Percyleine Pelegrine Herculiani

**Efeitos da inalação crônica de cocaína “crack” no
aparelho respiratório de camundongos**

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

Área de concentração: Patologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Thaís Mauad

São Paulo

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
©reprodução autorizada pelo autor

Herculiani, Percyleine Pelegrine

Efeitos da inalação crônica de cocaína “crack” no aparelho respiratório de camundongos / Percyleine Pelegrine Herculiani. -- São Paulo, 2007.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Patologia.

Área de concentração: Patologia.

Orientadora: Thaís Mauad.

Descritores: 1.Cocaína crack 2.Pulmão 3.Nariz 4.Transtornos relacionados ao uso de substâncias 5.Camundongos

USP/FM/SBD-317/07

*“O homem que consagra suas horas
com infatigável empenho a honrosos
objetivos, traça luminosamente o seu
destino”.*

Edward Kong

Dedicatória

Aos meus pais, Pêrsio e Disleine, como reconhecimento que não se traduz por meio de palavras, por tudo que fizeram pela minha formação moral e profissional.

Ao meu marido, Cristóvam, pelo incentivo valioso, participação ativa e compreensão carinhosa nos momentos mais difíceis desta jornada.

Aos meus filhos Rafael e Amanda, pela renúncia e compreensão por todos os momentos que lhes foram subtraídos.

Agradecimentos

À Deus, pela presença constante em minha vida.

À Dra. Thaís Mauad, pelo empenho, paciência, disponibilidade e amizade demonstrados na transmissão de seus conhecimentos, tornando-se responsável pelo meu amadurecimento profissional.

Ao Ruy de Camargo Pires Neto, pela indispensável e fundamental participação nas fases de desenvolvimento e de análise deste trabalho, como também pelas palavras amigas sempre transmitidas.

Ao Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, por ter me recebido no Departamento de Patologia e pela ajuda incondicional deste trabalho, sempre com palavras de apoio e conhecimento.

À Dra. Heloísa Maria de Siqueira Bueno, pela dedicação e pela ajuda incondicional na realização da parte experimental deste estudo.

Ao Dr. Júlio Cezar Zorzetto, pela idéia da câmara de inalação e pelo empenho na obtenção do “crack” junto as autoridades competentes.

Ao Dr. Maurício Yonamine e seu aluno Raphael Caio Tamborelli Garcia, do Departamento de Toxicologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP, pela análise da cocaína sérica dos animais.

À Dra. Débora Gonçalves de Carvalho, do Núcleo de Toxicologia Forense, do Instituto Médico Legal de São Paulo, pela análise da concentração de cocaína no “crack” usado neste trabalho.

Ao Dr. Luiz Carlos da Silva, diretor do Núcleo de Perícias Médico Legal de Marília, por me apresentar ao Departamento de Patologia de FMUSP, e no auxílio na realização deste trabalho.

À Ângela Batista Gomes dos Santos, pela confecção das lâminas de imunohistoquímica.

Aos Funcionários do Laboratório de Histologia, Ady, Cássia, Celina, Kelly, Keyla, Marina e Rosely, pela confecção das lâminas de histoquímica.

À Angélica Baganha Ferreira, Dolores Helena e Sandra Regina de Castro Soares, pela ajuda no sacrifício dos animais.

À Fernanda Degobbi Tenório Quirino S. Lopes, pelo auxílio no processamento dos pulmões.

Aos Funcionários da Universidade de Marília, Cirilo e Magno, pelo incentivo e amizade.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste estudo.

Meus sinceros agradecimentos.

Esta dissertação 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 F. 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 figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 História da cocaína	05
1.2 Aspectos físico-químicos.....	08
1.3 Vias de exposição.....	11
1.4 Propriedades psicoestimulantes.....	12
1.5 Efeitos farmacológicos da cocaína.....	13
1.6 “Overdose”	14
1.7 Alterações respiratórias provocadas pelo “crack”.....	15
1.8 O modelo experimental.....	21
1.8.1 Cavidade nasal.....	22
1.8.2 Pulmões.....	23
2 OBJETIVOS.....	26
3 MÉTODOS.....	28
3.1 Animais.....	28
3.2 Substância teste.....	30
3.3 Exposição ao “crack”.....	31
3.4 Determinação sérica de cocaína.....	35
3.5 Processamento dos tecidos.....	36

3.6 Histoquímica.....	38
3.7 Imunohistoquímica.....	39
3.8 Morfometria.....	39
3.8.1 Epitélio nasal e brônquico.....	40
3.8.2 Artérias pulmonares de pequeno calibre.....	41
3.8.3 Hemossiderina pulmonar.....	42
3.8.4 Densidade de macrófagos e neutrófilos pulmonares.....	42
3.9 Análise estatística.....	43
4 RESULTADOS.....	44
4.1 Temperatura na câmara de exposição.....	45
4.2 Animais.....	45
4.2.1 Peso dos animais.....	45
4.2.2 Concentração sérica de cocaína.....	46
4.2.3 Cavidade nasal.....	47
4.2.3.1 Análise em conjunto das regiões nasais anteriores, mediais e posteriores (1,2 e 3).....	48
4.2.3.2 Análise em separado das regiões da mucosa nasal.....	51
4.2.4 Pulmões.....	59
4.2.4.1 Peso pulmonar.....	59
4.2.4.2 Espessura do epitélio e quantidade de muco brônquico.....	60
4.2.4.3 Artérias pulmonares de pequeno calibre.....	64
4.2.4.4 Quantificação da hemossiderina pulmonar.....	67
4.2.4.5 Densidade de macrófagos pulmonares.....	68
4.2.4.6 Densidade de neutrófilos pulmonares.....	71
5 DISCUSSÃO.....	74
6 CONCLUSÕES.....	88

7 ANEXOS.....	90
8 REFERÊNCIAS	95

Lista de Figuras

Figura 1 - Arbusto <i>Erythroxylon coca</i>	04
Figura 2 - Pedras de “crack’.....	10
Figura 3 - Cachimbos para fumar “crack”	11
Figura 4 - Mecanismos da “overdose” de cocaína.....	15
Figura 5 - Fotomicrografia do epitélio respiratório	22
Figura 6 - Divisão anatômica dos pulmões de camundongo	24
Figura 7 - Recipiente com 5 g de “crack”	32
Figura 8 - Queima do “crack” e produção de fumaça	33
Figura 9 - Câmara de inalação com o grupo exposto	34
Figura 10 - Bomba à vácuo, câmara de inalação e material para queima do “crack”	35
Figura 11 - Ilustração da superfície ventral do crânio de camundongo ..	37
Figura 12 - Curvas do ganho de peso dos grupos controle e exposto ...	46
Figura 13 - Epitélio respiratório do tipo pseudo-estratificado colunar ciliado com células caliciformes	47
Figura 14 - Proporção de volume do muco ácido, neutro e intraepitelial nos grupos controle e exposto nas 3 regiões da mucosa nasal	49
Figura 15 - Volume de muco total e espessura do epitélio nos grupos controle e exposto nas 3 regiões da mucosa nasal.....	50
Figura 16 - Proporção de volume do muco ácido, neutro e intraepitelial nos grupos controle e exposto na região 1 (proximal) da mucosa nasal.	52
Figura 17 - Volume de muco total e espessura do epitélio nos grupos controle e exposto na região 1 (proximal) da mucosa nasal.....	53
Figura 18 - Proporção de volume do muco ácido, neutro e intraepitelial nos grupos controle e exposto na região 2 (medial) da mucosa nasal....	55
Figura 19 - Volume de muco total e espessura do epitélio nos grupos controle e exposto na região 2 (medial) da mucosa nasal.....	56

