumento no grupo H-PILO, enquanto os grupos CRK e H-PILO+CRK apresentaram níveis mais próximos do grupo controle (CTRL). A forma oxidada da glutatona diminuiu em todos os grupos tratados, sendo significativamente menor no grupo H-PILO+CRK. Estes resultados podem sugerir que a exposição a baixas doses de pilocarpina e ao *crack* desencadeia uma resposta adaptativa do sistema antioxidante, ou seja, o organismo busca compensar os danos oxidativos causados por essas substâncias, aumentando a atividade das enzimas antioxidantes.

Palavras chaves: estresse oxidativo; drogas de abuso; epilepsia.

ABSTRACT

The brain is highly susceptible to oxidative damage, this is configured by the high oxygen consumption contrasted with the antioxidant capacity. In addition, the autoxidation of neurotransmitters, the presence of high levels of transition metal content and the abundance of polyunsaturated fats in cell membranes led to this brain vulnerability. Studies already irritate that exposure to cocaine/crack and administration of pilocarpine (PILO) for inducing epilepsy in animal models *in vivo* results in an imbalance of redox status, leading to the development of oxidative stress. , has been linked to seizures and increased brain activity. These substances can develop compulsive or persistent seizures, regardless of the frequency of drug use, excited for the development of seizures. This study investigated the effects of exposure to low doses of PILO and *crack* on the antioxidant enzyme system in brain tissue. For this, Wistar rats were subjected to microinjection of a low dose of intrahippocampal pilocarpine [H-PILO (0.75 mg/ μ L)], followed by exposure to crack pyrolysis products [CRK 400 mg]. They were studied by measuring the concentration of GSH and GSSG, the levels of sulfhydryl compounds, as well as the activities of the enzymes superoxide dismutase and catalase. There is a trend towards an increase in the concentration of sulfhydryl compounds and in the catalase enzyme in the groups treated with H-PILO, crack or both subsequently. As for glutathione, there was an increase trend in the H-PILO group, while the CRK and H-PILO+CRK groups showed levels closer to the control group (CTRL). The oxidized form of glutathione occurred in all treated groups, being significantly lower in the H-PILO+CRK group. These results suggest that exposure to low doses of pilocarpine and crack triggers an adaptive response of the antioxidant system, that is, the body seeks to compensate for the oxidative damage caused by these substances, increasing the activity of antioxidant enzymes.

Keywords: oxidative stress; drugs of abuse; epilepsy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - *Erythroxylon coca* e formas de apresentação da cocaína
- Figura 2** - Reação de pirólise da cocaína formando anidroecgonina metil éster (AEME)
- Figura 3** - Representação da ação da cocaína ao bloquear o do transportador de dopamina
- Figura 4** - Ciclo de síntese e degradação da acetilcolina (ACh)
- Figura 5** - Formação de radicais livres via cadeia transportadores de elétrons
- Figura 6** - Equação da catalase (CAT)
- Figura 7** - Ciclo catalítico da glutathione
- Figura 8** - Representação esquemática da linha do tempo dos experimentos realizados
- Figura 9** - Dosagem de compostos sulfidrílicos (SH)
- Figura 10**- Dosagem da atividade de catalase (CAT)
- Figura 11**- Dosagem da atividade da superóxido dismutase (SOD)
- Figura 12**- Dosagem do estado redox (razão GSH/GSSG)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABE Associação Brasileira de Epilepsia

AC: Ácido acético

Acetil-CoA: Acetil-coenzima A

ACh: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterase

AEME: Anidroecgonina metil éster

AOPPs: Produtos protéicos de oxidação avançada

AP-1: Proteína ativadora-1

ATP: Adenosina trifosfato

AVC: Acidente vascular cerebral

BIOCEN//UFAL: Biotério da Universidade Federal de Alagoas

BSA: Reagente albumina de soro bovino

CAT: Catalase

Ca²⁺: Íon cálcio

ChAT: Colina acetiltransferase

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CRE: Crises recorrentes e espontâneas

CSE: Status epilepticus convulsivo

CTRL: Grupo controle

Cu²⁺: Íon cobre

Cys: Aminoácido cisteína

DA: Dopamina

DAG: Diacilglicerol

DAT: Transportador de dopamina

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELT: Epilepsia de lobo temporal

EO: Estresse oxidativo

EPI: Equipamentos de proteção pessoal

ERN: Espécie reativa de nitrogênio

EROS: Espécie reativa de oxigênio

Fe²⁺: Íon ferroso

Fe³⁺: Íon férrico
GPx: Glutathione peroxidase
GR: Glutathione reductase
GSH: Glutathione reduzida
GSSG: Glutathione oxidada
H-PILO: Microinjeção intra-hipocámpal de pilocarpina
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
HO•: Radical hidroxila
ILAE: International League Against Epilepsy
IM: Intramuscular
IP: Intraperitoneal
IP₃: Inositol trifosfato
LNFI: Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa
mAChRs: Receptores muscarínicos metabotrópicos
Mg²⁺: Íon magnésio
MAO: Monoamina oxidase
MDA: Malondialdeído
nAChRs: Receptores nicotínicos ionotrópicos
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NCSE: Status epilepticus não convulsivo
NF-κB: Fator nuclear kappa B
NMDA: receptor N-metil-D-aspartato
NO•: Óxido nítrico
NO₂: Grupo nitro
O₂: Oxigênio
O₂•-: Ânion superóxido
ONOO: Peroxinitrito
PILO: Pilocarpina
RNA: Ácido ribonucleico
SC: Subcutânea
SE: *Status epilepticus*
SNC: Sistema nervoso central
SNP: Sistema nervoso periférico

SOD: Superóxido dismutase

EROs: Espécies reativas de oxigênio

Zn²⁺: Íon zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 <i>Crack</i>	20
2.1.1 Sistemas neuronais.....	21
2.2 Epilepsia.....	24
2.2.1 <i>Status epilepticus</i>	25
2.2.2 Modelos experimentais.....	25
2.2.3 Pilocarpina.....	26
2.3 Epilepsia e <i>crack</i>	27
2.3 Estresse Oxidativo.....	28
2.3.1 Espécies reativas de oxigênio (ERO).....	29
2.3.2 Espécies reativas de nitrogênio (ERN).....	30
2.4 Sistemas Antioxidantes.....	30
2.5 Estresse oxidativo e cocaína/ <i>crack</i>	33
2.6 Estresse oxidativo e epilepsia.....	34
3 OBJETIVOS	35
3.1 Geral.....	35
3.2 Específicos.....	35
4 METODOLOGIA	36
4.1 Animais.....	36
4.2 Delineamento Experimental.....	36
4.3 Cirurgia Estereotáxica.....	37
4.4 Microinjeção Intrahipocampal.....	37
4.5 Exposição aos produtos da pirólise do <i>crack</i>	37
4.6 Eutanásia.....	38
4.7 Ensaio de estresse oxidativo.....	38
4.7.1 Atividade da superóxido dismutase.....	38
4.7.2 Atividade de catalase.....	39
4.7.3 Conteúdo do grupo sulfidril.....	39
4.7.4 Quantificação do estado redox (razão GSH/GSSG).....	39
4.8 Análise estatística.....	39
5 RESULTADOS	41

6 DISCUSSÃO.....	44
7 CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

1. INTRODUÇÃO

O *crack* é um estimulante do sistema nervoso central (SNC) feito a partir da cocaína, que é extraída das folhas de *Erythroxylon coca* (BAHLS et al., 2002). Para obtenção do *crack*, é realizada uma mistura do cloridrato de cocaína com bicarbonato de sódio (RIBEIRO et al., 2010). Por ser insolúvel em água, o *crack* precisa ser fumado para ser consumido, dessa forma, quando aquecido, é produzido um metabólito denominado Anidroecgonina metil éster (AEME) que possui maior potencial neurotóxico em comparação à cocaína (HAIM et al., 1995; MELECA et al., 1997; GARCIA et al., 2012). Uma das particularidades do *crack* é a velocidade com que seus efeitos psicotrópicos são alcançados (HIRSCH et al., 2018). Em poucos segundos após o consumo, a cocaína presente na pedra se volatiliza durante a pirólise, atingindo rapidamente o sistema nervoso central (SNC) (JULIEN et al., 1995; GARCIA et al., 2012; HIRSCH et al., 2018). Esse efeito mais potente, rápido e de curta duração reforça o consumo compulsivo e repetido em períodos curtos de tempo e em doses cada vez maiores, levando à fissura e, conseqüentemente, ao desenvolvimento a dependência (HATSUKAMI et al., 1996; HIRSCH et al., 2018). Ao longo das últimas décadas, o uso de cocaína e de *crack* também vem sendo associado a ocorrência de episódios convulsivos, induzindo crises ou exacerbando uma desordem preexistente, visto que essas substâncias tendem a promover o aumento da atividade cerebral (KOPPEL et al., 1996; SORDO et al., 2013; CHANG et al., 2016; PACHECO et al., 2021). Com isso, crises isoladas ou autossustentadas provocada por cocaína/*crack* e seus produtos podem ser um insulto inicial na geração do fenômeno da epileptogênese, que pode levar ao desenvolvimento da epilepsia (FREITAS et al., 2006; ZAPARTE et al., 2015; ARAÚJO et al., 2018; PACHECO et al., 2021).

Epilepsia é descrita como uma desordem neurológica crônica, caracterizada por predisposição duradoura que ocasiona as crises epilépticas com conseqüências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais que decorrem deste distúrbio (FISHER et al., 2005). Existem diversas evidências que correlacionam a epilepsia, *status epilepticus* (SE) e convulsões com o estresse oxidativo, visto que a hiperexcitabilidade neuronal e o dano oxidativo causado por ação excessiva de radicais livres podem desempenhar um papel no início e na progressão da epilepsia (JARRETT et al., 2008; GERONZI et al., 2018). Bem como, estudos indicam que a excitação neuronal prolongada relacionada à convulsão resulta no aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) e reduzem o funcionamento de enzimas antioxidantes (MÉNDEZ-ARMENTA et al., 2014). Além disso, é possível sugerir

que estresse oxidativo pode desempenhar um papel fundamental na neurodegeneração induzida por convulsões (CASTRO et al., 2011). Dentre os modelos experimentais de epilepsia utilizados para investigar o estresse oxidativo, destaca-se o modelo de convulsão induzida por pilocarpina (PILO), substância essa, que é um agonista colinérgico e possui a capacidade de se ligar aos receptores muscarínicos M1, M3 e M5 (CURIA et al., 2008). Semelhante ao que acontece em modelos de epilepsia após indução de crises convulsivas e SE por PILO, grande parte dos efeitos adversos da cocaína/*crack* e seus metabólicos, como AEME, têm sido associada ao desbalanço oxidativo, pelo aumento na geração de radicais livres (EGILMEZ et al., 1995; HERMIDA-AMEIJEIRAS et al., 2004) e diminuição das moléculas antioxidantes (POON et al., 2007;; LÓPEZ-PEDRAJAS et al., 2015). Isso pode acarretar em dano mitocondrial, peroxidação lipídica, resultando em morte celular por apoptose ou necrose (DIETRICH et al., 2005; MACEDO et al., 2010; GOMES et al., 2012; LÓPEZ-PEDRAJAS et al., 2015; GARCIA et al., 2019; PAVLEK et al., 2020) A conexão entre derivados da coca e o estresse oxidativo são consistentes e podem ocasionar desde alterações nos biomarcadores de oxidação à neurodegeneração (POON et al., 2004; MACEDO et al., 2010).

O estresse oxidativo ocorre quando há desequilíbrio entre os níveis de radicais livres e compostos antioxidantes (JONES et al., 2008; BARBOSA et al., 2010). No decorrer do seu funcionamento regular, o organismo produz radicais livres como parte das reações bioquímicas necessárias para a vida (BARBOSA et al., 2010). No entanto, quando em excesso, esses radicais livres podem causar danos às estruturas celulares devido à sua alta reatividade e instabilidade (JONES et al., 2008). Para equilibrar e controlar os radicais livres, o organismo possui um sistema de defesa antioxidante, composto por enzimas e compostos não enzimáticos, que atuam inibindo ou limitando a ação dessas espécies reativas (MACHADO et al., 2009; PEARSON-SMITH et al., 2017). O cérebro é descrito como um dos tecidos mais vulneráveis ao estresse oxidativo devido ao alto consumo de oxigênio para o metabolismo aeróbico, ao elevado teor de íons de metais de transição (especialmente ferro), à auto-oxidação de neurotransmissores e à composição lipídica das membranas celulares, que são mais propensos à peroxidação lipídica (MARIANI et al., 2005). Além disso, essa maior tendência à geração de radicais livres é combinada com a atividade antioxidante reduzida (BELLISSIMO et al., 2001; FREITAS et al., 2005; FREITAS et al., 2007; CUNHA-OLIVEIRA et al., 2008; PEARSON-SMITH et al., 2017; COBLEY et al., 2018). O estresse oxidativo pode provocar danos em diversas estruturas moleculares, como

DNA, proteínas, lipídios, e estruturas celulares, especialmente as mitocôndrias, além de promover alterações hidroeletrólíticas (como o aumento dos níveis intracelulares de íon cálcio $[Ca^{2+}]$), peroxidação lipídica, alterações na neurotransmissão, aumento da hiperatividade do tecido neuronal, neuroinflamação e neurodegeneração (DIETRICH et al., 2005; DE FREITAS et al., 2010; LIU et al., 2010; MACEDO et al., 2010; PEARSON-SMITH et al., 2017; GARCIA et al., 2019). Considerando os diversos danos ocasionados pelo estresse oxidativo, este fenômeno pode contribuir para o desenvolvimento e a progressão da epilepsia, bem como na neurotoxicidade associada ao consumo de *crack*. Em conjunto, é razoável estabelecer uma associação entre *crack* e epilepsia, analisando o estresse oxidativo desencadeado por essas substâncias no cérebro. No entanto, a literatura científica sobre estas informações correlacionadas ainda é escassa. Entretanto, em estudos realizados pelo grupo ainda não publicados, evidenciaram que animais submetidos à dose baixa de PILO seguida de exposição única ao *crack*, foram capazes de aumentar a frequência e duração de crises, como também, reduzir o limiar na geração dessas em comparação aos controles, sugerindo que a inalação de *crack* torna o tecido nervoso mais suscetível às crises epiléticas, independente da frequência. Dessa forma, a hipótese desse estudo é que a administração de baixas doses de PILO, seguida da exposição aguda ao *crack*, pode induzir um desequilíbrio oxidativo, diminuindo a eficácia do sistema antioxidante e promovendo o dano neuronal.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Crack

O *crack* é uma substância psicotrópica estimulante derivada da cocaína, que é extraída das folhas de *Erythroxylon coca* (Fig. 1A) (BAHLS et al., 2002). O mesmo, é obtido a partir do cloridrato de cocaína (Fig. 1B), que é aquecida diretamente com bicarbonato de sódio, amônia, entre outros aditivos, posteriormente a mistura é resfriada resultando em cristais de formatos irregulares chamadas de “pedras”(CFM, 2007; RIBEIRO et al., 2010; GARCIA et al., 2012). Por ser insolúvel em água, o *crack* precisa ser fumado para ser consumido, dessa forma, quando aquecido provoca precipitação de cristais de cocaína, gerando um ruído que deu origem ao seu nome “*crack*”, que em inglês, que significa “estalos” (HAIM, 1995 et al.; MELECA et al., 1997).

