ALCIDES GILBERTO MORAES

Alterações anatomopatológicas em corações de camundongos submetidos à inalação crônica de cocaína crack

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Patologia

Orientador: Prof. Paulo Hilário Nascimento Saldiva

SÃO PAULO
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Moraes, Alcides Gilberto
Alterações anatomopatológicas em corações de camundongos submetidos à inalação crônica de cocaína crack / Alcides Gilberto Moraes. – São Paulo, 2009.
Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Anatomia Patológica.
Área de concentração:Patologia.
Orientador: Prof. Paulo Hilário Nascimento Saldiva

Descritores: 1.Cocaína crack/toxicidade 2.Anatomia & histologia 3.Vasoespasmo coronariano 4.Apoptose 5.Atrofia 6.Camundongos

USP/FM/SBD-0123/09

Dedico este trabalho à minha família, responsável pela minha manutenção na jornada.

Aos meus pais, *Alcides e Anésia,* (*in memoriam)*, que me assistem, no momento sem as suas presenças físicas, mas sempre ao meu lado na continua missão educativa.

À minha esposa, *Maria Cecilia*, pelo apoio e estímulo, principalmente nos momentos críticos da nossa caminhada, parceira constante e fundamental nos desafios, e com participação decisiva na minha presença e perseverança como doutorando pela Universidade de São Paulo.

Aos meus filhos, *Eduardo, Marcela e Augusto,* a razão maior de ter aceitado esse desafio, em um momento e numa idade não muito favorável. Ajudaram-me bastante a lidar com o computador e a informática; cada um na sua individualidade e os três, juntamente com a mãe, importantíssimos, através dos incentivos e da compreensão, para me credenciar e candidatar ao honroso título de doutor pela Universidade de São Paulo.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, naturalmente a Deus Pai, que permitiu conhecer e contar com a ajuda valiosa de tantas pessoas generosas na nossa pesquisa. Que Ele recompense a todos com muita Saúde e Paz!

“Ó Deus, nos ensineis a julgar com sabedoria os valores terrenos e colocai nossas esperanças nos bens eternos”. “Perdoai as nossas ofensas, assim como nós perdoamos àqueles que nos tenha ofendido”.

O meu agradecimento especial ao meu orientador *Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva,* pela grande oportunidade oferecida para participar em uma pesquisa tão importante, satisfazendo a conhecida e eterna curiosidade de um Patologista; e consequentemente, por ter respirado ciência nesses cinco anos; pela amizade e apoio fundamental no momento mais difícil e critico do nosso desafio. Apesar dos seus inúmeros compromissos, sempre com muito otimismo e bom humor e seus reconhecidos conhecimentos, nos orientou em todas as etapas da pesquisa.

Meus agradecimentos a muitas pessoas que direta ou indiretamente, contribuíram para que o nosso projeto se concretizasse e culminasse na realização dessa Tese.

Aos meus atuais professores, e a todos os funcionários do Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela forma carinhosa que me receberam nesses cinco anos, pela cortesia e disponibilidade, e por terem me colocado as portas sempre abertas.

Ao *Prof. Dr. Edwin Roger Parra*, ser humano com contagiante modéstia, mais uma amizade estabelecida dentro do Departamento de Patologia. Inicialmente, pela gentileza em nos orientar no uso do sistema analisador de imagem, o adequado processamento do software Image Pró-Plus 6.0 e colaboração na quantificação do colágeno; em seguida, pela disponibilidade em nos auxiliar na realização do paper e sugestões ao escrevermos a tese.

À *Profª Dra. Heloisa Bueno* pela colaboração desde a fase pré-analítica, atuando intensamente no experimento, na coleta do material biológico e tabulação dos resultados; por estar sempre presente quando recorremos aos seus préstimos, muitas vezes em dias e horários impróprios.

À *Profª Dra Marisa Dolhnikoff*, pela assessoria que nos deu no inicio, e com isso participando nos rumos direcionados da nossa pesquisa.

À *Profª Dra. Thaís Mauad*, pelas sugestões, revisão estatística quando da utilização do Modelo Linear Generalizado nos nossos resultados e pela solicitude em colaborar no paper.

Às *Profª Dra. Fabíola Bernardi e Dra Sheila Siqueira*, pelas análises críticas pertinentes e sugestões oportunas quando da qualificação.

À *Profª Dra Vera Luiza Capelozzi*, quando por feliz coincidência, em um dia decisivo para o andamento da pesquisa, disponibilizou de forma espontânea e incondicional, colorações de imunoistoquímica, que muito vieram enriquecer a nossa tese; pelas orientações nas interpretações das mesmas e pelos incentivos.

À pesquisadora e pós-graduanda, *Adriana Pires*, pela participação na segunda leitura nos estudos imunoistoquímicos.

A todos os funcionários e pesquisadores do Laboratório de Poluição, local inspirador da pesquisa; às secretárias no período da pós-graduação, *Márcia, Dalva e Eliane*, pela forma sempre atenciosa e simpatia ao nos atender.

À secretária da pós-graduação da Patologia, *Liduvina Barros*, pela atenção e presteza, quer pessoalmente ou através de e-mail, nos orientando desde o início, no passo a passo, quanto à sistemática da pós-graduação.

À secretária do professor Saldiva*, Aldazira*, pela paciência nas tentativas de agendamento das reuniões.

Às funcionárias, *Esmeralda M. Eher e Sandra de Morais* Fernezlian do Laboratório de Imunoistoquimica e Welluma de Souza do Laboratório de histologia do Departamento de Patologia da FMUSP, pela competência nas confecções das excelentes lâminas da pesquisa; sem contar o carinho e a simpatia.

Aos funcionários do Laboratório conhecido como Museu*, Reginaldo e Ana Luiza,* pela atenção e colaboração, quando necessitamos realizar as microfotografias.

À *Profª Dra Walcy Teodora* do Laboratório de Matriz Extracelular da Faculdade de Medicina da USP, pela disponibilização dos equipamentos para as pesquisas de colágeno.

Ao *Prof. Dr. Julio Zorzzeto*, médico-legista da Faculdade de Medicina de Marília e Doutor pela USP, pela colaboração fundamental na viabilização do nosso projeto, na idealização da câmara de inalação, assim como pelas sugestões pertinentes durante a pesquisa e a qualificação.

À estaticista, *Cecília Farhat*, pela colaboração na interpretação dos resultados das estatísticas.

À secretária, *Célia,* do departamento de Patologia da FAMEMA (Marília), pela colaboração na época que escrevemos o projeto.

Aos professores, *Maurício Yanomami e Raphael Caio*, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela análise da cocaína no sangue dos animais.

À *Dra. Débora Gonçalves de Carvalho,* do Núcleo de Toxicologia Forense do IML de São Paulo, pela análise da concentração de cocaína no crack usado neste trabalho.

Ao *Dr. Décio Divanir Mazeto* (Juiz de Direito da Comarca de Marília), *Dr. Flávio José Rino Guimarães* (Delegado da DISE de Marília, DEINTER Bauru), *Dr. Paulo Roberto de Lara Silva* (Delegado da DISE de Marília, DEINTER Bauru), *Getúlio Tomoyuki Sato* (Escrivão da DISE de Marília, DEINTER Bauru); todos com participação fundamental na viabilização da pesquisa, desde apreensão da droga, agilização dos tramites legais e autorização de entrega do crack para a realização deste estudo.

Aos professores da pós-graduação, *Alberto Consolaro, Raymundo Soares de Azevedo Neto, Fernando Soares, Teresa Takagaki, Geraldo Lorenzi e Wilson Jacob Filho,* pelos ensinamentos preparatórios adquiridos nas suas disciplinas.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e aos Laboratórios de Investigação Médica (LIMs), entidades científicas que contribuíram para viabilizarção do projeto.

Aos amigos, poucos mais presentes, pela compreensão, quando tivemos que abrir mão do sempre prazeroso convívio.

Aos colegas médicos de Ourinhos e região pela compreensão e palavras de apoio nessa jornada, em particular (*in memoriam)* ao saudoso Dr *Paulo Saldanha,* por ter nos estimulado à pós-graduação, pela sua “ousadia” ao investir no ensino superior na área da saúde e por ter confiado na nossa capacidade de colaboração.

Aos componentes da Equipe de Perícias Médico-Legais de Ourinhos, particularmente aos *Drs. Romeu e Pedro,* pela inestimável colaboração, sempre que necessário, em adaptar as escalas de plantões às minhas necessidades da pós-graduação.

À *Dona Carmem,* eminente Professora de Português em Ourinhos, com atenção às necessidades da revisão ortográfica da Tese.

Finalmente, não poderia deixar de lembrar, pessoas que me influenciaram na escolha da especialidade, e nas que me formaram Patologista, o eterno curioso - como bem explicita o cartaz comemorativo do dia do Patologista -, portanto, também contribuindo nessa importante caminhada:

Ao Dr. *Moacyr Alves de Lima*, (*in memoriam)*, médico generalista, a primeira pessoa a me falar da importância da Patologia como especialidade médica, mesmo antes de iniciar o curso de medicina.

Aos meus professores no curso de graduação na Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA), *José Donato de Próspero, Carlos Marigo e Helena Muller,* por me terem proporcionado um bom inicio na Patologia, pela oportunidade de estreitar esse conhecimento como monitor da disciplina e iniciar meu apego à profissão escolhida e à tão temida matéria.

Ao *Dr. Godofredo Gomes de Oliveira*, Patologista na FAMEMA, quando do meu 6º ano, cujos conhecimentos e abnegação foram decisivos na minha escolha da especialidade.

Aos professores de Patologia durante a residência, na Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto, *Fritz Köbeller (in memoriam), Paulo F.L. Becker (in memoriam), João Samuel M. Oliveira (in memoriam), José Alberto M. Oliveira, Marcos Rossi, Ricardo Ribeiro dos Santos, Sergio Zucoloto, Reynaldo de Britto Costa e José Barbieri Neto,* pelos ensinamentos e o despertar do interesse investigativo.

“Pouca Ciência nos afasta de Deus, muita nos aproxima”

Luis Pasteur - 1892

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos
Lista de Tabelas
Lista de Figuras
Resumo
Summary

1. INTRODUÇÃO 1
1.1 CONCEITOS, EFEITOS E TIPOS DE DROGAS 2
1.2 COCAÍNA 8
1.3 HISTÓRICO DA COCAÍNA 13
1.4 FORMAS DE USO DA COCAÍNA 16
1.5 COCAÍNA CRACK 16
1.7 PREPARO DA COCAÍNA CRACK E ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS 26

2. REVISÃO DA LITERATURA 31
2.1 EFEITOS DA COCAÍNA NO SISTEMA CARDIOVASCULAR 32
2.2 ANATOMIA E HISTOLOGIA DO CORAÇÃO DE CAMUNDONGOS 39

3. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO 42

4. OBJETIVO 44

5. MÉTODOS 46
5.1 PROTOCOLO DO ESTUDO 47
5.1.1 Animais 47
5.1.2 Material teste - droga utilizada no projeto 48
5.1.3 Grupos experimentais 48
5.1.4 Exposição 49
5.2 PESAGEM E COLETA DO SANGUE PARA ANÁLISE 57
5.3 EXAMES ANATOMOPATOLÓGICOS DOS CORAÇÕES 57
5.3.1 Preparo do tecido 57
5.3.2 Técnicas de coloração 58
5.3.3 Análise morfométrica 60

6. RESULTADOS 66
6.1 DADOS GERAIS E COMPORTAMENTO DOS ANIMAIS 67
6.2 PESO DOS ANIMAIS 67
6.3 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE COCAÍNA 69
6.4 ANÁLISE DOS CORAÇÕES – EXAME ANATOMOPATOLÓGICO 69
6.4.1 Peso dos corações 69
6.4.2 Estudo das fibras cardíacas – microscopia convencional (H&E) 71
6.4.3 Estudo das artérias coronárias intramurais – morfometria 72
6.4.4 Estudo das paredes ventriculares – morfometria H&E 75
6.4.5 Estudo da apoptose pela marcação doTUNEL - imunoistoquímica 78
6.4.6 Estudo das fibras colágenas – Picro sirius 82

7. DISCUSSÃO **87**
7.1 MODELO EXPERIMENTAL 88
7.2 CARACTERÍSTICAS DA DROGA UTILIZADA 89
7.3 RESULTADOS GERAIS 90
7.4 ACHADOS ANATOMOPATOLÓGICOS DO CORAÇÃO 91

8. CONCLUSÕES **98**

9. REFERÊNCIAS **100**

10. APÊNDICES

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

a.C.	antes de Cristo
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
α	Alfa
β	Beta
CA	controle adulto
CEBRID	Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas
CJ	controle Jovem
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
et al.	e outros
DEINTER	Delegacia do Interior
DISE	Delegacia de Investigação Sobre Entorpecentes
TdT	Deoxinucleotidil Transferase
DNA	Acido Desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
EA	Exposto Adulto
EJ	Exposto Jovem
FAMEMA	Faculdade de Medicina de Marília
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
g	Grama
ºC	Grau Celsius
H&E	Hematoxilina-Eosina
IC	Intervalo de Confiança

IML	Institituto Médico Legal
INPM	Instituto Nacional de Pesos e Medidas
LSD	Diatilacima do Ácido Lisérgico
Kg	Quilograma
LP	Luz-Parede
MLG	Modelo Linear Generalizado
ml	Mililitro
mg	Miligrama
MHZ	Megahertz
µ	Micra
µm²	micrometro quadrado
ng	Nanograma
NTF	Núcleo de Toxicologia Forense
PBS	*Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato-Salino)*
PKCε	*Protein kinase Cε*
p	probabilidade Estatística
p38-MAPK	*p38 mitogen-activated protein kinases*
TUNEL	*Terminal deoxynucleotidyl-Transferase-Mediated dUTP*
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo
VD	Ventrículo Direito
VE	Ventrículo Esquerdo

TABELAS

Tabela 1. Peso médio dos animais nos diferentes grupos experimentais. 68
Tabela 2. Pesos médios dos corações por grupos. 70

FIGURAS

Figura 1. Folhas, frutos e galhos do arbusto Erythroxylum coca 10
Figura 2. Cachimbos e artefatos improvisados,utilizados para se fumar o crack . 18
Figura 3. Menino fumando cocaína crack 19
Figura 4. Preparo da pasta base de cocaína 28
Figura 5. Preparo da pasta base de cocaina e purificação 29
Figura 6. Cocaína Crack 30
Figura 7. Parede do miocárdio de camundongos 41
Figura 8. Recipientes para queima da droga 51
Figura 9. Componentes utilizados para a queima e produção de fumaça da cocaína crack 52
Figura 10. Câmara de inalação 53
Figura 11. Controle de fluxo da fumaça 55
Figura 12. Modelo experimental completo 56
Figura 13. Retículo de pontos 62
Figura 14. Programa Image Pro-Plus 64
Figura 15. Peso médio dos animais 68
Figura 16. Apoptose de células miocárdicas 71
Figura 17. Remodelamento da parede vascular 73
Figura 18. Relação luz/parede da coronária esquerda 74
Figura 19. Relação núcleo/área das fibras miocárdicas do ventrículo direito 76
Figura 20. Relação núcleo/área das fibras miocárdicas do ventrículo esquerdo 77
Figura 21. Apoptose em células cardíacas pela técnica do TUNEL nos grupos controle jovem e adulto 79
Figura 22. Apoptose em células cardíacas pela técnica do TUNEL nos grupos expostos 80
Figura 23. Densidade de apoptose em células miocárdicas 81
Figura 24. Colágeno na parede vascular nos grupos controle e exposto 83
Figura 25. Fibras colágenas da coronária esquerda 84
Figura 26. Colágeno no interstício do miocárdio do grupo exposto 85
Figura 27. Densidade de fibras colágenas no interstício cardíaco 86

RESUMO

Alcides AG. *Alterações anatomopatológicas em corações de camundongos submetidos à inalação crônica de cocaína crack* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 111p.

A cocaína crack é a forma popular da cocaína nos dias de hoje, em decorrência do baixo custo relativo da droga e da rapidez dos seus efeitos no sistema nervoso central. São conhecidas alterações provocadas pela cocaína no coração de humanos e animais, sendo frequentes graves transtornos no sistema cardiovascular, muitas vezes fatais. Mas diante do crescente e preocupante aumento do uso dessa forma fumada da cocaína, particularmente pelos jovens, tornam-se necessários estudos experimentais utilizando-se a droga in natura, que não se encontra habitualmente disponibilizada para experimentos, diante das dificuldades legais. Este estudo objetivou a avaliação dos efeitos da inalação crônica da cocaína crack no coração de camundongos, tendo sido utilizados 24 animais BALB/c machos, jovens e adultos, 6 animais de cada grupo (n= 6), que foram expostos à fumaça originada da queima de 5 g de cocaína, por 5 minutos, 5 dias da semana, durante 39 dias, em um período de dois meses; utilizou-se uma câmara de inalação para a manutenção dos animais durante as sessões e os animais do grupo controle, em igual nº (n= 6), foram mantidos no biotério em condições favoráveis. A droga teve como origem a apreensão policial (195,2 g) e o seu uso, na pesquisa previamente autorizada pela justiça. A análise farmacológica da droga constatou a presença de 57,66 % de cocaína nas pedras de crack, satisfazendo as necessidades para a experiência. A quantificação de cocaína de 212,5 ng/ml no sangue dos animais também foi considerada representativa para os nossos objetivos de pesquisar alterações morfológicas no coração dos camundongos. Os resultados foram analisados pela One-Way-Anova e Modelo Linear Generalizado, e as diferenças consideradas significativas quando $p< 0,05$. Os estudos mostraram diminuição significativa da media (±DP) de peso dos corações nos animais expostos à droga, adultos e jovens, quando comparados com os grupos controles correspondentes. No grupo jovem, o aumento do número de núcleos, por área ventricular, pode ser relacionada com atrofia miocárdica dos ventrículos, direito e esquerdo ($p< 0,001$), demonstrada pela morfometria das fibras musculares estriadas cardíacas, utilizando-se o sistema de retículo de pontos. Nos adultos expostos, apesar da diminuição de peso do coração, a morfometria não constatou atrofia de miocárdio de nenhum dos lados ($p> 0,05$). Nos exames microscópicos das paredes ventriculares, com a coloração da hematoxilina-eosina, foi detectado, discreto número de fibras musculares cardíacas, com perda das estriações e hialinizações do citoplasma, favorecendo apoptose. A morfometria dos vasos coronarianos intramurais, com medições das luzes, camadas médias e adventícias demonstrou diminuição significativa da

proporção (razão) luz/parede nos animais expostos, independente da idade, quando comparado com os grupos controle (p= 0,001). Esses dados caracterizam a vasoconstrição por provável ação simpaticomimética da droga, justificando uma isquemia relativa no coração e conseqüente aumento da apoptose, bem documentada pela imunoistoquímica através da coloração do TUNEL. Esta imunocoloração marcou extensamente os núcleos de células apoptóticas, nos ventrículos direito e esquerdo dos animais expostos, quando comparado aos animais não expostos (p< 0,001). A microscopia óptica com H&E e Picro-sirius sugeriu fibrose peri-adventicial nos animais expostos adultos A quantificação do colágeno, após a polarização, mostrou aumento não significativo, nos ramos coronarianos dos animais expostos adultos e interstício do ventrículo direito dos dois grupos expostos (p> 0,05). As pesquisas realizadas com um modelo experimental inédito confirmam alterações anatomopatológicas já descritas na literatura, como a vasoconstrição com isquemia aguda e aumento da apoptose e mostram alterações ainda não referidas, em efeitos crônicos da cocaína, como a diminuição de peso do coração e atrofia do miocárdio. Os estudos, embora tenham limitações por não ter sido isolada outra substância eventualmente presente na amostra teste, constataram achados morfológicos importantes para a saúde pública, que devem ser pesquisados nas autópsias. Novos estudos são recomendados, utilizando-se outros tempos e ambientes de exposição, com e sem a associação de drogas, assim como porcentagens diferentes de cocaína no crack e isolando-se as substâncias presentes na droga in natura.

Descritores: 1.Cocaína crack/toxicidade 2.Anatomia & histologia 3.Vasoespasmo coronariano 4.Apoptose 5.Atrofia 6.Camundongos.

SUMMARY

Alcides AG. *Anatomopathological alterations in hearts of mice submitted to chronic inhalation of crack cocaine [Thesis].* São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009. 111p.

Crack cocaine is the currently popular form of cocaine, due to its low cost and rapid effects on the central nervous system. Alterations caused by cocaine on the hearts of humans and animals are well known and severe disorders in the cardiovascular system, which are sometimes fatal, are frequent. Considering the growing concern regarding the increase in the use of this smoked form of cocaine, especially by young individuals, it becomes necessary to carry out experimental studies using the drug in its natural form, which is not usually available for experiments due to legal difficulties. The present study aimed at assessing the effects of the chronic inhalation of crack cocaine on the hearts of mice. A total of 24 BALB/c male animals were used in the experiment, both young and old, with 6 animals in each group (n=6), which were exposed to crack cocaine smoke that resulted from the burning of 5 g of cocaine, for 5 minutes, 5 days a week, for 39 days, except on weekends and holidays, during a two-month period. An inhalation chamber was used to keep the animals during the sessions, whereas the same number of animals from the control group (n=6) were kept at the animal facility of the institution under favorable conditions. The drug had been originally apprehended by the police in the course of criminal investigations and its use in research was previously authorized by the Department of Justice. The pharmacological analysis of the drug verified the presence of 57.66% of cocaine in the crack rocks, which satisfied the criterion used for the experience. The quantification of cocaine at 212.5 ng/mL in the blood of the animals was also considered representative for our objectives of assessing morphological alterations in the hearts of mice. The results were analyzed by One-Way-ANOVA and Generalized Linear Model, and the differences were considered significant when $p< 0.05$. The studies showed a significant difference in the mean (±SD) weight of the hearts of the animals exposed to the crack cocaine smoke, both young and adult ones, when compared to the corresponding control groups. In the young group, the increased number of nuclei per ventricular area might be related to the myocardial atrophy of the right and left ventricles ($p< 0.001$), demonstrated by the morphometry of the striated heart muscle fibers, using the system of point reticulum. In the exposed adult animals, in spite of the decreased heart weight, the morphometry did not show myocardial atrophy in neither side ($p> 0.05$). The microscopic assessment of the ventricular walls, carried out with hematoxylin and eosin (H&E) staining, showed a small number of heart muscle fibers with loss of striations and hyalinization of the cytoplasm, which favored apoptosis. The morphometry of the intramural coronary vessels, with lumen, medial and adventitial layer measurement, showed a significant decrease in the lumen/wall ratio in exposed animals, regardless of age, when compared to the control group ($p=0.001$).

These data characterize vasoconstriction, due to the probable sympatheticomimetic action of the drug, which justifies a relative ischemia of the heart and a consequent increase in apoptosis, well documented by immunohistochemistry through TUNEL staining. This immunostaining extensively identified the nuclei of apoptotic cells in the right and left ventricles of the exposed animals, when compared to the non-exposed animals ($p < 0.001$). Optical microcopy with H&E and Picrosirius suggested periadventitial fibrosis in the adult exposed animals. Collagen quantification after polarization showed a non-significant increase in the coronary branches of the adult exposed animals and in the right ventricular interstitium in the two exposed groups ($p > 0.05$). The present study, carried out using a novel experimental model, confirmed the presence of anatomopathological alterations that had been previously described in the literature, such as vasoconstriction with acute ischemia and increased apoptosis and showed alterations that had not been previously reported as being chronic effects of cocaine, such as decreased heart weight and myocardial atrophy. Although there were limitations, considering that other substances eventually present in the test sample were not identified, the present study demonstrated important morphological findings for public health, which must be studied in autopsies. Further studies are recommended, using other exposure durations and environments, with and without the association of drugs, as well as different percentages of cocaine in crack rocks and isolating the substances present in the drug in its natural form.

Descriptors: 1.Crack cocaine 2.Anatomy & histology 3.Coronary vasospasm 4.Apoptosis 5.Atrophy 6.Mice

1. INTRODUÇÃO

1.1 Conceitos, efeitos e tipos de drogas

É oportuno serem apresentados inicialmente alguns conceitos gerais sobre drogas ilícitas.

Há controvérsia sobre a origem da palavra droga, as referências mais citadas relacionando o seu étimo ao holandês antigo (*neerlandês*) “droog”, que significa folha seca, pois, antigamente, a maioria dos medicamentos era à base de vegetais (CEBRID, 2003). Consta também, como origem do francês “drogue”, designação genérica de toda substância usada em química e farmácia.

