

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NA NEUROTOXICIDADE
INDUZIDA POR CETAMINA, ETANOL E A ASSOCIAÇÃO DE AMBAS
AS SUBSTÂNCIAS EM CÉLULAS SH-SY5Y**

Gabriela Otofugi Pereira

Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Tania Marcourakis

São Paulo

2020

À minha mãe, Kinue Otofugi Pereira, por ser meu maior exemplo de força e perseverança, por sempre ter me incentivado a seguir meus sonhos e por possibilitar tantas oportunidades únicas.

Ao meu pai, Paulo Inácio Pereira, por ser luz e sempre trazer boas energias para nossa família, por ser exemplo de amigo, força e compreensão e por todo seu amor e incentivo.

À minha irmã, Melina Otofugi Pereira, minha inspiração como mulher, acadêmica, pesquisadora e professora, por sempre acreditar em mim e nunca me deixar desistir, por ter estado ao meu lado sempre e pela boa amizade que cativamos.

À minha tia, Adriana Ayako Otofugi Leal, por ser empatia e amor, por possibilitar que hoje eu esteja concluindo minha graduação, por ter sido minha segunda mãe e por toda a dedicação, amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela bolsa de Iniciação Científica concedida a esse estudo, intitulado “ Nº 2018/18582-0, e ao projeto de Auxílio Regular do qual ele faz parte, intitulado “Exposição à cetamina, ao etanol e à associação de ambas as substâncias: avaliação da neurotoxicidade em células SH-SY5Y”, Nº 2017/21834-8, sob responsabilidade do Prof Dr Raphael Caio Tamborelli Garcia.

À Professora Doutora Tania Marcourakis, pela orientação desse trabalho, paciência, dedicação para ensinar e exemplo de mulher, farmacêutica e cientista. Obrigada por me inserir no mundo da neurociência e inspirar a ser uma profissional de excelência!

Ao Professor Doutor Raphael Caio Tamborelli Garcia, pela co-orientação desse trabalho, ensinamentos, confiança e por ter me acolhido dentre seus alunos com toda a paciência e apoio. Obrigada por possibilitar meu ingresso no mundo acadêmico e pela troca de conhecimentos!

À Mestra e amiga Stephanie de Oliveira Duro, pela amizade e companheirismo dentro e fora do laboratório, por ter me acompanhado nos meus experimentos, por ter me ensinado as técnicas para avaliação das enzimas antioxidantes e tudo mais que diz respeito às boas práticas de laboratório. Obrigada por me auxiliar nos momentos difíceis e sempre acreditar em mim, você é uma excelente amiga e profissional!

Aos meus colegas e amigos de Iniciação Científica, Emídio, Laísa, Maria e Rafaela, que me acolheram no grupo e que, em conjunto, possibilitaram o bom andamento dos nossos projetos. Obrigada pelos aprendizados, pelas vivências e por me ensinarem que o trabalho compartilhado sempre é melhor.

Às alunas de pós-graduação do Instituto de Farmacologia da Universidade Federal de São Paulo, Angélica, Michelle, Rafaela e Taís, pelos meses de aprendizado sobre cultura de células e boas práticas de laboratório.

Às colegas de bloco e amigas, Beatriz e Daniela, por todos os conselhos e cafés diários, que tornaram a rotina mais leve.

Aos colegas e amigos de laboratório, Jéssica, Lídia e Vitor, pelo acolhimento no laboratório, por me ensinarem tanto e pela parceria.

Aos meus queridos amigos, Nathany e Léo, por sempre estarem ao meu lado, nos bons e maus momentos, por sempre serem a segurança em meio ao caos e por sempre me incentivarem a ir em busca dos meus sonhos.

À minha querida amiga, Luana, por ter sido meu maior presente da graduação, sempre tão compreensiva e companheira, por ter me dado forças nos momentos difíceis no dia a dia, sempre com um bom conselho e por sempre colocar um sorriso no meu rosto.

Às minhas queridas amigas, Beatriz Batista, Beatriz Peixinho, Bruna Prates, Déborah Rigo, Gabriela Lima, Gabriela Rodrigues, Helena Chen e Júlia Passos, por terem me acompanhado, principalmente, nos anos finais da graduação, por serem paz em meio ao caos e por me apoiarem e me incentivarem a explorar novas oportunidades.

Às minhas queridas amigas e amigos da graduação, Beatriz Rocha, Bruna Costa, Bruna Rodrigues, Bruno Borges, Caio Nery, Camila Coelho, Gabriela Carvalho, Helena Tozetto, Isis Azeka, Júlia Passos, Júlia Seraphim, Juliana Canto, Kamila Holanda, Leonardo Cunha, Luani Damasceno, Nadine Santana, Renan Oliveira, Rodrigo Mazzeo, Sara Souza, Tatiana Dzik, Vanessa Valentini, e Vinicius Lima, por terem me acompanhado nessa jornada e por tornarem a faculdade um ambiente mais aconchegante.

Aos meus queridos amigos da graduação que fiz no Centro Acadêmico de Farmácia e Bioquímica, Cursinho Popular Clarice Lispector e Jornada Científica.

Ao meu avô, José Pedro Pereira, por ser minha inspiração enquanto pesquisador e profissional farmacêutico, por sempre ter me incentivado a seguir na minha carreira.

À minha tia, Maria de Lourdes Pereira, por sempre ter me apoiado e dado forças nos momentos difíceis.

Ao meu cunhado, João, por sempre estar presente nos bons e maus momentos e por me incentivar a ser uma pessoa melhor.

À minha namorada, Clara, por me incentivar a ir em busca dos meus sonhos e me lembrar das coisas boas que me fazem querer continuar, por todo o carinho e o amor.

Ao cachorro da família, Lollo, por seu amor incondicional e por sempre alegrar nossos dias.

À minha família por todo o amor e apoio, por mesmo longe estar presente sempre.

A todas e todos que contribuíram direta ou indiretamente com o desenvolvimento desse trabalho e da minha jornada ao longo da graduação.

Agradeço imensamente a todas e todos!

RESUMO

OTOFUJI, G. **Avaliação do estresse oxidativo na neurotoxicidade induzida por cetamina, etanol e a associação de ambas as substâncias em células SH-SY5Y.** 2020. no. 45. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Palavras-chave: cetamina, etanol, estresse oxidativo, SH-SY5Y, associação.

INTRODUÇÃO: A cetamina é um anestésico muito utilizado de forma ilegal por adolescentes e jovens adultos em festas e raves, devido ao fato de apresentar ações psicotrópicas diversas associadas à intensificação da interação social. O etanol, por sua vez, é uma substância legal e seu consumo é socialmente aceito, o que pode favorecer seu uso abusivo, bem como a associação com outras substâncias, como a cetamina, podendo causar danos irreversíveis ao sistema nervoso central.

OBJETIVO: Assim, o presente projeto visa investigar a presença de estresse oxidativo em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y expostas à cetamina, etanol e associação de ambas as substâncias. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foram realizadas curvas de concentração-resposta para as substâncias por meio de ensaios de viabilidade celular utilizando o teste de MTT, padronizadas as atividades das enzimas envolvidas no estresse oxidativo (glutationa peroxidase, GPx; glutationa redutase, GR; glutationa S-transferase, GST), com as determinações das concentrações ideais de células para cada enzima, e realizadas as determinações das suas atividades após exposição de 3 e 6 horas com cetamina, etanol e ambas as substâncias.

RESULTADOS: Por meio dos ensaios de MTT foram obtidos os valores de maior concentração sem efeito tóxico (NOAEL) e menor concentração em que há efeito tóxico (LOAEL) para a cetamina e o etanol, sendo eles 0,1 e 1,0 mM para cetamina e 10 e 100 mM para etanol, respectivamente, que foram utilizadas nas exposições para os experimentos desse trabalho. Determinou-se, por meio dos ensaios de padronização, a concentração de 1×10^6 células/mL para a realização dos experimentos de determinação de atividade enzimática. Verificou-se o aumento significativo de atividade de GPx no grupo associação KT_L e ET_N tanto em relação ao grupo controle quanto aos compostos isolados nas mesmas concentrações no período de exposição de 3 horas, porém, o mesmo grupo não apresentou alteração na atividade de GR, sugerindo prejuízo na redução da GSSG em GSH e consequente

comprometimento na capacidade antioxidante quando da exposição a esta associação. CONCLUSÃO: Sendo assim, tendo em vista que ambas as substâncias em estudo nesse projeto apresentam ação por meio da inibição não competitiva dos receptores NMDA, é possível que, quando utilizadas em associação, haja um sinergismo para indução da neurotoxicidade.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
CCR	Curva concentração-resposta
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta de cAMP
Cu ²⁺	Cobre
DFC	Droga facilitadora de crime
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECA	Estatuto da Criança e do Adolescente
EPM	Erro padrão médio
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ET	Etanol
g	Gravidade
GABA _A	Ácido gama-aminobutírico tipo A
GHB	Gama-hidroxibutirato
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GST	Glutationa S-transferase
h	Hora
iPSC	<i>Induced pluripotent stem cells</i>
KCl	Cloreto de potássio
KT	Cetamina
kg	Quilograma

L	Litro
LNUD	Levantamento Nacional do Uso de Drogas na População Brasileira
LOAEL ou L_c	Menor concentração em que há efeito tóxico
LSD	Ácido lisérgico dietilamida
M	Molar ou mol por litro
MDMA	Metilenodioximetanfetamina
mg	Miligramma
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólio
NADH	Dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NIDA	<i>National Institute of Drug Abuse</i>
nm	Nanômetro
NMDA	Receptor do tipo N-metil-D-aspartato
NOAEL ou N_c	Maior concentração sem efeito tóxico
NOX	NADPH oxidase
PBS	Tampão fosfato salina
pH	Potencial hidrogeniônico
PPAR-alfa	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa
rpm	Rotação por minuto
R^2	Coeficiente de determinação
SOD	Superóxido dismutase
TPP	Placa de Petri tratada
U	Unidade
X	Xenobiótico
μL	Microlitro
μM	Micromolar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Células de Neuroblastoma SH-SY5Y.....	18
Figura 2 – Reações casadas de oxidação e redução da glutationa.....	22
Figura 3 – Reação de redução da glutationa pela glutationa redutase	23
Figura 4 – Reação de conjugação catalisada pela glutationa S-transferase	24
Figura 5 – Resultados de viabilidade celular após exposição à cetamina por 48 horas	26
Figura 6 – Resultados de viabilidade celular após exposição a etanol por 48 horas	27
Figura 7 – Resultados de viabilidade celular após exposição à cetamina e etanol isolados e em associação por 3, 6, 12 e 48 horas	28
Figura 8 – Resultados da padronização das enzimas antioxidantes	30
Figura 9 – Resultados de atividade enzimática de glutationa peroxidase após exposição à cetamina e etanol isolados e em associação por 3 e 6 horas	31
Figura 10 – Resultados de atividade enzimática de glutationa redutase após exposição à cetamina e etanol isolados e em associação por 3 e 6 horas	32
Figura 11 – Resultados de atividade enzimática de glutationa S-transferase após exposição à cetamina e etanol isolados e em associação por 3 e 6 horas	33
Figura 12 – Reações de reciclagem da glutationa	34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 <i>Substâncias de estudo</i>	17
3.2 <i>Cultura de células SH-SY5Y.....</i>	17
3.3 <i>Ensaio de viabilidade celular</i>	18
3.4 <i>Preparo de amostras.....</i>	19
3.5 <i>Determinação da concentração proteica</i>	20
3.6 <i>Determinação da atividade das enzimas antioxidantes</i>	21
3.6.1 <i>Determinação da Atividade da Glutationa Peroxidase (GPx).....</i>	21
3.6.2 <i>Determinação da Atividade da Glutationa Redutase (GR)</i>	23
3.6.3 <i>Determinação da Atividade da Glutationa S-Transferase (GST).....</i>	24
3.7 <i>Análise estatística.....</i>	25
4. RESULTADOS	26
4.1 <i>Determinação das concentrações de cetamina e etanol</i>	26
4.2 <i>Determinação do período de exposição de cetamina e etanol</i>	27
4.3 <i>Padronização da atividade das enzimas antioxidantes.....</i>	29
4.4 <i>Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes.....</i>	31
5. DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÃO	39
7. REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

