

FERNANDO PONCE

**Estudo das alterações imunológicas e comportamentais
provocadas pelo *crack* em ratos adultos expostos à droga por via
pulmonar**

São Paulo
2015

FERNANDO PONCE

**Estudo das alterações imunológicas e comportamentais
provocadas pelo *crack* em ratos adultos expostos à droga por via
pulmonar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profa. Dra. Isis Machado Hueza

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3196
FMVZ

Ponce, Fernando
Estudo das alterações imunológicas e comportamentais provocadas pelo crack em ratos adultos expostos à droga por via pulmonar / Fernando Ponce. -- 2015.
142 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Dra. Isis Machado Hueza.

1. Crack. 2. Exposição pulmonar. 3. Comportamento. 4. Imunotoxicidade. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação dos efeitos imunotóxicos do crack sobre ratos adultos expostos à droga por via pulmonar", protocolado sob o nº 2882/2013, utilizando 195 (cento e noventa e cinco) ratos, sob a responsabilidade do(a) Dra. Isis Machado Hueza, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 13/3/2013.

We certify that the Research "Evaluation of immunotoxic effects of crack cocaine on adult rats exposed to the drug via the pulmonar route", protocol number 2882/2013, utilizing 195 (one hundred and ninety five) rats, under the responsibility Dra. Isis Machado Hueza, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 3/13/2013.

São Paulo, 18 de março de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: PONCE, Fernando

Título: Estudo das alterações imunológicas e comportamentais provocadas pelo *crack* em ratos adultos expostos à droga por via pulmonar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais **Ruth Meire e Antonio Carlos**,
pelo apoio incondicional e pelos valores morais e sociais ensinados,
por terem me incentivado e me dado forças para ir além,
e por colaborarem profundamente com minha formação pessoal e profissional.

Aos meus irmãos **Antonio, Patricia e Angela**,
pelo companheirismo, pelo incentivo, pelos exemplos
e por terem me ensinado muitas coisas
mesmo que de maneira silenciosa.

A minha querida companheira, confidente e amiga **Juliana Sanchez**,
por compreender a minha ausência,
pela valiosa contribuição para a formação de quem eu sou,
e principalmente, por muitas vezes me mostrar o caminho
e caminhar ao meu lado ao longo dele.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os animais que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado, aguardo esperançosa e ansiosamente o dia em que a ciência avance ao ponto de não mais necessitar da experimentação animal.

À minha orientadora, Isis Machado Hueza, agradeço pela sua paciência, pelos seus conselhos e ensinamentos que ao longo dos anos me fizeram ver muitas coisas de maneira diferente. Obrigado pela confiança demonstrada ao longo do tempo e pela nossa relação de profundo respeito e amizade.

Ao meu amigo e eterno professor André Rinaldi Fukushima, obrigado por abrir as portas do universo científico para mim. Tenho a sua pessoa como um grande exemplo profissional e pessoal a ser seguido. Que sua paixão pela pesquisa, pela docência e seu espírito caridoso possam continuar a mudar a realidade de muitas pessoas para melhor.

A minha querida professora Maria Aparecida Nicoletti, pelas suas palavras de motivação e pelo seu grande amor a docência. Muito obrigado por ter me apoiado em momentos de dificuldade, e pelos inúmeros ensinamentos ao longo dos anos.

A todos os meus familiares, pelo apoio, amizade e demonstrações de afeto; em especial aos meus tios Valdir (*in memoriam*) e Sandra e meus primos André e Régis que desde cedo me mostraram os benefícios da educação, obrigado pelos muitos momentos felizes que vocês me forneceram.

Aos meus grandes amigos de longa data, André, Diego, Douglas, Evandro, Marcos, Pedro, Rafael e Vinícius. Que a amizade de vocês continue por longos anos! Muito obrigado pela mão amiga nas horas de dificuldade, obrigado por tornarem as coisas mais leves.

Aos meus “irmãos” científicos, Fernando Pípole, Patricia Mendes e Bianca Nakayama. Obrigado pela ajuda durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Sem a ajuda e o conhecimento de vocês este trabalho não teria sido possível.

A todos os funcionários da FMVZ-USP, em especial àqueles do VPT pelo auxílio que sempre me foi fornecido; às secretárias Milena e Adriana pela eficiência e amizade; aos funcionários do biotério Mauro, Dona Idalina, Nelsinho e Cláudia pelo prestativo apoio e imenso carinho e zelo pelo bem-estar animal; aos funcionários do Laboratório de Histopatologia, Luciano e Cláudio, pelo aprendizado e auxílio na confecção de inúmeras lâminas durante este trabalho; aos meus grandes amigos do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia: Vagner, Nicolle e Herculano, meu agradecimento a vocês vai muito além da sempre pronta ajuda recebida durante os experimentos, vocês contribuíram de inúmeras maneiras para meu crescimento pessoal, meu sincero muito obrigado por tudo!

A todos os professores do VPT, em especial aos doutores Paulo Maiorka e Helenice Spinosa pela imensa contribuição no desenvolvimento desta dissertação, pela amizade e excelente convivência.

Aos colegas pós-graduandos do VPT, Thiago, Alessandra, Nathalia, Eduardo, Sayuri, Thaísa, Mariana, Mariane, Atilio, Fernanda e Gabriela pela convivência, apoio e momentos de descontração.

Aos meus amigos e colaboradores Dr Raphael Garcia e Dr Thiago Kirsten, pelas grandes contribuições e auxílio técnico durante a execução deste trabalho.

*“Toda a nossa ciência comparada com a realidade,
é primitiva e infantil - e, no entanto,
é a coisa mais preciosa que temos.”*

Albert Einstein

“Diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo, é um imenso prazer para mim dividir um planeta e uma época com você.”

Carl Sagan

RESUMO

PONCE, F. **Estudo das alterações imunológicas e comportamentais provocadas pelo crack em ratos adultos expostos à droga por via pulmonar.** [Study of immune and behavioral changes caused by crack cocaine in adult rats exposed to the drug by pulmonary route]. 2015. 142 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O *crack*, uma droga de abuso constituída principalmente por cocaína, continua sendo um grande problema social e de saúde pública. Apesar de vários estudos em modelos animais com outras formas de cocaína, raros são os relatos sobre os efeitos da exposição pulmonar ao *crack* em roedores, devido à dificuldade de realizar a exposição dos mesmos à droga, o que seria de grande valia, uma vez que eliminaria variáveis encontradas em usuários, como o uso de outras drogas. Assim, o propósito do presente estudo foi avaliar os efeitos tóxicos, imunotóxicos e ainda, alterações comportamentais de ratos Wistar machos expostos ao *crack* pela via pulmonar. Inicialmente, foram realizadas determinações de cocaína nas pedras de *crack* utilizadas e também, a quantidade de *crack* e tempo de exposição dos animais para obtenção de níveis séricos de cocaína semelhantes àqueles encontrados na literatura, e os dados obtidos foram de: 67% de cocaína no *crack* e a queima de 250 mg de *crack*, com exposição dos animais por 10 minutos acarretou em níveis plasmáticos próximos de 170 ng/mL de cocaína. Assim, em cada experimento foram utilizados 30 ratos divididos em 3 grupos iguais, um controle, um experimental e um grupo *pair-fed*, já que a cocaína promove efeitos anorexígenos que poderiam interferir nas avaliações comportamentais e imunológicas aqui estudadas, e que foram expostos ou não à fumaça resultante de 250 mg de *crack*, por 10 minutos, duas vezes ao dia, durante 28 dias. Ao final do período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia para realização de avaliações bioquímicas, hematológicas, histopatológicas, análise de órgãos-linfóides, avaliação das respostas imune inata (inflamatória), humoral e a avaliação da reação de hipersensibilidade do tipo IV. Ainda, ao longo do período experimental, estes mesmos animais foram avaliados quanto a possíveis alterações comportamentais e para tal foram utilizados 3 métodos distintos: avaliação cognitiva em labirinto em T, avaliação geral do comportamento em campo aberto e ainda, a avaliação de

preferência ou aversão ao odor da droga. A exposição ao *crack* não resultou em alterações que caracterizem toxicidade em parâmetros clínicos, bioquímicos, hematológicos e histopatológicos; não foram observadas alterações com significado clínico nas avaliações do peso relativo, celularidade, morfometria de órgãos linfoides e fenotipagem de linfócitos esplênicos de ratos expostos à droga. Não houve efeitos imunomodulatórios nas avaliações do *burst* oxidativo e fagocitose de macrófagos peritoneais e de neutrófilos circulantes, assim como nas avaliações da produção de anticorpos T-dependentes e na reação de hipersensibilidade do tipo IV. Quanto às avaliações comportamentais, os animais expostos à droga apresentaram aumento da atividade locomotora, e uma maior preferência ao odor característico do *crack*, aparentemente sem prejuízo cognitivo. Em conclusão, a exposição de ratos 2 vezes ao dia, por 28 dias ao *crack* não promoveu alterações imunotóxicas; por outro lado, comportamentos clássicos da exposição à cocaína foram observados nos animais expostos, evidenciando que o modelo aqui utilizado será de grande utilidade para outros estudos que envolvam drogas de abuso, como possíveis estratégias terapêuticas e o melhor entendimento da toxicocinética de drogas utilizadas pela via pulmonar.

Palavras-chave: Crack. Exposição pulmonar. Comportamento. Imunotoxicidade.

ABSTRACT

PONCE, F. **Study of immune and behavioral changes caused by crack cocaine in adult rats exposed to the drug by pulmonary route.** [Estudo das alterações imunológicas e comportamentais provocadas pelo *crack* em ratos adultos expostos à droga por via pulmonar]. 2015. 142 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Crack cocaine, a drug of abuse that consists mainly of cocaine, remains as a major social and public health problem. Although several studies in animal models with other forms of cocaine, there are few scientific reports on the effects of pulmonary exposure to crack in rodents, this is due to the difficulty of performing their exposure, which would be of great value, since would eliminate variables observed in users, such as the use of other drugs. Initially, the concentration of cocaine in crack samples, as the amount of crack and time of exposure of the animals to obtain serum levels of cocaine similar to those found in the literature were determined, and the data obtained were: 67% of cocaine in crack, and 250 mg of crack, exposing the animals for 10 minutes resulted in plasma levels close to 170 ng/mL of cocaine. Thus, the purpose of this study was to evaluate the toxic effects, immunotoxic and behavioral changes of male Wistar rats exposed to crack cocaine. Thus, in each experiment were used 30 rats divided into three groups, one control, one experimental and one pair-fed, since it is known that cocaine promotes anorexic effects that may interfere with behavioral and immunological assessments that will be studied here, and who were exposed or not to the burning of 250 mg of crack, for 10 minutes, twice daily for 28 days. At the end of the experiment, the animals were euthanized to perform biochemical evaluation, hematological, histopathological, analysis of lymphoid organs, evaluation of innate immune responses (inflammatory), humoral and the assessment of the type IV hypersensitivity reaction. Still, throughout the experimental period, these same animals were evaluated for possible behavioral changes and were used three different methods: cognitive assessment in T-maze, overall assessment on open field behavior and the evaluation of preference or aversion to the odor of the drug. Exposure to crack cocaine, did not result in changes that characterize toxicity in clinical, biochemical, hematological and histopathological parameters; were not observed clinically meaningful changes in the relative weight

ratings, cellularity, morphology of lymphoid organs and phenotyping of splenic lymphocytes from rats exposed to the drug. There was no immunomodulatory effect in the evaluations of oxidative burst and phagocytosis of peritoneal macrophages and in circulating neutrophils, and the assessments of the production of T-dependent antibodies and the type IV hypersensitivity reaction. With regard to behavioral assessments, the animals exposed to the drug showed increased locomotor activity, and greater preference to the characteristic odor of crack cocaine, apparently without cognitive impairment. In conclusion, in the exposure model to crack cocaine used here, immunotoxic changes were not evident; by contrast, classic behavior of cocaine exposure were observed in the animals exposed, indicating that the model used herein will be useful for the study of other parameters involving drugs of abuse, in evaluation of therapeutic strategies and a better understanding of drugs toxicokinetics used by the pulmonary route.

Keywords: Crack-cocaine. Pulmonary exposure. Behavior. Immunotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Ilustrações de propagandas do Vin Mariani, o vinho com extrato de coca30
- Figura 2 - Ilustrações do rótulo de um produto indicado para dor de dentes que era comercializado em 188530
- Figura 3 - Informativo publicitário da bebida não alcoólica Coca-Cola, que continha cocaína em sua formulação.....31
- Figura 4 - Processo de extração e obtenção da cocaína e crack das folhas de *Erythroxylum coca*. A: colheita manual das folhas de coca; B: extração dos alcaloides presentes nas folhas; C: drenagem e posterior alcalinização do solvente orgânico; D: filtração e obtenção da paste base de cocaína; E: processo de secagem; F: dissolução da paste base de cocaína com acetona e ácido clorídrico; G: remoção dos solventes; H: secagem e obtenção do cloridrato de cocaína em pó; I: alcalinização da cocaína para a obtenção do crack; J: aspecto do crack após processo de obtenção35
- Figura 5 - Cocaína em pó disposta em “carreiras” momentos antes de serem auto administradas pela via intranasal, prática de uso considerada comum entre usuários36
- Figura 6 - Diferentes aparatos de queima (“cachimbos”) utilizados pelos usuários de crack para consumirem a droga38
- Figura 7 - Pacote de droga adquirida junto ao DENARC (a) e seu conteúdo constituído de bolsinhas de crack (b).....51
- Figura 8 - Característica da droga quando desembalada (a) e seu peso final líquido obtido em equipamento calibrado de nosso laboratório (b)51
- Figura 9 - Ilustração do equipamento de exposição. Legenda: 1) válvula esfera de ½ polegada; 2) rolha com conexão de rosca em aço; 3) orifício; 4) Batente da eclusa; 5) antecâmara de espera; 6) êmbolo para direcionamento dos animais à câmara de exposição; 7) porta; 8) câmara e exposição e 9) orifício para passagem de sondas. Note que a válvula lateral é conectada à uma bomba de vácuo que posteriormente ao final do ciclo de vácuo é

<p>fechada. A válvula no topo, que é conectada ao queimador da droga por meio de tudo de silicone, é aberta concomitantemente com o momento em que a droga está sendo queimada, sendo toda a fumaça resultante da queima aspirada para o interior da câmara</p>	53
<p>Figura 10 - Caixa de acrílico com paredes de 12mm e com volume total de 16 litros</p>	54
<p>Figura 11 - Detalhe de parafuso tipo Philips igualmente distribuídos pelas junções entre as paredes</p>	54
<p>Figura 12 - Detalhe das válvulas de ½ polegada do tipo esfera inseridas por meios de rosqueamento no topo da câmara de exposição</p>	55
<p>Figura 13 - Foto mostrando detalhe do acabamento interno, evitando desta forma os cantos em 90° e dando mais reforço às paredes contra a pressão negativa interna</p>	55
<p>Figura 14 - Note a porta (seta) inserida dentro da eclusa (pontilhado). Esta porta abre no sentido vertical (para cima) e possui na sua extremidade superior um orifício para facilitar seu manejo (a). Na foto da direita é possível ter uma visão superior da eclusa, onde é inserida a porta (b)</p>	56
<p>Figura 15 - Antecâmara de espera (a) onde os animais ficam contidos antes de serem conduzidos pelo pistão para o interior da câmara de exposição (b)</p>	57
<p>Figura 16 - Equipamento de exposição montado com suas câmaras, a de exposição e a antecâmara de espera</p>	57
<p>Figura 17 - Cachimbo modificado com haste de vidro que permite conectá-lo à câmara de exposição. Note no interior do mesmo, a presença de tela de aço (poro 0,1mm) para contenção das cinzas e do crack</p>	58
<p>Figura 18 - Esquema de exposição dos animais para os diferentes testes comportamentais avaliados após a exposição à fumaça do crack</p>	79
<p>Figura 19 - Representação gráfica da curva analítica com os valores dos padrões de cocaína em diferentes concentrações: 15; 50; 100; 150; 200ppm</p>	82
<p>Figura 20 - Valores referentes a média e desvio-padrão da concentração plasmática de cocaína em ratos Wistar após uma única exposição à fumaça</p>	

resultante da queima de 100, 250 ou 500 mg de crack, por períodos de 5 ou 10 minutos de exposição	84
Figura 21 - Consumo de ração médio diário (em gramas) de ratos Wistar expostos (CK) ou não (CO) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões	86
Figura 22 - Avaliação histopatológica do tecido hepático de ratos Wistar machos adultos expostos (CK) ou não (CO) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, 2 vezes ao dia, durante 28 dias. Abaixo segue amostra representativa do grupo CO (a) sem alterações, nota-se presença de congestão hepática na amostra dos animais do grupo CK (b). HE, 40X	92
Figura 23 - Avaliação histopatológica do tecido renal de ratos Wistar machos adultos expostos (CK) ou não (CO) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, 2 vezes ao dia, durante 28 dias. Abaixo segue amostra representativa do grupo CO (a) sem alterações, nota-se presença de congestão renal sem toxicidade tubular na amostra dos animais do grupo CK (b). HE, 40X	93
Figura 24 - Concentrações séricas de corticosterona de ratos expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, 2 vezes ao dia, durante 28 dias. Valores referentes a média ± desvio-padrão dos grupos	93
Figura 25 - Peso relativo do timo e do baço (g/100g de peso vivo) de ratos Wistar machos adultos expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, 2 vezes ao dia, durante 28 dias. Valores referentes a média ± desvio-padrão dos grupos	95
Figura 26 - Celularidade do baço (esplenócitos x 10 ⁶ /g de baço) e celularidade da medula óssea (células x10 ⁶) de ratos Wistar machos adultos expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, 2 vezes ao dia, durante 28 dias. Valores referentes a média ± desvio-padrão dos grupos	96

- Figura 27 - Volume (em mL) do coxim plantar (T24-T0) de ratos Wistar machos adultos expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. Valores referentes a média \pm desvio-padrão dos grupos.....100
- Figura 28 - Níveis séricos de citocinas de ratos Wistar machos adultos não imunizados que foram expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. Valores referentes a média \pm erro-padrão.....101
- Figura 29 - Níveis séricos de citocinas de ratos Wistar machos adultos imunizados que foram expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. Valores referentes a média \pm erro-padrão.....102
- Figura 30 - Diferença dos níveis séricos de citocinas de ratos Wistar machos adultos imunizados (KLH) e não-imunizados que foram expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. Valores referentes a média \pm erro-padrão ..103
- Figura 31 - Análise do comportamento em campo aberto de ratos Wistar machos adultos expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. Os animais foram avaliados no início, no meio e no final do período experimental. Valores referentes a média \pm erro-padrão106
- Figura 32 - Análise do comportamento cognitivo em labirinto em T de ratos Wistar machos adultos expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. Os animais foram avaliados no início, no meio e no final do período experimental. Valores referentes a média \pm erro-padrão107
- Figura 33 - Análise do comportamento de aversão ou preferência ao odor de crack em ratos Wistar machos adultos expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. Os animais foram avaliados no início, no meio e no final do período experimental. Valores referentes a média \pm erro-padrão109

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Teor de cocaína (%) encontrado nas amostras de crack submetidas à análise em HPLC-DAD.....83
- Tabela 2 - Peso inicial, peso final, ganho de peso total e consumo de ração total (em gramas) de ratos Wistar expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. São apresentados as médias e os respectivos desvios-padrões85
- Tabela 3 - Parâmetros hematológicos de ratos Wistar expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. São apresentados as médias e os respectivos desvios-padrões.....88
- Tabela 4 - Diferencial de leucócitos de ratos Wistar expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. São apresentados as médias e os respectivos desvios-padrões.....89
- Tabela 5 - Avaliação dos valores séricos de parâmetros bioquímicos de ratos Wistar expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. Valores referentes a média \pm desvio-padrão dos grupos.....91
- Tabela 6 - Carboxihemoglobina (%) de ratos machos adultos expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, 2 vezes ao dia, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos desvios-padrões.....94
- Tabela 7 - Morfometria do timo e baço de ratos Wistar machos adultos expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, 2 vezes ao dia, durante 28 dias. Valores referentes a média \pm desvio-padrão dos grupos96

Tabela 8 - Fenotipagem de linfócitos T e B esplênicos de ratos Wistar machos adultos expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. Valores referentes a média \pm desvio-padrão dos grupos.....	97
Tabela 9 - Burst oxidativo e fagocitose de macrófagos peritoneais de ratos Wistar machos adultos expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. São apresentados as médias e os respectivos desvios-padrões	98
Tabela 10 - Burst oxidativo e fagocitose de neutrófilos circulantes de ratos Wistar machos adultos expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. São apresentados as médias e os respectivos desvios-padrões	99
Tabela 11 - Avaliação dos valores séricos de IgM Anti-KLH e IgG Anti-KLH de ratos Wistar machos adultos expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. Valores expressos em densidade óptica (O.D.), referentes a média \pm desvio-padrão dos grupos	100

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1 HISTÓRICO DA COCAÍNA E DO <i>CRACK</i>	27
2.2 A OBTENÇÃO, AS FORMAS DE APRESENTAÇÃO E DE USO DA DROGA.....	33
2.3 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS	38
2.3.1 Toxicocinética	38
2.3.2 Toxicodinâmica	41
2.3.3 Outros fatores	44
3 OBJETIVO GERAL	48
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
4 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 O <i>CRACK</i>	50
4.2 OS ANIMAIS.....	51
4.3 REAGENTES	52
4.4 O EQUIPAMENTO DE EXPOSIÇÃO	53
4.4.1 A câmara de exposição	54
4.4.2 A eclusa e a porta da câmara de exposição	56
4.4.3 Antecâmara de espera	56
4.5 O ARTEFATO DE QUEIMA (QUEIMADOR)	58
4.6 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE COCAÍNA PRESENTE NAS AMOSTRAS DE <i>CRACK</i>	58
4.7 A QUEIMA DA DROGA E EXPOSIÇÃO DOS ANIMAIS.....	59
4.8 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE COCAÍNA.....	60
4.9 O GRUPO <i>PAIR-FED</i>	61
4.10 EUTANÁSIA	61

4.11 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA	61
4.11.1 Avaliação do consumo de ração e ganho de peso.....	62
4.11.2 Avaliação de parâmetros hematológicos	62
4.11.3 Análise bioquímica.....	62
4.11.4 Necropsia e coleta de material para avaliação histopatológica	63
4.11.5 Análise dos níveis séricos de corticosterona.....	63
4.11.6 Análise da concentração de carboxihemoglobina	63
4.12 AVALIAÇÃO IMUNOTOXICOLÓGICA	64
4.12.1 Avaliação do peso relativo de timo e baço e celularidade de baço	64
4.12.2 Avaliação global de células da medula óssea	64
4.12.3 Fenotipagem de linfócitos T e B do baço por citometria de fluxo	65
4.12.4 Morfometria do timo e do baço	66
4.12.5 Avaliação de atividade de neutrófilos circulantes e de macrófagos peritoneais por meio do “ <i>burst</i> ” oxidativo e da fagocitose.....	66
4.12.5.1 Elicitação de macrófagos peritoneais	66
4.12.5.2 Coleta de macrófagos peritoneais elicitados pelo tioglicolato 3%	66
4.12.5.3 Coleta de neutrófilos circulantes	67
4.12.5.4 Execução da técnica para avaliação do “ <i>burst</i> ” oxidativo e fagocitose.....	67
4.12.6 Reação de hipersensibilidade do tipo IV (<i>Delayed-Type Hypersensitivity</i> - DTH) e avaliação dos níveis séricos de anticorpos específicos.....	68
4.12.7 Avaliação das citocinas séricas.....	69
4.13 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL	70
4.13.1 Atividade geral em campo aberto	70
4.13.2 Cognição em labirinto em T	71
4.13.3 Comportamento de aversão ou preferência ao odor do <i>crack</i>	72
4.14 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	73

4.14.1 Determinação da quantidade de <i>crack</i> a ser queimada e do tempo de exposição à sua fumaça	73
4.14.2 Avaliação dos efeitos do <i>crack</i> sobre parâmetros séricos: hemograma, bioquímica, citocinas, corticosterona e sobre órgãos linfoides, suas celularidades e morfometria.....	74
4.14.3 Determinação da concentração de carboxihemoglobina nas amostras de sangue total	76
4.14.4 Avaliação da atividade de macrófagos peritoneais.....	76
4.14.5 Avaliação dos efeitos do <i>crack</i> sobre a resposta imune celular e humoral	76
4.14.6 Avaliação do fenótipo de linfócitos B e T esplênicos e da atividade de neutrófilos circulantes por meio do “ <i>burst</i> ” oxidativo e da fagocitose	77
4.14.7 Avaliação do comportamento de ratos expostos ao <i>crack</i>	78
4.14.7.1 A exposição dos animais e os períodos de avaliação comportamental	78
4.14.7.2 Avaliações comportamentais.....	79
4.15 Análise estatística	80
5 RESULTADOS.....	81
5.1 ESTUDO QUÍMICO	81
5.1.1 Quantificação do teor de cocaína presente no homogenato de pedras de <i>crack</i>	81
5.1.2 Determinação da concentração plasmática de cocaína em ratos e sua correlação com a quantidade de <i>crack</i> a ser queimada e com o tempo de exposição à sua fumaça.	83
5.2 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA	84
5.2.1 Avaliação do ganho de peso e do consumo de ração de ratos expostos ao <i>crack</i> durante 28 dias.....	85
5.2.2 Parâmetros Hematológicos	86
5.2.3 Parâmetros Bioquímicos	89

5.2.4 Histopatologia	92
5.2.5 Avaliação dos níveis séricos de corticosterona.....	93
5.2.6 Avaliação das concentrações de carboxihemoglobina	94
5.3 AVALIAÇÃO IMUNOTOXICOLÓGICA	94
5.3.1 Avaliação do peso relativo de órgãos linfoides, suas celularidades, morfometria e fenotipagem de linfócitos esplênicos.....	94
5.3.2 Avaliação da atividade inflamatória de macrófagos peritoneais e de neutrófilos circulantes.....	97
5.3.3 Avaliação da resposta imune celular e humoral	99
5.3.4 Níveis séricos de citocinas de animais expostos ou não à droga que foram imunizados ou não-imunizados com o KLH	100
5.4 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL	103
5.4.1 Avaliação comportamental da atividade geral em campo aberto e de parâmetros cognitivos em labirinto em T.	104
5.4.2 Avaliação comportamental de aversão ou preferência ao odor do crack.....	107
6 DISCUSSÃO	110
7 CONCLUSÕES.....	125
REFERÊNCIAS.....	127
ANEXOS	141

1 INTRODUÇÃO

A droga de rua *crack*, que recebeu esse nome devido ao som que a pedra faz ao ser “queimada”, é uma droga cujo principal princípio ativo é a cocaína – alcaloide tropânico extraído principalmente das folhas de *Erythroxylum coca*, planta nativa da América do Sul (OLIVEIRA et al., 2010) –, que possui um longo histórico como estimulante e que vem se destacando como um problema social e de saúde pública não só no Brasil, bem como em todo o mundo.

Dentre as drogas de abuso, a cocaína sempre esteve difundida como droga de “entretenimento” entre adolescentes e adultos jovens, principalmente aqueles pertencentes às classes sociais mais abastadas, devido ao seu preço mais elevado quando comparada a outras drogas. Entre o final dos anos de 1970 e início dos 1980, o uso da cocaína ganhou popularidade dentro de ambientes de trabalho de alta competitividade e estresse emocional, principalmente para aqueles indivíduos denominados *workaholics* de grandes centros urbanos (BIELEMAN et al., 1993). No entanto, cerca de 10 anos depois, a cocaína na forma de *crack* surgiu, coexistindo nas ruas com a forma cloridrato (pó de cocaína) em diferentes proporções entre seus usuários; porém, veio se disseminando de forma mais vigorosa entre menores de rua, pessoas em situação de rua, usuários de outras drogas ilícitas e outros personagens marginalizados pela sociedade (NAPPO; GALDURÓZ; NOTO, 1994). Na verdade, o *crack* vem se mostrando uma droga que não respeita fronteiras de idade, sexo e classe social, já que é de custo menor que a cocaína em sua forma em pó, custando entre R\$5,00 a R\$20,00 a pedra e R\$0,50 o farelo (raspa da pedra para apenas uma “fumada”) (OLIVEIRA; NAPPO, 2008), resultando em gerações corrompidas e degradadas por essa droga.

Segundo o Relatório Mundial sobre Drogas publicado em 2013 pelo Escritório Sobre Drogas e Crimes das Nações Unidas (*World Drug Report, United Nations Office on Drugs and Crime – UNODC, 2013*), após os opioides, a cocaína é a droga mais comumente citada como motivo dos usuários terem buscado tratamento contra a dependência química nas Américas.

O Relatório Mundial sobre Drogas publicado pelo Escritório Sobre Drogas e Crimes das Nações Unidas publicado no ano de 2015 aponta que desde 2006 a prevalência (consumo da droga nos últimos 12 meses) do consumo de cocaína em

suas diversas formas na população da América do Norte passa por um declínio, passando de 2,5% em 2006 para 1,6% em 2013. Entretanto, o cenário brasileiro parece ser diferente, as estimativas referentes à prevalência do consumo de cocaína em suas diversas formas pela população do Brasil apontam uma elevação constante, que entre 2005 e 2011 mais que dobrou: passou de 0,7% da população brasileira em 2005, para 1,75% dos brasileiros em 2011. Ainda, o Brasil é apontado pelo relatório como o principal mercado para a cocaína em toda a América do Sul. (UNODC, 2015).

Um fato que deve ser salientado quanto aos usuários de cocaína e/ou *crack* é o maior risco de contaminação por injúrias infectocontagiosas, como o HIV e a soropositividade para hepatites e tuberculose (FISCHER et al., 2008; STORY; BOTHAMLEY; HAYWARD, 2008; DEBECK et al., 2009). Dados do Boletim Epidemiológico HIV/AIDS de 2012 indicam que na população brasileira de faixa etária entre 15 e 49 anos o índice de prevalência de soropositividade para HIV é de aproximadamente 0,6% (BRASIL, 2012), enquanto que dados recentes como o da Pesquisa Nacional sobre o Uso de *Crack* (BERTONI; BASTOS 2014) apontam que a prevalência de infecção pelo HIV numa amostra de 7300 usuários de *crack* e/ou similares no Brasil foi de 4,97%, dado este corroborado por um estudo conduzido por Bastos et al., (2009), que analisou uma população de usuários de drogas ilícitas (com exceção da maconha) em 10 cidades brasileiras onde os índices de infecção por HIV foram de aproximadamente 5,91%.

Várias são as hipóteses desta maior suscetibilidade, entre elas, baixa aderência à programas de vacinação e prevenção, má nutrição, uso concomitante de muitas drogas debilitantes como o álcool, além de condições precárias de moradia (CURTIS et al., 2013). Outras hipóteses incluem a maior promiscuidade sexual dos usuários (DICKSON-GÓMEZ et al., 2006; CHETTIAR et al., 2010), o uso inconsistente de preservativos nas relações sexuais (BASTOS et al., 2009), queimaduras na boca, face e ainda presença de cortes devido aos “cachimbos” improvisados em latas – o que proporcionaria porta de entrada para microrganismos –, compartilhamento de “equipamentos” com resquícios de sangue e ainda a prática do chamado *shotgunning*, quando um usuário assopra a fumaça do *crack* fumado dentro da boca de outro usuário (PERLMAN et al., 1999; HAYDON; FISCHER, 2005; FISCHER et al., 2008).

Os usuários de *crack* ainda se diferem dos usuários de outras drogas (excetuando-se as formas injetáveis), pelo fato de que a dependência ao *crack* pode se instalar em um curto período de tempo, o que torna os seus usuários propensos ao isolamento social, aumentando à negligência quanto aos cuidados para com a própria saúde, sendo capaz de promover o rompimento de vínculos familiares e sociais, além de muitas vezes inserir o usuário em um contexto de marginalidade (NAPPO et al., 1996; OLIVEIRA; NAPPO, 2008). De fato, estudos realizados com usuários de *crack* na cidade de São Paulo, demonstram a ocorrência de problemas psicológicos e/ou neurológicos, dentre eles perturbações do funcionamento cognitivo geral, alterações nas tomadas de decisões e de controle de impulsos, déficit de parâmetros relacionados a atenção, além da existência de traços de ansiedade (DE OLIVEIRA et al., 2009; CUNHA et al., 2011).

Atualmente, raríssimos são os relatos das alterações imunológicas e comportamentais causadas pelo *crack per se*, ou seja, sem a presença de variáveis que interfiram nas respostas imunológicas e/ou comportamentais, como o uso concomitante de álcool e/ou outras drogas, má-nutrição e outras possíveis morbidades, este fato decorre da falta de um modelo experimental factível de exposição em animais de laboratório que mimetize a prática do usuário.

Isto posto, o presente estudo teve como objetivo geral avaliar os efeitos imunotóxicos e comportamentais da exposição, por via pulmonar, ao *crack* em ratos Wistar por período de 28 dias. Para tal, foi empregado um aparato de exposição à fumaça do *crack* que visa utilizar pequenas quantidades da droga por período de exposição; sendo que este aparato também poderá ser útil para testar outras drogas ilícitas expostas por via pulmonar, como a metanfetamina ou mesmo a maconha.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura compreenderá os aspectos históricos, o processo de extração e obtenção, aspectos toxicológicos e ainda, outros fatores relacionados ao *crack*.

2.1 HISTÓRICO DA COCAÍNA E DO CRACK

A cocaína – também conhecida como benzoilmetilecgonina –, é um alcaloide tropânico encontrado principalmente nas folhas de plantas do gênero *Erythroxylum* (*E. novogranatense* e *E. coca*), sendo a *E. coca* comumente referida como a principal fonte de comércio ilegal da cocaína. A concentração média de cocaína nas folhas de *E. coca* é de aproximadamente 0,8% do seu peso total (PLOWMAN; RIVIER, 1983; POMARA et al., 2012; UNODC, 2015).

A *E. coca* cresce na forma de arbusto, é cultivada em altitudes que variam de 450 a 1800 metros acima do nível do mar, podendo alcançar de 2 a 3 metros de altura. É uma planta nativa de regiões andinas, principalmente Colômbia, Peru e Bolívia; porém, também pode ser encontrada no México, Indonésia e em algumas regiões do Caribe (ALTMAN; ALBERT; FOURNIER, 1985).

O abuso de cocaína possui suas origens na cultura de civilizações pré-colombianas, quando a planta de coca era cultivada com zelo e possuía significados místicos, religiosos e cerimoniais. De acordo com a mitologia do povo Inca, tal planta era sagrada, considerada um presente de Inti, O Deus Sol, cujo filho desceu do céu para ensinar aos homens as artes, a agricultura e para presenteá-los com as primeiras sementes e mudas de coca (FERREIRA; MARTINI, 2001). Existem evidências do cultivo de coca que datam de 4500 anos atrás, sendo inclusive encontradas, em território peruano, múmias com cerca de 2000 anos com a presença de restos de folhas de coca dentro de suas bocas (ALTMAN; ALBERT; FOURNIER, 1985).

A civilização Inca considerava que o ato de mascar as folhas de coca concedia poderes mágicos, como: o conhecimento de eventos do passado e futuro;

providenciava um contato íntimo com os deuses; fornecia grande força física, espiritual e proteção contra a fome e a fadiga (NARANJO, 1981). Assim, o hábito de mascar ou ingerir a infusão das folhas de coca era considerado um ato sagrado. No entanto, a população em geral não possuía autorização para se beneficiar de tal prática, sendo o costume reservado para as castas mais privilegiadas desta civilização. Desta forma, este costume não se tornou “popular” até a chegada dos conquistadores espanhóis no século XVI (PATTERSON, 1971; ALTMAN; ALBERT; FOURNIER, 1985; FERREIRA; MARTINI, 2001).

Assim, com a chegada dos conquistadores espanhóis em territórios do Império Inca, passou a ocorrer a opressão dos hábitos nativos pagãos deste povo, sendo o ritual de consumir as folhas de coca considerado como símbolo de heresia e paganismo, o qual foi duramente condenado e proibido pelos espanhóis (BUCHER, 1992). Entretanto, como os conquistadores forçavam os nativos a longas e árduas jornadas de trabalho em plantações e em minas de extração de minérios, logo perceberam a necessidade e utilidade tanto prática quanto econômica de se fornecer as folhas de coca para os trabalhadores, fazendo com que eles, desta forma, resistissem ao longo período sem sono e sem alimentação, além de melhorar a condição física em locais de elevadas altitudes (HERNÁNDEZ; SÁNCHEZ, 1999). No século XVI, o escritor Garcilaso de la Vega (1539 – 1616) filho de um conquistador espanhol e de uma nobre Inca, fez a seguinte citação sobre a folha de coca: “[a folha de coca] satisfaz a fome, fornece novas forças ao cansado e exausto e faz o infeliz esquecer seus sofrimentos” (GRINSPOON; BAKALAR, 1981).