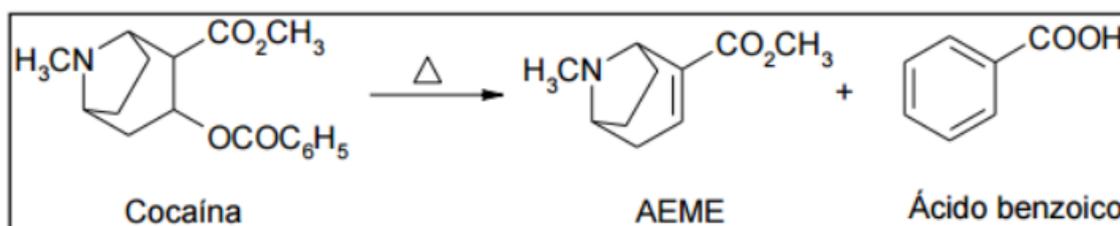
Figura 1- *Erythroxylon coca* e formas de apresentação da cocaína



A) Folhas da planta *Erythroxylon coca*; B) Cloridrato de cocaína; C) Pedra de *crack*.
Fontes: <http://wikipedia.org/wiki/erythroxylumcoca>; <http://healthnews.pt>; <http://wikipedia.org/wiki/crack>, respectivamente.

Durante o processo de queima do *crack* ocorre a formação da AEME, que é um composto resultante da pirólise (Fig. 2), portanto, ao inalar o *crack*, o usuário se expõe não só aos efeitos da cocaína, mas também está sujeito aos efeitos da AEME (GARCIA et al., 2012; GOMES et al., 2017). Essa molécula apresenta um potencial neurotóxico superior ao da cocaína, que parece contribuir para o agravamento da dependência do usuário (GARCIA et al., 2012; GOMES et al., 2017).

Figura 2 - Reação de pirólise da cocaína formando anidroeconina metil éster (AEME)



Fonte: Retirado de Garcia et al. (2009)

Uma das particularidades do *crack* é a velocidade com que seus efeitos psicotrópicos são alcançados (HIRSCH et al., 2018). Em poucos segundos após o consumo, a cocaína presente na pedra se volatiliza durante a pirólise, atingindo rapidamente o SNC (JULIEN et al., 1995; GARCIA et al., 2012; HIRSCH et al., 2018). Dessa forma, o *crack* produz efeitos como: bem-estar, euforia, aumento do estado de alerta e da concentração, diminuição do apetite e fadiga, hiperatividade motora, verbal e ideativa, além do aumento da libido (CEBRID, 2014). No entanto, essa ação mais potente, rápida e de curta duração (em torno de 5 a 30 minutos) reforça o consumo compulsivo e repetido em períodos curtos de tempo e em doses cada vez maiores, levando à fissura e, conseqüentemente, ao desenvolvimento a dependência (JULIEN et al., 1995; HATSUKAMI et al., 1996; HIRSCH et al., 2018).

Além disso, o uso de cocaína/*crack* tem sido relacionada com problemas cardiovasculares, incluindo hipertensão, arritmia, vasoconstrição coronariana e isquemia miocárdica, bem como AVC, hemorragia cerebral, perda transitória da consciência, desmaios, desordens psiquiátricas, incluindo depressão e ansiedade e a ocorrência de episódios convulsivos, podendo ser um insulto inicial na geração da epilepsia (LOWENSTEIN et al., 1987; KRAMER et al., 1990; TANEN et al., 2000; DUAİLÍBI et al., 2008; PERAILE et al., 2010; SCHWARTZ, 2010, GARCIA et al., 2012; ARAÚJO et al., 2018; PACHECO et al., 2021).

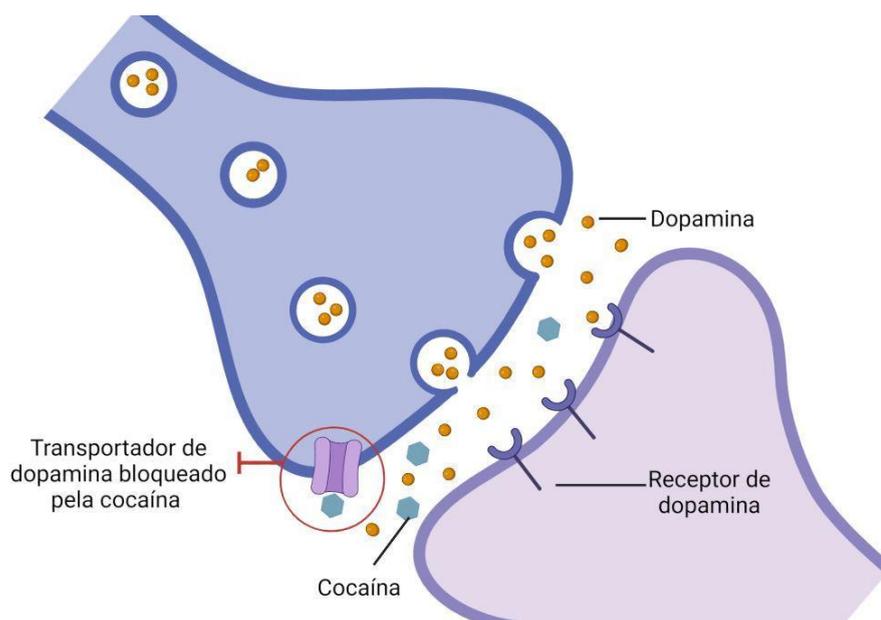
Ademais, o *crack* é um exemplo de droga sintética que possui custo inferior ao das demais substâncias psicotrópicas já conhecidas, ou seja, tomando em conjunto essas características, a utilização de *crack* se espalhou mundialmente acometendo diferentes classes sociais (KESSLER et al., 2008). Atualmente, o consumo de drogas psicotrópicas está em ascensão mundialmente, tornando-se um grave problema de saúde pública. Estima-se que cerca de 21,5 milhões de pessoas usaram cocaína pelo menos uma vez no ano de 2020, representando 0,4% da população global de 15 a 64 anos. No Brasil, a causa mais frequentes de mortes diretamente associadas ao consumo de drogas está relacionada ao uso da cocaína/*crack*. Além disso, estima-se que o uso regular de *crack* é mais prevalente entre grupos vulneráveis e marginalizados nas regiões metropolitanas do país (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, 2022).

2.1.1. Sistemas neuronais

Vários sistemas neuronais estão envolvidos na dependência às drogas, a maioria das substâncias psicoativas atuam no circuito de recompensa pela via dopaminérgica (HYMAN et al., 2006; WILLIAMS et al., 2008; WIDMAIER et al., 2012; NIDA et al., 2020). É

estabelecido que o mecanismo de ação da cocaína/*crack* no cérebro se dá pelo bloqueio da recaptação de dopamina (DA) através da inibição do transportador de dopamina (DAT), resultando no acúmulo de DA na fenda sináptica (Fig.3) (BAIK et al., 2013). Porém, tem-se verificado um maior interesse na transmissão colinérgica na fisiopatologia do abuso de drogas (WILLIAMS et al., 2008).

Figura 3- Representação da ação da cocaína ao bloquear o do transportador de dopamina (DAT)



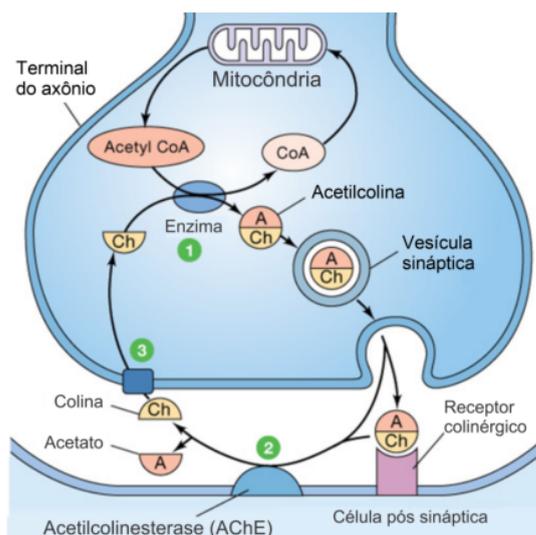
Fonte: Adaptado pela autora de BAIK et al., 2013

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor envolvido em sinapses no sistema nervoso central, no sistema nervoso periférico (SNP) e na junção neuromuscular (VENTURA et al., 2010). Este neurotransmissor está envolvido na regulação do sono e em processos cognitivos (memória e aprendizado), já as alterações nesse sistema de neurotransmissão estão relacionadas com distúrbios neurológicos e neuropsicóticos, tais como doença de Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia e epilepsia (BLOKLAND et al., 1995; GOLD et al., 2003; SARTER et al., 2006; VENTURA et al., 2010; DREVER, 2011 et al.; MICHEAU et al., 2011).

Os neurônios colinérgicos inervam quase todas as regiões cerebrais e possuem a capacidade de sintetizar, liberar e metabolizar a ACh (WIDMAIER et al., 2012; PRADO et al., 2017). A ACh é sintetizada a partir da acetilcoenzima A e da colina, sendo catalisada pela colina acetiltransferase (ChAT) (ZIMMERMAN et al., 2006). A transmissão sináptica ocorre quando a ACh é liberada na fenda e interage com receptores muscarínicos

metabotrópicos (mAChRs) e nicotínicos ionotrópicos (nAChRs), em seguida, a ACh disponível é hidrolisada em acetato e colina pela enzima acetilcolinesterase (AChE), estes componentes, então, são reaproveitados para a nova síntese de ACh (Fig.4) (ZIMMERMAN et al., 2006).

Figura 4 - Ciclo de síntese e degradação da acetilcolina (ACh)



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

Tem-se observado um maior interesse na transmissão colinérgica na fisiopatologia do abuso de drogas, já que substâncias anticolinesterásicas inibem a ação AChE e impedem a hidrólise da ACh, gerando um acúmulo dessa na fenda sináptica, o que acarreta uma hiperestimulação colinérgica (SANTOS et al., 2008). Além disso, Acevedo-Rodriguez et al., (2014), demonstrou que agindo via inibição de nAChRs, a cocaína aumenta a proporção de liberação de DA fásica para tônica e, portanto, aumenta potencialmente sua capacidade de reforçar comportamentos. Estudos evidenciam que a cocaína possui afinidade direta por mAChRs (SHARKEY et al., 1988; HEARD et al., 2008; WILLIAMS et al., 2008).

É sugerido na literatura que o *crack* e AEME modulam transmissão colinérgica, visto que foram observadas implicações neurotóxicas cardíacas e cerebrais relacionadas à ACh após a administração dessas substâncias (GARCIA et al., 2012; GOMES et al., 2017). Além disso, em estudo ainda não publicado pelo grupo, foi demonstrado que administração aguda de baixa dose de PILO (0,75 mg/ μ L) associada aos produtos da pirólise do *crack* ocasionou a

inibição na atividade da AChE após 60 min de exposição às drogas, na região hipocampal. Assim, sugere-se que o desequilíbrio na homeostase colinérgica pode ser considerado um importante mecanismo fisiopatológico do *crack* e que essa interação com os receptores de ACh podem desempenhar um papel nos episódios convulsivos observados após o uso da cocaína/*crack*.

2.2 Epilepsia

Epilepsia é descrita como uma desordem neurológica caracterizada por predisposição duradoura que ocasiona as crises epiléticas com consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais que decorrem deste distúrbio (FISHER et al., 2005). De acordo com International League Against Epilepsy (ILAE), as crises epiléticas constituem ocorrências transitórias de sinais e/ ou sintomas a partir da atividade neuronal anormal, excessiva e síncrona das células cerebrais, na qual, a sintomatologia pode ser definida por eventos motores, sensitivos e/ou sensoriais, autônomos ou psíquicos involuntários, com ou sem perda de consciência, percebidos pelo paciente ou por um observador presente (THURMAN et al., 2011).

Algumas condições podem levar ao surgimento de crises que são geradas por mecanismos que alteram o sistema neuronal de inibição ou promovam a excitação cerebral (FISHER et al., 2005). As crises podem ser: 1- Não provocadas (espontâneas) que ocorrem a partir de um transtorno neurológico; 2- Provocadas sendo desencadeadas por infecções, AVC, hemorragia intracerebral, drogas ou condições fisiológicas excessivas (SHNEKER, et al. 2003; FISHER et al., 2005; FISHER et al., 2014; PAVLEK et al.; 2020). Sendo assim, a Associação Brasileira de Epilepsia (ABE) em 2014, estabeleceu três critérios de diagnóstico e de diferenciação acerca da epilepsia: 1- Pelo menos duas ou mais crises não provocadas (ou reflexas) em um intervalo maior que 24 horas; 2- Crise não provocada (ou reflexa) com possibilidade de uma nova crise estimada em pelo menos 60%, após duas crises não provocadas em dez anos; 3- Possuir o diagnóstico de uma síndrome epilética.