Club drugs são substâncias de abuso utilizadas tipicamente por adolescentes e jovens adultos, em ambientes de festas noturnas e *raves*, que apresentam diversas ações psicotrópicas, dentre elas, o aprimoramento da experiência social desses eventos (GAHLINGER, 2004; PARKS & KENNEDY, 2004; WU, SCHLENGER & GALVIN, 2006). Segundo o *National Institute of Drug Abuse* (NIDA), compõem o grupo das *club drugs* a metilenodioximetanfetamina (MDMA), a metanfetamina, o ácido lisérgico dietilamida (LSD), o gama-hidroxibutirato (GHB), o flunitrazepam e a cetamina (GUERREIRO et al., 2011). Elas são utilizadas com fins recreativos de intensificar as experiências sociais nas festas, por proporcionar a impressão de redução das sensações negativas, potenciação das sensações positivas e maior disposição para dançar por longos períodos (SMITH, LARIVE & ROMANELLI, 2002; Guerreiro et al., 2011). Wu, Schlenger e Galvin (2006) relatam em estudo observacional ($n = 19084$) que 20% dos adolescentes e jovens adultos, de 16 a 23 anos, estadunidenses já utilizaram ao menos uma *club drug* ao longo da vida.

A popularização das *club drugs* pode ser associada ao fato de se apresentarem em diversas formulações, como pílulas ou soluções, que podem ser administradas via oral, e a baixos preços, bem como o fato de que o público que as consome acredita que elas são inofensivas e seguras (SMITH, LARIVE & ROMANELLI, 2002; GAHLINGER, 2004, PARKS & KENNEDY, 2004). Além disso, diversos estudos relatam que o uso das *club drugs* é predominantemente associado a contextos sociais de festas e *raves*, fato que levou ao cunho do termo que nomeia a classe, relacionando as substâncias ao padrão de uso e não às características químicas ou efeitos desejados (GABLE, 2004; GAHLINGER, 2004; PARKS & KENNEDY, 2004).

Há diversos relatos do uso das *club drugs* em associação com etanol ou outras drogas para intensificar seus efeitos, que, por muitas vezes, pode implicar graves problemas de saúde física e mental (GAHLINGER, 2004; PARKS & KENNEDY, 2004). Tendo em vista a cultura de consumi-las associadas a outras drogas, o tratamento imediato de casos agudos de intoxicação por *club drugs*, e qualquer outra droga ilícita, baseia-se apenas na manutenção cardiorespiratória (GAHLINGER, 2004), uma vez que é possível que, por serem drogas ilícitas, as substâncias consumidas tenham sido adulteradas ou substituídas. Segundo Smith, Larive e Romanelli (2002), 70% dos

casos registrados em pronto atendimento relacionados à qualquer uma das *club drugs* envolviam o uso de mais de uma droga, sendo o etanol a substância mais comum utilizada em associação.

Dentre as *club drugs*, a cetamina vem apresentando aumento considerável em sua prevalência de uso, especialmente entre jovens adultos, de 0,9, para 1,2%, como relatado no estudo *Measuring the Future* de 2019 (SCHULENBERG et al, 2019). Essa substância é um anestésico derivado da fenciclidina que começou a ser utilizado na década de 1960, porém, seu uso clínico atualmente é limitado, sendo mais utilizado na prática veterinária, uma vez que apresenta reações adversas como alucinações, delírios e alterações no estado sensorial (SMITH, LARIVE & ROMANELLI, 2002). Entretanto, tais reações pareceram atrativas para seu uso recreativo e ilegal, principalmente como *club drug*, por proporcionar aumento da interação social e propriedades “entactógenas”, ou seja, que elevam a sensação de proximidade física, empatia e euforia (GAHLINGER, 2004). Acredita-se que a cetamina começou a ser utilizada de forma recreativa ao longo da década de 1980 e, principalmente, como adulterante de MDMA, porém, com a familiarização de seus efeitos, seu uso como droga única tornou-se mais popular entre os frequentadores de festas e *raves* (SMITH, LARIVE & ROMANELLI, 2002).

Por apresentar uma rota de síntese complexa, a maior fonte ilícita de cetamina encontra-se no desvio de produtos humanos e veterinários adquiridos de forma legítima (SMITH, LARIVE & ROMANELLI, 2002; GAHLINGER, 2004), sendo assim, é válido ressaltar seu uso abusivo por parte de profissionais de saúde, cujo acesso é facilitado. Enquanto produto farmacêutico, é comercializada na forma de solução ou em pó e pode ser administrada por via oral ou intravenosa, entretanto, se submetida à secagem, como comumente ocorre no uso recreativo, pode ser inalada ou adicionada a misturas com tabaco e maconha e, então, ser fumada (SMITH, LARIVE & ROMANELLI, 2002; GUERREIRO et al., 2011).

Em baixas doses, a cetamina apresenta efeitos dissociativos, analgésicos, alucinações visuais, desinibição social, que são manifestações desejadas pelos indivíduos que a utilizam, bem como a procura do fenômeno chamado *k-hole*, um estado com sensação de dissociação corporal e alterações na percepção de espaço e tempo, e seus efeitos manifestam-se rapidamente após a administração e duram

cerca de 30 a 45 minutos (GAHLINGER, 2004; GUERREIRO et al., 2011). Entretanto, há possibilidade de intoxicação, principalmente quando utilizada em associação com outras drogas, com manifestações como taquicardia, palpitações, hipertensão, amnésia anterógrada e, seu uso crônico, pode levar a quadros de dependência e abstinência (SMITH, LARIVE & ROMANELLI, 2002; GABLE, 2004; GAHLINGER, 2004). Ainda, é válido ressaltar que pela facilidade de manipulação da cetamina, ela também pode ser classificada como droga facilitadora de crime (DFC), uma vez que, por ser uma substância inodora, insípida e incolor, pode ser adicionada em bebidas sem o consentimento do indivíduo e causar sedação e amnésia a doses mais altas (SMITH, LARIVE & ROMANELLI, 2002; SHBAIR, ELJABOUR & LHERMITTE, 2010).

O mecanismo de ação da cetamina baseia-se em sua ação antagonista não-competitiva dos receptores do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), bloqueando os canais de cálcio, o que parece estar relacionado com seu efeito anestésico, uma vez que provoca a diminuição da neurotransmissão associada a glutamato e aspartato (KOHRS & DURIEX, 1998; SMITH, LARIVE & ROMANELLI, 2002; GUERREIRO et al., 2011). Estudos em roedores apontaram que a exposição a substância em questão de forma crônica e em altas doses (80 mg/kg) pode levar à neurotoxicidade por apoptose durante o período de desenvolvimento encefálico, podendo também, causar déficits no aprendizado e na memória (WANG et al., 2014). Ito, Uchida e Makita (2015) observaram aumento da atividade das caspases-3 e -7, concentrações elevadas de espécies reativas de oxigênio, diminuição do potencial de membrana mitocondrial e de adenosina trifosfato (ATP) em cultura de neurônios derivados de iPSCs (do inglês *Induced pluripotent stem cells*) expostos à cetamina (0-500 µM) por 6 e 24 horas.

Quanto à prevalência do uso de cetamina, Wu, Schlenger e Galvin (2006) revelam que, dos adolescentes e jovens adultos estadunidenses que fazem uso de cetamina, 98% utilizaram três classes de drogas ou mais ao longo da vida e que 100% já fizeram uso de etanol. No Brasil, a prevalência do consumo de cetamina ao longo da vida é de 0,2% das pessoas entre 12 e 65 anos e a idade média do primeiro consumo é de 22,5 anos (BASTOS et al, 2017).

O etanol é uma substância cujo uso é legalizado e socialmente aceito, havendo, inclusive, a cultura de que seu consumo moderado pode ser um hábito saudável e fator de proteção para doenças cardiovasculares, fato confirmado por diversos

estudos (COSTA et al, 2004). Entretanto, seu consumo abusivo está associado ao desenvolvimento de cirrose, alguns tipos de câncer, violência e transtornos mentais (COSTA et al, 2004). Devido ao seu baixo peso molecular e hidrofilicidade, o etanol é facilmente absorvido e distribuído, além de ser capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica, podendo atuar em seus sítios no sistema nervoso central, bem como causar efeitos neurotóxicos, como alterações em vias glutamatérgicas, disfunção mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ZUO et al., 2017). Além disso, uma preocupação crescente nos últimos anos é o *binge drinking*, definido pelo Levantamento Nacional de Uso de Drogas pela População Brasileira (LNUD) de 2017 como o consumo de, ao menos, quatro, para mulheres, ou cinco, para homens, doses de etanol em uma única ocasião. Esse padrão de consumo, cuja prevalência é maior entre indivíduos de 18 a 34 anos, totalizando 43,8% dos consumidores em *binge* no Brasil, pode causar intoxicação, além de estar associado à violência e acidentes (BASTOS et al., 2017).

Segundo o VI Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio das Redes Pública e Privada de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras de 2010, o etanol e o tabaco são as drogas de maior prevalência de uso em toda a vida em todas as capitais do país (CARLINI et. al., 2010). Além disso, é válido citar que a idade média do primeiro consumo de etanol no Brasil é de 17,4 anos e que aproximadamente sete milhões de indivíduos menores de 18 anos (34,3%) relataram ter consumido etanol ao longo da vida, mesmo que, o Estatuto da Criança e do Adolescente (ECA) tenha alterado a Lei 13.106 , em 17 de março de 2015, de forma que torna crime a venda, o fornecimento ou a entrega de qualquer bebida alcoólica, ou outros produtos que possam causar dependência, a crianças ou adolescentes (BASTOS et al., 2017). Ainda, segundo o LNUD de 2017, 43,1% da população revela ter utilizado etanol no último ano, 30,1% nos últimos 30 dias, dos quais 16,5% revelam fazer seu uso em *binge*, além disso, 2,6% da população revela ter utilizado etanol e pelo menos uma substância ilícita no último ano (BASTOS et al., 2017).

Sabe-se que quando utilizado de forma crônica, o etanol atua como inibidor não competitivo dos receptores NMDA no córtex, núcleo *accumbens*, amígdala, hipocampo e área tegumentar ventral, o que interfere na neurotransmissão glutamatérgica e pode levar a alterações neuroplásticas em áreas responsáveis pela

memória e aprendizado, como hipocampo e núcleo caudado e putâmen (RAO et al., 2015). Apesar dos mecanismos de neurotoxicidade do etanol não serem completamente elucidados, estudos apontam que a apoptose induzida por etanol no período em que ainda há desenvolvimento neuronal é mediada por receptores do ácido gama-aminobutírico tipo A (GABA_A) e NMDA (IKONOMIDOU et al., 2000). Sabe-se também que o estresse oxidativo está envolvido na neurotoxicidade induzida pelo etanol. O uso de resveratrol, substância com propriedades antioxidantes, foi capaz de proteger os neurônios da raiz dorsal ganglionar *in vitro* expostos ao etanol (15 mg/mL, equivalente a 325,6 mM), diminuindo a quantidade de espécies reativas de oxigênio e malonaldeído, principais biomarcadores do estresse oxidativo (YUAN et al., 2013).