Com o conhecimento de que a eficácia dos trabalhadores era maior sob efeito das folhas de coca, os europeus tentaram transportar a planta para a Europa para seu uso no velho continente. No entanto, devido ao longo tempo de viagem e às diversas condições climáticas enfrentadas durante o trajeto de navio, o alcaloide presente nas folhas muito provavelmente era degradado até que as mesmas chegassem ao destino final, e conseqüentemente, seu uso não se difundiu na Europa, o que deve ter ocasionado um “esquecimento” da planta, uma vez que existe uma falta de relatos sobre os efeitos da folha de coca durante os séculos XVII e XVIII (LEITE, 1999).

Além dos relatos acerca de suas atividades estimulantes e uso místico, os primeiros relatos do uso medicinal da coca ocorreram por volta de 800 d.C. ainda no Império Inca, quando a saliva resultante do ato de mascar as folhas de coca era

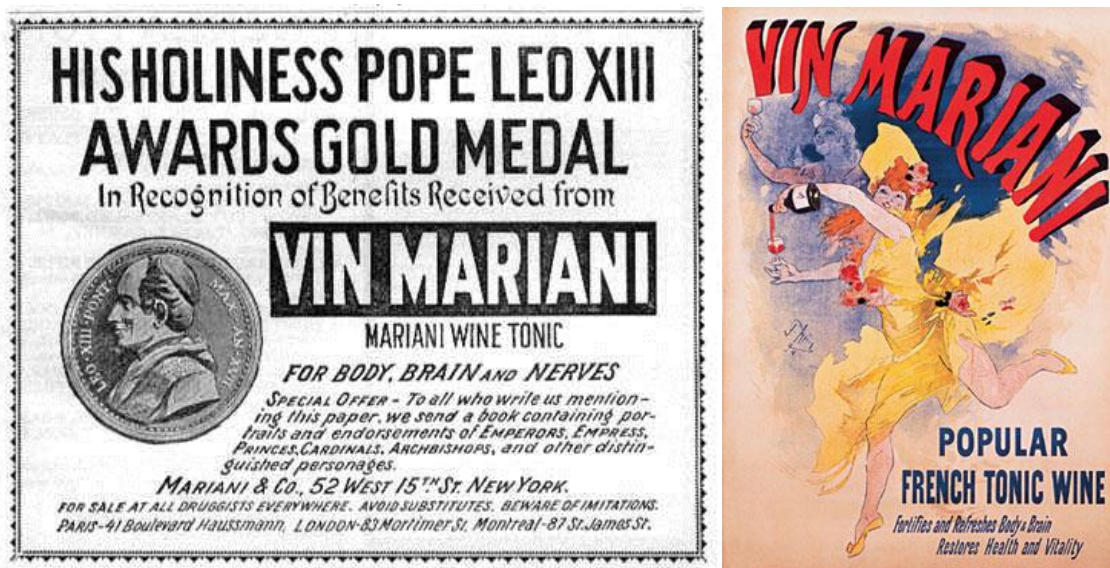
gotejada sobre a cabeça do enfermo com finalidade anestésica antes de cirurgias de trepanação (que consiste basicamente na abertura de um ou mais orifícios no crânio), tal procedimento era empregado em complexos casos de fraturas cranianas, em casos de dores de cabeça e até para tratamento de doenças mentais (WAKEFIELD; DELLINGER, 1939; ALTMAN; ALBERT; FOURNIER, 1985).

Apesar destes relatos históricos e uso intensivo por povos andinos, a caracterização da cocaína começou a ocorrer a partir de estudos fitoquímicos realizados por Freidrich Gaedcke (1828 – 1890), em 1855, quando extraiu os alcaloides presentes nas folhas de coca, dentre eles a cocaína, nomeando tal alcaloide como *erythroxyline* (GAEDCKE, 1855). Entretanto, foi apenas em 1859 que o químico alemão Albert Niemann (1834 – 1861) caracterizou e isolou o alcaloide que ele então nomeou como cocaína. No entanto, foi somente a partir de 1884 que a cocaína começou a ser utilizada na medicina devido às suas propriedades farmacológicas, e foi Karl Koller (1857 – 1944), um médico austríaco, que a utilizou como anestésico em cirurgias oftalmológicas, fato este que imediatamente popularizou a cocaína entre o meio científico da época (GRINSPOON; BAKALAR, 1981).

No entanto, mesmo antes de seu uso para fins médicos, o químico franco-italiano Ângelo Mariani (1838 – 1914), em 1863, inventou uma bebida tônico-alcoólica que tinha como base o vinho de Bordeaux misturado com extrato de folhas de coca, tal bebida era conhecida como “*Vin Mariani*” ou vinho Mariani (Figura 1), e era consumido e recomendado por ilustres personalidades da época tais como Julio Verne (1828 – 1905), H. G. Wells (1866 – 1946), Thomas Edison (1847 – 1931) e o papa Leão XIII (1810 – 1903) que inclusive, premiou a invenção do químico Mariani com uma medalha de ouro (GRINSPOON; BAKALAR, 1981; WEISS; MIRIN; BARTEL, 1994; BAHLS; BAHLS, 2002). Durante o mesmo período, diversos produtos contendo extratos de coca foram amplamente utilizados para as mais variadas causas, indo de produtos para aliviar dores de dente (Figura 2) até tônicos fortificantes, e foi quando John Stith Pemberton (1831 – 1888), um farmacêutico estadunidense, criou em 1886 uma bebida isenta de álcool preparada com extrato de folhas de coca e de noz de cola, tal bebida ficou mundialmente famosa e é reconhecida pelo nome Coca-Cola (Figura 3), tendo sido a presença da cocaína na bebida posteriormente substituída pela cafeína em 1903. Atualmente, acredita-se que esses preparados e a grande oferta de produtos tendo como base a cocaína

facilitaram o caminho para o uso da mesma em sua forma pura a partir de 1880 (CARLINI-COTRIM, 1995).

Figura 1 – Ilustrações de propagandas do *Vin Mariani*, o vinho com extrato de coca.



Fonte: <http://www.bmlisieux.com/litterature/bibliogr/mariani>

Figura 2 – Ilustrações do rótulo de um produto indicado para dor de dentes que era comercializado em 1885.



Fonte: https://regmedia.co.uk/2015/04/07/children_cocaine

Figura 3 – Informativo publicitário da bebida não alcoólica Coca-Cola, que continha cocaína em sua formulação.



Fonte: [https://en.wikipedia.org/wiki/Coca-Cola#/media/Pembertoncokeanzeige .jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Coca-Cola#/media/Pembertoncokeanzeige.jpg)

De início, a cocaína foi considerada um fármaco milagroso, sendo empregada e popularizada pelo trabalho do neurologista austríaco Sigmund Freud (1856 – 1939) que em 1884, publicou um trabalho intitulado *Über coca* (Sobre a Cocaína), um detalhado relato sobre sua experiência com a cocaína, quando Freud defendia o uso terapêutico da substância como estimulante, anestésico local, afrodisíaco, no tratamento de exaustão nervosa, histeria, sífilis e até em casos de dependência por morfina (MORIARTY; ALAGNA; LAKE, 1984). O próprio Freud utilizava doses de aproximadamente 200 mg de cocaína, recomendando o uso de 50 a 100 mg da substância por via oral como estimulante para tratar estados depressivos. Tal publicação, principalmente o uso de cocaína no tratamento de dependência por morfina, só foi retificada por Freud em 1892, quando o mesmo averiguou que a suposta “substância milagrosa” era capaz de levar a quadros de dependência. Tal percepção ocorreu após o insucesso em tratar um amigo médico

que era dependente de morfina devido a um trauma doloroso que sofrera, o qual passou a usar a cocaína na tentativa de suprir tal dependência, resultando em quadros de alucinações e delírios paranoides, além de uma dependência dupla (KARCH, 1999; BAHLS; BAHLS, 2002).

Após a “explosão” do consumo de cocaína entre o final do século XIX e início do século XX que relatos sobre seus efeitos deletérios, como dependência e até mortes começaram a ser divulgados em revistas médicas, sendo tais relatos cada vez mais frequentes com o advento da comercialização de agulhas hipodérmicas, o que proporcionou o abuso da cocaína agora pela via intravenosa (KARCH, 1999; FERREIRA; MARTINI, 2001).

Foi a partir de 1914 com a implementação do chamado *Harisson Narcotic Act* — nos Estados Unidos que a comercialização de cocaína foi devidamente proibida. No Brasil, a cocaína era livremente comercializada até início do século XX, em decorrência da proibição de sua comercialização nos Estados Unidos a sua restrição ocorreu no Brasil no ano de 1921 com o Decreto-Lei Federal nº 4.292 de 6 de julho de 1921 (CARLINI et al., 1996).

Curiosamente, em 1962 foi realizado o primeiro levantamento brasileiro sobre internações devido à dependência de drogas no território nacional, quando averiguou-se que nos 187 hospitais psiquiátricos haviam apenas 4 casos de internação por dependência à cocaína, contra mais de 8 mil por dependência ao álcool. Valores estes que correspondem ao montante de cocaína apreendida entre as décadas de 1930 – 1950 pelas autoridades policiais, que foi extremamente baixo desde a sua proibição em 1921. (CARLINI et al., 1996; BAHLS; BAHLS, 2002).

Até o início da década de 1970 poucos são os relatos na literatura que demonstram o potencial tóxico do uso crônico da cocaína sobre a saúde do usuário. Talvez tal fato, em conjunto com a popularização do movimento hippie e o aumento na oferta da droga, tenha colaborado com o aumento, de maneira repentina do consumo de cocaína mundial a partir da década de 1970, desta vez o intuito do uso era “recreacional”, já que existia a crença de que a substância era segura, e sem riscos de causar dependência (GAWIN; KHALSA; ELLINWOOD, 1994). Na década que se segue, o consumo de cocaína se torna ainda mais evidente, tal fato é devido ao aumento da oferta e disponibilidade da cocaína no mercado. Este aumento é sustentado pela maior produção e distribuição mais eficaz de cocaína por cartéis de traficantes sul-americanos. A máxima do comércio se faz sentir, quanto maior a

oferta, menor o preço, e de fato, a maior disponibilidade faz com que o preço médio da cocaína fique cada vez mais barata, se tornando mais atraente para novos usuários e possibilitando o maior consumo por usuários crônicos (FERREIRA; MARTINI, 2001).

No entanto, apesar da antiguidade do uso da cocaína isolada, já que há mais de 100 anos esta fora usada como anestésico local pelo médico Karl Koller em 1885, o consumo de uma nova forma de cocaína, popularmente conhecida como *crack*, possui uma história mais recente. Os primeiros relatos sobre o consumo por usuários desta forma de cocaína foram feitos em clínicas médicas na Bahamas em 1985 (KARCH, 1999). As primeiras evidências de uso de *crack* no Brasil são relatadas como sendo de 1989 (DUNN et al., 1996). Esta forma de uso de cocaína é mais comumente utilizada por via pulmonar/inalatória, desta maneira propicia uma rápida e elevada concentração sanguínea de cocaína em um curto intervalo de tempo, resultando em um efeito estimulante quase que de imediato, facilitando, desta maneira, maior abuso e dependência, tornando as complicações psíquicas, físicas e sociais mais deletérias ao usuário (FUKUSHIMA, 2010).

2.2 A OBTENÇÃO, AS FORMAS DE APRESENTAÇÃO E DE USO DA DROGA

Atualmente, a maior parte do fornecimento de cocaína do mundo é produzida em países sul-americanos como Peru, Colômbia e Bolívia. A principal espécie da planta utilizada é a *E. coca*, por ser a espécie que produz as maiores quantidades de cocaína, sendo a folha a parte que contém os maiores índices deste alcaloide. O processo de obtenção de cocaína mais comumente empregado é a extração química das folhas. No entanto, a quantidade de cocaína presente nas folhas colhidas diminui ao longo do tempo, sendo então processadas logo após colheita (WARNER, 1993).

As folhas de *E. coca* são colhidas manualmente (Figura 4A). Para extrair a cocaína das folhas de coca, as mesmas geralmente são processadas em laboratórios clandestinos na selva, primeiramente ocorre a imersão das folhas maceradas em solventes orgânicos, tais como querosene, gasolina, ou outros com a finalidade de

promover a extração dos alcaloides presentes nas folhas para o meio líquido (Figura 4B). Após um período de tempo, o solvente orgânico que agora contém o alcaloide cocaína é drenado e filtrado em um barril e bicarbonato de sódio ou amoníaco é adicionado à solução (Figura 4C). É realizada a filtração desta mistura para a obtenção da pasta base de cocaína (*cocaine base*) possuindo um teor de cocaína que varia de 40 a 80% (Figura 4D). A pasta base, após secagem (Figura 4E), é então dissolvida em outro solvente, geralmente acetona, adicionando-se à mistura o ácido clorídrico gerando a cocaína em forma de pó o que resulta na formação de um sal de cocaína, neste caso, o cloridrato de cocaína (Figura 4F); os solventes em excesso são removidos do cloridrato de cocaína utilizando-se uma prensa hidráulica (Figura 4G), os solventes excedentes são removidos usando fornos de micro-ondas, obtendo-se assim o cloridrato de cocaína sob a forma de pó (Figura 4H) (SHANNON, 1988; GOLDSTEIN; DESLAURIERS; BURDA, 2009).

A forma de cocaína conhecida como “*freebase*” é produzida a partir do cloridrato de cocaína que é dissolvido em água e uma substância alcalina, como hidróxido de amônia, é adicionada. Éter ou um solvente semelhante é adicionado para dissolver a base de cocaína, a cocaína é, então, extraída a partir da solução de éter por evaporação. O *crack* também é obtido a partir do cloridrato de cocaína que foi dissolvido em água, sendo a droga então misturada com bicarbonato de sódio e aquecida até a ebulição pelo tempo necessário até que se forme uma solução com aspecto oleoso (Figura 4I), então a mistura é resfriada até que ocorra a solidificação e precipitação da cocaína-base que é recolhida e passa por um processo de secagem, o que resulta no seu aspecto característico que é semelhante a pequenas “pedras”. (GOLDSTEIN; DESLAURIERS; BURDA, 2009; FUKUSHIMA, 2010).

Figura 4 – Processo de extração e obtenção da cocaína e *crack* das folhas de *Erythroxylum coca*. A: colheita manual das folhas de coca; B: extração dos alcaloides presentes nas folhas; C: drenagem e posterior alcalinização do solvente orgânico; D: filtração e obtenção da paste base de cocaína; E: processo de secagem; F: dissolução da paste base de cocaína com acetona e ácido clorídrico; G: remoção dos solventes; H: secagem e obtenção do cloridrato de cocaína em pó; I: alcalinização da cocaína para a obtenção do *crack*; J: aspecto do *crack* após processo de obtenção.



Fonte: <http://www.deamuseum.org/ccp/coca/production-distribution.html>

As formas mais comuns de cocaína apreendida são a pasta base (geralmente na forma de pó compactado, o que facilita o transporte pelos traficantes), cocaína base (obtida da purificação da pasta base de cocaína, para remoção de impurezas oriundas do processo de extração), cloridrato de cocaína, “*freebase*”, merla e *crack*. Como é ressaltado por Fukushima (2010) sobre a obtenção do *crack*: “Nenhum dos procedimentos altera a composição química da cocaína, mas apenas muda a maneira pelo qual é consumida, sendo alterada a forma de apresentação química do éster para a forma de base livre, alterando assim suas propriedades físico-químicas”. (BOGHDADI; HENNING, 1997; FUKUSHIMA, 2010).

Pelo exposto, é possível depreender que a cocaína pode ser consumida de diversas formas, dentre elas os ésteres – sais de cloridrato ou sulfato – que devido a características físico-químicas são solúveis em água e possuem elevado ponto de fusão (195°C) sendo que a cocaína em tal forma sofre degradação quando exposta a altas temperaturas, o que impossibilita que a mesma seja fumada. Geralmente o cloridrato/sulfato de cocaína encontra-se na forma de um pó branco cristalino, que pode ser administrado por via intravenosa ou, por meio da via intranasal sendo absorvida pelas mucosas da cavidade buco-nasal (BOGHDADI; HENNING, 1997). Essa forma de uso é conhecida entre os usuários como “cheirar” ou “cafungar” e consiste na prática de dispor a cocaína em pó em fileiras (chamadas pelos usuários de “carreiras” – Figura 5) que então é aspirada com o auxílio de notas de dinheiro enroladas, canudos, ou qualquer outro objetivo que possibilite o ato (GOLDSTEIN; DESLAURIERS; BURDA, 2009; CARVALHO, 2011).

Figura 5 – Cocaína em pó disposta em “carreiras” momentos antes de serem auto administradas pela via intranasal, prática de uso considerada comum entre usuários.



Fonte: http://www.huffingtonpost.ca/2013/04/16/cocaine-financial-crisis-wall-eet_n_3094423

A pasta base, cocaína base, “*freebase*”, merla e *crack* são formas de apresentação da cocaína base livre, oriundas de processos de obtenção e com graus de pureza e aspectos físicos diferentes. Entretanto, não podem ser consideradas drogas diferentes, já que todas possuem como princípio ativo a cocaína na forma de base livre. Como a cocaína na forma de base livre apresenta baixa temperatura de fusão (entre 96 e 98°C) e se volatiliza a aproximadamente 90°C, a forma de escolha de uso pelos usuários é a inalação de seus vapores através do ato de fumar (CARVALHO, 2011). Sendo que inclusive o nome *crack* é devido ao som característico que a droga faz quando sob aquecimento, provavelmente devido a crepitação de suas impurezas (NAPPO, 1996).

Durante o processo de queima do *crack* ocorre a formação do éster metilanidroecgonina (AEME), e de acordo com estudo publicado em 1991 por Nakahara e Ishigami, tal processo é termodependente, quanto mais elevada for a temperatura, maior é a conversão de cocaína em AEME, em temperaturas de até 230°C a presença de cocaína é de 68 a 77%, sendo, aproximadamente apenas 30% em temperaturas superiores a 255°C, nota-se ainda, que em temperaturas abaixo de 170°C não foi evidenciada a formação de AEME (NAKAHARA; ISHIGAMI, 1991; HOFFMAN, 2006).

Como relatado por Oliveira e Nappo (2008), o uso de *crack* é realizado por meio cachimbos, muitas vezes improvisados (Figura 6), que são produzidos com uma grande variedade de materiais como, por exemplo, copos de iogurte e de água mineral, isqueiro, tubo de pasta de dente, tampas de garrafas plásticas, canos para encanamentos, lâmpadas, entre outros, sendo que a lata de alumínio é descrita como a principal “matéria-prima” na manufatura dos cachimbos. Os autores ainda descrevem o relato a seguir de um usuário sobre a maneira mais frequente de uso do *crack* na cidade de São Paulo: “(...) corta o isqueiro no meio e coloca um caninho de metal (na parte de baixo) e em cima o alumínio (...) fura o alumínio com uma agulha e em cima dos furos coloca as cinzas de cigarro e em cima delas, a pedra (...)” (OLIVEIRA; NAPPO, 2008).

Figura 6 – Diferentes aparatos de queima (“cachimbos”) utilizados pelos usuários de *crack* para consumirem a droga.



Fontes: cdn.c.photoshelter.com/img-get/I00009JlChpad7Gg/s/750/600/Crack-Pipe-2.jpg;
http://imgsapp2.correiobraziliense.com.br/app/noticia_127983242361/2013/09/19/388977/20130919113741827320a.jpg;
http://www.teoriaedebate.org.br/sites/default/files/imagecache/image_big_destaque/materia/imagens/crack_cachimbo_marcelo_casal.jpg

2.3 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

2.3.1 Toxicocinética

As formas mais comumente encontradas de cocaína são a do alcaloide sob a forma de um éster – o cloridrato/sulfato de cocaína – e também na sua forma de base livre, podendo ser administrada por várias vias: intranasal (absorção através da mucosa nasal), intravenosa, pulmonar, oral e outras mucosas, como gengivas e até mesmo a aplicação em mucosas íntimas. No final de 1970, a cocaína cloridrato foi utilizada principalmente por inspiração nasal, até o início dos anos 1980, quando a

cocaína se tornou menos dispendiosa e mais disponível sendo utilizada por via intravenosa. Nos meados dos anos 1980 tornou-se amplamente disponível na forma de *crack* (BOGHADADI; HENNING, 1997). Assim, as vias preferenciais de uso dos usuários de cocaína são a inspiração ou injeção por via intravenosa ou intramuscular do cloridrato/sulfato de cocaína e a exposição via pulmonar por meio do ato de fumar a cocaína base livre, sendo o *crack* a forma mais consumida por esta via (BOGHADADI; HENNING, 1997; LEIKIN; PALOUCHEK, 2008).

Como é de se esperar, a velocidade de absorção e o pico de concentração plasmática da cocaína são decorrentes da via de administração da mesma. O pico de concentração plasmática de cocaína nas vias intravenosa e pulmonar são semelhantes; a via pulmonar, entretanto, apresenta o pico de concentração entre 1 a 3 minutos após a exposição, sendo que na via intravenosa o mesmo ocorre entre 3 a 5 minutos; valores estes que contrastam com os da via intranasal, que ocorre de 15 a 20 minutos após a administração (CONE, 1995; WARNER, 1993). Apesar do fenômeno de absorção não ocorrer na via intravenosa, é tido que devido à proximidade do local de absorção da via pulmonar ao sistema nervoso central (SNC), ou seja, o circuito sanguíneo: pulmão – átrio/ventrículo esquerdo – aorta – SNC, a via pulmonar seja a via com o início de ação mais rápido, sendo que o usuário nota seus efeitos em cerca de 3 a 5 segundos após o consumo da droga, o mesmo só ocorre após 10 a 60 segundos na via intravenosa, e aproximadamente em 5 minutos na via intranasal. Ainda, observa-se que entre essas vias de administração a via intranasal é a que demonstra um maior tempo de duração dos efeitos, sendo que as vias intravenosa e pulmonar apresentam um curto período de duração dos efeitos da cocaína (JEFFCOAT et al., 1989; BORTOLOTTI; GOTTARDO; TAGLIARO, 2012).

Devido às características toxicocinéticas do *crack*, o seu padrão de uso assemelha-se ao da cocaína pela via intravenosa, sendo que quase imediatamente após o uso, o usuário experimenta sensações de euforia, autoconfiança, extremo prazer além da diminuição do apetite e da necessidade de sono, efeitos estes que duram aproximadamente 5 minutos (CONE, 1995; NAPPO, 1996). Este curto período de duração do efeito desejado faz com que os usuários façam o consumo repetido da droga, muitas vezes quando esse padrão de uso é interrompido abruptamente os usuários apresentam um forte impulso para usar a substância, conhecido como fissura que é descrita pelos usuários como: “uma necessidade

imprescindível para o corpo, indispensável para a vida, comparada à fome” (CHAVES et al., 2011). Na impossibilidade de saciá-la os usuários enfrentam um grande sofrimento, com pensamentos obsessivos em relação à obtenção do *crack* e/ou dinheiro para adquiri-lo, nesta fase os usuários podem se tornar agressivos e se utilizarem de qualquer artifício para a obtenção da droga, como vender objetos pessoais e/ou familiares, recorrer ao furto ou roubo e até mesmo, prestar favores sexuais em troca da droga. Outro problema decorrente da fissura é o padrão de consumo intenso, contínuo e repetitivo de *crack*, conhecido como *binge*, é provocado pela fissura e costuma durar dias até que o suprimento da droga acabe ou quando ocorre a exaustão física do usuário (CHAVES et al., 2011).

A meia-vida da cocaína no plasma sanguíneo é curta, entre 0,5 e 1,5 horas, embora a cocaína seja rapidamente biotransformada no plasma sanguíneo, a mesma é mais lentamente eliminada em outros tecidos, e pode ser detectada no cérebro, humor vítreo e fígado por 8 ou mais horas após o seu uso (PRAKADASH; DAS, 1993; WARNER, 1993). Os principais metabólitos oriundos da biotransformação de cocaína são: a benzoilecgonina (BE) que pode ser originada por meio da hidrólise espontânea ou, em menor quantidade, por meio da ação de carboxilesterases e responde a cerca de 45% dos produtos de biotransformação da cocaína; a éster metilecgonina, que é produzida por meio de hidrólise catalisada por ação da enzima butirilcolinesterase e forma aproximadamente 40% dos produtos de biotransformação da cocaína; também são originados, em pequenas quantidades, a norcocaína, a benzoilnorcocaína, a ecgonina, e a n-hidroxinorcocaína. Menos de 10% da cocaína é biotransformada por N-demetilação oxidativa no fígado, por enzimas presentes no citocromo P-450, para norcocaína, que é um metabólito de cocaína com atividade farmacológica, sendo inclusive hepatotóxico e com capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica. Aproximadamente 1 % da cocaína é excretada pela urina de maneira inalterada (FLEMING; BYCK; BARASH, 1990; BENOWITZ, 1993; BOGHDADI; HENNING, 1997).

Ainda, a cocaína e o álcool são muitas vezes consumidos concomitantemente, o que no organismo, devido à transesterificação da molécula de cocaína por ação de esterases, forma a substância denominada cocaetileno, que possui ação farmacológica semelhante à da cocaína e com um tempo de meia vida de aproximadamente 150 minutos, mais longo do que o da própria cocaína que é de 0,5 a 1,5 horas (BENOWITZ, 1993; WILSON et al., 1995; CHASIN, 1996).

2.3.2 Toxicodinâmica

A cocaína pode ser classificada como um potente estimulante do SNC, e possui como principal mecanismo de ação o aumento da disponibilidade dos neurotransmissores dopamina, serotonina e noradrenalina nas sinapses, atuando por meio do bloqueio dos transportadores de recaptção pré-sináptica dessas monoaminas. Ao prejudicar essa recaptção de neurotransmissores, a cocaína faz com que ocorra o acúmulo dos mesmos nas fendas sinápticas, o que aumenta substancialmente a estimulação dos receptores pós-sinápticos. O comportamento estimulante e de euforia, classicamente observado nos usuários de cocaína se deve, principalmente, à elevação da concentração de dopamina nas regiões mesolímbicas e mesocorticais do SNC (BENOWITZ, 1993; BOGHADADI; HENNING, 1997; CARVALHO 2011). Ainda, estudos atribuem o potencial de abuso da cocaína com a elevação dos níveis extracelulares de dopamina numa região do SNC conhecida como *nucleus accumbens*, região esta que possui um papel significativo no processamento cognitivo de aversão, motivação, recompensas e prazer (CARELLI, 2002; KALIVAS; O'BRIEN, 2008; MALENKA et al., 2009). A cocaína também suprime a atividade de regiões do SNC como o *locus coeruleus*, efeitos que estão relacionados à supressão de sentimentos de receio e pânico, fato que ajuda a explicar os efeitos “ansiolíticos” transitórios e eufóricos da cocaína (DAS; LADDU, 1993; MÜLLER et al., 2008; LIU et al., 2014).

O uso repetitivo de cocaína faz com que ocorra o esgotamento gradual de dopamina nos neurônios pré-sinápticos do SNC por meio da inibição do mecanismo de recaptção de dopamina. Conseqüentemente, o número de receptores dopaminérgicos aumenta para compensar a diminuição da disponibilidade de dopamina, fenômenos estes que combinados geram o quadro de fissura. A diminuição dos níveis de dopamina cerebral pode ocasionar anormalidades das vias dopaminérgicas o que é relatado em distúrbios psiquiátricos (DAS; LADDU, 1993; PRAKADASH; DAS, 1993).

Atualmente uma das teorias aceitas sobre o fenômeno de dependência às drogas é a Teoria Neurobiológica da Dependência como Escolha. Ela caracteriza a dependência como resultado de processos de aprendizagem em que a droga e estímulos associados a seus efeitos adquirem controle potente sobre o

comportamento, sustentando que o consumo repetido de drogas diminui o valor reforçador de atividades concorrentes (por exemplo, atividades rotineiras do dia-a-dia como trabalhar, tomar banho, manter contato social, entre outros) além de promover mudanças no circuito neuronal relacionado ao valor reforçador (KALIVAS; VOLKOW, 2005; GARCIA-MIJARES; SILVA, 2006). Entende-se como “reforço ou valor reforçador”, o estímulo que irá aumentar ou manter a frequência do comportamento que o gerou. O potencial de reforço desencadeado pelo uso da droga atua no chamado centro de recompensa do SNC e, aliado a outros fenômenos como, por exemplo, estímulos ambientais, busca pela sensação prazerosa provocada pelo consumo da droga, tolerância (devido às alterações metabólicas e/ou neuroadaptativas), entre outros; constituem e determinam o chamado potencial de abuso de uma determinada droga (KALIVAS; VOLKOW, 2005; MOREAU, 2008). Ainda, é tido que o potencial de abuso de uma droga é influenciado pela velocidade e intensidade do reforço (como por exemplo, a sensação prazerosa), sendo assim, quanto menor o intervalo de tempo entre o uso e o reforço positivo, maior o potencial de abuso da substância (GARCIA-MIJARES; SILVA, 2006; MOREAU, 2008).

A cocaína, em concentrações elevadas, pode também atuar como uma droga anticolinérgica. A concentração de cocaína necessária para inibir receptores muscarínicos é de aproximadamente 20 vezes mais elevada do que a concentração plasmática necessária para produzir euforia (BOGHDADI; HENNING, 1997). Outra ação importante da cocaína é seu efeito como anestésico local, o efeito anestésico é alcançado bloqueando-se de forma competitiva os canais de sódio neuronais, prejudicando assim a condução de impulsos nervosos. A cocaína diminui a taxa de despolarização e pode diminuir a amplitude do potencial de ação, produzindo uma condução mais lenta do potencial de ação, além de bloquear os canais de sódio nos miócitos cardíacos, podendo prejudicar diretamente a contratilidade do miocárdio, sendo capaz de produzir arritmias cardíacas (BENOWITZ, 1993). Ainda, o consumo intranasal de cocaína frequentemente está associado à necrose da cartilagem nasal e perfuração do septo nasal, bem como úlceras na região orofaríngea, estas complicações são devido aos efeitos adrenérgicos da cocaína resultando em vasoconstrição aguda, o que pode levar a um quadro de necrose isquêmica da mucosa nasal e orofaríngea e da cartilagem nasal (DAGGET et al., 1990). Devido à vasoconstrição periférica profunda, a dissipação do calor corporal (que em usuários geralmente está elevada devido ao aumento da atividade motora) é prejudicada,

ocasionando um quadro de hipertermia aguda, que, por sua vez, pode inclusive originar convulsões (DHUNA et al., 1991).

Nota-se que usuários crônicos de cocaína desenvolvem tolerância à euforia induzida pela droga, assim o usuário tende a utilizar doses cada vez maiores de cocaína para produzir os mesmos efeitos euforizantes. No entanto, apenas se desenvolve tolerância parcial para os efeitos simpaticomiméticos da cocaína, a dissociação entre o desenvolvimento de tolerância no SNC e os efeitos cardiovasculares da cocaína contribuem significativamente para o desenvolvimento de toxicidade cardiovascular principalmente durante os episódios de uso intenso. É tido que os efeitos cardiotóxicos da cocaína são devidos a um sinergismo entre as ações simpatomiméticas, bloqueio dos canais de sódio, além da inibição de receptores muscarínicos do tipo M₂ na musculatura cardíaca, ocorrendo ainda vasoconstrição periférica através da estimulação central do hipotálamo, quadro este propício para que ocorra taquicardias, fibrilações ventriculares, isquemia, infarto agudo do miocárdio e, inclusive morte súbita de causas cardiovasculares (BONI; BARR; MARTIN, 1991; BENOWITZ, 1993; GOLDSTEIN; DESLAURIERS; BURDA, 2009).

A capacidade da cocaína para anestesiar a cavidade oral e a árvore traqueobrônquica, predispõe o usuário para complicações pulmonares. Ainda, a cocaína pode agir como um hapteno e induzir a produção de imunoglobulina E, na reexposição à cocaína, uma reação antígeno-anticorpo que ocorre na superfície de mastócitos, com subsequente degranulação e liberação de histamina, serotonina e fatores pró-inflamatórios podem ocasionar lesão de tecido pulmonar (BOGHDADI; HENNING, 1997). A inalação de vapores de cocaína excessivamente quentes, ou até mesmo a ignição de éter inalado (o qual é usado no tratamento de base livre de cocaína para a obtenção de *freebase*) pode causar inflamação aguda e necrose (O'DONNELL et al., 1991).

Um fato preocupante que se correlaciona com as alterações cardiovasculares causadas pelo uso da cocaína é o conhecimento de que a circulação uteroplacentária é vulnerável às alterações cardiovasculares maternas, já que o fluxo sanguíneo uteroplacentário não é auto regulável. (ROBERTSON; MOON, 2003). Sendo assim, a vasoconstrição uterina aumentaria a resistência vascular do útero, o que diminuiria a perfusão sanguínea desse órgão, conseqüentemente, o suprimento nutricional e o aporte de oxigênio ao feto são diminuídos, podendo

provocar cianose e hipóxia fetal (EDWARDS; BOWLES, 1988). Ainda, a cocaína altera a produção placentária de prostaglandinas *in vitro*, favorecendo a produção de tromboxano, o que pode causar vasoconstrição e diminuir o fluxo sanguíneo uteroplacentário (MANJU et al., 1994). O aumento da pressão sanguínea maternal após a 20^a semana de gestação ocasiona em proteinúria, o que geralmente é acompanhado por edemas difusos podendo levar ao quadro de pré-eclâmpsia, que pode evoluir para um quadro de eclâmpsia ocasionando convulsões e até mesmo o óbito materno e também fetal (FEITOSA-FILHO et al., 2008).

Um estudo para identificar associações entre exposição à cocaína durante a gravidez e os problemas médicos em recém-nascidos desde o nascimento até alta hospitalar foi realizado por Bauer et al. (2005) e evidenciou os seguintes fatos: neonatos expostos à cocaína durante a gravidez tiveram um período de gestação mais curto, com uma redução média de 1,2 semanas; no momento do nascimento pesavam em média 536 g a menos, eram cerca de 2,6 centímetros menores, e tinham a circunferência da cabeça 1,5 centímetros menores do que crianças não expostas a droga. Os sintomas relacionados ao sistema nervoso autônomo e central foram mais frequentes no grupo de neonatos expostos à droga, que apresentavam sintomas como: tremor, grito estridente, irritabilidade, sucção excessiva durante o ato de mamar, além de se apresentarem um estado hiperalerta. Todavia, ao exame ultrassonográfico, não foram detectadas diferenças em órgãos internos (BAUER et al., 2005).

2.3.3 Outros fatores

Conforme descrito por Oliveira e Nappo (2008), devido às habilidosas estratégias de mercado dos traficantes que o *crack* rapidamente se popularizou entre os usuários de drogas em território brasileiro. Como estratégia para facilitar a adesão por parte do usuário ao uso de *crack*, os traficantes esgotavam as reservas de outras drogas nos pontos de distribuição, disponibilizando apenas o *crack* (NAPPO et al., 1996; OLIVEIRA; NAPPO, 2008).

No Brasil, é descrito que os usuários de *crack* e/ou similares referem consumir, num dia “normal” de uso uma média de 13,42 pedras/porções destas drogas. Entretanto, os termos pedra ou porção são intrínsecos às definições dos

usuários não havendo como definir com precisão o peso em gramas e conteúdo do que cada usuário denomina “pedra”. Tendo como base a elevada frequência de uso, especialmente nas capitais, onde também se concentram cenas de uso de drogas com grande quantidade de usuários, chegando por exemplo, ao número de 200 usuários (chamadas popularmente de “cracolândias”), a Pesquisa Nacional Sobre o Uso de *Crack* de 2014 sugere que: “a operação de uma cena de grande porte se traduz numa circulação e consumo de 3.000 pedras/dia, ou mesmo, 3.000 pedras/turno, considerando que a circulação de usuários se renova por turnos. Um mercado dessa magnitude exige circulação intensa, que atravessa redes dinâmicas de comércio local da droga e uma (ou mais de uma) interface com o mercado “atacadista” de pasta base, considerando que a fabricação do *crack* é “artesanal” e não se dá em grandes laboratórios de refino, como é o caso da cocaína em pó”. Tais dados reforçam a importância da inibição do tráfico de drogas nas fronteiras, além do controle da comercialização de reagentes químicos que possibilitem as modificações e/ou purificações da cocaína, sendo este especialmente complexo quando de tratando do mercado de *crack* que possui características extremamente dinâmicas e perfil fragmentado (BERTONI; BASTOS 2014; UNODC, 2015).