A epilepsia é considerada um dos transtornos neurológicos mais comuns, estima-se que cerca de 50 milhões de pessoas são afetadas (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE - OPAS, 2019), sendo a epilepsia de lobo temporal (ELT) a forma mais recorrente (MENEGUELLO et al., 2006). A ELT é definida como uma epilepsia focal (crises focalizam em um lado do cérebro) e tem origem nas estruturas mesiais do lobo temporal, como o hipocampo, complexo amigdalóide e adjacências (BERTRAM et al., 1997). Essa é

caracterizada por um estado de hiperexcitabilidade neuronal crônica e estado de hipersincronia (SHARMA et al., 2007; BAE et al., 2010; LIEFFERINGE et al., 2013; ZHAO et al., 2014; MELO et al., 2016).

A ELT pode apresentar crises focais simples ou complexas, quando há ou não comprometimento da consciência, respectivamente (ENGEL et al., 2006). Geralmente, é desencadeada por insulto precipitante inicial, como convulsões febris, lesões, encefalite, trauma cranioencefálico e SE (BETJEMANN et al., 2015; LIEFFERINGE et al., 2013; POBLETE et al., 2017). O insulto é seguido de um período de latência que pode durar entre 5 a 10 anos em humanos, ou seja, os pacientes mantêm-se livres de sintomas e complicações, sendo estabelecido no cérebro o SE, chamado de epileptogênese, levando à ocorrência de crises recorrentes e espontâneas (CRE) e ao diagnóstico de epilepsia crônica (ENGEL et al., 1993).

2.2.1 Status epilepticus (SE)

SE é definido como uma crise com duração maior ou igual a 5 minutos ou duas ou mais crises discretas sem recuperação entre elas, autosustentáveis e com perda de consciência (ILAE, 1964; LOWENSTEIN et al., 1998; QUINTERO et al., 2011). O SE é categorizado como convulsivo (CSE) ou não convulsivo (NCSE) (CHERIAN, 2009; MENON, 2013). CSE ocorrem contrações musculares durante a crise, como clônicas, tônicas, tônico-clônicas e mioclônicas, sendo essa a forma mais grave e comum, enquanto na NCSE, não ocorrem convulsões físicas, mas sim, apatia e anormalidades motoras oculares, contínuas ou quase contínuas com duração aproximada de 30 min e possíveis a resposta anticonvulsivantes (CHERIAN et al., 2009; MENON et al., 2013).

2.2.2 Modelos Experimentais

Para o estudo da epilepsia, são empregados modelos *in vivo*, nos quais animais são submetidos a protocolos de indução de crises epiléticas por meio de agentes químicos, físicos, elétricos e genéticos, e modelos *in vitro* quando é utilizado culturas de células ou fatias de tecidos são empregados (LOSCHER et al., 2011). Os modelos animais, principalmente ratos e camundongos, são amplamente utilizados para o desenvolvimento de ELT. Para isso, é necessário induzir uma injúria inicial, chamada de insulto epileptogênico, até a ocorrência de crises recorrentes e espontâneas, algumas substâncias químicas como pilocarpina (PILO) e ácido acético (AC) ou a estimulação elétrica de estruturas límbicas

desencadeiam o SE, reproduzindo, assim características histopatológicas descritas na ELT em humanos (KANDRATAVICIUS, 2014).

2.2.3 Pilocarpina (PILO)

A PILO é um fármaco extraído das folhas da espécie *Pilocarpus microphyllus*, conhecida comumente como jaborandi (PINHEIRO et al., 2002). Essa substância é um agonista colinérgico, amplamente empregado no controle da pressão intraocular elevada (ALLERGAN, 2015). Além dessa função farmacológica, a PILO também é utilizada em protocolos de indução de epilepsia em modelos animais *in vivo*, pois se liga a receptores muscarínicos M1, M3 e M5, sendo um dos modelos mais usados (CURIA et al., 2008). É importante ressaltar que as alterações induzidas pela PILO são dependentes da dose administrada (TURSKI et al., 1983; LIU et al., 1994).

Resumidamente, quando a PILO interage com os receptores, ocorre a ativação de segundos-mensageiros, como diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃), que elevam a concentração do Ca²⁺ intracelular e diminuem a condutância do potássio, resultando em uma despolarização sustentada (VENTURA et al., 2010; DREVER et al., 2011). Secundariamente, ocorre a ativação da via glutamatérgica pelo receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), induzindo uma elevação dos níveis de glutamato no hipocampo que contribuem para mudanças nas propriedades eletrofisiológicas neuronais e em circuitos inibitórios (TURSKI et al., 1989; CURIA et al., 2008). Sugere-se que o desencadeamento das crises é de origem colinérgica, enquanto a manutenção parece ser glutamatérgica (TURSKI et al., 1983; TURSKI et al., 1984; SMOLDERS et al., 1997; MARINO et al., 1998; BEHNKE et al., 2001; PRIEL et al., 2002; KOZHEMYAKIN et al., 2010).

Estudos anteriores, desenvolveram um modelo de SE induzido por microinjeção intra-hipocampal de pilocarpina (H-PILO) pelo Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo, comandado pelo Prof. Dr. Norberto Garcia-Cairasco, em conjunto com o nosso grupo de pesquisa. Este modelo reproduziu aspectos comportamentais, eletroencefalográficos e morfológicos agudos e crônicos da ELT, além de apresentar um perfil de baixa mortalidade animal e redução dos efeitos periféricos da PILO, em relação ao modelo sistêmico (DE FURTADO et al., 2002; FURTADO et al., 2011; MELO et al., 2016)

2.3 Epilepsia e *crack*

Nas últimas décadas, a cocaína e o *crack* têm sido associados a ocorrência de episódios convulsivos, induzindo crises ou exacerbando uma desordem preexistente (MACEDO et al., 2010; SORDO et al., 2013; CHANG et al., 2016; PACHECO et al., 2021). As crises convulsivas e SE têm sido descritas como uma das principais causas de morte e morbidades entre os usuários de cocaína (TSENG et al., 1993; PAVLEK et al., 2020). De acordo com Pascual-Leone et al., (1990), em um estudo sobre as complicações relacionadas à intoxicação por cocaína/*crack* revelou que dos 474 pacientes atendidos no Hennepin County Medical Center com crise convulsiva, 403 não possuíam histórico de convulsões. Esse estudo mostrou que a maioria dos pacientes teve convulsões únicas e generalizadas, sendo possível observar crises convulsivas tanto em casos de overdose acidental, quanto no uso recreativo de doses relativamente baixas de cocaína, ou seja, a ocorrência de convulsões por cocaína não está restrita a determinados usuários (KRAMER et al., 1990; WINBERY et al., 1998).

Além disso, em outro estudo realizado com usuários de cocaína revelou que aproximadamente 10% dos indivíduos tiveram pelo menos uma convulsão, enquanto 3% apresentaram SE (CHOY-KWONG et al., 1989). Além disso, as lesões cerebrais resultantes de eventos cerebrovasculares associados ao uso de cocaína, também podem desencadear epilepsia (ZAGNONI et al., 2002). Em um estudo de autópsia, foi observado que indivíduos que faleceram em decorrência do uso de cocaína haviam apresentado convulsões antes do óbito (PASCUAL-LEONE et al., 1990). Em experimentos com modelos animais, a administração aguda de cocaína em doses elevadas [126 mg/kg; intraperitoneal (IP)] resultou em convulsões e morte em ratos e camundongos (HOFFMAN et al., 2004). Outro estudo, utilizando doses menores (75 mg/kg; IP), induziu convulsões clônicas acompanhadas por distúrbios locomotores súbitos. Após o desenvolvimento da convulsão, os ratos se recuperaram e mostraram comportamento normal 30 min após a injeção (GASIOR et al., 1999). No entanto, quando uma dose maior (90 mg/kg; IP) foi administrada, alguns animais apresentaram SE e outros morreram após as convulsões (MACEDO et al., 2010).

Apesar dos estudos clínicos e experimentais sobre a relação entre o uso de cocaína/*crack* e convulsões, o mecanismo exato ainda não está claro. Acredita-se que a propensão às convulsões esteja relacionada a uma interação complexa entre diferentes sistemas receptores, o que pode explicar a variabilidade dos efeitos da cocaína em humanos (WINBERY et al., 1998; DORANDEU et al., 2017). Além disso, cocaína e o *crack* são

frequentemente usados em combinação com outras drogas, o que pode aumentar o risco de início de convulsão (ZAGNONI et al., 2002)

2.3 Estresse Oxidativo (EO)

No decorrer dos processos metabólicos, o organismo produz radicais livres que atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas diversas reações bioquímicas fundamentais à vida, como por exemplo, na cadeia transportadora de elétrons durante a respiração celular para geração de adenosina trifosfato (ATP) (BARBOSA et al., 2010). Entretanto, o excesso dos radicais livres pode danificar várias estruturas celulares, uma vez que são moléculas altamente instáveis e reativas devido à presença de um elétron desemparelhado (JONES et al., 2008). Os radicais livres são balanceados e controlados pelo sistema de defesa antioxidante, sendo esse sistema composto por uma parte enzimática e outra não enzimática, com função de inibir ou limitar os níveis de espécies reativas, controlando assim, as ações danosas (BARBOSA et al., 2010). Contudo, o desbalanço entre os níveis de radicais livres e o de compostos antioxidantes, que são necessários para neutralizá-los, ocasionam o EO (MACHADO et al., 2009; PEARSON-SMITH et al., 2017).

A instauração do EO ocorre pela produção intensa de radicais livres ou em detrimento da velocidade de inibição destes (JONES et al., 2008; BARBOSA et al., 2010). O desbalanço oxidativo é preocupante, pois, é capaz de agravar quadros clínicos e dificultar o tratamento de patologias, como diabetes, aterosclerose, câncer e obesidade (NODA et al., 2001; GREEN et al., 2004; BARBOSA et al., 2010; REUTER et al., 2010). No cérebro, pode infligir danos em diversas estruturas moleculares como DNA, proteínas e lipídios, e celulares, como nas mitocôndrias, podendo ocasionar alterações na neurotransmissão, aumento da hiperatividade do tecido neuronal, neuroinflamação, neurodegeneração e neurotoxicidade (MARKESBERY et al., 1997; POON, 2004; DE FREITAS et al., 2010; LIU et al., 2010; PEARSON-SMITH et al., 2017).

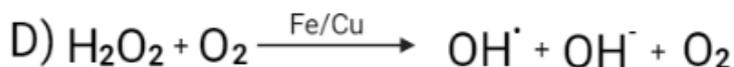
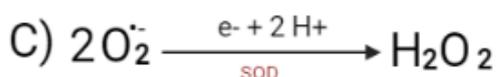
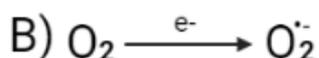
O EO também tem sido associado ao desenvolvimento de outras condições neuropatológicas como por exemplo, doença de Alzheimer, Parkinson, Huntington, isquemia, esclerose múltipla e esclerose lateral amiotrófica, epilepsia e, mais recentemente, com a dependência química a cocaína (MARKESBERY et al., 1997; FREITAS et al., 2009; LÓPEZ-PEDRAJAS et al., 2015; UDDIN et al., 2019).

2.3.1 Espécies reativas de oxigênio (ERO)

As ERO são denominadas radicais livres por apresentarem um elétron não pareado. Sua produção ocorre principalmente nas mitocôndrias a partir da cadeia transportadora de elétrons, mas podem ser geradas também nas membranas celulares e no citoplasma a partir do escape de oxigênio (O₂) (KOURY et al., 2003; GREEN et al., 2004). Na mitocôndria, O₂ sofre redução tetravalente, recebendo quatro elétrons oxidados do citocromo C, resultando na formação de duas moléculas de água (Fig. 5A) (FERREIRA et al., 1997; BARBOSA et al., 2010).

A enzima que catalisa essa reação é chamada de citocromo oxidase, essa ação enzimática controla a geração excessiva de radicais livres nas mitocôndrias, no entanto, cerca de 2% a 5% do O₂ metabolizado é realocado para outra via metabólica, reduzido de maneira univalente, gerando os radicais livres, como ânion superóxido (O₂•⁻) (Fig. 5B); peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Fig. 5C) e radical hidroxila (HO•) (Fig. 5D; 5E) (FERREIRA et al., 1997; KOURY et al., 2003, SCHNEIDER et al., 2004).

Figura 5- Formação de radicais livres via cadeia transportadores de elétrons



A- Equação da redução tetravalente do oxigênio; B- Equação da redução univalente do oxigênio para formação do ânion superóxido; C- Equação de dismutação do ânion superóxido para formação do peróxido de hidrogênio; D- Equação da reação de Haber-Weiss para formação do radical hidroxila; E- Equação da reação de Fenton para formação do radical hidroxila. Fonte: Adaptado pela autora de Barbosa, 2010.

Todos os componentes celulares estão suscetíveis à ação deletéria dos EROs, todavia os ácidos graxos poliinsaturados, encontrados abundantemente nas membranas celulares, são os mais afetados em decorrência do processo conhecido como peroxidação lipídica que

ocasiona alterações na permeabilidade, fluidez e integridade das membranas (FERREIRA et al., 1997; JONES et al., 2008). Como seqüela, há a perda da seletividade nas trocas iônicas, liberação dos conteúdos das organelas, formação de produtos citotóxicos que podem culminar em morte celular (FERREIRA et al., 1997; JONES et al., 2008).