Figura 20 - Proporção de volume do muco ácido, neutro e intraepitelial nos grupos controle e exposto na região 3 (distal) da mucosa nasal.....	58
Figura 21 - Volume de muco total e espessura do epitélio nos grupos controle e exposto na região 3 (distal) da mucosa nasal.....	59
Figura 22 - Média $\pm$ DP do peso pulmonar (g) entre os dois grupos estudados	60
Figura 23 - Proporção de volume do muco ácido, neutro e intraepitelial entre os dois grupos estudados no epitélio brônquico.....	62
Figura 24 - Volume de muco total e de epitélio nos grupos controle e exposto no epitélio brônquico	63
Figura 25 - Representação histológica do epitélio brônquico no grupo controle e no grupo exposto.....	63
Figura 26 - Índice de espessura da parede de artérias de pequeno calibre entre o grupo controle e exposto.....	65
Figura 27 - Índice de vasoconstrição de artérias de pequeno calibre entre o grupo controle e exposto	66
Figura 28 - Representação histológica de artéria de pequeno calibre com luz ampla do grupo controle e artéria de pequeno calibre com vasoconstrição do grupo exposto.....	66
Figura 29 - Representação gráfica da proporção de volume de estruturas Perls positiva no parênquima pulmonar no grupo controle e exposto	67
Figura 30 - Representação histológica de parênquima pulmonar exibindo negatividade na coloração de Perls do grupo controle e grande quantidade de estruturas Perls positivo do grupo exposto	68
Figura 31 - Representação gráfica da densidade celular de macrófagos alveolares no grupo controle e exposto	69
Figura 32 - Representação histológica de pulmão com quantidade habitual de macrófagos alveolares (células esparsas) no grupo controle e pulmão com grande quantidade de macrófagos alveolares no grupo exposto	69
Figura 33 - Densidade celular de macrófagos nas regiões	

peribrônquicas nos grupos controle e exposto.....	70
Figura 34 - Representação histológica de pulmão do grupo exposto com grande quantidade de macrófagos nas regiões peribrônquicas	71
Figura 35 - Representação gráfica da densidade celular de neutrófilos na região alveolar nos grupos controle e exposto	72
Figura 36 - Representação histológica de pulmão negativo para neutrófilos alveolares no grupo controle e pulmão com grande quantidade de neutrófilos no grupo exposto.....	72
Figura 37 - Número de neutrófilos nas regiões peribrônquicas nos grupos controle e exposto	73

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Comparação entre pulmão de camundongo e humano.....	25
Tabela 2 - Volume de muco ácido, muco neutro, muco intraepitelial, muco total e espessura do epitélio nas 3 regiões da mucosa nasal.....	48
Tabela 3 - Volume de muco ácido, muco neutro, muco intraepitelial, muco total e espessura do epitélio na região1 da mucosa nasal.....	51
Tabela 4 - Volume de muco ácido, muco neutro, muco intraepitelial, muco total e espessura do epitélio na região 2 da mucosa nasal.....	54
Tabela 5 - Volume de muco ácido, muco neutro, muco intraepitelial, muco total e espessura do epitélio na região 3 da mucosa nasal.....	57
Tabela 6 - Média do peso pulmonar nos grupos controle e exposto.....	60
Tabela 7 - Volume de muco ácido, muco neutro, muco intraepitelial, muco total e espessura do epitélio brônquico.....	61
Tabela 8 - Média da espessura da parede de artérias pulmonares de pequeno calibre no grupo controle e exposto.....	64
Tabela 9 - Média do índice de vasoconstrição das artérias pulmonares de pequeno calibre nos grupos controle e exposto.....	65
Tabela 10 - Proporção de volume de estruturas Perls positivas entre o grupo controle e exposto.....	67
Tabela 11 - Densidade de macrófagos no grupo controle e exposto.....	68
Tabela 12 - Densidade de macrófagos nas regiões peribrônquicas no grupo controle e exposto.....	70
Tabela 13 - Média de neutrófilos nos grupos controle e exposto.....	71
Tabela 14 - Média de neutrófilos nas regiões peribrônquicas dos grupos controle e exposto.....	73

Lista de Siglas

AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BALT	<i>Bronchus Associated Lymphoid Tissue</i> - Tecido Linfóide Associado aos Brônquios
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> - Soro de Albumina Bovina
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DAB	Diaminobenzidine
DISE	Delegacia de Investigação Sobre Entorpecentes
EDTA	Etilenodiaminotetracetato de Tetrasódio
GC/MS	<i>Gas Chromatography/Mass Spectrometry</i> - Cromatografia em Fase Gasosa/ Espectrometria de Massa
HE	Hematoxilina & Eosina
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> - Vírus da Imunodeficiência Humana
IL-8	Interleucina 8
IML	Instituto Médico Legal
LBA	Lavado Broncoalveolar
LSD	<i>Lysergic Acid Diethylamide</i> - Dietilamida do Ácido Lisérgico
NTF	Núcleo de Toxicologia Forense
PAS/AB	<i>Periodic Acid Schiff/Alcian Blue</i> - Ácido Periódico de Schiff/Azul Alciano

RESUMO

Herculiani PP. *Efeitos da inalação crônica de cocaína “crack” no aparelho respiratório de camundongos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.102p.

INTRODUÇÃO: Uma das formas de uso (ilegal) da cocaína é a forma fumada, através da queima de uma base de cocaína na forma de “pedras” (cocaína “crack”). O uso da cocaína “crack” pode causar alterações de caráter crônico ou agudo no trato respiratório. Neste estudo foram investigados os efeitos da inalação crônica de cocaína “crack” no aparelho respiratório de camundongos. **MÉTODOS:** Quarenta camundongos Balb/c machos com 60 dias de idade (10 animais controles e 30 expostos) foram usados no estudo. Dez animais foram usados para determinar o nível de cocaína sérica após uma única exposição. Vinte animais foram expostos à fumaça de “crack” em uma câmara de inalação, 5 dias por semana, durante 2 meses. Os dez animais controles foram mantidos no biotério. Análises morfológicas quantitativas de cortes histológicos de nariz e pulmão foram realizadas através da microscopia óptica. Foram quantificados a espessura e quantidade de muco no epitélio nasal e brônquico, a hemossiderina pulmonar, a espessura da parede e o índice de vasoconstrição de artérias pulmonares de pequeno calibre e a densidade de macrófagos e neutrófilos nas regiões alveolares e peribrônquicas. O grupo exposto e controle foram comparados entre si e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. **RESULTADOS:** No epitélio nasal observou-se um aumento de muco ($p < 0,001$) e diminuição de sua espessura ($p < 0,001$) no grupo exposto. No epitélio brônquico não houve alteração da quantidade de muco ($p = 0,075$) entre os grupos, mas observou-se significativa diminuição da espessura epitelial ($p < 0,001$) no grupo exposto. Houve aumento da hemossiderina pulmonar ($p < 0,001$) no grupo exposto. Nas artérias pulmonares de pequeno calibre não houve aumento da espessura da parede ($p = 0,782$) entre os grupos, mas o índice de vasoconstrição foi significativamente maior ($p = 0,034$) no grupo exposto. A densidade celular dos macrófagos foi maior tanto na região alveolar ($p = 0,001$) como na região peribrônquica ($p = 0,001$). A densidade celular de neutrófilos foi maior na região alveolar ($p = 0,002$) do grupo exposto sendo que na região peribrônquica a diferença não foi significativa ($p = 0,419$) entre os grupos. **CONCLUSÕES:** Nossos resultados mostram que a inalação do “crack” causa alterações no aparelho respiratório, afetando desde a mucosa nasal até o parênquima pulmonar. Este estudo contribui para uma melhor compreensão dos efeitos adversos do uso crônico da cocaína “crack” no trato respiratório.

Descritores: 1- Cocaína “crack” 2- Pulmão 3- Nariz 4- Transtornos relacionados ao uso de substâncias 5- Camundongos

SUMMARY

Herculiani PP. *Chronic inhalation effects of crack cocaine in the respiratory system of mice* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 102p.

INTRODUCTION: One of the illegal ways of using cocaine is smoking its rock through a burning cocaine basis shaped resin (crack cocaine). The use of crack cocaine may cause chronic and severe alterations in the respiratory system. In this research, the chronic inhalation effects of “crack” cocaine in mice respiratory systems were studied. **METHODS:** Forty male Balb/c mice, 60-days-old (10 control animals and 30 exposed) were utilized in this study. Ten of them were chosen to determine the level of silky cocaine after one single exposition. Twenty animals were exposed to crack smoke in an inhalation chamber, 5 days a week, during 2 months. All the control animals were kept in the housing unit. Quantitative morphometric analysis of histological cuts in the nose and lung were realized across by the optical microscopy. The following were quantified: the thickness, likewise the amount of mucus in nasal and bronchial epitheliums, lung hemosiderin, ply of the sheet and the rate of vasoconstriction in lung arteries of small diameter, in addition to the density of macrophages and neutrophiles inside of alveolar and peribronchial regions. A comparison between the high-risk and control group was established. The differences were considered significant when $p < 0,05$. **RESULTS:** In the nasal epithelium, an increase of mucus was observed ($p < 0,001$), as well as a decrease of its thickness ($p < 0,001$) in the high-risk group. In the bronchial epithelium, there was no alteration in the amount of mucus ($p = 0,075$) between the groups, but there was a significant decrease in the epithelial ply ($p < 0,001$) inside of the exposed group. There was an increase of lung hemosiderin ($p < 0,001$) in the exposed group. In arteries of small diameter, there was no expansion of the thickness in the sheet ($p = 0,782$) between the groups, although the level of vasoconstriction was significantly higher ($p = 0,034$) in the exposed group. The cellular density of macrophages was higher in the alveolar region ($p = 0,001$), as in the peribronchial one ($p = 0,001$). The cellular density observed in neutrophiles was higher in the alveolar site ($p = 0,002$) of the exposed group, since that in the peribronchial region the difference was not significant ($p = 0,419$) between the groups. **CONCLUSIONS:** Our results show that crack inhalation may cause alterations in the respiratory system, affecting from the nasal mucus until the lung parenchyma. This research contributes for a better comprehension of the adverse effects originating from a chronic use of crack cocaine in the respiratory tract.