De acordo com estimativas do ano de 2012, o percentual de usuários de crack e/ou similares que fazem uso regular da droga nas 26 capitais do Brasil mais o Distrito Federal foi de 0,81%, que em números absolutos representa aproximadamente 366 mil indivíduos. O perfil dos usuários brasileiros de *crack* foi levantado a partir de 7381 entrevistas com usuários de *crack* encontrados em cenas abertas de uso, em todas as regiões do Brasil, e evidenciou que a maioria (aproximadamente 31%) dos usuários nessas cenas abertas de uso se encontram na faixa etária de 18 a 24 anos, sendo a idade média de aproximadamente 30 anos (tal pesquisa apenas entrevistou usuários com mais de 18 anos). Nota-se uma predominância de 78,68% de usuários do sexo masculino em tais cenas, sendo que grande maioria, 79,15%, se autodeclarou como sendo “não-branco”. Quando questionados quanto à moradia nos 30 dias anteriores à pesquisa, 39,04% relataram estar em condições de rua, sem moradia fixa, enquanto que 36,36% relataram morar em casa/apartamento próprio ou de família. Quanto à escolaridade foi observado que a grande maioria dos usuários (57,80%) já frequentou a escola, tendo evadido o ensino básico entre a 4ª e a 8ª série do Ensino Fundamental, e 64,9% declarou trabalhar por conta própria ou realizar “bicos”, sem possuir uma renda fixa. De modo geral, observou-se que os usuários de *crack*, em

sua maioria, eram homens, jovens, em situação de rua, pouco escolarizados e sem renda fixa. Ainda, quando questionados ao motivo de terem iniciado o uso de *crack* e/ou similares, 58,28% afirmaram que tiveram a primeira experiência com a droga devido a ter sentido vontade ou curiosidade de ter o efeito da droga, sendo que apenas 8,83% afirmaram que o uso inicial foi devido a “uma vida ruim, sem perspectivas” (BERTONI; BASTOS 2014).

O uso de *crack* compromete a capacidade de tomar decisões saudáveis por conta de sua natureza altamente viciante e seus efeitos sob o funcionamento neurocognitivo normal, fato este que predispõe os usuários a diversos comportamentos de risco (HOFF et al., 1996). De fato, dentre os mais de 7300 usuários de *crack* e/ou drogas similares entrevistados pela Pesquisa Nacional Sobre o Uso de *Crack* de 2014, 71,01% afirmaram já terem compartilhado o aparato para o consumo da droga e, 42,17% afirmaram terem realizado algum tipo de troca de sexo por droga nos últimos 30 dias. De maneira diferente dos usuários de *crack* internacionais, como por exemplo, dos Estados Unidos e Canadá, os usuários de *crack* brasileiros, em sua grande maioria, não são usuários ou ex-usuários de drogas injetáveis, sendo que apenas cerca de 9,21% dos usuários de *crack* em território nacional já relataram terem feito uso de drogas pela via intravenosa. Entretanto, a grande maioria dos usuários encontrada em cenas abertas de consumo de drogas é “poliusuário”, que relatam o uso, muitas vezes concomitante ao *crack*, de diversas outras substâncias lícitas, como por exemplo, o álcool e o tabaco citados por 77,07 e 85,06%, respectivamente, dos usuários entrevistados, e ilícitas, como a maconha e a cocaína inalada, respectivamente, 67,32 e 47,94% (BERTONI; BASTOS 2014).

Como visto anteriormente, dados de estudos epidemiológicos apontam que a prevalência de soropositividade para HIV é aproximadamente 8 vezes maior em usuários de *crack* em comparação ao restante da população (BASTOS, 2009; BERTONI; BASTOS 2014; BRASIL, 2012). Nota-se ainda, semelhança quando avaliada a prevalência de infecção pelo vírus da hepatite C (HCV), que é de aproximadamente 2,63% dos usuários e *crack* e de 1,38% na população geral (PEREIRA et al., 2013; BERTONI; BASTOS 2014).

Existem indícios de que o uso de *crack* possa promover alterações no sistema imunológico. Em um estudo com mulheres HIV-positivas usuárias de *crack*, foi observada uma progressão mais rápida do HIV/AIDS, aumento da frequência de doenças definidoras de AIDS (por exemplo, tuberculose extrapulmonar, encefalopatia

pelo HIV, sarcoma de Kaposi, entre outras complicações), e aumento da mortalidade relacionada com a AIDS (COOK et al., 2008). É notável que dentro de poucos dias após a infecção, o HIV-1 entra no SNC onde várias células residentes podem servir como reservatórios para o vírus. Nos seres humanos, distúrbios neurocognitivos associados ao HIV-1 ocorrem em aproximadamente um terço dos pacientes infectados, estes sintomas podem variar de distúrbios motores que afetam quase 50% dos indivíduos HIV-positivos em terapia antirretroviral, a encefalite severa e/ou demência que afeta quase 15 a 20% das pessoas com AIDS que não fazem uso da terapia antirretroviral. Adicionalmente, o SNC pode funcionar como um potencial reservatório viral devido à incapacidade da maioria dos agentes antirretrovirais para penetrar eficazmente a barreira hemato-encefálica (BUCH et al., 2011). O SNC é também um órgão-alvo para a cocaína, sendo que estudos evidenciaram que tal droga prejudica as funções de macrófagos e linfócitos e aumenta a expressão de HIV-1 nestas células (BAGASRA; POMERANTZ, 1993; KLEIN et al., 1993; BALDWIN et al., 1997a; ROTH et al., 2002).

Com base no exposto até o momento, nota-se o quão complexo é o estado da saúde física e emocional dos usuários de *crack*. Essa população em particular está extremamente vulnerável frente ao risco de contrair doenças infecciosas, isso se deve aos comportamentos de risco assumidos, a inserção destes indivíduos em contextos violentos, marginalizados pela sociedade e geralmente sem a mínima infraestrutura para garantir um estado de saúde aceitável. Existe, portanto, a clara necessidade de se adotar ações preventivas, tais como: detectar precocemente, controlar e reduzir a incidência de determinadas doenças em tal população; promover um maior policiamento e fiscalização das fronteiras do território nacional visando reduzir o montante de drogas ilícitas disponíveis; aumentar a frequência e alcance dos programas de conscientização sobre as drogas em âmbito escolar, já que grande maioria dos usuários de *crack* evadiu os estudos ainda durante o Ensino Fundamental; ter um melhor conhecimento farmacológico e toxicológico sobre a droga de rua conhecida como *crack*, afim de se compreender os mecanismos pelos quais a droga promove seus efeitos deletérios sob os mais diferentes sistemas e órgãos, incluindo alterações comportamentais e imunológicas provocadas pelo uso do *crack*. Como já foi ressaltado, faz-se necessário um modelo de estudo do *crack* sem a presença das inúmeras variáveis encontradas em seus usuários, que seja factível, acessível, e de fácil replicação, neste contexto, encontra-se o presente estudo.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar os possíveis efeitos tóxicos, imunotóxicos e alterações comportamentais provocados pela exposição à fumaça resultante da queima do *crack* em ratos Wistar adultos expostos à droga duas vezes ao dia, durante 28 dias.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Estudo analítico

- Determinação do teor de cocaína presente no *crack*;
- Determinação da quantidade de *crack* a ser queimada e período de exposição dos animais por meio da avaliação dos níveis séricos de cocaína;

✓ Avaliação da toxicidade sistêmica

- Avaliação dos parâmetros clínicos, bioquímicos, hematológicos e histopatológicos de ratos expostos diariamente à droga;

✓ Avaliação imunotoxicológica

- Imunopatologia: avaliação do peso relativo, celularidade, morfometria de órgãos linfoides e fenotipagem de linfócitos esplênicos de ratos expostos ao *crack*;
- Atividade de macrófagos: avaliação do *burst* oxidativo e fagocitose de macrófagos peritoneais e de neutrófilos circulantes de ratos expostos ao *crack*;
- Avaliação da resposta imune humoral: produção de anticorpos T-dependentes de ratos expostos ao *crack*;
- Avaliação da reação de hipersensibilidade do tipo IV (*Delayed-Type Hypersensitivity* – DTH) de ratos expostos diariamente à droga;
- Avaliação do perfil de citocinas séricas de ratos imunizados ou não e que foram expostos diariamente ao *crack*;

✓ **Estudo comportamental:**

- Avaliação da atividade geral em campo aberto de ratos expostos ao *crack*;
- Avaliação da cognição no teste de alternância espontânea no labirinto em T de ratos expostos ao *crack*;
- Avaliação do comportamento de aversão/preferência ao odor do *crack* em ratos expostos ao *crack*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção serão detalhados os materiais e os procedimentos realizados durante esta pesquisa.

4.1 O *CRACK*

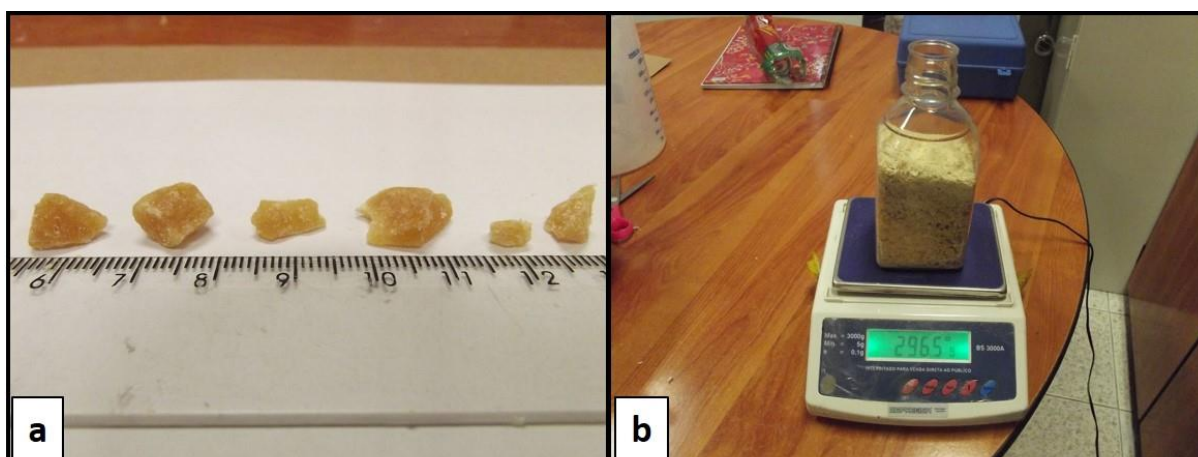
A autorização para o uso da droga foi deferida pelo Juiz de Direito – Corregedor da Polícia Judiciária e Coordenador da DIPO – Dr. Kleber Leyser de Aquino, em 28 de setembro de 2012, tendo sido dado despacho de concessão da droga (Anexo A) pelo Excelentíssimo Juiz de Direito, Dr. Lucas Pereira Moraes Garcia, da 3ª Vara do Tribunal de Justiça do Estado de São Paulo, Comarca de Itapeverica da Serra. Segundo despacho de processo nº. 0007417-59.2012.8.26.0268, o montante apreendido junto ao réu foi de 684 gramas da droga, que se encontrava sob custódia nos próprios do Departamento Estadual de Repressão ao Narcotráfico – Divisão Especial de Apoio (DENARC-DEAP), o qual nos entregou um pacote contendo 416 gramas da droga, cujo laudo da perícia constatou positividade para cocaína. A figura 7 mostra o pacote para nós entregue pelas autoridades policiais (a) e seu conteúdo (b), já a figura 8 mostra o aspecto característico da droga quando “desembalada” (a) e o montante de droga analisado em balança de nosso laboratório (b): 296,5 gramas de droga.

Figura 7 – Pacote de droga adquirida junto ao DENARC (a) e seu conteúdo constituído de bolsinhas de crack (b).



Fonte: (PONCE, F., 2015).

Figura 8 – Característica da droga quando desembalada (a) e seu peso final líquido obtido em equipamento calibrado de nosso laboratório (b).



Fonte: (PONCE, F., 2015).

4.2 OS ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar com aproximadamente 45 dias de idade (adultos jovens) provenientes do Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ - USP). Os ratos permaneceram durante todo o experimento em caixas plásticas medindo 40 x 50 x 20 cm e forradas com maravalha esterilizada, sendo alocado 1 rato por caixa. As

caixas foram mantidas em sala com aeração, exaustão, temperatura (22°C a 24°C) e umidade (45% - 65%) controladas por meio de aparelhos de ar condicionado central em um ciclo claro/escuro de 12 horas. Os ratos receberam ração Nuvilab e água filtrada *ad libitum*. Os animais foram utilizados de acordo com as normas de bioética desta Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP sob número 2882/2013 expedido pelo Comitê de Bioética desta Faculdade.

4.3 REAGENTES

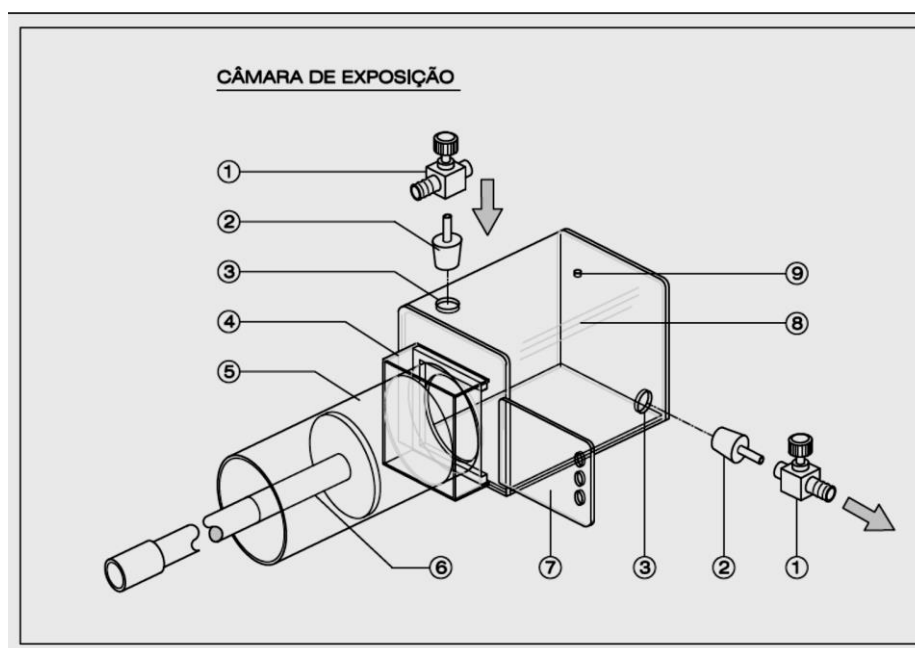
✓ Análises químicas: Acetonitrila grau HPLC (Merck); ácido orto-fosfórico P.A. (Merck); diclorometano grau HPLC (Vetec); hidróxido de amônio P.A. (Vetec); isopropanol grau HPLC (Merck); metanol grau HPLC (Merck); padrão de cocaína 1mg/mL da marca *Cerilliant*®; prolintano (*LGC Standards*); trietilamina grau HPLC (Vetec);

✓ Estudos biológicos: Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 10% 3mM (Merck); adjuvante de Freund completo e incompleto (*Sigma-Aldrich*™); álcool etílico 96° (Archote); anticorpos monoclonais *mouse anti-rat IgM* e *mouse anti-rat CD3* (ambos conjugados a r-ficoeritrina – PE), *mouse anti-rat CD45* e *mouse anti-rat CD8* (ambos conjugados a isotiocianato de fluoresceína – FITC) e *mouse anti-rat CD4* (conjugado a *allophycocyanin* – APC) da BD Pharmingen™; azul de *trypan* 4% (Gibco); cetamina (Dopalen® - Ceva); cloreto de sódio (Nuclear); diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) (Molecular Probes); forbol de miristato acetato (PMA); formol 10% (Merck); fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio dibásico (Sigma); iodeto de propídeo (PI) (Sigma Chemical); *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) (Calbiochem); kits de análise para bioquímica sérica Randox™: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), albumina (ALB), proteínas totais (PT), colesterol total (COL), *high density lipoproteins* (HDL), triglicérides (TRIG), creatinina (CREA), uréia e glicose (GLI); kits de anticorpos policlonais (*goat anti-IgM* e *anti-IgG* conjugados com *horseradish peroxidase* - HRP) (Bethyl Laboratories); meio de cultura RPMI-1640 (Gibco); xilazina (Xilazin® - Syntec).

4.4 O EQUIPAMENTO DE EXPOSIÇÃO

O modelo foi desenvolvido por nosso grupo de pesquisa e é constituído por duas câmaras: a câmara de exposição, onde sob pressão negativa (-70mmHg) a fumaça do *crack* que está sendo queimado no meio exterior é aspirada (analogamente ao pulmão) e confinada; e uma antecâmara construída com um tubo de cloreto de polivinil (PVC) com 100 mm de diâmetro com janela em *polietileno tereftálico* composto (PETG) transparente de 0,8 mm de espessura para visualização dos animais aí mantidos até a queima total do *crack* e final do confinamento da fumaça. Entre as câmaras existe uma eclusa de conexão acoplada a uma porta que é aberta assim que a queima da droga é finalizada e há o restabelecimento do equilíbrio de pressão atmosférica, para que então os animais na antecâmara sejam conduzidos para o interior da câmara de exposição (Figura 9).

Figura 9 – Ilustração do equipamento de exposição. Legenda: 1) válvula esfera de ½ polegada; 2) rolha com conexão de rosca em aço; 3) orifício; 4) Batente da eclusa; 5) antecâmara de espera; 6) êmbolo para direcionamento dos animais à câmara de exposição; 7) porta; 8) câmara e exposição e 9) orifício para passagem de sondas. Note que a válvula lateral é conectada à uma bomba de vácuo que posteriormente ao final do ciclo de vácuo é fechada. A válvula no topo, que é conectada ao queimador da droga por meio de tudo de silicone, é aberta concomitantemente com o momento em que a droga está sendo queimada, sendo toda a fumaça resultante da queima aspirada para o interior da câmara.



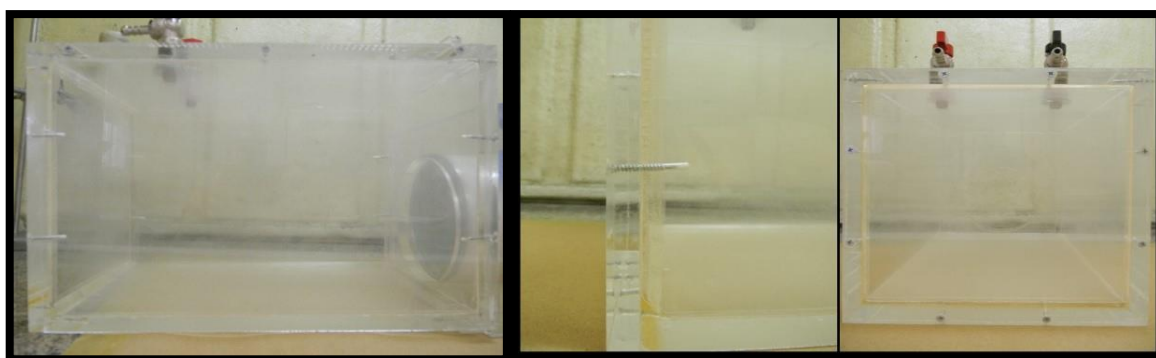
Fonte: (HUEZA, 2014).

4.4.1 A câmara de exposição

A câmara de exposição (Figura 10) possui as seguintes medidas internas: 34,0 x 21,5 x 22,0 cm (comprimento x profundidade x altura), totalizando um volume de aproximadamente 16 litros e foi toda confeccionada com acrílico cristal, com chapa de 12 mm de espessura, sendo todas as paredes coladas com cola específica para acrílico (cola acrílica S-330) e ainda parafusadas (parafuso *philips* auto brocante de 25 x 3,5 mm) em pontos estratégicos de vulnerabilidade quando sob alta pressão negativa (Figura 11).

Figura 10 - Caixa de acrílico com paredes de 12mm e com volume total de 16 litros.

Figura 11 - Detalhe de parafuso tipo *Philips* igualmente distribuídos pelas junções entre as paredes.



Fonte: (PONCE, 2015).

Diferente do que mostra a figura 9, resolveu-se por colocar ambas as válvulas esfera no topo da caixa (Figura 12), sendo uma de saída de ar (conectada à bomba de vácuo – válvula preta) e uma para entrada da fumaça do *crack* (conectada ao queimador – válvula vermelha).

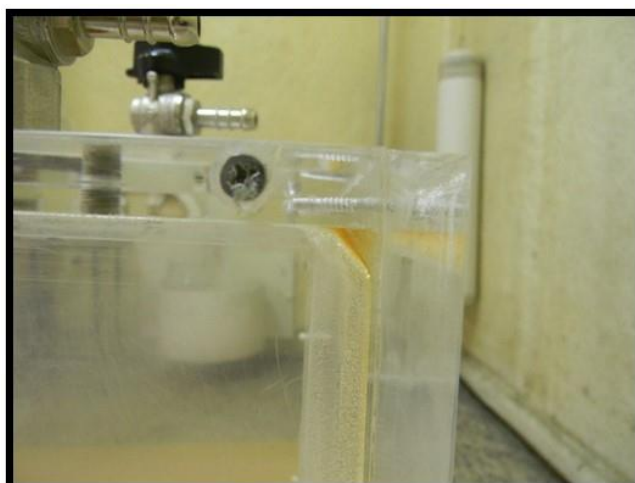
Figura 12 - Detalhe das válvulas de ½ polegada do tipo esfera inseridas por meios de rosqueamento no topo da câmara de exposição.



Fonte: (PONCE, 2015).

Ainda, foi possível fazer a rosca para a conexão das válvulas diretamente sobre a chapa de acrílico (Figura 12), o que diminuiu a possibilidade de vazamentos quando da inserção das rolhas com haste rosqueada. No interior da câmara, nas junções entre as paredes, aplicou-se uma camada de polímero S-330, eliminando-se desta forma os cantos-vivos (90°) no interior da caixa, o que além de facilitar a limpeza também promoveu reforço das junções das paredes contra a pressão negativa, conforme ilustra a figura 13. Em uma das extremidades da caixa, há a abertura da mesma, a qual nada mais é do que um orifício redondo com 96mm de diâmetro.

Figura 13 - Foto mostrando detalhe do acabamento interno, evitando desta forma os cantos em 90° e dando mais reforço às paredes contra a pressão negativa interna.

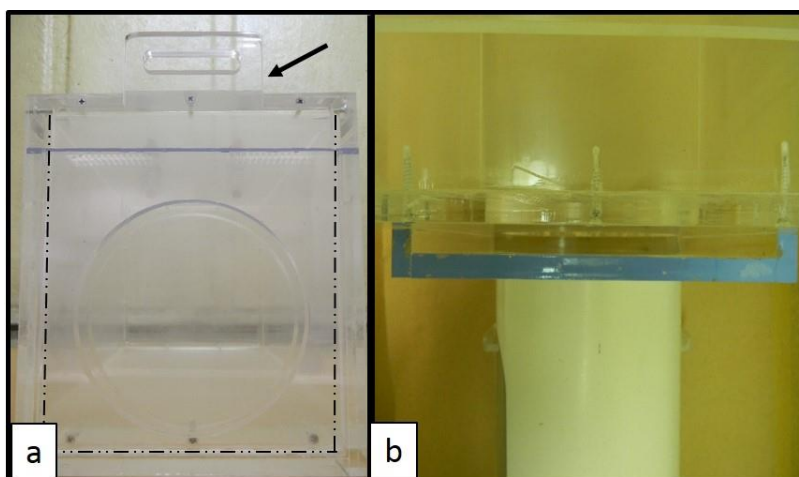


Fonte: (PONCE, 2015).

4.4.2 A eclusa e a porta da câmara de exposição

A eclusa é constituída por um sistema muito parecido com um batente de porta corrediça que permite que a mesma corra ao longo de sua extensão e sele o orifício da caixa de exposição. A porta também confeccionada com chapa acrílica de 12 mm de espessura possui 24 x 27 cm, quando fechada e a caixa de exposição submetida ao vácuo, a mesma é “sugada” contra a parede externa da caixa de exposição, não permitindo que haja vazamentos com conseqüente perda do vácuo. A porta possui uma extensão que possibilita a inserção dos dedos para melhor manusear a mesma no procedimento de abertura e fechamento. Vale ressaltar que, devido à inflexibilidade e da superfície totalmente plana em contato com a parte externa da caixa de exposição, não é preciso besuntar a porta com vaselina para diminuir a possibilidade de perder-se o vácuo (Figura 14).

Figura 14 - Note a porta (seta) inserida dentro da eclusa (pontilhado). Esta porta abre no sentido vertical (para cima) e possui na sua extremidade superior um orifício para facilitar seu manejo (a). Na foto da direita é possível ter uma visão superior da eclusa, onde é inserida a porta (b).



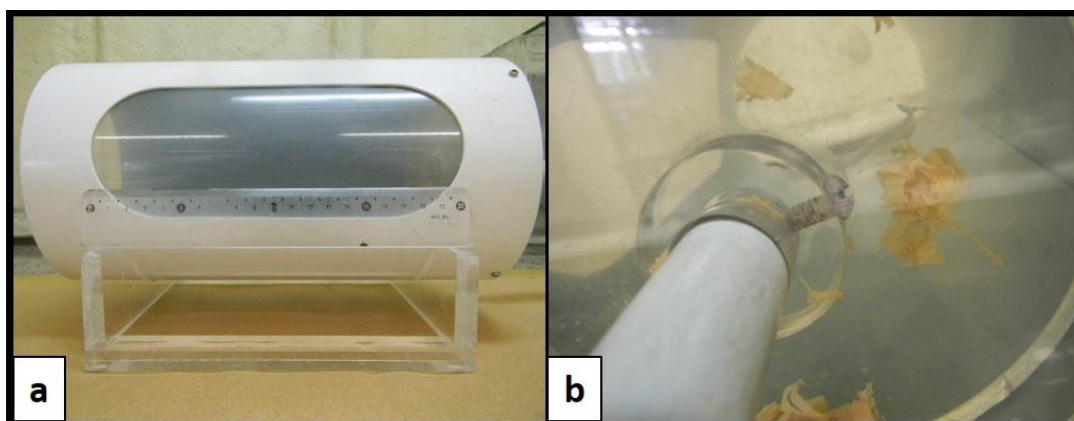
Fonte: (PONCE, 2015).

4.4.3 Antecâmara de espera

A antecâmara de espera foi confeccionada em um tubo de PVC branco fosco de 100 mm de diâmetro, a qual, após os animais serem colocados na mesma, é acoplada à eclusa e quando do término do período de queima e confinamento da

fumaça no interior da caixa de exposição e equilíbrio das pressões atmosféricas entre as duas câmaras, a porta é aberta e os animais são conduzidos a entrar na câmara por meio do deslocamento de um pistão (Figura 15a e 15b).

Figura 15 - Antecâmara de espera (a) onde os animais ficam contidos antes de serem conduzidos pelo pistão para o interior da câmara de exposição (b).



Fonte: (PONCE, 2015).

Ainda, foi feita uma janela confeccionada com plástico PETG de 0,8 mm na parede desta antecâmara a qual permite melhor visualizar os animais no interior da mesma. A figura 16 ilustra o equipamento montado com seus dois compartimentos.

Figura 16 - Equipamento de exposição montado com suas câmaras, a de exposição e a antecâmara de espera.



Fonte: (PONCE, 2015).

4.5 O ARTEFATO DE QUEIMA (QUEIMADOR)

O queimador foi comprado em loja especializada na venda de produtos para fumo, narguilés entre outros compostos. Este queimador nada mais é do que um cachimbo ao qual foi adaptado duas peças de vidro, sendo uma delas uma tampa de vidro com extremidade areada e a outra, um tudo de conexão que permite que a fumaça seja sugada para o interior da caixa. Ainda, no interior deste aparato foi acondicionada uma tela de aço com espessura de 0,1mm de poro, como ilustra a figura 17.

Figura 17 - Cachimbo modificado com haste de vidro que permite conectá-lo à câmara de exposição. Note no interior do mesmo, a presença de tela de aço (poro 0,1mm) para contenção das cinzas e do *crack*.



Fonte: (PONCE, 2015).

4.6 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE COCAÍNA PRESENTE NAS AMOSTRAS DE *CRACK*

Mesmo a droga tendo sido fruto de uma única apreensão de lote único, o *crack* foi totalmente triturado em gral de porcelana e homogeneizado para evitar diferenças no teor da droga nas alíquotas que foram separadas em frascos de vidro pré-pesados (4 g/frasco) e mantido em cofre dentro dos próprios do Departamento de Patologia até o momento do uso. Após a homogeneização das pedras de *crack* e o devido armazenamento, foi realizada a determinação do nível de cocaína presente

no homogenato, e para tal, foi utilizado um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu[®] acoplado a um detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD), com condições cromatográficas de 30°C de temperatura de forno; fluxo de coluna de 1,0 mL/min, volume de injeção de 5 µL e leitura do detector em comprimento de onda de 236 nm. Para as análises foi utilizada uma coluna ODS Hypersil C-18 (250 mm x 4,6 mm), com tamanho da partícula de 5 µm (*ThermoScientific*[®]). Ainda, a fase móvel foi constituída por uma mistura de uma solução aquosa contendo 0,1% de trietilamina com o pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, e acetonitrila grau HPLC (75:25 v/v).

Para a determinação do teor de cocaína, uma amostra de 10 mg do *crack* foi pesada em balança analítica e transferida para um balão volumétrico de 10 mL. Foi então preparada uma solução do *crack* com concentração de 1 mg/mL (1000 ppm) utilizando-se metanol grau HPLC. A partir desta solução foi realizada a diluição para uma concentração de 0,1 mg/mL (100 ppm) utilizando-se metanol grau HPLC como diluente.

A seguir, a partir de uma amostra de padrão de cocaína - 1 mg/mL - da marca *Cerilliant*[®] foram realizadas sucessivas diluições para a obtenção das seguintes concentrações de cocaína: 200 ppm, 150 ppm, 100 ppm, 50 ppm e 15 ppm, com as quais construiu-se uma curva do padrão para a determinação da quantidade da cocaína no homogenato de pedras de *crack*.

4.7 A QUEIMA DA DROGA E EXPOSIÇÃO DOS ANIMAIS

Quando o *crack* é aquecido sob uma chama de isqueiro de gás butano, este se liquefaz, e mesmo com a presença da tela de aço com poro de 0,1 mm de espessura, o *crack* fundido se perde para o interior do cachimbo. Para evitar esta perda, passou-se a empregar a mesma técnica que os usuários da droga fazem em seus “apetrechos”. Assim, sobre a tela de aço, foram acondicionadas cinzas de cigarro, as quais impedem que o *crack* fundido se perca e o mantém agregado para queima total da droga sem que a mesma se transfira para o interior do cachimbo.

Antes mesmo de a droga ser queimada, a caixa de exposição já se encontra com vácuo em seu interior e os animais na antecâmara de espera. Assim, no mesmo

instante em que a droga está sendo queimada, a válvula que faz a sucção da fumaça é aberta paulatinamente, para que ocorra a aspiração de toda a fumaça resultante da queima total da droga e saturação completa da caixa de exposição com restabelecimento da pressão atmosférica e a inserção dos animais para a exposição.

4.8 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE COCAÍNA

Após a exposição, os animais foram submetidos à eutanásia para coleta de sangue total em tubo contendo fluoreto de sódio (2% p/v). As amostras de sangue foram então centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min e o plasma resultante da separação foi acondicionado em tubos criogênicos e mantidos a -80°C até o momento das análises.

No momento das análises, após o descongelamento das amostras, foram adicionados a 1 mL de plasma de cada animal, 1 mL tampão fosfato (0,1 M; pH 6,0) e 30 µL de padrão interno (prolintano 10µg/mL). Posteriormente estas amostras foram submetidas à extração em fase sólida de maneira automatizada, utilizando-se do equipamento GX-274 ASPEC (Gilson®) com cartuchos de 130g, 3 mL da marca Bond Elut Certify (Agilent Technologies®) previamente condicionados com 2 mL de metanol e 2 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 6.

Após a adição das amostras, foram utilizados 3 mL de água MilliQ, 2 mL de ácido acético 1M e após secagem do cartucho sob fluxo de nitrogênio por 7 minutos foram adicionados ainda 3 mL de metanol para retirada de impurezas e interferentes adsorvidos ao cartucho. Os analitos de interesse foram eluídos utilizando-se uma solução contendo diclorometano, isopropanol e hidróxido de amônio (12:3:0,3) recentemente preparada. Após a secagem do solvente sob fluxo de nitrogênio à temperatura de 40°C, o resíduo foi ressuspenso com 40 µL de metanol e posteriormente submetidos à análise cromatográfica em fase gasosa com detecção de nitrogênio e fósforo (CG-DNP) para a determinação dos valores de concentração plasmática de cocaína com as seguintes condições cromatográficas: injetor do tipo *Split/Splitless* de fluxo total de 7,6 mL/min a 250°C sendo utilizado nitrogênio como

gás de arraste, com gradiente de temperatura do forno a 148°C (1 min), 10°C/min até 200°C até 270°C (7 min); com detector a 280°C, H₂ (3,0 mL/min) e ar (60 mL/min). Foi utilizada a coluna Ultra 2 (fenil metil siloxano) de dimensões 25 m x 200 µm x 0,33 µm com fluxo de 0,5 mL/min e com volume de injeção de 1 µL.

4.9 O GRUPO *PAIR-FED*

Foi inserido um grupo denominado de *pair-fed* (PF), uma vez que é sabido que a exposição às diferentes formas de cocaína promove efeito anorexígeno nos usuários e nos animais (BLUNDELL; LATHAM, 1978; BEDFORD; BORNE; WILSON, 1980). Assim, o grupo PF entrou no delineamento experimental um dia após o início do tratamento dos outros grupos. Estes animais receberam diariamente apenas o valor médio de ração que foi consumida pelos ratos do grupo expostos à droga no dia anterior, sem exposição à droga, e foram avaliados diariamente apenas quanto ao consumo de ração e ganho de peso, e no final dos experimentos participaram de todos os ensaios à semelhança dos grupos expostos ou não à droga.

4.10 EUTANÁSIA

Os métodos de eutanásia empregados neste estudo são aceitos pelo Comitê de Bioética Animal da FMVZ-USP. E para tal, empregou-se o plano anestésico de 5,0 e 50 mg/kg de xilazina e cetamina, respectivamente, por via intraperitoneal (IP), seguido de deslocamento cervical. Em alguns delineamentos experimentais foi necessário realizar a eutanásia dos animais por decapitação em guilhotina.

4.11 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA

Para a avaliação toxicológica os seguintes procedimentos foram realizados.

4.11.1 Avaliação do consumo de ração e ganho de peso

Os animais foram pesados antes do início da exposição à droga para a distribuição estatisticamente homogênea dos grupos. Posteriormente, o consumo de ração e o peso dos animais foram medidos diariamente durante todo o período experimental.

4.11.2 Avaliação de parâmetros hematológicos

Para a coleta de sangue, os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina (5 e 50 mg/kg, respectivamente, por via IP) e submetidos à cirurgia para exposição da veia cava caudal, bem como da coleta de sangue, com anticoagulante EDTA para avaliação do hemograma completo, série vermelha e branca. O hemograma foi realizado por meio de um sistema automatizado (pocH-100iV Diff[®]-Roche).

4.11.3 Análise bioquímica

Foram ainda coletadas amostras de sangue, sem anticoagulante, que foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos para a retração do coágulo e, posteriormente, submetidos à centrifugação (4000 rpm, 10 minutos) para coleta de soro, o qual foi acondicionado em microtubos previamente identificados e imediatamente congelados a -20°C , para então serem submetidos às diferentes determinações bioquímicas em aparelho semiautomatizado (Monza[®] – Randox).

Foram determinados os seguintes parâmetros bioquímicos: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), albumina (ALB), proteínas totais (PT), colesterol total (COL), lipoproteína de alta densidade (HDL – do inglês, *high-density lipoprotein*), triglicerídeos (TRIG),

creatinina (CREA), uréia e glicose (GLI) por meio de “kits” comerciais, seguindo as metodologias de acordo com as especificações recomendadas pelo fabricante.

4.11.4 Necropsia e coleta de material para avaliação histopatológica

Após a eutanásia dos animais pertencentes aos diferentes tratamentos, os mesmos foram avaliados macroscopicamente para detecção de possíveis lesões e procedeu-se a coleta de vários órgãos (encéfalo, pulmão, coração, fígado, rins, baço e timo) para análise histopatológica. Os tecidos foram fixados em formol 10% tamponado, processados seguindo as técnicas de rotina, cortados a 5 micra e corados por hematoxilina e eosina.

4.11.5 Análise dos níveis séricos de corticosterona

Após a obtenção do sangue total e posterior centrifugação para a obtenção do soro o mesmo foi armazenado em freezer -20°C até o momento da análise (conforme item 4.11.3). Os níveis de corticosterona foram determinados pelo método ELISA, utilizando-se kits comerciais (*Arbor Assays*) e seguindo o procedimento detalhado pelo fabricante.