O ânion superóxido é formado pela redução univalente do O_2 (Fig. 5B). Sua principal ação é atuar como agente redutor, exemplificado na geração H_2O_2 (Fig. 5C) e na produção radical $HO\cdot$ através do quelatos de ferro (Fig. 5D; 5E). Além disso, o $O_2^{\bullet-}$ possui extrema importância frente a infecções causadas por microrganismos sendo produzidos por fagócitos, linfócitos e fibroblastos, no curso de um processo inflamatório (FERREIRA et al., 1997; BARREIROS et al., 2006; BARBOSA et al., 2010).

O peróxido de hidrogênio é formado a partir dismutação do $O_2^{\bullet-}$, catalisado por enzimas oxidases (Fig. 5C) ou pela β -oxidação de ácidos graxos. O H_2O_2 não é considerado um radical livre, visto que não possui um elétron desemparelhado na camada de valência porém, tem alto potencial reativo principalmente na presença de metais de transição, como cobre e ferro, pois participa na geração do radical $HO\cdot$ (Fig. 5D; 5E) (BARREIROS et al., 2006; BARBOSA et al., 2010).

O radical hidroxila é formado principalmente por dois mecanismos, reação do H_2O_2 juntamente com os metais de transição (Fig. 5D; 5E) e homólise da água por exposição a radiação ionizante. O radical $HO\cdot$ tem a ação mais prejudicial ao organismo, causando danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares (BARREIROS et al., 2006; BARBOSA et al., 2010).

2.3.2 Espécies reativas de nitrogênio (ERN)

ERN são moléculas originadas a partir do óxido nítrico ($ON\cdot$), do aminoácido arginina e de NADPH pela enzima óxido nítrico sintetase (GREEN et al., 2004; SCHNEIDER et al., 2004). A ação do $ON\cdot$ isolada é insuficiente para causar danos ao DNA, mas essa pode reagir com $O_2^{\bullet-}$ e gerar o peroxinitrito ($ONOO^-$) que, após reações secundárias, são capazes de nitrar, ou seja, introduzir irreversivelmente de um ou mais grupo nitro (NO_2) em moléculas orgânicas, como aminoácidos aromáticos (BARREIROS et al., 2006; BARBOSA et al., 2010).

2.4 Sistemas Antioxidantes

O controle do excesso das espécies reativas no organismo é feito por moléculas

antioxidantes, essas podem ser produzidas pelo corpo, como a enzima superóxido dismutase (SOD), ou absorvidos na dieta, como a vitamina C (BARREIROS et al., 2006). Os antioxidantes são definidos como substâncias que regeneram o substrato oxidado ou previne a sua oxidação (HALLIWELL et al., 2000). Essas possuem a capacidade de impedir os danos provocados pelas espécies reativas: 1- inibindo a peroxidação lipídica; 2- neutralizando radicais livres; 3- quelando íons metálicos; 4- interrompendo a formação das EROs ou eliminando as já formadas e 5- fazendo o reparo de substâncias orgânicas que sofreram alguma modificação pelas espécies oxidantes (CADENAS et al., 1985; THEROND et al., 2000; SIES et al., 2015).

A SOD é responsável pela dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 (BABIOR et al., 1997). No organismo pode ser encontrada em três isoformas: SOD 1 é observada no citoplasma, possui Cobre (Cu^{2+}) e Zinco (Zn^{2+}) como cofatores metálicos e sua atividade não é afetada pela deflagração de estresse oxidativo; SOD 2 é encontrada no interior das mitocôndrias, contêm o Magnésio (Mg^{2+}) como cofator e sua produção é induzida pelo desbalanço oxidativo, condições de inflação ou estresse oxidativo; SOD 3 que possui também Cu^{2+} e Zn^{2+} como cofatores mas são visualizadas no meio extracelular, tendo um papel completamente importante na proteção dos tecidos (BOTA et al., 2002; NOIK-GRAYCK et al., 2005). A enzima catalase (CAT) é responsável pela dismutação do H_2O_2 em H_2O e O_2 (Fig.6) e é encontrada principalmente nos peroxissomos, organela responsável pela metabolização de várias substâncias (BARREIROS et al., 2006).

Figura 6- Equação da catalase (CAT)

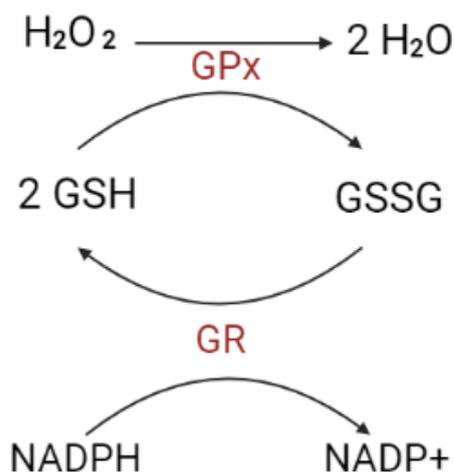


Fonte: Adaptado pela autora de BARREIROS, 2006.

O complexo da glutathiona é composto por duas enzimas, a glutathiona peroxidase (GPx) e a glutathiona redutase (GR), além disso, possui uma forma oxidada (GSSG) e uma reduzida (GSH) (BARREIROS et al., 2006). Este sistema é responsável pela dismutação H_2O_2 em H_2O e O_2 , sendo a GPx o agente encarregado de reagir com o H_2O_2 (BARREIROS et al., 2006). No interior celular, a glutathiona é encontrada majoritariamente livre, sob a forma reduzida, na qual a enzima GR é a responsável por reverter a GSSG em GSH, usando o NADPH como doador de elétrons (Fig.7). A proporção entre a forma reduzida e oxidada é utilizada como marcador de estresse oxidativo (ZITKA et al., 2012), visto que

durante um desequilíbrio redox ocorre a redução de GSH e aumento de GSSG (OWEN et al., 2010). Desta forma, a SOD, CAT e GPx atuam como protetores enzimáticos contra as injúrias causadas pelas espécies reativas.

Figura 7- Ciclo catalítico da glutatona



Fonte: Adaptado pela autora de BARREIROS, 2006.

No organismo vivo, a defesa antioxidante de compostos não enzimáticos é dependente de algumas variáveis como: absorção na dieta, biodisponibilidade, concentrações plasmáticas ideais, tipo de radicais livres e onde foram gerados (BIANCHI et al., 1999). Os principais antioxidantes não enzimáticos são ácidoascórbico (vitamina C) e α -tocoferol (vitamina E) que agem isoladamente ou em sinergia (BARREIROS et al., 2006). A vitamina C age reduzindo o íon férrico (Fe^{3+}) e Cu^{2+} , que atuam como metais de transição na formação da $\text{HO}\cdot$ (BARREIROS et al., 2006), já a vitamina E, que é lipossolúvel, é responsável pela remoção dos radicais livres nas membranas celulares, principalmente nas hemácias, interrompendo o processo de lipoperoxidação e prevenindo a hemólise (MACHADO et al., 2009).

Algumas moléculas possuem em sua estrutura química um grupo sulfidrílico (SH), como por exemplo aminoácido cisteína (cys), essas são consideradas como agentes quelantes, visto que possuem a capacidade de formar quelatos, ou seja, um complexo hidrossolúvel através de ligações covalentes entre os agentes quelantes e íons metálicos (FLORA et al., 2008). Os compostos sulfídricos possuem alta afinidade com íons metálicos transição como Fe^{3+} e Cu^{2+} . Esses íons metálicos desempenham um papel importante nas reações de radicais livres, levando à geração de espécies altamente reativas a partir de espécies menos reativas.

Um exemplo disso é a produção do radical hidroxila (BARREIROS et al., 2006; BARBOSA et al., 2010).

2.5 Estresse oxidativo e cocaína/crack

A administração do *crack* gera um aumento na concentração de DA na fenda sináptica devido ao bloqueio da recaptação desse neurotransmissor. Esse aumento nos níveis da DA pode levar à sua remoção por auto-oxidação ou pela ação da enzima monoamina oxidases (MAO), ocasionando a formação de H₂O₂ e OH• (ARAI et al., 1991; HERMIDA-AMEIJEIRAS et al., 2004). Egilmez et al., (1995), verificou que o acúmulo da DA e o aumento da oxidação desse neurotransmissor estão completamente relacionados com a administração de cocaína em ratos.

É sugerido que a desregulação do sistema antioxidante ocasionada pela cocaína oscile em relação a quantidade de administrações. No estudo conduzido por Pacifici et al. (2003), que investigou a formação de metabólitos oxidativos em baços de ratos após o uso de cocaína, foi constatado que durante a exposição aguda (40 mg/kg de cocaína dissolvida em soro fisiológico 0,9%; IP; tratamento de 1 dia), o organismo parece responder a ofensa oxidativa estimulando o GSH, sendo observado um aumento da GR, ou seja, promovendo uma defesa antioxidante.

Estudos também evidenciaram que a cocaína e AEME estão relacionadas com a peroxidação lipídica, na qual foi observado o aumento nos níveis de MDA após 48 horas da exposição, sendo um marcador comumente utilizado para avaliar a peroxidação lipídica (GARCIA et al., 2019). Além disso, também foi constatado a redução da atividade de GPx e GR após 3 e 6 horas do tratamento em células hipocámpais de rato. Ainda, a administração da cocaína pode induzir uma ativação dose-dependente de fatores de transcrição regulados por redox, como fator nuclear kB (NF-kB) e a proteína ativadora-1(AP-1) em células endoteliais microvasculares cerebrais (LEE et al., 2001). A conexão entre derivados da cocaína e o estresse oxidativo são consistentes e podem ocasionar desde alterações nos biomarcadores de oxidação à morte celular no SNC (POON et al., 2004; MACEDO et al., 2010))

2.6 Estresse oxidativo e epilepsia

Existem diversas evidências que correlacionam a epilepsia e convulsões com o estresse oxidativo, visto que a hiperexcitabilidade neuronal e o dano oxidativo causado por ação excessiva de radicais livres podem desempenhar um papel no início e na progressão da epilepsia (JARRETT et al., 2008; GERONZI et al., 2018). Na literatura ainda não há

concordância sobre o estresse oxidativo, se esse é causa ou consequência da epilepsia. É verificado que a excitação neuronal prolongada relacionada à convulsão resulta no aumento das EROs que contribui para o dano cerebral (FREITAS et al., 2009; TSAI et al., 2010; MÉNDEZ-ARMENTA et al., 2014). Além disso, a que a superprodução de espécies reativas provocam uma ruptura gradual da homeostase do Ca^{2+} , modulando a excitabilidade neuronal e a transmissão sináptica, resultando na diminuição dos níveis de ATP intracelular e na perda neuronal (CASTRO et al., 2011; PUTTACHARY et al., 2015).

Diversos modelos experimentais de epilepsia evidenciaram o aumento de estresse oxidativo com auxílio de biomarcadores. Incluindo modelo de convulsão induzida por compostos químicos, ACh e PILO, na qual foi visualizado aumento na peroxidação lipídica (DAL-PIZZOL et al., 2000; PATEL et al., 2001) assim como, no modelo de convulsão induzida eletricamente, onde também foi observado elevação na lipoperoxidação em todo o cérebro (ROLA et al., 2002). Com base nisso, et al., 2011). é possível verificar que estresse oxidativo pode desempenhar um papel fundamental na neurodegeneração induzida por convulsões (CASTRO

Ademais, os níveis de CAT também foram vistos aumentados em modelos agudos de epilepsia, podendo ser entendido como consequência de uma resposta antioxidante enzimática ao aumento produção basal de radicais livres, participando no controle das injúrias induzidos pelas convulsões (BARROS et al., 2007). Sendo assim, as disfunções mitocondriais, que resultam no aumento de EROs, podem afetar a excitabilidade e transmissão sináptica, fatores esses que contribuem para suscetibilidade à epilepsia. Da mesma forma, as convulsões em si são capazes de desencadear danos mitocondriais, levando ao estresse oxidativo. Portanto, há uma interdependência entre a função mitocondrial e as convulsões, criando um ciclo vicioso, na qual, não só distúrbios mitocondriais têm um efeito sobre a epilepsia, mas também a própria epilepsia tem um efeito na função mitocondrial (PATEL et al., 2004; JARRETT et al., 2008; KANG et al., 2013; KHURANA et al., 2013; GERONZI et al., 2018).

Coletivamente, é razoável estabelecer uma correlação entre *crack* e epilepsia, considerando o impacto do estresse oxidativo desencadeado por essas substâncias no funcionamento cerebral. Portanto, a hipótese desse estudo é que a administração de baixas doses de H-PILO, seguida da exposição única ao *crack*, pode provocar um desequilíbrio oxidativo, resultando na diminuição da eficácia do sistema antioxidante.

3.OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar o impacto da exposição a baixas doses de PILO e aos produtos da pirólise do *crack* sobre sistema de enzimas antioxidantes em modelo animal de epilepsia.

3.2 ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito do uso do *crack*, isoladamente, no sistema de enzimas antioxidantes;
- Analisar o efeito de baixas doses de PILO, isoladamente, no sistema de enzimas antioxidantes;
- Investigar o efeito de baixas doses de PILO associado à exposição ao *crack* no sistema de enzimas antioxidantes.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

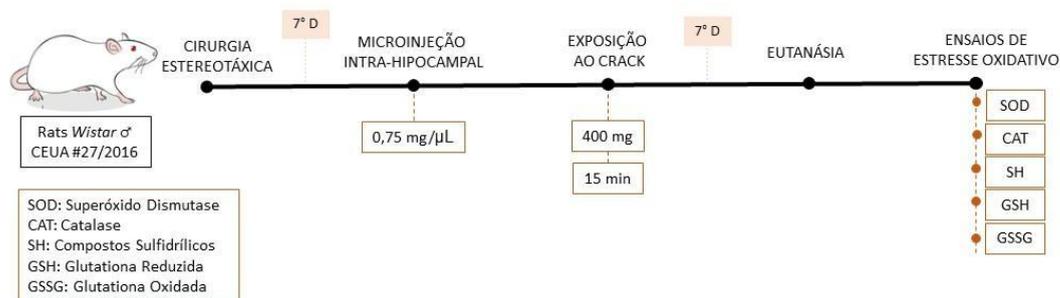
Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Alagoas (Protocolo nº 27/2016), seguindo as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os experimentos foram conduzidos em ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus* [n = 24, 240-340g]), fornecidos pelo biotério da Universidade Federal de Alagoas (BIOCEN//UFAL). Os animais foram alojados em grupos de cinco animais por gaiola sob temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), submetidos a ciclo claro / escuro de 12 h (luzes acesas às 07h00 e apagadas às 19h00), com água e ração *ad libitum*. 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 nosso laboratório (LNFI – UFAL). Todos os documentos foram organizados pela Procuradoria Federal com sede na UFAL, por meio de solicitação por parte do Magnífico Reitor.