Key words: 1 - crack cocaine 2 - lung 3 - nose 4 - disturbs related to the use of substances mice.

.....INTRODUÇÃO

1 Introdução

Segundo a Organização Mundial de Saúde, 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); e dependência corresponde a um padrão comportamental de emprego de uma droga, caracterizado pelo uso compulsivo, decorrente de um envolvimento pessoal profundo, o qual inclui em suas características a procura obsessiva e uma alta tendência a voltar a usá-la após período de supressão (Terra Filho et al., 2004; Silva, 2006). Uma droga ilícita pode ser definida como alguma substância que é proibida ou não autorizada por regras impostas pela sociedade (Terra Filho et al., 2004).

As drogas com capacidade de induzir dependência têm sido comumente denominadas tóxicos, narcóticos, entorpecentes ou simplesmente drogas (Silva, 2006), sendo um problema tão velho quanto a própria civilização, utilizado em muitas sociedades para alterar a disposição, o humor, os pensamentos e os sentimentos (Ferreira Filho et al., 2003).

Segundo Oga (1996), Rang et al. (2001) e Silva (2006) as drogas mais comumente utilizadas na sociedade ocidental atual são:

Ecstasy (MetilenoDioxoMetAnfetamina): É uma anfetamina usada para evitar a sonolência, desinibir e para euforizar. Esta droga aumenta a concentração de dopamina e serotonina no cérebro. Têm a forma de comprimidos e são ingeridos com água ou bebida alcoólica.

Heroína (diacetilmorfina): é um produto sintético que tem a forma de pó branco e cristalino. Derivada da papoula, pertence ao grupo dos opiáceos (hipnoanalgésicos). Pode ser injetada após a diluição ou ser misturada ao fumo do cigarro. Causa uma rápida sensação de prazer, seguida por um efeito de bem estar e sonolência. Pertence ao mesmo grupo químico da morfina, porém sua ação é cinco vezes mais potente. Com 30 dias de uso, o dependente necessita de uma injeção a cada duas horas.

LSD (dietilamida do ácido lisérgico): faz parte do grupo das drogas alucinógenas, é um produto semi-sintético extraído da ergotina do centeio. É utilizado habitualmente via oral, embora possa ser misturado ocasionalmente com tabaco e fumado. O usuário torna-se deprimido, triste e fadigado, apresentando perturbações da percepção do mundo exterior, com delírios e alucinações.

Maconha: também denominada marijuana, diamba, liamba, fumo-de-angola, erva maldita, erva do diabo, canabis, birra, haxixe e maria-joana. Esta droga é conhecida na China e na Índia há 9 mil anos. É extraída das folhas da Cannabis sativa. Seu consumo se dá, principalmente, em forma de cigarros (baseado, fininho). Alguns não a consideram propriamente um tóxico, por não trazer dependência, tolerância, nem crises de abstinência. É um excitante e pode levar o usuário a associar outro tipo de droga. A

maconha provoca prostração, lassidão, olhos perdidos a distância, memória afetada, falta de orientação no tempo e espaço.

Por fim, a cocaína: um dos alcalóides presentes nas folhas do arbusto *Erythroxylon*, natural das encostas andinas, cultivada nas regiões planálticas e região noroeste da Amazônia (Costa Leite e Andrade, 1999). Existem em torno de 200 espécies, mas apenas 17 podem ser utilizadas na produção de cocaína (Costa Leite e Andrade, 1999). As mais utilizadas são as que apresentam uma quantidade maior de alcalóide: a *Erythroxylum novogratense*, variedade trujillo, cultivada legalmente em países andinos e cuja produção destina-se à indústria farmacêutica, onde a cocaína é utilizada como anestésico local ou à indústria alimentícia, como constituinte de chás, e a *Erythroxylum coca* (Figura 1), que constitui a principal fonte de produção ilícita (Oga, 1996).

Figura 1 - Arbusto *Erythroxylum coca*. (Ribeiro e Laranjeira, 2004)

1.1 História da cocaína

As folhas de coca provavelmente foram utilizadas por milhares de anos por civilizações anteriores aos incas, sendo que as primeiras notícias que se tem sobre seu uso datam da época em que Pizarro conquistou o Peru em 1532, época em que os incas mascavam folhas de coca para aumentar a resistência ao frio, à fome e ao cansaço pelo trabalho (Costa Leite e Andrade, 1999; Terra Filho et al., 2004; Silva, 2006).

Em 1858, Albert Niemann extraiu o alcalóide a partir das folhas da droga, criando o termo cocaína, sendo empregada em vários produtos. Sigmund Freud voltava-se para a análise dos efeitos sistêmicos da droga, sugerindo seu uso no controle de diversas patologias, inclusive como recurso substituto para o tratamento de viciados em morfina (Oga, 1996). Karl Koller, em 1884, utilizou a instilação de cocaína na córnea de animais e pacientes, ficando comprovada a propriedade anestésica local (Mari et al., 2002), e John Stife Pimperton, em 1885, patenteou um tônico cerebral que foi transformado em bebida, surgindo a Coca- Cola (Albertson, 1995). A euforia era tanta para os efeitos da cocaína que o neurologista italiano Enrique Pizzi chegou a escrever "... Deus é injusto, pois fez o homem incapaz de manter os efeitos da coca durante toda a sua vida" (Gold, 1993).

Porém, na última década do século XIX, a euforia social pelo uso da cocaína começa a diminuir, pois aumentam os relatos de dependência, comportamento psicótico, convulsões e mortes (Gold, 1993).

Na Europa e Estados Unidos, bebidas com mistura de coca foram proibidas por volta de 1914 e a sociedade, percebendo o problema, pressionava as autoridades para tomarem posições mais severas contra o uso da droga. No início da década de 30 seu consumo diminuiu, deixando de ser um problema social (Costa Leite e Andrade, 1999).

A volta do consumo generalizado de cocaína ocorreu nos anos 70, estando relacionado a alguns fatores como: restrições à comercialização das anfetaminas, reputação da droga como incapaz de causar dependência e ser perfeita para utilizar no meio social devido a sua ação ultracurta (Costa Leite e Andrade, 1999).

Atualmente o uso de cocaína tem se mostrado um grave problema de uso de drogas ilícitas no mundo. Em 2003, a “National Survey on Drug Use and Health” mostrou que, nos Estados Unidos, 14,7% da população com 12 anos ou mais já fizeram uso de cocaína alguma vez em sua vida. Na Europa esta taxa atingiu 5,2% em 2004 (Prinzleve et al., 2004). O maior fator responsável por este aumento de consumo foi o surgimento do “crack”, desenvolvido na segunda metade dos anos 80, quando as características da cocaína foram alteradas para poderem ser fumadas (Terra Filho et al., 2004).

Muitos fatores têm contribuído para o aumento do uso do “crack” nos últimos anos. Entre eles, podemos citar o seu custo mais barato se comparado às outras drogas, a obtenção quase que imediata dos seus efeitos por uma absorção via circulação pulmonar (Tashkin, 2001), a não necessidade de material para injetar a droga, com isso diminuindo o risco de

doenças transmissíveis por via sanguínea, entre eles o vírus da imunodeficiência humana (HIV), a causa da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Costa Leite e Andrade, 1999; Ferreira Filho et al., 2003).

No Brasil, o uso de drogas é também um grave problema de saúde pública, e o consumo de cocaína aumentou entre os estudantes na última década (Guindalini et al., 2006).

Em 1997, 57,1% dos adolescentes com idade entre 11 e 17 anos que procuraram atendimento ambulatorial para dependentes de drogas e/ou álcool na cidade de São Paulo usavam “crack” (Scivoletto et al., 1997), sendo que, quando comparados a usuários de outras drogas, aqueles apresentavam um maior índice de prejuízos escolares, envolvimento com atividades ilegais e problemas familiares (Scivoletto et al., 1997).