4.11.6 Análise da concentração de carboxihemoglobina

Para a coleta de sangue, os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina (5 e 50 mg/kg, respectivamente, por via IP) e submetidos à cirurgia para exposição da veia cava caudal, bem como da coleta de sangue em tubo heparinizado que foi mantido em gelo e analisado o mais breve possível.

Adicionou-se 0,1 ml em do sangue total em um tubo de ensaio com 12 ml da solução hemolizante, sendo esta preparada com solução tampão fosfato de potássio

0,1 mol/L, diluído 1/10 com água destilada. O tubo de ensaio foi então gentilmente homogeneizado. Retirou-se 0,4 ml deste hemolisado e em outro tubo de ensaio se fez a diluição com 4,6 ml da solução diluente (25 mg de hipossulfito de sódio em 20 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L), preparada antes do uso, o tubo de ensaio foi deixado por 10 minutos a temperatura ambiente. Então, procedeu-se a leitura no espectrofotômetro nas absorvâncias de 420 e 432 nm, usando como branco a solução diluente para verificar os valores de carboxihemoglobina que são expressos em porcentagem.

4.12 AVALIAÇÃO IMUNOTOXICOLÓGICA

A avaliação imunotoxicológica foi determinada por meio dos procedimentos descritos a seguir.

4.12.1 Avaliação do peso relativo de timo e baço e celularidade de baço

Ao final do período de experimentação, os animais foram submetidos à eutanásia sendo imediatamente coletados o timo e o baço. A seguir, procedeu-se à pesagem desses órgãos e, após este procedimento, o baço foi divulsionado em um homogeneizador (*potter* de vidro) e lavado com 10 mL de solução gelada de RPMI-1640 com pH 7,4. As células foram acondicionadas em gelo até o momento da contagem em contador automatizado Luna™.

4.12.2 Avaliação global de células da medula óssea

As células da medula óssea foram obtidas através da lavagem do fêmur esquerdo com uma seringa contendo 10 mL do meio de cultura RPMI-1640 (4°C) após o corte de suas epífises. Esta suspensão celular foi homogeneizada,

centrifugada e ressuspensa em 5 mL desse mesmo meio para realização da contagem de sua celularidade. A viabilidade e contagem global das células nucleadas foram realizadas utilizando-se o corante azul de trypan (0,1%) diluído em PBS. Foi aceito no mínimo 95% de viabilidade, e o número de células foi determinado com o uso do sistema automatizado Luna™.

4.12.3 Fenotipagem de linfócitos T e B do baço por citometria de fluxo

Para a determinação das subpopulações de linfócitos foi realizada análise por citometria de fluxo (FACSCalibur), em que as células foram reconhecidas por meio das propriedades de FSC – *FowardScatter* e SSC – *SideScatter* que avaliam o tamanho e a complexidade interna, respectivamente. Foram adquiridos um total de dez mil eventos, e os resultados foram expressos em percentagem. A análise dos dados foi realizada utilizando o software FlowJo 7.2.2® (Tree Star Inc, Ashland, KY), sendo as populações de interesse em cada experimento selecionadas por meio de *gates*, excluindo assim outros tipos celulares das amostras. Para todos os experimentos o aparelho foi calibrado com um tubo branco como controle de fluorescência basal da célula a ser analisada.

A caracterização das moléculas de superfície dos linfócitos T foi realizada com o uso de anticorpos monoclonais conjugados a APC, FITC ou PE: anti-CD4 para linfócitos T *helper*, anti-CD8 para linfócitos T citotóxicos e finalmente, anticorpos anti-CD45 e IgM para linfócitos B. Cem μL de uma suspensão de esplenócitos (10^6 céls/mL) foram acondicionados em tubos para citometria e incubados com os diferentes anticorpos marcados, durante 30 min, no escuro, à 4°C. Após este período, as células foram lavadas e ressuspensas em 300 μL de PBS para então serem analisadas por meio de citometria de fluxo.

4.12.4 Morfometria do timo e do baço

Foram coletados fragmentos teciduais do timo e baço os quais foram fixados em formol 10% tamponado, processados seguindo as técnicas de rotina, cortados a 5 micra e corados por hematoxilina e eosina para a avaliação da morfometria. A avaliação morfométrica do timo e do baço foi realizada utilizando-se o software *NIS-Elements Basic Research - Microscope Imaging Software* (Nikon®, Japão) acoplado a um microscópio ótico de luz (Nikon®, Japão) e a razão entre as áreas da região cortical e medular, no caso do timo (C/M) foram determinadas e calculadas pela fórmula $C/M = \text{área total do córtex} / \text{área total da medula}$; e entre regiões de polpa vermelha e polpa branca no caso do baço (PV/PB), foram calculadas através da fórmula $PV/PB = \text{área total da polpa vermelha} / \text{área total da polpa branca}$.

4.12.5 Avaliação de atividade de neutrófilos circulantes e de macrófagos peritoneais por meio do “*burst*” oxidativo e da fagocitose

A técnica utilizada para tal é descrita a seguir.

4.12.5.1 Elicitação de macrófagos peritoneais

Para elicitar macrófagos para a cavidade abdominal, foi injetado por via IP 5 mL de uma solução estéril de tioglicolato de sódio a 3%.

4.12.5.2 Coleta de macrófagos peritoneais elicitados pelo tioglicolato 3%

Cinco dias após a injeção de tioglicolato, a musculatura abdominal dos animais foi exposta para injetar 10 mL de PBS gelado na cavidade peritoneal dos mesmos. Após massagem abdominal, foi coletada uma suspensão de células por

meio de uma punção da cavidade peritoneal. Estas células foram mantidas dentro de tubos de ensaio de polipropileno, e foram mantidas em banho de gelo até serem quantificadas na câmara de *Neubauer*. As suspensões celulares foram então ajustadas para a concentração de $2,0 \times 10^6$ células/mL e 100 μ L foram utilizados para analisar a atividade fagocítica de macrófagos peritoneais e a resposta ao “burst” oxidativo.

4.12.5.3 Coleta de neutrófilos circulantes

Os neutrófilos utilizados foram aqueles circulantes no sangue, assim o mesmo foi coletado conforme anteriormente descrito no item 4.11.2, tendo sido utilizado heparina como anticoagulante ao invés do EDTA.

4.12.5.4 Execução da técnica para avaliação do “burst” oxidativo e fagocitose

Foi utilizado o método proposto por Hasui, Hirabayashi e Kobayashi (1989) com modificações. Para tal, as suspensões celulares coletadas ($2,0 \times 10^6$ células) foram alocadas em tubos da seguinte forma:

- Tubo 1: $2,0 \times 10^6$ células em 1 mL de PBS;
- Tubo 2: 100 μ L da amostra, 200 μ L de 2',7'-diclorfluoresceína-diacetato (DCFH-DA) (0,3 μ M) em 800 μ L de PBS. O DCFH-DA reage com os radicais livres produzidos pelas células e emite fluorescência verde;
- Tubo 3: 100 μ L da amostra, 100 μ L de *Staphylococcus aureus* conjugado com o iodeto de propídeo (SAPI) em 900 μ L de PBS. O iodeto de propídeo se intercala ao DNA da célula e emite uma fluorescência vermelha;
- Tubo 4: 100 μ L da amostra, 200 μ L de DCFH-DA (0,3 μ M), 100 μ L de SAPI em 700 μ L de PBS;
- Tubo 5: 100 μ L da amostra, 200 μ L de DCFH-DA (0,3 μ M), 100 μ L de PMA (1ng/ μ L) em 700 μ L de PBS.

O forbol de miristato acetato (PMA) e o SAPI foram usados como estímulos *in vitro* para a produção de radicais livres de oxigênio. O tubo contendo apenas SAPI foi utilizado para avaliação da fagocitose. Todas as amostras foram incubadas a 37°C por 30 min, logo após adicionou-se 2 mL de EDTA (3 mM) para parar a reação.

As amostras foram então centrifugadas (1500 rpm/5 min) e ressuspensas em 300 μ L de PBS. Em seguida foi realizada a análise por citometria de fluxo.

Cada amostra foi submetida ao citômetro de fluxo para aquisição de 10.000 eventos. Os valores referentes ao *burst* oxidativo e a fagocitose foram então avaliados por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pelas células inflamatórias. Este valor é dado pelo aparelho a partir do *gate* selecionado para a população celular de interesse e pela análise do histograma de fluorescência da população. Os dados foram analisados pelo programa FlowJo 7.2.2® (Tree Star Inc, Ashland, USA).

4.12.6 Reação de hipersensibilidade do tipo IV (*Delayed-Type Hypersensitivity - DTH*) e avaliação dos níveis séricos de anticorpos específicos

Para a sensibilização dos ratos, foi preparado uma solução de KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanine*) (1,0 mg/mL em PBS) emulsificado em adjuvante incompleto de Freund (KLH-I) na razão 1:1, e 0,2 mL (100 μ g de KLH) foi injetado por via subcutânea na base da cauda no 14^o dia do experimento. Após sete dias, 0,2 mL da solução de KLH (1,0 mg/mL em PBS) emulsificado em adjuvante completo de Freund (KLH-C) na razão 1:1, foi novamente injetado na base da cauda, pela mesma via.

Sete dias após a última sensibilização, todos os animais tiveram o volume do coxim plantar da pata esquerda determinado por meio de pletismógrafo (Ugo Basile), sendo esta primeira medida plantar denominada de tempo zero (T0) de medição. Ainda neste dia foi preparado o *heat-aggregated* KHL (*ha-KLH*), aquecendo-se o KLH (10 mg/mL em salina) por 1 hora em banho-maria a 75°C. Esta solução foi centrifugada a 2000rpm, por 10 minutos, para remover o excesso de salina; a seguir, a solução foi injetada por via intradérmica (ID) (0,1 mL/rato) no coxim plantar da pata esquerda dos animais.

Após 24 horas do desafio com o *ha-KLH*, o edema resultante foi medido novamente por meio do volume plantar com o pletismógrafo (T24). A avaliação do DTH foi expressa a partir da subtração do valor obtido na mensuração do coxim plantar da pata no T24 com aquele valor da mensuração antes do inóculo (T0).

Após a eutanásia dos animais, o sangue dos mesmos foi coletado, conforme anteriormente descrito no item 4.11.2 para a determinação dos níveis séricos de anticorpos anti-KLH do isotipo M (IgM) e do isotipo G (IgG) por meio da técnica de ELISA. Para tal, placas de 96 poços de fundo chato foram sensibilizadas com 100 µL/poço de uma solução contendo KLH (5 µg/mL em PBS) e permaneceram incubadas *overnight* a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com solução de Tween-20 (0,05% em PBS), em seguida, foram bloqueadas, por 2 horas, com 300 µL/poço com uma solução de albumina sérica bovina (BSA) à 5%. A lavagem das placas foi repetida e então foi adicionado 50 µL/poço de soro dos animais sensibilizados com o KLH diluído em PBS em concentrações adequadas, incubando-se por 2 horas. Em seguida, a placa foi novamente lavada com Tween-20 e foi adicionado 50 µL/poço de anti-rat-IgM/IgG marcado com *horseradish peroxidase* (0,2 µg/mL – HRP), incubando-se por 1 hora. Após nova lavagem das placas (400 µL/poço), foi adicionado 100 µL/poço do substrato tetrametilbenzidina (TMB) e após 10 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 100 µL/poço de ácido sulfúrico 1N, seguida de posterior leitura à 450nm (HIRABAYASHI et al., 1992).

4.12.7 Avaliação das citocinas séricas

Para a mensuração das citocinas séricas foi utilizado um kit comercial - CBA (*Cytometric Beads Array* – BD Biosciences) para a quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α e INF- γ , em amostras de soro de animais não-imunizados (hígidos) e de animais imunizados com o KLH (conforme descrito no item 4.12.6).

A técnica CBA baseia-se em micropartículas combinadas com anticorpos, em que as partículas são “tingidas” com seis intensidades de fluorescência diferentes. As partículas foram pareadas por uma ligação covalente com um anticorpo contra uma das cinco citocinas (IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α e IFN- γ). Essas partículas pareadas com o anticorpo específico para cada citocina servem então como uma ferramenta de captura. As citocinas são diretamente detectadas usando-se anticorpos diferentes combinados com o fluorocromo PE. O anticorpo detector conjugado com PE é utilizado para completar a reação do tipo “sanduíche” e a

intensidade de fluorescência emitida é proporcional à concentração da citocina na amostra, que é quantificada a partir de uma curva de calibração.

Seis populações de *beads* com distintas intensidades de fluorescência são conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina, misturadas para formar o CBA e lidas no canal FL3 do citômetro de fluxo FACScalibur (BD). Para tal, os padrões obtidos através dos “kits” liofilizados de proteínas solúveis *Flex Set (BD)* foram reconstituídos e foi criada uma curva com 10 concentrações de cada citocina (0pg/mL a 10000pg/mL).

As populações de *beads* foram visualizadas de acordo com as suas respectivas intensidades de fluorescência. No CBA, as *beads* de captura das citocinas são misturadas com as amostras e então são incubadas durante 1 hora. Após esse período, é adicionado o anticorpo de detecção conjugado com o fluorocromo PE, e então as amostras foram incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente. Os tubos para aquisição foram preparados com: 50 µL de amostra, 50 µL da mistura de *beads* de captura e 50 µL do reagente de detecção PE. Após a incubação, foi adicionado 1mL de *Wash Buffer* em todas as amostras, e as mesmas foram centrifugadas a 200G por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 300 µL de *Wash Buffer*, as amostras passaram por agitação no vortex para que as *beads* fossem ressuspensas. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da curva-padrão. Os resultados foram gerados em gráficos e tabelas utilizando-se o software CellQuest (BD).

4.13 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Nestes estudos foram avaliadas as possíveis alterações comportamentais conforme descrito a seguir.

4.13.1 Atividade geral em campo aberto

A metodologia para avaliar a atividade geral em campo aberto dos ratos foi adaptada de Kirsten et al. (2010). Os ratos foram observados em campo aberto para avaliar parâmetros motores, exploratórios e de ansiedade (PATTI et al., 2005;

SUDAKOV et al., 2013). Imediatamente após a exposição, os animais foram individualmente colocados no centro da arena (90 cm de diâmetro x 28 cm de altura) e cada sessão de avaliação durou 5 minutos, e foi registrada e analisada com o auxílio do software *Ethovision*® (Noldus®, Leesburg, VA, USA) que consiste em um sistema de rastreamento em vídeo de análise de movimento e reconhecimento comportamental.

Uma câmera colocada a 100 cm acima da arena foi utilizada para coletar os vídeos que foram analisados pelo software, instalado em um computador compatível colocado em um cômodo adjacente. Os parâmetros avaliados foram: distância percorrida (cm), velocidade média (cm/s), tempo de autolimpeza (s), e tempo de permanência nas zonas central e periférica. O aparato era limpo com solução álcool/água 5% antes de colocar cada animal na arena, para eliminar possíveis traços de odor deixados pelos outros animais que podem interferir no comportamento.

4.13.2 Cognição em labirinto em T

O labirinto em T foi empregado para avaliar a cognição ligada ao comportamento de alternância espontânea. O teste é baseado nos estudos do grupo de Timofeeva (2008). O labirinto em T utilizado é constituído em madeira pintada de preto (tinta acrílica impermeável) com três braços em forma de T (90° de inclinação). Os braços possuem 10 cm de largura e as paredes 30 cm de altura. Um dos braços possui uma área de partida de 20 cm de comprimento, separado por uma parede removível da continuação do braço. O restante desse braço possui 45 cm de comprimento. Os outros dois braços de menor comprimento (esquerdo e direito) são os braços de livre escolha, com 40 cm de comprimento cada.

Para o teste, imediatamente após a exposição, o animal foi mantido por 10 segundos na área de partida. Após isso, a barreira foi removida e o animal pôde explorar todo o labirinto por até 30 segundos. Assim que ele entrou em um dos braços de livre escolha, a barreira desse braço correspondente bloqueou o animal nesse braço por 30 segundos. Após isso, o animal era recolocado na área de partida, iniciando outra sessão. Caso o animal não entrasse em nenhum dos braços

de livre escolha após os 30 segundos de exploração, aquela sessão era reiniciada, com o animal sendo recolocado na área de partida. Foram realizadas cinco sessões para cada animal. Em cada uma das sessões era avaliado o primeiro braço de livre escolha visitado pelo animal, isto é, se o animal entrou primeiro no braço direito ou esquerdo.

O parâmetro analisado equivale à porcentagem (%) de alternância entre os braços esquerdo e direito, sempre com relação ao braço visitado na sessão anterior. Esse modelo é baseado na propensão natural do rato em alternar a escolha do braço visitado em cada sessão, ao longo de sucessivas sessões (DUDCHENKO, 2004). Portanto, quanto maior a porcentagem de alternância entre os braços, mais normal é considerado o comportamento do animal, e quanto menor a alternância, maior é a inflexibilidade cognitiva. Para análise estatística, esses dados foram transformados em escores: 0 = nenhuma alternância entre os braços visitados, ou seja, repetição do mesmo lado visitado ao longo das cinco sessões; 1 = uma alternância entre os braços visitados ao longo das cinco sessões; 2 = duas alternâncias entre os braços visitados ao longo das cinco sessões; 3 = três alternâncias entre os braços visitados ao longo das cinco sessões; 4 = quatro alternâncias entre os braços visitados, ou seja, alternância entre os braços em todas as cinco sessões. Entre as sessões o aparato foi limpo como descrito no item 4.13.1.

4.13.3 Comportamento de aversão ou preferência ao odor do *crack*.

O teste para avaliação da preferência ou aversão ao odor da droga foi adaptado a partir de um modelo empregado para avaliação da motivação sexual utilizado em nosso laboratório (RODRIGUES-ALVEZ *et al.*, 2008). O aparato utilizado é constituído por uma arena circular (90 cm de diâmetro por 28 cm de altura, pintado em cinza escuro fosco com revestimento acrílico lavável). Em duas extremidades da arena existem dois compartimentos anexos (20 cm por 30 cm, com mesma altura que a arena), separadas da arena por paredes de material acrílico transparente com furos, permitindo o contato olfativo e visual do animal na arena com os dois compartimentos. As outras paredes dos compartimentos anexos são fechadas e feitas do mesmo material que a arena, esses compartimentos possuem

tampas removíveis para fechar a parte superior. Imediatamente em frente a cada um dos compartimentos existirá desenhado no chão da arena um quadrado com linhas brancas (20 cm por 30 cm); essas zonas foram chamadas de zona neutra (odor de maravalha) e zona de interesse (odor característico de *crack*). Além disso, outra linha branca separou o meio da arena, (lado neutro e lado de interesse) com os dois compartimentos situados em cada uma das extremidades.

Imediatamente antes do teste, em um dos compartimentos é colocado maravalha limpa (zona neutra), considerado como um odor neutro que os animais estão acostumados. No outro compartimento será colocada o produto resultante da queima da droga (zona de interesse), que mantém o odor característico da mesma. Os compartimentos permaneceram com as tampas superiores fechadas para o teste. Cada animal era inserido no centro do aparato com sua cabeça voltada para o compartimento neutro imediatamente após a exposição à droga ou veículo (cinzas de cigarro). Durante 5 minutos foi quantificado o número de vezes que o animal entra em cada uma das zonas (zona neutra e zona de interesse), o tempo (em segundos) que o animal permanece em cada uma das zonas, além do tempo (em segundos) de permanência em cada um dos lados da arena (lado neutro e lado de interesse). O aparato era então limpo como citado anteriormente.

4.14 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.14.1 Determinação da quantidade de *crack* a ser queimada e do tempo de exposição à sua fumaça

Inicialmente foram utilizados 15 ratos machos divididos em 3 grupos iguais (n=5/grupo) que foram expostos à fumaça do *crack* durante 5 minutos. Cada grupo foi exposto à queima de 100, 250 e 500 mg de *crack* uma única vez. Após a queima de 100 mg da droga e confinamento da fumaça na caixa de exposição, conforme descrito no item 4.7, os 5 animais que aguardavam na antecâmara de espera foram conduzidos para o interior da caixa de exposição previamente forrada com maravalha, e lá permaneceram por 5 minutos. Vale ressaltar nesse momento que a

caixa de exposição foi dimensionada para comportar apenas 5 ratos adultos por vez. Este mesmo procedimento foi repetido para a queima das quantidades de 250 e 500 mg de droga e seus respectivos grupos de animais. Após 5 minutos do final de cada exposição, os ratos foram imediatamente submetidos à eutanásia por decapitação e tiveram o sangue coletado para determinação analítica dos níveis plasmáticos de cocaína, conforme detalhadamente descrito no item 4.8.

Posteriormente, 10 outros ratos machos foram divididos em 2 grupos iguais, os quais foram expostos à fumaça resultante da queima de 250 e 500 mg de *crack*, respectivamente, por 10 minutos. Após 5 minutos do final de cada exposição, os animais foram submetidos à eutanásia e tiveram as amostras de sangue coletadas para as análises de cocaína plasmática à semelhança do que fora feito com os animais expostos durante 5 minutos.

4.14.2 Avaliação dos efeitos do *crack* sobre parâmetros séricos: hemograma, bioquímica, citocinas, corticosterona e sobre órgãos linfoides, suas celularidades e morfometria

Uma vez determinados o tempo de exposição e a quantidade da droga a ser queimada, foram empregados 30 ratos Wistar machos igualmente divididos em 3 grupos iguais, com 10 animais em cada, a saber: grupo controle (CO), grupo exposto ao *crack* (CK) e o grupo PF. Como a caixa de exposição só tem capacidade para alocar 5 ratos adultos por vez, os grupos de animais, com exceção do grupo PF, foram blocados em dois subgrupos; porém, expostos consecutivamente após o período de exposição. Assim, ratos do grupo CK foram expostos à fumaça resultante da queima de 250 mg da droga, durante 10 minutos, duas vezes ao dia, durante 28 dias consecutivos. Já os ratos do grupo CO, estes foram expostos apenas à queima das cinzas que funcionam como anteparo de queima da droga, como descrito no item 4.7, com confinamento na caixa de exposição em tempo e periodicidade semelhante ao do grupo CK. O grupo PF passou apenas pela restrição alimentar e pesagem diária, conforme esta detalhadamente descrito no item 4.9. Chama-se a atenção que este procedimento de exposição se repetiu em todos os experimentos descritos abaixo.

Os animais foram avaliados diariamente quando à possíveis alterações clínicas de toxicidade, como morbidade ou morte dos animais. O consumo de ração e o peso dos animais foram avaliados diariamente, conforme descrito no item 4.11.1.

No dia seguinte ao último dia de exposição, ou seja, no dia 29 de experimentação, os animais do grupo CO e CK foram submetidos à anestesia para coleta de sangue, a qual foi realizada por meio da punção da veia cava abdominal após secção cirúrgica do abdômen dos animais. O sangue coletado foi alocado em dois tubos, um contendo EDTA e outro seco. O sangue com EDTA foi submetido à análise de hemograma completo (série branca e vermelha), conforme item 4.11.2 enquanto que o sangue que foi acondicionado em tubo seco, foi mantido em temperatura ambiente e após 30 minutos foi submetido à centrifugação por 10 minutos à 4000 rpm e coleta do soro sobrenadante. Este por sua vez foi aliquotado em dois tubos criogênicos distintos, um para determinação da bioquímica sérica e dos níveis de corticosterona (item 4.11.3 e 4.11.5) e outro para dosagem de citocinas (item 4.12.7) de animais hípidos (sem desafio imune), e foram armazenados sob refrigeração de -20°C para posterior dosagem de seus parâmetros.

Após a coleta do sangue, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical para a coleta de órgãos linfo-hematopoiéticos, para determinação do peso relativo de timo e baço e celularidade deste último e ainda a contagem global de medula óssea, conforme detalhadamente descrito nos itens 4.12.1 e 4.12.2, respectivamente.

Após a pesagem dos órgãos linfoides e secção de parte do baço para determinação de sua celularidade, o timo e a amostra remanescente do baço foram fixadas em formol, assim como as amostras dos seguintes tecidos não linfoides: encéfalo, coração, pulmão, fígado e rins. O timo e o baço foram submetidos, além do exame histopatológico, à análise de sua morfometria óptica, conforme item 4.12.4.

É importante salientar que todos os procedimentos experimentais aqui descritos também foram realizados com os animais do grupo PF.

4.14.3 Determinação da concentração de carboxihemoglobina nas amostras de sangue total

Para a determinação da concentração de carboxihemoglobina, foram utilizados 15 ratos machos divididos em 3 grupos iguais (n=5/grupo), a saber, grupo CO, CK e um grupo que não passou pelo aparato de exposição (PF). Os animais do grupo CK foram expostos à fumaça resultante da queima de 250 mg de *crack*, durante 10 minutos, duas vezes ao dia; já os ratos do grupo CO, foram expostos apenas à queima das cinzas que funcionam como anteparo de queima da droga, durante o mesmo tempo e intervalo de exposição; o grupo PF, não sofreu qualquer manipulação experimental. Após 30 minutos do fim da 2^o exposição, todos os animais foram anestesiados para a coleta de sangue, e posterior determinação da concentração de carboxihemoglobina, conforme item 4.11.6.

4.14.4 Avaliação da atividade de macrófagos peritoneais

Foram empregados 30 ratos Wistar machos igualmente divididos em 3 grupos iguais, com 10 animais em cada, a saber: grupo controle (CO), grupo exposto ao *crack* (CK) e grupo PF.

Quatro dias antes do final do período experimental, todos os ratos receberam, por via IP, 5 mL de uma solução tioglicolato estéril. No dia seguinte ao último dia de exposição ao *crack*, todos os ratos foram submetidos à eutanásia para posterior coleta de macrófagos peritoneais e avaliação das diferentes atividades de macrófagos, conforme anteriormente descrito (item 4.12.5).

4.14.5 Avaliação dos efeitos do *crack* sobre a resposta imune celular e humoral

Foram empregados 30 ratos Wistar machos igualmente divididos em 3 grupos iguais, com 10 animais em cada, a saber: grupo controle (CO), grupo exposto

ao *crack* (CK) e grupo PF. Lembrando que foram empregados 250 mg de *crack*, com exposição dos animais por 10 minutos, 2 vezes ao dia, durante 28 dias.

Conforme descrito detalhadamente no item 4.12.6, todos os animais foram sensibilizados com uma solução de KLH. Vinte e quatro horas antes do final do período experimental (28º dia de tratamento) os ratos tiveram o volume da pata esquerda plantar medido por meio do pletismógrafo, após este procedimento, os ratos receberam por via ID no coxim plantar esquerdo, o desafio imunológico, por meio da inoculação da solução *ha*-KLH. No dia seguinte ao inóculo, o “tumor” gerado pelo desafio com KLH foi avaliado com o uso do pletismógrafo.

Após a eutanásia dos animais, o sangue dos mesmos foi coletado e posteriormente, centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos, o soro obtido foi transferido para dois tubos criogênicos diferentes que ficaram armazenados a -20°C até o momento das análises, um para a determinação dos níveis séricos de anticorpos anti-KLH IgM e IgG por meio da técnica de ELISA, conforme descrito no item 4.12.6 e o outro para a avaliação das citocinas séricas de animais imunizados, conforme item 4.12.7.

4.14.6 Avaliação do fenótipo de linfócitos B e T esplênicos e da atividade de neutrófilos circulantes por meio do “*burst*” oxidativo e da fagocitose

Foram empregados 30 ratos Wistar machos igualmente divididos em 3 grupos iguais, com 10 animais em cada, a saber: grupo controle (CO), grupo exposto ao *crack* (CK) e grupo PF. Lembrando que foram empregados 250 mg de *crack*, com exposição dos animais por 10 minutos, 2 vezes ao dia, durante 28 dias.

Ao final do período experimental, os animais foram submetidos à anestesia e tiveram a veia e a artéria esplênica ligadas por fio de sutura e foi realizada a retirada do baço, evitando dessa maneira, hemorragia esplênica. Foi efetuada a coleta de sangue em tubo heparinizado por meio da punção da veia cava abdominal. As células esplênicas foram avaliadas quanto à sua fenotipagem, ou seja, a quantificação por meio de citometria de fluxo, das populações de células T e B presentes neste órgão linfoide, conforme detalhado no item 4.12.3. O sangue coletado foi imediatamente processado e passou pelos procedimentos descritos no

item 4.12.5 para a avaliação da atividade de neutrófilos circulantes por meio do *burst* oxidativo e da fagocitose.

4.14.7 Avaliação do comportamento de ratos expostos ao *crack*

Para a avaliação do comportamento dos animais, foram seguidos os procedimentos a seguir.

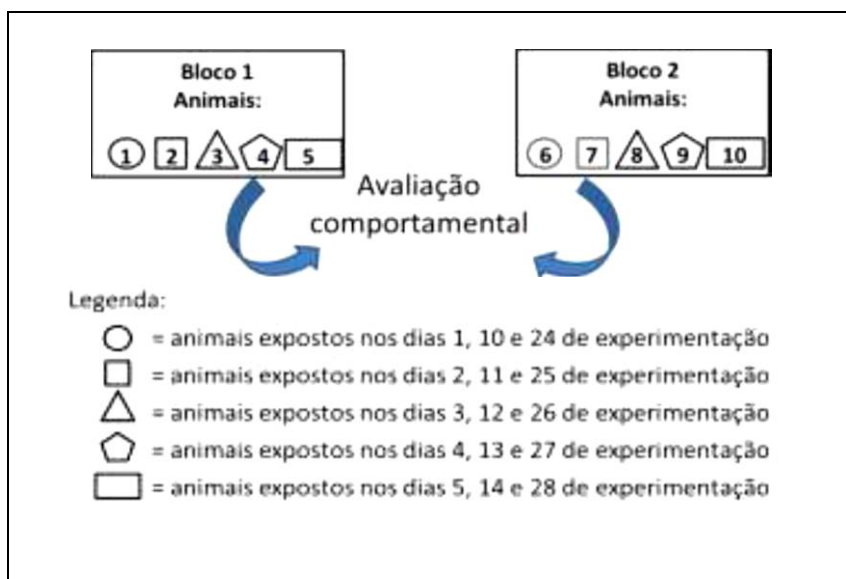
4.14.7.1 A exposição dos animais e os períodos de avaliação comportamental

Os animais foram expostos diariamente, duas vezes ao dia, à fumaça resultante da queima de 250 mg de *crack* por vez, por 10 minutos durante 28 dias. Este valor e tempo de exposição foram previamente estudados em nosso laboratório e mostraram promover níveis séricos de cocaína adequados para este estudo (aproximadamente 170 ng/mL). É importante salientar que foram alojados no máximo 5 ratos por vez no interior da câmara de exposição e como o “n” aqui empregado foi de 10, os mesmos foram expostos de 5 em 5 por vez.

Assim, caso fizéssemos as avaliações comportamentais de todos os 5 animais que foram expostos conjuntamente após a exposição, haveria um intervalo entre o primeiro a ser estudado e o último de no mínimo 25 minutos, já que cada teste emprega por rato, em média, 5 minutos de avaliação nos diferentes aparelhos, o que causaria erro de análise devido à rápida biotransformação da cocaína absorvida.

Portanto, decidiu-se por realizar o seguinte esquema de exposição: os animais foram divididos em 2 blocos de 5 animais cada, sendo que durante o dia 1 de exposição foram avaliados os animais 1 e 6 (do bloco 1 e 2, respectivamente); no dia 2, os animais 2 e 7; no dia 3, os animais 3 e 8 e assim consecutivamente, para os diferentes períodos que terão os seguintes intervalos de exposição: do dia 1 ao 5 (T1); do dia 10 ao 14 (T2) e do dia 24 ao 28 (T3), conforme ilustra a figura 18.

Figura 18 - Esquema de exposição dos animais para os diferentes testes comportamentais avaliados após a exposição à fumaça do *crack*.



Fonte: (PONCE, 2015).

4.14.7.2 Avaliações comportamentais

Foram realizados 3 experimentos no total, em cada um deles foram utilizados 30 ratos Wistar machos jovens adultos. Os animais foram divididos em 3 grupos iguais ($n=10/\text{grupo}$), um grupo controle (CO), um grupo exposto ao *crack* (CK) – o qual foi exposto duas vezes ao dia, durante 28 dias consecutivos, à fumaça resultante da queima de 250mg de *crack*, conforme descrito no item 4.7 – e um grupo PF (item 4.9).

Os animais foram avaliados quanto ao ganho de peso e consumo de ração (item 4.11.1). Os períodos de avaliação para os diferentes testes comportamentais são descritos no item 4.14.7.1, e as avaliações em campo aberto, avaliação da cognição em labirinto em T e preferência ou aversão ao odor da droga foram realizados conforme descritos nos itens 4.13.1, 4.13.2 e 4.13.3, respectivamente.

4.15 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prisma v5.00, e os resultados obtidos foram apresentados na forma de média e seu respectivo desvio-padrão (média \pm SD).

Foi realizado o teste estatístico de Bartlett, para se verificar a homocedasticidade dos dados. Caso os dados fossem paramétricos, foi utilizada a análise de variância ANOVA (SNEDCOR, 1946) para comparação das médias entre os vários grupos. Para detecção das diferenças significantes entre os grupos, após a ANOVA, utilizou-se o teste de Tukey de múltiplas comparações, uma vez que todos os grupos apresentam número de observações (n) aproximadamente semelhantes. Para a análise estatística dos experimentos comportamentais foi utilizada a análise de variância de duas-vias ANOVA, seguida do pós-teste de Dunn para a detecção de diferenças significantes entre os grupos.

Em alguns experimentos, cujo número de grupos era igual a 2 foi realizado o teste *t*-Student, para a detecção das diferenças estatisticamente significantes. A probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada capaz de revelar diferenças significantes entre os grupos.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos são relatados a seguir.

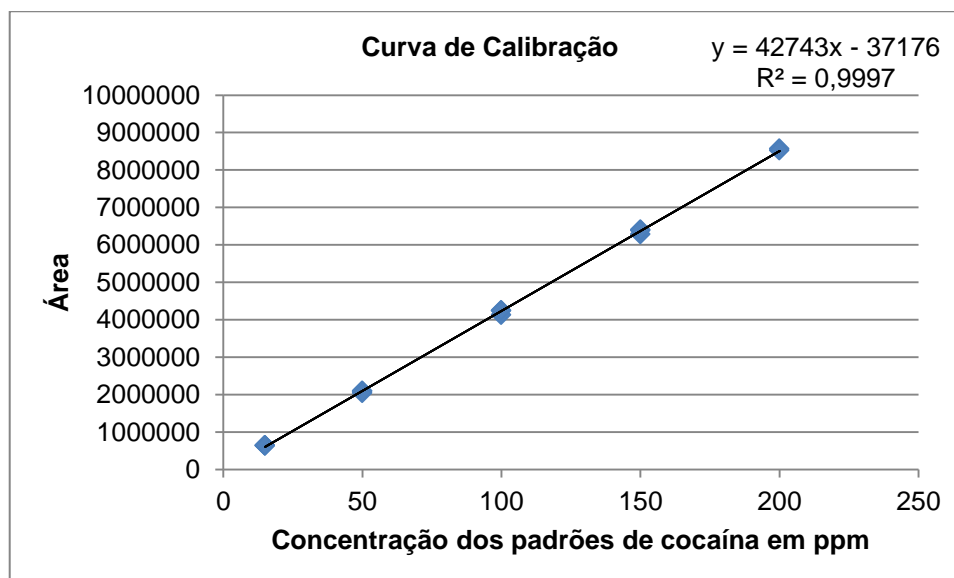
5.1 ESTUDO QUÍMICO

Trata dos resultados referentes ao teor de cocaína de amostras coletadas do lote de *crack* adquirido e a concentração plasmática de cocaína após a exposição de ratos a diferentes quantidades de *crack* e em diferentes tempos de permanência no equipamento de exposição.

5.1.1 Quantificação do teor de cocaína presente no homogenato de pedras de *crack*

Para a quantificação da cocaína presente no *crack*, foi necessário construir uma curva de calibração que se baseou no valor numérico referente a área dos picos das diferentes concentrações do padrão de cocaína obtidas pelo cromatograma. Os resultados foram tratados com regressão linear e foi construída uma curva de calibração para o padrão de cocaína, o coeficiente de correlação (R^2) e a equação da reta foram obtidos com o *software Microsoft® Excel 2013* (Figura 19). O coeficiente de correlação obtido ($R^2 = 0,9997$) foi próximo a 1, o que demonstra uma linearidade confiável da curva de calibração.

Figura 19 - Representação gráfica da curva analítica com os valores dos padrões de cocaína em diferentes concentrações: 15; 50; 100; 150; 200ppm.