Nesse sentido, é sabido que atualmente o consumo de drogas em associação é comum entre adolescentes e jovens adultos, entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos neurotóxicos e as vias pelas quais ocorre a neurotoxicidade induzida pela associação de cetamina e etanol, o que torna a importância de estudos que investiguem os fenômenos decorrentes desse uso ainda maior.

2. OBJETIVOS

Este Trabalho de Conclusão e Curso teve como objetivo avaliar a neurotoxicidade da cetamina, do etanol e da associação das duas substâncias ao investigar os mecanismos envolvidos nos processos de morte neuronal, com ênfase no estresse oxidativo, por meio do uso de cultura de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

3. MATERIAL E MÉTODOS

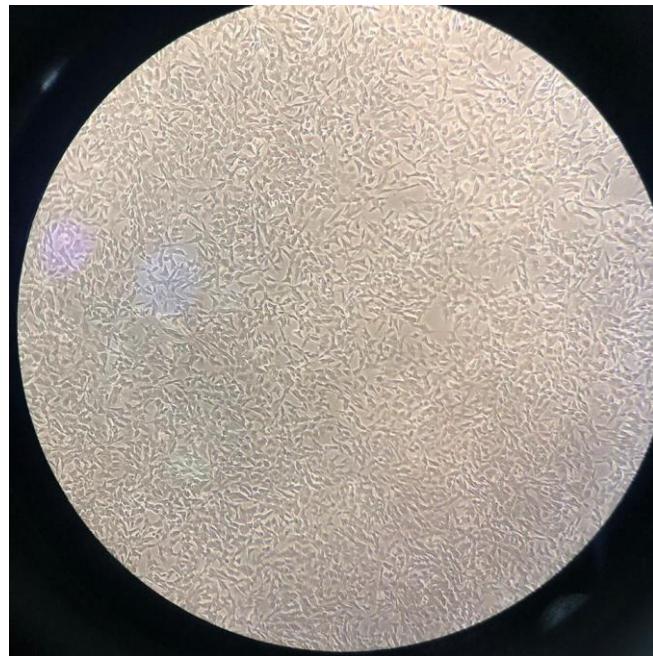
3.1 *Substâncias de estudo*

A cetamina (Dopalen®) foi adquirida por intermédio da Profa. Dra. Isis Machado Hueza (UNIFESP), médica veterinária e colaboradora deste projeto. O etanol (99%) foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich®.

3.2 *Cultura de células SH-SY5Y*

As células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC) foram cedidas pelos Profs. Dr. Gustavo J. S. Pereira e Dr. Rodrigo P. Ureshino do Departamento de Farmacologia da UNIFESP. O protocolo de descongelamento celular foi realizado com 10 mL de meio de cultura DMEM/HAM's F12 (contendo L-glutamina 2 mM e HEPES 3,5 g/L, LGC BIO), suplementado com soro fetal bovino (Thermo) 10% além de penicilina 50 U/mL e estreptomicina 50 µg/mL (LGC BIO) em tubo cônico de 15 mL. Após a centrifugação a 1500 rpm (252 x g) por 5 minutos, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet com 5 mL de meio de cultura DMEM/HAM's F12 suplementado e, posteriormente, realizado o cultivo celular em placas Petri (60 mm) tratadas (TPP). As células foram mantidas à 37°C e 5% de CO₂ e o meio de cultura foi trocado a cada 48 horas. As passagens foram realizadas ao se atingir uma confluência celular de 70-80% com a adição de 1 mL de tripsina 0,25% (LGC BIO). Após 5 minutos em estufa, a tripsina foi inativada com 5 mL de meio de cultura DMEM/HAM's F12 suplementado, o conteúdo foi centrifugado para descartar o sobrenadante, as células foram ressuspensas em meio de cultura DMEM/HAM's F12 suplementado e posteriormente cultivadas em placas Petri ou então plaqueadas para incubação com as substâncias de interesse.

Figura 1. Células de neuroblastoma SH-SY5Y.



Fonte: Autoria própria.

3.3 Ensaio de viabilidade celular

A determinação da viabilidade celular foi realizada por meio do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólio (brometo de tetrazólio ou MTT), que é utilizado para medir a atividade metabólica das células viáveis. O MTT é reduzido a formazan, um precipitado de coloração violeta, pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial, que é ativa em células com metabolismo da cadeia respiratória intacto. Assim, o formazan é quantificado espectrofotometricamente e apresenta correlação direta com o número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

As células SH-SY5Y foram mantidas em placas de 24 poços (1×10^5 células por poço) e incubadas com concentrações variadas de cetamina (0,001; 0,01; 0,1; 1; 2,5; 5; 7,5 e 10 mM) e etanol (0,1; 1; 10; 100; 250; 500; 750 e 1000 mM), por 24 e 48 horas. Uma solução de KCl 250 mM foi utilizada como controle positivo de morte celular. Após os períodos de incubação, o sobrenadante (meio de cultura) foi removido e as células foram lavadas com 400 µL de tampão fosfato salina (PBS) estéril a 37°C, por duas vezes. Em seguida, foram adicionados 400 µL de MTT 0,5 mg/mL em cada poço e a placa foi incubada em estufa (5% de CO₂ e 37°C) por 3 horas. Posteriormente, a solução de MTT foi removida para a adição de 700 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Após a homogeneização, 200 µL de cada poço foram transferidos, em triplicata, para

uma placa de 96 poços para a leitura da absorbância a 595 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle e o DMSO foi utilizado como branco (GARCIA et al., 2012).

As curvas concentração-resposta (CCR) de cada substância foram realizadas para se determinar a maior concentração sem efeito tóxico (NOAEL) e a menor concentração em que há efeito tóxico (LOAEL) para cada substância, ou seja, NOAEL do etanol (ET_N) e da cetamina (KT_N), e LOAEL do etanol (ET_L) e da cetamina (KT_L). Posteriormente, o efeito decorrente da associação das substâncias foi estudado por meio dos seguintes grupos: KT_N+ET_N , KT_L+ET_N , KT_N+ET_L e KT_L+ET_L .

Sendo assim, a determinação das concentrações de cetamina e etanol a serem utilizadas no projeto foram realizadas segundo os protocolos de ensaios de viabilidade celular por MTT, quatro ($n=4$) experimentos independentes para cada uma das exposições. Ainda, uma vez estabelecidas as concentrações a serem utilizadas nesse estudo, foram realizados, segundo os protocolos de ensaios de viabilidade celular por MTT, quatro ($n=4$) experimentos independentes para cada uma das exposições com os grupos KT_N , KT_L , ET_N e ET_L isoladas e em combinação por 3, 6, 24 e 48 horas, com o objetivo de determinar qual o período de exposição mais adequado para a determinação das atividades das enzimas antioxidantes. Além disso, todas as exposições foram realizadas com poços controle, apenas preenchidos com meio de cultura F-12, bem como poços de controle positivo de morte, apenas preenchidos com cloreto de potássio (KCl) 250 mM.

3.4 Preparo de amostras

Em uma placa de 12 poços, foram plaqueadas 4×10^5 células por poço contendo 1 mL de meio de cultura DMEM/HAM's F12 suplementado. Após 24 horas, realizou-se a exposição das células à cetamina, etanol e sua associação nas concentrações referentes aos valores de NOAEL e LOAEL de cada substância, de forma a combinar 9 grupos: controle, KT_N (0,1 mM); KT_L (1 mM); ET_N (10 mM); ET_L (100 mM); KT_N e ET_N ; KT_N e ET_L ; KT_L e ET_N ; KT_L e ET_L . Para a determinação do período de exposição das células à cetamina e etanol, após os períodos de incubação, de 3, 6, 24 e 48 horas, seguiu-se com o protocolo do ensaio de viabilidade celular pelo MTT descrito

anteriormente. Para a realização dos experimentos de determinação de atividade enzimática, após os períodos de incubação, de 3 ou 6 horas, realizou-se a retirada das células dos poços com 200 µL de tripsina 0,25% (LGC BIO) por poço e incubou-se por 5 minutos em estufa, sendo posteriormente inativada com 1 mL de soro fetal bovino (Thermo). O conteúdo de cada um dos poços foi transferido para um microtubo de 1500 µL, totalizando 9 microtubos, e, em seguida, após centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos, descartou-se o sobrenadante. Posteriormente, realizou-se um processo de lavagem com 1 mL de PBS 1x (solução de tampão fosfato), seguido de centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos.

Para a realização desses experimentos, ressuspendeu-se o conteúdo de cada microtubo em 400 µL de tampão fosfato 0,1M pH=7,4, obtendo-se uma concentração de 1×10^6 células/mL. Em seguida, o conteúdo de cada microtubo, foi submetido à sonicação por 5 segundos.

3.5 Determinação da concentração proteica

Este ensaio foi realizado com o Kit de quantificação de proteína BCA PierceTM, que consiste na detecção colorimétrica e quantificação total de proteína, por meio da redução de cobre (Cu^{2+}) e quebração de duas moléculas de ácido bicinconínico gerando um produto de coloração roxa. Esse complexo apresenta absorbância a 562nm que é linear com o aumento da concentração de proteínas.

Foram preparadas diluições de albumina nas concentrações de 50, 100, 125, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL, além das amostras de cada grupo de exposição, e pipetadas em triplicata com volume de 25 µL por poço numa placa de 96 poços. Em seguida, adicionou-se 200 µL de reagente de trabalho, composto por 50 partes de carbonato de sódio, ácido bicinconínico e tartarato de sódio em hidróxido de sódio 0,1 M e 1 parte de sulfato de cobre 4%, e agitou-se a placa por 30 segundos, seguido de incubação por 30 minutos a 37°C. Após o período de incubação, mediu-se a absorbância a 562 nm no espectrofotômetro.

3.6 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes

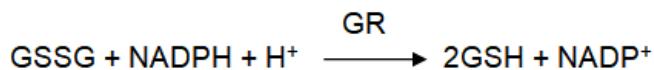
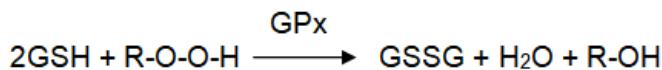
Para a determinação da atividade enzimática das enzimas antioxidantes, glutationa peroxidase, glutationa-S-transferase e glutationa redutase, foram realizados 5 experimentos independentes no período de 3 horas de exposição e 4 experimentos independentes no período de 6 horas de exposição. Além disso, todas as exposições foram realizadas com poços controle, apenas preenchidos com meio de cultura DMEM F-12. Os métodos encontram-se descritos a seguir.