Em 2003 uma pesquisa entre os usuários de drogas hospitalizados na grande São Paulo mostrou que 38,4% dos pacientes eram dependentes de “crack” e 31,8% usavam tanto a forma fumada como a inalada (Ferreira Filho et al., 2003). No Brasil, os dependentes de “crack” apresentam uma baixa escolaridade, alto índice de desemprego e prevalência de indivíduos sem moradia fixa (Ferreira Filho et al., 2003).

Segundo Ferreira Filho et al. (2003), o número de internações hospitalares por dependência de drogas entre a população menos favorecida vem se agravando nos últimos anos, principalmente por causa do uso do “crack”. Os usuários são freqüentemente presos e a principal causa de mortes tem sido o homicídio (Ribeiro et al., 2004), aumentando os índices de violência e criminalidade. Admite-se, pela incidência crescente e pela

relevância dos problemas a ela relacionados, que o uso e a dependência desta droga constituirão o problema sanitário mais grave no campo das toxicomanias (Velasco et al., 1993).

1.2 Aspectos físico-químicos

A cocaína (benzoilmetilecgonina, C₁₇, H₂₁, NO₄) é um alcalóide extraído das folhas da *Erythroxylum coca* (Egred e Davis, 2005).

No processo de obtenção de cocaína para consumo ilícito, as folhas do *E. coca* são colocadas em tambores com um solvente como éter, querosene ou até mesmo gasolina, formando-se a pasta de coca que contém de 40 a 85% de sulfato de cocaína. Numa segunda fase é adicionado a esta pasta ácido clorídrico, com o objetivo de refinar o produto, eliminando as impurezas remanescentes do processo anterior, resultando num pó branco, inodoro, solúvel em água, que é o cloridrato de cocaína. Este pó é usado geralmente para inalação ou injetado por via intravenosa, sendo ocasionalmente misturado com heroína. O cloridrato de cocaína, que é solúvel em água, possui ponto de fusão a 196°C, sendo que na temperatura de volatilização se decompõe, portanto não pode ser fumado (Haim et al., 1995). Devido ao seu alto custo no comércio ilícito, a droga é freqüentemente adulterada para comercialização adicionando-se outras substâncias como pó de mármore, giz, talco, farinha, lactose, cafeína, lidocaína, efedrina, fenciclidinina, quinina, estricnina e outros, constituindo-se

no produto conhecido como “cocaína de rua”, que não é pura (Jatlow, 1987; Costa Leite e Andrade, 1999).

A partir do cloridrato é possível obter a base livre e o “crack”, que são alcalóides, exibem degradação pelo calor e vaporização a uma temperatura de 98°C, portanto podendo ser fumados (Haim et al., 1995). A base livre e o “crack” são semelhantes quimicamente, mas são sintetizados de maneiras distintas (Meleca et al., 1997). A base livre é uma mistura do pó com uma solução alcalina, sendo que a extração de cocaína é feita com um solvente (éter, acetona ou álcool) que é evaporado, formando-se então cristais (Haim et al., 1995; Meleca et al., 1997).

A forma preferida de preparação pelos traficantes é a obtenção de um produto chamado de “crack”, “rock” e pedra, em nosso meio, formado por um aquecimento de uma solução de cloridrato de cocaína, bicarbonato de sódio ou amônia e água. Após a mistura de solventes ser evaporada, fica um resíduo de cristais de cocaína, chamados de “rock” ou pedra, devido a sua aparência, e “crack”, devido ao som resultante da queima da pedra (Haim et al., 1995; Meleca et al., 1997) (Figura 2).

Figura 2 - Forma de apresentação do “crack”. Cada centímetro cúbico representa o equivalente à 1g da droga. Fonte: Carga apreendida pela Delegacia de Investigação sobre Entorpecentes de Marília (DISE), da Polícia Civil de São Paulo.

Existem diferentes meios para fumar cocaína, os mais comuns envolvem cachimbos especiais (chamados de “maricas” – Figura 3) improvisados de diversas maneiras, com latas, frascos adaptados com papel alumínio ou misturados com tabaco ou maconha na forma de cigarro (Jatlow, 1987; Meleca et al., 1997).

Figura 3 - Cachimbos ou “maricas” com artefatos caseiros e improvisados para fumar o “crack”, apreendidos pela Delegacia de Investigação sobre Entorpecentes de Marília (DISE), da Polícia Civil de São Paulo, e criança fumando “crack”. Fonte: Ribeiro e Laranjeira, 2004.

1.3 Vias de exposição

A cocaína pode ser utilizada diretamente nas mucosas, por via oral, respiratória ou endovenosa.

Os meios mais comuns de uso ocorrem através da absorção do pó (cloridrato de cocaína) via nasal, pela mucosa, que entra em contato direto com a droga. Os usuários podem desenvolver ulcerações nas narinas e perfuração do septo nasal, devido ao seu alto poder vasoconstritor. Outras vias de utilização são a parenteral endovenosa (no músculo, devido à

constrição local, a injeção de cocaína causaria necrose) e pela via fumada (“crack”), atravessando a membrana alveolar pulmonar, que é uma mucosa ricamente vascularizada (Velasco et al., 1993).

A cocaína fumada atinge a circulação cerebral entre 6 a 8 segundos, a via endovenosa entre 16 a 20 segundos, enquanto que a inalação requer um tempo entre 3 a 5 minutos (Haim et al., 1995). O tempo médio da cocaína no sangue varia de 60 a 90 minutos de acordo com a via de administração (Egred e Davis, 2005).

1.4 Propriedades psicoestimulantes

Os principais efeitos agudos da cocaína são: euforia com uma sensação de prazer intensa, sensação de energia aumentada, aumento das percepções sexuais, auditivas, táteis e visuais, diminuição do apetite pelo bloqueio dos centros da fome do hipotálamo lateral, aumento da ansiedade, diminuição da necessidade de sono, diminuição do cansaço, aumento da autoconfiança, delírios, sintomas gerais de descarga simpática como sudorese, taquicardia, tremor, etc (Gold, 1993; Ferreira Filho et al., 2003).

Em casos de consumo crônico ou após consumo excessivo ocorrem sintomas depressivos, amotivação, sonolência, paranóia e irritabilidade (Costa Leite e Andrade, 1999). O usuário sofre um desejo de repetir os prazeres da droga, que associada à depressão pela abstinência pode levar ao uso crônico compulsivo da mesma (Gold, 1993).

1.5 Efeitos farmacológicos da cocaína

A cocaína é um anestésico local, tem propriedades simpaticomiméticas e é um forte estimulante do Sistema Nervoso Central (Zanini e Oga, 1985; Haim et al., 1995; Oga, 1996).

O efeito anestésico é obtido por um bloqueio da iniciação e transmissão dos sinais elétricos, mediante uma inibição da permeabilidade para o sódio, durante a despolarização da membrana em células nervosas (Laposata e Mayo, 1993; Egred e Davis, 2005). Em contraste, os efeitos sistêmicos no sistema nervoso são exercidos bloqueios dos receptores pré-sinápticos dos neurotransmissores noradrenalina e dopamina (Laposata e Mayo, 1993), e em nervos periféricos inibe receptores da serotonina e dopamina (Egred e Davis, 2005).

As ações simpaticomiméticas da cocaína a nível celular são mediadas por estimulação de receptores α e β adrenérgicos (Egred e Davis, 2005).

A ativação do sistema nervoso simpático leva a uma taquicardia, hipertensão, vasoconstrição, broncodilatação, agitação, midríase, hipertermia e arritmias (Haim et al., 1995). O efeito da hipertermia se deve a três fatores: aumento da atividade muscular, vasoconstrição por estimulação vasomotora central e ação direta sobre o centro termoregulador (França, 2004).

Os efeitos do uso do “crack” no trato respiratório incluem os efeitos diretos pelos vapores e seus produtos de combustão, em adição aos efeitos farmacológicos da cocaína na superfície respiratória (Laposata e Mayo, 1993).

Os efeitos pulmonares por ação direta da droga incluem uma hiperatividade aérea com um aumento da permeabilidade do epitélio alveolar, aumento da permeabilidade dos capilares alveolares e uma vasoconstrição. O edema pulmonar tem uma relação indireta da bomba cardíaca através de uma falência ventricular esquerda (Laposata e Mayo, 1993).

1.6 “Overdose”

Segundo Perri e Dunn (1999), “overdose” é o uso de qualquer droga em tais quantidades que efeitos agudos físicos e mentais ocorrem. Ela pode ser deliberada ou acidental, fatal ou não fatal.

Uma dose suficientemente alta de cocaína, a “overdose”, pode levar à falência de um ou mais órgãos do corpo (Ellenhorn et al., 1997).