4.2 Delineamento experimental

Os animais (n= 22) foram divididos em 4 grupos experimentais:

- CTRL (n=5): Animais submetidos à microinjeção de salina e não expostos à fumaça do *crack*;
- H-PILO (n=5): Animais submetidos à microinjeção de baixa dose de pilocarpina e não expostos à fumaça do *crack*;
- CRACK (n=6): Animais submetidos à microinjeção de salina e expostos à fumaça do *crack*;
- H-PILO+CRACK(n=6): Animais submetidos à microinjeção de baixa dose de pilocarpina e expostos à fumaça do *crack*.

Figura 8- Representação esquemática da linha do tempo dos experimentos realizados



Fonte: Autora

4.3 Cirurgia estereotáxica

Os animais foram anestesiados com xilazina (80 mg/Kg; IP) e cetamina (8mg/kg; IP) após isso, receberam 0,1mL/100g de pentabiótico veterinário (Fort Dodge®, intramuscular [IM]) antes do procedimento cirúrgico. Em seguida, foi realizada a tricotomia do pelo e a fixação do animal no estereotáxico, estes receberam anestésico local (lidocaína 0,2 mL/100g, SC) na região da cirurgia (DE FURTADO, et al., 2002; CASTRO et al., 2011). Posteriormente, foi realizada uma incisão na cabeça para a implantação de uma cânula, com 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 et al., 1997). Após a cirurgia, os animais permaneceram 7 dias em recuperação no biotério setorial do Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa (LNFI). Todos os cuidados foram tomados para minimizar qualquer sofrimento do animal.

4.4 Microinjeção intra-hipocámpal

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

4.5 Exposição os produtos da pirólise do crack

O aparelho de exposição consistia em uma bomba geradora de fumaça, acoplada a um tubo em uma das suas extremidades (local onde a substância foi queimada) e uma câmara

de acrílico na outra (local de alojamento dos animais). O aparelho possuía um ventilador Veterinary Anesthesia Ventilator Model, 2000, Hallowell Emc, Pittsfield, Ma) configurado para geração de 150 ml / min. A taxa de 150 ml / min foi padronizada a partir de estudos pilotos (dados não publicados), onde foi observado que o *crack* queimava completamente. Todo o experimento foi realizado em uma sala própria para exposição, em uma capela com filtro, exaustores e todos os equipamentos de proteção pessoal (EPI) necessários.

Após a microinjeção, os animais dos grupos CRACK e H-PILO+CRACK foram expostos aos produtos da pirólise do *crack*. Cada animal foi colocado individualmente na caixa de acrílico do aparelho por 1 minuto para ambientação. Em seguida, iniciou-se o aquecimento dos tubos com auxílio de maçarico, totalizando 2 minutos. Em seguida, 400 mg de crack foi colocado em um cano e queimado por 2 minutos, tempo suficiente para queimar a pedra completamente, sem deixar qualquer vestígio de substância no cano. Logo após a queima total, 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 para permitir o fluxo de ar. O excesso de fumaça foi removido por aberturas de exaustão dentro e fora da capela. No presente experimento, o animal foi exposto apenas um dia (protocolo de exposição aguda).

4.6 Eutanásia

Por fim, passados uma semana após o contato com essas substâncias (pilocarpina e/ou crack) os animais foram eutanasiados por decapitação com auxílio de guilhotina (Insight®, São Paulo, Brazil;).

4.7 Ensaio de estresse oxidativo

Foi adicionado ao tecido cerebral coletado, 1,5 mL de tampão de extração contendo 50 mM Tris-HCl (pH = 7,4) e 1 mM EDTA, homogeneizado em gelo usando um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem e centrifugado a 1180g e 4°C por 10 min. O sobrenadante foi coletado e submetido à quantificação de proteína total pelo método de Bradford. Uma solução de Reagente albumina de soro bovino (BSA) (2 mg mL⁻¹) foi usada como concentração de proteína padrão.

4.7.1 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A determinação da atividade da SOD foi realizada de acordo com Misra e Fridovich (1972). Na qual, uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de proteína necessária

para inibir a autooxidação de 1 μmol de epinefrina por minuto. O homogenato de cérebro (80 μg de proteína) foi incubado em tampão de carbonato de sódio 50 mM ($\text{NaCO}_3/\text{NaHCO}_3$ em $\text{pH} = 10,2$ com EDTA 0,1 mM) a 37 °C. A reação iniciou pela adição de 20 μL de epinefrina (150 mM) em ácido acético (0,05% v/v) em um volume final de 1 mL e a absorbância foi medida a 480 nm por 7 min no espectrofotômetro (AJX-6100PC).

4.7.2 Atividade de catalase (CAT)

A atividade da catalase foi executada de acordo com Aebi (1984). Na qual, uma unidade de CAT foi definida como a quantidade de proteína necessária para converter 1 μmol de H_2O_2 por minuto em H_2O . O homogenato de cérebro (40 μg de proteína) foi adicionado a 50 mM de tampão fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$, $\text{pH} = 7,0$) a 28°C. A reação iniciou pela adição de 10 mM de H_2O_2 em um volume final de 1 mL. O decaimento da absorbância foi monitorado a 240 nm em um espectrofotômetro (AJX-6100PC) por 1 min.

4.7.3 Conteúdo do grupo sulfidril

O teor de sulfidril foi determinado a partir da reação com DTNB (5,5'-ditio-bis-[(ácido 2-nitrobenzóico)]). O homogenato de cérebro (100 μg de proteína) foi incubado com 500 μM de DTNB por 30 min no escuro. Em seguida, o volume foi ajustado para 2 mL com tampão de extração ($\text{pH} 7,4$) e a absorbância foi medida em 412 nm. A cisteína foi usada como padrão na curva analítica (6,25 - 100 μM) para quantificar o conteúdo total de tiol livre.

4.7.4 Quantificação do estado redox (razão GSH/GSSG)

A relação GSH/GSSG foi avaliada medindo-se o conteúdo de GSH e GSSG. Para a quantificação de GSH foram adicionados ao homogenato cerebral (50 μg de proteína), o-ftalaldeído (1 mg mL^{-1} ; sonda fluorescente), NaH_2PO_4 0,1 M ($\text{pH} 8,0$) e EDTA 0,005M. Já para o ensaio GSSG, foram acrescentados ao homogenato cerebral (50 μg de proteína), o-ftalaldeído (1 mg mL^{-1} ; sonda fluorescente) e NaH_2PO_4 0,1 M ($\text{pH} 8,0$). A fluorescência foi monitorada usando um espectrofluorômetro (Flex Station 3, Molecular Devices) com $\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 420$ nm. Uma curva analítica baseada em concentrações conhecidas de GSH e GSSG foi empregada para determinar as concentrações desses compostos nas amostras.

4.8 Análises estatísticas

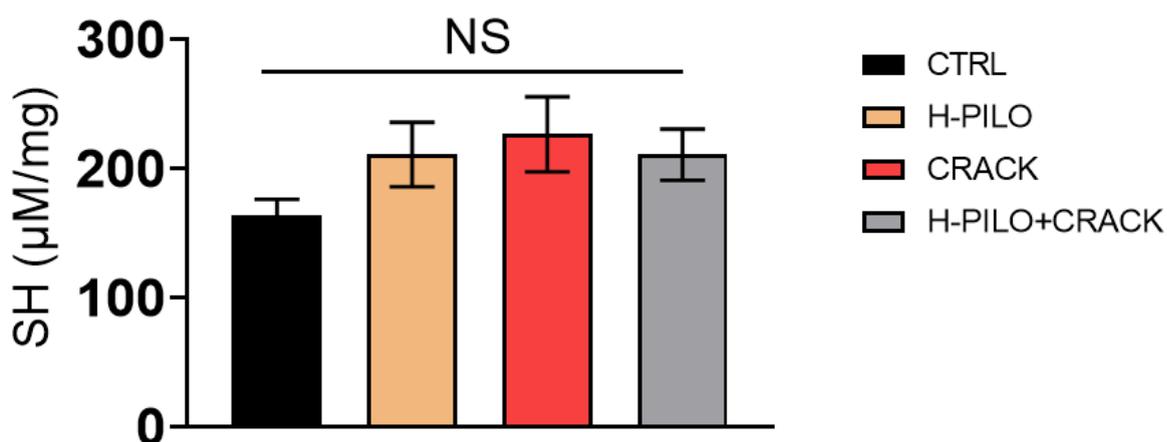
Os dados foram comparados, após teste de normalidade, através de ANOVA *one-way*

para dados independentes, usando o teste de Tukey para comparações múltiplas post hoc, sendo considerado ($p < 0,05$). Foram considerados tendência o valor de p entre 0,06 - 0,08. Essas análises foram realizadas com o auxílio do GraphPad Prism® (GraphPad, EUA), versão 8.0.

5. RESULTADOS

No que se refere ao SH, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados (H-PILO, CRACK, e H-PILO+CRACK) em comparação ao CTRL [F (3,14) = 2,598; P= 0,0936] (Fig. 9).

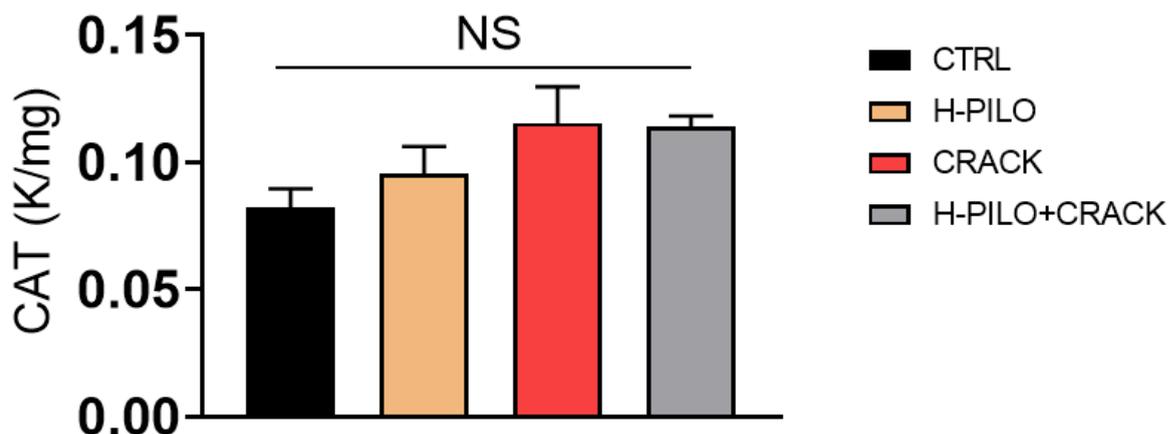
Figura 9- Dosagem de SH



Dosagem de compostos sulfidrílicos ($p=0,3685$) em 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 mg). Cada valor representa a média \pm S.E.M. * $P<0,05$ e NS $P>0,05$. ANOVA uma via seguida do teste de Tukey

Em relação a enzima catalase, também não foi verificada correlação significativa entre os grupos tratados (H-PILO, CRACK, e H-PILO+CRACK) em relação ao grupo CTRL [F (3,14) = 2,598; P= 0,0936] (Fig. 10).

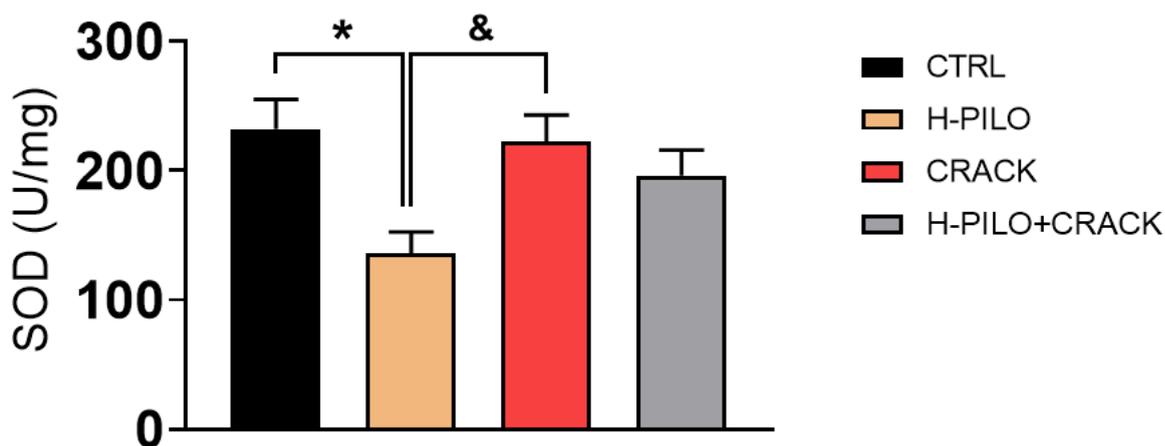
Figura 10 - Dosagem da atividade de CAT



Dosagem da atividade catalase ($p = 0,0936$) em 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 mg). Cada valor representa a média \pm S.E.M. $*P < 0,05$ e NS $P > 0,05$. ANOVA uma via seguida do teste de Tukey.