Para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes foi necessária a padronização dos métodos para as células SH-SY5Y, empregadas nesse estudo. Sendo assim, a padronização foi realizada para cada enzima segundo os protocolos de ensaios de determinação da atividade das mesmas, como descritos a seguir, uma vez que o objetivo era determinar qual a concentração ideal de células para verificar a atividade em cada uma das enzimas. Em uma placa de 6 poços, foram plaqueadas 5×10^5 células por poço contendo 2 mL de meio de cultura DMEM/HAM's F12 suplementado. Após 24 horas, realizou-se a retirada das células dos poços com 200 µL de tripsina 0,25% (LGC BIO) por poço e incubou-se por 5 minutos em estufa, sendo posteriormente inativada com 1 mL de meio de cultura DMEM/HAM's F12 suplementado. O conteúdo de cada um dos poços foi transferido para um microtubo de 1500 µL, totalizando 6 microtubos, e, em seguida, após centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos, descartou-se o sobrenadante. Posteriormente, realizou-se um processo de lavagem com 1mL de PBS 1x (solução de tampão fosfato), seguido de centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos. Para a padronização dos experimentos, ressuspendeu-se o conteúdo de 1, 2 ou 3 microtubos em 500 µL de tampão fosfato 0,1 M pH=7,4, obtendo-se uma concentração de 1×10^6 , 2×10^6 e 3×10^6 células/mL, respectivamente. Em seguida, o conteúdo de cada microtubo, foi submetido à sonicação por 5 segundos.

3.6.1 Determinação da Atividade da Glutationa Peroxidase (GPx)

Este método baseia-se na medida indireta da atividade da GPx, por meio de uma reação casada com a glutationa redutase (GR). A glutationa oxidada (GSSG), produzida pela redução por hidroperóxidos pela GPx, é reciclada para gerar seu estado reduzido pela GR e NADPH (FLOHÉ & GÜZLER, 1984).

Figura 2. Reações casadas de oxidação e redução da glutationa.



Reações casadas de oxidação e redução da glutationa, gerando GSSG e GSH, respectivamente, pela glutationa peroxidase (GPx) e redutase (GR).

Fonte: Adaptado de Garcia, 2009.

O substrato utilizado neste ensaio é o terc-butil hidroperóxido. A oxidação de NADPH a NADP⁺ é acompanhada pelo decaimento da absorbância a 340 nm e à 37°C.

Adicionou-se em cada poço de uma placa de 96 poços, tampão fosfato 0,1 M pH=7,0 e EDTA 1 mM (qsp 200µL); 40 µL de amostra; 5µL de solução de glutationa reduzida (GSH) 80 mM; 0,048 U de glutationa redutase (5µL da solução 0,0096 U/µL). Essa mistura foi incubada por 5 minutos a 37°C, e em seguida foram adicionados 5µL de solução de terc-butil hidroperóxido 0,46% e 30µL de solução de NADPH 1,2 mM. O decréscimo na absorbância foi monitorado a 340nm por 5 minutos.

A atividade pode, então, ser determinada a partir da fórmula:

$$\text{Atividade} = \left[\frac{k}{\xi_{\text{NADPH}} \cdot b} \times \frac{200\mu\text{L}}{40\mu\text{L}} \times D \right] / \text{proteína}$$

Sendo:

Atividade: atividade específica da GPx (U/µg de proteína);

k: inclinação da curva de decaimento (min⁻¹);

b: caminho óptico (0,524 cm);

ξ_{NADPH} : $6,22 \times 10^{-3}$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$);

proteína: quantidade de proteínas totais utilizada no ensaio;

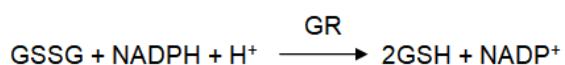
$\frac{200\mu\text{L}}{40\mu\text{L}}$: diluição da amostra na cubeta;

D = diluição da amostra no homogenato.

3.6.2 Determinação da Atividade da Glutationa Redutase (GR)

O método baseia-se na medida direta da atividade da GR, que utiliza o NADPH como cofator na redução da GSSG em GSH. A oxidação de NADPH a NADP⁺ é acompanhada pelo decaimento da absorbância a 340 nm e à 37°C (Calberg et al., 1975).

Figura 3. Reação de redução da glutationa pela glutationa redutase.



Reação de redução da glutationa oxidada (GSSG) em glutationa reduzida (GSH) pela glutationa redutase (GR).

Fonte: Adaptado de Garcia, 2009.

Preparou-se 10mL de meio reagente no momento do uso com 5 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 e EDTA 1 mM; 3 mL de EDTA 0,005 M; 3 mL de água deionizada, 2 mg de glutationa oxidada (GSSG) e 4 mg de NADPH. A seguir, adicionou-se 40 µL de amostra em cada poço de uma placa de 96 poços e 160 µL de meio reacional. O decréscimo dos valores de absorbância foi monitorado a 340 nm por 20 minutos à 37°C.

A atividade pode, então, ser determinada a partir da fórmula:

$$\text{Atividade} = \left[\frac{k}{\xi_{\text{NADPH}} \cdot b} \times \frac{200\mu\text{L}}{40\mu\text{L}} \times D \right] / \text{proteína}$$

Sendo:

Atividade: atividade específica da GR (U/µg de proteína);

k: inclinação da curva de decaimento (min⁻¹);

b: caminho óptico (0,524 cm);

ξ_{NADPH} : $6,22 \times 10^{-3}$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$);

proteína: quantidade de proteínas totais utilizada no ensaio;

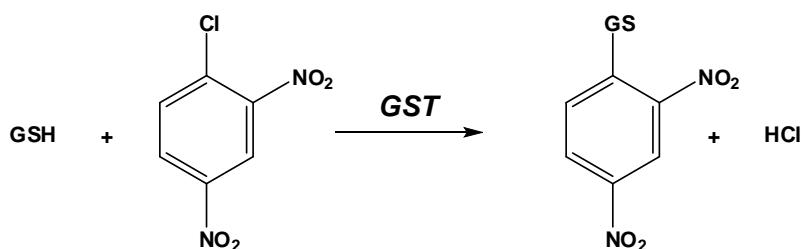
$\frac{200\mu\text{L}}{40\mu\text{L}}$: *diluição da amostra na cubeta;*

D = diluição da amostra no homogenato.

3.6.3 Determinação da Atividade da Glutationa S-Transferase (GST)

O método baseia-se na formação de um complexo entre a GSH e o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), catalisada pela GST. O aumento de absorbância é diretamente proporcional à atividade da GST na amostra (HABIG, PABST e JAKOBY, 1974).

Figura 4. Reação de conjugação catalisada pela glutationa S-transferase.



Reação de conjugação do 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno com a glutationa (GSH) catalisada pela glutationa S-transferase (GST).

Fonte: Garcia, 2009.

Adicionou-se, em cada poço de uma placa de 96 poços, 40 µL de amostra, 160 µL de tampão fosfato 0,1 M pH=6,5; 5µL de solução de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 0,1 M; essa mistura foi pré-incubada por 2 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 15 µL de glutationa reduzida (GSH) 0,1 M. O aumento na absorbância foi monitorado a 340 nm por 5 minutos à 25°C.

A atividade pode, então, ser determinada a partir da fórmula:

$$\text{Atividade} = \left[\frac{k}{\xi_{NADPH} \cdot b} \times \frac{200\mu\text{L}}{40\mu\text{L}} \times D \right] / \text{proteína}$$

Sendo:

Atividade = atividade específica da GST (U/µg de proteína);

k = inclinação da curva (min^{-1});

b = caminho óptico (0,524 cm);

$\xi_{CDNB} = 9,60 \times 10^{-3} (\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$;

proteína = quantidade de proteínas totais utilizada no ensaio;

$\frac{200\mu\text{L}}{40\mu\text{L}}$ = diluição da amostra na cubeta;

D = diluição da amostra no homogenato.

3.7 Análise estatística

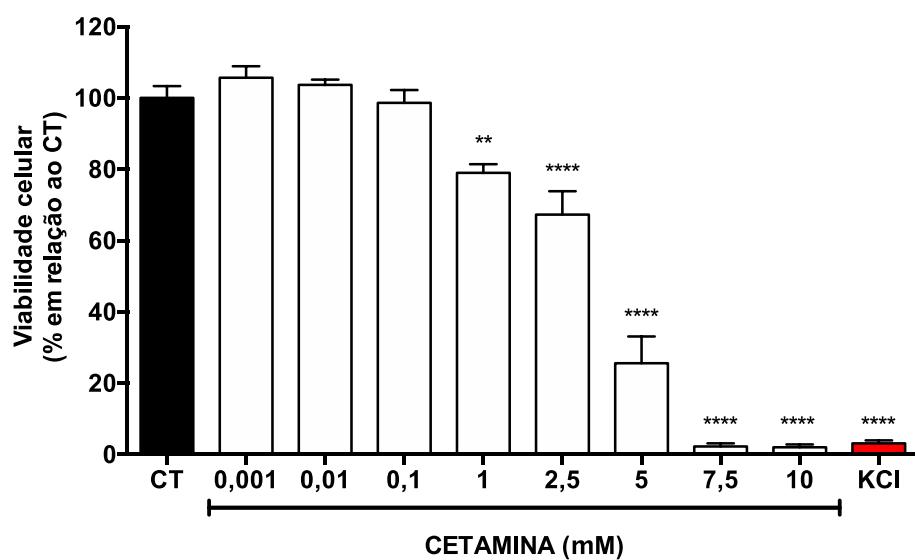
Os resultados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls. Os valores foram expressos como “*média ± erro padrão da média*” e as diferenças foram consideradas significativas para o valor $p<0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Determinação das concentrações de cetamina e etanol

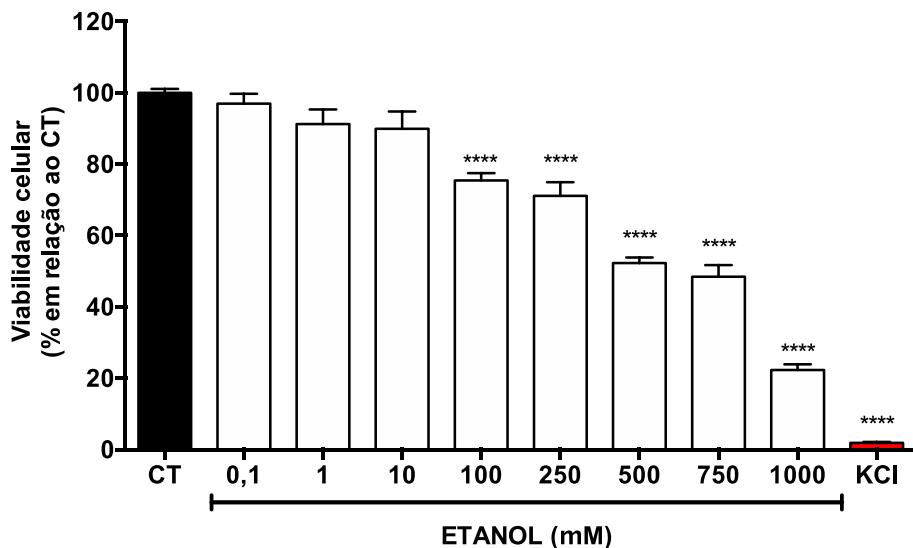
Os resultados de viabilidade celular pelo ensaio do MTT, obtidos de 4 experimentos independentes, permitiram a identificação da maior concentração sem efeito tóxico (NOAEL, do inglês *no observed adverse effect level*) e menor concentração em que há efeito tóxico (LOAEL, do inglês *lowest observed adverse effect level*) para cada uma das substâncias. Dessa forma, pode-se concluir que os valores de NOAEL e LOAEL de cetamina equivalem a 0,1 e 1,0 mM, respectivamente; enquanto que os valores de NOAEL e LOAEL de etanol equivalem a 10 e 100 mM, respectivamente (Figuras 5 e 6). Sendo assim, tais concentrações foram escolhidas para a realização dos testes de investigação da presença do estresse oxidativo decorrente da associação de ambas as substâncias.

Figura 5. Resultados de viabilidade celular após exposição à cetamina por 48 horas.