A palavra foi usada, primitivamente, como toda substância orgânica ou inorgânica, empregada como ingrediente de tinturaria, química ou farmácia. O termo, entretanto, só começou a ser usado na Idade Média.

Hoje em dia, droga poderia ser definida como qualquer substância capaz de modificar a função dos organismos vivos, resultando em mudanças fisiológicas ou de comportamento (CEBRID, 2003). Trata-se de toda e qualquer substância, natural ou sintética que, introduzida no organismo, modifica suas funções.

Segundo a OMS, a droga é uma substância que, quando administrada ou consumida por um ser vivo, modifica uma ou mais de suas funções, com

exceção daquelas substâncias necessárias para a manutenção da saúde normal (Ghodse, 1995).

Há drogas naturais, obtidas através de determinadas plantas, de animais e de alguns minerais, por exemplo: a cafeína do café; a nicotina do tabaco; o ópio da papoula; o tetraidrocanabinol da Canabis sativa (maconha); e drogas sintéticas fabricadas em laboratório.

As drogas são classificadas em três categorias: as estimulantes, as depressoras e as perturbadoras das atividades mentais. As estimulantes aumentam o processamento cerebral, resultando em situações de êxtase e grande agitação, como é o caso da cocaína, ecstasy, anfetaminas e cafeína. As depressoras alteram o processamento de captação das informações pelo cérebro, sendo exemplos o álcool, o ópio e a morfina. As alucinógenas despersonalizam os usuários, como a maconha, LSD e heroína.

A Organização Mundial da Saúde define toxicomania ou toxicofilia como “um estado de intoxicação periódica ou crônica, nociva ao indivíduo e /ou à sociedade, produzida pelo repetido consumo de uma droga natural ou sintética”. Suas características são irresistível desejo causado pela falta da mesma, que obriga a pessoa a continuar a usar a droga, tendência a aumentar a dose e dependência de ordem psíquica e, às vezes física, dos efeitos da mesma (Moreau,1996).

A dependência a uma droga é definida como o condicionamento do indivíduo a ela e que, quando na falta da mesma, desencadeia a crise ou síndrome de abstinência. Isto faz com que o usuário busque rapidamente nova dose, aumentando a frequência e a quantidade de uso (Moreau, 1996).

Dependência é uma sindrome biopsícosocial manifestada por um padrão de comportamento no qual a procura e uso da droga têm uma prioridade extrema sobre outros comportamentos anteriormente valorizados. Ela pode ser psíquica e física, condicionando o individuo a ela e que, quando da falta, desencadeia a crise ou síndrome de abstinência. Esta síndrome é, portanto, um conjunto de sinais e sintomas contrários aos provocados pela droga, que ocorre quando uma pessoa interrompe abruptamente o consumo constante a que seu organismo já estava adaptado. Ela não é apenas o uso de grandes quantidades, ela começa quando uma pessoa faz uma escolha consciente de usar droga. Pesquisas têm demonstrado que as drogas não somente interferem no funcionamento normal do cérebro, com as sensações de prazer, mas, em longo prazo, provocam mudanças cerebrais que levam o abuso à dependência.

As drogas podem causar uma série de sintomas e sinais, relacionados com os seus componentes.

Delírio pode ser definido como uma condição que conduz a compreensão e raciocínio errados, da situação ou do ambiente (objetos e pessoas).

Alucinação é percepção sensorial (tátil, olfativa, auditiva e visual) falsa que ocorre na ausência de um estímulo concreto.

Ilusão é uma confusão e uma distorção de percepções e estímulos.

O abuso e a dependência da drogas nos dias de hoje é um grande problema que a sociedade vem enfrentando, pois além de enormes prejuízos sociais ela causa graves distúrbios físicos. Portanto, o conhecimento dos seus

efeitos danosos à saúde pode ajudar na prevenção e tratamento, que pode ter um efeito significativo, não apenas para os usuários, mas também na sociedade, com diminuição da criminalidade e violência, redução da contaminação pela SIDA (AIDS), queda do número dos acidentes automobilísticos e consequentemente, das estatísticas de internações hospitalares não só decorrentes de traumas, como por complicações físicas e psiquiátricas.

No Iº Levantamento Domiciliar Nacional sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas, realizado em 1999 pelo CEBRID (Boletim nº 40, 2000), envolvendo as 24 maiores cidades do estado de São Paulo, constatou-se que o uso de qualquer tipo de droga psicotrópica, exceto álcool e tabaco, foi de 11,6%, porcentagem próxima ao Chile, superior à Colômbia e muito inferior aos EUA (34,8%).

As principais substâncias utilizadas pelos usuários de drogas nos dias atuais são:

Maconha: também conhecida por vários nomes entre eles, marijuana, haxixe, diamba, liamba, birra, erva maldita, baseado. É uma droga extraída das folhas da Canabis sativa, planta em forma de arbusto, que cresce facilmente nos climas tropicais, muito cultivadas no Nordeste brasileiro e cujo consumo é elevado pelo baixo custo. É consumida, principalmente em forma de cigarros e o seu principio ativo, o tetra-hidrocanabinol, (THC) é psicodisléptico, causando sintomas gerais, neurológicos e psíquicos, com alterações comportamentais; o usuário pode chegar a cometer atos delituosos graves como homicídio. No sistema cardiocirculatório, pode

provocar palpitações, taquicardia, desconforto retroesternal e alterações vasculares graves de membros (Sterne e Ducastaing, 1960). Embora sendo aceito que não gera dependência física (toxicomania ou vicio), portanto crises de abstinência ou fenômeno de adição, ela leva o usuário a associar outro tipo de droga, como é o caso do zirrê ou craconha, mistura de crack e maconha, com efeitos mais intensos.

Morfina: é um alcalóide derivado do ópio, de núcleo fenantrênico; um narcótico, com ação sobre o córtex cerebral, suprimindo a dor e causando, no inicio, euforia, alegria, disposição, sensação de letargia, bem-estar e, posteriormente, resultando emagrecimento, envelhecimento precoce, angústia, impotência sexual, inapetência e vômitos. O uso é por via parenteral, sendo que, quando injetada em veias do antebraço e mão podem determinar infecções, cicatrizes e necrose.

Heroína: é um produto sintético, a diacetilmorfina, oriunda da substituição de dois átomos de hidrogênio por dois radicais acetila da molécula da morfina, e tem a forma de pó branco e cristalino. A droga é utilizada injetada após a diluição ou sendo misturado ao fumo do cigarro; é mais potente que a morfina, com ação despersonalizante, alucinógena e levando ao estado de embriaguez, seguido de abolição de sensações desagradáveis como fadiga, fome, medo e angustia, porém tem uma duração fugaz.

LSD ou Ácido Lisérgico: é uma potente droga psicodisléptica e psicomimética, conhecida também como dietilamida do Ácido Lisérgico ou LSD 25, um produto semi-sintético extraído da ergotina do centeio, tem

grande poder alucinógeno; consumida geralmente por via oral após ser dissolvido na água.

Mescalina: droga também psicodisléptica, encontrada em um cacto no México, o mescal (Lophophora williamisii), cujas pontas secas eram comidas pelos curandeiros das tribos; de uso restrito e com efeitos semelhantes ao LSD.

Psilocibina: outro potente psicodisléptico, com efeitos semelhantes aos do LSD e Mescalina, encontrada em cogumelos mexicanos, conhecidos como *téo-nacatyl* ou "carne dos deuses" pelos Astecas desde Montezuma, em cuja coroação foi distribuído ao povo para maior movimentação à solenidade.

Anfetaminas: drogas com uso crescente nos últimos anos, a mais conhecida o Ecstasy, também conhecida com droga do amor; seu uso tendo se iniciado em boates e raves, e atualmente cada vez mais usada em vários eventos sociais; é uma droga sintética e psicoativa, consumida em forma de comprimidos, com água ou bebida alcoólica, sendo utilizada, além da via oral, a via parenteral, como supositório e por inalação. Causa euforia, desinibição e perda do sono, em decorrência do aumento da concentração da dopamina e serotonina no cérebro. O Ecstasy é neurotóxico e em altas doses pode causar elevação aguda da temperatura corporal, causando a Hipertemia Maligna, com lesão muscular e insuficiências, renal e cardiovascular.

Inalantes: substâncias químicas voláteis com efeitos psicoativos, de uso crescente e preocupante, pois durante muito tempo não foi considerada como droga, sendo uma variedade delas usadas no ambiente doméstico

como, tintas spray, colas e fluidos de limpeza, e pelo acesso fácil das crianças e adolescentes, o grupo de maior risco. Entre os inalantes encontram-se, os solventes como thinner, removedores, fluidos de limpeza, gasolina, cola – a conhecida cola de sapateiro -, e gases como, por exemplo, butano, propano, aerossóis e gases anestésicos. Produzem efeitos similares aos anestésicos, com duração de poucos minutos, inicialmente sendo estimulantes, com perda da inibição, e o uso continuo determinando perda da consciência e podendo induzir a parada cardíaca.

Cocaína: droga que participa como material teste nesta pesquisa, um alcalóide de função amina, de uso crescente nos dias atuais através da sua forma inalada, o crack. A prevalência do uso de cocaína no Estado de São Paulo é de 1,7%, e está bem próxima a de alguns países da América do Sul como Chile e Colômbia, além de Holanda e Dinamarca; porém é bem inferior à prevalência dos EUA (CEBRID, 2000).

1.2 Cocaína

A cocaína, benzilmetilecgonina - C17. H21. N04 -, é um alcaloide natural, considerada um psicodisléptico em decorrência dos efeitos despersonalizantes ou alucinógenos; é extraída da folha de um arbusto, o Erythroxylum coca (Egred e Davis,2005), planta conhecida como coca ou epadu, este último nome dado pelos índios do Brasil (Ferreira e Martini,2001) (Figura 1).

Há referência de mais de 200 espécies de Erythroxylum, 17 delas podendo produzir a cocaína, a mais utilizado sendo, o Erythroxilum novogravatense com cultivo destinado à indústria farmacêutica na produção de anestésico ou a indústria alimentícia como constituinte de chás e a espécie Erythroxylum coca a responsável pela produção da cocaína (Costa e Andrade,1999).

Figura 1. Folhas, frutos e galhos do arbusto Erythroxylum coca
A)Pode ser observado as diferentes partes da planta da coca; B) com mais detalhe é mostrado o fruto avermelhado (Imagem cedida por U.S. Drug Enforcement Administration); C) assim como os galhos, e as folhas que são a matéria prima da elaboração da cocaína.

Ela é nativa dos Andes, região da América do Sul, predominantemente Bolívia, Colômbia e Peru, utilizada pelos nativos há milênios em forma de chá ou mastigando-se as folhas, tendo sido considerada como planta sagrada, havendo relatos de ter sido utilizada em ritos religiosos; a população a usa como forma de aliviar a fome, a sede e o cansaço (Costa e Andrade,1999) e também em cidades de grandes altitudes com a finalidade de suportar a rarefação de oxigênio. Turistas que visitam cidades como Cuzco e Machu-Pichu relatam se sentirem aliviados da sintomatologia respiratória, quando tomam chá feito de folhas da coca e sem manifestarem efeitos colaterais. Esse chá é uma infusão de folhas de coca, bastante diluído e, portanto, é servido legalmente em qualquer restaurante, assim como o hábito de mastigar as folhas é visto nas ruas das cidades andinas da Colômbia, Peru e Bolívia.

A pequena quantidade do principio ativo na folha da referida planta não produz as consequências funestas que ocorrem quando da utilização da cocaína por qualquer das vias conhecidas de consumo da droga, oral (ingerida), intranasal (aspirada, cheirada), intravenosa (injetada, endovenosa) e respiratória (fumada). Portanto ela pode chegar até o consumidor em forma de um sal, o cloridrato de cocaína, que é aspirada ou dissolvida em água para uso endovenoso, ou sob a forma de uma base, que origina o crack, que é pouco solúvel em água, mas que se volatiliza quando aquecida e, por isso, sendo fumada e inalada; os usuários utilizam, para isso, tipos de cachimbos ou acessórios improvisados (Oliveira e Napo,2008).

Outro subproduto da cocaína, também em pasta, mas preparada de forma diferente, é a “merla” que predomina no Distrito Federal, particularmente na periferia, mas seu uso vem sendo substituído gradativamente pelo crack.

Se o crack inalado vier associado à ingestão de álcool, podemos ter, no fígado, a produção de uma substância química chamada cocaetileno, mais tóxica e potencialmente fatal (Bai et al., 1996).

O uso do crack também tem sido combinado com outras substâncias como o cigarro e a maconha. A combinação crack-tabaco, conhecida como “capetinha, pitilho ou cisclado”, tem um efeito mais fraco que o da pedra isolada, mas com a vantagem, para o usuário, de usá-la em lugares públicos (Oliveira e Nappo, 2008).

Uma nova associação de drogas vem sendo comercializada nos últimos anos, predominantemente no Rio de Janeiro e, como novidade, vem atraindo o usuário: é a mistura do crack com maconha, chamada de zirrê, mesclado, melado ou craconha. A procura por essa novidade tem sido crescente por causar mais euforia do que quando as drogas são consumidas isoladamente; o contato com o sangue ocorre rapidamente no primeiro minuto. Esse uso combinado tem sido empregado também com a finalidade de diminuir a fissura e demais efeitos ansiogênicos do crack, na tentativa de descontinuar, permitindo as atividades normais da rotina (Oliveira e Nappo, 2008). Para os especialistas as chamadas dependências cruzadas, ou seja, o uso de duas ou mais drogas simultaneamente, são as mais perigosas, porque não temos idéia de quantos receptores são

estimulados ao mesmo tempo. Uma potencializa o efeito da outra como ocorre com o zirrê (Werner, 2008).

1.3 Histórico da cocaína

A cocaína é uma substancia natural, um alcalóide extraído das folhas do arbusto, o Erytroxylum coca, nativa dos altiplanos dos países andinos, América do Sul, onde a folha é costumeiramente mastigada (Leite e Andrade,1999).

Há referencias de que ela seja consumida pela humanidade há pelo menos cinco mil anos (Escohotado, 1996) e que 3000 a.C era considerada como um presente dos deuses, sendo utilizada em serviços religiosos e que já era conhecida mesmo em civilizações pré-incaicas, no século X a.C. (Escohotado,1966; Johanson,1988).

A etimologia da palavra “coca” provém da língua aymara, originando de “Khoka” que significa árvore, planta ou arbusto (Karch, 1989).

No século XVI (1505), Américo Vespúcio fez na Europa os primeiros relatos sobre o uso da coca e, com a conquista das Américas, os espanhóis passaram a taxar suas plantações. Na Europa, a cocaína não se popularizou de inicio devido à deterioração da planta durante o transporte, permanecendo o seu uso como um costume restrito indígena até o século XIX (Grinspoon et al.,1985; Johanson,1988). Devido as suas propriedades estimulantes centrais que abrandam a fome, a sede e o cansaço, os

habitantes dessa região, há milênios, a utilizam em forma de chá ou mastigando a folha in natura.

Em 1708, Herman fez a primeira publicação científica sobre o assunto, na revista Institutiones Medicae (The Vaults of Erowid).

Entre 1850 e 1855, a coca passou a ser usada como uma forma de anestesia em cirurgias de garganta.

Albert Neimman, em 1859, identificou e isolou a cocaína das folhas do Erythroxylum coca, obtendo o princípio ativo, de natureza básica e função amina, publicou os resultados em uma tese em 1860, e ela passou a ser usada na clínica e em caráter experimental (Das, 1993).

Em 1863, Angelo Mariani produziu um vinho com extrato de folhas da coca, que passou a ser conhecido como “Vin Mariani” (Das, 1993; Karch,1989).

Karl Köller, em 1884, comprovou a propriedade anestésica da cocaína ao realizar uma série de experimentos, instilando cocaína na córnea de animais e de pacientes e utilizou-a em procedimentos oftalmológicos (Byck, 1974; Van Dyke e Byck, 1982).

Freud, também em 1884, foi o primeiro a notar os efeitos neuroestimulantes centrais da droga e começou a utilizá-la em tratamentos de pacientes com vários distúrbios, notadamente psiquiátricos, assim como recurso terapêutico nos viciados em morfina (Chasin e Salvadori, 1996).

Em 1885, John Styth Pemberton preparou um vinho para concorrer com o Vin Mariani, utilizando as folhas de coca, denominado “French Wine

Cola” patenteou como um tônico cerebral, dando origem a um refrigerante muito consumido (Pemberton, 1885).

Em 1890 foi relatado o primeiro caso de morte induzida por cocaína (Karch,1989).

Em 1905, cheirar cocaína torna-se popular e, em 1910, são relatados os primeiros casos de lesões nasais causados pela droga.

Em 1910, presidente americano William Howard Taft declarou a cocaína como inimiga pública número um (Das, 1989).

Em 1911, foi relatado dano letal no miocárdio, pelo uso da cocaína em procedimento anestésico para cirurgia odontológica (Laposata,1991).

Em 1914, foram proibidas bebidas contendo coca nos Estados Unidos e Europa assim como ela foi retirada dos medicamentos nos Estados Unidos. No início da década de 30, ocorreu diminuição do consumo, deixando a droga de ser um problema social (Costa e Andrade, 1999).

Nos anos 70, o consumo volta a aumentar em decorrência da restrição ao consumo das anfetaminas, dos efeitos rápidos e a equivocada divulgação de não causar dependência e, por isso, sendo considerada perfeita para ser usada no meio social (Costa e Andrade, 1999).

Em 1973, the Strategy Council on Drug Abuse, nos Estados Unidos, declarou que a morbidade associada ao abuso de cocaína não parecia ser grande e que não havia mortes confirmadas atribuídas à overdose.

O ano de 1984, no Bronx, Estados Unidos, é considerado como sendo origem do crack, da pasta básica da cocaína; seu efeito mais rápido e potente causou um aumento significativo do seu consumo.

1.4 Formas de uso da cocaína

A cocaína encontra-se disponibilizada para o consumo em formas de pasta (pasta básica), pó (refinada) e pedra (crack). Ela é usada por vias oral, intranasal, intravenosa e respiratória. Por via oral, é facilmente hidrolisada no sistema digestório; a absorção é pequena, resultando discreto efeito e, por isso, pouco usada. Pela via nasal, a droga em forma de pó é aspirada (cheirada); há baixa velocidade de absorção devido às propriedades vasoconstritoras, responsáveis por ulcerações nas narinas e perfuração do septo nasal. A via parenteral é a endovenosa, pois a intramuscular pode determinar necrose tecidual local (Chasin e Salvadori, 1996).

A via preferida, atualmente, é a via respiratória, a forma fumada através da queima do crack, de uso crescente em todas as camadas sociais; o baixo custo favorece a disseminação nas classes mais baixas.

Devido ao alto custo da cocaína refinada, em forma de pó, a droga é frequentemente adulterada, misturando-se uma variedade de substâncias como, pó de mármore, giz e talco, com isso barateando o preço e tornado-a mais acessível (Chasin e Salvadori,1996).

1.5 Cocaína crack

Crack é a forma de cocaína preferida pelo usuário nos dias de hoje; ela é consumida pelo ato de fumar e os usuários utilizam um tipo de cachimbo, conhecido também como maricas, ou estruturas improvisadas

como latas, tubos plásticos ou de papelão, papel alumínio, peças hidráulicas ou mesmo embalagens de produtos alimentícios (Figuras 2). Independente do material utilizado, na cidade de São Paulo esses acessórios são denominados “cachimbo de alumínio”. Considerando que a lata de alumínio é a principal matéria prima, o uso repetido deste tipo de cachimbo, aquecido, pode provocar bolhas e ferimentos, na língua, lábios, faces e dedos; essas lesões poderiam aumentar nos usuários que compartilham os “cachimbos”, o risco das transmissões de doenças infectocontagiosas (Oliveira e Nappo, 2008). A droga, em quantidades tidas como adequadas, em torno de 200 mg (Wood et al.,1996) é queimada nesses receptáculos, utilizando-se de uma chama, e a fumaça aspirada (Figura 3). Após o uso continuo, por alguns dias, pode ser constatada a deposição de um resíduo enegrecido, na parte interna desses cachimbos, denominada “borra, raspa, resina ou sarro”. Esse resíduo pode conter uma forma concentrada de cocaína, em decorrência da sua sublimação e impregnação na parede interna do cachimbo; uma vez removida e fumada possibilita efeitos mais intensos que os da pedra de crack (Oliveira e Nappo,2008). A cocaína inalada (pó) ou fumada (crack) ao atingir a corrente sanguínea tem efeitos comparados aos da via intravenosa (Seibel e Toscano Jr, 2001), porém o crack é seis vezes mais potente do que a cocaína em pó inalada, agindo no Sistema Nervoso Central entre 5 a 10 segundos. O seu baixo custo, associado ao fato de não deixar vestígios externos e não expor o usuário às doenças transmitidas por seringas tem elevado significativamente o seu consumo. O uso compulsivo de cocaína pode se desenvolver mais rapidamente nessa forma de consumo.

Figura 2. Cachimbos e artefatos improvisados,utilizados para se fumar o crack, apreendidos pela Delegacia de Investigação Sobre Entorpecentes (DISE) de Marilia

Podemos observar os diferentes tipos de cachimbos que são utilizados para a queima e o consumo do crack, chamados popularmente de “maricas”.

Figura 3. Menino fumando cocaína crack
Detalhe da improvisação para queima da pedra da cocaína crack (fonte: foto publicada no Jornal Folha de São Paulo em 1992)

1.6 Cocaína crack como problema sócio-econômico, criminal e de saúde pública

A cocaína é uma das drogas mais utilizadas em todo mundo; o seu consumo aumenta constantemente desde 1987, principalmente na forma popularmente conhecida como crack (Das, 1993; Dunn et al., 1997; Ferri et al., 1997; Ferreira Filho et al., 2003).

O seu uso recreativo alcançou proporções epidêmicas, com aumento trágico de mortes por problemas cardiovasculares em jovens saudáveis, tornando-se nos países ocidentais a droga preponderante nos atendimentos nas urgências hospitalares (Billman, 1995b).

Na ultima década do século XIX, houve diminuição do uso da cocaína em decorrência dos problemas relacionados com dependência, comportamento psicótico, convulsões e mortes (Gold, 1993). A volta do consumo ocorreu nos anos 70 por vários motivos, entre eles as maiores dificuldades na comercialização das anfetaminas e a divulgação equivocada de que a droga não causaria dependência.

A cocaína crack por ter se tornado uma droga barata, fácil de obtenção e de se consumir, e com rapidez dos efeitos, tem tido um preocupante crescimento do consumo, principalmente entre aqueles de menor poder econômico (Ferreira Filho et al., 2003).

Em 1997, Woof e seus colaboradores estimaram que, 25-30 milhões de americanos faziam uso de cocaína e em 1999, Li e colaboradores, constataram que números semelhantes já haviam usado a

droga nos Estados Unidos, e que, aproximadamente 6,6 milhões, eram usuários regulares.

Em 2003, o *U.S. Department of Health and Human Services* estimou em 34.9 milhões o número de americanos que usaram cocaína pelo menos uma vez, e que 7.9 milhões desses eram usuários de crack.

No Brasil, até o início do século XX, não havia relato de consumo excessivo e dependência da cocaína. A substância era vendida em farmácia para alívio de laringites e tosse (ação anestésica).

Nas décadas de 10 e 20 (1910/20), iniciou-se o uso não médico da cocaína nas grandes cidades como São Paulo e Rio de Janeiro.

Apesar do nosso país não ser considerado um produtor importante de cocaína, ele faz parte da rota colombiana do tráfico para os Estados Unidos e Europa (Carlini et al.,1995;Ferreira Filho et al., 2001); consta a participação na conexão nigeriana, e outras rotas como a paraguaia e a boliviana, envolvendo interior do Estado de São Paulo e recentemente noticiado rota envolvendo a cidade de Fortaleza (CE). Embora nos últimos anos tenha ocorrido aumento no combate ao tráfico, ainda é grande a quantidade ofertada para o consumo interno e externo e o público-alvo sendo uma idade cada vez menor.

Tem sido demonstrado o aumento crescente do consumo de crack entre os jovens (Dunn et al., 1996; Ferri et al., 1997; Strang et al., 1990 apud Ferreira Filho et al., 2003), de forma epidêmica nos Estados Unidos, sendo que no fim dos anos 80, após a descoberta do crack, um de cada quatro americanos tinha usado cocaína, na classe média com predomínio

da raça branca; foi constatado que 15 % usaram cocaína ou crack e 18 % tendo consumido mais de 50 vezes (Schwartz et al., 1991). No Canadá, usuários de crack entre 13 e 18 anos, representam 2% dos estudantes de Ontário e British Columbia (Spitz e Rosecan, 1987; Smart, 1991apud George et al., 1996).