Fonte: (PONCE, F., 2015)

Determinada a curva, no total, oito amostras de *crack* foram analisadas durante um período de quatro meses, sendo que para cada nova análise, também foi construída uma nova curva de calibração. Baseando-se na equação da reta e utilizando-se o valor das áreas dos picos obtidos pelos cromatogramas, foi possível determinar que o teor médio de cocaína presente nas amostras de *crack* analisadas foi de $66,34 \pm 3,95\%$.

A tabela 1 mostra as determinações do teor de cocaína nas amostras de *crack* analisadas.

Tabela 1 - Teor de cocaína (%) encontrado nas amostras de *crack* submetidas à análise em HPLC-DAD.

Amostra	Teor de cocaína (em %) encontrado nas amostras submetidas à análise em HPLC-DAD
1	64,403
2	65,846
3	63,090
4	72,717
5	69,839
6	60,601
7	69,080
8	65,110
Média ± desvio-padrão	66,34± 3,95

Fonte: (PONCE, F., 2015).

5.1.2 Determinação da concentração plasmática de cocaína em ratos e sua correlação com a quantidade de *crack* a ser queimada e com o tempo de exposição à sua fumaça.

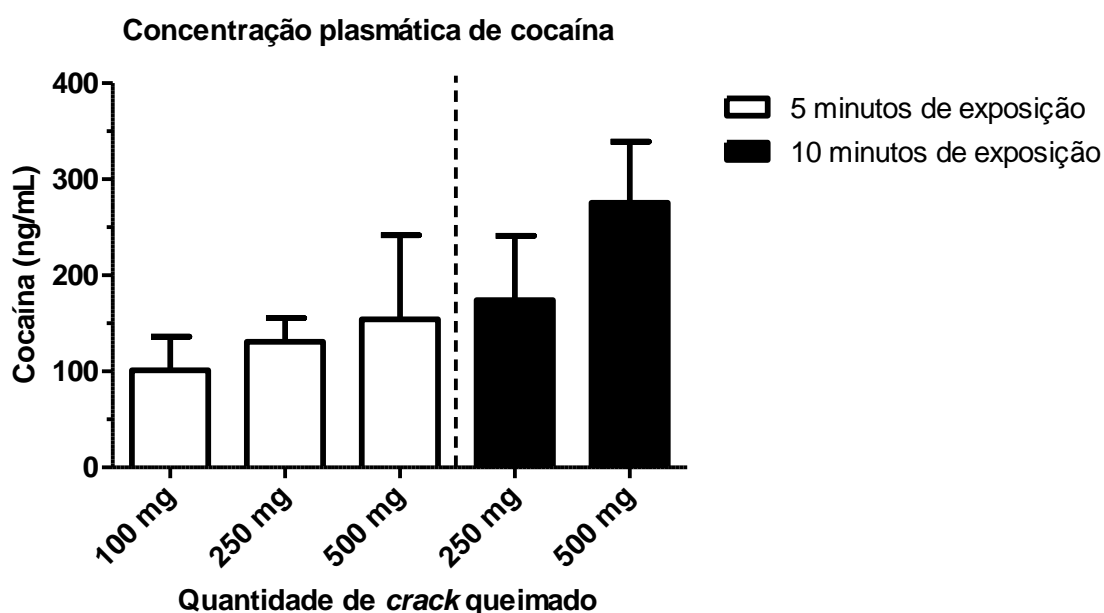
Como pode ser observado na figura 20, os resultados obtidos das análises do plasma sanguíneo dos animais expostos à droga mostraram-se de forma dose e tempo dependente, sendo os valores plasmáticos para o tempo de 5 minutos de exposição de $101,1 \pm 15,64$; $130,9 \pm 10,97$ e $154 \pm 39,25$ ng/mL para as quantidades de 100; 250 e 500 mg de *crack*, respectivamente.

Em relação aos dados do tempo de 10 minutos de exposição, vale ressaltar que decidiu-se por não fazer a exposição dos animais a 100 mg para esse tempo de exposição, pois como foi observado no tempo de exposição anterior, ao final dos 5 minutos de exposição, já não havia mais fumaça no equipamento, assim, queimar o mesmo montante para 10 minutos, muito provavelmente, seria desperdício de droga e de animais, uma vez que os animais já entrariam em período de biotransformação

(WARNER, 1993), conseqüentemente com menores concentrações plasmáticas da mesma.

Tendo sido isto posto, os valores obtidos para o tempo de 10 minutos de exposição foram $174,1 \pm 30,05$ ng/mL para 250 mg e $275 \pm 28,53$ ng/mL para 500 mg de *crack*, conforme ilustra a figura 20.

Figura 20 - Valores referentes a média e desvio-padrão da concentração plasmática de cocaína em ratos Wistar após uma única exposição à fumaça resultante da queima de 100, 250 ou 500 mg de *crack*, por períodos de 5 ou 10 minutos de exposição



Fonte: (PONCE, F., 2015).

5.2 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA

Avaliação de parâmetros de toxicidade segundo guia 407 da OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*), com modificações.

5.2.1 Avaliação do ganho de peso e do consumo de ração de ratos expostos ao *crack* durante 28 dias

A tabela 2 mostra o peso inicial e final, o ganho de peso total e o consumo de ração (em gramas) de ratos expostos a 250mg de *crack* (grupo CK) durante 10 minutos, 2 vezes ao dia, durante um período de 28 dias, ou que apenas passaram pelo mesmo período de exposição e confinamento sem a presença da droga (CO), ou ainda, que sofreram apenas restrição alimentar (PF) durante o mesmo período de 28 dias.

Foi possível verificar, por meio da análise estatística do teste *t*-Student mono caudal, uma diminuição estatisticamente significativa do grupo CK em relação ao grupo CO no consumo de ração total durante o período experimental ($p < 0,01$). A análise de variância empregada (ANOVA) não evidenciou quaisquer diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de animais com relação aos demais parâmetros aqui analisados.

Tabela 2 - Peso inicial, peso final, ganho de peso total e consumo de ração total (em gramas) de ratos Wistar expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de *crack* por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. São apresentados as médias e os respectivos desvios-padrões

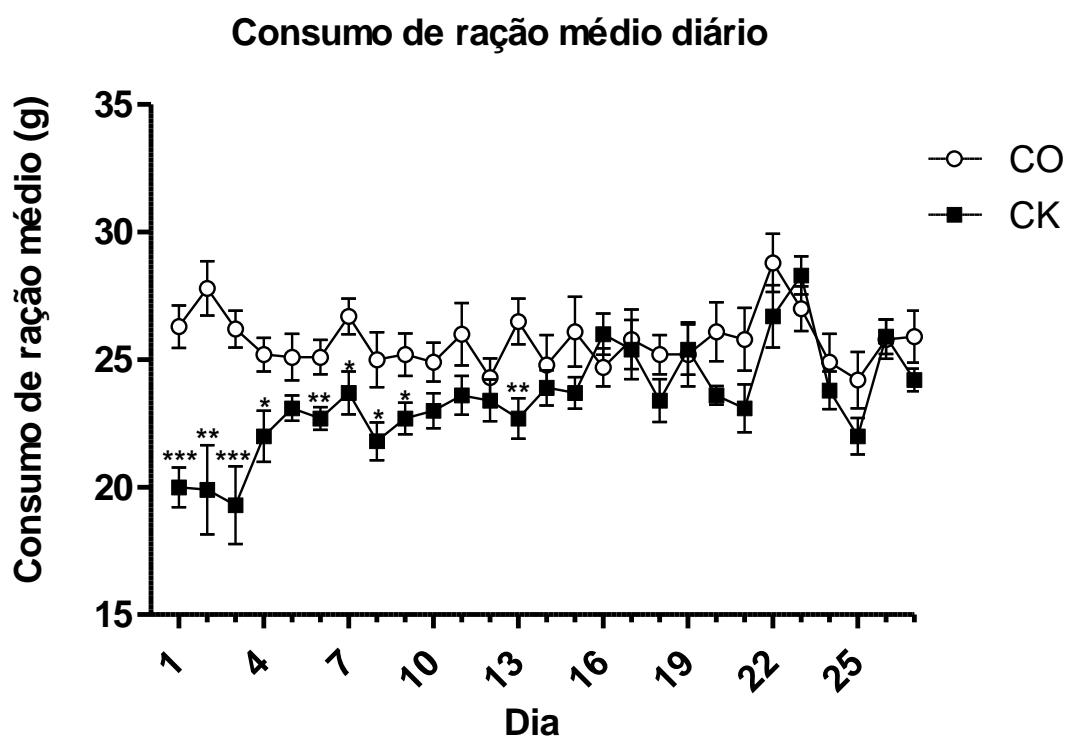
Grupos	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganho de peso total (g)	Consumo de ração total (g)
CO (n=10) ^a	254,9 ±13,02	331,4 ±23,15	79,40 ±17,65	694,6 ±56,83
CK (n=10)	249,1 ±15,03	319,1 ±19,21	74,10 ±11,57	633,3 ±46,85**
PF ^b (n=10)	261,8 ±14,68	323,5 ±18,25	65,70 ±9,31	-

^a número de animais empregados por grupo; ^b o grupo PF apenas recebeu a média de ração consumida por animais do grupo CK; ** $p < 0,01$ versus grupo controle, teste *t* de Student não-pareado mono-caudal. Fonte: (PONCE, F., 2015).

A figura 21 mostra os dados referentes à média do consumo de ração diário de ratos do grupo CO e ratos expostos duas vezes ao dia à fumaça resultante da queima de 250 mg de *crack*, por vez, durante 28 dias consecutivos. O teste *t*-Student empregado para análise de dois grupos experimentais evidenciou que houve diferenças estatísticas entre os grupos de animais entre os dias: 1 ($p < 0,001$); 2 ($p < 0,01$); 3 ($p < 0,001$); 4 ($p < 0,05$); 6 ($p < 0,01$); 7, 8 e 9 ($p < 0,05$) e também entre os

grupos no 13º dia de exposição ($p < 0,01$), evidenciando que nestes períodos o grupo CK diminuiu de forma estatisticamente significativa o seu consumo de alimentos quando comparado com o grupo CO, não havendo mais nenhuma alteração estatisticamente significativa entre os grupos ao longo do período experimental. O grupo PF não está nas estatísticas uma vez que o consumo de ração do mesmo foi idêntico àquele do grupo tratado com a droga.

Figura 21 - Consumo de ração médio diário (em gramas) de ratos Wistar expostos (CK) ou não (CO) à fumaça resultante da queima de 250 mg de *crack* por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões



* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, versus grupo CO, teste *t* de Student. Fonte: (PONCE, F., 2015).

5.2.2 Parâmetros Hematológicos

A tabela 3 mostra os resultados referentes ao hemograma de ratos expostos (CK) ou não (CO) à fumaça resultante da queima de *crack*, ou que passaram apenas por restrição alimentar (PF), durante um período de 28 dias. O teste estatístico

ANOVA revelou haver diferenças estatisticamente significantes entre os grupos quanto ao número de leucócitos ($F=5,59$, $p<0,01$ e $df=2,25$), eritrócitos ($F=7,054$, $p<0,01$ e $df=2,25$), concentrações de hemoglobina ($F=8,735$, $p<0,01$ e $df=2,25$) e valor do hematócrito ($F=9,185$, $p<0,01$ e $df=2,25$). O teste *posthoc* de Tukey revelou que os animais do grupo PF exibiram diminuição nas contagens de leucócitos e eritrócitos, e nas concentrações de hemoglobina e no valor de hematócrito quando comparados aos grupos CO e CK.

Tabela 3 - Parâmetros hematológicos de ratos Wistar expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. São apresentados as médias e os respectivos desvios-padrões

Grupos	WBC [†] (10 ³ /μL)	RBC (10 ⁶ /μL)	HGB (g/dL)	HCT (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	PLT (10 ³ /μL)
CO (n=10) ^a	7,4 ±1,6	9,3 ±0,4	18,7 ±0,7	49,3 ±1,9	53,2 ±1,1	20,2 ±0,5	37,9 ±0,6	943,9 ±200,3
CK (n=9)	7,0 ±1,7	9,3 ±0,4	18,9 ±0,9	49,7 ±2,2	53,4 ±0,8	20,3 ±0,5	38,0 ±0,5	1014,0 ±222,2
PF ^b (n=9)	5,2 ±1,1*	8,5 ±0,6**	15,9 ±2,1**	45,0 ±3,5**	53,3 ±0,9	20,2 ±0,5	37,8 ±0,6	954,3 ±121,4

[†]WBC = leucócitos; RBC = eritrócitos; HGB = hemoglobina; HCT = hematócrito; VCM = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina corpuscular média; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média; PLT = plaquetas; ^a número de animais empregados por grupo; ^b o grupo PF apenas recebeu a média de ração consumida por animais do grupo CK. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ versus grupos CO e CK, pós-teste de Tukey. Fonte: (PONCE, F., 2015).

Quanto ao leucograma (Tabela 4), os resultados obtidos foram analisados pelo teste estatístico ANOVA e foram observadas diferenças entre os grupos quanto ao percentual de monócitos ($F=6,837$, $p<0,01$ e $df=2,26$). Ainda, apesar de não ser estatisticamente significante, foi evidenciada uma tendência de aumento no percentual de neutrófilos do grupo PF ($F=3,137$, $p=0,060$ e $df=2,26$). O teste *posthoc* de Tukey revelou que os animais do grupo CK exibiram uma diminuição no percentual de monócitos quando comparados aos grupos CO. Os testes estatísticos empregados não evidenciaram quaisquer outras alterações dignas de nota.

Tabela 4 - Diferencial de leucócitos de ratos Wistar expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. São apresentados as médias e os respectivos desvios-padrões

Grupos	Linfócitos (%)	Neutrófilos (%)	Monócitos (%)	Eosinófilos (%)
CO (n=10) ^a	77,00 ± 6,80	10,10 ± 5,95	12,30 ± 3,92	0,68 ± 0,71
CK (n=10)	77,70 ± 3,27	14,40 ± 2,87	7,60 ± 2,17**	0,33 ± 0,71
PF ^b (n=9)	73,11 ± 5,92	16,22 ± 7,03	9,33 ± 2,06	1,33 ± 1,58

^a número de animais empregados por grupo; ^b o grupo PF apenas recebeu a média de ração consumida por animais do grupo CK; ** $p \leq 0,01$ versus grupo CO, pós-teste de Tukey. Fonte: (PONCE, F., 2015).

5.2.3 Parâmetros Bioquímicos

A tabela 5 mostra os resultados da bioquímica sérica de ratos expostos (CK) ou não (CO) à fumaça resultante da queima de *crack*, ou que passaram apenas por restrição alimentar (PF), durante um período de 28 dias. O teste estatístico ANOVA revelou haver diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nos parâmetros: AST ($F=7,06$, $p<0,01$ e $df=2,27$); ALT ($F=6,260$, $p<0,01$ e $df=2,27$); FA ($F=3,698$, $p<0,05$ e $df=2,27$); COL ($F=9,905$, $p<0,001$ e $df=2,27$) e uréia ($F=7,182$, $p<0,01$ e $df=2,27$). O teste *posthoc* de Tukey revelou que os animais dos grupos CK e PF exibiram uma diminuição nas concentrações de colesterol total quando comparados ao grupo CO. Também foi evidenciado que, em comparação ao grupo CO, o grupo PF apresentou uma diminuição dos níveis séricos de AST, ALT e uréia,

assim como um aumento nos níveis de FA e TRIG. Além disso, quando comparado o grupo PF em relação ao grupo CK, o pós-teste de Tukey evidenciou um aumento nos níveis de TRIG, e reduções nos níveis de AST e ALT. Nos outros parâmetros da bioquímica sérica aqui avaliados, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi verificada pela ANOVA.

Tabela 5 - Avaliação dos valores séricos de parâmetros bioquímicos de ratos Wistar expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. Valores referentes a média \pm desvio-padrão dos grupos

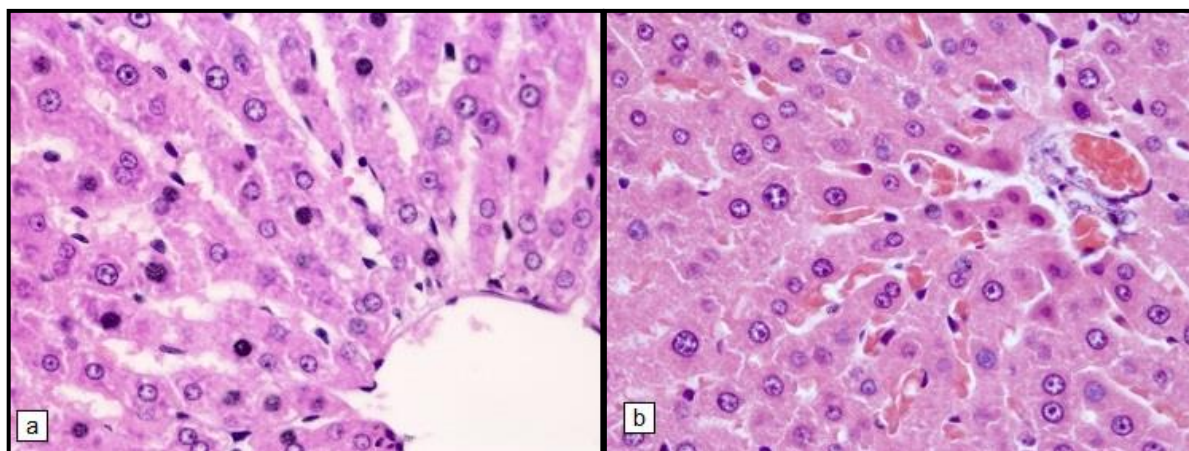
Grupos	AST [†] (U/L)	ALT (U/L)	FA (U/L)	ALB (g/dL)	PT (g/dL)	COL (mg/dL)	HDL (mg/dL)	TRIG (mg/dL)	CREA (mg/dL)	Uréia (U/L)	GLI (mg/dL)
CO (n=10) ^a	137,9 \pm 38,61	24,37 \pm 3,33	222,0 \pm 43,33	3,42 \pm 0,54	5,36 \pm 0,44	45,34 \pm 5,49	19,76 \pm 5,15	58,50 \pm 16,97	0,466 \pm 0,10	37,00 \pm 3,66	269,1 \pm 44,66
CK (n=10)	127,1 \pm 29,00	25,66 \pm 4,59	235,8 \pm 29,07	3,15 \pm 0,20	5,09 \pm 0,41	37,93 \pm 4,51*	17,38 \pm 1,62	57,70 \pm 29,56	0,554 \pm 0,29	38,46 \pm 3,39	293,2 \pm 59,71
PF ^b (n=10)	91,9 \pm 11,25**/■	20,43 \pm 1,85*/■	274,7 \pm 57,77*	3,16 \pm 0,13	5,22 \pm 0,30	34,09 \pm 6,96***	17,03 \pm 4,92	72,20 \pm 28,48*/■	0,571 \pm 0,08	31,41 \pm 5,74*	324,7 \pm 54,22

[†]AST= aspartato aminotransferase; ALT= alanina aminotransferase; FA= fosfatase alcalina; ALB= albumina; PT= proteínas totais; COL= colesterol total; HDL= *high density lipoproteins*; TRIG= triglicérides; CREA= creatinina; GLI= glicose; ^anúmero de animais empregados por grupo; ^bo grupo PF apenas recebeu a média de ração consumida por animais do grupo CK; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus grupo CO; ■ $p < 0,05$; ■■ $p < 0,01$; ■■■ $p < 0,001$ versus grupo CO; teste de ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Fonte: (PONCE, F., 2015).

5.2.4 Histopatologia

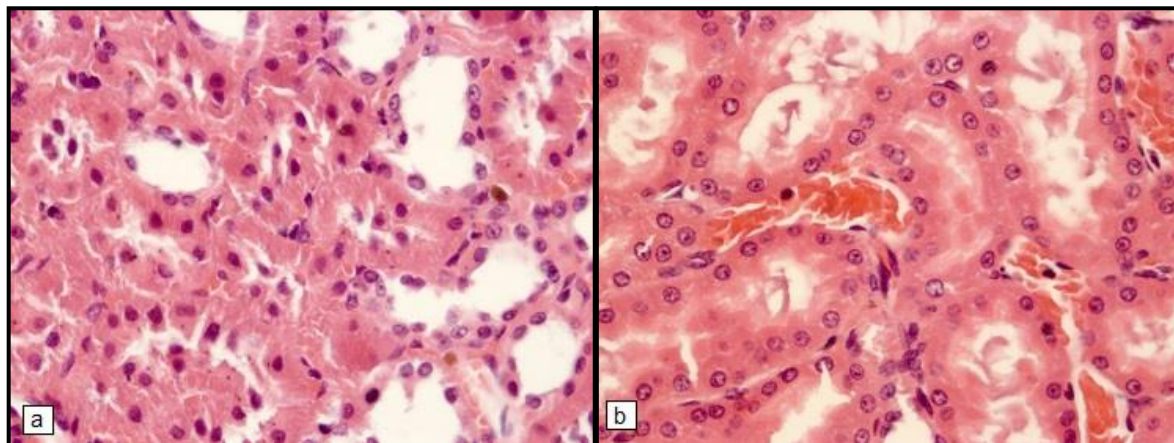
A figura 22 ilustra uma amostra do tecido hepático pertencente a um animal do grupo CO (a), e a de um animal pertencente ao grupo CK (b). E a figura 23 ilustra uma amostra do tecido renal pertencente a um animal do grupo CO (a), e a de um animal pertencente ao grupo CK (b). Em ambas as amostras dos animais expostos ao *crack* é possível observar uma leve congestão hepática e renal, respectivamente. Não foram observadas alterações nas amostras representativas de encéfalo, coração, baço, timo e pulmões, e nenhuma alteração digna de nota foi observada nas amostras do grupo PF.

Figura 22 – Avaliação histopatológica do tecido hepático de ratos Wistar machos adultos expostos (CK) ou não (CO) à fumaça resultante da queima de 250 mg de *crack* por 10 minutos, 2 vezes ao dia, durante 28 dias. Abaixo segue amostra representativa do grupo CO (a) sem alterações, nota-se presença de congestão hepática na amostra dos animais do grupo CK (b). HE, 40X



Fonte: (PONCE, F., 2015).

Figura 23 - Avaliação histopatológica do tecido renal de ratos Wistar machos adultos expostos (CK) ou não (CO) à fumaça resultante da queima de 250 mg de *crack* por 10 minutos, 2 vezes ao dia, durante 28 dias. Abaixo segue amostra representativa do grupo CO (a) sem alterações, nota-se presença de congestão renal sem toxicidade tubular na amostra dos animais do grupo CK (b). HE, 40X

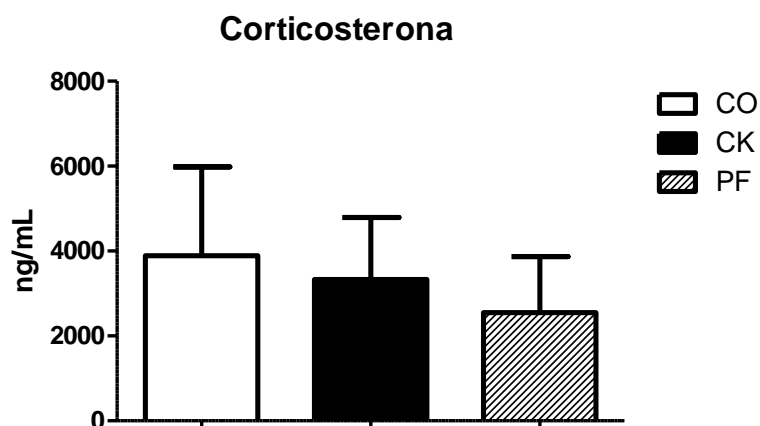


Fonte: (PONCE, F., 2015).

5.2.5 Avaliação dos níveis séricos de corticosterona

Conforme ilustra a figura 24, o teste estatístico ANOVA não evidenciou qualquer diferença estatisticamente significativa dos níveis séricos de corticosterona entre os diferentes grupos.

Figura 24 – Concentrações séricas de corticosterona de ratos expostos (CK) ou não (CO e PF^a) à fumaça resultante da queima de 250 mg de *crack* por 10 minutos, 2 vezes ao dia, durante 28 dias. Valores referentes a média \pm desvio-padrão dos grupos



^aO grupo PF apenas recebeu a média de ração consumida por animais do grupo. Fonte: (PONCE, F., 2015).

5.2.6 Avaliação das concentrações de carboxihemoglobina

Como pode ser observado na tabela 6, o teste ANOVA evidenciou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de animais quanto as concentrações de carboxihemoglobina ($F=198,5$, $p<0,001$ e $df=2,12$). O teste *posthoc* de Tukey revelou que os animais dos grupos CO e CK apresentaram maiores concentrações de carboxihemoglobina quando comparados ao grupo PF.

Tabela 6 - Carboxihemoglobina (%) de ratos machos adultos expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, 2 vezes ao dia, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos desvios-padrões.

	Grupos		
	CO (n=5) ^a	CK (n=5)	PF ^b (n=5)
Carboxihemoglobina (%)	3,13 ± 0,08***	3,89 ± 0,19***	2,10 ± 0,15

^a Número de animais empregados por grupo; ^b o grupo PF não passou por nenhuma exposição no aparato de exposição. *** $p \leq 0,001$ versus grupo PF, teste de ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Fonte: (PONCE, F., 2015).

5.3 AVALIAÇÃO IMUNOTOXICOLÓGICA

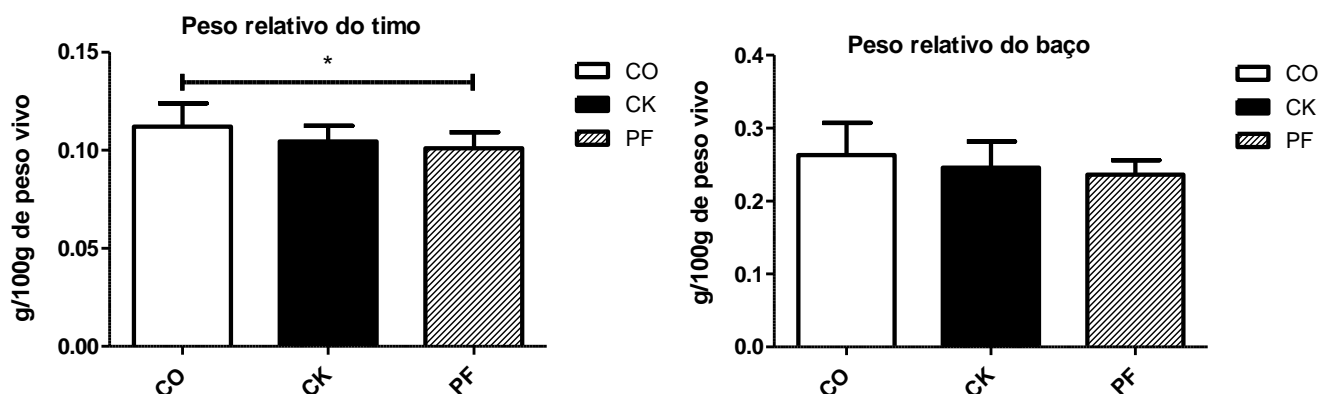
A seguir são descritos os resultados referentes a avaliação imunotoxicológica.

5.3.1 Avaliação do peso relativo de órgãos linfoides, suas celularidades, morfometria e fenotipagem de linfócitos esplênicos

As avaliações do peso relativo do timo e do baço (g/100g de peso vivo) são ilustradas na figura 25. O teste estatístico ANOVA revelou haver diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de animais quanto ao peso relativo do

timo ($F=3,516$, $p<0,05$ e $df=2,27$). O teste *posthoc* de Tukey revelou que os animais do grupo PF exibiram uma diminuição no peso relativo do timo quando comparados ao grupo CO. Com relação ao peso relativo de baço, o teste estatístico empregado não evidenciou qualquer diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 25 - Peso relativo do timo e do baço (g/100g de peso vivo) de ratos Wistar machos adultos expostos (CK) ou não (CO e PF^a) à fumaça resultante da queima de 250 mg de *crack* por 10 minutos, 2 vezes ao dia, durante 28 dias. Valores referentes a média \pm desvio-padrão dos grupos

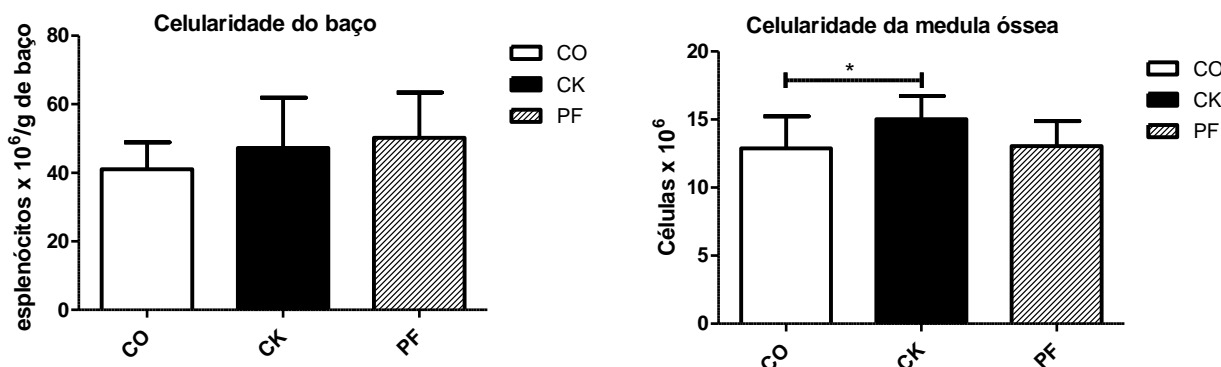


^aO grupo PF apenas recebeu a média de ração consumida por animais do grupo CK; * $p<0,05$; teste de ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Fonte: (PONCE, F., 2015).

Na figura 26 podemos observar os resultados referentes à celularidade do baço (esplenócitos $\times 10^6$ /g de baço) e da medula óssea (células $\times 10^6$) de ratos expostos (CK) ou não (CO) ao *crack*, ou que passaram apenas por restrição alimentar (PF) durante 28 dias. O teste estatístico ANOVA revelou haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos de animais quando avaliados quanto à celularidade da medula óssea ($F=3,540$, $p<0,05$ e $df=2,26$), entretanto, o teste *posthoc* de Tukey evidenciou apenas uma tendência de aumento da celularidade da medula óssea do grupo CK em relação ao grupo CO. Com relação a celularidade do baço, o teste estatístico ANOVA não evidenciou qualquer diferença estatisticamente significativa.

Com relação aos resultados referentes à morfometria do timo e do baço, como podemos visualizar na tabela 7, o teste estatístico de ANOVA não evidenciou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de animais.

Figura 26 - Celularidade do baço (esplenócitos $\times 10^6/\text{g}$ de baço) e celularidade da medula óssea (células $\times 10^6$) de ratos Wistar machos adultos expostos (CK) ou não (CO e PF^a) à fumaça resultante da queima de 250 mg de *crack* por 10 minutos, 2 vezes ao dia, durante 28 dias. Valores referentes a média \pm desvio-padrão dos grupos



^aO grupo PF apenas recebeu a média de ração consumida por animais do grupo CK; * $p < 0,05$; teste estatístico ANOVA de uma via. Fonte: (PONCE, F., 2015).

Tabela 7 - Morfometria do timo e baço de ratos Wistar machos adultos expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de *crack* por 10 minutos, 2 vezes ao dia, durante 28 dias. Valores referentes a média \pm desvio-padrão dos grupos

Grupos	Timo (Razão C/M) ^c	Baço (Razão PV/PB) ^d
CO (n=10) ^a	5,386 \pm 0,92	2,212 \pm 0,33
CK (n=10)	5,378 \pm 0,92	1,922 \pm 0,23
PF ^b (n=10)	4,778 \pm 0,65	2,241 \pm 0,56

^a número de animais empregados por grupo; ^b o grupo PF apenas recebeu a média de ração consumida por animais do grupo CK; ^c razão entre as áreas das regiões corticais e regiões medulares do timo; ^d razão entre as áreas das regiões de polpa vermelha e polpa branca do baço. Fonte: (PONCE, F., 2015).

A Tabela 8 mostra os resultados da fenotipagem de linfócitos T e B do baço de ratos Wistar machos adultos expostos (CK) ou não (CO) à fumaça resultante da queima de *crack*, ou que passaram apenas por restrição alimentar (PF), durante um período de 28 dias. Para análise estatística dos resultados foi utilizado o teste estatístico ANOVA que revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de animais quando analisamos as populações de linfócitos CD3+CD8+ ($F = 6,243$, $p < 0,01$ e $df = 2,26$) e CD45+IgM+ ($F = 17,42$, $p < 0,001$ e $df = 2,26$). O teste *posthoc* de Tukey revelou que os animais do grupo PF exibiram uma diminuição estatisticamente significativa das populações de linfócitos CD3+CD8+ do baço

quando comparados aos animais do grupo CO e também, das populações de linfócitos CD45+IgM+ do baço quando comparados aos animais dos grupos CO e CK.

Tabela 8 - Fenotipagem de linfócitos T e B esplênicos de ratos Wistar machos adultos expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. Valores referentes a média \pm desvio-padrão dos grupos

Grupos	% CD3+CD4+	% CD3+CD8+	% CD45+IgM+
CO (n=10) ^a	17,73 \pm 6,93	1,397 \pm 0,85	27,36 \pm 8,93
CK (n=9)	18,07 \pm 8,54	0,902 \pm 0,57	27,83 \pm 6,99
PF ^b (n=10)	12,89 \pm 6,48	0,389 \pm 0,25**	12,15 \pm 2,51***

^aNúmero de animais empregados por grupo; ^bo grupo PF apenas recebeu a média de ração consumida por animais do grupo CK; ** $p < 0,01$, versus grupo CO; *** $p < 0,001$, versus grupos CO e CK, teste de ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Fonte: (PONCE, F., 2015).

5.3.2 Avaliação da atividade inflamatória de macrófagos peritoneais e de neutrófilos circulantes

Em relação ao *burst* oxidativo e fagocitose de macrófagos peritoneais (Tabela 9), o teste estatístico de ANOVA evidenciou diferenças na fagocitose entre os grupos quanto ao percentual ($F=5,421$, $p=0,011$ e $df=2,24$), e também quanto à média geométrica da intensidade de fluorescência ($F=5,182$, $p<0,05$ e $df=2,24$). Também pode-se observar uma diferença entre os grupos quando analisado o *burst* oxidativo induzido pelo SAPI ($F=5,078$, $p<0,05$ e $df=2,24$). O teste *posthoc* de Tukey revelou que os animais do grupo PF exibiram um aumento na atividade fagocítica em relação aos animais do grupo CO, observou-se também uma redução no *burst* oxidativo induzido pelo SAPI no grupo PF em relação ao grupo CO.

Tabela 9 - Burst oxidativo e fagocitose de macrófagos peritoneais de ratos Wistar machos adultos expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. São apresentados as médias e os respectivos desvios-padrões

Avaliação do <i>burst</i> oxidativo e fagocitose de macrófagos peritoneais				
		CO (n=8) ^a	CK (n=9)	PF ^b (n=10)
Fagocitose	(%)	13,87 ±3,60	25,53 ±14,49	31,90 ±12,76**
	(MFI) ^c	11,42 ±2,89	22,50 ±13,53	27,16 ±11,08*
<i>Burst</i> oxidativo induzido pela fagocitose (MFI)		354,2 ±221,2	299,5 ±137,9	138,4 ±77,69*
<i>Burst</i> oxidativo induzido pelo PMA (MFI)		409,3 ±407,9	340,4 ±251,6	273,1 ±241,5

^a número de animais empregados por grupo; ^bo grupo PF apenas recebeu a média de ração consumida por animais do grupo CK; ^c valores referentes a média geométrica da intensidade de fluorescência; * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$ versus grupo CO, teste de ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Fonte: (PONCE, F., 2015).

Como pode ser observado na Tabela 10, em relação ao *burst* oxidativo e fagocitose de neutrófilos circulantes o teste estatístico de ANOVA evidenciou diferenças na fagocitose entre os grupos quanto ao percentual ($F=7,32$, $p<0,01$ e $df=2,25$), e também quanto à média geométrica da intensidade de fluorescência ($F=21,42$, $p<0,001$ e $df=2,25$), também observam-se diferenças entre os grupos quando analisado o *burst* oxidativo induzido pela fagocitose ($F= 7,07$, $p<0,01$ e $df=2,25$) e o *burst* oxidativo induzido pelo PMA ($F= 5,29$, $p< 0,05$ e $df=2,25$). O teste *posthoc* de Tukey revelou que os animais do grupo PF exibiram um aumento na atividade fagocítica em relação aos demais grupos, observou-se também o aumento do *burst* oxidativo induzido pela fagocitose no grupo PF em relação aos grupos CO e CK, e do *burst* oxidativo induzido pelo PMA no grupo PF em relação ao grupo CK.