Resultados de viabilidade celular (MTT) após exposição à cetamina por 48 horas (N = quatro experimentos independentes em duplicata). CT = controle (meio de cultura suplementado); KCl = cloreto de potássio 250 mM (controle positivo de morte celular). ** $p<0,01$ e **** $p<0,0001$ em relação ao CT (ANOVA e comparação múltipla de Newman-Keuls).

Figura 6. Resultados de viabilidade celular após exposição a etanol por 48 horas.



Resultados de viabilidade celular (MTT) após exposição a etanol por 48 horas ($N =$ quatro experimentos independentes em duplicata). CT = controle (meio de cultura suplementado); KCl = cloreto de potássio 250 mM (controle positivo de morte celular). *** $p < 0,0001$ em relação ao CT (ANOVA e comparação múltipla de Newman-Keuls).

4.2 Determinação do período de exposição de cetamina e etanol

Ainda, a fim de determinar o período de exposição à cetamina e etanol mais adequado para avaliação das atividades das enzimas antioxidantes, foram realizados 4 experimentos independentes de viabilidade celular pelo ensaio de MTT com diferentes períodos de exposição a KT_N , KT_L , ET_N e ET_L isoladas e em combinação, além do grupo controle e controle positivo, cloreto de potássio (KCl) 250 mM, por 3, 6, 24 e 48 horas. Na figura 7, que apresenta os resultados obtidos nesses ensaios, é possível observar redução da viabilidade celular apenas a partir da exposição de 24 horas, o que indica que os tempos de 3 e 6 horas de exposição se referem ao período que antecede a morte celular. Sendo assim, foram escolhidos os períodos de 3 e 6 horas de exposição para avaliação das atividades das enzimas antioxidantes.

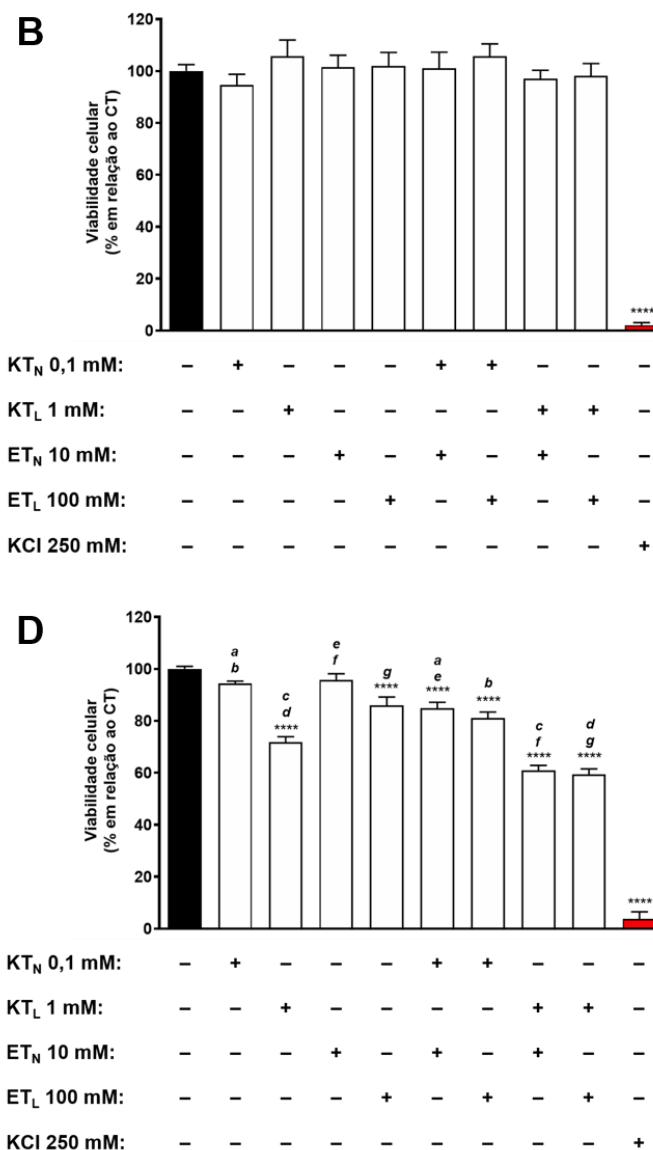
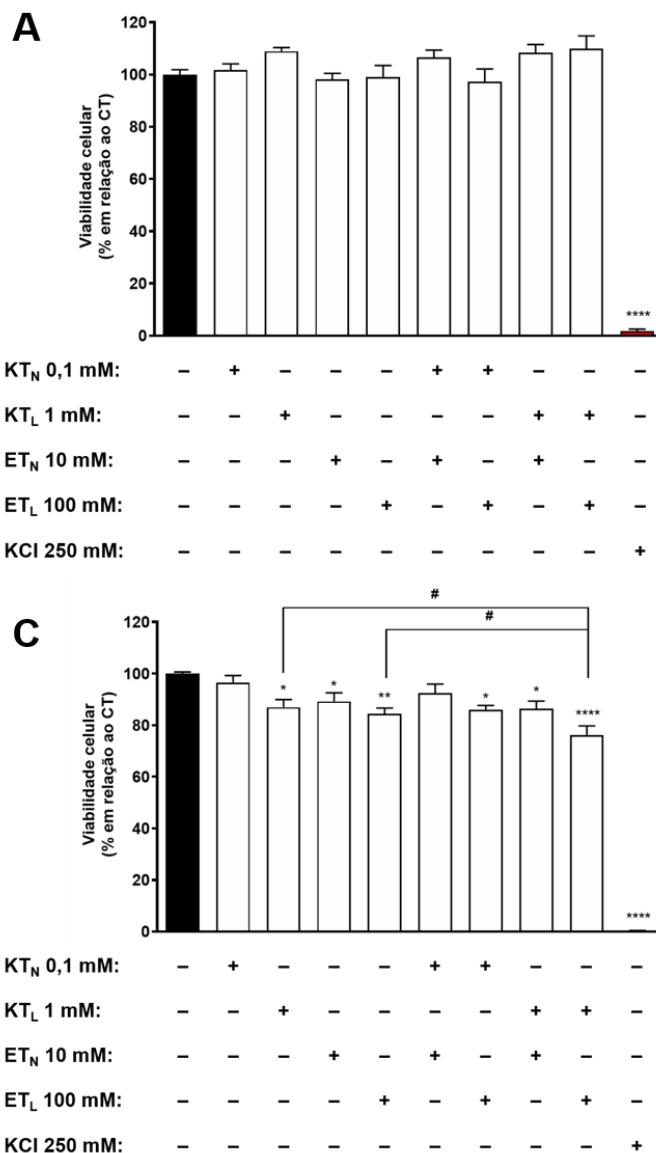


Figura 7. Resultados de viabilidade celular após exposição à cetamina e etanol isolados e em associação por 3, 6, 12 e 48 horas.

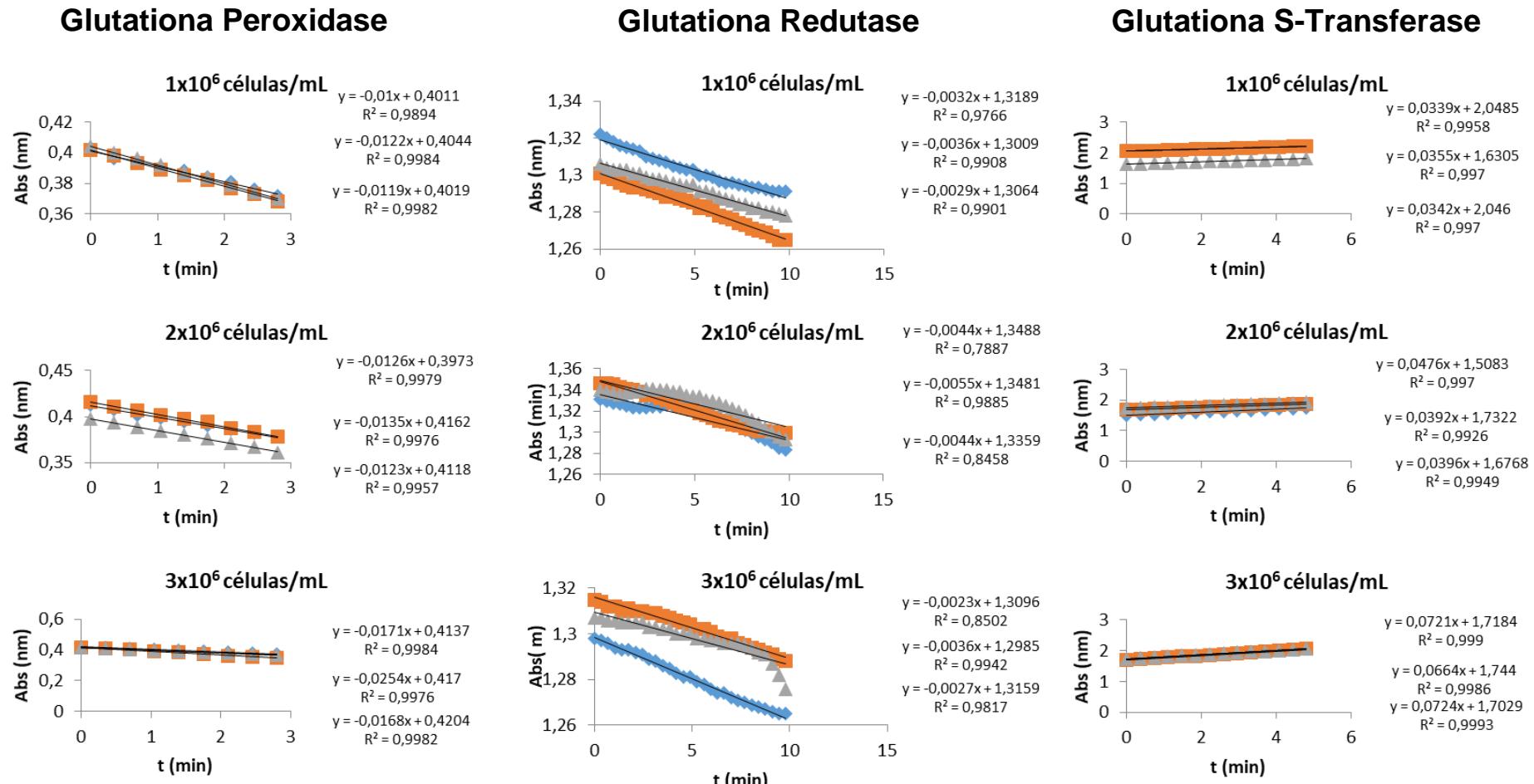
Resultados do ensaio de viabilidade celular em 3 (A), 6 (B), 24 (C) e 48 (D) horas de exposição a KT_N, KT_L, ET_N e ET_L isoladas e em combinação, além do grupo controle e controle positivo, cloreto de potássio (KCl) 250 mM. ($n=4$ experimentos independentes) Ainda, “+” representa presença de substância; “-” representa ausência de substância.

* $p<0,05$; *** $p<0,001$ e **** $p<0,0001$ em relação ao CT; $\#p<0,05$ entre os grupos; $\text{a}p<0,05$ entre os grupos KT_N e KT_N+ET_N, $\text{b}p<0,001$ entre os grupos KT_N e KT_N+ET_L, $\text{c}p<0,01$ entre os grupos KT_L e KT_L+ET_N, $\text{d}p<0,01$ entre os grupos KT_L e KT_L+ET_L, $\text{e}p<0,01$ entre os grupos ET_N e KT_N+ET_N, $\text{f}p<0,0001$ entre os grupos ET_N e KT_L+ET_N, $\text{g}p<0,0001$ entre os grupos ET_L e KT_L+ET_L, (ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls).