Pesquisa realizada no Estado de São Paulo em 2001, por Ferreira Filho (Ferreira Filho et al., 2003) revelou que 45,8% dos usuários referiram ser fácil obter cocaína; 36,1% informaram da facilidade de se obter o crack e 98,8% dos envolvidos na pesquisa estavam cientes das graves consequências do consumo dessa droga.

Levantamentos realizados pela Delegacia de Investigações sobre Entorpecentes da Policia Civil do Estado de São Paulo, da região do DEINTER IV (Bauru), compreendendo 89 municípios, entre eles o que originou a droga para essa pesquisa (Marília), registrou a apreensão de 125,983 Kg de crack no ano de 2008. Segundo dados da Secretaria de Segurança Pública do Estado de São Paulo, houve um aumento de 6,9% em relação a 2007 e 34% em relação a 2006, na apreensão de entorpecentes de uma maneira geral.

Ainda pouco se sabe do perfil do usuário, pois um número significativo permanece na clandestinidade pelo uso de droga ilegal e frequente participação em crimes, o que dificulta realização de estudos com ênfase ao problema de saúde (Ferri et al., 1997; Ferreira Filho et al., 2001). Uma porcentagem deles pode ser encontrada em centros especializados de tratamento da dependência química, em delegacias de policia, cadeias,

presídios e hospitais, neste ultimo estando os casos mais graves de saúde relacionados à droga (Ferreira Filho et al., 2003). Há grande número de artigos que relatam a associação da cocaína com infarto do miocárdio.

O perfil dos dependentes de crack, quando comparado com os usuários de outras vias de administração, mostra pior condição socioeconômica, maior desemprego, um grande número sendo moradores de ruas, escolaridade mais baixa, consumidores de maior quantidade de droga, envolvimento mais frequente com violência e criminalidade e, por isso, preso maior número de vezes (Ferreira Filho et al,2003).

Pesquisas no Brasil constataram aumento do consumo da droga em oito de dez capitais e análise da população de meninos de rua em seis capitais mostrou que 47% já tinham usado pelo menos uma vez. As estatísticas ainda revelam que 2 % dos estudantes brasileiros já usaram cocaína mesmo que eventualmente e 0,8 % são usuários freqüentes.

Um levantamento realizado pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID, 2007), do Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, no período compreendido entre 1987 e 1993, mostrou um aumento significativo do percentual de estudantes de 1º e 2º graus que usaram cocaína, em pó ou pedra, pelo menos uma vez na vida, passando de 0,5% em 1987 para 1,2% em 1993.

Em 2003, Ferreira Filho e colaboradores fizeram uma pesquisa do perfil sócio-demográfico e das formas de uso da cocaína, em usuários hospitalizados e em recuperação na grande São Paulo/Brasil. De um total de

440 pacientes internados, 85 % eram menores de 35 anos, a idade variando de 18 a 51, com uma media de 27,5 anos, 95,9% do sexo masculino, 69,8% das classes sociais C, D e E. Desse grupo 38,4% fumavam crack e 1,6% usavam a droga de forma injetável. A faixa predominantemente jovem é decorrente da maior exposição e facilidade para se experimentar as drogas (Ferreira Filho et al., 2003).

Em 2005, nova pesquisa do CEBRID, registrou que 0,7% da população entre 12 e 65 anos dizia ter provado a droga, quase o dobro de quatro anos atrás.

Na cidade de São Paulo, a Secretaria da Saúde estima que 0,9 % da população acima de 12 anos usa a droga regularmente.

Segundo a Secretaria da Saúde do Rio Grande do Sul, há, atualmente, 50000 dependentes no Estado.

Os efeitos do crack são os mesmos das outras formas de uso da cocaína, pois se trata da mesma droga, porém mais potente, devendo ser considerado as outras substâncias presentes no preparo da mesma (França, 2001). Ao atravessar a membrana alveolar, ela provoca efeitos semelhantes aos da via endovenosa, com propriedades simpaticomiméticas e anestésicas locais e com repercussões cardiovasculares. O efeito anestésico é obtido por bloqueio do início e transmissão dos sinais elétricos, mediante uma inibição da permeabilidade para o sódio, durante a despolarização da membrana em células nervosas (Laposata, 1993; Egred e Davis, 2005). Por outro lado, os efeitos no Sistema Nervoso Central, são por bloqueio nos receptores pré-sinápticos, da recaptura dos neurotransmissores,

noradrenalina e dopamina (Laposata,1993) e em nervos periféricos por bloqueio na recaptura dos neurotransmissores serotonina e dopamina (Egred e Davis, 2005). As ações simpaticométicas da cocaína nas células são mediadas por estimulação de receptores α e β adrenérgicos (Egrad e Davis, 2005). A cocaína tem a capacidade de liberar catecolaminas, particularmente adrenalina, de reservas teciduais e estimular a adrenal, influenciando o sistema renina-angiotensina (França, 2001).

A cocaína pode elevar a temperatura corporal pela maior atividade muscular, vasoconstrição por estimulação central com redução da perda de calor e, por fim, pela ação direta sobre o centro termo-regulador, estimulando o aumento de temperatura (França, 2001).

A metabolização resulta a metilecgonidina que tem atividade biológica sistêmica.

Cook et al., (1985) constataram que 50 mg de crack fumados em intervalos de 30 segundos e por 5 minutos, têm efeitos psíquicos e cardíacos semelhantes a 20 mg de cocaína por via endovenosa.

Consta que a média de uso do dependente seja de 4 a 5 g por semana. O uso crônico da cocaína crack leva à tolerância, havendo relatos de que o uso diário excedendo 1g pode ser considerado letal para o adulto (Chasin e Salvadori, 1996). A overdose para humanos varia de 1,0 a 5,0g. São conhecidos, entretanto, efeitos tóxicos com doses menores, assim como usuários resistentes a doses maiores (França, 2001).

Em uma overdose, o usuário, em pouco tempo, torna-se excitado, inquieto, ansioso e perturbado, com reflexos exacerbados, cefaléia,

taquicardia e, por vezes, com fibrilação ventricular e dispnéia, hipertermia, midríase e exoftalmia. Podem ser observados também náuseas, vômitos e dores abdominais, delírio, respiração de Cheyne-Stokes, convulsões e inconsciência. A morte é decorrente de parada cardiorrespiratória.

1.7 Preparo da cocaína crack e aspectos físico-químicos

A pasta básica da cocaína é preparada normalmente acondicionando-se as folhas da coca em tambores com um solvente como éter, gasolina, querosene, ácido sulfúrico, resultando uma pasta que contém de 40 a 85% de sulfato de cocaína (Figura 4). Adicionando-se a essa pasta acido clorídrico, com o objetivo de refinar o produto e limpar as impurezas, obtêm-se um pó branco inodoro, solúvel em água, o cloridrato de cocaína (Figura 5), de custo elevado ao consumidor e, portanto, frequentemente adulterado na comercialização, adicionando-se entre outras substâncias farinha, talco, giz, pó de mármore, cafeína; por isso ela é denominada como cocaína de rua e tem elevado ponto de fusão (198º C) e não pode ser fumada.

A base livre e o crack são alcalóides com semelhanças químicas, mas sintetizados de formas diferentes; com ponto de fusão de 98ºC, pode ser fumado.

O crack é preparado a partir da mistura da pasta básica da cocaína (folha da coca + ácido sulfúrico) com bicarbonato de cálcio, em proporções iguais, utilizando-se água, mistura essa, que após ser aquecida origina um tipo de sabão de cor bege ao amarelo que, com a evaporação da água,

endurece e forma como produto final a “pedra” (Figura 6). A pedra ao ser queimada faz um barulho crepitante (estalo) característico que deu origem à palavra crack; a fumaça gerada é inalada pelo usuário (Corradini, 1996).

A metilecgonidina é o maior produto metabólico da cocaína (formado pela pirólise da base aquecida) tem atividade biológica sistêmica e age na comunicação entre os neurônios, prolongando a ação da dopamina.

Figura 4. Preparo da pasta base de cocaína
Forma de preparação da pasta base, onde pode se observar a forma precária do acondicionanmento da matéria prima - folhas de coca (A); que são colocadas em tambores e misturadas a solventes, como: éter, gasolina, querosene, ácido sulfúrico, etc (B).

Figura 5. Preparo da pasta base de cocaina e purificação
Refinamento artesanal, rudimentar e sem higiene do produto, na tentativa de se livrar das impurezas (A), obtendo-se um pó branco, inodoro e solúvel em água (B).

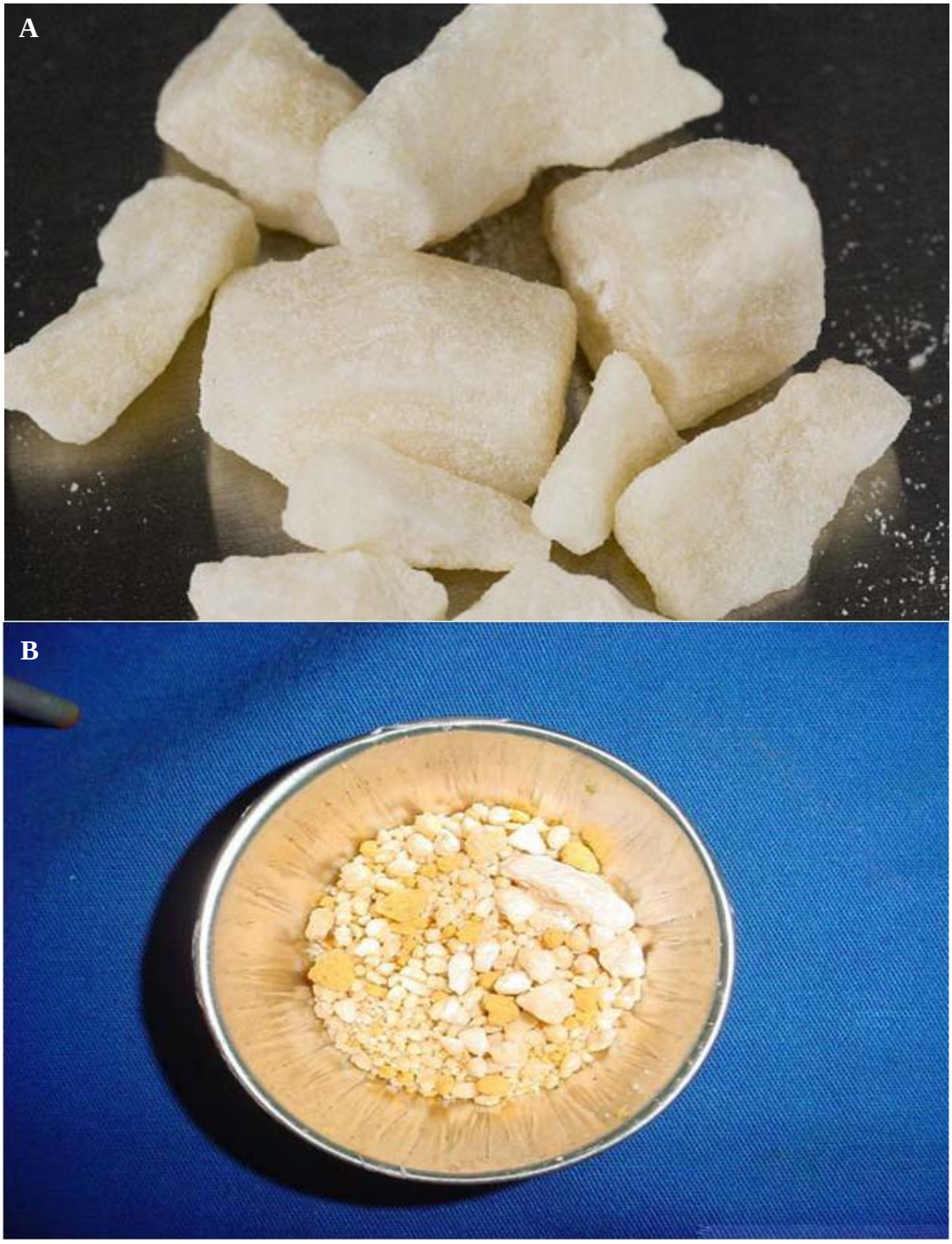

Figura 6. Cocaína Crack
A) Amostra constituída por pedras grandes e de diferentes tamanhos.
B) Amostra utilizada no experimento.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Efeitos da cocaína no sistema cardiovascular

A cocaína tem sido associada a doenças cardiovasculares, aguda e crônica, como infarto do miocárdio, angina, aceleração de aterosclerose, miocardites, cardiomiopatias dilatada e hipertrófica, arritmias, hipertensão arterial, aneurisma dissecante da aorta, trombose, endocardite, aumento da apoptose e malformações em fetos de animais expostos à cocaína na gestação. Ela tem sido responsabilizada pelo crescente índice de morte súbita em jovens.

Há, na literatura, um grande número de artigos fazendo referência aos efeitos e consequências da cocaína no sistema cardiovascular, em humanos e em animais submetidos a experiências com a droga.

Young e Glauber (1947) mostraram pela primeira vez, evidências eletrocardiográficas de disritmias ventriculares intratáveis e severas, provocadas pela cocaína utilizada durante cirurgia nasal.

Willian Hammond, cirurgião geral nos Estados Unidos, provocou aumento rápido e irregular da sua frequência cardíaca ao se auto-administrar alta dose de cocaína; ele, portanto, especulou que a reação letal da cocaína poderia ser consequência de efeitos cardíacos (Byck, 1974).

Desde 1978, o uso de cocaína de forma recreativa tem sido associado a desordens rítmicas cardíacas fatais, particularmente a fibrilação ventricular (Benchimol et al., 1978).

Estudos experimentais em animais anestesiados também demonstraram que a administração de cocaína provocava fibrilação e taquicardia ventricular durante infusão de catecolaminas (Catravas e Waters, 1981); e que as arritmias são mais facilmente induzidas por estímulo elétrico do coração após cocaína intravenosa (Ganterbeg e Hageman, 1992).

Woods et al. (1989), constataram aumento da pressão arterial e diminuição do fluxo sanguíneo uterino, em ovelhas prenhas sob efeito da cocaína.

Hale et al. (1989), concluíram, em modelo experimental com cachorros, que uma rápida administração de cocaína deprime a função ventricular esquerda, dilata o referido ventrículo e está associada com vasoconstrição da coronária e redução do fluxo sanguíneo no miocárdio.

Peng et al. (1989), após análises de biópsias de endocárdio, em pacientes jovens com insuficiência cardíaca congestiva associada ao crack, sugeriram que a cocaína teria efeito tóxico direto. As biópsias mostraram necrose multifocal, sem bandas de contração, o comprometimento focal de miócitos desfavorecendo etiologia isquêmica. Os danos dos miócitos seriam decorrentes dos efeitos do aumento das catecolaminas por bloqueio da recaptura dos neurotransmissores.

Virmani et al. (1989), descreveram os efeitos cardiovasculares da cocaína, em 40 autopsias de pessoas que apresentaram cocaína ou

metabólitos em fluidos do corpo; foi constatada trombose com oclusão total da artéria descendente anterior esquerda associada à aterosclerose leve em um caso, miocardites em oito casos (20%) e necrose em banda em 25%.

Kuhn et al. (1990), demonstraram em cachorros que a cocaína intravenosa produz vasoconstrição em coronárias, não associada com isquemia do miocárdio, e que o mecanismo farmacológico é a estimulação do receptor α adrenérgico, enquanto que os efeitos hemodinâmicos sistêmicos são por combinação de estímulos dos receptores α e β adrenérgicos. Os efeitos simpaticomiméticos, com vasoespamos das coronárias são, portanto, decorrentes de estímulos de receptores α adrenérgicos presentes nas paredes dos vasos sanguíneos.

Billman (1990), em revisão dos mecanismos dos efeitos cardiotóxicos da cocaína, referiu que o estímulo dos receptores β adrenérgicos no coração ativa adenilciclase, com aumento subsequente dos níveis do AMP cíclico e ativação da proteína cinase AMP cíclico dependente, com fosforilização das proteínas reguladoras (canal de cálcio, fosfolamban), que aumentam o nível do cálcio livre nas células miocárdicas.

Laposata (1991) sumarizou o mecanismo de ação da cocaína, com ênfase nas sequelas cardiovasculares. Fez referência aos múltiplos mecanismos de ação da droga, salientando que, quando eles estavam combinados com os efeitos deletérios de substâncias adulterantes, presentes no crack, aumentavam os riscos de vida por respostas cardiovasculares à cocaína. Citou também a grande variedade de adulterantes, conhecidos na época, como procainamida, quinidina,

anfetaminas, lidocaína, benzocaina, fenopropanolamina, pseudoefedrina, açúcar e substâncias inertes como talco e derivados do milho. O autor, citando Ellennhorn (1998), refere que a porcentagem de cocaína no crack apreendido variava de 15 a 90 % e as substâncias contaminantes (impurezas) podendo contribuir para as reações adversas da droga.

Cregler (1991) apontou a cocaína como um novo fator de risco de doenças cardiovasculares.

Billman (1995), em revisão sobre as ações tóxicas da cocaína na função cardíaca referiu que, uma interação complexa de propriedades anestésicas locais e efeitos adrenérgicos poderiam provocar as reações adversas cardiovasculares da droga.

Lee et al. (1995), relataram caso de trombo intraventricular após infarto do miocárdio induzido por cocaína.

Edward et al. (1995), em estudos realizados em seis voluntários do sexo masculino, submetidos à exposição passiva de vapor de 100 a 200mg da cocaína base aquecida a 200 ºC, em uma sala pequena e não ventilada, não demonstraram efeito farmacológico da droga; a pesquisa no sangue foi negativa para cocaína e metabolitos e a quantificação na urina estava abaixo do valor considerado padrão no estudo (300 ng/ml), variando de 22 a 123 ng/ml. Nessa pesquisa, os estudos mostraram que eles absorveram aproximadamente 0,25 mg de cocaína, sendo que para se ter resultado positivo haveria a necessidade de 1mg de absorção como constatado após a injeção dessa quantidade por via venosa.

Bai et al. (1996), demonstraram, em cardiomiócitos de ratos, que o cocaetileno, metabólito da associação de cocaína com álcool, tem efeito mais intenso que a cocaína isoladamente, com ação inotrópica negativa muito mais potente.

Regalado et al. (1996), constataram em crianças que foram expostas à cocaína no pré-natal, variabilidade da frequência cardíaca durante o sono e a vigília, sugerindo diferenças no controle cardiovascular nas crianças expostas em relação àquelas cujas mães não tinham sido expostas à cocaína.

Zafar et al. (1997), publicaram trabalho sobre complicações agudas da intoxicação por cocaína.

Kleerup et al. (1997), publicaram estudo sobre efeito agudo da cocaína intravenosa na pressão arterial pulmonar e frequência cardíaca em usuários habituais de crack.

Woolf et al. (1997), em estudos experimentais, usando a metilecgonidina em animais (Ferret) e em miocárdio humano, demonstraram, relacionado com a concentração da droga, diminuição da frequência cardíaca (efeito cronotrópico negativo), diminuição na taxa de condução nos nódulos sinoatriais e atrioventriculares (efeito dromotrópico negativo) e diminuição da força de contração cardíaca (efeito inotrópico negativo), sendo esse o achado mais importante e correspondendo à diminuição do cálcio intracelular e sugerindo ação nos receptores colinérgicos. O bloqueio de recaptura dos neurotransmissores adrenérgicos em neurônios periféricos contribui para a hiperatividade simpática, com repercussões cardiovasculares, alterações rítmicas via aumento do cálcio intracelular,

isquemia miocárdica por vasoespasmo e aumento da demanda de oxigênio, e necrose em banda também por aumento do cálcio. A cocaína também está relacionada com alteração na função célula endotelial e plaquetas, predispondo à trombose da coronária com isquemia, alterações na função imune da killer cells favorecendo a miocardite de várias etiologias; por fim, o efeito tóxico direto nas fibras musculares pode provocar disfunção cardíaca.

Wang (1999), descreveu a cardiotoxidade induzida por cocaína, pH dependente, demonstrando acidemia e alterações eletrocardiográficas em quatro pacientes, que tiveram reversão do quadro, com normalização da condução cardíaca, após a correção do pH sanguíneo.

Sofuoglu et al. (2000), realizaram estudo dos fatores preditivos da resposta cardiovascular da cocaína fumada em humanos; a pesquisa demonstrou como variáveis associadas com aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial, o sexo masculino, raça negra, maior peso corpóreo e associação com a maconha.

Houser et al. (2000), relataram caso de impacto da cocaína em coração de doador, que desenvolveu cardiomiopatia, constatada na autópsia, salientando a importância da história clínica e do exame toxicológico do doador.

Xiao et al. (2000), demonstraram que a cocaína induz a apoptose em células miocárdicas fetais através da via mitocôndria dependente.

Xiao et al. (2001), concluíram que a cocaína administrada na gestação provoca aumento - dose dependente - da apoptose, em coração de feto de rato, associada ao aumento da atividade da caspase 9, 8 e 3, que

seria responsável por redução importante e permanente de cardiomiócitos, levando a uma variedade de disfunções cardíacas após o nascimento.

Gill et al. (2002), descreveram o papel da apoptose no aparecimento de doenças cardíacas.

Bae e Zhang (2005) sugeriram que a exposição pré-natal de ratas à cocaína aumentou a apoptose em neonatos.

Bae et al. (2005), demonstraram também pela primeira vez, em trabalho experimental com ratas expostas à cocaína no pré-natal, aumento da suscetibilidade ligada ao sexo, para isquemia e injúria de reperfusão do coração dos animais na fase adulta. Embora o mecanismo desse efeito sexo dependente, seja provavelmente multifatorial, a pesquisa sugere que a exposição à cocaína, no período de desenvolvimento fetal, pode determinar uma programação intra-úteros, do padrão de expressão do gen PKCε, que teria papel importante no aumento da sensibilidade do coração à isquemia e à injúria nos animais adultos machos.

Li et al. (2005), descreveram que a cocaína determina apoptose em células do miocárdio de fetos de ratos através do p38 MAPK e da via mitocondrial/ citocromo c.

Portanto, são conhecidos efeitos da cocaína – inclusive do crack, a sua forma fumada -, em humanos e animais submetidos a pesquisas, e as suas consequências para o sistema cardiovascular, decorrentes não só da cocaína propriamente dita, como também dos seus metabólitos, assim como a possibilidade de efeitos tóxicos de outras substâncias presentes no preparo da droga. Como já exposto, seu uso prolongado pode determinar,

hipertrofia ou dilatação ventricular, aterosclerose, vasoespasmo, apoptose de cardiomiócitos, miocardites, necrose em banda, necrose focal por ação direta das catecolaminas e trombose.

2.2 Anatomia e histologia do coração de camundongos

Embora muito menor em tamanho, o coração de camundongos apresenta, em comum com os mamíferos maiores, muitos processos patológicos; o desenvolvimento de animais transgênicos torna o camundongo animal de escolha para pesquisas dessa natureza.

Comparando com cachorro, o camundongo adulto tem o peso corpóreo 1000 vezes menor (25kg *vs* 0,025 Kg), a mesma diferença existente para o peso médio dos corações ou seja de 250 g e 0,25g. Os maiores ramos da aorta de camundongos são semelhantes aos de humanos. As maiores diferenças, quanto ao coração e aos vasos de camundongos, estão no arranjo do sistema venoso do coração; as veias cardíacas são mais proeminentes na superfície epicárdica do ventrículo esquerdo, excedendo, quanto à visibilidade, as artérias coronárias (Michael LH et al., 2004). A arquitetura venosa pode ser confundida com as coronárias, que estão em meio à musculatura, ou seja, intramurais. A observação dos ramos coronarianos em camundongos, portanto, é mais difícil e exige análise microscópica com maior aumento e luz mais intensa. Uma particularidade anatômica no coração de camundongos é que a artéria circunflexa esquerda, que é o maior ramo da coronária esquerda em outros animais e nos humanos, não é o maior vaso nos murinos, mostrando-se

inclusive de forma rudimentar nesses animais. O átrio dos murinos é constituído por pequena massa, apresentando dificuldades para estudos de fibrilação atrial (Wakimoto et al., 2001); a válvula atrioventricular direita não é triscúpide e a válvula mitral é servida por dois músculos papilares que não são independentes da parede ventricular, assemelhando-se mais a trabécula cárnea do que músculo papilar verdadeiro (Icardo e Colvee,1995). O coração de camundongos tem aproximadamente 20 a 30 % de células miocárdicas e o restante sendo compostos de células endoteliais, células musculares lisas vasculares e fibroblastos (Soonpaa et al.,1996). Os cardiomiócitos nos ventrículos podem ser divididos em três camadas, as miofibrilas, na camada média, dispondo-se de maneira preferencialmente circunferencial, enquanto as camadas externa e interna estão dispostas de maneira paralela ou obliqua ao eixo base-ápice (Mclean e Prothero, 1991).