A respeito da enzima superóxido dismutase, foi visualizado diferença significativa entre os grupos H-PILO vs CTRL [F (3,12)= 4,583; $P=0,0248$] e H-PILO vs CRACK [F (3,12)= 4,583; $P=0,0455$]. No qual foi possível observar a redução nos níveis de SOD no grupo H-PILO tanto em comparação ao grupo CTRL quanto ao grupo CRACK. Além disso, foi observado que o grupo CRACK e o grupo H-PILO + CRACK se mantiveram semelhantes ao grupo CTRL.(Fig. 11).

Figura 11- Dosagem da atividade da SOD

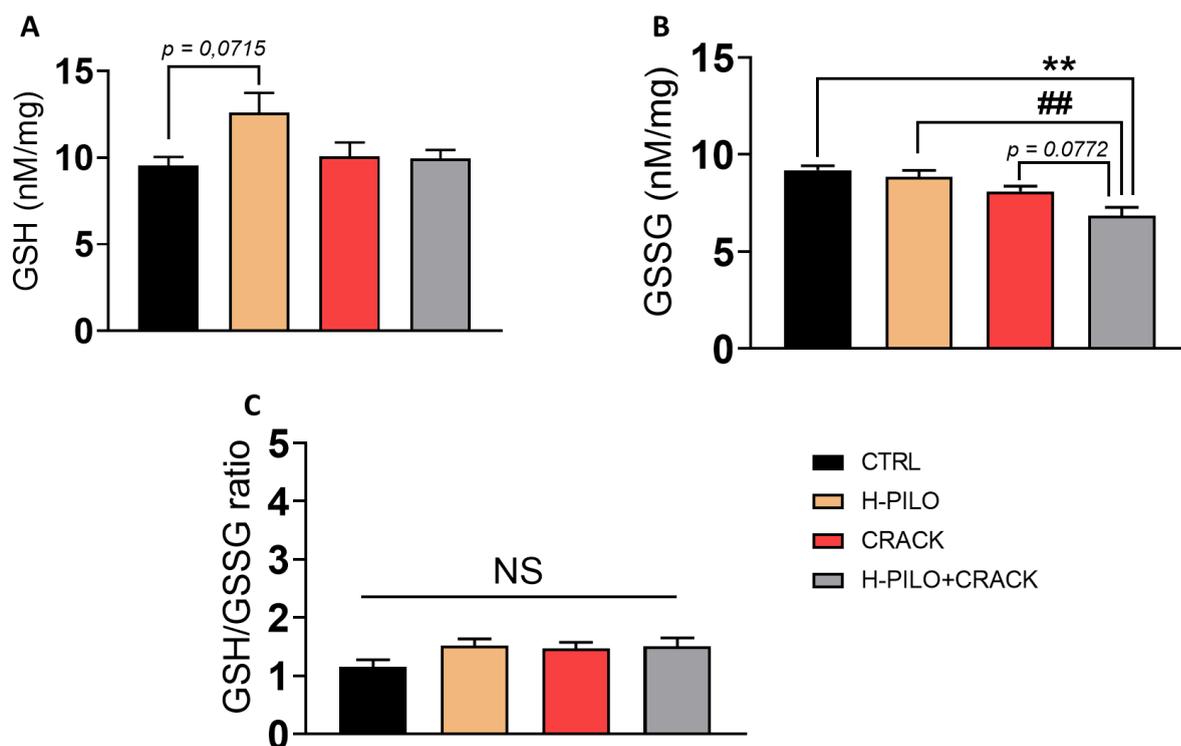


Dosagem da atividade da superóxido dismutase ($p= 0,0233$) em animais submetidos ou não a administração de baixa dose de PILO intrahipocampal ($0,75 \text{ mg}/\mu\text{L}$) e expostos, ou não, a fumaça do *crack* (400 mg). Cada valor representa a média \pm S.E.M. $*P < 0,05$ e NS $P > 0,05$. ANOVA uma via seguida do teste de Tukey.

Quanto à dosagem de GSH (Fig. 12 A) não foram verificadas variações estatísticas significativas entre os grupos tratados em relação ao controle, entretanto observou-se uma tendência de aumento dos níveis dessa molécula no grupo H-PILO [F (3,12) = 3,166 $P=0,0715$], ao contrário dos grupos CRACK e H-PILO+CRACK, que se mostraram mais próximos ao grupo CTRL. Acerca da GSSG, observou-se uma de diminuição dos níveis de GSSG no grupo H-PILO+CRACK, sendo essa redução significativa visualizada entre grupos CTRL vs H-PILO+CRACK [F (3,12) = 10,11 $P=0,0013$] e H-PILO vs H-PILO+CRACK [F (3,12) = 10,11 $P=0,0048$]. Além disso, foi possível verificar uma tendência de diminuição nos níveis de GSSG no grupo H-PILO+CRACK em comparação ao grupo CRACK [F (3,12) =

10,11 $P=0,0772$ (Fig. 12 B). Entretanto, no que tange a razão entre GSH e GSSG, os dados não mostraram evidências claras de uma relação significativa entre os grupos (Fig. 12 C).

Figura 12- Dosagem do estado redox (razão GSH/GSSG)



Dosagem da do estado redox em animais submetidos ou não a administração de baixa dose de PILO intrahipocampal (0,75 mg/ μ L) e expostos, ou não, a fumaça do *crack* (400 mg). Glutathiona na sua forma reduzida – GSH ($p= 0,0639$) (A); glutathiona na sua forma oxidada – GSSG ($p= 0,0013$) (B); a razão GSH/GSSG ($p= 0,1520$) (C). Cada valor representa a média \pm S.E.M. * $P<0,05$ e NS $P>0,05$.. ANOVA uma via seguida do teste de Tukey.

6. DISCUSSÃO

Observou-se que no grupo H-PILO a atividade da enzima SOD foi reduzida em comparação aos grupos CTRL e CRACK, ao passo que, foi visualizado uma tendência de aumento nos níveis de GSH no grupo tratado com H-PILO em relação ao grupo CTRL. No entanto, os níveis de GSSG foram menores no grupo H-PILO+CRACK em comparação aos demais grupos. Entretanto, as análises estatísticas não revelaram resultados estatisticamente significativos sobre os níveis de SH, CAT e GSH/GSSG em nenhum dos grupos tratados.

A PILO tem sido descrita como uma molécula capaz de ativar um mecanismo compensatório e neuroprotetor, que age contra o estresse oxidativo, sendo amplamente amparado no nível enzimático, especialmente SOD e à CAT, cujas atividades são aumentadas (FREITAS et al., 2005; FREITAS et al., 2009; LIU et al., 2010; TSAI et al., 2010). Em estudo realizado por Freitas et al. (2005) em ratos, foi observado que a administração de uma dose convulsivante PILO (400 mg/kg; SC) resultou em um aumento na atividade da CAT no hipocampo após 24 horas da administração do fármaco, quando comparado ao grupo controle. Ademais, em estudo subsequente realizado pelo mesmo autor (2009), no qual, os parâmetros bioquímicos foram medidos 30 dias após a administração da mesma dose convulsivante de PILO eles constataram que a atividade da SOD e CAT aumentaram durante a fase crônica, porém, foi visto também, aumento na peroxidação lipídica, assim como elevação nos níveis de nitrito, evidenciando que aumento na formação de radicais livres é acompanhado por mecanismo compensatório envolvendo a modulação dessas enzimas que pode ser a curto e ao longo prazo. No entanto, em outro estudo utilizando uma dose convulsivante de PILO (400 mg/kg; IP), foi observado um aumento na enzima GPx, nenhuma alteração na atividade da SOD e CAT foram visualizadas no estriado após 1 hora da administração do tratamento (MILITÃO et al., 2010), o que corrobora com nosso achado na enzima CAT. Entretanto, os nossos resultados evidenciaram que a única dose de H-PILO ocasionou uma diminuição nos níveis de SOD registrada sete dias após insulto, observou-se para essa enzima que os níveis são compatíveis com estudos crônicos, seja com dose convulsivante (340 mg/kg; IP) (MAO et al., 2017), com doses subconvulsivante (100mg/kg; IP) (SINGH et al., 2021) e estudos agudos com dose convulsivante (320 mg/kg; IP) (SHISHMANOVA-DOSEVA et al., 2021). Em relação a estes dados, é sugerido ainda, que numa dosagem menor, a H-PILO pode ter induzido um aumento da atividade do tecido cerebral, implicando o aumento gradual da formação de EROs, ajudando a gerar o efeito visto ao longo dos dias que se seguiram à aplicação da H-PILO.

Outro fato importante diz respeito à possível capacidade do *crack* em disparar esse efeito compensatório, visualizado a partir nos níveis de SOD no grupo CRACK e H-PILO + CRACK, que se mantiveram iguais ao CTRL, o que pode indicar a existência de um mecanismo compensatório desencadeado pela ação do *crack*. Pacifici et al. (2003), em estudo com ratos expostos à cocaína (40mg/kg; IP; trat. agudo; trat. crônico: 1 injeção/dia por 30 dias) observou o aumento de GSH e ácido ascórbico (AA) nas primeiras 2 h após ao tratamento agudo de cocaína, diferente dos nossos resultados. Porém, a atividade de SOD se manteve equiparada ao controle, assim como os nossos dados. Isso sugere que a administração de cocaína alterou a condição redox da célula que reage aumentando os níveis intracelular de moléculas antioxidantes (PACIFICI et al. 2003). Já em estudo com ratos expostos aos produtos da pirólise do *crack* (3g; 1x por dia durante 5 dias) foi indicado um aumento na atividade de SOD e nos níveis dos produtos protéicos de oxidação avançada (AOPPs), que é um biomarcador de dano oxidativo, no corpo estriado, sugerindo um aumento nas propriedades antioxidantes e na oxidação de proteínas, respectivamente, nesta região do cérebro (LIPAUS et al., 2019). Foi relatado também por Dietrich et al. (2005), em estudo com cocaína (20 mg/kg; IP; trat. agudo: 1 dia; trat. crônico: 1 injeção/dia por 10 dias), que a atividade de enzimas como SOD e GPx foi aumentada no cérebro tanto nas exposições agudas, quanto crônicas, indicando a existência desse mecanismo compensatório inicial o qual ocorreu possivelmente no momento em que se identificou um aumento significativo das EROs. Esses estudos demonstram que a formação de radicais induzidos pela cocaína/*crack* é acompanhada pela atividade das enzimas antioxidantes após tratamento agudo e crônico, propondo mecanismos compensatórios ao estresse oxidativo.

Lopes-Pedrajas et al. (2015) em estudo com cerebelo de ratos expostos à cocaína (15 mg/kg; IP; 1 injeção/dia por 18 dias), foi observado aumento nos níveis de GSSG, diferente dos nossos resultados, o qual foi observado uma redução significativa nos níveis de GSSG no grupo H-PILO+CRACK em comparação aos demais grupos, enquanto os níveis de GSH permaneceram inalterados em comparação ao grupo controle, como mostrado em nosso estudo. Além disso, foi visualizado a redução da enzima GPx. Macêdo et al. (2010) evidenciaram que altas doses de cocaína (90 mg/kg; IP) produziram dano oxidativo e morte neuronal no córtex pré-frontal e estriado de camundongos, além de ter sido observado que alguns animais apresentam SE. Seguindo o mesmo raciocínio, Garcia et al. (2019), demonstraram, através de ensaios de viabilidade celular, que a AEME tem maior potencial neurotóxico do que a própria cocaína em células hipocámpais de ratos cultivadas. Conforme

representado pela diminuição da GPx e GR após 3h da exposição, permanecendo esse efeito até 6h após a administração, em todos os grupos tratados. Ademais, também foi observado elevação nos níveis de MDA apenas no grupo de combinação AEME + COCAÍNA quando comparada ao grupo COCAÍNA, após 48h de exposição, relatando um efeito de peroxidação lipídica. Esses resultados podem indicar a presença de estresse oxidativo tanto em modelos animais como em culturas celulares. Entretanto, um estudo utilizando o sangue periférico de usuários de *crack* após 14 dias do início do tratamento de desintoxicação em clínica psiquiátrica, indicou um aumento nos níveis de GSH e SOD em relação à coleta sanguínea realizada no primeiro dia da internação, evidenciando que o processo de desintoxicação do *crack* melhorou os parâmetros oxidativos e defesas antioxidantes (HIRSCH et al., 2018). Foi relatado também, de acordo com Zaparte et al. (2021), em estudo com usuárias de *crack* durante o período de desintoxicação da droga, que a recuperação por 18 dias foi eficaz para restabelecer o balanço oxidativo. No qual, mulheres com dependência ao *crack* e à cocaína mostraram níveis mais altos de AOPPs e estresse oxidativo durante a primeira semana, em comparação com níveis mais elevados de biomarcadores antioxidantes na terceira semana de abstinência, evidenciado pelo aumento nos níveis de SOD, GPx e GSH, estes resultados sugerem uma intensificação das defesas antioxidantes no final do tratamento de desintoxicação. Estes fatos podem ter contribuído para os nossos resultados, visto que esses dizem respeito a uma mensuração dos níveis enzimáticos que foi feita sete dias após uma exposição única a este psicoestimulante, podendo esse tempo ser entendido como um período de desintoxicação promovendo o restabelecimento do equilíbrio oxidativo. Todavia, uma mensuração em diferentes períodos de tempo necessita ser realizada para uma compreensão mais precisa dessa hipótese.