4.3 Padronização da atividade das enzimas antioxidantes

A concentração ideal de células para a realização dos ensaios foi aquela em que os valores de inclinação da reta variaram pouco entre as triplicatas e em que os valores de R^2 foram mais próximos a 0,99, que corresponde a 1×10^6 células/mL para todas as enzimas, como demonstrado na Figura 8.

Figura 8 – Resultados da padronização das enzimas antioxidantes

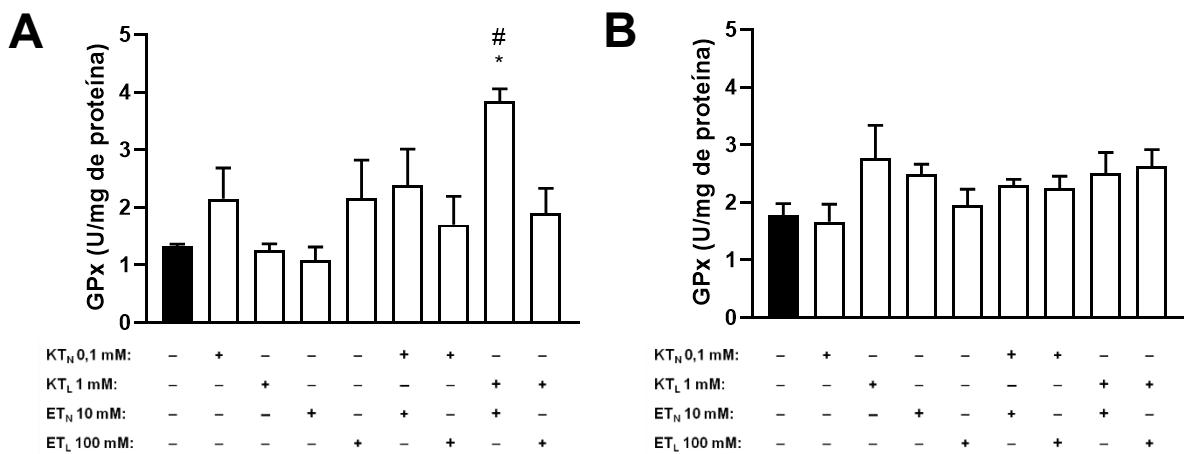


Gráficos referentes à padronização para cada uma das enzimas antioxidantes, segundo os protocolos de determinação de atividade. Para os experimentos desse trabalho, utilizou-se a concentração de 1×10^6 células/mL para todas as enzimas. Abs: absorbância; min: minuto; nm: nanômetro; t: tempo.

4.4 Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes

A Figura 9 apresenta os resultados da atividade enzimática de GPx, responsável pela oxidação de glutationa reduzida em glutationa oxidada.

Figura 9 – Resultados de atividade enzimática de glutationa peroxidase após exposição à cetamina e etanol isolados e em associação por 3 e 6 horas

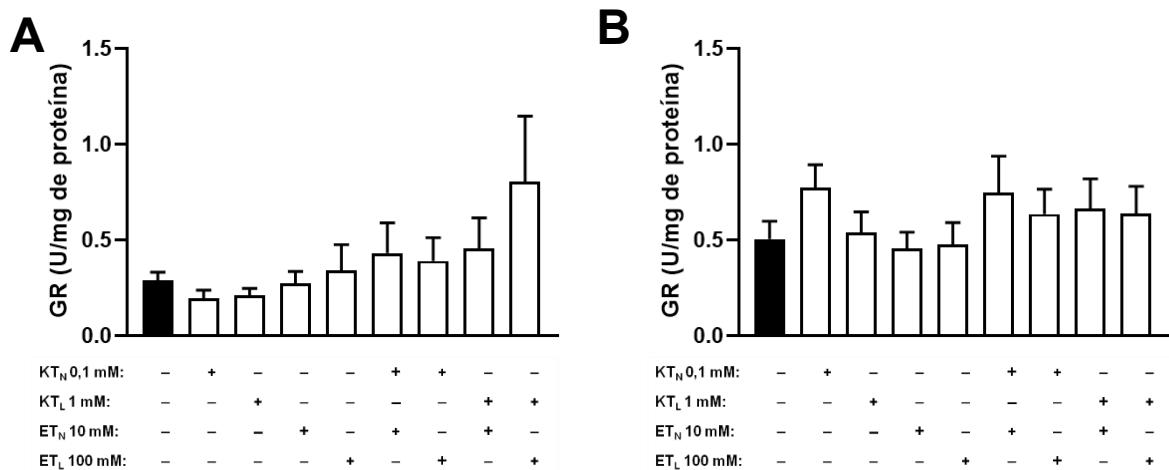


Resultados de atividade enzimática de glutationa peroxidase (GPx) após exposição à cetamina, etanol e associação por 3 (A) e 6 (B) horas. * $p<0,05$ em relação ao CT e # $p<0,05$ em relação às substâncias isoladas (ANOVA e comparação múltipla de Newman-Keuls).

Ao analisar os resultados, na exposição de 3 horas (Figura 9A), é possível verificar que houve aumento significativo da atividade de GPx no grupo associação KT_L e ET_N tanto em relação ao grupo controle ($p<0,05$) quanto aos compostos isolados nas mesmas concentrações ($p<0,05$), o que pode indicar a possibilidade de ação sinérgica para o aumento da atividade enzimática. Entretanto, tal alteração significativa não é observada nos grupos restantes, assim como na exposição de 6 horas (Figura 9B).

A Figura 10 apresenta os resultados da atividade enzimática de GR, enzima responsável pela conversão de glutationa oxidada em glutationa reduzida, contribuindo, assim, para o sistema antioxidante.

Figura 10 – Resultados de atividade enzimática de glutationa redutase após exposição à cetamina e etanol isolados e em associação por 3 e 6

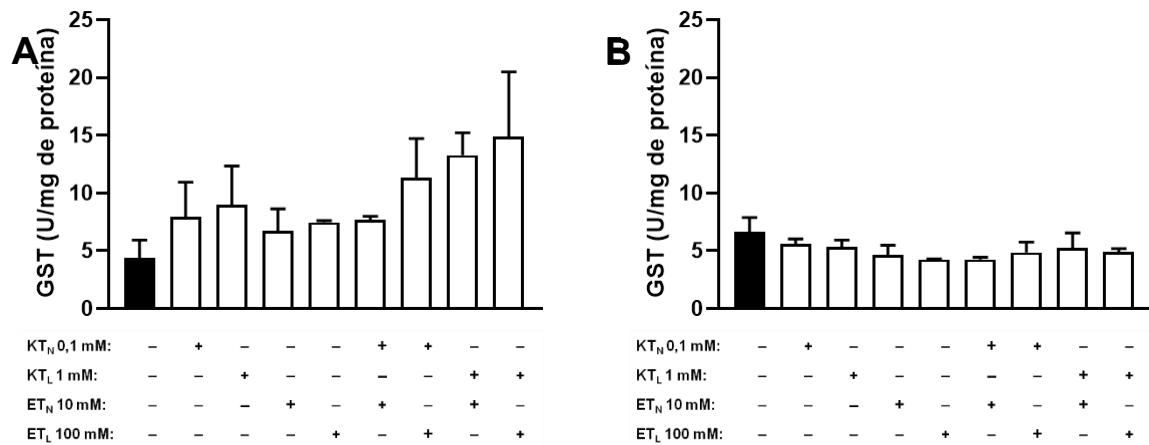


Atividade enzimática de glutationa redutase (GR) após exposição à cetamina (KT), etanol (ET) e associação por 3 (A) e 6 (B) horas.

Analizando os resultados, pode-se observar que não foram encontradas alterações significativas na atividade da GR. Entretanto, é possível que o alto erro padrão médio (EPM) no grupo KT_L e ET_L tenha prejudicado observância de aumento significativo da atividade da GR na exposição de 3 horas (Figura 10A). Porém, na exposição de 6 horas (Figura 10B) não houve aumento de atividade da enzima, o que pode sugerir um possível aumento da atividade de GR em 3 horas e redução com o aumento das horas de exposição.

A Figura 11 apresenta os resultados da atividade enzimática de GST, enzima responsável pela conjugação de xenobióticos para consequente eliminação, contribuindo, assim, para o sistema antioxidante.

Figura 11 – Resultados de atividade enzimática de glutationa S-transferase após exposição à cetamina e etanol isolados e em associação por 3 e 6 horas



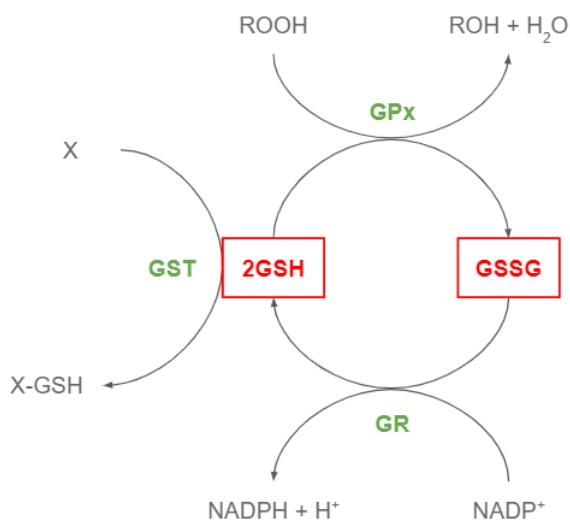
Atividade enzimática de glutationa S-transferase (GST) após exposição à cetamina (KT), etanol (ET) associação por 3 (A) e 6 (B) horas.

A análise dos resultados mostra que não houve alterações significativas na atividade de GST. Entretanto, o considerável EPM pode ter mascarado uma possível diferença no aumento de atividade de GST principalmente dos grupos de associação em relação ao controle na exposição de 3 horas (Figura 11A).

5. DISCUSSÃO

O estresse oxidativo é uma condição fisiopatológica em que há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o funcionamento de sistemas antioxidantes resultando em perturbação do metabolismo celular, potenciais danos aos constituintes celulares e até morte celular, que pode ser induzida por xenobióticos ou doenças (LUSHCHAK, 2014). Dessa forma, desempenha um papel de grande importância o sistema antioxidante das enzimas relacionadas à glutationa, composto pela enzima GPx, que é responsável pela oxidação da glutationa reduzida (GSH) em glutationa oxidada (GSSG); pela GR, que, por sua vez, reduz GSSG a GSH novamente; e pela GST, que é responsável pela reação de conjugação de GSH com um xenobiótico (X) para posterior eliminação (Figura 12). Quando os sistemas antioxidantes não são suficientes para conter o estresse oxidativo, as consequências podem ser minimizadas com a indução de apoptose e, ainda, quanto mais tardar o início da ação de mecanismos de minimização de danos é mais provável que ocorra o cenário descontrolado de necrose (LUSHCHAK, 2014), seja esse processo desencadeado por uma condição fisiopatológica ou induzido por xenobiótico.

Figura 12 – Reações de reciclagem da glutationa



Reações de reciclagem da glutationa. A enzima glutationa peroxidase (GPx) é responsável pela oxidação da glutationa reduzida (GSH) em glutationa oxidada (GSSG), que, por sua vez, é reduzida novamente a GSH pela glutationa redutase (GR). A glutationa-S-transferase é responsável pela reação de conjugação de GSH com um xenobiótico (X).

Fonte: Autoria própria.