No Brasil quase não existem dados sobre “overdose”, mas um estudo com 294 usuários de cocaína em serviços de atendimento em São Paulo mostrou que 43% já tiveram “overdose” por cocaína, e deste total, 56% foi através do uso do “crack” (Perri e Dunn, 1999)

A “overdose” pode acometer qualquer tipo de usuário (crônicos, eventuais ou iniciantes). O mecanismo é a hiperestimulação do sistema nervoso simpático, através do bloqueio da recaptação das catecolaminas no Sistema Nervoso Central (SNC). A dose letal para o uso oral é de 1 a 1,2 g de cocaína pura (Costa Leite e Andrade, 1999). Fatores como a tolerância, presença de patologias de base (por exemplo, insuficiência coronariana) e grau de pureza da cocaína vendida nas ruas, influenciam a sua ocorrência.

Mittleman e Wetil (1987) constataram em necropsias uma relação entre doenças coronarianas e “overdose”.

Nela, rapidamente o paciente fica excitado, inquieto, ansioso e perturbado. A “overdose” pode levar um usuário ao óbito através de um infarto agudo do miocárdio, arritmia cardíaca, hemorragia cerebral, hiperpirexia, convulsões e parada respiratória (Weiss et al., 1994) (Figura 4).

Figura 4 - Mecanismos da “overdose” de cocaína (Ribeiro e Laranjeira, 2004).

1.7 Alterações respiratórias provocadas pelo crack

São relatados muitos efeitos adversos no aparelho respiratório resultantes do uso de cocaína (Albertson et al., 1995; Thadani, 1996; Baldwin et al., 2002; Terra Filho et al., 2004). As alterações dependem da via de administração, da quantidade da droga usada, da frequência no uso, da existência de contaminação microbiológica, da presença de substâncias

utilizadas para adulterar a amostra, do compartilhamento do material para consumir a droga e do usuário (Terra Filho et al., 2004).

Quando o crack é fumado o aparelho respiratório é exposto a vapores com produtos tóxicos resultantes da pirólise da droga. Além da cocaína, durante a degradação térmica, cerca de 5% da cocaína é convertida em metilanidroecgonina (Wood et al., 1996; Scheidweiler et al. 2003). Estes vapores atingem diretamente os pulmões, sendo absorvidos rapidamente pela membrana mucosa e pelo epitélio alveolar, atingindo rapidamente a corrente sanguínea e levando rapidamente a efeitos fisiológicos e psicológicos intensos (Terra Filho et al., 2004).

Em casos forenses a metilanidroecgonina tem sido detectada em fluidos biológicos como urina, sangue, saliva e suor, sendo usada como marcador para diferenciar usuários de “crack”, de usuários que utilizam outra via de administração da cocaína (Scheidweiler et al., 2003).

Alterações nasais locais têm sido descritas pelo uso de cocaína e crack, como sangramento nasal, rinite crônica, diminuição do olfato e perfuração nasal (Nassif Filho et al., 1999; Tierney e Stadelmann, 1999 e Mari et al., 2002). Em 1999, Nassif Filho et al., estudando 16 pacientes viciados em cocaína e ou “crack” mostraram que através de uma rinoscopia pode-se observar as seguintes alterações: mucosa nasal hiperemiada (43,75%) e empalidecida (37,5%), edema presente em 62,5%, secreção mucopurulenta (12,5%), crostosa (31,25%) e serosa (12,5%). Em três pacientes usuários crônicos de cocaína com lesões nasais foram encontrados, através de biópsias, os seguintes resultados: paciente1-

ulceração não específica e inflamação crônica; paciente 2- severa inflamação crônica e hiperplasia epitelial e paciente 3- com inflamação crônica não específica (Mari et al., 2002).

O uso do crack pode levar a alterações pulmonares agudas, sendo que a explicação para esses efeitos ainda não são conhecidos (Baldwin et al., 2002). Muitas hipóteses têm sido propostas, entre elas temos a anóxia celular resultante da vasoconstrição pulmonar, efeito tóxico direto no endotélio do capilar alveolar e no epitélio brônquico e reação de hipersensibilidade para os componentes da cocaína básica (Terra Filho et al., 2004).

Várias complicações pulmonares agudas devido ao uso do crack são descritas na literatura (Albertson et al., 1995; Haim et al., 1995 ; Terra Filho et al., 2004). Segundo Terra Filho et al. (2004), os sintomas respiratórios são variados e não específicos, podendo aparecer após algumas horas ou alguns minutos após o uso da droga, sendo que os mais comuns relatados em usuários de “crack” são dor torácica, dispnéia, tosse com expectoração de secreção escura ou sanguinolenta, hemoptise, agitação, asma e episódios periódicos de broncoespasmos.

A prevalência destes sintomas é variável como mostram alguns estudos. Um dos pioneiros foi Itkonen et al. (1984) que mostraram que, de 19 pacientes usuários de “crack” estudados, houve o relato de tosse e dispnéia em 58% dos casos; Delbono et al. (1989) mostraram que, de 36 pacientes, 61% apresentavam tosse com secreção, 50% dificuldade em respirar e 44% dispnéia. Em 1992, Tashkin et al. apresentaram um estudo

com 192 usuários da droga, mostrando que os principais sintomas pulmonares foram tosse com secreção escura (44%), dor torácica (38%) e hemoptise (6%); enquanto Suhl e Gorelick (1998) mostram que, de 23 usuários, 26% relataram apresentar tosse, 21% secreção pulmonar, 32% dificuldades em respirar, 21% dispnéia e 26% hemoptise.

O mecanismo da tosse possivelmente seja provocado pela irritação epitelial das vias aéreas, resultado da inalação dos produtos de combustão do “crack” (Haim et al. 1995). A secreção pulmonar escura que é característica de usuários de “crack” se deve à inalação de resíduos de carbonáceos mediante a utilização de álcool para acender a cocaína. Klinger et al. (1992) estudaram uma paciente usuária da droga e observaram através do lavado brônquico a presença de carbonáceos e muitos macrófagos com pigmentos. A dor torácica pode estar relacionada com a irritação local das vias aéreas; também não pode ser descartada a possibilidade de isquemia ou infarto do miocárdio, pneumotórax e pneumomediastino (Warner, 1993). A hemoptise pode ser resultado da ruptura de vasos sanguíneos submucosos da traquéia, brônquios ou originado dos capilares alveolares (Haim et al., 1995; Gallouj et al., 1999). Edema pulmonar foi relatado por Cucco et al. (1987) em um homem de 31 anos, após o uso de uma grande quantidade de “crack” que resultou em infiltrados pulmonares bilaterais visíveis através de radiografias torácicas e um lavado brônquioalveolar (BAL) rico em proteínas.

Pouco se conhece sobre os efeitos do abuso regular e crônico do “crack” no aparelho respiratório. Alguns autores descrevem barotrauma com

pneumotórax e pneumomediastino, enfisema, edema pulmonar não-cardiogênico, hemorragia alveolar, pneumonite, fibrose intersticial, bronquiolite obliterante com pneumonia, vasculite e hipertensão pulmonar (Laposata e Mayo, 1993; Albertson et al., 1995; Terra Filho et al. 2004).

Em um estudo de 12 meses com 56 usuários de drogas injetáveis submetidos a radiografias de tórax, observou-se que 16 apresentavam enfisema e neste grupo 10 eram usuários de cocaína (Gurney e Bates, 1989). Também em 1989, Murray et al., através de 20 exames necroscópicos de indivíduos que morreram de intoxicação por cocaína, observaram hemorragia pulmonar pela presença de macrófagos com hemossiderina positiva em 7 casos e hipertrofia da artéria pulmonar em 4 casos. Bailey et al. (1994), em 52 necropsias com exame toxicológico positivo para cocaína, encontraram, através de exames histopatológicos, hemorragia crônica em 40% dos casos, pneumonite e fibrose em 38%, congestão em 88% e edema intra-alveolar em 77%.

Usando ecocardiografia transtorácica, Yakel e Eisenberg (1995) estudaram treze usuários crônicos de cocaína e encontraram oito deles com a pressão pulmonar maior que 30 mmHg, caracterizando um quadro de hipertensão pulmonar. Baldwin et al. em 2002 estudaram 36 indivíduos usuários de cocaína e/ou tabaco e puderam observar, através da coleta do lavado broncoalveolar (LBA), que houve um aumento significativo de macrófagos alveolares com hemossiderina positiva do grupo dos fumantes de cocaína (“crack”) em relação ao grupo que faz uso de outras formas de cocaína (inalável e injetada) ou tabaco. Em outro trabalho, onde estudaram

o LBA de 31 usuários de cocaína (“crack” ou outras formas) e/ou tabaco, também observou-se no grupo de fumantes de “crack” um aumento do ferro tanto no macrófago alveolar como no próprio fluído broncoalveolar (Janjua et al., 2001). Outros trabalhos (Baldwin et al., 1997b; Roth et al., 2003) mostraram que os macrófagos alveolares dos fumantes de cocaína apresentaram uma atividade limitada na fagocitose da bactéria *Stafilococcus aureus*, mediante a incapacidade de utilizar o óxido nítrico como uma molécula antibacteriana.