O miocárdio tem uma rica vascularização, composta de arteríolas de paredes relativamente delgadas, vênulas e uma rede bem organizada de capilares (Figura 7). Os pericitos vasculares do miocárdio de camundongos são células extensamente ramificadas, que formam uma camada incompleta em torno do endotélio dos capilares e vênulas pós-capilares (Forbes et al., 1977). Células inflamatórias, como macrófagos e mastócitos, são raras em corações de camundongos, quando comparadas com outras espécies (Gersch et al., 2002), sendo encontradas, ocasionalmente, no pericárdio e junto dos vasos. Em contraste, uma grande quantidade de mastócitos, é encontrada nas adventícias nos troncos arteriais e podem estar envolvidos na regulação do tônus vascular.

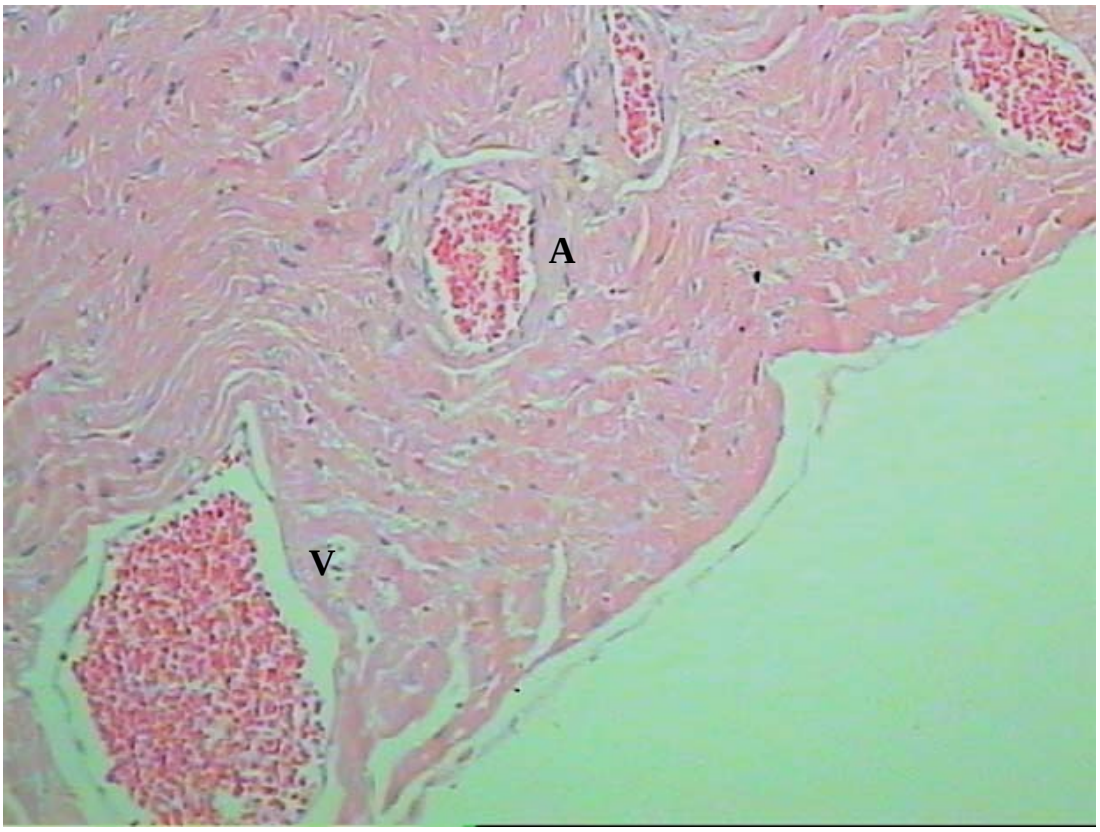

Figura 7. Parede do miocárdio de camundongos (aumento de 400x) Vascularização normal subepicárdica mostrando o proeminente componente venoso(V) da região, em relação ao componente arterial (A).

3. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A cocaína crack representa um grave problema social, policial e de saúde pública. O comprometimento das funções cardiovasculares tem tido um crescimento preocupante no índice de mortalidade, principalmente entre jovens.

Apesar de a literatura registrar um grande número de artigos fazendo referências a complicações cardiovasculares da cocaína, há ainda pontos a esclarecer. A sua frequente associação com outras drogas, as limitações em se quantificar e qualificar a composição do crack consumido, as formas diferentes do seu uso e a faixa etária predominante jovem do usuário justificam novas pesquisas, para se ampliar os conhecimentos sobre os efeitos dessa droga, particularmente em corações.

4. OBJETIVO

Avaliar o efeito crônico em doses não letais da cocaína crack de uso popular, apreendido na rua, no coração de camundongos, expostos à fumaça da droga e modulados pela idade (pré-puberal e adulta); e utilizando-se um modelo experimental, construído de modo a simular como a droga é consumida habitualmente.

5. MÉTODOS

O presente estudo (Protocolo de Pesquisa n° 581/05) teve aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), em sessão de 28 de Julho de 2005, conforme documentação apresentada no Apêndice A.

5.1 Protocolo do estudo

5.1.1 Animais

Foram utilizados 24 camundongos machos da linhagem isogênica BALB/c, de duas diferentes idades, 21 dias representando animais jovens e 60 dias representando animais adultos, provenientes do Biotério de Criação da Faculdade de Medicina USP e mantidos no Biotério do Departamento de Patologia da FMUSP, durante o período experimental. Essas instalações estão de acordo com as normas do Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Intitute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, D.C. 1996 e junto aos princípios éticos da legislação brasileira e Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

5.1.2 Material teste - droga utilizada no projeto

A droga teste, cocaína crack, foi conseguida através de autorização Judicial, concedida pela 3ª Vara Criminal, Execuções Criminais - Corregedoria dos Presídios e da Polícia Judiciária – Poder Judiciário da Comarca de Marília/SP, para uso exclusivo neste estudo (Apêndice B).

A droga teve como origem uma única fonte, tendo sido apreendida pela Delegacia de Investigação sobre Entorpecentes de Marília (D.I.S.E.), pertencente à Polícia Civil de São Paulo, DEINTER IV Bauru – Secretaria dos Negócios da Segurança Pública e o lote lacrado pelo Núcleo de Perícias Criminalísticas de Marília – São Paulo (lacre nº 0047430), contendo 195,2 g da droga “in natura” (Apêndice C). Esse lote, contendo o material-teste foi submetido à análise quanto à porcentagem de cocaína presente em sua composição, pelo Núcleo de Toxicologia Forense (NTF) do Instituto Médico Legal de São Paulo (IML/SP), sendo detectado pela cromatografia gasosa, 57,66 % de cocaína na composição da amostra (Apêndice D).

5.1.3 Grupos experimentais

Vinte e quatro camundongos machos BALB/c, jovens e adultos, foram previamente adaptados às condições do laboratório durante três dias e, posteriormente, separados em quatro grupos, dois para a exposição e dois como controles, denominados:

- Grupo Exposto Jovem: (n=06) camundongos BALB/c, macho de 21 dias de idade - submetidos à exposição da cocaína crack.

- Grupo Exposto Adulto: (n=06) camundongos BALB/c, macho de 60 dias de idade - submetidos à exposição da cocaína crack.
- Grupo Não Exposto Jovem: (n=06) camundongos BALB/c, macho de 21 dias de idade – não exposto a cocaína crack.
- Grupo Não Exposto Adulto: (n= 06) camundongos BALB/c, macho de 60 dias de idade. - não exposto a cocaína crack.

5.1.4 Exposição

Os dois grupos de animais, jovem e adulto, escolhidos como expostos, foram submetidos à exposição da fumaça gerada pela queima da droga apreendida, utilizando-se um dispositivo confeccionado exclusivamente para o experimento.

Os animais foram expostos à queima diária de 5g da droga, por 5 minutos, exceto os fins de semana e feriados, perfazendo um total de 39 dias em um período de dois meses.

A amostragem (5g) foi pesada, acondicionada em recipientes apropriados de alumínio (formas de empadas) e protegida por um invólucro de plástico delicado, até sua utilização no experimento (Figura 8).

O modelo de exposição (dispositivo) foi projetado e montado, de maneira que oferecesse condições para que os animais inalassem a cocaína crack queimada, simulando a maneira como o crack é usado nas ruas, ou seja, na sua forma fumada.

O modelo é composto de:

1. Suporte de apoio, lamparina, recipientes para queimar a droga e funil - Suporte de ferro, para sustentar o recipiente de alumínio (forma de empada), onde a droga é acondicionada para a queima (5g). Lamparina como geradora de chama, produzida por álcool etílico 92,8º INPM. A chama com finalidade de provocar o aquecimento da base do recipiente, e promover a queima das pequenas pedras de crack da amostragem, e a fumaça gerada direcionada ao funil de pirex, localizado sobre o suporte (Figura 9).
2. Câmara de inalação - caixa de acrílico transparente de 45 cm de comprimento, 35 cm de largura e 13,5 cm de altura, hermeticamente fechada, local onde foram mantidos os animais para a exposição (Figura 10). Os grupos jovens e adultos foram separados por uma rede de malha grossa, subdividindo a câmara em dois ambientes de dimensões proporcionais. Para que a fumaça produzida pela queima do crack fosse direcionada à câmara de inalação, um funil coletor, sobre o recipiente de alumínio aquecido, foi conectado a uma mangueira de silicone e essa adaptada a um orifício lateral da câmara de inalação.

Figura 8. Recipientes para queima da droga
Recipientes metálicos (tipo formas de empadas) com a quantidade diária da droga a ser inalada (5g), cobertos por invólucros (filme) de plástico.

Figura 9. Componentes utilizados para a queima e produção de fumaça da cocaína crack
a) lamparina; b) pedras de crack em recipiente de alumínio; c) funil de captura de fumaça; d) mangueira de silicone; e) conector em Y.

Figura 10. Câmara de inalação
Câmara de inalação, confeccionada em acrílico, onde os animais foram colocados e divididos em dois grupos, jovens e adultos, separados por uma malha divisoria.

3. Controle do fluxo da fumaça-bomba de vácuo, conectada por mangueira à câmara de inalação, em orifício destinado à saída da fumaça, localizado na parede lateral em posição oposta ao orifício de entrada, criando-se pressão negativa de ar dentro da câmara. A pressão foi controlada por válvula de vazão e medida por um fluxômetro, estabelecendo-se um fluxo considerado ideal de 20 litros/minuto (Figura 11). A fumaça oriunda da queima do crack, portanto, foi direcionada para dentro da câmara, pela pressão negativa controlada, permitindo a entrada, total dissipação e a saída da fumaça capturada pelo funil.

Para se manter a câmara com oxigênio, um conector em forma de "Y" foi adaptado à mangueira de entrada da fumaça, permitindo que ar ambiente e a fumaça, oriunda da queima do crack, entrassem na câmara em igual proporção.

Todo o período de duração da exposição foi realizado em capela de exaustão, sob pressão negativa de ar, para que o resíduo da fumaça tóxica fosse eliminado, para o exterior (Figura 12).

Os grupos-controle, dos animais não expostos, permaneceram no biotério, em condições favoráveis, durante todo período experimental.

Todos os animais receberam alimentação comercial balanceada para camundongos e água ad libitum. Foram realizadas pesagens periódicas (semanal e quinzenal) e análises diárias do comportamento, assim como eventual registro de morte de animais.

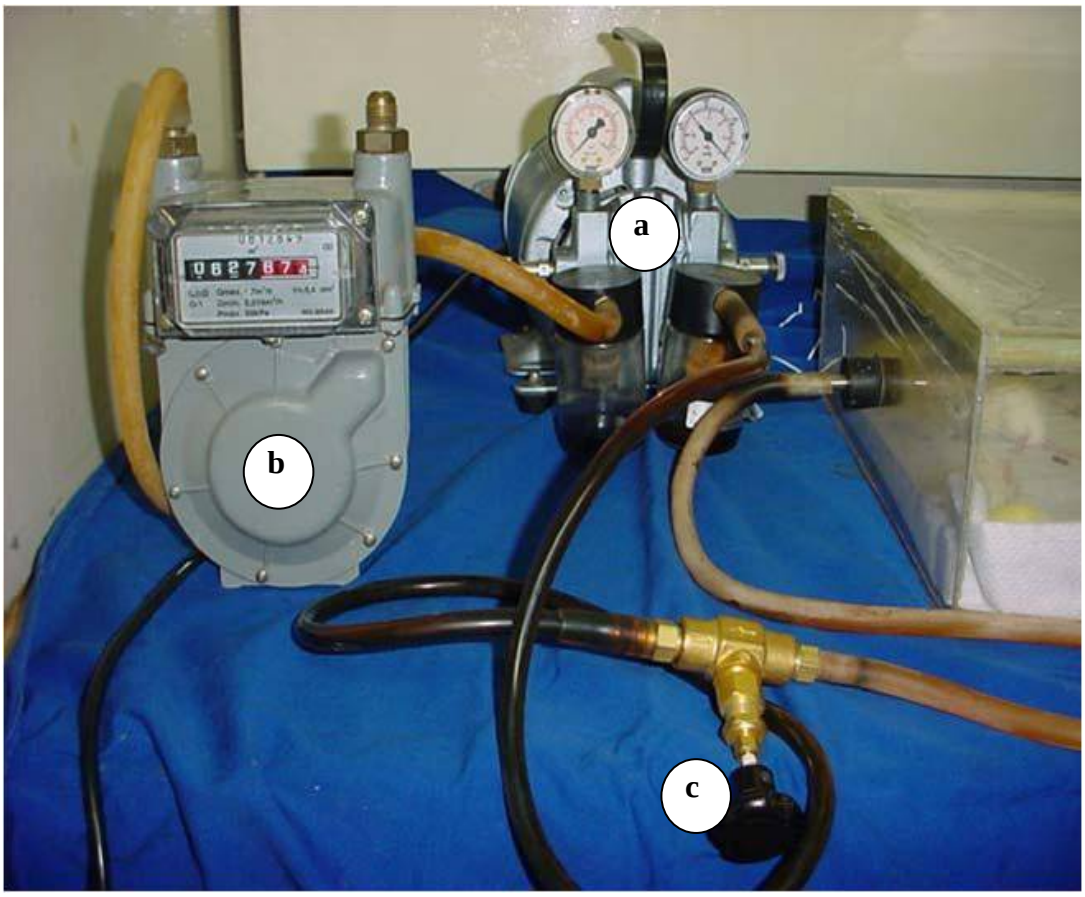

Figura 11. Controle de fluxo da fumaça
Aparelhagem utilizada para controle de pressão negativa, do fluxo de ar e da fumaça, no interior da câmara de inalação. a) bomba de vácuo; b) fluxômetro; c) válvula controladora de vazão.

Figura 12. Modelo experimental completo
Modelo experimental completo sob capela de exaustão, constituído por lamparina, suporte de ferro, recipiente para a droga, funil de pirex, câmara de inalação com as mangueiras de entrada e saída da fumaça, bomba de vácuo, fluxômetro e válvula de controle de vazão.

5.2 Pesagem e coleta do sangue para análise

Após os 39 dias de exposição, excetuando-se os fins de semana e feriados (período de dois meses), os animais foram pesados por grupos, anestesiados com pentobarbital (50 mg/kg de peso corpóreo) e submetidos à eutanásia e autópsia, sendo coletados para análises sangue dos expostos e corações de todos os animais.

Foram submetidos à coleta de 1 ml de sangue da aorta abdominal, colocados em tubos previamente heparinizados, refrigerados a 4°C, para determinação da cocaína sérica, através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, exame realizado no Departamento de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo/SP.

5.3 Exames anatomopatológicos dos corações

5.3.1 Preparo do tecido

Os corações após serem retirados da cavidade torácica foram lavados com soro fisiológico, pesados, analisados macroscopicamente e imersos em formalina tamponada (formol a 10 %) pelo período de 24 horas. Após a fixação, os corações foram seccionados perpendicularmente (cortes transversais), em três níveis: o superior, próximo aos vasos da base; o médio, na região das válvulas e o inferior acima da ponta, submetidos à desidratação, diafanização e incluídos em parafina.

Foram realizados cortes histologicos de 3-4 micras de espessura, sendo colocados os três niveis de cada coração na mesma lâmina e submetidos às colorações histoquímicas e imunoistoquímica.

5.3.2 Técnicas de coloração

Foram utilizadas as colarações histoquímicas de Hematoxilina – Eosina e Picro Sirius e a Imunoistoquímica através do TUNEL.

As técnicas de coloração empregadas foram as seguintes:

5.3.2.1 Técnica de coloraçâo da hematoxilina eosina – H&E

Após corte do material em micrôtomo, a 4 micras, o tecido foi montado em lâminas as quais foram colocadas na estufa à 58ºC; uma vez o tecido aderido as lâminas foram desparafinizadas em xilol, submetidas à hidratação, passando por banhos de álcool em concentrações de 99%, 95% e 70%; a seguir foram lavadas em água corrente e coradas com solução de Hematoxilina de Harris por 5 minutos. Foram lavadas novamente com água corrente e colocadas na solução de Eosina por um minuto; em seguida submetidas ao processo de desidratação em álcool em concentrações crescentes de 70%, 95% e 99%, passagem pelo xilol, e montadas com balsamo do Canadá.

5.3.2.2 Técnica empregada na coloração das fibras de colágeno – Picro-sirius

Após a microtomia, as lâminas desparafinadas, foram submetidas ao Picro-sirius por uma hora, lavadas em água, imersas na hematoxilina de Harris por cinco minutos e lavadas novamente em água; e em seguida com passagens pelo álcool 95%, 100% e xilol e montadas em balsamo ou entelan.

Nas avaliações controles, as estruturas do tecido conjuntivo contendo colágeno coram-se em vermelho,os núcleos em azul e o tecido muscular e o epitélio em rosa ou amarelo.

5.3.2.3 Técnica empregada na marcação de núcleos em apoptose - TUNEL

O metodo do TUNEL foi realizado usando a deoxinucleotidil transferase (TdT) (Boehringer Mannehein, Mannehein, Germany) (Gavrieli et al., 1992; Wijsman et al.,1993), seguindo o protocolo do Laboratório de Imunoístoquímica do Departamento de Patologia da FMUSP: as lâminas desparafinizadas em três banhos de xilol de 5 minutos cada (um a 60 graus e dois a temperatura ambiente), reidratadas em gradiente de etanol, incubadas em Proteinase K por 15-30 minutos, à temperatura ambiente, lavadas duas vezes em PBS por 5 minutos e secadas as áreas em torno da amostra; logo após, pipetado uma quantidade de 50 µl da mistura (reação TUNEL), - 5 µl da solução de enzima (tubo 1) e 45µl da solução de marcador (tubo 2) - por amostra, e incubadas sob parafilme em câmara úmida a 37º C

por 60 minutos; as lâminas são então lavadas seis vezes por 3 minutos em PBS (neste ponto as amostras podem ser observadas no microscópio de imunofluorescência), secadas novamente em torno da amostra, incubadas cada uma com 50 µl do conversor de Peroxidase sob parafilme em câmara úmida a 37º C por 30 minutos; em seguida, lavadas 3 vezes em PBS por 5 minutos, incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos com 50 ul de DAB (0,2% + H2O2 0,05% em PBS); lavadas por 3x em PBS, contra coradas com verde de metil, secadas ao ar, submetidas a banhos rápidos em álcool anidro e xilol; posteriormente foram submetidas à desidratação por butanol e banho de xilol e montadas em lamínulas após lavagem em água destilada. Para o controle negativo foi pipetado só o número 2 do KIT.

As avaliações de lâminas controles evidenciaram os núcleos das células em apoptose coradas em marrom e as células sem apoptose com os núcleos corados em azul.

5.3.3 Análise morfométrica

5.3.3.1 Quantificação morfométrica dos vasos sanguíneos e dos cardiomiócitos

Foram realizadas análises morfométricas quantitativas, dos vasos sanguíneos arteriais, em lâminas coradas pelo Picrus-sirius e fibras miocárdicas coradas pelo H&E e TUNEL, utilizando-se retículo de pontos, confeccionado em acetato e acoplado em um monitor SM 20 Gradiente e um microscópio Nikon Eclipse E 200. Foi utilizada objetiva de 40x, correspondendo a um aumento de 400x e o campo equivalente a

aproximadamente 5625 μm². Foram analisados três a seis ramos arteriais intramurais, do ventrículo esquerdo de cada lâmina, quantificando-se a luz, a média e a adventícia e três campos microscópicos de cada parede ventricular, tanto esquerda como direita, perfazendo o máximo de dezoito campos microscópicos por lâmina, quando estavam todos os cortes representados, tendo em vista as dimensões do ventrículo direito. As leituras foram feitas por dois observadores, com um coeficiente de erro menor do que 5 %.

A morfometria, por esse sistema de retículo dos pontos, dos ramos arteriais intramurais, avaliou a relação (proporção) entre a luz e a parede dos vasos sanguineos (L/P), em cortes transversais, determinando-se o número de pontos atingindo as luzes ou as paredes. Os ramos arteriais selecionados foram centrados e posicionados dentro dos limites do retículo e as áreas do lumen e da parede calculadas (Figura 13).

A morfometria das paredes ventriculares, nas lâminas coradas pelo H&E, foi utilizada para contar o número de núcleos das fibras miocárdicas, coincidentes com as linhas do retículo, excluindo-se a primeira linha vertical à esquerda e a superior, em relação ao observador; o objetivo, a pesquisa de adaptação celular (remodelamento cardiaco).

A morfometria pelo retículo nas lâminas coradas peloTUNEL, pela mesma metodologia acima, teve o objetivo avaliar injúria celular, através do número de núcleos com apoptose.

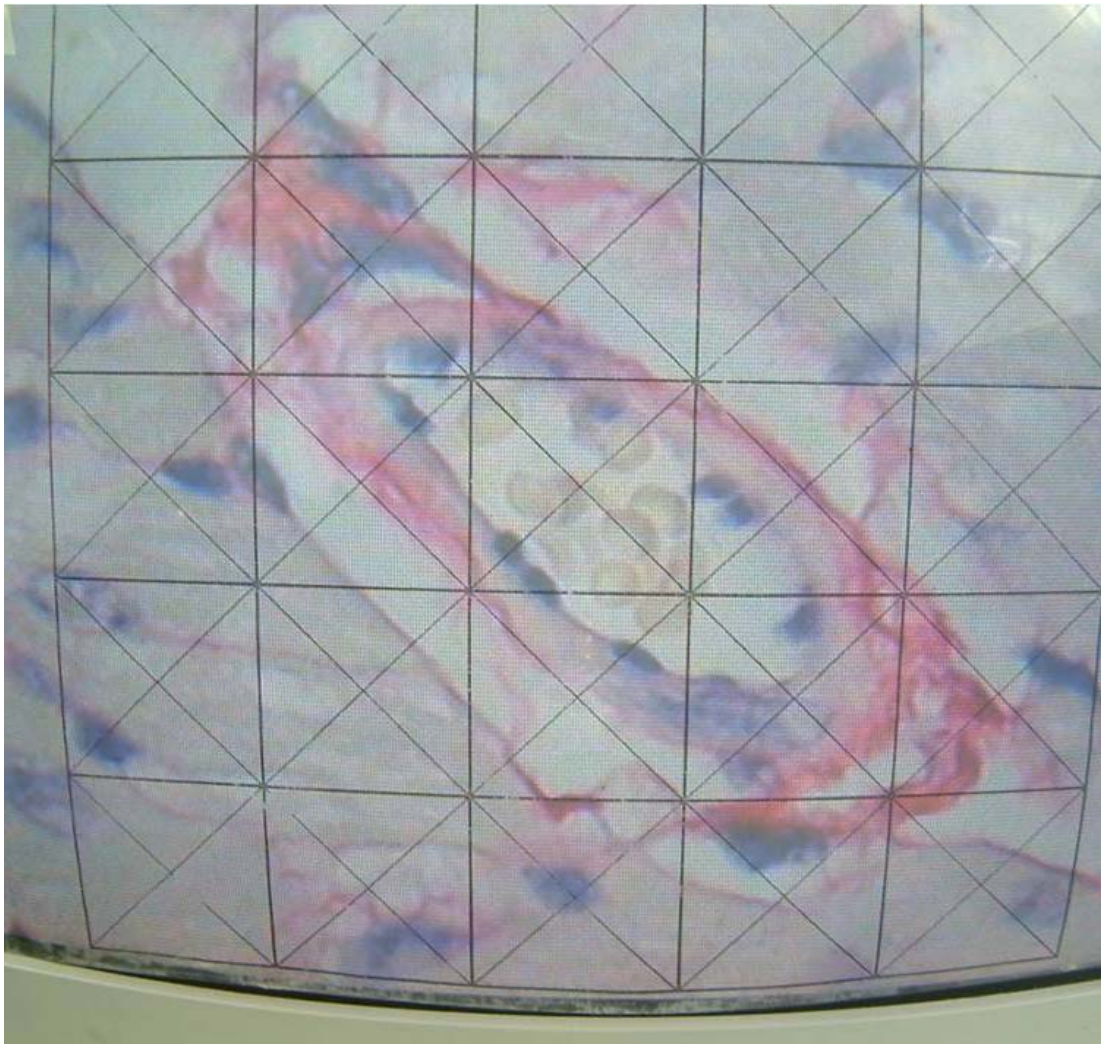

Figura 13. Retículo de pontos
Grade reticulada e acoplada ao monitor, utilizada para as análises morfométricas. Pode-se observar na tela do monitor um ramo coronariano intramural.