Tabela 10 - Burst oxidativo e fagocitose de neutrófilos circulantes de ratos Wistar machos adultos expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. São apresentados as médias e os respectivos desvios-padrões

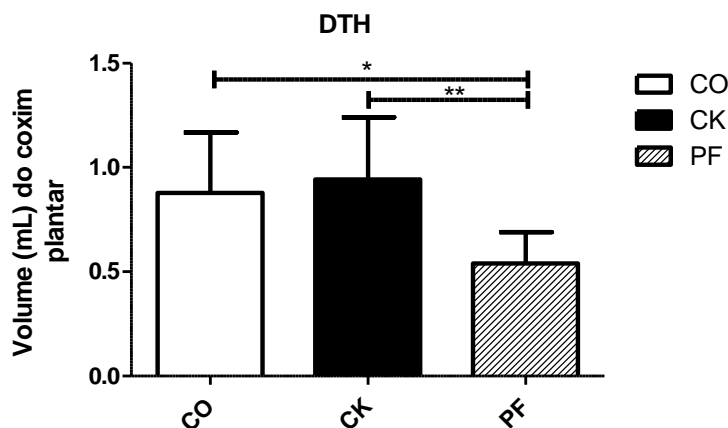
Avaliação do <i>burst</i> oxidativo e fagocitose de neutrófilos circulantes				
		CO (n=10) ^a	CK (n=8)	PF ^b (n=10)
Fagocitose	(%)	66,1 ±21,3	63,69 ±23,0	92,5 ±7,6 ^{**/■}
	(MFI) ^c	87,2 ±43,2	75,0 ±37,7	194,0 ±48,1 ^{***}
Burst oxidativo induzido pela fagocitose (MFI)		372,6 ±210,8	276,7 ±87,1	595,9 ±166,2 ^{*/■}
Burst oxidativo induzido pelo PMA (MFI)		156,5 ±71,8	127,8 ±43,6	214,2 ±52,1 [■]

^a número de animais empregados por grupo; ^bo grupo PF apenas recebeu a média de ração consumida por animais do grupo CK; ^c valores referentes a média geométrica da intensidade de fluorescência; * $p < 0,05$, ** $p \leq 0,01$, versus grupo CO; *** $p < 0,001$, versus grupo CO e CK; [■] $p < 0,05$, [■] $p < 0,01$, versus grupo CK; teste de ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Fonte: (PONCE, F., 2015).

5.3.3 Avaliação da resposta imune celular e humoral

Os resultados ilustrados na figura 27 são relativos à diferença entre as medidas T24 e T0 (conforme descrito no item 4.12.6). Para a análise estatística de tais dados, foi empregado o teste estatístico de ANOVA que revelou haver diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de animais ($F=7,239$, $p < 0,01$ e $df=2,27$). O teste *posthoc* de Tukey revelou que os animais do grupo PF exibiram uma diminuição estatisticamente significativa do volume do coxim plantar após o desafio com o *heat-aggregated* KLH (T24 –T0) quando comparados aos animais dos grupos CO e CK. Conforme mostra a tabela 11, o teste estatístico ANOVA não evidenciou qualquer diferença significativa dos níveis séricos de IgM anti-KLH e IgG anti-KLH entre os diferentes grupos.

Figura 27 - Volume (em mL) do coxim plantar (T24-T0) de ratos Wistar machos adultos expostos (CK) ou não (CO e PF^a) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. Valores referentes a média ± desvio-padrão dos grupos



^a O grupo PF apenas recebeu a média de ração consumida por animais do grupo CK; * $p < 0,05$; versus grupo CO; ** $p < 0,01$ versus grupo CK, teste de ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Fonte: (PONCE, F., 2015).

Tabela 11 - Avaliação dos valores séricos de IgM Anti-KLH e IgG Anti-KLH de ratos Wistar machos adultos expostos (CK) ou não (CO e PF) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. Valores expressos em densidade óptica (O.D.), referentes a média ± desvio-padrão dos grupos

Grupos	IgM Anti-KLH O.D. 450nm	IgG Anti-KLH O.D. 450nm
CO (n=10) ^a	3,451 ±0,19	3,827 ±0,12
CK (n=10)	3,495 ±0,11	3,847 ±0,05
PF ^b (n=10)	3,507 ±0,20	3,809 ±0,11

^aNúmero de animais empregados por grupo; ^bo grupo PF apenas recebeu a média de ração consumida por animais do grupo CK. Fonte: (PONCE, F., 2015).

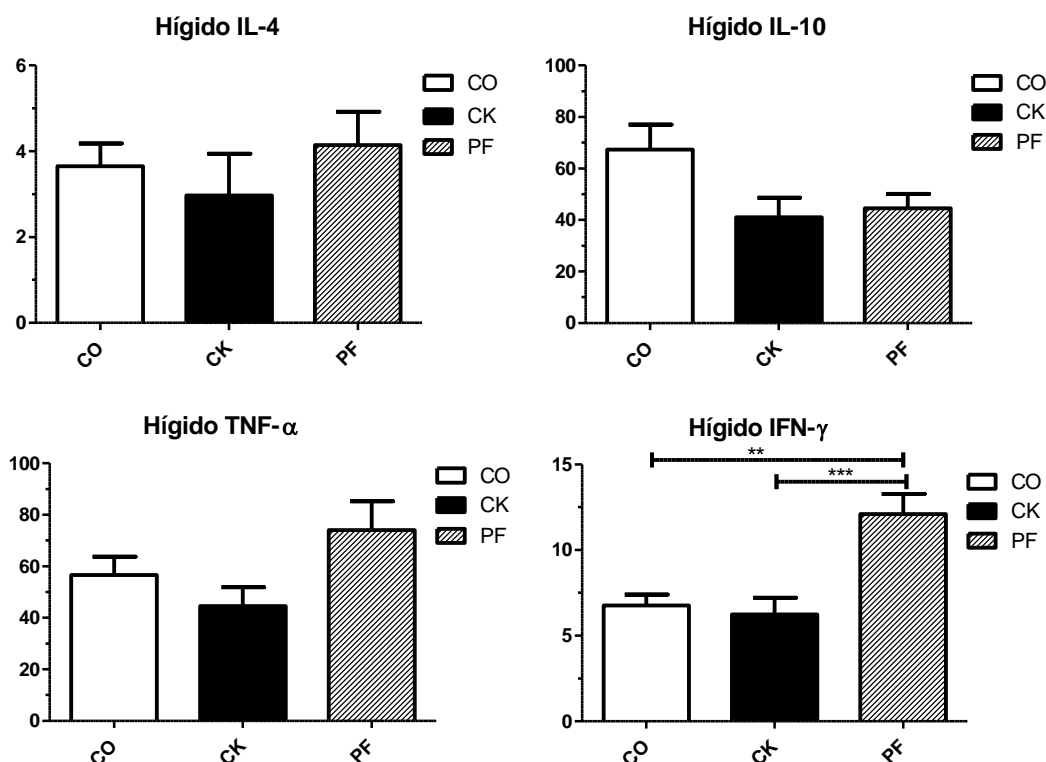
5.3.4 Níveis séricos de citocinas de animais expostos ou não à droga que foram imunizados ou não-imunizados com o KLH

As figuras 28 e 29 ilustram os resultados referentes a quantificação de citocinas séricas em animais não-imunizados (hígidos) e em animais imunizados, respectivamente. O teste estático ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey foi

empregado para a averiguação de possíveis diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Como pode ser observado na figura 28, o teste estatístico empregado revelou haver diferenças estatisticamente significantes ($F=11,10$, $p<0,001$ e $df=2,21$) entre os grupos quanto aos níveis séricos de IFN- γ de animais não imunizados, o pós-teste de Tukey evidenciou níveis elevados de IFN- γ nos animais do grupo PF quando comparados aos animais dos grupos CO e CK ($p<0,01$ e $p<0,001$, respectivamente).

Figura 28 - Níveis séricos de citocinas de ratos Wistar machos adultos não imunizados que foram expostos (CK) ou não (CO e PF^a) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. Valores referentes a média \pm erro-padrão

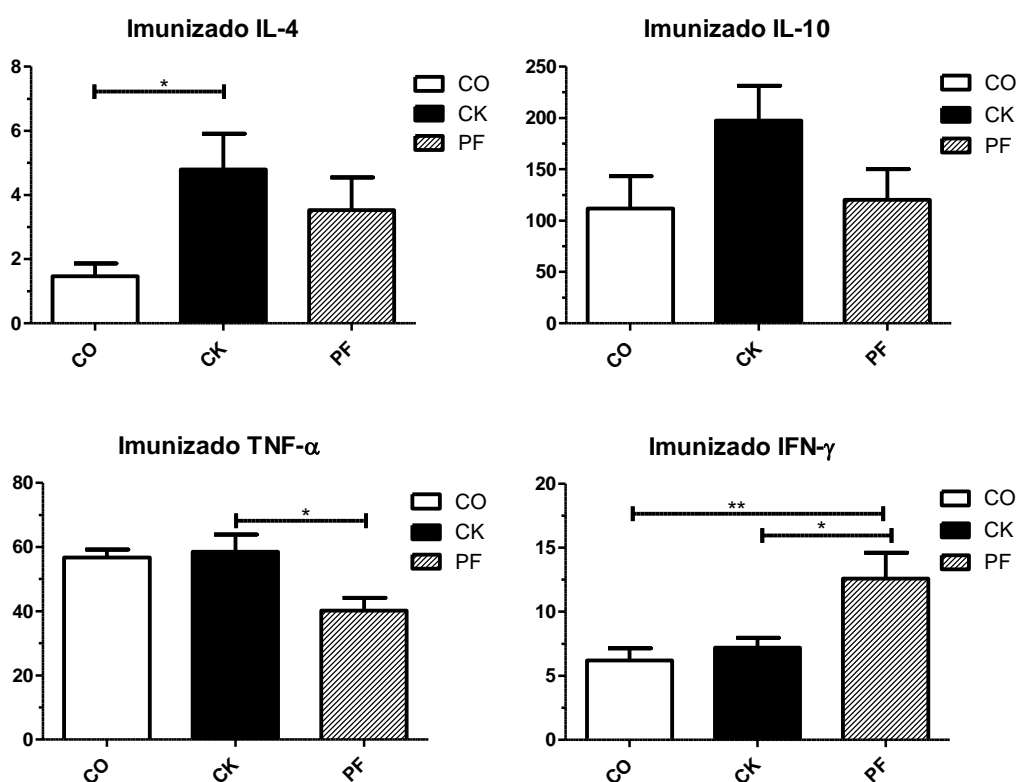


^a O grupo PF apenas recebeu a média de ração consumida por animais do grupo CK. ** $p<0,01$ versus grupo CO; *** $p<0,001$ versus grupo CK, teste de ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Fonte: (PONCE, F., 2015).

A análise estatística referente aos resultados das citocinas séricas de animais imunizados (Figura 29) revelou haver diferenças estatisticamente significantes entre os grupos com relação aos níveis séricos das citocinas IL-4 ($F=4,006$, $p<0,05$ e $df=2,21$) TNF- α ($F=3,591$, $p<0,05$ e $df=2,21$) e IFN- γ ($F=6,824$,

$p < 0,01$ e $df = 2,21$). O pós-teste de Tukey revelou que os animais do grupo CK apresentaram níveis elevados de IL-4 em comparação aos animais do grupo CO ($p < 0,05$) e, ainda, níveis elevados de TNF- α em relação aos animais do grupo PF ($p < 0,05$). O pós-teste de Tukey também evidenciou níveis elevados de IFN- γ nos animais do grupo PF quando comparados aos animais dos grupos CO e CK ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente).

Figura 29 - Níveis séricos de citocinas de ratos Wistar machos adultos imunizados que foram expostos (CK) ou não (CO e PF^a) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. Valores referentes a média \pm erro-padrão

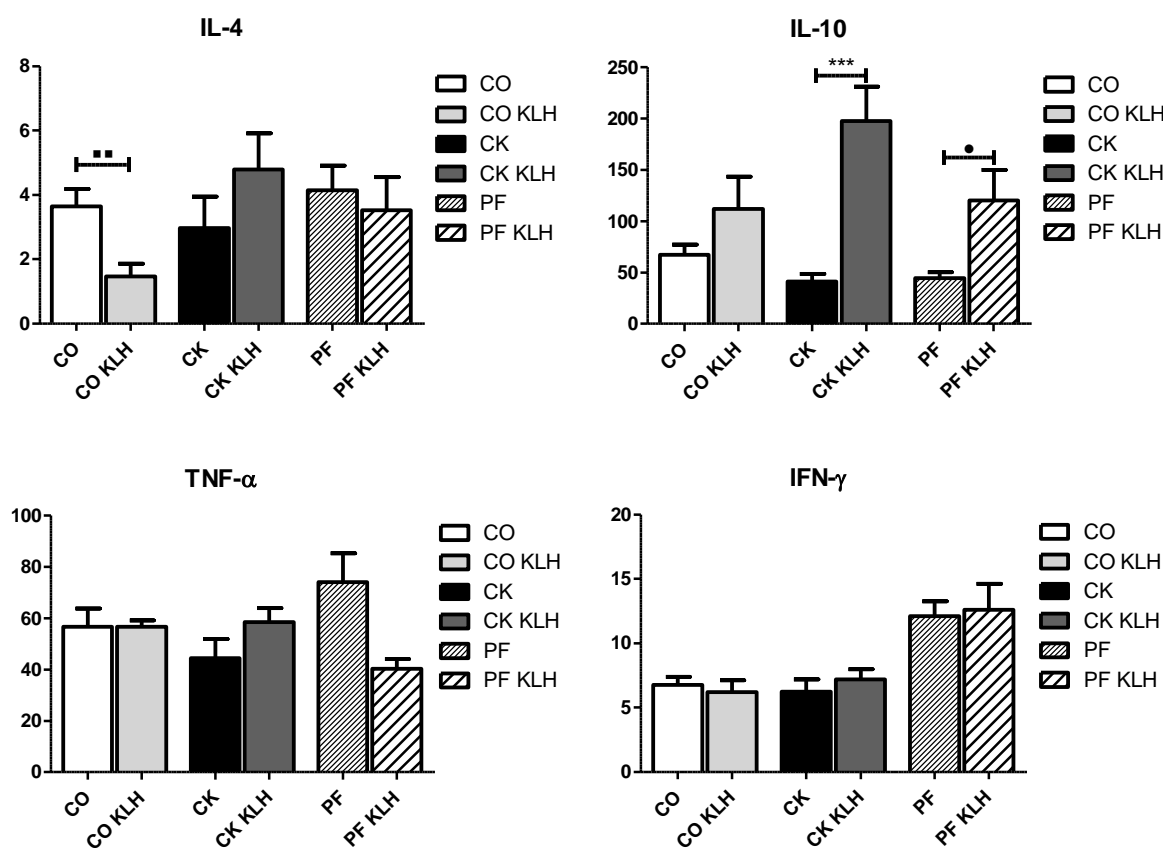


^a O grupo PF apenas recebeu a média de ração consumida por animais do grupo CK; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ versus grupo CO, teste de ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Fonte: (PONCE, F., 2015).

A figura 30 mostra os resultados das análises das citocinas séricas de animais imunizados e não-imunizados, o teste estatístico *t-Student* foi empregado para averiguar a possível existência de diferenças entre os animais imunizados e não-imunizados de um mesmo grupo.

O teste estatístico aqui empregado revelou que houveram diferenças nos níveis séricos de IL-4 quando comparados os animais imunizados e não-imunizados do grupo CO ($p < 0,01$). Notou-se também, diferenças estatisticamente significantes em relação aos níveis séricos de IL-10 entre os animais imunizados e não-imunizados dos grupos CK e PF ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente).

Figura 30 - Diferença dos níveis séricos de citocinas de ratos Wistar machos adultos imunizados (KLH) e não-imunizados que foram expostos (CK) ou não (CO e PF^a) à fumaça resultante da queima de 250 mg de *crack* por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. Valores referentes a média \pm erro-padrão.



^a O grupo PF apenas recebeu a média de ração consumida por animais do grupo CK; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$, teste *t* de Student. Fonte: (PONCE, F., 2015).

5.4 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

A seguir são descritos os resultados referentes às avaliações comportamentais.

5.4.1 Avaliação comportamental da atividade geral em campo aberto e de parâmetros cognitivos em labirinto em T.

A figura 31 ilustra os resultados dos parâmetros comportamentais motores analisados por meio do campo aberto. Análises estatísticas foram realizadas com o teste ANOVA de duas vias. Em relação aos dados relativos à distância percorrida pelos diferentes grupos (Figura 31A), foram observadas diferenças entre os diferentes grupos [$F(2,81) = 20,21, p < 0,0001$] e os diferentes tempos de análise [$F(2,81) = 52,33, p < 0,0001$], o pós-teste de Bonferroni mostrou que o grupo CK apresentou um aumento da distância percorrida quando comparado com o grupo CO nos tempos T1, T2 e T3 ($p < 0,001, p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) e também quando comparado ao grupo PF nos tempos T1 e T2 ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente).

Quanto à análise dos resultados relativos a velocidade média (Figura 31B) dos diferentes grupos, foram evidenciadas diferenças entre os grupos [$F(2,81) = 19,05, p < 0,0001$] e também em relação aos diferentes tempos de análise [$F(2,81) = 49,78, p < 0,0001$], sendo observado, através do pós-teste de Bonferroni, um aumento da velocidade média do grupo CK em relação ao grupo CO nos tempos T1 e T2 ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente) e em relação ao grupo PF nos tempos T1 e T2 ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente).

Com relação ao parâmetro de auto-limpeza (Figura 31C), apesar de não terem sido observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, ocorreram diferenças com relação aos diferentes períodos de análise [$F(2,81) = 5,43, p = 0,0061$].

Como ilustrado na figura 31D, quando analisados os dados referentes ao tempo de permanência na zona central, foram detectadas diferenças entre os grupos [$F(2,81) = 8,07, p = 0,0006$], porém não foi observada uma diferença significativa em relação aos diferentes tempos de exposição. Por meio do pós-teste de Bonferroni, podemos observar um aumento do tempo de permanência na zona central do grupo CK em relação ao grupo CO nos tempos T2 e T3 (ambos $p < 0,01$) e em relação ao grupo PF, também nos tempos T2 e T3 (ambos $p < 0,05$).

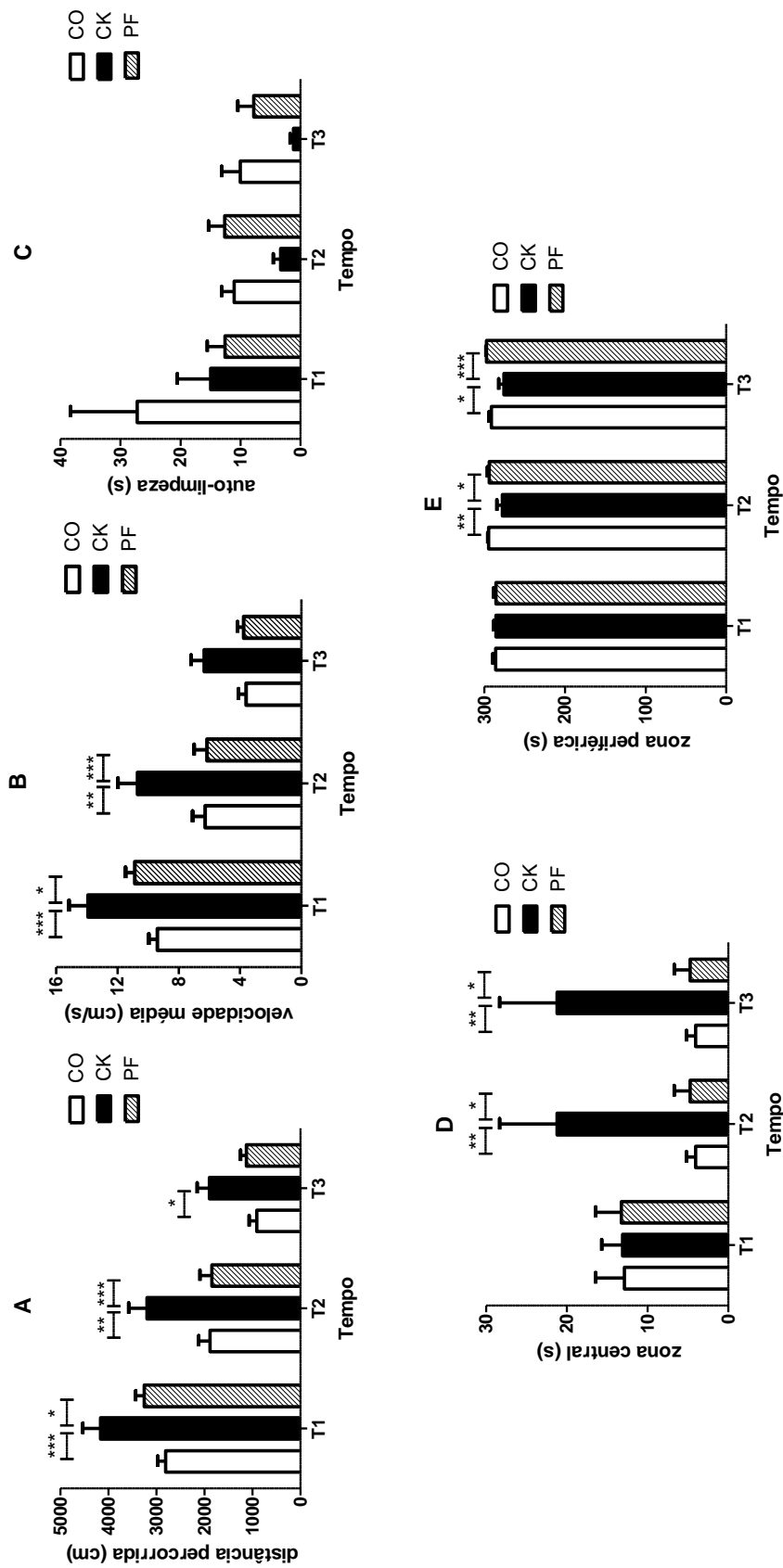
Foi observado a presença de diferenças entre os grupos no parâmetro de tempo de permanência na zona periférica do campo aberto (Figura 31E) [$F(2,81)$

=8,97, $p=0,0003$], entretanto, não foi observada uma diferença significativa em relação aos diferentes tempos de exposição. Quando empregamos o pós-teste de Bonferroni, foi evidenciado uma diminuição no tempo de permanência na zona periférica no grupo CK em relação ao grupo CO nos tempos T2 e T3 ($p<0,01$ e $p<0,05$, respectivamente) e também, em relação ao grupo PF nos tempos T2 e T3 ($p<0,05$ e $p<0,001$, respectivamente).

A figura 32 ilustra os resultados da análise do comportamento cognitivo em labirinto em T, não foram observadas diferenças estatísticas em relação aos diferentes grupos e nem em relação aos diferentes tempos de análise.

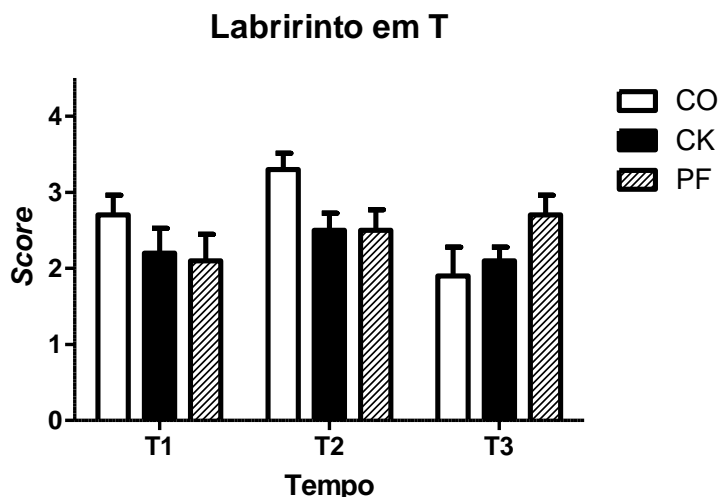
Figura 31 - Análise do comportamento em campo aberto de ratos Wistar machos adultos expostos (CK) ou não (CO e PF^a) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. Os animais foram avaliados no início, no meio e no final do período experimental. Valores referentes a média \pm erro-padrão.

Análise comportamental em campo aberto



^a O grupo PF apenas recebeu a média de ração consumida por animais do grupo CK; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; teste estatístico ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. Fonte: (PONCE, F., 2015).

Figura 32 - Análise do comportamento cognitivo em labirinto em T de ratos Wistar machos adultos expostos (CK) ou não (CO e PF^a) à fumaça resultante da queima de 250 mg de *crack* por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. Os animais foram avaliados no início, no meio e no final do período experimental. Valores referentes a média \pm erro-padrão.



^a O grupo PF apenas recebeu a média de ração consumida por animais do grupo CK; teste estatístico ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni. Fonte: (PONCE, F., 2015).

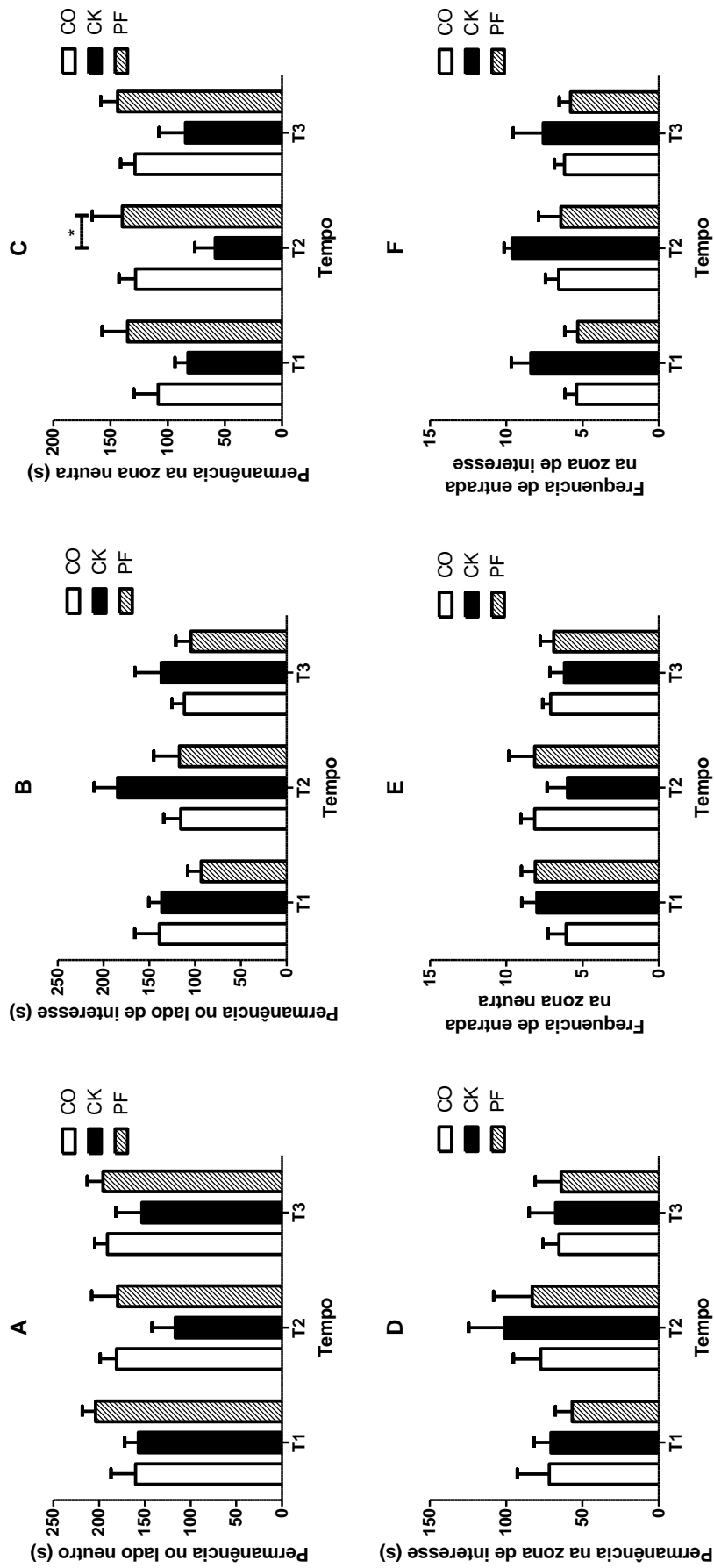
5.4.2 Avaliação comportamental de aversão ou preferência ao odor do *crack*.

Ilustrados na figura 33 estão os resultados dos parâmetros comportamentais de aversão ou preferência ao odor de *crack* analisados por meio do campo aberto. O teste estatístico utilizado para evidenciar possíveis diferenças estatisticamente significantes entre os grupos foi o teste ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni. Em relação aos dados referentes ao tempo de permanência (em segundos) dos animais no lado de odor neutro (Figura 33A), foram observadas diferenças entre os diferentes grupos [$F(2,72) = 4,32, p < 0,05$], o pós-teste de Bonferroni não foi capaz de evidenciar qualquer diferença estatisticamente significativa, mesmo assim é possível notar uma tendência de redução no tempo de permanência no lado neutro nos animais do grupo CK em relação aos demais grupos, principalmente nos tempos experimentais T2 e T3. Como era esperando, a análise do tempo de permanência (em segundos) dos animais no lado de interesse (Figura 33B) evidenciou diferenças entre os grupos [$F(2,72) = 3,82, p < 0,05$], novamente o pós-teste de Bonferroni não evidenciou alterações estatisticamente

significantes, porém, nota-se uma tendência de aumento no tempo de permanência no lado de interesse por parte dos animais do grupo CK em relação aos demais grupos, novamente nos tempos T2 e T3.

Quanto ao tempo de permanência (em segundos) dos animais na zona neutra (Figura 33C), foi evidenciado uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos [$F(2,72) = 9,52, p < 0,001$], o pós-teste de Bonferroni evidenciou que o grupo CK apresentou uma diminuição do tempo de permanência na zona neutra quando comparado com o grupo PF no tempo T2 ($p < 0,05$). Quando analisado o parâmetro relativo ao número de entradas na zona de interesse (Figura 33F) notou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos [$F(2,72) = 5,29, p < 0,01$], todavia, o pós-teste de Bonferroni não foi capaz de evidenciar quaisquer diferenças entre os grupos. Quanto aos parâmetros de tempo de permanência (em segundos) na zona de interesse (Figura 33D) e do número de entradas na zona neutra (Figura 33E) o teste estatístico aqui empregado não evidenciou diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes grupos e tempos de análise.

Figura 33 - Análise do comportamento de aversão ou preferência ao odor de crack em ratos Wistar machos adultos expostos (CK) ou não (CO e PF^a) à fumaça resultante da queima de 250 mg de crack por 10 minutos, durante 28 dias, 2 vezes ao dia. Os animais foram avaliados no início, no meio e no final do período experimental. Valores referentes a média \pm erro-padrão.



^a O grupo PF apenas recebeu a média de ração consumida por animais do grupo CK; * $p < 0,05$, teste estatístico ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. Fonte: (PONCE, F., 2015).

6 DISCUSSÃO

Em relação aos teores de cocaína presentes no *crack*, não existe uma definição exata de seus teores neste tipo de droga, sendo foco de pesquisas de vários estudos, como é relatado por Fukushima (2010) que estudou o perfil da cocaína comercializada como *crack* na região metropolitana de São Paulo durante um período de vinte meses entre 2008 e 2009, o percentual de pureza média de cocaína presente nas amostras de *crack* analisadas foi de 71,3%. Ainda, um estudo conduzido pela Polícia Federal revelou que o teor de cocaína do *crack* apreendido na cidade de São Paulo entre os anos 2011 e 2012, foi de 71,9% (COSTA et al., 2013), o que corrobora com o estudo anteriormente citado.

Curiosamente, muitos relatos sobre o teor de cocaína em amostras de *crack* contradizem esses dados, como é o caso do estudo conduzido por Costa (2012), que evidenciou níveis que ficaram entre 4,9 a 93,8% de cocaína em amostras de *crack* apreendidas no Estado da Paraíba; ainda, resultados apresentados por Oliveira et al. (2009) evidenciam uma pureza de cocaína na forma cloridrato compreendida entre 37,4% e 95,6%, e entre 13,6% e 21,6% para amostras de *crack*. Acreditava-se que um menor teor de cocaína nas amostras de *crack* era esperado, uma vez que a produção desta forma de entorpecente se dá a partir da cocaína cloridrato, o que poderia diminuir o teor de cocaína devido à adição de vários outros compostos com intuito de aumentar o volume da droga. No entanto, teores elevados de cocaína podem se justificar pelo próprio processo de alcalinização da droga, já que a maior parte das concentrações dos adulterantes clássicos que são misturados ao cloridrato de cocaína são removidos. De fato, a *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction* (2014) em seus estudos epidemiológicos, afirma que em média os níveis de cocaína no *crack* são, de maneira geral, maiores que aqueles encontrados na forma cloridrato.

Após os processos de trituração e homogeneização do *crack* descritos anteriormente, 8 amostras representativas do mesmo foram, durante um período de quatro meses, analisadas por meio de HPLC-DAD para a verificação do teor de cocaína. A média encontrada foi de aproximadamente 67%, valor este próximo daqueles encontrados por Fukushima (2010) e Costa et al. (2013). Assim, pode-se

concluir que o nível médio de cocaína presente no homogenato de pedras de *crack* adquiridas do DENARC e utilizadas no presente estudo corrobora com o que vem sendo relatado, tanto na região metropolitana de São Paulo quanto em outros países, como valores encontrados no Reino Unido que são de aproximadamente 73% (SCHIFANO; CORKERY, 2008).

Inicialmente, foi proposto um modelo de exposição semelhante à exposição do tipo *nose-only*, onde apenas o focinho do animal seria inserido no equipamento para a exposição à fumaça resultante da queima do *crack*. No entanto, para tal, haveria a contenção física dos animais durante o período de exposição à droga, e isto seria uma preocupação deste modelo de exposição devido ao efeito estressor provocado pela contenção física e sua correlação com efeitos imunossupressores (FAHEY; GUYRE; MUNCK, 1981; DE CASTRO et al., 2000; OISHI, et al., 2003), o que poderia vir a interferir, tanto nos estudos de imunotoxicidade, quando nos comportamentais.

Porém, neste modelo aqui utilizado, os animais teriam todo o seu corpo exposto à fumaça da droga, poderia haver absorção dérmica? Como foi descrito anteriormente, as principais vias de exposição à cocaína são: a intravenosa, a intranasal (mucosa) e a pulmonar, sendo a via oral a principal de nativos de países produtores (BOGHDADI; HENNING, 1997). No entanto, um estudo de Baselt e colaboradores (1990) mostrou que a aplicação dérmica de base livre de cocaína sobre a pele nua de voluntários humanos gerou a excreção de baixíssimas concentrações urinárias de benzoilecgonina, seu principal metabólito, equivalente a cerca de 1,0% a dose administrada, sendo considerado de pouca importância toxicológica, com exceção da positividade para o contexto forense (BASELT; CHANG; YOSHIKAWA, 1990). Com este dado de literatura em mãos, decidiu-se que a inserção de todo o animal no interior da caixa não causaria interferência nos níveis plasmáticos de cocaína por via pulmonar.

Assim, para o desenrolar dos estudos comportamentais e de imunotoxicidade, foi necessário determinar a quantidade de droga a ser queimada e o tempo de exposição dos animais. E de fato, os resultados aqui obtidos claramente evidenciaram que o equipamento de exposição foi eficaz em expor os animais à fumaça do *crack* de forma dose-dependente e que se desdobra para tempo-dependente, podendo ser inclusive utilizado para outras drogas administradas pela

via pulmonar, como a metanfetamina e a própria maconha, empregando para tal, pequenas quantidades de droga, uma vez que neste trabalho, foi utilizado 250 mg da droga contra, por exemplo, os 5 gramas de *crack* empregados por Herculani et al.(2009), Pires et al. (2012) e Areal et al. (2015) para alcançar concentrações séricas de cocaína semelhantes, ou até mesmo maiores (AREAL et al., 2015).