No trabalho de Baldwin et al. (1997a), 24 usuários de “crack” foram recrutados para injetar ou inalar cocaína ou placebo e, através da análise de uma amostra de sangue, verificou-se que a exposição à cocaína aumentou a quantidade de interleucina 8 (IL-8), um potente quimiotático de neutrófilos, e a atividade antibacteriana dos neutrófilos, sendo que esta avaliação foi feita de acordo com a capacidade destas células em destruir *Stafilococcus aureus*. Poucos estudos histológicos existem em tecido pulmonar de usuários de “crack” que não sejam de necropsias, entre eles Fligiel et al. (1997) realizaram um estudo com indivíduos não fumantes e fumantes de cocaína, tabaco e/ou maconha e, através de biópsias da mucosa brônquica, relataram que o grupo de usuários de cocaína fumada apresentava uma hiperplasia de células basais e metaplasia de células escamosas brônquicas.

As dificuldades de compreender de maneira sistemática os efeitos crônicos do uso “crack” nos pulmões resultam de diversos fatores: número reduzido de pacientes nos estudos, uso concomitante de outras drogas,

dificuldade em controlar a composição das amostras e dificuldade de padronizar um modelo padrão para a exposição (Fligiel et al., 1997).

Devido a esses fatores, tem sido sugerido o uso de modelos animais como uma alternativa para uma melhor compreensão das patologias pulmonares e do mecanismo dos danos pulmonares crônicos em usuários de cocaína injetada (Robin et al., 1989 e Barroso- Moguel et al., 1999).

A motivação deste estudo surgiu da lacuna existente na literatura científica sobre os danos crônicos ao aparelho respiratório pelo uso do “crack”, visando reproduzir as condições de exposição dos usuários. Para tal, desenvolvemos um modelo experimental biológico de inalação crônica por “crack” cocaína em camundongos.

Frente ao exposto acima, levantamos a hipótese que o sistema respiratório é afetado desfavoravelmente pelo uso do “crack”, tanto no segmento superior, com alterações do epitélio nasal, como no segmento pulmonar, com alterações do epitélio brônquico, e no segmento parênquimatoso, com alterações vasculares, assim bem como um aumento da reação inflamatória pulmonar.

1.8 O modelo experimental

O camundongo foi escolhido como modelo experimental neste estudo devido à ampla disponibilidade destes animais, além de serem de baixo custo e de fácil manipulação (Andersen et al., 2004). O uso de camundongos permite também o uso de anticorpos para marcação tissular em técnicas de imunohistoquímica, uma vez que existem diversos anticorpos anti-

camundongos disponíveis. No entanto, existem diferenças entre o trato respiratório humano e dos mesmos, sendo aqui algumas delas apresentadas.

O aparelho respiratório do camundongo compreende uma porção condutora formada pela cavidade nasal, laringe, traquéia, brônquio e bronquíolos terminais, e uma porção respiratória constituída pelos ductos alveolares e alvéolos, sendo diferente do humano por não apresentar bronquíolos respiratórios (Hedrich, 2004).

A maior parte da porção condutora é formada por um epitélio respiratório, representado principalmente por um epitélio pseudo-estratificado colunar ciliado e células caliciformes secretoras de muco (Junqueira e Carneiro, 2004) (Figura 5).

Figura 5 - Fotomicrografia evidenciando os principais componentes do epitélio respiratório (pseudo-estratificado ciliado com células caliciformes nas setas). 400x PAS/AB

1.8.1 Cavidade nasal

O nariz é a primeira porção do sistema respiratório a entrar em contato com o meio ambiente, fazendo parte da porção condutora do sistema

respiratório e apresentando as principais funções de filtrar, aquecer e umidificar o ar inspirado (Guyton e Hall, 1998). Na medida em que seu epitélio é comprometido ou que sofra algum dano, as vias aéreas poderão estar mais suscetíveis às agressões geradas pelo meio externo.

A cavidade nasal está dividida longitudinalmente (anterior para posterior) em narinas, concha nasal, concha maxilar, concha etmoidal, faringe (nasofaringe, orofaringe, epiglote e laringofaringe) e laringe. Separando a cavidade nasal em duas metades semelhantes está o septo nasal, constituído de tecido cartilaginoso e, ao contrário dos humanos, o septo nasal dos camundongos não separa totalmente as metades da cavidade nasal. Um pequeno espaço em sua base anteriormente ao ducto nasofaríngeo permite comunicação direta entre os compartimentos e serve de “caminho” para a nasofaringe. Este espaço também serve de ponto de convergência para os fluxos de ar e de muco (Herbert e Leininger, 1999).

1.8.2 Pulmões

No homem o pulmão esquerdo encontra-se dividido em lobos superior e inferior, e o pulmão direito em lobos superior, médio e inferior (Gardner et al., 1988).

No camundongo o pulmão esquerdo apresenta um lobo e o direito quatro lobos: cranial, médio, caudal e acessório (Hedrich, 2004) (Figura 6).

Figura 6 - Divisão anatômica dos pulmões de camundongo. (Ward e Parsonneault, 2007)

Os pulmões são penetrados pelos brônquios principais originados por uma bifurcação da traquéia. Os brônquios principais se ramificam para formar os brônquios intrapulmonares e terminarem como bronquíolos. As grandes vias aéreas do camundongo são formadas por células epiteliais colunares, células de Clara, células ciliadas, células neuroendócrinas, células mucosas e células em escova (Hedrich, 2004). As células de Clara são não ciliadas e apresentam microvilosidades na região apical, exibindo grânulos de secreção com glicoproteínas, sendo importantes na proteção do epitélio e na degradação de toxinas através da degradação de enzimas do citocromo P- 450 (Gartner e Hiatt, 2003).

As pequenas vias aéreas do camundongo são os bronquíolos terminais com aberturas nos ductos alveolares, que terminam nos sacos alveolares e alvéolos (Hedrich, 2004). Os alvéolos são pequenos sacos aéreos constituídos por pneumócitos tipo I, células pavimentosas de revestimento e

pneumócitos tipo II e células arredondadas responsáveis pela secreção do surfactante pulmonar (Gartner e Hiatt, 2003). A tabela abaixo permite uma comparação entre o pulmão humano e o de camundongo.

Tabela 1: Comparação entre pulmão de camundongo e humano.

	Camundongo	Humano
anatomia	direito: 4 lobos esquerdo: 1 lobo	direito: 3 lobos esquerdo: 2 lobos
diâmetro do brônquio principal	1mm	10 – 15 mm
diâmetro do bronquíolo	0,01 – 0,05 mm	< 1mm
diâmetro do brônquio terminal	0,01 mm	0,6 mm
diâmetro do bronquíolo respiratório	ausente	0,5 mm
diâmetro do alvéolo	0,00039 – 0,0069 mm	0,2 – 0,4 mm

Fonte: Hedrich, 2004.

O tecido linfóide associado aos brônquios (“BALT”), são raramente observados em camundongos saudáveis. Os pulmões recebem nutrientes da circulação sistêmica por meio das artérias brônquicas e sangue venoso via artérias pulmonares do coração (Hedrich, 2004).

O parênquima pulmonar do camundongo ocupa uma fração maior se comparado com o pulmão humano (camundongo, 18%, e homem, 12% do volume pulmonar) (Irvin e Bates, 2003).

Em trabalhos recentes, o animal foi utilizado como um modelo experimental de inalação. No nosso grupo, em 2006, Pires Neto et al. mostraram os efeitos da exposição à poluição urbana na cavidade nasal de camundongos. Diversos outros autores, trabalhando com a fumaça de cigarros, demonstraram seus efeitos no aparelho respiratório (Hamm et al., 2007; Hodge-Bell et al., 2007).

.....OBJETIVOS

2 Objetivos

2.1 Geral

Analisar os efeitos da inalação crônica do “crack” no aparelho respiratório de camundongos.