5.3.3.2 Quantificação das fibras colágenas

As lâminas coradas pelo Picro-sirius, foram submetidas à polarização e as imagens capturadas, utilizando-se um Sistema Analisador de Imagem, consistindo de uma câmara Olympus, acoplada ao microscópio Olympus, e as imagens foram enviadas a um monitor LG e processadas por um software, (Image Pró-Plus 6.0) (Figura 14), através de sistema de digitalização (Oculus TCX, Coreco Inc; St Laurent, Quebec, Canada), inserido em um computador (Pentium 1330 Mhz). Para cada lâmina, contendo os três níveis de clivagem do coração, foram analisadas, todas as camadas de 3 a 6 ramos arteriais coronarianos intramurais do ventrículo esquerdo e até dezoito campos microscópicos do insterstício, de ambos os ventrículos, sempre em aumento de 400x. Deve ser salientado, que a espessura do ventrículo direito, em decorrência de várias microtomias, não permitiu a análise de dezoito campos microscópicos em algumas lâminas. A quantidade de fibras colágenas, no compartimento vascular e no interstício do miocárdio, foi medida e expressa, como uma relação entre a quantidade de fibras dividida pelo total das áreas estudadas, das artérias e interstício, respectivamente. Os resultados finais demonstraram a quantidade de fibras colágenas per total (área) (Rizin et al., 2005).

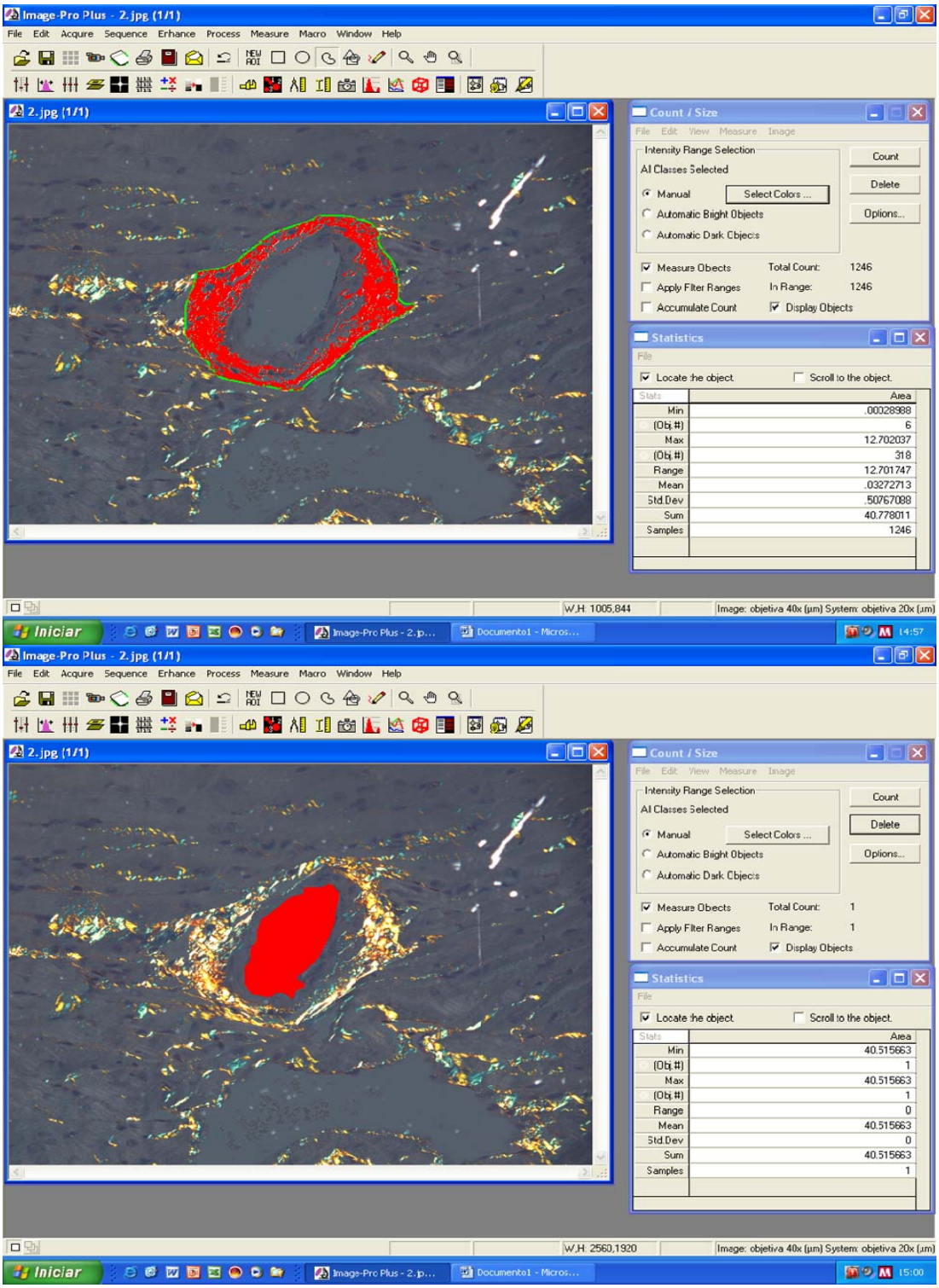

Figura 14. Programa Image Pro-Plus
Mostrando a quantificação do colágeno na parede do ramo coronariano intramural.

5.3.4 Análise estatística

Todos os dados obtidos foram analisados mediante testes estatísticos para comparação, baseados nos tipos de distribuição das variáveis. Os dados estatísticos desta forma foram submetidos às Análises pela One-Way-ANOVA e Modelo Linear Generalizado, usando-se como variáveis dependentes cada um dos parâmetros patológicos medidos e considerando como variáveis preditivas, indicadores categóricos da exposição e idade. Foi utilizado o programa estatístico SPSS v.15.0 As diferenças foram consideradas significantes quando $p<0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Dados gerais e comportamento dos animais

Nos registros diários dos animais, no biotério e na câmara de exposição, não foram constatadas alterações, no comportamento dos animais, em quaiquer dos grupos, assim como não foi registrado nenhum óbito.

6.2 Peso dos animais

Não houve variação significativa do peso nos animais adultos tanto expostos como controle e o aumento de peso nos animais jovens não foi influenciado pela exposição da cocaína crack, como pode ser mostrado na Tabela 1.

Durante o período de dois meses da pesquisa e trinta e nove dias de exposição à fumaça de cocaína crack, a variação de peso dos animais, nos diferentes grupos experimentais, não foi significativa (Figura 15).

Tabela 1. Peso médio dos animais nos diferentes grupos experimentais.

Grupo	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Controle Adulto	21,80	25,90
Controle Jovem	12,10	24,20
Exposto Adulto	20,80	23,40
Exposto Jovem	11,50	22,60

Peso dos animais no início e no final do experimento, mostrando equivalência dos grupos; portanto não foram encontradas diferenças entre os grupos controles e expostos. Pesagem realizada por grupos.

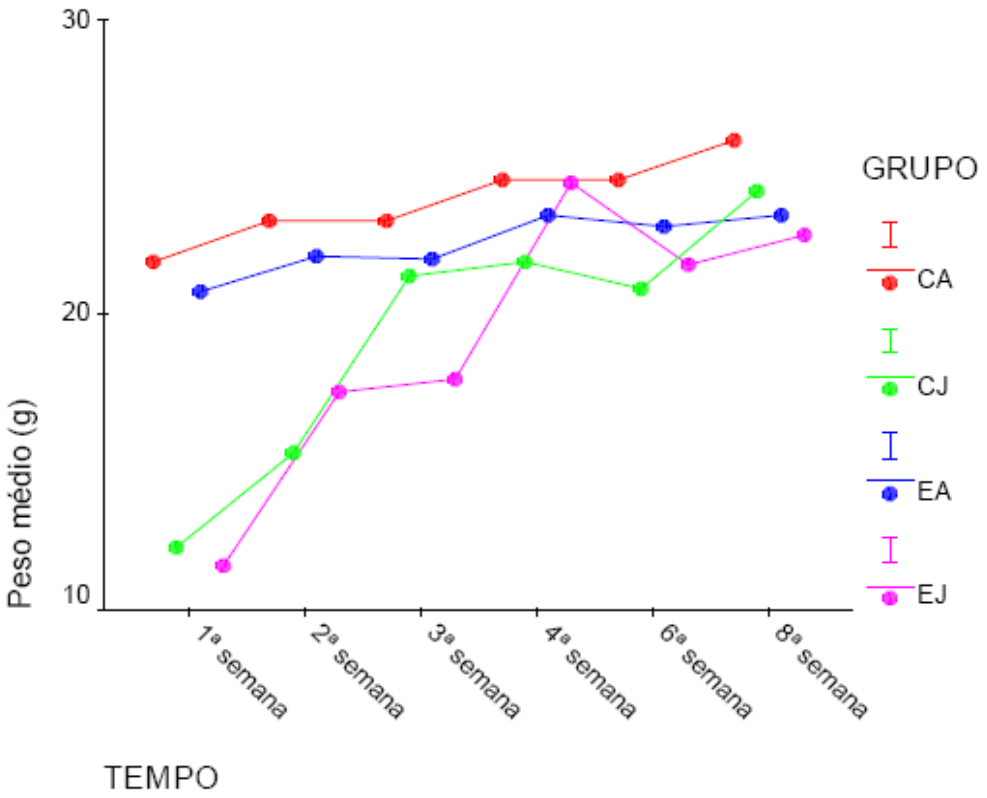

Figura 15. Peso médio dos animais
Representação gráfica dos pesos médios dos animais dos grupos experimentais, com medidas semanais ou quinzenais. O peso médio dos animais do grupo exposto jovem (EJ), durante a 2ª, 4ª e 6ª semanas do experimento, alcançou valores maiores em relação aos animais do grupo controle jovem (CJ). Os animais do grupo exposto adulto (EA) mantiveram os pesos médios menores em relação ao grupo controle adulto (CA).

6.3 Concentração sérica de cocaína

A coleta de sangue dos animais expostos mostrou um valor médio de 212,5 ng de cocaína/ml, utilizando-se a análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.

Para fins comparativos, a dose letal de cocaína em humanos é de 1000 a 25000 ng/ml de sangue.

6.4 Análise dos corações – exame anatomopatológico

6.4.1 Peso dos corações

Ambos os grupos de animais expostos, adultos e jovens, apresentaram diminuição do peso dos corações, quando comparados respectivamente aos grupos controles: Exposto jovem (0,117 ± 0,010), exposto adulto (0,133 ± 0,012), controle jovem (0,124 ± 0,012, $p<0,019$) e controle adulto (0,164 ± 0,019), $p=0,001$), (Tabela 2).

Não foram evidenciadas alterações macroscópicas nos ramos coronarianos principais, hiperemia em pericárdio ou alterações da cor do miocárdio, assim como valvulopatias.

Tabela 2. Pesos médios dos corações por grupos.

Grupo	Peso (Média)	Peso (Desvio padrão)
Controle Adulto	0,164	0,019
Controle Jovem	0,124	0,012
Exposto Adulto	0,133	0,012
Exposto Jovem	0,117	0,010

Mostrando diminuição significativa dos pesos dos corações, dos grupos dos animais expostos adultos ($p= 0.001$) e jovens ($p< 0.001$).

6.4.2 Estudo das fibras cardíacas – microscopia convencional (H&E)

Em ambos os ventrículos, foi observado pequeno número de fibras miocárdicas com aumento da eosinofilia do citoplasma e irregularidades nucleares, predominantemente nas regiões do endocárdio e próximas ao pericárdio, sugerindo apoptose (Figura 16).

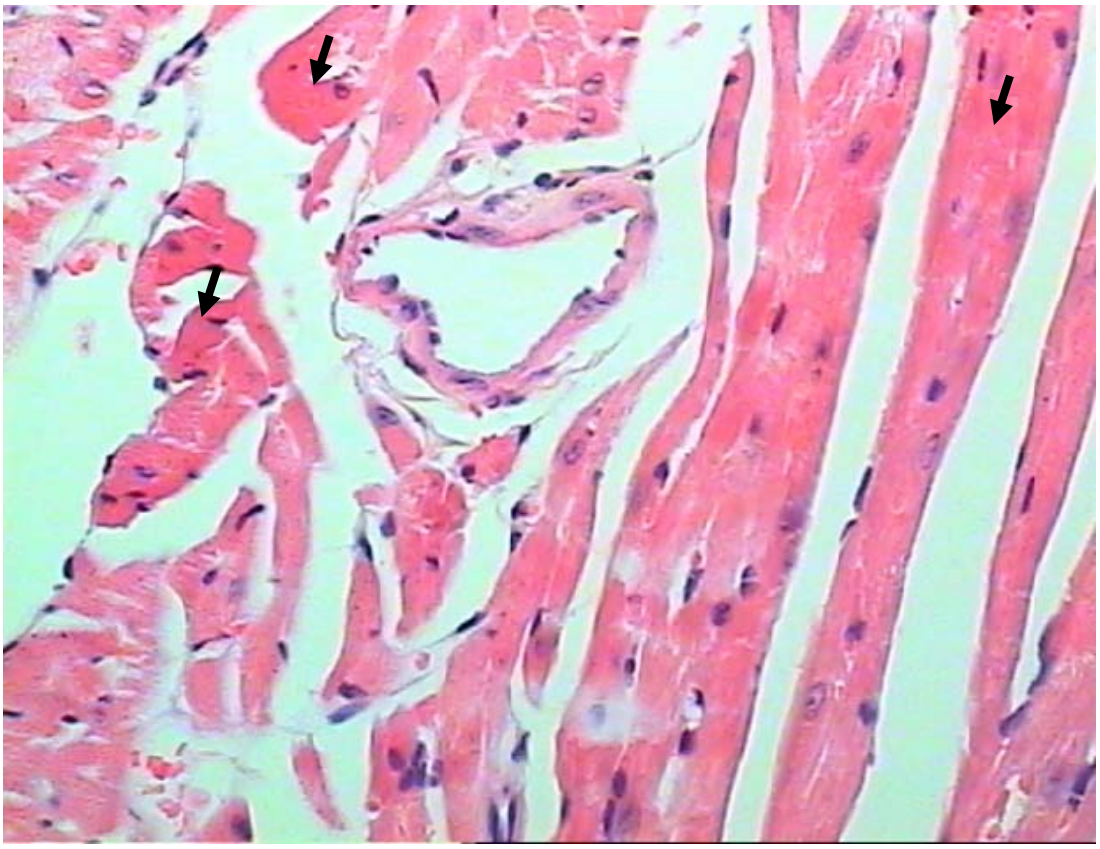

Figura 16. Apoptose de células miocárdicas
Áreas de hialinização citoplasmática (setas) de fibras miocárdicas caracterizando apoptose celular (Hematoxilina Eosina, 400x).

6.4.3 Estudo das artérias coronárias intramurais - morfometria

Na microscopia do coração, em lâminas coradas pelo Picro-sirius, observou-se nos animais expostos discreto espessamento da parede de alguns ramos arteriais intramurais, alguns com alterações favorecendo diminuição das luzes por vasoespasmo, ou seja, vasoconstrição (Figura 17).

A contagem dos pontos coincidentes na luz e parede dos ramos coronarianos intramurais mostrou uma redução significativa na relação luz/parede (L/P) nos animais expostos, independente da idade, quando comparados com os grupos controles, favorecendo o vasoespasmo, com $p < 0,01$. Exposto jovem e controle jovem (1,70 ± 0,26 vs 2,21 ± 0,30). Exposto adulto e controle adulto (1,19 ± 0,17 vs 1,87 ±0,19) (Figura 18).

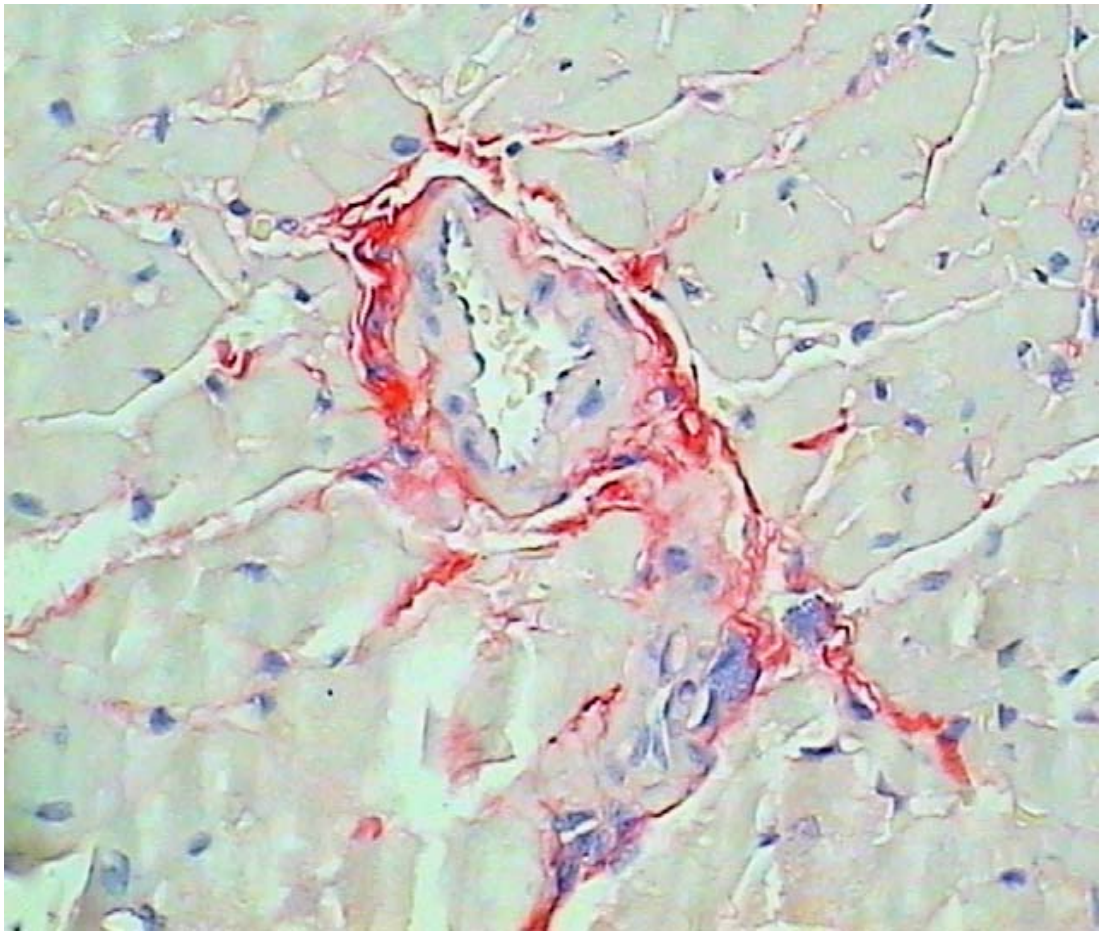

Figura 17. Remodelamento da parede vascular
Diminuição da luz vascular sugestiva de vasoespasmo em artéria coronariana intramural (Picro sirius 400x).

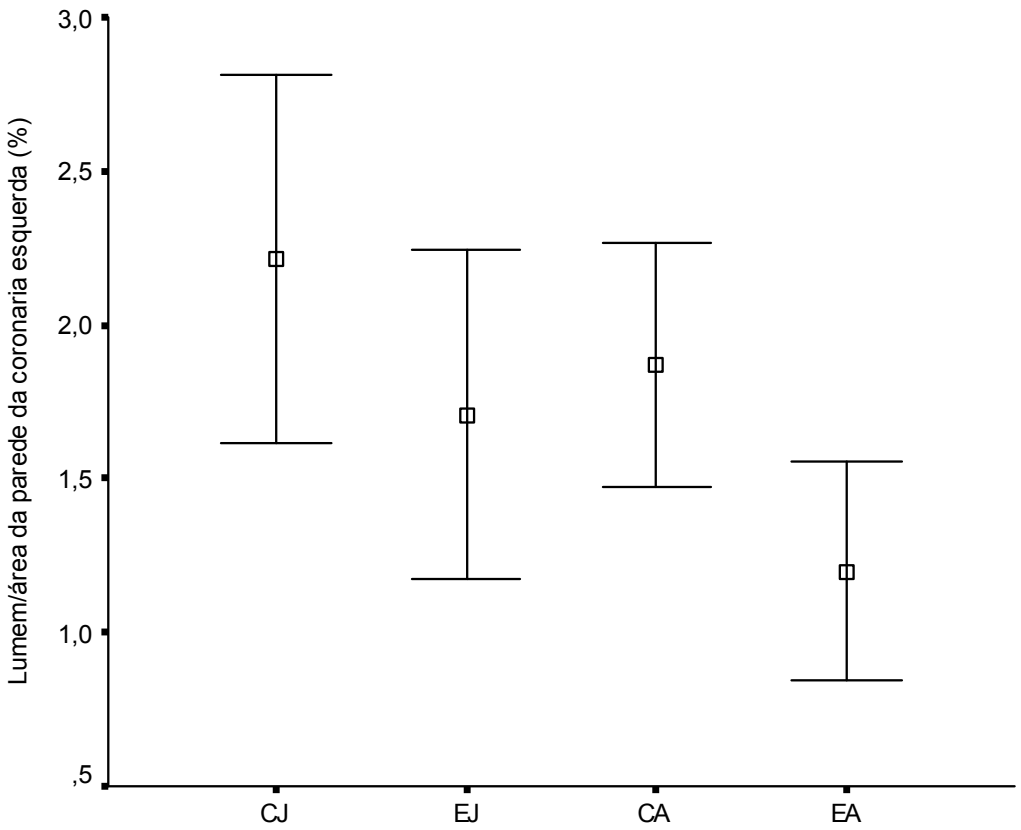

Figura 18. Relação luz/parede da coronária esquerda
Representação gráfica das médias da relação luz/parede de artérias coronárias intramurais, determinadas para os quatro grupos experimentais. As barras representam o erro padrão da média. A exposição ao crack promoveu redução desta relação para ambos os grupos ($p<0,01$) independentemente da idade de exposição, favorecendo vasoconstrição.

6.4.4 Estudo das paredes ventriculares – morfometria (H&E)

A morfometria pelo retículo de pontos das paredes ventriculares, em coloração pelo H&E, constatou aumento significativo do número de núcleos (densidade nuclear) das fibras miocárdicas de ambos os ventrículos dos animais expostos jovens, o mesmo não acontecendo nos animais expostos adultos. Os achados de maior número de núcleos no grupo exposto jovem caracterizam atrofia, quando comparado com o grupos-controle, tanto no ventrículo direito (Exposto jovem 19,49 ±4,72 vs controle jovem 14,39 ± 3,16, $p<0,001$), como esquerdo (Exposto jovem 16,54 ± 3,56 vs controle jovem 14,03 ± 2,81, $p<0,002$). Nos animais expostos adultos não se constatou maior número de núcleos quando comparados com respectivo grupo controle, não sendo caracterizado, portanto, atrofia de fibras miocárdicas (Figuras 19 e 20).