Estudos recentes apontam papel importante do estresse oxidativo na neurotoxicidade induzida pela cetamina. De Carvalho Cartágenes et al (2019) verificaram aumento nas concentrações de malonaldeído, marcador da peroxidação lipídica, no hipocampo, apesar de não haver alteração em enzimas como catalase, responsável pela metabolização de peróxido de hidrogênio, e superóxido dismutase, responsável pela transformação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio, em ratos Wistar adolescentes após exposição aguda à cetamina na dose de 10 mg/kg/dia por 2 dias (GARCIA et al., 2009). Ito, Uchida e Makita (2015) observaram aumento de 40% da atividade das caspases 3 e 7, envolvidas nos estágios iniciais da apoptose, aumento de 14% da produção de espécies reativas de oxigênio e redução de 81% do potencial de membrana mitocondrial em cultura de neurônios derivados de iPSC (*induced Pluripotent Steam Cells*) após exposição à 500 µM de cetamina por 24 horas em relação às células não tratadas. Com base nesses resultados, os autores criaram a hipótese de que a cetamina pode induzir uma disfunção no sistema de fosforilação oxidativa na mitocôndria, uma vez que foi verificada redução na oxidação de NADH a NAD⁺ (Ito, Uchida & Makita, 2015). Além disso, Félix (2018) propõe um mecanismo de ativação de p53, gene supressor tumoral responsável pela indução de apoptose, em consequência do estresse oxidativo gerado pela exposição à cetamina em embriões de *zebrafish* (FÉLIX et al., 2018), enquanto Wang (2017) aponta que diversas linhas de pesquisa demonstraram que a exposição prolongada à cetamina pode afetar subunidades específicas do receptor NMDA, de forma a alterar sua função e elevar a geração de EROs que, em conjunto, contribuem para o dano neuronal (WANG et al., 2017).

Em condições fisiológicas, para que haja sobrevivência celular, o equilíbrio adequado entre os radicais livres e os níveis de antioxidantes é primordial (PEREIRA, ANDRADE E VALENTAO, 2015). O etanol, por sua vez, pode alterar significativamente a atividade das enzimas antioxidantes no sistema nervoso central de animais expostos a ele de forma crônica. Luo (2014) aponta que, nos neurônios, as EROs produzidas pela exposição ao etanol provém da disfunção mitocondrial e a ativação da NADPH oxidase (NOX). Uma vez que a administração de antioxidantes leva ao bloqueio parcial do fluxo autofágico induzido pelo etanol, sugere-se que o estresse oxidativo e a interrupção da homeostase de cálcio intracelular podem ser mecanismos pelos quais há indução do processo autofágico (LUO, 2014). Nesse

sentido, é válido ressaltar, que a autofagia é um processo em que macroproteínas e, até mesmo, organelas são capturadas para lisossomos para que possam ser degradadas e, assim, reciclar os componentes para formação de novas estruturas ou convertidas a energia (D'ARCY, 2019). Segundo D'Arcy (2019), a autofagia pode ser iniciada por fatores estressantes, como a privação de nutrientes e exposição a agentes tóxicos, e ela também está envolvida nas respostas imunes inatas contra patógenos intracelulares, apresentando efeito protetivo, ou destruir a célula por completo, ao reciclar os componentes celulares, em situações de senescência celular.

Após exposição aguda e crônica ao etanol, estudos verificaram o surgimento de distúrbios no metabolismo mitocondrial, com diminuição na produção de ATP e geração exacerbada de EROs, eventos que contribuem para a suscetibilidade à apoptose celular e morte por estresse oxidativo (PEREIRA, ANDRADE E VALENTAO, 2015). Quando se fala de estresse oxidativo enquanto mecanismo de neurotoxicidade, é válido ressaltar o papel da fosforilação de CREB, proteína de ligação ao elemento de resposta de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), que é essencial para a expressão do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa (PPAR-alfa). As principais funções do PPAR-alfa são a manutenção da integridade e função neuronal, por meio da regulação do metabolismo de energia celular, biogênese mitocondrial e mecanismo antioxidante celular (O'NEILL, 2000; FRIEDMAN, 2001; JOHN et al., 2005). Sendo assim, a *down-regulation* de PPAR-alfa está relacionada ao comprometimento das funções neurais e, consequentemente, a danos neuronais. Nesse sentido, Liu (2014) mostrou que o etanol pode reduzir a expressão de PPAR-alfa, ao reduzir a fosforilação de CREB por meio da redução das concentrações de cAMP intracelular em células neuronais, contribuindo, assim, para um aumento da concentração de EROs intracelular, disfunção mitocondrial e, consequentemente, danos neuronais relacionados à neurotoxicidade do etanol (PEREIRA, ANDRADE E VALENTAO, 2015).

Ainda, o uso de resveratrol, substância com propriedades antioxidantes, foi capaz de proteger os neurônios da raiz dorsal ganglionar *in vitro* expostos a 325,6 mM de etanol, diminuindo a quantidade de EROs e malonaldeído, importantes biomarcadores do estresse oxidativo (YUAN et al., 2013), o que pode indicar que o estresse oxidativo está presente na neurotoxicidade induzida por etanol.

Tendo em vista os efeitos da exposição à cetamina e ao etanol separadamente nos neurônios no que diz respeito ao estresse oxidativo, buscou-se por estudos que avaliassem os efeitos de ambas as substâncias em associação, a fim de comparar os resultados obtidos no presente estudo. Em experimento com células PC12, Zuo (2017) verificou o aumento significativo de EROs após exposição ao etanol (60 mM) ou cetamina (100 µM) em relação ao grupo controle e dos grupos associação em relação aos grupos etanol e cetamina isoladamente. Ainda, Zuo (2018) também observou, após exposição de ratos Sprague–Dawley machos a etanol (4g/kg) e cetamina (30mg/kg) por 14 dias consecutivos, a ruptura da estrutura mitocondrial com fragmentação das membranas, por meio de análise por microscopia eletrônica de hipocampo, resultado obtido nos grupos associação e no grupo cetamina, mas não no grupo etanol. Além disso, a expressão da proteína do citocromo C, responsável pelo transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, foi investigada por *western blotting* e verificou-se aumento de sua expressão no grupo cetamina em relação ao controle e no grupo associação em relação à cetamina sozinha, o que pode indicar uma disfunção mitocondrial na administração associada (ZUO et al., 2018).

Nesse sentido, os resultados obtidos no presente estudo, como o aumento significativo de atividade de GPx no grupo associação KT_L e ET_N tanto em relação ao grupo controle quanto aos compostos isolados nas mesmas concentrações no período de exposição de 3 horas e, que o mesmo grupo não apresentou alteração significativa na atividade de GR, sugerem a possibilidade de haver um prejuízo na redução da GSSG em GSH e consequente comprometimento na capacidade antioxidante quando da exposição a esta associação, resultados que vão ao encontro dos obtidos por Zuo (2017, 2018), no que diz respeito à presença de marcadores do estresse oxidativo quando associa-se etanol e cetamina.

Levando-se em consideração o mecanismo de ação da cetamina, ou seja, sua ação antagonista não competitiva nos receptores NMDA, o que inibe a excitabilidade dos neurônios relacionados à dor para induzir sua atividade anestésica dissociativa (CORAZZA et al., 2013), assim como o mecanismo de ação do etanol, que atua como inibidor não competitivo dos receptores NMDA no córtex, núcleo *accumbens*, amígdala, hipocampo e área tegumentar ventral, a associação entre ambas as substâncias pode interferir na neurotransmissão glutamatérgica e levar a alterações

neuroplásticas em áreas responsáveis pela memória e aprendizado (RAO et al., 2015).

Uma revisão da literatura conduzida por Olney (2000) aponta que o fato do etanol apresentar propriedades antagonistas de NMDA e modular positivamente os receptores GABA_A, traz a reflexão acerca da habilidade de mimetizar os efeitos pro-apoptóticos dos antagonistas de NMDA e GABA miméticos. Após administração de etanol a ratos de 7 dias de idade, avaliou-se por microscopia eletrônica que a resposta neurotóxica induzida pelo etanol é compatível com os critérios de morte celular por apoptose e que seu mecanismo é composto pelos mesmos padrões observados em antagonistas de receptor NMDA e GABA miméticos (IKONOMIDOU et al., 2000).

Por fim, diversos estudos apontam que a administração de tais drogas enquanto o SNC ainda está em desenvolvimento, torna-o ainda mais vulnerável à neurotoxicidade por elas induzidas, podendo acarretar déficits cognitivos e de memória irreversíveis. Sendo assim, no que diz respeito aos estudos futuros relacionados ao consumo em associação dessas substâncias, seria de grande interesse investigar o comportamento de outros marcadores do estresse oxidativo, como malonaldeído, marcador da peroxidação lipídica; 3-nitrotirosina, marcador do metabolismo do óxido nítrico; superóxido dismutase (SOD), enzima responsável pela transformação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio; e catalase, enzima responsável pela transformação do peróxido de hidrogênio em água. Mais ainda a compreensão do papel do receptor NMDA nessa associação trará grande contribuição, uma vez que ambas as substâncias apresentam ação nesse sítio, ao que tudo indica, de forma sinérgica. Uma vez que o grande consumo deste tipo de drogas se faz por adolescentes e jovens adultos, espera-se que os próximos estudos possam fornecer subsídios suficientes para o desenvolvimento de políticas públicas de conscientização, controle, tratamento e prevenção do uso abusivo dessas e de outras substâncias.

6. CONCLUSÃO

A cetamina, anestésico utilizado ilicitamente como *club drug* devido aos seus efeitos de aumento da interação social e delírios, é amplamente consumida em ambientes de festas e *raves* por adolescentes e jovens adultos, nas quais é muito comum a administração conjunta com outras drogas, como o etanol. Esse estudo buscou avaliar o papel do estresse oxidativo na toxicidade induzida por cetamina e etanol em associação em células de neuroblastoma SH-SY5Y e obteve como principais resultados a determinação dos valores de NOEAL e LOAEL para cetamina, 0,1 e 1,0 mM, e etanol, 10mM e 100mM, respectivamente; a padronização da concentração para amostras de células de neuroblastoma SH-SY5Y em 1×10^6 células/mL para os ensaios de determinação de atividade das enzimas do estresse oxidativo relacionadas à glutationa; o aumento significativo de atividade de GPx no grupo associação KT_L e ET_N tanto em relação ao grupo controle quanto aos compostos isolados nas mesmas concentrações no período de exposição de 3 horas. Além disso, é importante destacar que o mesmo grupo não apresentou alteração na atividade de GR, sugerindo prejuízo na reciclagem de GSSG em GSH e, consequentemente, comprometimento na capacidade antioxidante diante da exposição a essas substâncias em associação. Sendo assim, tendo em vista que ambas as substâncias em estudo nesse projeto apresentam ação por meio da inibição não competitiva dos receptores NMDA, é possível que, quando utilizadas em associação, haja um sinergismo para indução da neurotoxicidade.