Além disso, foi observado a diminuição significativa nos níveis de GSSG no grupo H-PILO+CRACK quando comparado aos demais grupos. Por outro lado, em relação aos níveis de GSH não foram observadas alterações, excluindo o grupo H-PILO, na qual possivelmente ocasionou aumento dos níveis de GSH devido ao mecanismo de defesa antioxidante (GALLEANO et al., 1995) Entretanto, a proporção de GSH/GSSG não mostraram evidências claras de uma relação significativa entre as moléculas do ciclo das glutations. Contudo, seria necessário que estudos futuros incluam mensuração das enzimas GPx e GR para se obter uma compreensão mais clara e precisa sobre esse sistema antioxidante. No entanto, é importante salientar que tanto a administração H-PILO quanto a exposição ao *crack* são fatores exógenos que causam alterações no sistema oxidativo dos

organismos. Portanto, mesmo que as análises estatísticas não revelem resultados significativos, indicando que os grupos tratados são possivelmente equivalentes ao controle, esse comportamento pode sugerir que o organismo conseguiu restabelecer o equilíbrio oxidativo, visto que as análises foram realizadas 7 dias após a administração das substâncias mencionadas. Além disso, considerando que este estudo envolve baixas doses de H-PILO e exposição única ao *crack*, quantificadas sete dias após a administração, é possível que os efeitos esperados sejam menos evidentes quando um número reduzido de animais é utilizado. Essa limitação pode influenciar a detecção de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, uma vez que o erro padrão pode ser maior que o efeito verdadeiro. Adicionalmente, é sugerido que a desregulação do sistema antioxidante e os danos ocasionados pela cocaína/*crack* e pela administração à PILO oscilem em relação as seguintes variáveis: tempo decorrente da exposição até a eutanásia dos animais; dose utilizada; via de administração (IP, SC, H-PILO); modelo de exposição; tempo de exposição ativa; frequência de administração da substância (exposição aguda e a crônica); e a estrutura a ser analisada (os resultados em estudos do cérebro como um todo podem se diferenciar de estudos que focam em algumas de suas estruturas, existindo diferenças também quanto aos níveis de estresse oxidativo entre uma estrutura e outra de um mesmo cérebro (DIETRICH et al., 2005; FREITAS, 2005; FREITAS et al., 2009; LIU et al., 2010; MILITÃO et al., 2010; TSAI et al., 2010; LÓPEZ-PEDRAJAS et al., 2015; ZAPARTE et al., 2015; PEARSON-SMITH et al., 2017; GOMES et al., 2018; HIRSCH et al., 2018; LIPAUS et al., 2019; SINGH et al., 2021).

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo confirmaram parcialmente a hipótese proposta inicialmente. Os dados coletados após sete dias a exposição a baixas doses de H-PILO e ao *crack* sugerem um possível restabelecimento do equilíbrio oxidativo a partir do provável aumento até os níveis homeostáticos na atividade dos sistemas de defesa antioxidantes. Entretanto, é possível inferir que administração de uma dose reduzida de H-PILO pode ter resultado no aumento da atividade do tecido cerebral e conseqüentemente diminuído os níveis da SOD, em concordância com a hipótese inicial. Essas descobertas podem ajudar a compreender como o organismo se comporta com as alterações provocadas pelo uso de *crack* e pela administração de H-PILO. No entanto, mais estudos devem ser realizados para compreensão dos mecanismos supracitados, sendo necessário abranger mais variáveis como: frequência de exposição ao *crack*, diferentes tempos de coleta, análises de diferentes estruturas cerebrais e com um maior quantitativo de animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO-RODRIGUEZ A, ZHANG L, ZHOU F. Cocaine inhibition of nicotinic acetylcholine receptors influences dopamine release. **Front Synaptic Neurosci**, v.4, p. 6-19, 2014.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v.105, p. 121-126, 1984.
- AKARSU, S., YILMAZ, S., OZAN, S., et al. Effects of febrile and afebrile seizures on oxidant state in children. **Pediatric Neurol.**, v.36, p. 307–311, 2007.
- ARAI, Y., KIM, S.K., KINEMUCHI, H. Inhibition of brain MAO-A and animal behaviour induced by phydroxyamphetamine. **Brain Res. Bull.**, v. 27, 81-84, 1999.
- ARAÚJO 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.
- 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.
- BAIK, J.H. Dopamine signaling in reward-related behaviors. **Front Neural Circuits.**, v.11, n.7, p. 152, 2013.
- BARBOSA, K.B.F., COSTA, N.M.B, ALFENAS, R.C.G. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Rev. Nutr.**, v.23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S., DAVID, J. M., DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.2, n.1, p. 113-123, 2006.
- BARROS, D.O.; XAVIER, S.M.L.; BARBOSA, C.O. Effects of the vitamin E in catalase activities in hippocampus after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats. **Neurosci. Lett.**, v. 416, p. 227-230, 2007.
- BEHNKE, M. The search for congenital malformations in newborns with fetal **Cocaine Exposure**, v.107, n. 5, p. 1-6, 2001.
- BELLISSIMO, M. I. et. al. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. **Epilepsy Research**, v.46, p. 121–128, 2001
- BERTRAM, E. H. Functional anatomy of spontaneous seizures in a rat model of limbic Epilepsy. **Epilepsia**, v. 38, n. 1, p. 95-105, 1997.
- BETJEMANN, J. P.; LOWENSTEIN, D. H. Status epilepticus in adults. **The Lancet. Neurology**, v. 14, n. 6, p. 615–24, 2015.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 12, p. 123-130, 1999.
- BLOKLAND, A. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? **Brain Research Reviews**, v. 21, n. 3, p. 285–300, 1995.
- BOTA, D.A., VAN-REMMEN, H., DAVIES, K.J. Modulation of Lon protease activity and aconitase turnover during aging and oxidative stress. **FEBS Letters.**, v. 532, n.1, p. 103-106,

2002.

CADENAS, E., SIES, H. Oxidative stress: excited oxygen species and enzyme activity. **Advances in enzyme regulation.**, v.23, p. 217-37, 1985.

CASTRO, O.W; FURTADO M.A; TILELLI C.Q. Comparative neuroanatomical and temporal characterization of FluoroJade-positive neurodegeneration after status epilepticus induced by systemic and intrahippocampal pilocarpine in Wistar rats. **Brain Res**,v. 1374,p. 43-55, 2011.

CEBRID. Livreto informativo sobre Drogas Psicotrópicas. p. 1–64, 2014. Disponível em: <<https://www.cebrid.com.br/wp-content/uploads/2012/12/Livreto-Informativo-sobre-Drogas-Psicotr%C3%B3picas.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2022

CHANG, T. R. et al. Cocaine use as an independent predictor of seizures after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Journal of Neurosurgery**, v. 124, n. 3, p. 730–735, 2016.

CHOY-KWONG, M., LIPTON, R.B. Seizures in hospitalized cocaine users. **Neurology**, v. 39, p. 425, 1989.

Classificação da ILAE das epilepsias: artigo da posição da Comissão de Classificação e Terminologia da International League against Epilepsy. **International League Against Epilepsy (ILAE)**, 2017. Disponível em: <<https://www.ilae.org/files/ilaeGuideline/ClassificationEpilepsies-Scheffer2017-Brazil.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2022

COBLEY,J.N.; FIORELLO, M.L.; BAILEY, D.M.13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. **Redox Biol**, v.15 p. 490–503,2018

COLOMBO, L.L., LOPEZ, M.C., CHEN, G.J., WATSON, R.R. Effect of shortterm cocaine administration on the immune system of young and old C57BL/6 female mice. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, v. 21, p.755-769, 1999.

COMMISSION ON TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY (ILAE). A proposed international classification of epileptic seizures. **Epilepsia**, v. 5, p. 297–306, 1964.

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

CURIA, G., LONGO, D., BIAGINI, G.nThe pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 172, n. 2, p. 143–157, 2008.

DAL-PIZZOL, F., KLAMT, F., VIANNA, M.M. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. **Neurosci. Lett.**,v. 29, n. 3, p.179-182, 2000.

DE FREITAS, R. L. M. et al. Oxidative stress in rat hippocampus caused by pilocarpine-induced seizures is reversed by buspirone. **Brain Research Bulletin**, v. 81, n. 4–5, p. 505–509, 2010.

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

DIETRICH, J. B. et al. Acute or repeated cocaine administration generates reactive oxygen

species and induces antioxidant enzyme activity in dopaminergic rat brain structures. *Neuropharmacology*, v. 48, n. 7, p. 965–974, 2005.

Diretrizes gerais médicas: para assistência integral ao dependente do uso do crack. **Conselho Federal de Medicina (CFM) - Rev. CFM**. 2017. Disponível em: <<https://portal.cfm.org.br/images/stories/pdf/cartilhacrack.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2022

DORANDEU, F., CALAS, G. Models of Chemically-Induced Acute Seizures and Epilepsy: Toxic Compounds and Drugs of Addiction. **Models of Seizures and Epilepsy**, p. 529–551, 2017.

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

Drug market trends cocaine amphetaminetype stimulants new psychoactive substances. **United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC)**, 2022. Disponível em: <https://www.unodc.org/res/wdr2022/MS/WDR22_Booklet_4.pdf>. Acesso em: 15 set. 2022.

Drugs, Brains, and Behavior: The Science of Addiction. **National Institute on Drug Abuse (NIDA)**, 2020. Disponível em: <<https://nida.nih.gov/publications/drugs-brains-behavior-science-addiction/drugs-brain>>. Acesso em: 15 set. 2022.

DUAILIBI, 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.

EGILMEZ, Y., JUNG, M.E., LANE, J.D. Dopamine release during cocaine self-administration in rats: effect of SCH23390. **Brain Res.**, v. 701, p.142-150, 1995.

ENGEL, J. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. **Epilepsia**, v.42 p. 796-803, 2001.

ENGEL, J. Report of the ILAE classification core group. **Epilepsia**, v.47, p.1558-1568, 2006.

ENGEL, J. Seizures and Epilepsy. **Oxford University Press**, 2013.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista de Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

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

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. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: position paper of the ILAE commission for classification and terminology. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 522-530, 2017.

FLORA, S.J. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. **Oxid Med Cell Longev.**, v. 4, p. 191-206, 2009.

- FREITAS, R. M. et al. Oxidative stress in the hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus in Wistar rats. **FEBS Journal**, v. 272, n. 6, p. 1307–1312, 2005.
- FREITAS, R. M. Investigation of oxidative stress involvement in hippocampus in epilepsy model induced by pilocarpine. **Neuroscience Letters**, v. 462, n. 3, p. 225–229, 2009.
- 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.
- GALLEANO, M.; PUNTARULO, S. Role of antioxidants in the erythrocyte's resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1271, p. 321–326, 1995.
- 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. Anhydroecgonine methyl ester (AEME), a cocaine pyrolysis product, impairs glutathione-related enzymes response and increases lipid peroxidation in the hippocampal cell culture. **Toxicology Reports**, v. 6, n. July, p. 1223–1229, 2019.
- GASIOR, M., UNGARD, J.T., WITKIN, J.M., 1999. Preclinical evaluation of newly approved and potential antiepileptic drugs against cocaine-induced seizures. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 290, n.3, p.1148-1156, 1999.
- GERONZI, U., LOTTI, F., GROSSO, S. Oxidative stress in epilepsy. **Expert Rev Neurother.**, v. 1, n. 5, p. 427-434, 2018.
- 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
- 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**, v. 34, n. 4, p. 834–847, 2017.
- GREEN, K., BRAND, M.D., MURPHY, M.P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53, p.110-8, 2004.
- HALLIWELL, B.; CLEMENT, M. V.; LONG, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. **Febs Letters**, v. 486, n. 1, p. 10-13, 2000.
- HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **Lancet**, v., n. 355, p.1179-80, 2000.
- HAIM, D.Y., LIPPMANN, M., GOLDBERG, S., & WALKENSTEIN, M.D. The Pulmonary Complications of Crack Cocaine. **Chest.**,v.107 p. 233-40, 1995.
- 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.
- HATSUKAMI, D. K., & FISCHMAN, M. W. Crack cocaine and cocaine hydrochloride: Are the differences myth or reality? **JAMA: Journal of the American Medical Association**. v.276, n.19, p. 1580–1588, 1996.

HEARD, K., PALMER, R., & ZAHNISER, N. R. Mechanisms of Acute Cocaine Toxicity. **The Open Pharmacology Journal**, v. 2, n. 1, p. 70–78, 2008.

HERMIDA-AMEIJEIRAS, A., MENDEZ-ALVAREZ, E., SANCHEZ-IGLESIAS, S. Autoxidation and MAO-mediated metabolism of dopamine as a potential cause of oxidative stress: role of ferrous and ferric ions. **Neurochem. Int.**, v. 45, p. 103-116, 2004.

HIRSCH, G. E. et al. Evaluation of oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor levels related to crack-use detoxification. **Neuroscience Letters**, v. 670, n. October 2017.

HOFFMAN, R.S., KAPLAN, J.L., HUNG, O.L. Ecgonine methyl ester protects against cocaine lethality in mice. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.**, v.42, n.4, p.349–354, 2004.

HYMAN, S. E., MALENKA, R. C., AND NESTLER, E. J. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. **Rev. Neurosci.**, v. 29, p.565–598, 2006

JARRETT, S.G.; LIANG, L.-P.; HELLIER, J.L. Mitochondrial DNA damage and impaired base excision repair during epileptogenesis. **Neurobiol. Dis.**, v. 30, p.130-138, 2008.

JONES, D.P. Radical-free biology of oxidative stress. **Am J. Physiol Cell Physiol.**, v. 295, n. 4, p. 849-868, 2008.

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

KANG, H.C., LEE, Y.M., KIM, H.D. Mitochondrial disease and epilepsy. **Brain Dev.**, v. 35, p.757-761, 2013.

KESSLER, F., PECHANISKY, F. Uma visão psiquiátrica sobre o fenômeno do crack na atualidade. **Rev Psiquiatr RS**, v. 27, p. 1303–7, 2008.

KHURANA, D.S., SALGANICOFF, L., MELVIN, J.J. Epilepsy and respiratory chain defects in children with mitochondrial encephalopathies. **Neuroped.**, v.39, n.1, p. 8-13, 2008.

KHURANA, D.S., VALENCIA, I., GOLDENTHAL, M.J. Mitochondrial dysfunction in epilepsy. **Semin Pediatr Neurol.**, v. 20, p. 176-187, 2013.

KELMANN, B., NAVES, P., CORSO, J. A definição de epilepsia em dez questões. **Associação Brasileira de Epilepsia (ABE)**, 2017. Disponível em: <<https://epilepsia-brasil.org.br/definicoes-e-conceitos>>. Acesso em: 15 set. 2022.