Vale salientar neste momento, que a queima de 100 mg de *crack* para exposição dos animais por 10 minutos foi abolida, pois quando se queimou a mesma quantidade por 5 minutos, não havia mais indícios de fumaça na caixa. Assim, devido à rápida farmacocinética que a cocaína na forma fumada possui, já teríamos em animais expostos a esta quantidade por tempo de 10 minutos, somados ainda a 5 minutos de espera até a eutanásia, concentrações bem abaixo daquelas obtidas com animais expostos apenas por 5 minutos. De fato, em estudos realizados tanto em humanos (EVANS; CONE; HENNINGFIELD,1996) quanto em animais (HE et al., 2006; PARLAMAN et al., 2007), foi evidenciado que na forma fumada, ocorre um decréscimo bastante significativo na concentração de cocaína já aos 5 minutos após a administração. Por exemplo, nos estudos com camundongos realizados por He et al. (2006) evidenciou-se que após 0,5 minutos da exposição à fumaça do *crack*, os níveis séricos de cocaína foram de aproximadamente 405,6 ng/mL, após 5 minutos os níveis eram de aproximadamente 160 ng/mL, sendo que os mesmos, após 30 minutos, caíram para 18 ng/mL.

Quando o presente estudo foi idealizado, a concentração plasmática-alvo para que os ensaios biológicos fossem iniciados era de aproximadamente 200 ng/mL, níveis estes próximos aos encontrados em usuários de cocaína (SCHRAMM et al., 1993). No modelo aqui proposto, decidiu-se por empregar a dose de 250 mg/10 min, a qual promove valores plasmáticos ao redor dos 170 ng/mL, pois assim seria possível expor os animais duas vezes ao dia, na tentativa de se aproximar da realidade do usuário, que usa a droga várias vezes ao dia. Assim, com o tempo de exposição e a quantidade de droga a ser utilizada por exposição definidos, deu-se início aos experimentos visando avaliar as alterações comportamentais e os parâmetros de toxicidade sistêmicos e de imunotoxicidade.

No entanto, estes níveis plasmáticos e a exposição dos animais duas vezes ao dia refletiriam de fato em efeitos sabidamente característicos da intoxicação por cocaína, já que raríssimos são os estudos com o *crack*?

Logo nos primeiros dias de experimentação, foi possível observar uma diminuição na ingestão de alimentos por aqueles animais expostos à fumaça do *crack*, resultado este sabidamente esperado, sendo inclusive uma das justificativas para o uso do grupo PF (BLUNDELL; LATHAM, 1978; BEDFORD; BORNE; WILSON, 1980), e um dos mecanismos sugeridos para este efeito, está relacionado ao aumento de dopamina nas fendas sinápticas cerebrais, em específico a região estriatal dorsal, levando à hipofagia (CANNON; BSEIKRI, 2004; SOTAK et al., 2005). No entanto, no decorrer dos 28 dias de exposição, foi possível observar que os animais voltaram a ingerir alimentos, mesmo que em quantidades menores que aqueles do grupo controle; porém, sem prejuízos estatisticamente significantes sobre o ganho de peso destes animais. Segundo Balopole e colaboradores (1979), o efeito anorexígeno da cocaína de forma aguda em roedores existe; porém, é transiente, sendo ainda corroborado por outros estudos que evidenciaram que a o consumo de alimentos pode ficar retardado enquanto sob efeito da droga (BALOPOLE; HANSULT; DORPH, 1979; COOPER; VAN DER HOEK, 1993), podendo inclusive sofrer um efeito compensatório para alguns tipos de alimentos, como carboidratos e gorduras (BANE et al., 1993).

No entanto, quando o ganho de peso foi observado, notou-se que os animais do grupo PF apresentaram menor ganho de peso quando comparados com seus parceiros do grupo CK. Apesar da não significância estatística, é possível sugerir que, enquanto nos animais expostos à droga o efeito anorexígeno é de origem central, nos animais do grupo PF está ocorrendo restrição de alimentos, o que pode gerar estresse nos mesmos (PANKEVICH et al., 2010), que pareceu ser maior no início da experimentação, como os dados referentes ao consumo de ração, já que não foram detectadas alterações significantes nos níveis de corticosterona nestes animais quando comparadas com os dos demais grupos.

Ainda, outro fato que corrobora com o sucesso da exposição ao *crack* e seus efeitos semelhantes à cocaína na forma de cloridrato foram os resultados referentes à análise comportamental, em específico aqueles resultados do campo aberto, que evidenciaram claramente a maior movimentação dos animais expostos à droga, característica esta referenciada como um marcador comportamental da intoxicação por cocaína (POST; CONTEL, 1983; AREAL et al., 2015).

Ainda em relação a estes resultados, vale ressaltar neste momento que a administração crônica de cocaína é capaz de produzir sensibilização e/ou tolerância aos efeitos locomotores observados, e isto dependendo do paradigma pelo qual a cocaína é administrada. Tem sido relatado que o acesso diário estendido dos animais para a cocaína não consegue produzir uma sensibilização locomotora, sendo este parâmetro observado apenas em um padrão intermitente de administração de cocaína, além disso, este acesso prolongado leva ao aumento do consumo da droga em estudos que envolvam a autoadministração da cocaína sugerindo que a sensibilização locomotora e o uso compulsivo de cocaína estejam dissociados (BEN-SHAHAR et al., 2001; VEZINA, 2007). O processo de tolerância ocorre quando a administração repetida de uma droga provoca um desvio da curva dose-resposta para a direita, de modo que seja necessária uma maior dose da droga para produzir o mesmo efeito; o efeito oposto, denominado sensibilização, refere-se a um desvio da curva de dose-resposta para a esquerda, de modo que a administração repetida de uma droga provoca um maior efeito de determinada dose ou, há a necessidade de dose menor para se obter o mesmo efeito. É interessante notar que pode haver tolerância e sensibilidade simultânea a uma droga (GOLAN, 2011).

Isto posto, chama a atenção que, os aumentos da distância percorrida e da velocidade média aqui observados na análise comportamental em campo aberto, à semelhança dos dados referentes ao consumo de ração dos animais expostos à droga, apresentaram-se de maneira transitória, sendo mais evidentes nos períodos iniciais da experimentação em detrimento dos períodos finais do ensaio, mas sempre se apresentando maior que naqueles animais não expostos ao *crack*. Estaria este resultado relacionado à um processo de tolerância? Muito provavelmente sim, no entanto, existe a possibilidade do contato prévio com o ambiente e conseqüente familiarização com o campo aberto, reduzir a frequência dos parâmetros exploratórios e locomotores. Tanto o é, que esta característica ocorreu em todos os grupos, contudo, o efeito estimulante da droga é sempre evidente em todos os períodos, sendo que, para o melhor entendimento de um possível efeito de tolerância locomotora à droga, será necessária a avaliação da neuroquímica de tais animais para maiores evidências de tal fato.

Contudo, quando observamos os resultados referentes aos parâmetros de permanência nas zonas centrais e periféricas do campo aberto, notamos um maior tempo de permanência na zona central e, conseqüentemente, menor tempo de permanência nas zonas periféricas do campo aberto, que ao nosso ver podem estar relacionadas a efeitos ansiolíticos, conforme sugerido por Prut e Belzung (2003); no entanto, o campo aberto não é o melhor método para tal inferência. Todavia, existem relatos de que a cocaína promove inibição do funcionamento normal dos canais de sódio de neurônios situados no *locus coeruleus* (região esta correlacionada com efeitos ansiogênicos quando estimulada), resultando em efeitos “ansiolíticos”, efeitos estes de natureza transitória devido à própria farmacocinética da droga (LIU et al., 2014). A hipótese de efeito ansiolítico da cocaína aqui estudado em campo aberto, também pode ser corroborada pelos estudos de Müller et al. (2008), o qual, após administração de cocaína em ratos por via IP, também observou efeitos semelhantes em campo aberto, que foi confirmado pelo labirinto em cruz elevado, teste este o mais indicado para avaliação deste parâmetro, logo este trabalho conclui que o crack, à semelhança de cocaína, promove efeitos ansiolíticos que podem ser transitórios devido à farmacocinética da cocaína.

O teste do labirinto em T é clássico para estudar as possíveis alterações cognitivas nos animais. De acordo com Deacon e Rawlins (2006) a tendência natural dos ratos num labirinto em T é alternar a escolha do braço de entrada, assim eles estão usando memória operacional, isto é, a resposta em cada ensaio varia de acordo com a escolha que os animais haviam realizado anteriormente. Esta alternância reflete a motivação do animal para explorar o seu ambiente e localizar a presença de recursos como alimento, água, companheiros ou abrigo, sendo notável que os animais não precisam ser privados de tais recursos para mostrar o comportamento de alternância, que neste caso, é chamado de alternância espontânea (OLTON; BECKER; HANDELMANN, 1979; DEMBER; RICHMAN, 1989; DEACON; RAWLINS, 2006). Além disso, a alternância, seja recompensada ou espontânea, é considerada um excelente teste na detecção de disfunções do hipocampo, devido ao fato do teste ser fundamentado na memória operacional dos animais (REISEL et al., 2002). Tarefas de memória operacional requerem monitoramento cognitivo (por exemplo, a manipulação de informações ou comportamentos), os processos cognitivos necessários para alcançar este objetivo

incluem a correta interpretação e atenção sobre o controle da memória de curto prazo, o que permite a integração, transformação, eliminação e recuperação de informações (DEACON; RAWLINS, 2005).

Isto posto, existem estudos que relatam que a administração de cocaína, tanto em animais de laboratório (CUTLER et al., 1996; BRIAND et al., 2008; MCCRACKEN; GRACE, 2013) quanto em seres humanos (VONMOOS et al., 2013), pode alterar parâmetros cognitivos dos mesmos. Sendo este um dos motivos da escolha de tal teste comportamental. Em um estudo de Smith et al. (1993) foi demonstrado que altas doses de cocaína poderiam inibir o potencial de ação de longa duração em neurônios da região do hipocampo, sendo este um importante processo envolvido na formação de memórias recentes. Ainda, Vonmoos et al. (2014) relatam um desempenho cognitivo reduzido, principalmente na memória operacional, de usuários crônicos de cocaína; entretanto, no mesmo estudo é relatado que em usuários que se tornaram abstinentes, tais alterações se apresentaram reversíveis. No entanto, nos resultados aqui obtidos, não foram observadas quaisquer alterações dignas de nota, o que sugere que no paradigma de exposição ao *crack* aqui apresentado não houve alterações cognitivas nos animais que foram expostos à droga, porém, vale ressaltar que outros estudos devam ser direcionados para de fato avaliar o impacto do *crack* sobre parâmetros cognitivos, haja vista que para o nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho na literatura que relata tais estudos comportamentais com o uso da exposição pulmonar à fumaça do *crack*.

Quando decidiu-se por realizar um ensaio com o objetivo de averiguar se os animais apresentavam algum comportamento que indicasse “uso compulsivo” ou “fissura” ao *crack*, uma vez que o modelo aqui empregado não foi o de autoadministração, realizou-se uma análise comportamental de aversão ou preferência ao odor do *crack*, o qual foi idealizado a partir de um modelo de comportamento sexual; assim, foi possível evidenciar uma redução do tempo de permanência dos animais expostos ao *crack* na zona com odor neutro, e, conseqüentemente, uma tendência de um maior tempo de permanência na zona com o odor característico do *crack*, em detrimento do odor considerado neutro (maravalha).

Um fenômeno claro que tem sido implicado no uso crônico de *crack* é o desejo incontrolável de se utilizar a droga, vontade esta conhecida como fissura. Acredita-se que a fissura possa ser uma resposta que foi condicionada pelo uso prévio da droga, e pode ser provocada pelos chamados estímulos ambientais (CHILDRESS et al., 1993; BORDNICK et al., 2004). Vale salientar que abordagens de tratamento comportamental para dependência de drogas fornecem incentivos para os usuários se manterem abstinentes, ensinam habilidades importantes que ajudam a manter a abstinência, mesmo na presença de fatores estressores ou outros estímulos ambientais que podem desencadear o desejo intenso pela droga. Assim, um programa de tratamento da toxicodependência bem-sucedido seria provável se o mesmo concentrasse em ambos os mecanismos neurais e de contingências do meio ambiente que medeiam o uso de drogas (PECK; RANALDI, 2014).

A exposição a estímulos relacionados à droga em condições de extinção é uma estratégia de tratamento que tem sido usada para apoiar a abstinência de drogas em seres humanos. Neste paradigma de tratamento a pessoa é exposta a um estímulo que foi emparelhado com a droga de forma fiável, entretanto na ausência, neste caso, dos efeitos provocados pelo uso da droga (procedimento de extinção), a fim de se reduzir os efeitos fisiológicos e o desejo psicológico para os efeitos provocados pelo uso da droga (CHILDRESS et al., 1988; O'BRIEN et al., 1988). Além disso, um importante componente do procedimento de extinção é que são ensinados aos usuários estratégias de abstinência (por exemplo, treinamento de relaxamento profundo) em situações estressantes ou na presença de sinais que sejam emparelhados por drogas, que supostamente diminuem a fissura pela droga e sintomas de retirada da mesma (PECK; RANALDI, 2014).

Portanto, quando se utiliza uma “pista” ambiental que remeta à droga no contexto de procedimento de extinção da exposição, é crítico que as técnicas de extinção comportamental sejam aplicadas no ambiente natural onde os usuários tipicamente experimentam os efeitos provocados pela droga, para ajudar a impedir a renovação do comportamento de busca pela droga nos contextos que o usuário relaciona com a droga (ROSE; LEVIN, 1991; CONKLIN; TIFFANY, 2002). Tendo sido isto posto, os resultados aqui apresentados indicam o papel que o odor desempenha como estímulo ambiental, sendo então, importante durante o

tratamento da toxicodependência levar em consideração o papel dos odores que o usuário assimila a droga ou ao seu contexto de uso.

Tomando-se em conjunto os resultados obtidos dos estudos comportamentais, pode-se concluir que a exposição de ratos, duas vezes ao dia, durante 28 dias promoveu nos mesmos, alterações comportamentais semelhantes e também distintas daquelas relatadas com o cloridrato de cocaína, sendo inclusive sugerido uma nova metodologia para avaliar os possíveis tratamentos de extinção e outros relacionados ao consumo do *crack*.

Um grande indicativo de possível efeito imunotóxico de determinada substância pode ser encontrado em um simples hemograma completo (WHO, 2014). Curiosamente, a avaliação do hemograma de animais expostos ou não ao *crack* revelou que os animais do grupo PF exibiram diminuição nas contagens de leucócitos e eritrócitos, nas concentrações de hemoglobina e no valor de hematócrito quando comparados aos grupos CO e CK. Tais efeitos não poderiam estar relacionados à menor ingesta de alimentos, uma vez que animais do grupo CK não apresentaram qualquer semelhança de efeito com o grupo PF. Assim, como explicar esta diminuição nos parâmetros relatados? A explicação encontrada para tais alterações foi, justamente, a diferença do “tratamento” entres estes grupos, sendo que apenas o grupo PF não foi exposto ao aparato de exposição. Como comentado anteriormente, para a queima da droga, foi necessário adicionar cinzas ao queimador, tendo sido o grupo CO exposto apenas à queima destas cinzas. Sabidamente, o processo de combustão em si, é capaz de produzir entre outras substâncias, o monóxido de carbono. Assim, a hipótese que levantamos é de que não houve uma diminuição dos parâmetros nos animais do grupo PF, e sim uma elevação dos parâmetros dos grupos CO e CK devido à exposição ao monóxido de carbono.

De fato, existem estudos que relatam os efeitos do monóxido de carbono sobre parâmetros hematológicos e bioquímicos, como por exemplo, o estudo de Lee et al. (1994) que relata elevações nos níveis de hemoglobina e do hematócrito e também elevação no número de eritrócitos. Whang e Choi (1990) ainda descrevem elevação na contagem de leucócitos, assim como nos níveis de glicose, de AST e ALT, parâmetros estes também alterados nos animais expostos ao monóxido de carbono aqui relatado.

Em relação aos efeitos imunotóxicos da droga, foi observado um aumento da celularidade da medula óssea no grupo CK; porém, não acompanhado de alterações hematológicas e também esplênicas, inferindo em dado isolado sem significado clínico aparente. Ainda em relação aos órgãos linfoides estudados, nenhuma outra alteração foi observada em relação ao peso relativo de timo e baço dos animais do grupo CO e CK, o que corrobora com estudos realizados por Masten et al. (1996) com ratas prenhas tratadas, por via IP, durante 12 dias com 60 mg/kg de cloridrato de cocaína, em que nenhuma alteração no ganho de peso ou nos pesos relativo de timo e baço foi observado. Porém, o grupo PF apresentou uma diminuição estatisticamente significante no peso relativo de timo. Sabe-se que este parâmetro funciona como um barômetro da má nutrição (CHANDRA, 1991). No entanto, os animais do grupo CK, apesar de possuírem valores bastante próximos aos do grupo PF, não apresentaram alterações estatisticamente significantes, logo, pode-se conjecturar que, ambos o grupos apresentaram menor aporte nutricional; porém, um decorrente de anorexia central, enquanto que o outro devido à restrição alimentar, esta última, como anteriormente salientado, com possível efeito estressor que pudesse contribuir para esta diferença entre os grupos CK e PF. Ainda em relação aos órgãos linfoides avaliados, não foram observadas diferenças na morfometria dos mesmos entre os grupos estudados.

À análise histopatológica, a exposição a 250 mg de *crack*, duas vezes ao dia, por 28 dias não provocou alterações no cérebro, coração, pulmões, timo e baço. Todavia, nos animais expostos ao *crack*, foi evidenciada uma leve congestão nos tecidos hepáticos e renais, contudo sem reflexo de toxicidade hepática ou renal, já que os parâmetros bioquímicos dos grupos CO e CK, expostos ao monóxido de carbono, não se encontram alterados.

Os resultados encontrados na literatura sobre os efeitos da cocaína sobre a fenotipagem de linfócitos esplênicos são inconclusivos. Estudo realizado por Lopez et al. (1991) evidenciou uma redução nos percentuais de linfócitos CD4+ e CD8+ e uma elevação em linfócitos B de camundongos que foram tratados com cocaína, por via IP, durante 4 semanas com doses crescentes até 40 mg/kg; por outro lado, um estudo conduzido por Avila et al. (2003) com ratos tratados com 10 mg/kg de cocaína pela mesma via não foi capaz de evidenciar quaisquer alterações no percentual de tais células; ainda, Di Francesco et al. (1994) após 7 dias de

administração de cocaína (1 a 10 mg/kg) em camundongos evidenciou uma redução na contagem global de leucócitos circulantes, entretanto após 30 dias de administração, notou-se que tal redução foi aparentemente transitória, ainda, durante as duas avaliações as populações de linfócitos foram avaliadas e não foram encontradas quaisquer alterações nos percentuais das diferentes populações celulares. Assim, os dados obtidos de literatura pouco contribuem para com o estudo aqui apresentado, uma vez que há diferenças na forma de cocaína administrada, a espécie animal empregada, o tempo de administração e a dose utilizada. Todavia, novamente o grupo PF surpreendeu quando seus animais apresentaram uma redução dos valores percentuais de linfócitos esplênicos CD3+CD8+ e CD45+IgM+.

Em relação aos possíveis efeitos pró ou anti-inflamatórios da cocaína, os dados da literatura mostram que a exposição aguda promove maior atividade de células inflamatórias, enquanto que no uso crônico, tal efeito parece ser transitório. De acordo com estudo conduzido por Vaz et al. (1993), a administração de cocaína por diferentes vias em camundongos promoveu aumento do *burst* oxidativo de macrófagos peritoneais e alveolares. Este efeito foi observado uma hora após a exposição à cocaína e durou até 48 horas após a exposição. Ainda no mesmo estudo, verificou-se que macrófagos expostos à cocaína *in vitro* não exibiram alterações no *burst* oxidativo. Já em um estudo conduzido por Baldwin et al. (1997b) foi avaliada a atividade de leucócitos polimorfonucleares circulantes de usuários de cocaína antes e depois da exposição à droga, e os resultados obtidos sugerem que a exposição a curto prazo à cocaína aumenta a efetividade da fagocitose e do *burst* oxidativo por tais células. Ainda, um outro estudo conduzido por Tripathi et al. (2008) com a exposição de camundongos de forma aguda e sub-crônica (8 dias de tratamento, duas vezes ao dia) revelou no grupo exposto de forma aguda ocorreu um aumento da efetividade da fagocitose e da produção de superóxido, em contraste, o grupo que passou pelo tratamento sub-crônico apresentou redução da efetividade da fagocitose assim como, redução da produção de superóxido. No entanto, nos estudos aqui realizados com o *crack*, nenhuma alteração estatisticamente significativa foi observada entre os animais do grupo CO e CK, e mais uma vez, salientamos que este é o primeiro estudo na literatura que emprega o *crack* por via pulmonar para avaliação de imunotoxicidade, podendo ser a via e a forma de exposição relevantes para a ocorrência de possíveis efeitos modulatórios

da cocaína sobre estas células do sistema imune inato. No entanto, em relação ao grupo PF, mais uma vez, foi possível observar alterações estatisticamente diferentes nos parâmetros avaliados, tanto de macrófagos quanto de neutrófilos circulantes quando comparados com aqueles animais do grupo CO.

Em um estudo com as folhas da coca, a ingestão crônica dos alcaloides presentes nas mesmas resultou em uma diminuição de 20 a 53% na resposta de DTH em ratos (WATSON et al., 1983). Uma diminuição da resposta do DTH também foi encontrada em um tratamento crônico com doses de 50 mg/kg em ratos, porém, os animais estavam previamente infectados com o vírus da leucemia murina de Friend (STAREC et al., 1991). Diminuição semelhante nas respostas do DTH também foi relatada por Stanulis et al. (1997a) com o tratamento de cocaína de forma crônica, quando a resposta reduzida de DTH foi acompanhada por uma mudança no perfil de citocinas a partir de um perfil Th1 (IL-2 e IFN- γ), para uma resposta Th2 (IL-4 e IL-10) como perfil dominante de citocinas (STANULIS et al., 1997a). Ainda, em um outro estudo, também conduzido por Stanulis e colaboradores (1997b), ocorreu um aumento da resposta de anticorpos frente a um antígeno T-dependente, este modelo de exposição foi realizado com administração aguda de cocaína via IP duas vezes ao dia e o tempo de administração ocorreu um ou 2 dias antes da sensibilização com antígeno; ainda, Havas et al. (1987), em camundongos tratados com a dose de 50 mg/kg de cocaína, observaram aumento da resposta humoral T-independente e nenhuma alteração da resposta T-dependente quando o antígeno foi outro que não o eritrócito de carneiro, antígeno clássico utilizado no PFC (*Plaque-Forming Cells*). No projeto original, o estudo da resposta imune humoral seria realizado por meio do clássico ensaio de imunotoxicidade, o PFC o qual avalia a resposta imune humoral do tipo T-dependente por meio da sensibilização e do desafio com eritrócitos de carneiro (JEONG et al., 1995). No entanto, outros estudos (HERZYK; HOLSAPPLE, 2007; KAWAI et al., 2013), visando também avaliar a resposta imune humoral do tipo T-dependente, vem utilizando para tal, a sensibilização e o desafio com a megaproteína KLH. A grande vantagem desta metodologia, é que é também possível se avaliar a reação de hipersensibilidade tardia nos mesmos animais (DESCOTES, 2006), diminuindo desta forma o uso de animais de laboratório, o que vem sendo muito desejado nos dias de hoje. Assim, decidimos instaurar em nosso laboratório tal metodologia, a qual foi realizada com

sucesso, diminuindo desta forma o número de animais a ser utilizado nos ensaios de imunotoxicidade

A exposição ao *crack* aqui realizado não promoveu alterações no DTH e nem nos níveis de anticorpos T-dependentes. Nota-se, que as alterações observadas no DTH do grupo PF podem ser atribuídas às alterações dos níveis de citocinas em tal grupo. Nos animais hígidos, é perceptível uma predominância do perfil Th1 (com maiores valores de IFN- γ e TNF- α), contudo, após a imunização destes animais, ocorreu mudança do perfil de citocinas Th1 para o Th2, com uma elevação dos níveis de IL-10, e conseqüente redução dos níveis de TNF- α .

Os valores referentes a citocina IL-4 após imunização do grupo CK se demonstrou elevado em comparação ao grupo CO, e ainda, quando comparado os níveis de IL-10 entre animais hígidos e imunizados do grupo CK nota-se uma elevação e tal citocina após a imunização. Porém, estes valores não se demonstraram impactantes nos outros estudos aqui realizados, como por exemplo o DTH.

Apesar de não ser a melhor metodologia para avaliação de imunotoxicidade, outros estudos *in vitro* que buscaram melhor entender a ação da cocaína sobre a produção de citocinas e sua ação sobre o sistema imune também apresentaram resultados conflitantes devido à concentração de cocaína empregada no co-cultivo, no tipo de célula (linfócitos ou monócitos circulantes ou peritoneais) e o mitógeno. De fato, em estudos de atividade proliferativa de linfócitos tratados com a cocaína *in vitro* e co-incubados com mitógenos por 24 horas revelaram diminuição nos níveis de IL-4 e IL-10, e aumento no TNF- α , IL-6 e IL-12 (WANG; HUANG; WATSON, 1994). Já o período de 72 horas de incubação com o mitógeno promoveu diminuição dos níveis de TNF- α (CHEN; WATSON, 1991), evidenciando que o tempo de incubação com o mitógeno e a cocaína também promove efeito diverso na produção de citocinas.

Tomando-se o tempo de exposição acima citado e a busca na literatura para dados e argumentos que pudessem justificar a não observância de efeitos imunotóxicos do *crack* aqui estudados, foi possível averiguar que alguns estudos evidenciaram que a exposição aguda e crônica de animais à cocaína, pode sim promover resultados díspares. Em estudo realizado por Di Francesco et al. (1994) em camundongos tratados por 7 dias consecutivos apresentaram redução no número absoluto de leucócitos circulantes e aumento no número de linfócitos NK. No

entanto, quando este estudo se prolongou para 30 dias de administração, todos os mesmos parâmetros estavam inalterados.

Outro relato sobre a influência da exposição aguda e crônica na reversibilidade dos efeitos imunomoduladores da cocaína está descrito em estudos conduzidos por Bayer et al. (1995, 1996). Foi observado que a administração aguda da cocaína promoveu supressão dose-dependente na atividade proliferativa de linfócitos circulantes e esplênicos e ao mesmo tempo, foi observado um aumento nos níveis séricos de corticosterona, como já outrora preconizado por outros autores (MOLDOW; FISCHMAN, 1987; RIVER; VALE, 1987); porém, em estudo mais prolongado, a imunossupressão da cocaína sobre a atividade proliferativa de linfócitos não foi mais observada, sendo sugerido pelos autores, um possível efeito de tolerância neuroendócrina, uma vez que uma única infusão de cocaína promove aumento nos níveis de ACTH e corticosterona, o que poderia estar envolvido na imunossupressão relatada, enquanto que a infusão constante de cocaína não promove o mesmo efeito (PILOTTE; SHARPE; DAX, 1990), sugerindo assim a ocorrência de uma adaptação ou tolerância do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) à cocaína, conforme outros autores também sugerem (ZHOU et al., 1996; MANTSCH et al., 2000).

Assim, é possível conjecturar que os possíveis efeitos imunotóxicos da cocaína relatados em diferentes estudos *in vivo* podem estar relacionados a um efeito indireto da droga sobre o eixo HPA, e devido à cronicidade da exposição e a “tolerância” sobre este eixo, nenhum efeito imunotóxico digno de nota foi observado em nossos estudos. Assim, decidimos avaliar os níveis séricos de corticosterona em nossos animais (Figura 24) e de fato, estes se mostraram sem significância estatística entre os grupos alocados no dispositivo de exposição e aqueles do grupo PF que apenas sofreu a restrição alimentar.

Porém, por que o grupo PF apresentou tantas alterações em parâmetros de toxicidade sistêmica e imunes? Afinal, a diminuição na ingestão de alimentos não causou qualquer efeito nos animais expostos ao *crack* e ainda, a quantidade reduzida de alimentos não foi tão expressiva a ponto de promover nestes animais qualquer alteração, inclusive o estresse da fome, o que é descartado pelos valores de corticosterona obtidos destes animais. O que mais seria diferente entre os grupos? A resposta poderia ser: o monóxido de carbono.

Como dito anteriormente, o crack para ser queimado foi colocado sobre uma camada de cinzas de cigarro para evitar sua perda e por isso, resolveu-se expor os animais do grupo controle apenas à queima das cinzas de cigarro e para melhor podermos conjecturar a respeito desta hipótese, fizemos a avaliação dos níveis de carboxihemoglobina dos animais expostos ou não dentro do dispositivo desenvolvido (Tabela 6) e de fato, tanto os níveis de carboxihemoglobina dos animais expostos ao crack quanto os do grupo controle se mostraram aumentados em relação ao grupo PF, no entanto chamamos a atenção que estes valores não são considerados tóxicos e emergenciais, uma vez que em humanos valores entre 4-6% são encontrados em fumantes, lembrando que o índice biológico máximo permitido é de 3,5% para não fumantes (NR-7) (BRASIL, 1994).

Alguns estudos têm revelado que o monóxido de carbono possui efeito imunomodulador sobre várias linhagens celulares, como células dendríticas, células T e também ação sobre receptores do tipo TLR de células do sistema imune inato (RÉMY et al., 2009; MACKERN-OBERTI et al., 2013; RIQUELME; BUENO; KALERGIS, 2015); no entanto, este monóxido de carbono estudado por estes pesquisadores é aquele produzido pela enzima hemeoxigenase-1 (HO-1), a qual catalisa a degradação do grupo heme produzindo biliverdina, monóxido de carbono e Fe^{+2} . Ainda, outros estudos também têm evidenciado que baixas concentrações de monóxido de carbono inalado possuem efeito protetor sobre o sistema nervoso central e no transplante de órgãos, sendo inclusive avaliado em estudos clínicos de fase I (MAHAN et al., 2012; AMANO; CAMARA, 2013).

Isto posto, poderia ser conjecturado que na verdade os efeitos observados não seriam sobre os animais do grupo PF, mas sim dos expostos ao monóxido de carbono no modelo de exposição, lembrando que esta exposição a este gás é aquela que ocorre nos usuários, e que talvez fosse o diferencial de nossos resultados com aqueles anteriormente relatados por pesquisadores que estudaram os efeitos do cloridrato de cocaína sobre o sistema imune, sendo sem sombras de dúvidas um resultado totalmente inusitado e que com toda certeza será mote para futuros estudos com nosso modelo de exposição.

7 CONCLUSÕES

- As amostras de *crack* utilizadas durante o período experimental continham um teor médio de cocaína de 66,34%;
- Os animais que foram expostos a fumaça resultante da queima de 250 mg de *crack* durante 10 minutos, apresentaram uma concentração plasmática de 174,1 \pm 30,05 ng/mL de cocaína;
- A exposição à fumaça resultante da queima de *crack* por 10 minutos, duas vezes ao dia, durante 28 dias, não resultou em alterações que remetam à toxicidade em parâmetros clínicos, bioquímicos, hematológicos e histopatológicos de ratos que foram expostos à droga;
- A exposição à fumaça resultante da queima de *crack* por 10 minutos, duas vezes ao dia, durante 28 dias, não promoveu alterações com significado clínico nas avaliações do peso relativo, celularidade, morfometria de órgãos linfoides e fenotipagem de linfócitos esplênicos de ratos expostos à droga;
- A exposição à fumaça resultante da queima de *crack* por 10 minutos, duas vezes ao dia, durante 28 dias, não promoveu efeitos imunomodulatórios nas avaliações do *burst* oxidativo e fagocitose de macrófagos peritoneais e de neutrófilos circulantes, assim como nas avaliações da produção de anticorpos T-dependentes e reação de hipersensibilidade do tipo IV (*Delayed-Type Hypersensitivity* – DTH) de ratos expostos à droga;
- Os valores de citocinas dos ratos expostos à fumaça resultante da queima do *crack*, foram inconclusivos no que diz respeito a um possível efeito de imunomodulação;

- Foi observada uma maior atividade locomotora assim como um comportamento “ansiolítico” de caráter transitório nas avaliações comportamentais em campo aberto de ratos expostos à fumaça resultante da queima do *crack*;
- A avaliação da cognição no teste de alternância espontânea no labirinto em T não evidenciou alterações cognitivas nos ratos que foram expostos ao *crack*;
- Foram observadas alterações na avaliação do comportamento de aversão ou preferência ao odor do *crack*, evidenciando uma alteração quanto a preferência ao odor característico do *crack* dos animais que haviam sido expostos à droga;
- Com os dados aqui obtidos não foi possível verificar que a exposição dos animais ao *crack* promove efeitos imunotóxicos, entretanto, este trabalho evidenciou um possível efeito imunomodulador do monóxido de carbono que deverá ser mote para pesquisas futuras; por outro lado, a exposição ao *crack* claramente evidenciou comportamentos clássicos da exposição à cocaína, evidenciando que o modelo aqui empregado será de grande utilidade para o estudo de outros parâmetros que envolvam drogas de abuso, como possíveis estratégias terapêuticas e melhor entendimento da toxicocinética de drogas utilizadas pela via pulmonar.

REFERÊNCIAS

- ALTMAN, A. J.; ALBERT, D. M.; FOURNIER, G. A. Cocaine's use in ophthalmology: our 100 year heritage. **Survey Ophthalmol**, v. 29, p. 300-307, 1985.
- AMANO, M. T.; CAMARA, N. O. The immunomodulatory role of carbon monoxide during transplantation. **Medical Gas Research**, v. 3, n. 1, p. 1-15, 2013.
- AREAL, L. B.; RODRIGUES, L. C.; ANDRICH, F.; MORAES, L. S.; CICILINI, M. A.; MENDONÇA, J. B.; PELIÇÃO, F. S., NAKAMURA-PALACIOS, E. M.; MARTINS-SILVA, C.; PIRES, R. G. Behavioural, biochemical and molecular changes induced by chronic crack-cocaine inhalation in mice: The role of dopaminergic and endocannabinoid systems in the prefrontal cortex. **Behavioural Brain Research**, v. 290, p. 8–16, 2015.
- AVILA, A. H.; MORGAN, C. A; BAYER, B. M. Stress-Induced Suppression of the Immune System after Withdrawal from Chronic Cocaine. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 305, p. 290-297, 2003.
- BAGASRA, O.; POMERANTZ, R. J. Human immunodeficiency virus type 1 replication in peripheral blood mononuclear cells in the presence of cocaine. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 168, p. 1157-1164, 1993.
- BAHLS, F. C.; BAHLS, S. C. Cocaína: origens, passado e presente. **Interação em psicologia**, v. 6, n. 2, p. 177-181, 2002.
- BALDWIN, G. C.; TASHKIN, D. P.; BUCKLEY, D. M.; PARK A. N.; DUBINETT S. M., ROTH, M.D. Marijuana and cocaine impair alveolar macrophage function and cytokine production. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 156, p. 1606-1613, 1997a.
- BALDWIN, G. G.; BUCKLEY, D. M.; ROTH, D. M; ERIC, C.; KLEERUP, E.C.; TASHKIN, D.P. Acute activation of circulating polymorphonuclear neutrophils following in vivo administration of cocaine: a potential etiology for pulmonary injury. **Chest**, v. 111, n. 3, p. 698-705, 1997b.
- BALOPOLE, D. C.; HANSULT, C. D.; DORPH, D. Effect of cocaine on food intake in rats. **Psychopharmacology**, v. 64, n. 1, p. 121-122, 1979.
- BANE, A. J.; MCCOY, J. G.; STUMP, B. S.; AVERY, D. D. The effects of cocaine on dietary self-selection in female rats. **Physiology & Behaviour**, v. 54, n. 3, p. 509-513, 1993.
- BASELT, R. C.; CHANG, J. Y.; YOSHIKAWA, D. M. On the dermal absorption of cocaine. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 14, n. 6, p. 383-384, 1990.
- BASTOS, F. I. **Taxas de infecção de HIV e sífilis e inventário de conhecimento, atitudes e práticas de risco relacionadas às infecções sexualmente**

transmissíveis entre usuários de drogas em 10 municípios brasileiros. Relatório técnico entregue ao Departamento de DST-AIDS e Hepatites Virais, 2009.

BAUER, C. R.; SHANKAREN, S.; BADA, H. S.; LESTER, B.; WRIGHT, L. L.; KRAUSE-STEINRAUF, H.; SMERIGLIO, V. L.; FINNEGAN, L. P.; MAZA, P. L.; VERTER, J. Acute neonatal effects of cocaine exposure during pregnancy. **Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine**, v. 159, p. 824-834, 2005.

BAYER, B. M.; HERNANDEZ, M. C.; DING, X. Z. Tolerance and crosstolerance to the suppressive effects of cocaine and morphine on lymphocyte proliferation. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v. 53, n. 1, p. 227-234, 1996.

BAYER, B. M.; MULRONEY, S. E.; HERNANDEZ, M. C.; DING, X. Z. Acute infusions of cocaine result in time- and dose-dependent effects on lymphocyte responses and corticosterone secretion in rats. **Immunopharmacology**, v. 29, p. 19-28, 1995.

BEDFORD, J. A.; BORNE, R. F.; WILSON, M. C. Comparative behavioral profile of cocaine and norcocaine in rats and monkeys. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 13, p. 69-75, 1980.