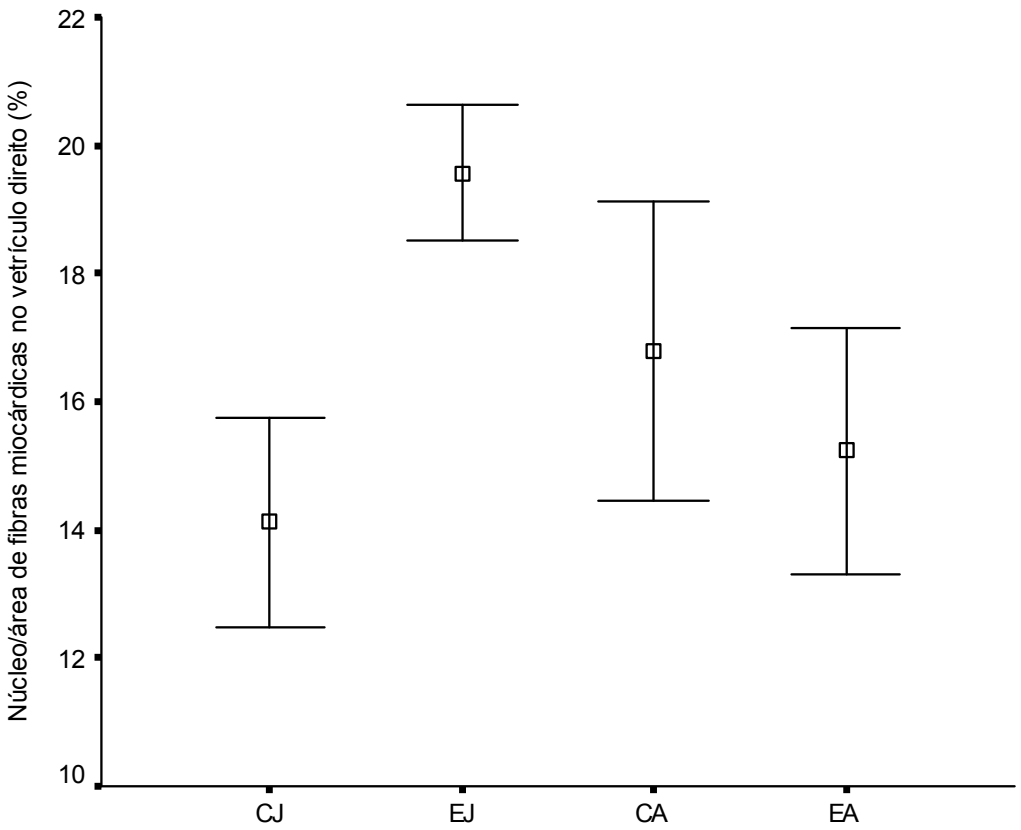

Figura 19. Relação núcleo/área das fibras miocárdicas do ventrículo direito
Representação gráfica do valor médio (± DP) do número de núcleos, em 5675 µm² de miócitos no ventrículo direito de camundongos expostos à inalação de crack, antes da puberdade e na fase adulta, bem como os seus respectivos controles. Houve aumento significativo ($p < 0,01$) da densidade numérica de núcleos de miócitos nos animais expostos, na fase pré-puberal, sugerindo atrofia miocárdica.

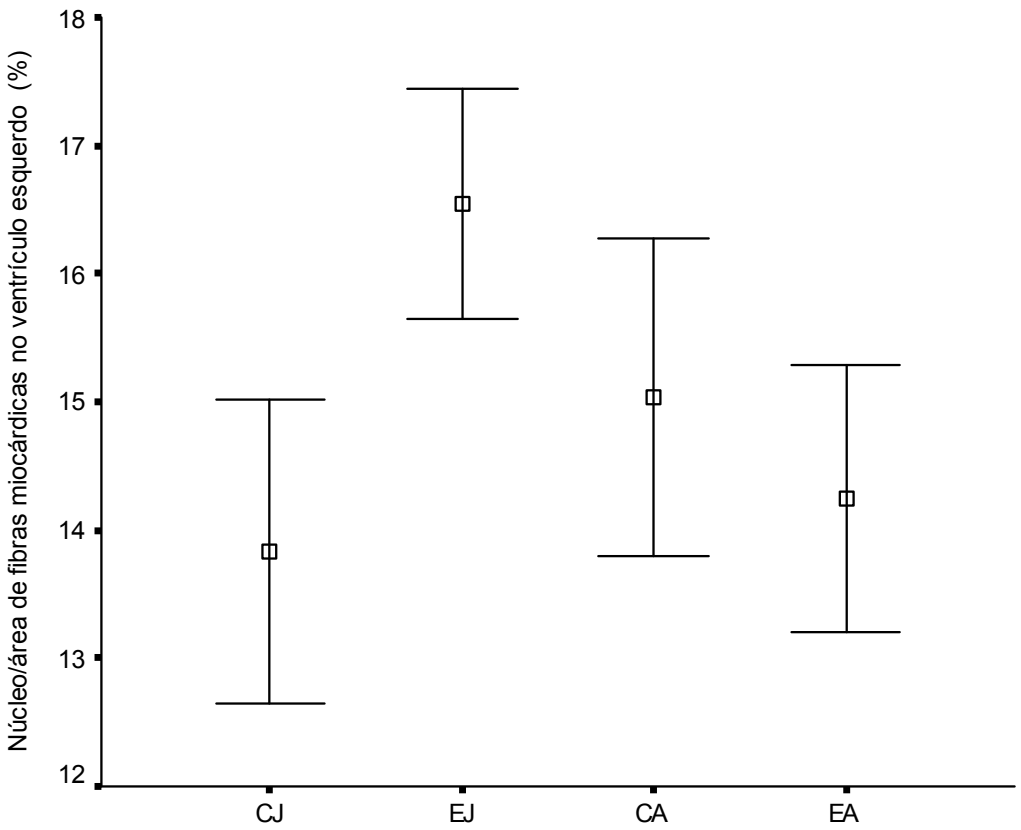

Figura 20. Relação núcleo/área das fibras miocárdicas do ventrículo esquerdo
Representação gráfica do valor médio (± DP) do número de núcleos, em 5675 µm² de miócitos no ventrículo esquerdo de camundongos expostos à inalação de crack, antes da puberdade ou na fase adulta, bem como os seus respectivos controles. Houve aumento significativo ($p < 0,01$) da densidade numérica de núcleos de miócitos nos animais expostos, na fase pré-puberal, sugerindo atrofia miocárdica.

6.4.5 Estudo da apoptose pela marcação doTUNEL - imunoistoquímica

A contagem pelo retículo, das fibras miocárdicas, analisando-se o número de núcleos corados pelo TUNEL (Figura 21 e 22), evidenciou um aumento significativo nos animais expostos, adultos e jovens, quando comparados com os respectivos grupos controles, favorecendo apoptose. (Exposto jovem 12,47 ± 3,23 vs Controle jovem 7,44 ± 3,45, p=0,003; Exposto adulto 13,56 ± 2,93 vs Controle adulto 7,59 ± 3,50, p= 0,001), (Figura 23).

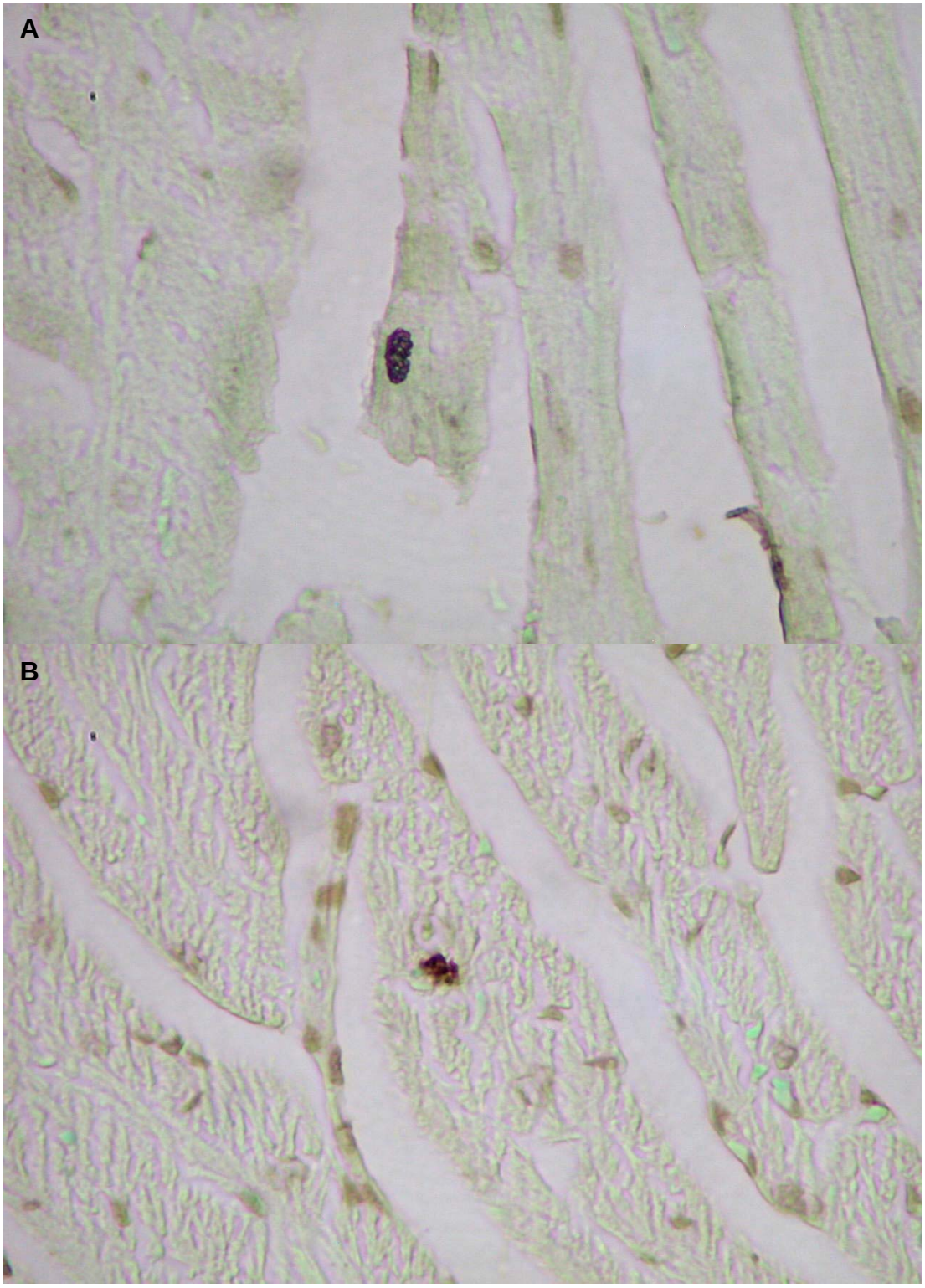

Figura 21. Apoptose em células cardíacas pela técnica do TUNEL nos grupos controle jovem e adulto
Escassos núcleos em apoptose imunomarcados, dos grupos controle jovem (A) e controle adulto(B).

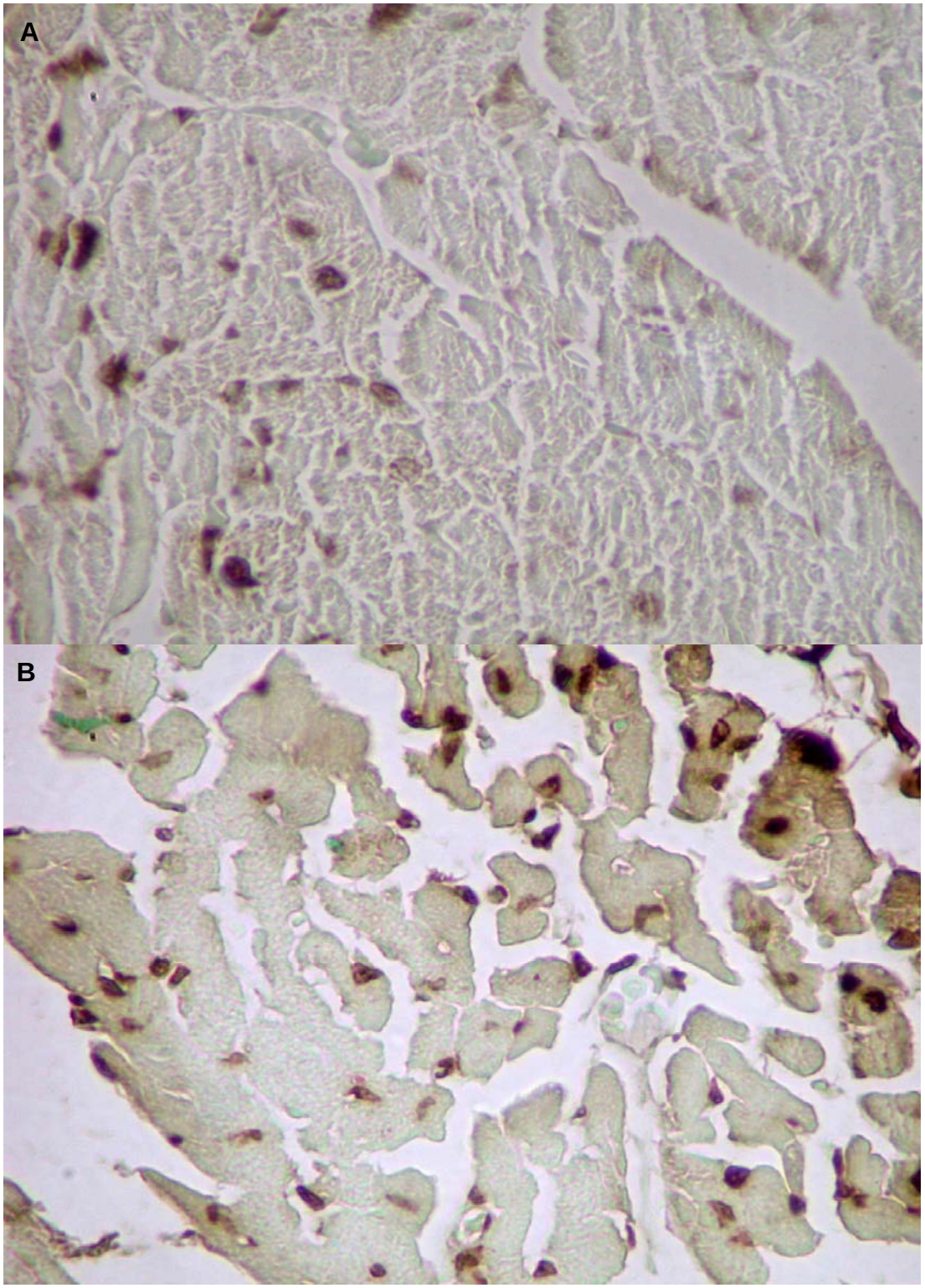

Figura 22. Apoptose em células cardíacas pela técnica do TUNEL nos grupos expostos
Grande número de núcleos corados, caracterizando apoptose aumentada nos grupos, exposto jovem (A) e exposto adulto (B).

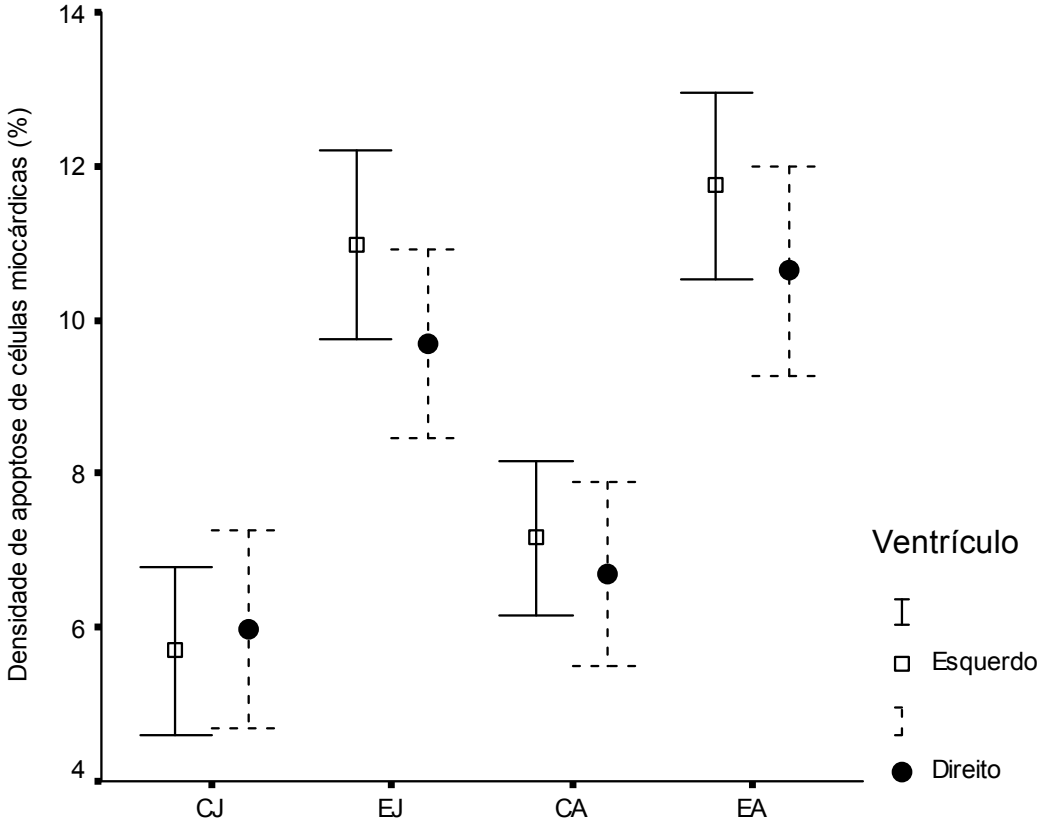

Figura 23. Densidade de apoptose em células miocárdicas
Representação gráfica do valor médio (± DP) do nº de núcleos de fibras miocárdicas corados pela técnica do TUNEL, nos ventrículos direito e esquerdo, dos camundongos expostos à inalação crônica de crack, antes da puberdade e na fase adulta, bem como os seus respectivos controles. Houve aumento significativo ($p < 0,01$) do número de núcleos corados em ambos os ventrículos dos dois grupos estudados.

6.4.6 Estudo das fibras colágenas – Picro sirius

A quantificação do colágeno, da parede dos ramos arteriais intramurais, mostrou aumento das fibras colágenas nos animais expostos adultos, porém, sem significância estatística, quando comparado com os animais expostos jovens e os respectivos controles (0,15 ± 0,01 vs 0,13 ±0,01 vs 0,14 ± 0,01 vs 0,13 ± 0,01, $p>0,05$), (Figura 24 e 25).

A quantificação do colágeno intersticial dos ventrículos mostrou um aumento de fibras no ventrículo direito dos animais expostos jovens e adultos, mas as diferenças não foram estatisticamente significativas, quando comparadas com os respectivos grupos controles (Figura 26 e 27), (9,0 ± 5,56 vs 7,56 ±8,20 vs 5,91 ±4,18 vs 5,65 ±3,24, $p> 0,05$).

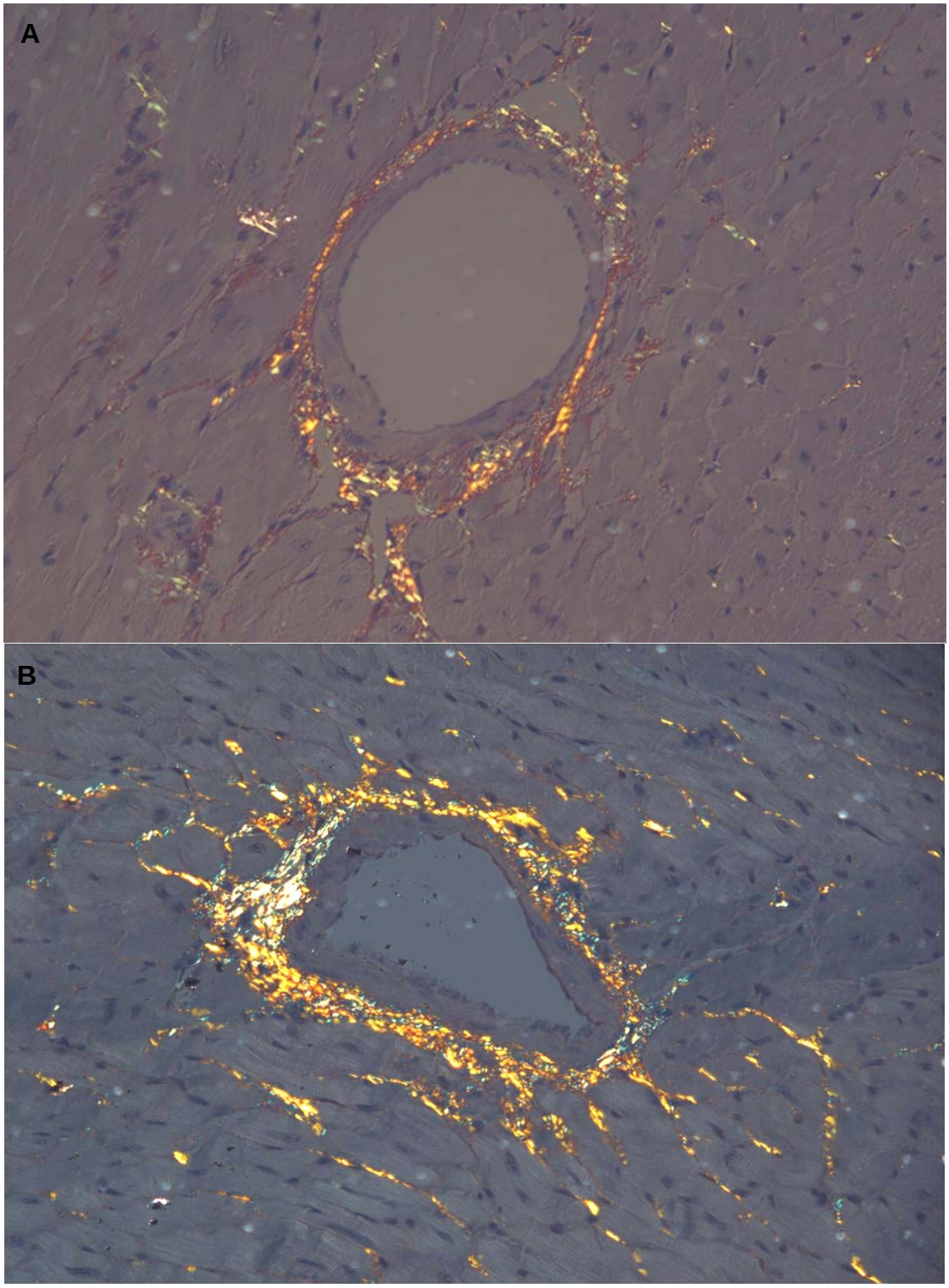

Figura 24. Colágeno na parede vascular nos grupos controle e exposto
Colágeno vascular em artéria coronariana intramural em animal adulto do grupo controle (A) e do grupo exposto (B). Aumento da intensidade de marcação das fibras colágenas na camada adventicial da artéria coronariana intramural (Picro sirius sob luz polarizada 400x).