2.2 Específicos

- Avaliar as alterações epiteliais da mucosa nasal e dos brônquios;
- Identificar alterações vasculares pulmonares;
- Quantificar a hemossiderina no parênquima pulmonar;
- Quantificar macrófagos e neutrófilos pulmonares.

.....**MÉTODOS**

3 Métodos

Este estudo foi aprovado pela 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 24.11.2005. Protocolo de Pesquisa nº 773/05.

3.1 Animais

Foram utilizados 40 camundongos machos da linhagem Balb/c com idade de 60 dias, provenientes do Biotério de Criação da Faculdade de Medicina USP e mantidos no Biotério do Departamento de Patologia da FMUSP durante o período experimental, cujas instalações estão de acordo com as normas do “Guide for the Care and Use of Laboratory Animal Resources (National Academy of Sciences, Washington Dc, 1996)” e aos princípios éticos da legislação brasileira e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os animais receberam ração comercial balanceada e água à vontade. Registros de ocorrências de morte foram feitos diariamente. Os animais foram pesados em grupo, 6 vezes durante todo o período experimental. Os pesos médios dos grupos controle e

exposto foram obtidos através do peso total do grupo dividido pelo número de animais.

Os animais foram divididos ao acaso para a formação de 2 grupos, a saber:

- Grupo Controle: (n=10) camundongos não expostos à inalação de “crack”, mantidos no biotério;
- Grupo Exposto : (n=30) camundongos expostos à inalação de “crack”.

3.2 Substância teste

A droga ‘crack’ foi concedida através de solicitação oficial ao Delegado Seccional de Marília com fornecimento autorizado pela 3ª Vara Criminal, Execuções Criminais – Corregedoria dos Presídios e da Polícia Judiciária – Poder Judiciário da Comarca de Marília/SP, para exclusivo desenvolvimento deste estudo (Anexo 1).

Foram utilizadas amostras do “crack” provenientes da Delegacia de Investigação sobre Entorpecentes de Marília (DISE) da Polícia Civil de São Paulo – Secretaria dos Negócios da Segurança Pública. Trata-se de material de uso popular, apreendido de fonte única, compondo um único lote lacrado (lacre nº 0047430) pelo Núcleo de Perícias Médico Legais do Instituto de Criminalística de Marília – São Paulo, contendo 195,2 g da droga “in natura” (pedras); vide anexos 2 e 3.

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), a fim de detectar e quantificar a presença de cocaína. Através da técnica de cromatografia em fase gasosa o resultado foi positivo para presença de cocaína e o percentual foi de 57,66% desta droga na amostra (Anexo 4).

3.3 Exposição ao “crack”

Os 10 animais do grupo controle foram mantidos por todo o período experimental em instalações no biotério sem sofrer exposição ao “crack”.

Os grupos experimentais de exposição foram submetidos a 5 minutos de inalação à fumaça produzida pela queima de 5 g de “crack”, dentro de uma câmara de inalação. Dez animais fizeram uma única exposição à droga para determinar os níveis plasmáticos da cocaína e os outros 20 fizeram uma exposição diária, exceto aos finais de semana, por 60 dias.

Para o experimento todo o lote de “crack” foi pesado e dividido em porções de 5 g, mantidos em pequenos recipientes de alumínio (Figura 7) e coberto por filme plástico até sua utilização em protocolo de exposição.

Figura 7 - Recipiente com 5 g de “crack”.

Por motivos de segurança apenas um pesquisador conhecia o local de acondicionamento da droga e também fornecia aos outros pesquisadores a dose diária antes de cada inalação.

Um modelo de exposição por via inalatória da droga foi especialmente desenvolvido para simular o “uso real”. Este modelo foi formado por 3 partes:

1. Queima e produção de fumaça de “crack”, composto formado através de um apoio de ferro para acomodar o recipiente de alumínio, contendo 5 g da droga, e sob ela uma chama produzida por álcool etílico 92,8° em lamparina. O aquecimento da base do recipiente promoveu o derretimento e queima das pequenas pedras de “crack”, produzindo uma fumaça densa pela sublimação dos compostos voláteis, com duração média de 5 minutos. A fumaça produzida foi represada em funil de vidro (Figura 8).

Figura 8 – Queima do “crack” e produção de fumaça.

2. Câmara de inalação, caixa feita de acrílico incolor transparente com 45cm de comprimento, 35cm de largura e 13,5cm de altura, hermeticamente fechada, onde foram colocados os camundongos do grupo exposto (Figura 9). A fim de que a fumaça produzida pela queima do crack fosse diretamente conduzida à câmara de inalação, o funil foi conectado através de mangueiras de silicone diretamente em um orifício lateral da câmara de inalação. A temperatura no interior da câmara foi medida utilizando-se um termômetro digital.

Figura 9 – Câmara de inalação com o grupo exposto

3. Controle de fluxo da fumaça, através da criação de pressão positiva de ar dentro da câmara por meio de bomba de vácuo conectada, também por mangueiras de silicone, ao orifício de saída de fumaça, feito na parede lateral oposta àquela de entrada da fumaça na câmara (Figura 10). A pressão da bomba à vácuo foi controlada por válvula de vazão e medida em fluxômetro. O fluxo ideal para exposição foi determinado em 20 L/min. O direcionamento da fumaça de “crack” produzida para dentro da câmara, então, se deu por pressão negativa controlada, que permitiu a entrada, total dissipação e posteriormente a saída da fumaça de “crack” capturada pelo funil.

A fim de estabelecer também o aporte de oxigênio aos animais havia também um conector em forma de “Y” na mangueira de entrada de fumaça para a câmara, permitindo que ar ambiente e fumaça de “crack” entrassem na câmara em igual proporção. Todo o procedimento de exposição

conduzido em capela de pressão negativa de ar, a fim de que o residual de fumaça tóxica produzida fosse totalmente eliminado para o ambiente externo.

Figura 10 – Bomba à vácuo, câmara de inalação e material para queima do “crack” no interior da capela.

3.4 Determinação sérica de cocaína

Após uma única exposição à fumaça do “crack”, 10 animais do grupo exposto foram anestesiados com 50 mg/kg de pentobarbital de sódio, coletado 1 mL de sangue de cada, e a eutanásia feita em seguida. Em um único frasco heparinizado, 10 mL de sangue foram encaminhados para se determinar o nível sérico de cocaína pelo Departamento de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, usando a espectrometria de massa associada à cromatografia em fase gasosa (GC/MS). A concentração foi determinada em todo o sangue pela extração líquido-líquido usando a mistura n-hexano e diclorometano (4:1).

Depois de agitar e separar, a fase orgânica foi secada sobre um brando fluxo de nitrogênio em bloco de aquecimento à 40°C. O resíduo foi ressuspenso em uma mistura de n-hexano e etanol (9:1) e 1µL foi injetado na GC-MS (Björk et al., 1990). O éster isopropil benzoilecgonina foi usado no padrão interno.

3.5 Processamento dos tecidos

Ao final do período de exposição, os animais foram encaminhados ao laboratório, pesados e anestesiados com pentobarbital sódico 50 mg/Kg. Depois da anestesia, a aorta abdominal foi cortada a fim de sacrificar o animal por exsanguinação.

A cabeça foi imediatamente separada do restante do corpo e 5mL de solução formalina tamponada a 10% foi injetada através da traquéia em direção a cavidade nasal. A pele, a musculatura e o excesso de tecido foram retirados, a mandíbula foi desarticulada e somente a cavidade nasal foi imersa em solução formalina tamponada a 10% por 24 horas para fixação do material. Após este período, a cavidade nasal foi imersa em solução de etilenodiaminotetracetato de tetrasódio (EDTA) a 5% para descalcificação por 14 dias.

Ao término da descalcificação, a cavidade nasal foi dividida em três níveis de secção transversal: região 1 ou proximal, onde o ponto de corte é imediatamente após o dente incisivo superior; região 2 ou medial, com o

ponto de corte próximo à papila incisiva, anteriormente ao palato duro; região 3 ou distal, na metade do segundo dente molar (Figura 11). Esta técnica, com estes níveis de corte, permite examinar os principais tipos de epitélio que revestem a cavidade nasal e os danos causados após a inalação de substâncias tóxicas (Herbert e Leininger, 1999).

Figura 11 – Ilustração da superfície ventral do crânio de camundongo evidenciando as estruturas utilizadas para marcar os “pontos de corte” da cavidade nasal. As linhas I, II e III indicam os níveis dos cortes padronizados pelo Programa de Toxicologia Nacional – EUA (Herbert e Leininger, 1999).