KOPPEL, B.S., SAMKOFF, L., DARAS, M. Relation of cocaine use to seizures and epilepsy. **Epilepsia**, v. 37, p. 875–8, 1996.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 433-441, 2003

KOZHEMYAKIN, M., RAJASEKARAN, K., KAPUR, J. Central cholinesterase inhibition enhances glutamatergic synaptic transmission. **J Neurophysiol**, v.103, n. 4, p. 1748-57, 2010.

KRAMER, L.D., LOCKE, G.E., OGUNYEMI, A. Cocaine-related seizures in adults. **Drug Alcohol Abuse**, v.16, n.3, p. 307–317, 1990.

LEE, Y. W., HENNIG, B., FIALA, M. Cocaine activates redox-regulated transcription factors and induces TNF- α expression in human brain endothelial cells. **Brain Research**, v. 920, p.125-133, 2001.

LIANG, L.P., PATEL, M. Mitochondrial oxidative stress and increased seizure susceptibility

in Sod2-/+ mice. **Free Radic. Biol. Med.**, v.36, p. 542-554, 2004.

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.

LIPAUS, I. F. S. et al. Impairment of spatial working memory and oxidative stress induced by repeated crack cocaine inhalation in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 359, p. 910–917, 2019.

LIU, J. et al. Oxidative stress mediates hippocampal neuron death in rats after lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. **Seizure**, v. 19, n. 3, p. 165–172, 2010.

LIU, Z.; NAGAO,T.; DESJARDINS, G.C. Quantitative evaluation of neuronal loss in the dorsal hippocampus in rats with long-term pilocarpine seizures. **Epilepsy Res**, v.17, p. 237–47,1994

LÓPEZ-PEDRAJAS, R. et al. Cocaine promotes oxidative stress and microglial-macrophage activation in rat cerebellum. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, n. 279, p. 1–10, 2015.

LÖSCHER, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Seizure**, v. 20, n. 5, p. 359-368, 2011.

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.

MACEDO, D.S., VASCONCELOS, S.M., ANDRADE-NETO, M. Cocaine-induced status epilepticus and death generate oxidative stress in prefrontal cortex and striatum of mice. **Neurochem. Int.**, v. 56, n. 1, p. 183–187, 2010.

MACHADO, L. P., KOHAYAGAWA, A., SAITO, M. E., SILVEIRA, V.F. Lesão oxidativa e eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse em Medicina Veterinária. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 8, n. 1, p. 84-94, 2009.

MAO, K. et al. Anticonvulsant effect of piperine ameliorates memory impairment, inflammation and oxidative stress in a rat model of pilocarpine-induced epilepsy. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 13, n. 2, p. 695–700, 2017.

MARKESBERY, W. R. Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 23, n.1, p. 134–147, 1997.

MARIANI, E., POLIDORI, M.C., CHERUBINI, A. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. **J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**,v.827, n.1, p. 65-75, 2005.

MARINO, M.J., ROUSE, S.T., LEVEY, A.I. Activation of the genetically defined M1 muscarinic receptor potentiates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor currents in hippocampal pyramidal cells. **Proc.Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, n. 19, p. 11465-70, 1998.

MELECA, R.J., BURGIO,D.L., CARR, R.M., LOLACHI, C.M. Mucosal injuries of the upper aerodigestive tract after smoking crack or freebase cocaine. **Laryngoscope**, v.107, p. 620-5, 1997.

MELO, I.S., SANTOS, Y.M.O., COSTA, M.A. Inhibition of sodium glucose cotransporters following status epilepticus induced by intrahippocampal pilocarpine affects neurodegeneration process in hippocampus. **Epilepsy Behav**,v. 61, p. 258–268, 2016.

MÉNDEZ-ARMENTA, M., NAVA-RUIZ, C., JUÁREZ-REBOLLAR, D. Oxidative stress associated with neuronal apoptosis in experimental models of epilepsy. **Ox Med Cell**

Longev., 2014.

MENEGUELLO, J.; LEONHARDT, F. D., PEREIRA, L.D. Processamento auditivo em indivíduos com epilepsia de lobo temporal. **Rev. Bras. Otorrinolaringologia**, v. 72, n. 4, p. 496-504, 2006.

MENON, R., RADHAKRISHNAN, A., RADHAKRISHNAN, K. Status Epilepticus. **Journal of the Association of Physicians of India**, v. 61, p. 58–63, 2013.

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.

MILITÃO, G. C. G.; FERREIRA, P. M. P.; DE FREITAS, R. M. Effects of lipoic acid on oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures. **Neurochemistry International**, v. 56, n. 1, p. 16–20, 2010.

MISRA, H.P., FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J. Biol. Chem.**, v. 247, p. 3170–3175, 1972.

MURIACH, M., LÓPEZ-PEDRAJAS, R., BARCIA, J. M. Cocaine causes memory and learning impairments in rats: involvement of nuclear factor kappa B and oxidative stress, and prevention by topiramate. **J. Neurochem.**, v. 114, p. 675-684, 2010.

NODA, N., WAKASUGI, H. Cancer and oxidative stress. **Japan Med. Assoc.**, v. 44, n. 12, p. 535-539, 2001.

NOZIK-GRAYCK, E., SULIMAN, H.B., PIANTADOSI, C.A. Extracellular superoxide dismutase. **The international journal of biochemistry & cell biology**, 2005;v. 37, n. 12, p. 2466-2471, 2005.

OMS destaca escassez de tratamento para epilepsia em países de baixa renda. **Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS)**, 2019. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/20-6-2019-oms-destaca-escassez-tratamento-para-epilepsia-em-paises-baixa-renda>>. Acesso em: 15 set. 2022.

OWEN, J.B., BUTTERFIELD, D.A. Measurement of oxidized/reduced glutathione ratio. **Methods in molecular biology**, v. 648, n. 2, p. 69-77, 2010.

PACHECO, A.L.D., et al. Maternal crack cocaine use in rats leads to depressive- and anxiety-like behavior, memory impairment, and increased seizure susceptibility in the offspring. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, p. 1–17, 2021.

PACIFICI, R., FIASCHI, A.I., MICHELI, L. Immunosuppression and oxidative stress induced by acute and chronic exposure to cocaine in rat. **Int Immunopharmacol**, v.3, n.4, p.581-92, 2003.

PASCUAL-LEONE, A.; DHUNA, A.; ALTAFULLAH, I. Cocaine-induced seizures. **Neurology**, v. 40, p.404, 1990.

PATEL, M., LIANG, L. P. Enhanced hippocampal F2-isoprostane formation following kainate-induced seizures. **J. Neurochem.**, v. 79, p.1065-1069, 2001.

PATEL, M., LI, Q. Y.; CHANG, L.Y. Activation of NADPH oxidase and extracellular superoxide production in seizure-induced hippocampal damage. **J. Neurochem.**, v. 92, p.123-131, 2005.

PAVLEK, L. R.; DILLARD, J.; ROGERS, L. K. The role of oxidative stress in toxicities due to drugs of abuse. **Current Opinion in Toxicology**, v. 20–21, p. 29–35, 2020.

PAXINOS, G., WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates., 1997.

PEARSON-SMITH, J. N. et al. Oxidative Stress Contributes to Status Epilepticus Associated Mortality. **Neurochemical Research**, v. 42, n. 7, p. 2024–2032, 2017.

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.

PILOCARPINA: Solução Oftálmica Estérel. Responsável técnica Elizabeth Mesquita. Guarulhos, São Paulo: **Allergan Produtos Farmacêuticos LTDA**, 2015. Disponível em: <<https://allergan-web-cdn-prod.azureedge.net/allerganbrazil/allerganbrazil/media/allergan-brasil/pilocarpina-profissional.pdf>> Acesso em: 25 abr. 2023.

PINHEIRO, C. U., Extrativismo, cultivo e privatização do Jaborandi (*Pilocarpus Microphyllus* Stapf Ex Holm., Rutaceae) no Maranhão, Brasil. **Acta Bot**, v.16: p.141 - 150, 2002.

POMIERNY-CHAMIOLO, L., MONICZEWSKI, A., WYDRA, K. Oxidative stress biomarkers in some rat brain structures and peripheral organs underwent cocaine. **Neurotoxicity research**., v. 23, n.1, p.92-102, 2013.

POON, H.F., ABDULLAH, L., MULLAN, M.A. Cocaine-induced oxidative stress precedes cell death in human neuronal progenitor cells. **Neurochem Int.**, v. 50, n.1, p. 69-73, 2007.

POTIER, S.; PSARROPOULOU, C. Endogenous acetylcholine facilitates epileptogenesis in immature rat neocortex. **Neurosci Lett.**, v. 302, n. 1, p. 25-8, 2011

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. 5, p. 40- 46, 2002.

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, 2017.

PUTTACHARY, S., SHARMA, S., STARK, S. Seizure-induced oxidative stress in temporal lobe epilepsy. **BioMed Res. Int.**, 2015.

REUTER, S., GUPTA, S.C., CHATURVEDI, M.M. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radic. Biol. Med.**, v. 49, n. 11, p.160-1616, 2010.

RIBEIRO, M., DUNN, J., SESSO, R. Causes of death among crack-cocaine users. **Braz. J. Psychiatry**, v. 28, n. 3, p. 196- 202, 2006.

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

RIEZZO, I., FIORE, C., DE CARLO, D. Side Effects of Cocaine Abuse: Multiorgan Toxicity and Pathological Consequences. **Current Medicinal Chemistry**, v.1, n.33, p. 5624–5646, 2012.

ROGGE, G.A., WOOD, M.A. The role of histone acetylation in cocaine-induced neural

plasticity and behavior. **Neuropsychopharmacology: Official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**. 2013; v. 38, n.1, p. 94-110, 2013.

ROLA, R., SWIADER, M., CZUCZWAR, S.J. Electroconvulsions elevate the levels of lipid peroxidation products in mice. **Pol J Pharmacol.**, v.54, p. 521-524, 2002.

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

SARTER, M., BRUNO, J. P., BERNTSON, G. G. Reticular Activating System. **Encyclopedia of Cognitive Science**, 2006.

SCHIAVONE, S. et al. The role of the NADPH oxidase derived brain oxidative stress in the cocaine-related death associated with excited delirium: A literature review. **Toxicology Letters**, v. 258, p. 29-35, 2016.

SCHNEIDER, C.D., OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **RBME**, v.10, n.10, p. 308-13, 2004.

SCHWARTZ, B. G., REZKALLA, S., KLONER, R. A. Cardiovascular Effects of Cocaine. **Circulation**, v.122, n.24, p. 2558-2569, 2010.

SHARKEY, J., RITZ, M. C., SCHENDEN, J. A. Cocaine inhibits muscarinic cholinergic receptors in heart and brain. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 246, p. 1048-1052, 1988.

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

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

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biol.**, v.4, p.180-183, 2015.

SINGH, S. et al. Anticonvulsive effects of chondroitin sulfate on pilocarpine and pentylenetetrazole induced epileptogenesis in mice. **Molecules**, v. 26, n. 22, 2021.

SMOLDERS, I. 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.

SORDI, A.O., PECHANSKY, F.H.P., KESSLER, Oxidative stress and BDNF as possible markers for the severity of crack cocaine use in early withdrawal. **Psychopharmacology**, v. 232, p. 4031- 9, 2014.

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.

TANEN, D.A.; GRAEME, K.A.; CURRY, S.C. Crack cocaine ingestion with prolonged toxicity requiring electrical pacing. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.**, v.38, p. 653-7, 2000.

THEROND, P., BONNEFONT-ROUSSELOT, D., DAVIT-SPRAUL, A. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v.3, n.5, p.373-384, 2000.

THOMAS, S.; CHERIAN, A. Status epilepticus. **Annals of Indian Academy of Neurology**, v. 12, n. 3, p. 140, 2009.

THURMAN, D.J., BEGHI, E., BEGLEY, C.E. Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy. **Epilepsia**, v.52, n.7, p.2-26, 2011.

TSAI, H. L.; CHANG, C. N.; CHANG, S. J. The effects of pilocarpine-induced status epilepticus on oxidative stress/damage in developing animals. **Brain and Development**, v. 32, n. 1, p. 25–31, 2010.

TSENG, C.C., DERLET, R.W., ALBERTSON, T.E. Cocaine-induced respiratory depression and seizures are synergistic mechanisms of cocaine-induced death in rats. **Ann. Emerg. Med.**, v. 21, n. 5, p. 486–493, 1993.

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.

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, 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.

UDDIN, M.S., KABIR, M.T. Oxidative stress in Alzheimer's Disease: molecular hallmarks of underlying vulnerability. In: Ashraf G, Alexiou A (eds) Biological, diagnostic and therapeutic advances in Alzheimer's disease, **1st edn. Springer Nature**, p. 91- 115, 2019.

UYS, J.D., KNACKSTEDT, L., HURT, P. Cocaine-induced adaptations in cellular redox balance contributes to enduring behavioral plasticity. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n.12, p.2551-2560, 2011.

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.

WIDMAIER, E. P.; RAFF, H.; STRANG, K. T. Fisiologia Humana - Os mecanismos das funções corporais. **14ª edição**. Guanabara Koogan, 26 de julho de 2012.

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

WINBERY, S., BLAHO, K., LOGAN, B. Multiple cocaine-induced seizures and corresponding cocaine and metabolite concentrations. **The American Journal of Emergency Medicine**, v.16, n.5, p. 529–533, 1998.

ZAGNONI, P., ALBANO, C. (2002), Psychostimulants and Epilepsy. **Epilepsia**, v. 43, p. 28-31, 2002.

ZAPARTE, A. et al. Early abstinence of crack-cocaine is effective to attenuate oxidative stress and to improve antioxidant defences. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 8, p. 1405–1413, 2015.

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

ZITKA, O., SKALICKOVA, S., GUMULEC, J. Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. **Oncology Letters**., v. 4, n. 6, p. 1247-53, 2012.