7. REFERÊNCIAS

- BASTOS, F., VASCONCELLOS, M., BONI, R., REIS, N., COUTINHO, C (org). III Levantamento Nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira. Rio de Janeiro, FIOCRUZ/ICICT, 2017. 528 p. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/34614>>.
- CARLINI, E., NOTO, A., SANCHEZ, Z., CARLINI, C., LOCATELLI, D., ABEID, L., AMATO, T., OPALEYE, E., TONDOWSKI, C., MOURA, Y. VI Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio das Redes Pública e Privada de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras – 2010/São Paulo: CEBRID - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas: UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo 2010. SENAD - Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas, Brasília – SENAD, 2010. 503 p.
- CORAZZA, O.; ASSI, S.; SCHIFANO, F. From "Special K" to "Special M": the evolution of the recreational use of ketamine and methoxetamine. **CNS Neurosci Ther**, v. 19, n. 6, p. 454-60, Jun 2013. ISSN 1755-5949 (Electronic). 1755-5930 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23421859>>.
- COSTA, J. S., SILVEIRA, M. F., GAZALLE, F. K., OLIVEIRA, S. S., HALLAL, P. C., MENEZES, A. M., GIGANTE, D. P., OLINTO, M. T., MACEDO, S. Heavy alcohol consumption and associated factors: a population-based study. **Rev Saude Publica**, v. 38, n. 2, p. 284-91, Apr 2004. ISSN 0034-8910 (Print) 0034-8910.
- D'ARCY, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biol Int**, v. 43, n. 6, p. 582-592, Jun 2019. ISSN 1065-6995.
- DE CARVALHO CARTAGENES, S., FERNANDES, L. M. P., CARVALHEIRO, T., DE SOUSA, T. M., GOMES, A. R. Q., MONTEIRO, M. C., DE OLIVEIRA PARAENSE, R. S., CRESPO-LOPEZ, M. E., LIMA, R. R., FONTES-JUNIOR, E. A., PREDIGER, R. D., MAIA, C. S. F. "Special K" Drug on Adolescent Rats: Oxidative Damage and Neurobehavioral Impairments. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2019, p. 5452727, 2019. ISSN 1942-0994 (Electronic). 1942-0994 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31001375>>.

FELIX, L. M., VIDAL, A. M., SERAFIM, C., VALENTIM, A. M., ANTUNES, L. M., MONTEIRO, S. M., MATOS, M., COIMBRA, A. M. Ketamine induction of p53-dependent apoptosis and oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Chemosphere**, v. 201, p. 730-739, Jun 2018. ISSN 1879-1298 (Electronic). 0045-6535 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29547861> >.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 114-21, 1984. ISSN 0076-6879 (Print). 0076-6879.

FRIEDMAN, W. J. Cytokines regulate expression of the type 1 interleukin-1 receptor in rat hippocampal neurons and glia. **Exp Neurol**, v. 168, n. 1, p. 23-31, Mar 2001. ISSN 0014-4886 (Print). 0014-4886.

GABLE, R. S. Acute toxic effects of club drugs. **J Psychoactive Drugs**, v. 36, n. 3, p. 303-13, Sep 2004. ISSN 0279-1072 (Print) 0279-1072 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15559678>>.

GAHLINGER, P. M. Club drugs: MDMA, gamma-hydroxybutyrate (GHB), Rohypnol, and ketamine. **Am Fam Physician**, v. 69, n. 11, p. 2619-26, Jun 1 2004. ISSN 0002-838X (Print). 0002-838x.

GARCIA, R.C.T. Efeitos neurodegenerativos da metilecgonidina e da cocaína em cultura celular primária de hipocampo. 2009. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. doi:10.11606/D.9.2009.tde-31032010-092939. Acesso em: 2020-10-23.

GARCIA, R. C., DATI, L. M., FUKUDA, S., TORRES, L. H., MOURA, S., DE CARVALHO, N. D., CARRETTIERO, D. C., CAMARINI, R., LEVADA-PIRES, A. C., YONAMINE, M., NEGRINI-NETO, O., ABDALLA, F. M., SANDOVAL, M. R., AFECHE, S. C., MARCOURAKIS, T. Neurotoxicity of anhydroecgonine methyl ester, a crack cocaine pyrolysis product. **Toxicol Sci**, v. 128, n. 1, p. 223-34, Jul 2012. ISSN 1096-0929.

GUERREIRO, D. F., CARMO, A. L., DA SILVA, J. A., NAVARRO, R., GÓIS, C. Club drugs: Um novo perfil de abuso de substâncias em adolescentes e jovens adultos. **Acta Med Port**, v. 24, n. 5, p. 739-56, Sep-Oct 2011. ISSN 0870-399x.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J Biol Chem**, v. 249, n. 22, p. 7130-9, Nov 25 1974. ISSN 0021-9258 (Print). 0021-9258.

HERNANDEZ-MARTINEZ J.M., FORREST C.M., DARLINGTON L.G., SMITH R.A., STONE T.W. Quinolinic acid induces neuritogenesis in SH-SY5Y neuroblastoma cells independently of NMDA receptor activation. **Eur J Neurosci.**, 45(5):700-711, doi: 10.1111/ejn.13499, 2017.

IKONOMIDOU, C., BITTIGAU, P., ISHIMARU, M. J., WOZNIAK, D. F., KOCH, C., GENZ, K., PRICE, M. T., STEFOVSKA, V., HÖRSTER, F., TENKOVA, T., DIKRANIAN, K., OLNEY, J. W. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. **Science**, v. 287, n. 5455, p. 1056-60, Feb 11 2000. ISSN 0036-8075 (Print). 0036-8075.

ITO, H.; UCHIDA, T.; MAKITA, K. Ketamine causes mitochondrial dysfunction in human induced pluripotent stem cell-derived neurons. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0128445, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic). 1932-6203 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26020236>>.

JOHN, G. R., LEE, S. C., SONG, X., RIVIECCIO, M., BROSNAN, C. F. IL-1-regulated responses in astrocytes: relevance to injury and recovery. **Glia**, v. 49, n. 2, p. 161-76, Jan 15 2005. ISSN 0894-1491 (Print). 0894-1491.

KOHRS, R.; DURIEUX, M. E. Ketamine: teaching an old drug new tricks. **Anesth Analg**, v. 87, n. 5, p. 1186-93, Nov 1998. ISSN 0003-2999 (Print). 0003-2999.

LIU, Z., LIU, Y., GAO, R., LI, H., DUNN, T., WU, P., SMITH, R. G., SARKAR, P. S., FANG, X. Ethanol suppresses PGC-1 α expression by interfering with the cAMP-CREB pathway in neuronal cells. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e104247, 2014. ISSN 1932-6203.

LUO, J. Autophagy and ethanol neurotoxicity. **Autophagy**, v. 10, n. 12, p. 2099-108, 2014. ISSN 1554-8635 (Electronic). 1554-8627 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25484085>>.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chem Biol Interact**, v. 224, p. 164-75, Dec 5 2014. ISSN 1872-7786

(Electronic). 0009-2797 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25452175>>.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983. ISSN 0022-1759 (Print). 0022-1759.

O'NEILL, L. The Toll/interleukin-1 receptor domain: a molecular switch for inflammation and host defence. **Biochem Soc Trans**, v. 28, n. 5, p. 557-63, Oct 2000. ISSN 0300-5127 (Print). 0300-5127.

OLNEY, J. W., ISHIMARU, M. J., BITTIGAU, P., IKONOMIDOU, C. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. **Apoptosis**, v. 5, n. 6, p. 515-21, Dec 2000. ISSN 1360-8185 (Print). 1360-8185.

PARKS, K. A.; KENNEDY, C. L. Club drugs: reasons for and consequences of use. **J Psychoactive Drugs**, v. 36, n. 3, p. 295-302, Sep 2004. ISSN 0279-1072 (Print). 0279-1072 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15559677>>.

PEREIRA, R. B.; ANDRADE, P. B.; VALENTAO, P. A Comprehensive View of the Neurotoxicity Mechanisms of Cocaine and Ethanol. **Neurotox Res**, v. 28, n. 3, p. 253-67, Oct 2015. ISSN 1476-3524 (Electronic). 1029-8428 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26105693>>.

RAO, P. S., BELL, R. L., ENGLEMAN, E. A., SARI, Y. Targeting glutamate uptake to treat alcohol use disorders. **Front Neurosci**, v. 9, p. 144, 2015. ISSN 1662-4548 (Print). 1662-453x.

SCHULENBERG, J. E., JOHNSTON, L. D., O'MALLEY, P. M., BACHMAN, J. G., MIECH, R. A. & PATRICK, M. E. Monitoring the Future national survey results on drug use, 1975–2019: Volume II, College students and adults ages 19–60. Ann Arbor: Institute for Social Research, The University of Michigan, 2019. Disponível em <<http://monitoringthefuture.org/pubs.html#monographs>>.

SHBAIR M.K., ELJABOUR S., LHERMITTE M. Drugs involved in drug-facilitated crimes: Part I: Alcohol, sedative-hypnotic drugs, gamma-hydroxybutyrate and ketamine. A review, **Ann. Pharm. Fr.**, 68:275-285, 2010.

SMITH, K. M.; LARIVE, L. L.; ROMANELLI, F. Club drugs: methylenedioxymethamphetamine, flunitrazepam, ketamine hydrochloride, and gamma-hydroxybutyrate. **Am J Health Syst Pharm**, v. 59, n. 11, p. 1067-76, Jun 1 2002. ISSN 1079-2082 (Print). 1079-2082.

WANG J., ZHOU M., WANG X., YANG X., WANG M. Impact of Ketamine on Learning and Memory Function, Neuronal Apoptosis and Its Potential Association with miR-214 and PTEN in Adolescent Rats. **PLoS ONE**, 9(6):e99855. doi:10.1371/journal.pone.0099855, 2014.

WANG, C., LIU, F., PATTERSON, T. A., PAULE, M. G., SLIKKER, W., JR. Relationship between ketamine-induced developmental neurotoxicity and NMDA receptor-mediated calcium influx in neural stem cell-derived neurons. **Neurotoxicology**, v. 60, p. 254-259, May 2017. ISSN 1872-9711 (Electronic). 0161-813X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27132109> >.

WANG, J., ZHOU, M., WANG, X., YANG, X., WANG, M., ZHANG, C., ZHOU, S., TANG, N. Impact of ketamine on learning and memory function, neuronal apoptosis and its potential association with miR-214 and PTEN in adolescent rats. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e99855, 2014. ISSN 1932-6203.

WU, L. T.; SCHLENGER, W. E.; GALVIN, D. M. Concurrent use of methamphetamine, MDMA, LSD, ketamine, GHB, and flunitrazepam among American youths. **Drug Alcohol Depend**, v. 84, n. 1, p. 102-13, Sep 1 2006. ISSN 0376-8716 (Print). 0376-8716.

YUAN, H., ZHANG, W., LI, H., CHEN, C., LIU, H., LI, Z. Neuroprotective effects of resveratrol on embryonic dorsal root ganglion neurons with neurotoxicity induced by ethanol. **Food Chem Toxicol**, v. 55, p. 192-201, May 2013. ISSN 1873-6351 (Electronic). 0278-6915 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23313797>>.

ZUO, D., LIU, Y., LIU, Z., CUI, J., ZHOU, X., LIU, Y., LI, Z., WU, Y. Alcohol aggravates ketamine-induced behavioral, morphological and neurochemical alterations in adolescent rats: The involvement of CREB-related pathways. **Behav Brain Res**, v. 349, p. 80-90, Sep 3 2018. ISSN 1872-7549 (Electronic). 0166-4328 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29738804>>.

ZUO, D., SUN, F., CUI, J., LIU, Y., LIU, Z., ZHOU, X., LI, Z., WU, Y. Alcohol amplifies ketamine-induced apoptosis in primary cultured cortical neurons and PC12 cells through down-regulating CREB-related signaling pathways. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 10523, Sep 5 2017. ISSN 2045-2322 (Electronic). 2045-2322 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28874724>>.

São Paulo, 03 de novembro de 2020.

Gabriela Otofugi Pereira

Aluna: Gabriela Otofugi Pereira



Orientadora: Profa Dra Tania Marcourakis