BENOWITZ, N.L. Clinical pharmacology and toxicology of cocaine. **Pharmacology & Toxicology**, v. 72, p 3-12, 1993.

BEN-SHAHAR, O.; OBARA, I.; ARY, A. W.; MA, N.; MANGIARDI, M. A.; MEDINA, R. L.; SZUMLINSKI, K. K. Extended daily access to cocaine results in distinct alterations in Homer 1b/c and NMDA receptor subunit expression within the medial prefrontal cortex. **Synapse**, v. 63, n. 7, p. 598-609, 2009.

BERTONI, N.; BASTOS, F. N. **Quem são os usuários de crack e/ou similares do Brasil?** Perfil sociodemográfico e comportamental destes usuários: resultados de uma pesquisa de abrangência nacional. Rio de Janeiro: Editora ICICT/FIOCRUZ, 2014. v. 4, 224p.

BIELEMAN, B.; DIAZ A.; MERLO, G.; KAPLAN, C. D. **Lines across Europe:** nature and extent of cocaine use in Barcelona, Rotterdam and Turim. Amsterdam: Swets & Zeitlinger; 1993. 232 p.

BLUNDELL, J. E.; LATHAM, C. J. **Pharmacological manipulation of feeding:** possible influences of serotonin and dopamine on feed intake. In: GARATTINI S.; SAMANIN, R. *Central Mechanisms of Anorexic Drugs*, New York: Raven Press, 1978. p. 3-109.

BOGHDADI, M. S.; HENNING, R. J. Cocaine: pathophysiology and clinical toxicology. **Heart and lung (The Journal of Acute and Critical Care)**, v. 26, n. 6, p. 466-483, 1997.

BONI, J. B.; BARR; W. H.; MARTIN, B. R. Cocaine inhalation in the rat: pharmacokinetics and cardiovascular response. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 257, n. 1, 1991.

BORDNICK, P. S.; ELKINS, R. L.; ORR, T. E.; WALTERS, P.; THYER, B. A. Evaluating the relative effectiveness of three aversion therapies designed to reduce craving among cocaine abusers. **Behavioral Interventions**, v. 19, p. 1–24, 2004.

BORTOLOTTI, F.; GOTTARDO, J. P.; TAGLIARO, F. Toxicokinetics of cocaine and metabolites: the forensic toxicological approach. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 56-58, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico - HIV/Aids**, v. 1, n. 1, 2012.

BRASIL. NR 7 - PROGRAMA DE CONTROLE MÉDICO DE SAÚDE OCUPACIONAL.1994. Disponível em: (<http://www010.dataprev.gov.br/sislex/paginas/05/mtb/7.htm>). Acesso em: julho de 2015.

BRIAND, L. A.; FLAGEL, S. B.; FUSTER, M. J. G.; WATSON, S. J.; AKIL, H.; SARTER, M.; ROBINSON, T. E. Persistent alterations in cognitive function and prefrontal dopamine D2 receptors following extended, but not limited, access to self-administered cocaine. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 12, p. 2969-2980, 2008.

BUCH, S.; YAO, H.; GUO, M.; MORI, T.; SU, T. P.; WANG, J. Cocaine and hiv-1 interplay: molecular mechanisms of action and addiction. **The Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 6, p. 503–515, 2011.

BUCHER, R. **Drogas e drogadição no Brasil**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1992. 323 p.

CANNON, C. M.; BSEIKRI, M.R. Is dopamine required for natural reward? **Physiology & Behavior**, v. 81, n. 5, p. 741-748, 2004.

CARELLI, R. M. Nucleus accumbens cell firing during goal-directed behaviors for cocaine vs. 'natural' reinforcement. **Physiology & Behavior**, v. 76, n. 3, p. 379-387, 2002.

CARLINI, E. A.; NOTO, A. R.; GALDURÓZ, J. C. F.; NAPPO, S. A. Visão histórica sobre o uso de drogas: passado e presente. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, Rio de Janeiro e São Paulo, v. 45, n. 4, p. 227-236, 1996.

CARLINI-COTRIM, B. Movimentos e discursos contra as drogas: o caso da sociedade norte-americana. **Revista Brasileira de Psiquiatria da Associação Psiquiátrica de La America Latina**, v. 17, n. 3, p. 93-101, 1995.

CARVALHO, V. M. **Redistribuição da cocaína e sua influência na neuroquímica post mortem**. 2011, 181 p. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

CHANDRA, R. K. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, n. 5, p. 1087-1101, 1991.

CHASIN, A. A. M. **Cocaína e cocaetileno**: influência do etanol nas concentrações de cocaína em sangue humano post mortem. 1996, 141 p. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

CHAVES, T. V.; SANCHEZ, Z. M.; RIBEIRO, L. A.; NAPPO, S. A. Fissura por crack: comportamentos e estratégias de controle de usuários e exusuários. **Revista de Saúde Pública**, v. 45, n. 6, p. 1168-1175, 2011.

CHEN, G. J.; WATSON, R. R. Modulation of tumor necrosis factor and gamma interferon production by cocaine and morphine in aging mice infected with LP-BM5, a murine retrovirus. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 50, n. 4, p. 349-355, 1991.

CHETTIAR, J.; SHANNON, K.; WOOD, E.; ZHANG, R.; KERR, T. Survival sex work involvement among street-involved youth who use drugs in a Canadian setting. **Journal of Public Health**, v. 32, p. 322-327, 2010.

CHILDRESS, A. R.; MCLELLAN, A. T.; EHRMAN, R.; O'BRIEN, C. P. Classically conditioned responses in opioid and cocaine dependence: a role in relapse? **NIDA Research Monograph**, v.84, p.25-43, 1988.

CHILDRESS, A. R.; HOLE, A. V.; EHRMAN, R. N.; ROBBINS, S. J.; MCLELLAN, A. T.; O'BRIEN, C. P. Cue reactivity and cue reactivity interventions in drug dependence. **NIDA Research Monograph**, v.137, p.73-95, 1993.

CONE, E.J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cocaine. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 19, p. 459-478, 1995.

CONKLIN, C. A.; TIFFANY, S. T. Applying extinction research and theory to cue-exposure addiction treatments. **Addiction Journal**, v. 97, p. 155-167, 2002.

COOK, J. A.; BURKE-MILLER, J. K.; COHEN, M. H.; COOK, R. L.; VLAHOV D.; WILSON, T. E.; GOLUB, E. T.; SCHWARTZ, R. M.; HOWARD, A. A.; PONATH, C.; PLANKEY, M. W.; LEVINE, A. M.; GREY, D. D. Crack cocaine, disease progression, and mortality in a multi-center cohort of HIV-1 positive women. **AIDS**, (London, England), v. 22, p. 1355-1363, 2008.

COOPER, S. J.; VAN DER HOEK, G. A. Cocaine: a microstructural analysis of its effects on feeding and associated behaviour in the rat. **Brain Research**, v. 608, n. 1, p. 45-51, 1993.

COSTA, J. L.; MALDANER, A. O.; ZACCA, J. J.; VIEIRA, M. L.; BOTELHO, E. D.; PEREIRA, L. J. R.; SALLES, M. T.; GROBÉRIO, T. S.; BRAGA, J. W. Análise da cocaína apreendida na cidade de São Paulo em 2011/2012 - Perfil químico do crack e outras formas de apresentação. In: PROCEEDINGS OF SBQ 2011: BRAZILIAN CHEMISTRY SOCIETY ANNUAL MEETING; Águas de Lindóia, Brasil. 2013.

COSTA, RONY ANDERSON REZENDE. **Determinação do grau de pureza de amostra de crack apreendidas no Estado da Paraíba por RMNq-1H e CLAE-DAD.** 2012, 120 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

CUNHA, P. J.; BECHARA, A.; DE ANDRADE, A. G.; NICASTRI, S. Decision-making deficits linked to real-life social dysfunction in crack cocaine-dependent individuals. **The American Journal on Addictions**, v. 20, p. 78-86, 2011.

CURTIS, B. J.; ZAHS, A.; KOVACS, E. J. Epigenetic targets for reversing immune defects caused by alcohol exposure. **Alcohol Research: current reviews**, v. 35 n. 1, p. 97-113, 2013.

CUTLER, A. R.; WILKERSON, A. E.; GINGRAS, J. L.; LEVIN, E. D. Prenatal cocaine and/or nicotine exposure in rats: preliminary findings on long-term cognitive outcome and genital development at birth. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 18, n. 6, p. 635-643, 1996.

DAGGET, R. B.; HAGHIGHI, P.; TERKELTAUB, R. A. Nasal cocaine abuse causing an aggressive midline intranasal and pharyngeal destructive process mimicking midline reticulosis and limited Wegener's granulomatosis. **The Journal of Rheumatology**, v. 7, p. 838-840, 1990.

DAS, G.; LADDU, A. Cocaine: friend or foe? **International Journal of Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 3, p. 449-455, 1993.

DE CASTRO, C. M. M. B.; CASTRO R. M.; MEDEIROS, A. F.; SANTOS A. Q.; SILVA W. T. F.; FILHO, J. L. L. F. Effect of stress on the production of O₂ in alveolar macrophages. **Journal of Neuroimmunology**, v. 108, n. 1-2, p. 68-72, 2000.

DE OLIVEIRA, L. G.; BARROSO, L. P.; SILVEIRA, C. M.; SANCHEZ, Z. V. D. M.; DE CARVALHO PONCE, J.; VAZ, L. J.; NAPPO, S. A. Neuropsychological assessment of current and past crack cocaine users. **Substance Use & Misuse**, v. 44, p. 1941-1957, 2009.

DEACON, R. M. J.; RAWLINS, J. N. P. Hippocampal lesions, species-typical behaviours and anxiety in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 156, p. 241-249, 2005.

DEACON, R. M. J.; RAWLINS, J. N. P. T-maze alternation in the rodent. **Nature Protocols**, v. 1, p. 7-12, 2006.

DEBECK, K.; KERR, T.; LI, K.; FISCHER, B.; BUXTON, J.; MONTANER, J.; WOOD, E. Smoking of crack cocaine as a risk factor for HIV infection among people who use injection drugs. **Canadian Medical Association Journal**, v. 181, p. 585-589, 2009.

DEMBER, W.N.; RICHMAN, C.L. **Spontaneous Alternation Behavior.** New York: Springer, 1989. v. 1, p. 86.

DESCOTES, J. Methods of evaluating immunotoxicity. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 2, n. 2, p. 249-259, 2006.

DHUNA, A.; PASCUAL-LEONE, A.; LANGENDORF, F.; ANDERSON, D. C. Epileptogenic properties of cocaine in humans. **Neurotoxicology**, v. 12, p. 621-626, 1991.

DI FRANCESCO, P.; RALCHETTI, R.; GAZIANO, R.; LANZILLI, G.; BELOGI, L.; RAVAGNAN, G.; GARACI, E. Differential effects of short-term or prolonged cocaine exposure on peripheral blood cells in mice. **Life Sciences**, v. 54, p. 2015–2020, 1994.

DICKSON-GÓMEZ, J.; BODNAR, G.; GUEVERRERA, A.; RODRIGUEZ, K.; GABORIT, M. Childhood sexual abuse and HIV risk among crack-using commercial sex workers in San Salvador, El Salvador: A qualitative analysis. **Medical Anthropology Quarterly**, v. 20, p. 545-574, 2006.

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

EDWARDS, D. J.; BOWLES, S. K. Protein binding of cocaine in human serum. **Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 7, p. 440-442, 1988.

EVANS, S. M.; CONE, E. J.; HENNINGFIELD, J. E. Arterial and venous cocaine plasma concentrations in humans: relationship to route of administration, cardiovascular effects and subjective effects. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 279, n. 3, p. 1345–1356, 1996.

GAEDCKE, F. Ueber das Erythroxylin, dargestellt aus den Blättern des in Südamerika cultivirten Strauches Erythroxyton Coca Lam. **Archiv der Pharmazie**, v. 132, n. 2, p. 141–150, 1855.

FAHEY, J. V.; GUYRE, P. M.; MUNCK, A. A. Mechanisms of anti-inflammatory actions of glucocorticoids. **Inflammation Research**, v. 2, p. 21-27, 1981.

FEITOSA-FILHO, G. S.; LOPES, R. D.; POPPI, N. T.; GUIMARÃES, H. P. Emergências hipertensivas. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 20, n. 3, p. 305-312, 2008.

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

FISCHER, B.; POWIS, J.; CRUZ, M. F.; RUDZINSKI, K.; REHM, J. Hepatitis C virus transmission among oral crack users: Viral detection on crack paraphernalia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, p. 812-814, 2008.

FLEMING, J. A.; BYCK, R.; BARASH, P. G. Pharmacology and therapeutic applications of cocaine. **Anesthesiology**, v. 73, p. 518-523, 1990.

- FUKUSHIMA, A. R. **Perfil da cocaína comercializada com crack na região Metropolitana de São Paulo em período de vinte meses (2008-2009)**. 2010, 91p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- GARCIA-MIJARES, M.; SILVA, M. T. A. Dependência de drogas. **Psicologia USP**, v. 17, n. 4, p. 213-240, 2006.
- GAWIN, F. H.; KHALSA, M. E.; ELLINWOOD, E. **Stimulants**. In: Textbook of substance abuse treatment. Ed. American Psychiatric Press Inc; 1994. p. 111-139.
- GOLAN, D. E.; TASHJIAN, A. H.; ARMSTRONG, E.J.; ARMSTRONG, A. P. **Principles of pharmacology: The pathophysiologic basis of drug therapy**. 3ª Ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012. 976 p.
- GOLDSTEIN, R. A.; DESLAURIERS, C.; BURDA, A. M. Cocaine: History, Social Implications, and Toxicity – A Review. **Disease a Month**, v. 55, p. 6-38, 2009.
- GRINSPOON, L.; BAKALAR, J. B. Coca and cocaine as medicines. An historical review. **Journal Ethnopharmacology**, v. 3, p. 149-159, 1981.
- HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 117, n. 1, p. 53-58, 1989.
- HAVAS, H. F.; DELLARIA, M.; SCHIFFMAN, G.; GELLER, E. B.; ADLER, M. W. Effect of cocaine on the immune response and host resistance in BALB/c mice. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 83, p. 377-383, 1987.
- HAYDON, E.; FISCHER, B. Crack use as a public health problem in Canada: Call for an evaluation of 'safer crack use kits'. **Canadian Journal of Public Health**, v. 96, p. 185-188, 2005.
- HE, F.; LIDOW, I. A.; LIDOW, M. S. Inhalational model of cocaine exposure in mice: Neuroteratological effects. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 28, n. 2, p. 181-197, 2006.
- HERCULIANI, P. P.; PIRES-NETO, R. C.; BUENO, H. M.; ZORZETTO, J. C.; SILVA, L. C.; SANTOS, A. B.; GARCIA, R. C.; YONAMINE, M.; DETREGIACHI, C. R.; SALDIVA, P. H.; MAUAD, T. Effects of chronic exposure to crack cocaine on the respiratory tract of mice. **Toxicologic Pathology**, v. 37, n. 3, p. 324-332, 2009.
- HERNÁNDEZ, L.; SÁNCHEZ, M. A. M. **Cocaína (I). Farmacologia. Intoxicação aguda**. In: LORENZO, P.; LADERO, J. M.; LEZA, J. C.; LIZASOAIN, I. Drogodependencias - Farmacologia, Patología, Psicopatología. Madrid, Espanha: Editorial Medica Panamericana; 1999. p. 113-34.
- HERZYK, D. J.; HOLSAPPLE, M. Immunotoxicity evaluation by immune function tests: focus on the T-dependent antibody response (TDAR). **Journal of Immunotoxicology**, v. 4, n. 2, p. 143-147, 2007.

HOFF, A. L.; RIORDAN, H.; MORRIS, L.; CESTARO, V.; WIENKE, M.; ALPERT, R.; WANG, G. J.; VOLKOW, N. Effects of crack cocaine on neurocognitive function. **Journal of Psychiatric Research**, v. 60, p. 167-176, 1996.

HOFFMAN, R. S. **Cocaine**. In: FLOMENBAUM, N.E.; GOLDFRANK, L.R.; HOFFMAN, R.S.; Goldfrank's Toxicologic Emergencies. New York, NY: McGraw Hill, 2006. v. 8, p. 1133-1146.

JEFFCOAT, A.; PEREZ-REYES, M.; HILL, J. Cocaine disposition in humans after intravenous injection, nasal insufflation (snorting), or smoking. **Therapeutics**, v. 17, n. 2, p. 153-159, 1989.

JEONG, T. C.; JORDAN, S. D.; MATULKA, R. A.; STANULIS, E. D.; KAMINSKI, E. J.; HOLSAPPLE, M. P. Role of metabolism by esterase and cytochrome P-450 in cocaine-induced suppression of the antibody response. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 272, n. 1, p. 407-416, 1995.

KALIVAS, P. W.; VOLKOW, N. D. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 162, n. 8, p. 1403-1413, 2005.

KALIVAS, P. W.; O'BRIEN, C. Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, p. 166-180, 2008.

KARCH, S. B. Cocaine: history, use, abuse. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 92, n. 8, p. 393-397, 1999.

KAWAI, R.; ITO, S.; AIDA, T.; HATTORI, H.; KIMURA, T.; FURUKAWA, T.; MORI, K.; SANBUISHO, A.; KAWADA, T. Evaluation of primary and secondary responses to a T-cell-dependent antigen, keyhole limpet hemocyanin, in rats. **Journal of Immunotoxicology**, v. 10, n. 1, p. 40-48, 2013.

KLEIN, T. W.; MATSUI, K.; NEWTON, C. A.; YOUNG, J.; WIDEN, R. E.; FRIEDMAN, H. Cocaine suppresses proliferation of phytohemagglutinin-activated human peripheral blood T-cells. **International Immunopharmacology**, v. 15, p. 77- 86, 1993.

LEE, S.; CHOI, I.; SONG, K. Hematologic changes in acute carbon monoxide intoxication. **Yonsei Medical Journal**, v. 35, n. 3, 1994.

LEIKIN, J.; PALOUCEK, F. **Poisoning and Toxicology Handbook**. New York, NY: CRC Press, 2008. p. 213.

LEITE, M. C. Conversando sobre cocaína e crack. **Publicação oficial da Secretaria Nacional Anti-Drogas (SENAD)**, v. 1, p. 06-19, 1999.

LIU, L. N.; ZHU, F. P.; SONG, M. Y.; KANG, X. J.; SHANG, S. J.; ZHANG, X. Y.; XU, H. D.; TENG, S. S.; LIU, B.; KUO, S. T.; LIU, W.; LI, M. L.; ZHOU, L.; JIAO, R. Y.; WANG, C. H.; WANG, S. R.; YANG, H.; ZHANG, B.; ZHOU, Z.; XU, Z. Q. Effect of cocaine on ion channels and glutamatergic EPSCs in noradrenergic locus coeruleus neurons. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 53, n. 3, p. 345-351, 2014.

LOPEZ, M. C.; HUANG, D. S.; WATZL, B.; CHEN, G. J., WATSON, R. R. Splenocyte subsets in normal and protein malnourished mice after long-term exposure to cocaine or morphine. **Life Sciences**, v. 49, n. 17, p. 1253-1262, 1991.

MACKERN-OBERTI, J. P.; LLANOS, L.; CARRENO, L. J.; RIQUELME, S. A.; JACOBELLI, S. H.; ANEGON, I.; KALERGIS, A. N. Carbon monoxide exposure improves immune function in lupus-prone mice. **Immunology**, v. 140, n. 1, p. 123-132, 2013.

MAHAN, V. L.; ZURAKOWSKI, D.; OTTERBEIN, L. E.; PIGULA, F. A. Inhaled Carbon Monoxide Provides Cerebral Cytoprotection in Pigs. **Plos One**, v. 7, n. 8, 2012.

MALENKA, R. C.; NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E. **Molecular Neuropharmacology: a foundation for clinical neuroscience**. Ed 2. New York: McGraw-Hill Medical, 2009. p.147-148, 367p.

MANJU, M.; CHMIELOWIEC, S.; ANDRES, R. L.; TROYER, L. T.; PARISI, V. M. Cocaine alters placental production of thromboxane and prostacyclin. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 171, p. 965-969, 1994.

MANTSCH, J. R.; SCHLUSSMAN, S. D.; HO, A.; KREEK, M. J. Effects of Cocaine Self-Administration on Plasma Corticosterone and Prolactin in Rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 294, p. 239-247, 2000.

MASTEN, S. A.; MILLARD, W.J.; KARLIX, J.L.; SHIVERICK, K.T. Evaluation of immune parameters and lymphocyte production of prolactin-immunoreactive proteins after chronic administration of cocaine to pregnant rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.277, n.2, p.1090-1096, 1996.

MCCRACKEN, C. B; GRACE, A. A. Persistent Cocaine-Induced Reversal Learning Deficits Are Associated with Altered Limbic Cortico-Striatal Local Field Potential Synchronization Clinton B. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 44, p. 17469 – 17482, 2013.

MOLDOW, R. L.; FISCHMAN, A. J. Cocaine induced secretion of ACTH, beta-endorphin, and corticosterone. **Peptides**, v. 8, p. 819–822, 1987.

MOREAU, R. L. M.; OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia: fármacos e drogas que causam dependência**. São Paulo: Atheneu Editora, 2008. v. 4, n. 3, 325 p.

- MORIARTY, K. M.; ALAGNA, S. W.; LAKE, C. R. Psychopharmacology. An historical perspective. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 7, n. 3, p. 411-433, 1984.
- MÜLLER, A.; CAREY, B.; WILKISZ, A.; SCHWENZNER, A.; JOCHAM, C.; HUSTON, A. Acute anxiolytic effects of cocaine: The role of test latency and activity phase. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 89, p. 218–226, 2008.
- NAKAHARA, Y.; ISHIGAMI, A. Inhalation efficiency of free-base cocaine by pyrolysis of 'crack' and cocaine hydrochloride. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 15, p. 105–109, 1991.
- NAPPO, S.A. *Banqueiros e Craqueiros. Um estudo etnográfico sobre o consumo de cocaína na cidade de São Paulo*. São Paulo, 1996, 304p. Tese de Doutorado – Universidade Federal de São Paulo, 1996.
- NAPPO, S. A.; GALDURÓZ, J. C.; NOTO, A. R. Crack use in São Paulo. **Substance Use & Misuse**, v. 31, p. 565-579, 1996.
- NAPPO, S. A.; GALDURÓZ, J. C.; NOTO, A. R. Uso do "crack" em São Paulo: fenômeno emergente? **Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria and Asociación Psiquiátrica de América Latina**, v. 16, p. 75-83, 1994.
- NARANJO, P. Social function of coca in pre-Columbian America. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 3, p. 161-172, 1981.
- O'BRIEN, C. P., CHILDRESS, A. R.; MCLELLAN, A. T.; WOODY, G. E.; MAANY, I. Pharmacological and behavioral treatments of cocaine dependence: controlled studies. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 49, p. 17–22, 1988.
- O'DONNELL, A. E.; MAPPIN, F. G.; SEBO, T.; TAZELAAR, H. Interstitial pneumonitis associated with "crack" cocaine abuse. **Chest**, v. 100, p. 155-157, 1991.
- OISHI, K.; NISHIO, N.; KONISHI, K.; SHIMOKAWA, M.; OKUDA, T.; KURIYAMA, T.; MACHIDA, K. Differential effects of physical and psychological stressors on immune functions of rats. **Stress**, v. 6, n. 1, p. 33-40, 2003.
- OLIVEIRA, L. G.; NAPPO, S. A. Crack na cidade de São Paulo: acessibilidade, estratégias de mercado e formas de uso. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 35, p. 212-218, 2008.
- OLIVEIRA, S. L.; DA SILVA M. S.; TAVARES J. F.; SENA-FILHO J. G.; LUCENA H. F.; ROMERO M. A.; BARBOSA-FILHO J. M. Tropanealkaloids from erythroxyllum genus: distribution and compilation of ¹³C-NMR spectral data. **Chemistry and Biodiversity**, v. 7, p. 302-326, 2010.
- OLTON, D. S.; BECKER, J. T.; HANDELMANN, G. E. Hippocampus, space and memory. **Journal of Behavioral and Brain Science**, v. 2, p. 313-365, 1979.
- PANKEVICH, D. E.; TEEGARDEN, S. L.; ANDREW, D.; HEDIN, A. D.; JENSEN, C. L.; BALE, T.L. Caloric restriction experience reprograms stress and orexigenic

pathways and promotes binge-eating. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 48, p. 16399-16407, 2010.

PARLAMAN, J. P.; THOMPSON, B. L.; LEVITT, P.; STANWOOD, G. D. Pharmacokinetic profile of cocaine following intravenous administration in the female rabbit. **European Journal of Pharmacology**, v. 562, n. 1-3, p. 124-129, 2007.

PATTERSON, T. C. Central Peru: its population and economy. **Archeology**, v. 24, p. 316-321, 1971.

PECK, J. A.; RANALDI, R. Drug abstinence: exploring animal models and behavioral treatment strategies. **Psychopharmacology**, v. 231, p. 2045–2058, 2014.

PERLMAN, D. C.; HENMAN, A. R.; KOCHEMS, L.; PAONE, D.; SALOMON, N.; DES JARLAIS, D. C. Doing a shotgun: A drug use practice and its relationship to sexual behaviors and infection risk. **Social Science and Medicine**, v. 48, p. 1441-1448, 1999.

PILOTTE, N. S.; SHARPE, L. G.; DAX, E. M. Multiple, but not acute, infusions of cocaine alter the release of prolactin in male rats. **Brain Research**, v. 512, p. 107-112, 1990.

PIRES, A.; PIERI, P.; HAGE, M.; SANTOS, A. B.; MEDEIROS, M. C.; GARCIA, R. C.; YONAMINE, M.; HALLAK, J.; SALDIVA, P. H.; ZORZETTO, J. C.; BUENO, H. M. Repeated inhalation of crack-cocaine affects spermatogenesis in young and adult mice. **Inhalation Toxicology**, v. 24, n. 7, p. 439-346, 2012.

PLOWMAN, T.; RIVIER L. Cocaine and Cinnamoylcocaine content of thirty-one species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). **Annals of Botany**, v. 51, p. 641–659, 1983.

POMARA, C.; CASSANO, T.; D'ERRICO, S.; BELLO, S.; ROMANO, A. D.; RIEZZO, I.; SERVIDDIO, G. Data available on the extent of cocaine use and dependence: biochemistry, pharmacologic effects and global burden of disease of cocaine abusers. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 33, p. 5647–5657, 2012.

POST, R. M.; CONTEL, N. R. **Human and animal studies of cocaine: implications for development of behavioral pathology**. New York: Raven, 1983. p. 169-203.

PRAKASH, A.; DAS, G. Cocaine and the nervous system. **International Journal of Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 31, p. 575-581, 1993.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

REISEL, D.; BANNERMAN, D. M.; SCHMITT, W. B.; DEACON, R. M.; FLINT, J.; BORCHARDT, T.; SEEBURG, P. H.; RAWLINS, J. N. Spatial memory dissociations in mice lacking GluR1. **Nature Neuroscience**, v. 5, p. 868–873, 2002.

RÉMY, S.; BLANCOU, P.; TESSON, L.; TARDIF, V.; BRION, R.; ROYER, P. J.; MOTTERLINI, R.; FORESTI, R.; PAINCHAUT, M.; POGU, S.; GREGOIRE, M.; BACH, J.M.; ANEGON, J.; CHAUVEAU, C. Carbon Monoxide Inhibits TLR-Induced Dendritic Cell Immunogenicity. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 4, p. 1877-1884, 2009.

RIQUELME, S. A.; BUENO, S. M.; KALERGIS, A. M. Carbon monoxide down-modulates Toll-like receptor 4/MD2 expression on innate immune cells and reduces endotoxic shock susceptibility. **Immunology**, v. 144, n. 2, p. 321-332, 2015.

RIVER, C.; VALE, W. Cocaine stimulates adrenocorticotropin (ACTH) secretion through a corticotropin-releasing factor (CRF)-mediated mechanism. **Brain Research**, v. 422, n. 2, p. 403–406, 1987.

ROBERTSON, S. A.; MOON, P.F. Anesthetic management for cesarean section in bitches. **Veterinary Medicine**, v. 98, p. 675-696, 2003.

ROSE, J. E.; LEVIN, E. D. Inter-relationships between conditioned and primary reinforcement in the maintenance of cigarette smoking. **British Journal of Addiction**, v. 86, p. 605–609, 1991.

ROTH, M. D.; TASHKIN, D. P.; CHOI, R.; JAMIESON, B. D.; ZACK, J. A.; BALDWIN, G. C. Cocaine enhances human immunodeficiency virus replication in a model of severe combined immunodeficient mice implanted with human peripheral blood leukocytes. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, p. 701–705, 2002.

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

SCHRAMM, W.; CRAIG, P. A.; SMITH, R. H.; BERGER, G. E. Cocaine and Benzoyllecgonine in Saliva, Serum, and Urine. **Clinical Chemistry**, v. 39, n. 3, p. 481-487, 1993.

SHANNON M. Clinical toxicity of cocaine adulterants. **Annals of Emergency Medicine – Journal**, v. 17, n. 11, p. 1243-1247, 1988.

SMITH, D. A.; BROWNING, M.; DUNWIDDIE, T. V. Cocaine inhibits hippocampal long-term potentiation. **Brain Research**, v. 608, p. 259–265, 1993.

SOTAK, B. N.; HNASKO, T. S.; ROBINSON, S.; KREMER, E. J.; PALMITER, R. D. Dysregulation of dopamine signaling in the dorsal striatum inhibits feeding. **Brain Research**, v. 1061, n. 2, p. 88-96, 2005.

STANULIS, E. D.; JORDAN, S. D.; ROSECRANS, J. A; HOLSAPPLE, M. P
Disruption of Th1/Th2 cytokine balance by cocaine is mediated by corticosterone. **Immunopharmacology**, v. 37, n. 1, p. 25–33, 1997b.

STANULIS, E. D.; MATULKA, R. A; JORDAN, S. D.; ROSECRANS, J. A;
OLSAPPLE, M. P. Role of corticosterone in the enhancement of the antibody
response after acute cocaine administration. **The American Society for
Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 280, n. 1, p. 284, 1997a.

STAREC, M.; RIOUVEIX, B.; SINET, M.; CHAU, F.; DESFORGES, B.; POCIDALO,
J. J.; LECHAT, P. Immune status and survival of opiate- and cocaine-treated mice
infected with Friend virus. **Journal of Pharmacology and Experimental
Therapeutics**, v. 259, p. 745–750, 1991.

STORY, A.; BOTHAMLEY, G.; HAYWARD, A. Crack cocaine and infectious
tuberculosis. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, p. 1466-1469, 2008.

TRIPATHI, A. K. A.; RATHI, N. B.; SUKE, S. G. A.; BANERJEE, B. D. A.; AHMED,
R. S. A.; MAHAJAN, P. B.; BHATTACHARYA, S. K. B. Alteration of superoxide- and
nitric oxide-mediated antimicrobial function of macrophages by in vivo cocaine
exposure. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 86, n. 1-2, p.
64-69, 2008.

UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime. **World drug report**. New York:
United Nations Publications, 2013.

UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime. **World drug report**. New York:
United Nations Publications, 2015.

VAZ, A.; LEFKOWITZ, S. S.; LEFKOWITZ, D. L. Cocaine alters the respiratory burst
and phagocytic activity of murine macrophages. **Clinical Immunology and
Immunopathology**, v. 69, n. 2, p. 161-166, 1993.

VEZINA P. Sensitization, drug addiction and psychopathology in animals and
humans. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.
31, p. 1553–1555, 2007.

VONMOOS, M.; HULKA, L. M.; PRELLER, K. H.; JENNI, D.; BAUMGARTNER, M.
R.; STOHLER, R.; BOLLA, K. I.; QUEDNOW, B. B. Cognitive dysfunctions in
recreational and dependent cocaine users: role of attention-deficit hyperactivity
disorder, craving and early age at onset. **The British Journal of Psychiatry**, v. 203,
p. 35–43, 2013.

VONMOOS, M.; HULKA, L. M.; PRELLER, K. H.; MINDER, F.; BAUMGARTNER, M.
R.; QUEDNOW, B. B. Cognitive Impairment in Cocaine Users is Drug-Induced but
Partially Reversible: Evidence from a Longitudinal Study.
Neuropsychopharmacology, v. 39, p. 2200–2210, 2014.

WAKEFIELD, E. G.; DELLINGER, S. C. Possible reasons for trephining the skull in
the past. **Ciba Symposium**, v. 1, p. 166-169, 1939.

WANG, Y.; HUANG, D. S.; WATSON, R. R. In vivo and in vitro cocaine modulation on production of cytokines in C57BL/6 mice. **Life Sciences**, v. 54, n. 6, p. 401-411, 1994.

WARNER, E.A. Cocaine abuse. **Annals of Internal Medicine**, v. 119, n. 3, p. 226-235, 1993.

WATSON, E. S.; MURPHY, J. C.; ELSOLHY, H. N.; ELSOLHY, M. A.; TURNER, C.E. Effects of the administration of coca alkaloids on the primary immune responses of mice: interaction with tetrahydro-cannabinol and ethanol. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 71, p. 1–13, 1983.

WEISS, R. D.; MIRIN, S. M.; BARTEL, R. L. Cocaine. **American Psychiatric Press**, Washington, v. 2, 1994.

WHANG, S. H.; CHOI, I. S. Studies on the clinical and laboratory findings of acute carbon monoxide intoxications. **Journal of the Korean Medical Association**, v. 33, p. 997-1005, 1990.

WHO. **Guidance for Immunotoxicity Risk Assessment for Chemicals**. Geneva, Switzerland, 2014.

WILSON, L. D.; HENNING, R. J.; SUTTHEIMER, C.; LAVINS, E.; BALRAJ, E.; EARL, S. Cocaethylene causes dose-dependent reductions in cardiac function in anesthetized dogs. **Journal Cardiovasc Pharmacol**, v. 26, p. 965-973, 1995.

ZHOU, Y.; SPANGLER, R.; LAFORGE, K. S.; MAGGOS, C. E.; HO, A.; KREEK, M. J. Corticotropin-releasing factor receptor messenger RNAs in rat brain and pituitary during “binge”-pattern cocaine administration and withdrawal. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 279, n. 1, p. 351–358, 1996.

ANEXO A – Despacho de concessão da droga



TRIBUNAL DE JUSTIÇA DO ESTADO DE SÃO PAULO

COMARCA DE ITAPEÇERICA DA SERRA

FORO DE ITAPEÇERICA DA SERRA

3ª VARA

Rua Major Matheus Rotger Domingues, 155, Compl. do Endereço da Vara

<< Nenhuma informação disponível >> - Jardim Santa Isabel

CEP: 06850-850 - Itapeçerica da Serra - SP

Telefone: (11) 4666-7277 - E-mail: itapeçerica3@tjsp.jus.br

DESPACHO

Processo nº: 0007417-59.2012.8.26.0268
 Classe – Assunto: Ação Penal - Procedimento Ordinário - Tráfico de Drogas e Condutas Afins
 Autor: Justiça Pública
 Réu: Wellington Silva de Almeida

CONCLUSÃO

Aos 08 de fevereiro de 2013, promovo estes autos conclusos a MM. Juiz de Direito da 3ª Vara de Itapeçerica da Serra, Excelentíssimo Dr. **Lucas Pereira Moraes Garcia**.

Juiz(a) de Direito: Dr(a). **Lucas Pereira Moraes Garcia**

Vistos.

Reconsidero a decisão retro e determino a liberação da quantia total de *crack* apreendido neste processo, ou seja, 684,00 g (seiscentos e oitenta e quatro gramas), guardando-se apenas quantidade suficiente para contraprova. A liberação deverá ser feita em favor da UNIFESP, para as professoras Dra. Isis Machado Huezo, Dra. Virgínia Martins Carvalho e Dra. Helenice de Souza Spinosa.

Servirá a presente decisão de ofício para a autoridade policial em cuja guarda está a droga, para fins de imediata liberação da droga para as professoras Dra. Isis Machado Huezo, Dra. Virgínia Martins Carvalho e Dra. Helenice de Souza Spinosa.

Intime-se.

Itapeçerica da Serra, 08 de fevereiro de 2013.

Lucas Pereira Moraes Garcia

Juiz de Direito

DOCUMENTO ASSINADO DIGITALMENTE NOS TERMOS DA LEI 11.419/2006, CONFORME IMPRESSÃO À MARGEM DIREITA

Este documento é cópia do original assinado digitalmente por LUCAS PEREIRA MORAES GARCIA. Para acessar os autos processuais, acesse o site www.tjsp.jus.br, informe o processo 0007417-59.2012.8.26.0268 e o código 7G00000007N8Y.