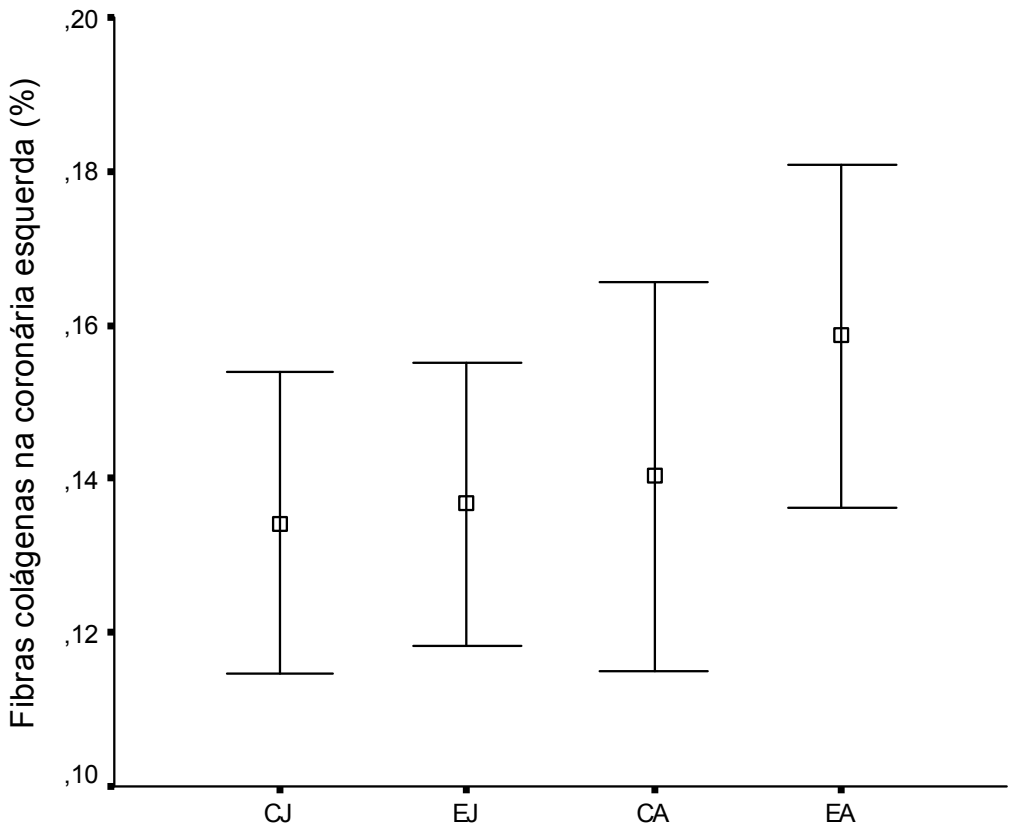

Figura 25. Fibras colágenas da coronária esquerda
Representação gráfica da quantificação de colágeno na parede de artérias intramurais de camundongos expostos à inalação crônica de crack, antes da puberdade e na fase adulta, bem como seus respectivos controles. A quantificação mostra aumento não significativo ($p>0,05$) de fibras colágenas na parede das artérias dos animais expostos adultos.

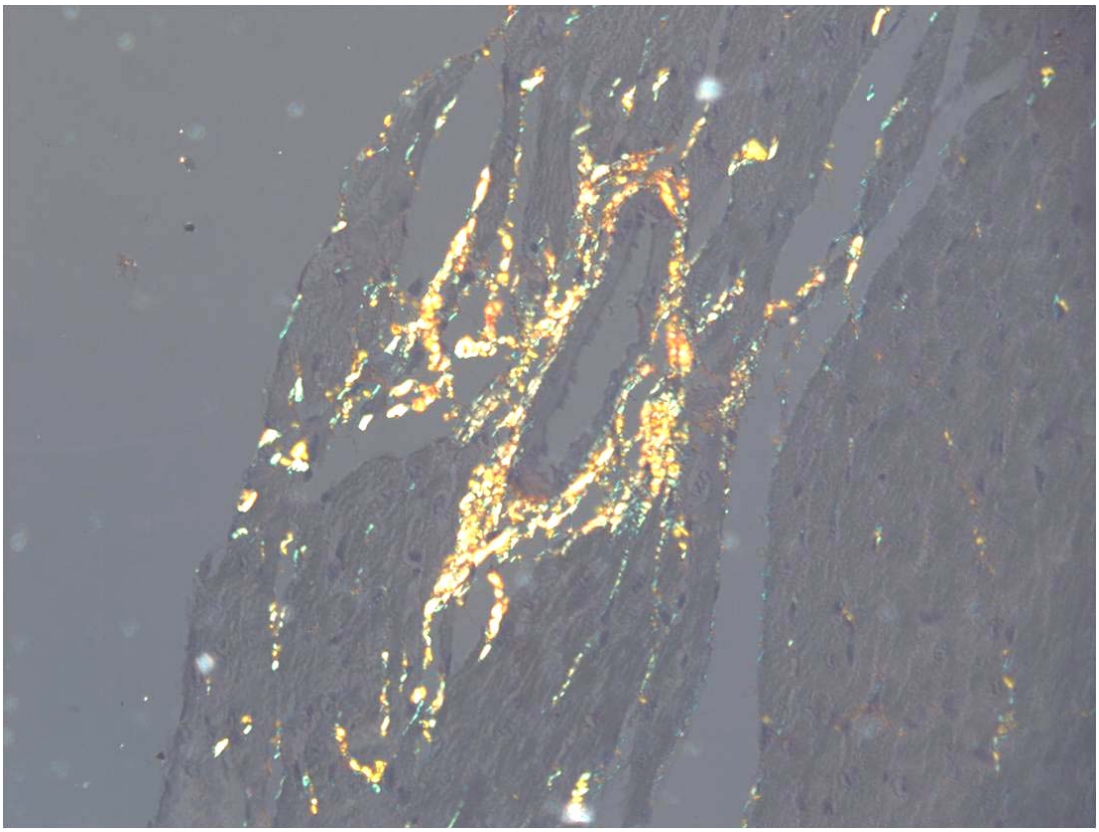

Figura 26. Colágeno no interstício do miocárdio do grupo exposto
Aumento da intensidade de marcação das fibras colágenas na parede vascular e no interstício miocárdico de grupo exposto adulto (Picro sirius sob luz polarizada em aumento de 400x).

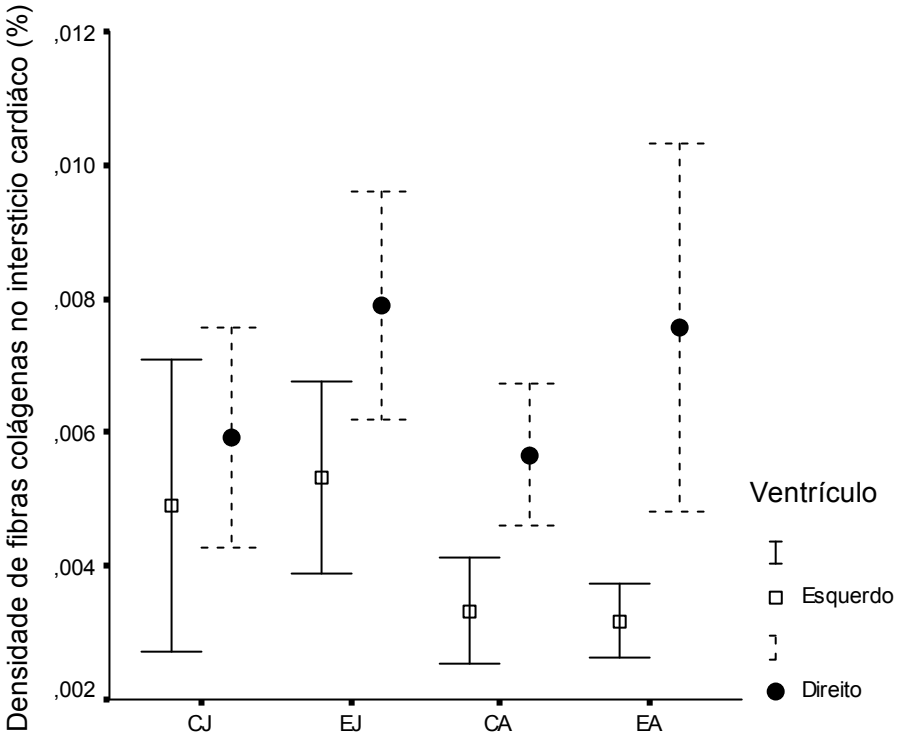

Figura 27. Densidade de fibras colágenas no interstício cardíaco
Representação gráfica da fração de áreas ocupada por fibras colágenas (± DP), a quantificação no interstício dos ventrículos direito e esquerdo, dos dois grupos expostos e controles, sendo realizada com digitalização das imagens após polarização A quantificação mostra um aumento de fibras colágenas, no ventrículo direito dos animais expostos jovem e adulto, porém sem significância estatística.

7. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo apontam que a inalação crônica e continua de crack, promoveram absorção de cocaína em quantidade detectada nas amostras sanguíneas, alterações na morfologia cardíaca, com atrofia de fibras miocárdicas, aumento do colágeno intersticial e peri-vascular arterial intramural e aumento da taxa de apoptose.

Os resultados obtidos serão discutidos nos seguintes tópicos:
a) o modelo experimental; b) as características da droga utilizada; c) resultados gerais; d) achados anatomopatológicos.

7.1 Modelo experimental

São conhecidos e descritos na literatura, os efeitos da cocaína em vários órgãos, inclusive resultados de pesquisas em animais, porém não há estudos das consequências da cocaína crack de uso popular, proveniente do usuário de rua, no coração de camundongos.

A câmara (dispositivo) de inalação projetada atendeu às necessidades, pois a queima do crack disponibilizou quantidade suficiente de droga para todos os animais, fato comprovado pela presença de cocaína no sangue dos animais expostos.

O animal de escolha foi o camundongo por reproduzir muitos processos em comum com mamíferos maiores, inclusive os maiores ramos da aorta sendo semelhantes, além da facilidade de se manipular os mesmos em experimentos (Pires et al., 2006; Hodges-Bell et al., 2007). Foram selecionados animais machos por não apresentarem variações hormonais representativas, pois há evidências dos hormônios femininos interferirem nos níveis séricos da cocaína (Collins et al., 2007).

7.2 Características da droga utilizada

A análise preliminar da cocaína crack, em forma de pedras, realizada pelo Núcleo de Toxicologia Forense do IML de São Paulo, detectou, pela técnica de cromatografia a gás, 57,66 % de cocaína no lote disponibilizado, porcentual considerado adequado para utilização da droga como substância teste no nosso estudo. Essa porcentagem normalmente é variável nos lotes apreendidos pela polícia, havendo relato de valores que vão de 15 a 90 % (Laposata, 1991), estando esses valores intimamente relacionados com a presença de uma maior ou menor quantidade das substâncias contaminantes, utilizadas habitualmente pelo tráfico com fins lucrativos. Neste estudo essas substâncias não foram identificadas.

A quantidade diária queimada da droga (5g) e o tempo de exposição à inalação (cinco minutos diários, cinco dias da semana, no período de 39 dias do experimento), foram suficientes para a cocaína ser detectada, com uma dosagem média de 212,5 ng/ml. A quantificação no sangue foi considerada

uma concentração comparável a uma dose de 0,69 a 1,37 mg/ kg, não letal em humanos (Collins et al., 2007); em roedores a dose a ser utilizada em experimento é proporcionalmente maior. Portanto, essa dose diária, baseada na dose diária dos usuários de crack (Chasin e Salvadori, 1996) não foi letal para os animais utilizados no experimento, permitindo que a pesquisa alcançasse seus objetivos.

7.3 Resultados gerais

Os dados gerais, coletados de todos os animais antes das autópsias, como não evidenciaram alterações de comportamento em nenhum dos grupos, mostram, também, que a concentração e o tempo de uso da droga, não foram suficientes para interferir no relacionamento entre os animais expostos; nos grupos controle, como esperado, também não foram registrados alterações.

Os animais foram pesados em conjunto por grupos e divididos pelo número; os valores médios iniciais sendo de 12,1g e 11,5g respectivamente para controle e exposto jovens e 21,8g e 20,8g para os respectivos grupos adulto controle e exposto. Os pesos médios, no final da experiência, dos grupos jovens foram 24,2g para o controle e 22,6g para o exposto, com equivalência evidente; nos grupos adultos os valores finais foram de 25,9g para o controle e 23,4 para o exposto, porém o peso médio inicial antes da exposição mostra que a diferença é mantida, não podendo ser responsabilizado como efeito da droga. Portanto o peso corpóreo médio

final, não mostrou alterações significativas, não se constatando uma diminuição ponderal, como seria esperado nos animais expostos cronicamente, pois, habitualmente, a cocaína causa inapetência e emagrecimento (Ferreira Filho et al., 2001; Seibel e Toscano Jr, 2001). O peso inicial menor nos grupos expostos trata-se de coincidência, e deve ser salientado que, na última pesagem, todos os grupos encontravam-se na fase adulta. Quando analisamos os pesos médios alcançados nos grupos expostos à droga, os adultos apresentam curva de crescimento proporcionalmente menor àquela do respectivo grupo controle ao longo do período da exposição sem, entretanto, caracterizar emagrecimento.

7.4 Achados anatomopatológicos do coração

Consta na literatura que a maioria das consequências cardiotóxicas, agudas e crônicas, induzidas pela cocaína crack, estão relacionados aos seus dois maiores efeitos farmacológicos: o aumento da atividade simpática (catecolaminas) e a redução do transporte do sódio (Kloner et al., 1992). No primeiro, há bloqueio a recaptura dos neurotransmissores adrenérgicos, como a noradrenalina e a dopamina (catecolaminas), em neurônios, dos sistemas nervosos, central e periférico, com repercussões cardiovasculares; isso pode causar alterações rítmicas e necrose em banda via aumento do cálcio intracelular, isquemia miocárdica por vasoespasmo e aumento da demanda de oxigênio, com infarto agudo do miocárdio, trombose e morte súbita. O aumento do fluxo do cálcio estaria relacionado com a

vasoconstrição (Kloner et al., 1992). No segundo, a propriedade farmacológica da cocaína afeta o coração em decorrência do efeito anestésico local, bloqueando o canal de sódio no miocárdio, resultando em alterações na eletrofisiologia e, consequentemente, arritmias. A cocaína pode também estar relacionada com alteração na função célula endotelial-plaqueta, predispondo à trombose da coronária e isquemia, alterações na função imune da killer cells, com miocardites de várias etiologias e efeito tóxico direto nas fibras musculares com disfunção cardíaca (Woof et al., 1997). Outros achados que têm sido descritos são hipertrofia ou dilatação ventricular, aterosclerose, ruptura de aorta, endocardite e apoptose de cardiomiócitos (Kloner et al., 1992).

No experimento, constatou-se diminuição significativa de peso dos corações, nos dois grupos de animais expostos, jovens e adultos, não se evidenciando outras alterações macroscópicas. Esse achado, de diminuição de peso dos corações, demonstra alteração adaptativa que não está descrita na literatura como efeito da cocaína, em humanos ou em pesquisas com animais, e pode estar relacionada com isquemia crônica do órgão. A alteração adaptativa, frequentemente referida, e que não foi encontrada nos nossos estudos, é a hipertrofia do ventrículo esquerdo. Também não se caracterizou dilatação das câmaras cardíacas, outra alteração anatômica frequentemente relacionada com o uso de cocaína crack.

A quantificação pela morfometria de retículo de pontos, do número de núcleos, por áreas das paredes ventriculares, nas lâminas coradas pelo H&E, constatou maior número de núcleos nos animais expostos jovens.

Esse resultado caracteriza atrofia de fibras musculares estriadas miocárdicas, em ventrículos direito e esquerdo ($p<0,01$), justificando o menor peso do coração desses animais, quando comparados com o grupo controle. Nos animais expostos adultos, embora com diminuição de peso dos corações ($p=0,001$), o estudo morfométrico não constatou atrofia de fibras; uma possibilidade para esse resultado pode estar relacionada com alterações nos demais componentes das paredes ventriculares, haja vista as fibras musculares estriadas representarem apenas 20 a 30% da celularidade do coração de camundongos, o restante correspondendo a células endoteliais, fibras musculares lisas de paredes vasculares e fibroblastos (Soonpaa et al., 1996); o aumento, não representativo, de colágeno no interstício do ventrículo direito, não teve resultado compensador, pois houve perda de peso, significativa, dos corações desses animais. A atrofia pode ser decorrente da hipóxia crônica, o predomínio à direita, encontrado no animal jovem, não estando relacionado ao fato da artéria circunflexa ser considerada normalmente hipodesenvolvida em camundongos (Michel et al., 2004), já que essa artéria é ramo da coronária esquerda, que irriga a parede posterior e lateral do ventrículo esquerdo.

No exame microscópico, pela H&E, foi possível notar, em ambos os grupos expostos, discreto número de fibras miocárdicas, predominantemente em regiões subepicárdicas e perivasculares, com o aumento da eosinofilia do citoplasma, por vezes com aspecto coagulado, hialinizado, e com perda das estriações, achados consistentes com apoptose e que foram corroborados pela técnica do TUNEL; não se detectaram outras alterações

histopatológicas que podem estar associadas à cocaína como, necrose coagulativa, infiltrado inflamatório, fibrose ou arteriosclerose.

Foram observadas também, artérias intramurais, com diminuição das luzes, sugerindo vasoespasmo. Os resultados morfométricos mostraram alterações na relação das luzes com as paredes dos vasos (luz/parede), achados já descritos na literatura (Hale et al.,1989). A avaliação estatística através do modelo linear generalizado (GLM) demonstrou diminuição das luzes das coronárias nos animais expostos, independente da idade ($p < 0,01$); isso favorece vasoconstrição por provável ação simpaticomimética mediada por estimulação dos receptores alfa-adrenégicos, presentes nas paredes vasculares coronarianas (Khun et al., 1990). O vasoespasmo está relacionado geralmente com efeito agudo da cocaína, podendo provocar isquemia do miocárdio, hipóxia e apoptose. Essa diminuição do calibre dos vasos tem sido documentada; pesquisas mostraram que o diâmetro pode variar de 15 a 29%, em experimento com cães anestesiados (Hale et al., 1989); a queda do fluxo sanguíneo para o miocárdio foi da ordem de 38% na região subepicárdica e 27% na subendocárdica (Kloner et al.,1992).

A análise mostrou também, um aumento estatisticamente não significativo de colágeno, na parede das artérias intramurais dos animais expostos adultos, com tendência a fibrose periadventicial. A quantificação do colágeno, após polarização, nas lâminas coradas pelo Picro-sirius, tanto da parede dos ramos coronarianos esquerdos como do interstício dos dois ventrículos, apresentou aumento não significativo do colágeno, respectivamente nos vasos dos animais expostos adultos e na parede dos

ventrículos direitos dos dois grupos (p>0,05). Esse aumento no interstício, apenas do lado direito do coração, pode estar relacionado com comprometimento pulmonar desses animais expostos ao crack, como descrito por Herculiani (Herculiani et al., 2009); ela constatou que a cocaína crack promoveu em pulmão de camundongos, atrofia do epitélio brônquico, aumento da hemossiderina pulmonar, aumento da densidade dos macrófagos e vasoconstrição. Uma provável hipertensão pulmonar poderia justificar a fibrose intersticial do ventrículo direito, favorecendo a ocorrência de remodelamento cardíaco.

Com as evidências de apoptose no H&E, em discreto número de fibras cardíacas, realizou-se estudo imunoistoquímico pela coloração do TUNEL, e as lâminas analisadas por dois observadores, utilizando-se a mesma metodologia do retículo de pontos. Os resultados mostraram concordância interobservadores e foram representativos em ambos os ventrículos, dos dois grupos de animais expostos (p<0,01), comprovando que a cocaína crack potencializa essa morte celular programada. A apoptose é caracterizada por mudanças morfológicas que incluem o encolhimento celular progressivo, com condensação e fragmentação da cromatina nuclear e formação de vesículas, com eventual fragmentação da célula, formando corpos apoptóticos que são fagocitados sem que haja reação inflamatória, diferentemente da morte por necrose. A liberação desses corpos dá nome ao mecanismo, pois do grego significa queda, como as folhas que caem de uma árvore (Kerr et al., 1972). A apoptose tem como uma das suas principais vias, as caspases, uma família de proteínas, consideradas como

moléculas da via efetora comum (Henkart e Grinstein, 1996), que encontram-se inativas nas formas de pró-caspases.

Um dos conceitos que emerge dos estudos sobre a apoptose é que a célula deve constantemente receber sinais de algum tipo (por exemplo, um fator de crescimento específico para o tipo celular em questão; a eventual remoção do mesmo detona os eventos que levam a apoptose) para reprimir a maquinaria que leva à morte celular programada. Na ausência de tais sinais a célula se autodestruiria.

Embora, a coloração pelo TUNEL, não seja específica para apoptose, podendo marcar também a necrose – outro tipo de morte celular -, as características microscópicas na H&E com ausência de reação inflamatória, assim como o fato de não ter sido constatado necrose coagulativa, favorecem apoptose o demonstrado na imunocoloração. A reação do TUNEL marca preferencialmente segmentos de DNA clivados durante a apoptose, podendo diferenciar da necrose propriamente dita e das clivagens primarias de DNA, induzidas por drogas citostáticas ou por irradiação. Há falsos negativos, pois o DNA clivado pode ser isento ou incompleto em algumas formas de apoptose, assim como ocorrem falsos positivos, pois a fragmentação extensiva de DNA pode ocorrer em estados tardios de necrose.

Os nossos estudos, utilizando uma metodologia inédita, confirmam conhecimentos já existentes relacionados com exposição à cocaína crack, como a apoptose decorrente de isquemia por provável vasoespasmo, constatado na diminuição da relação luz/parede ou por efeito tóxico direto da

droga no cardiomiócito. Esse efeito tóxico direto da droga foi sugerido através de estudos com biópsias endocárdicas (Peng et al.,1989). A apoptose, com perda representativa de células, também favorece a perda da capacidade funcional miocárdica e, consequentemente arritmias, responsáveis por paradas cardíacas e morte. Mostram também alterações que ainda não foram descritas em efeitos crônicos da cocaína em camundongos, a atrofia com perda de peso em corações. Os resultados demonstraram que os efeitos da droga foram mais representativos nos animais jovens, reforçam que a cocaína crack representa problema de saúde pública e podem ser utilizados em análises comparativas com órgãos provenientes de autópsias. Deve ser salientado que não houve associação de outras drogas de uso comum no dia-a-dia, como álcool, maconha e tabaco, que poderiam ter influenciado nos resultados. Entretanto, a pesquisa tem limitações, em decorrência do número de animais utilizados na pesquisa e por não ter sido isolado do material teste - crack -, outra substância que poderia estar presente na amostra, haja vista as frequentes misturas nas drogas comercializadas pelo tráfico. Como referido é conhecida uma grande variedade de substâncias contaminantes, que podem contribuir para as eventuais reações adversas, aumentando os riscos de complicações cardiovasculares.

8. CONCLUSÕES

Após ter sido comprovada a absorção sistêmica de cocaína, na dosagem empregada e no período de exposição estabelecido, as nossas pesquisas mostraram que os camundongos expostos à fumaça da droga sofreram alterações estruturais no miocárdio; e relacionadas com a fase de desenvolvimento dos animais. Diante dos resultados obtidos concluímos que a inalação do crack promoveu:

- diminuição das luzes coronarianas, sugerindo vasoespasmo, em artérias intramurais dos corações dos animais expostos, independente da idade.
- atrofia de fibras miocárdicas dos corações, com diminuição de peso, nos animas expostos jovens.
- diminuição de peso dos corações, mas sem atrofia comprovada de fibras miocárdicas, nos animais expostos adultos.
- aumento de apoptose de cardiomiócitos nos camundongos expostos jovens e adultos.
- evidências qualitativas de aumento de fibras colágenas, mas sem diferenças estatísticas entre os grupos, no interstício do miocárdio do ventrículo direito dos animais expostos jovens e adultos.
- evidências qualitativas de aumento de fibras colágenas periadventiciais, mas sem diferenças estatísticas entre os grupos, nas artérias coronarianas intramurais, do ventrículo esquerdo dos animais expostos adultos.

9. REFERÊNCIAS

Associação Brasileira de Psiquiatria – ABP. Werner Jairo - [acesso em 27 jul 2008]. Disponível em:
http://www.abpbrasil.org.br/medicos/clipping/exibClipping/?clipping=7861

Bae S, Zhang L. Prenatal cocaine exposure increases apoptosis of neonatal rat heart and heart susceptibility to ischemia – reperfusion injury in 1-month-old rat. *Br J Pharmacol.* 2005;144(7):900-7.

Bae S, Gilbert RD, Ducsay CA, Zhang LZ. Prenatal cocaine exposure increases heart susceptibility to ischaemia-reperfusion injury in adult male but female rats. *J Physiol*. 2005;565(Pt 1):149-58.

Bai H, Otsu K, Islam MN, Kuroki H, Terada M, Tada M, Wakasugi C. Direct cardiotoxic effects of cocaine and cocaethilene on isolated cardiomyocytes. *Int J Cardiol*. 1996;53(1):15-23.

Benzaquen BS, Cohen V, Eisenberg MJ. Effects of cocaine on the coronary arteries. *Am Heart J.* 2001;142(3):402-10.

Byck R. *The cocaine papers by Sigmund Freud.* Stonehill: New York; 1974.

Billman GE. Mechanisms responsible for the cardiotoxic effects of cocaine. *FASEB J.* 1990;4:2469-75.

Billman GE. Cocaine: a review of its toxic actions on cardiac function .*Crit Rev Toxicol.* 1995;25(2):113-32.

Boerhaave H. Institutiones Medicae. The vaults of erowid 2001. [cited 2007 dez 18]. Available from:
http://asbebon.no.comunidades.net/index.php?pagina=1244659481.

Carlini EA, Galduroz JC, Noto AR, Nappo S, Lima E, Adiala JC. Perfil de uso da cocaina no Brasil. *J Bras Psquiatr.* 1995; 44:287-303.

Catravas JD, Waters IW. Acute cocaine intoxication in the conscious dog: studies on the mechanism of lethality. *J Pharmacol Exp Ther.* 1981;217:350.

Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas Psicotrópicas - CEBRID; 2003. [acesso em 12 dez 2007]. Disponível em: http://www.unifesp.br/dpsicobio/cebrid/folhetos/drogas_.htm

Chasin A, Chasin M, Salvadori MC. *Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas.* New York: McGraw-Hill; 1996. p.159, 539.

Chasin AAM, Salvadori MC. Estimulantes do sistema nervoso central. In: Oga Z. *Fundamentos de toxicologia.* São Paulo: Editora Atheneu; 1996. 515p.

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA. [acesso em 12 dez 2007]. Disponível em: http:// www.cobea.org.br.

Collins SL, Evans SM, Foltin RW, Haney M. Intranasal cocaine in humans: effects of sex and menstrual cycle. *Pharmacol Biochem Behav.* 2007;86(1):117-24.

Condorelli G, Borello U, De Angelis L, Latronico M, Sirabella D, Coletta M, Galli R, Balconi G, Follenzi A, Frati G, Cusella DE, Angellis MG, Gioglio L, Amuchastegui S, Adorini L, Vescovi, A, Dejana E, Cossu G. Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:10733-8.

Cone EJ, Yousefnejad D, Hillsgrove MJ, Holicky B, Darwin WD. Passive inhalation of cocaine. *J Anat Toxicol.* 1995;19(6):399-411.

Cook CE, Jeffcoat AR, Perez-Reyes M. Pharmacokinetic studies of cocaine and phencyclidine in man. In Barnett G, Chiang CN, editors. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of psychoactive drugs: A Research Monograph*. Foster City, CA: Biomedical Publications; 1985. p.48-74.

Corradini HB. Cocaina: efeitos na gestante e nas crianças. *Pediatria* (São Paulo). 1996;18(2):170-4.

Costa LM, Andrade AG. *Cocaína e crack.* São Paulo: Artmed; 1999.

Cregler LL. Cocaine: The newest risk factor for cardiovascular disease. *Clin Cardiol.* 1991;14(6):449-56.

Das G. Cocaine abuse in North America: a milestone in history. *J Clin Pharmacol.* 1993;33(4):296-310.

Dunn J, Laranjeira RR, Silveira DX, Formigoni MLOS, Ferri CP. Aumento da procura de tratamento por usuários de crack em dois ambulatórios da cidade de São Paulo, nos 1990 a 1993. *Rev Ass Med Brasil.* 1997;43:25-8.

Egred M, Davis GK. Cocaine and the heart. *Postgrad Med J.* 2005;81(959):568-71.

Ellenhorn MJ, Varcelous DG. Cocaine. In: *Toxicology, diagnosis and treatment of human poisoning.* New York: Elsevier; 1988.

Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35:(4):495-516.

Escohotado A. Álcool e drogas sem distorção NEAD - Núcleo Einstein de Álcool e Drogas do Hospital Israelita Albert Einstein [acesso em 20 ago 2008]. Disponível em:
http://aed.one2one.com.br/novosite/drogas_historia_cocaina.htm.

Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime – UNODC - Brasil e Cone Sul. Relatório Mundial sobre Drogas 2008, [acesso em 20 ago 2008]. Disponível em: http://www.unodc.org.br.

Ferreira PE, Martini RK. Cocaine: myths, history and abuse. *Rev Bras Psiquiatr.* 2001;23(2):96-9.

Ferreira Filho OF, Turchi MD, Laranjeira R, Castelo A. Perfil. *Rev Saúde Pública.* 2001;35:150-8.

Ferreira Filho OF, Turchi MD, Laranjeira R, Castelo A. Epidemiological profile of cocaine users on treatment in psychiatrics hospitals, Brazil. *Rev Saúde Pública.* 2003;37(6):751-9.

Ferri CP, Laranjeira RR, Da Silveira DX, Dunn J, Formigoni MLOS. Aumento da procura de tratamento por usuários de crack em dois ambulatórios na cidade de São Paulo, nos anos de 1990 a 1993. *Rev Ass Med Brasil.* 1997;43(1):25-8.

Forbes MS, Rennels ML, Nelson E. Ultrastructure of pericytes in mouse heart. *Am J Anat.* 1977;149(1):47-70.

França GV. *Medicina legal.* 6a ed. Rio de Janeiro: Editora Koogan; 2001. 579p.

Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH, Spengler RN, Smith CW, Entman ML. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation.* 1998;98(7):699-710.

Gantenberg NS, Hageman GR. Cocaine enhance arrhythmogenesis: neural nonmneural mechanisms. *Can J Physiol Pharmacol.* 1992;70:240.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 1992;(3):493-501.

George VK, Li H, Teloken C, Grignon DJ, Lawrence WD, Dhabuwala CB. Effects of long term cocaine exposure on spermatogenesis and fertility in peripubertal male rats. *J Urol.* 1996;155:327-31.

Gersch C, Dewald O, Zoerlein M, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG. Mast cells and macrophages in normal C57/BL/6 mice. *Histochem Cell Biol.* 2002;118(1):41-9.

Ghodse H. *Drugs and addictive behaviour: a guide to treatment.* 2a ed. Oxford: Blackwell Science; 1995.

Gill C, Mestril R, Samali A. Losing heart: the role of apoptosis in heart disease – a novel therapeutic target? *FASEB J.* 2002;16:135-46.

Gold MS. *Cocaine*. New York: Plenum Medical Book Company; 1993.
Guindalini C, Vallada H, Breen G, Laranjeira R. Concurrent crack and powder cocaine users from Sao Paulo: do they represent a different group? *BMC Public Health.* 2006;20:6-10.

Hale SL, Alker KJ, Rezkalla S, Figures G, Kloner RA. Adverse effects of cocaine on cardiovascular dynamics, myocardial blood flow, and coronary artery diameter in an experimental model. *Am Heart J.* 1989; 118(5 Pt 1):927-33.

Henkart PA, Grinstein S. Apoptosis: mitochondria resurrected? *J Exp Med.* 1996;183(4):1293-5.

Herculiani PP, Pires-Neto RC, Bueno HMS, Zorzeto JC, Silva LC, Santos AB, Garcia RC, Detregiachi CR, Saldiva PH, Mauad T. Effects of chronic exposure to crack cocaine on the respiratory tract of mice. *Toxicol Pathology*. 2009;(37):1533-1601.

Hodge-Bell KC, Lee KM, Renne RA, Gideon KM, Harbo SJ, Mackinney WJ. Pulmonary inflammation in mice exposed to mainstream cigarette smoke. *Inhal Toxicol.* 2007;19(4):361-76

Houser SL, MacGillivray T, Aretz HT. The Impact of cocaine on the donor heart: a case report. *J Heart Lung Transplant.* 2000;19(6): 609-11.

Icardo JM, Colvee E. Atrioventricular valves of the mouse: II. light and transmission electron microscopy. *Anat Rec.* 1995;241(3):391-400.

Johanson CE. 1988. Site Álcool e Drogas sem Distorção (www.einstein.br/alcooledrogas) / NEAD - Núcleo Einstein de Álcool e Drogas do Hospital Israelita Albert Einstein [acesso em 20 nov 2008] http://aed.one2one.com.br/novosite/drogas_historia_cocaina.htm.

Karch SB. The history of cacaine toxicity. *Human Pathol.* 1989;20:1037.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-57.

Kleber HD. Cocaine abuse: historical, epidemiological and psychological perspectives. *J Clin Psychiatry.* 1988;49 Suppl:3-6.

Kleerup EC, Wong M, Marques-Magallanes JA, Goldman MD, Tashkin DP. Acute effects of intravenous cocaine on pulmonary artery pressure and cardiac index in habitual crack smokers. *Chest.* 1997;111:30-5.

Kloner RA, Hale S, Alker K, Rezkalla S. The effects of acute and chronic cocaine use on the heart. *Circulation.* 1992;85(2):407-19.

Kuhn FE, Johnson MN, Gillis RA, Visner MS, Schaer GL. Effects of cocaine on the coronary circulation and systemic hemodynamics in dog. *J Am Coll Cardiol.* 1990;16(6):1481-91.

Kurrelmeyer KM, Michael LH, Baungarten G, Taffet GE, Peschon JJ, Sivasubramanian N, Entman ML, Mann.DL. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(10):5456-61.

Lange RA, Cigarroa RG, Yancy CW Jr, Willard JE, Popma JJ, Sills MN, McBride W, Kim AS, Hillis LD. Cocaine-induced coronary-artery vasoconstriction. *N Engl J Med.* 1989;321(23):1557-62.

Laposata EA. Cocaine-induced heart disease: mechanisms and pathology. *J Thorac Imaging.* 1991;6(1):68-75.

Laposata EA, Mayo GL. A review of pulmonary pathology and mechanisms associated with inhalation of freebase cocaine ("crack"). *Am J Forensic Med Pathol.* 1993;14(1):1-9.

Lee H, Eisenberg MJ, Drew D, Schiller NB. Intraventricular thrombus after cocaine-induce myocardial infarction. *Am Heart J.* 1995;129(2):403-5.

Lehrmann E, Afanador ZR, Deep-Soboslay A, Gallegos G, Darwin WD, Lowe RH, Barnes AJ, Huestis MA, Cadet JL, Herman MM, Hyde TM, Kleinman JE, Freed WJ. Postmorten diagnostic and toxicological validation of ilicit substance use. *Addict Biol.* 2008;13(1):105-17.

Leite MC, Andrade AG. *Cocaína e crack: Dos fundamentos ao tratamento*. Porto Alegre: Artmed. 1999.

Li G, Xiao Y, Zhang L. Cocaine Induces Apoptosis in Fetal Rat Myocardial Cells through the p38 Mitogen-activated protein kinase and mitochondrial/cytochrome c pathways. *J Pharmacol.* 2005;312(1):112-9.

LI H,Jiang Y, Rajpurkar A, Tefilli MV, Dunbar JC, Dhabuwala CB. Lipide peroxidation and antioxidant activities in rat after chronic cocaine administration. *Urology.* 1999;54:925-28.

Maekawa N, Wada H, Kanda T, Niwa T, Yamada Y, Saito K, Fujiwara H, Sekikawa K, Seishima M. Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor-alpha. *J Am Coll Cardiol.* 39(7):1229-35.

McLean M, Prothero J. Myofiber orientation in the weanling mouse heart. *Am J Anat.* 1991;192(4):425-41.

Michael LH, Taffet GE, Frangogiannis NG, Entman ML, Hartley CJ. The cardiovascular system. In: Hedrich HJ, Bullock G, editors. *The Laboratory Mouse.* Elsevier Academic Press; 2004. p.207-23.

Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int.* 1996;20(1):15-21.

Morreau RLM. Fármacos e drogas que causam dependência. In: Oga S. *Fundamentos de toxicologia.* São Paulo: Atheneu; 1996. 515p.

Niemnan A, Álcool e Drogas Sem Distorção NEAD - Núcleo Einstein de Álcool e Drogas do Hospital Israelita Albert Einstein/
Wikipedia, the free encyclopedia. [acesso em 20 ago 2008]
Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/Albert_Niemann_(chemist)

Oliveira LG, Napo AS. Crack na cidade de São Paulo: acessibilidade, estratégias de mercado e formas de uso. *Rev Psiq Clin.* 2008; 35(6):212-8.
Oliveira LG, Nappo SA. Caracterização da cultura de crack na cidade de São Paulo: padrão de uso controlado. *Rev Saúde Pública*. 2008;42(4):664-71.

Orlic D, Katstura J, Clementi S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, Mckay R, Bernanrdo NG, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001;410(6829):701-5.

Pemberton JS. First coca-cola served in Jacob's Pharmacy, Atlanta. [cited 2007 nov 18] Available from:
http://ourgeorgiahistory.com/ogh/John_Stith_(Styth)_Pemberton

Peng SK, French WJ, Pelikan CD. Direct cocaine cardiotoxicity demonstrated by endomyocardial biopsy. *Arch Pathol Lab Med.* 1989(8);113:842-845.

Pires Neto RC, Liichtenfels AJ, Soares RS, Macchione M, Saldiva PHN, Dolhnikoff M. Effects of São Paulo air pollution on the upper airways of mice. *Environ Res.* 2006;101(3):356-61.

Pozner CN, Levine M, Zane R. The cardiovascular effects of cocaine. *J Emerg Med.* 2005;29(2):173-8.

Prinzleve M, Haasen C, Zurhold H, Matali JL, Bruguera E, Gerevich J, Bacskai E, Ryder N, Butler S, Manning V Gossop M, Pezous AM, Verster A, Camposeragna A, Andersson P, Olsson B, Primorac A, Fischer G, Guttinger F, Rehm J, Krausz M. Cocaine use in Europe - a multi-centre study: patterns of use in different groups. *Eur Addict Res.* 2004;10(4):147-55.

Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol.* 2000;157(5):1415-30.

Regalado MG, Schechtman VL, Del angel AP, Bean XD. Cardiac and respiratory patterns during sleep in cocaine-exposed neonates. *Early Hum Dev.* 1996;44(3):187-200.

Restrepo CS, Carrillo JA, Martinez S, Ojeda P, Rivera AL, Hatta A. Pulmonary complications from cocaine and cocaine-based substances: imaging manifestations. *Radiographics.* 2007;27(4):941-56.

Restrepo CS, Theisohn M, Klaus W. The pathophysiology of cocaine cardiotoxicity. *Forensic Sc Int.* 1995:71(2);103-15.

Rozin GF, Gomes MM, Parra ER, Kairalla RA, de Carvalho CR, Capelozzi VL. Collagen and elastic system in the remodeling process of major types of idiopathic interstitial pneumonias (IIP). *Histopathology.* 2005:46(4):413-21.

Schwartz RH, Luxenburg MG, Hoffman NG. Crack use by American middle class adolescent polydrug abusers*. J Pediatr*. 1991;118:150-5.

Secretaria de Estado da Segurança Pública do Estado de São Paulo – SSPSP [acessado em 18 mar 2009]. Disponível em: http://www.ssp.sp.gov.br/estatisticas/downloads/apresentacao2008.pdf

Seibel SD, Toscano Jr A. *Dependência de drogas.* São Paulo: Atheneu; 2001. 560p.

Sofuoglu M, Nelson D, Dudish-Poulsen S, Lexau B, Pentel PR, Hatsukami DK. Predictors of cardiovascular response to smoked cocain in humans. *Drug Alcohol Depend.* 2000;57(3):239-45.

Soonpaa M, Kim K, Pajak L, Franklin M, Kim K, Pajak L, Franklin M, Field LJ. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *Am J Physiol.* 1996;271(5 Pt 2):H2183-9.

Sterne J, Ducastaing C. Arteritis caused by Cannabis indica. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 1960;53:143-7.

Thadani PV. NIDA conference report on cardiopulmonary complications of "crack" cocaine use. Clinical manifestations and pathophysiology. *Chest.* 1996;110(4):1072-6.

Toma C, Pittenger M, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation.* 2002;105(1):93-8.

United States Department of Health & Human Services – USDHHS. [cited 2007 dez 28]. Available from: http://www.hhs.gov/.

Vermeulen K, Van Bockstaele R, Berneman ZN. Cell cicle and apoptosis. *Cell Prolif.* 2003;36(3):165-75.

Virmani R, Robinowitz M, Smialek JE, Smyth DF. Cardiovascular effects of cocaine: an autopsy study of 40 patients. *Am Heart J.* 1988;115(5):1068-76.

Xiao Y-H, He J, Gilbert RD. Cocaine induces apoptosis infetal myocardial cells through a mitochodria-dependent pathway. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;292:8-14.

Xiao Y, Xiao D, He J, Zhang L. Maternal cocaine administration during pregnancy induces apoptosis in fetal rat heart. *J Cardiovas Pharmacol.* 2001;37(5):639-48.

Zafar H, Vaz A, Carlson RW. Acude complications of cocaine intoxication. *Hosp Pract* (Minneap). 1997;32(2):167-70, 175-7, 181.

Zhang L, Xiao Y, He J. Cocaine and apoptosis in myocardial cells. *Anat Rec.* 1999;257(6):208-16.

Wakimoto H, Maguire CT, Kovoor P, Hammer PE, Gehrmann J, Triedman JK, Berul CI. Induction of atrial tachycardia and fibrillation in the mouse heart. *Cardiovasc Res*. 2001;50(3):463-73.

Wang RY. pH-dependent cocaine-induced cardiotoxicity. *Am J Emerg Med.* 1999;17(4):1000-6.

Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, van de Velde CJ, Cornelisse CJ, van Dierendonck JH. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem.* 1993;41(1):7-12.

Wong BA. Inhalation exposure system: design, methods and operation. *Toxicol Pathol.* 2007;35(1):3-14.

Wood RW, Shojaie J, Fang CP, Graefe JF. Methylecgonidine coats the crack particle. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996;53(1):57-66.

Woods JR, Plessinger MA, ScottK, Miller RK. Prenatal cocaine exposure to the fetus: A sheep model for cardiovascular evaluation. *Ann N Y Acad Sci.* 1989;562:267-79.

Woolf JH, Huang L, Ishiguro Y, Morgan JP. Negative inotropic effect of methilecgonidine, a major product of cocaine base pyrolisis, on ferret and human myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1997;30(3): 352-9.

Young D, Glauber JJ. Eletrocardiographic changes resulting from acute cocaine intoxication. *Am Heart J.* 1947;34(2):272-9.

Zorzetto JC. *Avaliação dos efeitos da inalação cronica de cocaina crack na espermatogenese de camundongos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

10. APÊNDICES

APÊNDICE A

Aprovação do Protocolo de Pesquisa nº 581/05, pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq), em 28.07. 2005.

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 28.07.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **581/05**, intitulado: **"Efeitos do crack no coração."** apresentado pelo Departamento de PATOLOGIA.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parcial e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2,letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Prof° Dr° Paulo Hilário Nascimento Saldiva**
Pesquisador(a) Executante: **Dr° Alcides Gilberto Moraes**

CAPPesq, 28 de Julho de 2005.

PROF. DR. CLAUDIO LEONE
Vice-Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5° andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq@hcnet.usp.br
VCN

APÊNDICE B

Aprovação da Liberação da droga pelo Poder Jurídico de Marília (Processo 266/003).

PODER JUDICIÁRIO
SÃO PAULO

COMARCA DE MARÍLIA - SP

3ª Vara Criminal, Execuções Criminais. Corregedoria dos Presídios e da Polícia Judiciária de Marília – SP

Rua Lourival Freire, n.110 - Bairro Fragata "B" - Marília - SP
C.E.P. 17519-050 - fone (XX14) - 455 22 55 - ramal 213

Of. nº 266/003
Corre.Pres. nº 01/02 - Exec.I

- A 2ª Vara p/ elaborar auto de entrega ao interessado c/ as cautelas de praxe.

Marília, 24 de fevereiro de 2003

Ciente! Formalizar o depósito ao interessado (auto de entrega) Mar 18.2.03

Fábio José Rino Guimarães
Delegado de Polícia

Senhor Delegado,

Em atenção a pedido formulado através do ofício n.58/03, datado de 06 de fevereiro p.p., comunico a Vossa Senhoria que este juízo autorizou a liberação e entrega de 195,200 gramas de "crack", apreendidos nos autos de I.P. n. 270/02, relativo ao processo n. 1096/02, ao doutor JULIO CESAR ZORZETTO, destinado a realização de trabalho experimental, devendo a autoridade policial tomar as providências necessárias.

A oportunidade, apresento a Vossa Senhoria protestos de estima e elevada consideração.

DECIO DIVANIR MAZETO
JUIZ DE DIREITO

Ilmo.Sr. Dr.
ROBERTO TERRAZ
Delegado Seccional de Polícia
Marília-SP

DELEGACIA SECCIONAL DE POLÍCIA - DE MARÍLIA -
Prot. N.º 407
Livro N.º — Fls. —
Data 18 / 02 / 2003

D.I.S.E. - Marília - SP.
CERTIFICO conferir com original
Dou fé
Marília, 06 MAR 2003 / 200__
O Escrivão de Polícia
Getúlio Samuel Polo
RG. 7.104.672 - Escrivão de Polícia

D.I.S.E. Marília - SP
PROT. n.º 133/2003
L. n.º 107 Fls. 129
Marília 19 FEV 2003
O Escrivão de Polícia

APÊNDICE C

Autorização da entrega da droga.

SECRETARIA DE ESTADO DOS NEGÓCIOS DA SEGURANÇA PÚBLICA
POLÍCIA CIVIL DE SÃO PAULO
DELEGACIA DE INVESTIGAÇÕES SOBRE ENTORPECENTES DE MARÍLIA
D.I.S.E.
Av. Nelson Spielmann n.º 587, Centro, fone: 433-7022

AUTO DE ENTREGA

Aos 06 de março de 2003, nesta cidade de Marília, na Delegacia de Investigações sobre Entorpecentes - D.I.S.E., presente o Doutor FLÁVIO JOSÉ RINO GUIMARÃES, Delegado de Polícia, comigo Escrivão de Polícia ao final assinado, presente Dr. JÚLIO CÉSAR ZORZETTO, RG. 6.734.405/SP, residente à Rua São Jorge, 880, nesta cidade, pela mesma autoridade foi feita entrega de 195.200 GRAMAS DE "CRACK", LACRADO COM O LACRE Nº 0047430, DO NUCLEO DE PERICIAS MÉDICAS LEGAIS, DO INSTITUTO DE CRIMINALISTICA DE MARILIA, relacionado ao IP. nº 270/2002, relativo ao processo nº 1096/2002, conforme determinação Judicial, tendo em vista o ofício nº 266/2003, da 3ª Vara Criminal, Execuções Criminais, Corregedoria dos Presídios e da Polícia Judiciária de Marília, datado de 14.02.2003, Corre. Pres. Nº 01/02 - Exec.I. Nada mais havendo a tratar, mandou a autoridade encerrar este auto, que depois de lido e achado conforme, vai devidamente assinado. Eu, Getúlio T. Sato, Escrivão de Polícia que o digitei.

Autoridade Policial: _____

Recebedor: _____

Testemunha: _____
Gilberto Akio Imamura

Testemunha: _____
Elder Juretto

Escrivão de Polícia: _____

CÓPIA

APÊNDICE D

Resultado da análise do crak-cocaina para ser utilizada no protocolo de estudo.

SECRETARIA DA SEGURANÇA PÚBLICA
SUPERINTENDÊNCIA DA POLÍCIA TÉCNICO-CIENTÍFICA

RESULTADO DE ANÁLISE

Recebemos neste Núcleo de Toxicologia Forense (NTF) do Instituto Médico Legal de São Paulo uma alíquota de crack para análise, que nos foi fornecida pelo Sr. Júlio Cezar Zorzetto, médico legista, lotado no Núcleo de Perícias Médico-Legal de Marília, a fim de qualificar a referida amostra para experimentos em camundongos em sua tese de doutorado no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Resultado:

As análises cromatográficas realizadas pela técnica de cromatografia a gás forneceram resultado qualitativo POSITIVO para COCAÍNA e a quantificação evidenciou um percentual de 57,66% (cinqüenta e sete, sessenta e seis por cento) de cocaína.

São Paulo, 12 de fevereiro de 2004.

Dra. Débora Gonçalves de Carvalho
Perito Criminal
Núcleo de Toxicologia Forense NTF - IML

APÊNDICE E

Trabalho submetido para publicação

Moraes AG, Parra ER, Siqueira HMB, Pires A, de Moraes ESP, Farhat C, de Souza W, Herculiani PP, Zorzetto JC, Mauad T, Saldiva PHN. *Chronic inhalation of crack cocaine induces myocardial remodeling in a murine experimental model.* Toxicological Pathology, 2008.