Os pulmões foram pesados e a traquéia canulada. Ambos pulmões foram inflados com pressão positiva constante de 20cm de água com 10% de formalina tamponada por 24 horas, permitindo a expansão homogênea do parênquima pulmonar (Halbower et al., 1994; Kasahara et al., 2000). Depois disso, os pulmões foram cortados transversalmente em 4 segmentos no lado direito e 3 segmentos no lado esquerdo.

3.6 Histoquímica

Cortes transversais das três regiões da cavidade nasal e dos pulmões direito e esquerdo passaram pelas seguintes etapas:

- a) lavagem em água destilada ;
- b) banhos em etanol (70, 80, 90 e 100%);
- c) banho em xilol;
- d) impregnação em parafina no interior da estufa;
- e) inclusão em parafina;
- f) cortes semi-seriados de 5 μ m de espessura foram obtidos em um micrótomo Jung-Leica RM2045;
- g) desparafinização;
- h) hidratação;
- i) coloração.

Nariz- Foram feitas 3 lâminas de cada animal com os segmentos proximal (1), médio (2) e distal (3) sendo corados pela técnica do Ácido Periódico de Schiff e Azul Alciano (PAS/AB) a um pH de 2,5.

Pulmões- Foram feitas 8 lâminas de cada animal, sendo 4 do pulmão direito e 4 do pulmão esquerdo. Uma lâmina de cada pulmão por animal foi encaminhada para imunohistoquímica e as outras receberam as seguintes colorações:

- Hematoxilina & Eosina (HE)
- Ácido Periódico de Schiff e Azul Alciano (PAS/AB)
- Perls

3.7 Imunohistoquímica

Os cortes de segmentos pulmonares foram desparafinados, hidratados e depois de bloqueados pela peroxidase endógena, a recuperação do antígeno foi feita com citrato tampão (ph=6) em altas temperaturas. Os seguintes anticorpos primários contra macrófagos e neutrófilos foram usados no estudo: macrófago anti-camundongo Mac-2 (1:25,000, clone M3/38; Cedarlane, ON, Canadá) e o neutrófilo anti-camundongo (1:400, clone 7/4, Serotec, Oxford, UK). O Kit Vecstastin ABC, do laboratório Vector (Burlingame, CA, USA) foi usado como um segundo anticorpo. O 3'3 Diaminobenzidine (DAB) (Sigma, St. Louis, Mo, USA) foi usado como cromógeno. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris. Para os controles negativos, o primeiro anticorpo foi omitido do procedimento e BSA (Soro de Albumina Bovina) foi utilizado no lugar.

3.8 Morfometria

Análises morfométricas foram feitas através de um retículo quadriculado, apresentando 400 pontos e adaptado a uma das oculares de um microscópio óptico comum da marca Nikon. Todas as lâminas foram

analisadas através de um aumento de 400x, apresentando uma área total de 62500 μm^2 . As lâminas foram codificadas e as medidas foram feitas sem um conhecimento prévio do grupo de estudo.

3.8.1 Epitélio nasal e brônquico

No epitélio nasal e brônquico foram avaliados os seguintes parâmetros:

- espessura do epitélio (nº pontos no epitélio);
- quantidade de muco intraepitelial (muco ácido + muco neutro);
- quantidade de muco total (muco ácido + muco neutro + muco excretado na porção apical da célula).

A proporção de volume de muco ácido (corado em rosa) e neutro (corado em azul) (Jones e Reid, 1978) pode ser determinada no epitélio nasal e brônquico, de acordo com a fórmula (Weibel, 1990; Weibel e Cruz-Orive, 1997):

$$\text{Proporção de Volume de Muco} = \frac{P_m}{P_t}$$

Onde P_m corresponde ao número de pontos que caem sobre as estruturas mucosas (ácidas ou neutras), e P_t é o número total de pontos que

caem sobre o epitélio em um comprimento conhecido e uniforme de mucosa nasal. A proporção de volume foi expressa em porcentagem.

3.8.2 Artérias pulmonares de pequeno calibre

Para avaliar o grau de contração e espessura das artérias pulmonares de pequeno calibre, lâminas coradas com HE foram utilizadas e a proporção da área luz/parede (L/P) foi determinada nos cortes transversais usando critérios específicos de medidas (Batalha et al., 2002). Como critérios de seleção todas artérias avaliadas estavam localizadas na junção broncoalveolar e no corte transversal à variação entre o diâmetro máximo e mínimo foi <10% . Em geral foi encontrado e avaliado em cada animal de 8-10 artérias de pequeno calibre seguindo estes critérios. Cada artéria foi colocada no centro do retículo e os pontos localizados na luz e na parede foram contados separadamente.

O grau de vasoconstrição foi avaliado pela seguinte fórmula (Batalha et al., 2002):

$$\frac{\text{Número de pontos na luz}}{\text{Número de pontos na parede}}$$

Para avaliar a espessura da artéria, utilizamos a seguinte fórmula (Warth et al., 1995):

$$\frac{\text{Número de pontos na parede}}{\text{Número de interceptos na membrana limitante elástica externa}}$$

3.8.3 Hemossiderina pulmonar

Para visualizar-se a hemossiderina no parênquima pulmonar foi utilizada a técnica de Perls (Putt, 1972). A proporção de volume de estruturas Perls positivas (coradas em azul) no parênquima pulmonar foi avaliada em vinte campos por animal, sendo os resultados expressos em porcentagens. Para quantificar a hemossiderina foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Número de pontos em material Perls positivo}}{\text{Número de pontos no parênquima pulmonar}}$$

3.8.4 Densidade de macrófagos e neutrófilos pulmonares

A densidade de macrófagos e neutrófilos alveolares foi calculada pela contagem do número de células presentes nos tecidos alveolares e peribrônquicos em cada campo microscópico. No parênquima alveolar, vinte campos foram analisados por animal. A área do tecido alveolar em cada campo foi calculada de acordo com o número de pontos que caem no tecido alveolar. Igualmente a densidade de macrófagos e neutrófilos peribrônquicos foram analisadas em toda a extensão da parede de 5 bronquíolos por animal.

A densidade das células foi determinada de acordo com a fórmula e os resultados expressos em células/mm² (Magalhães et al., 2005):

$$\frac{\text{Número de células marcadas positivas}}{\text{Área do tecido (pontos que caiam em parênquima pulmonar)}}$$

3.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias $\pm$ desvio padrão. A comparação entre os grupos foi representado utilizando o teste t ou Mann-Whitney, dependendo da distribuição dos dados. A análise estatística foi realizada com o auxílio do “software” SPSS para Windows, versão 13.0. Correlações entre densidade de macrófagos, neutrófilos e pigmentos de hemossiderina, foi representado usando o teste de correlação Spearman. Diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

.....RESULTADOS

4 Resultados

4.1 Temperatura na câmara de exposição

A temperatura interna da câmara girou em torno de **24°C ± 1°C** durante a exposição (3 medidas).

4.2 Animais

Nenhuma morte de animais foi registrada durante o período total de exposição.

4.2.1 Peso dos animais

Os animais foram pesados a cada semana (por 6 vezes), em grupo, durante o experimento. O grupo exposto mostrou um peso inicial médio de 20,80g e um peso final médio de 23,40g. A figura 12 mostra as curvas do ganho de peso em relação ao peso inicial durante o experimento. Os animais do grupo controle e exposto mantiveram um ganho de peso similar na 2ª, 3ª e 4ª aferição, mostrando que na 5ª e 6ª o ganho de peso do grupo exposto foi ligeiramente menor em relação ao controle. Não houve perda de peso pelos grupos.

Figura 12 – Curvas do ganho de peso dos grupos controle e exposto. Podemos observar que o ganho de peso foi similar nas 4 primeiras medidas e nas 2 últimas foi ligeiramente menor no grupo exposto. O peso do grupo foi expresso em porcentagem.

4.2.2 Concentração sérica de cocaína

A análise de 10 animais do grupo exposto revelou uma concentração de **212,5 ng de cocaína/ml** de sangue.

4.2.3 Cavidade nasal

Na figura 13 observa-se um exemplo do epitélio respiratório que reveste o septo da cavidade nasal nos animais dos grupos controle e exposto.

A

B

Figura 13 - O epitélio respiratório é do tipo pseudo-estratificado colunar ciliado com células caliciformes que são secretoras de muco. No grupo controle (A) observar as células colunares com uma grande quantidade de cílios (seta) e no grupo exposto (B) a atrofia celular (seta vermelha) e uma grande quantidade de muco intraepitelial (setas pretas) (PAS/AB 400x).

4.2.3.1 Análise em conjunto das regiões nasais anteriores, mediais e posteriores (1, 2 e 3).

A tabela 2, figuras 14 e 15 mostram a análise em conjunto das 3 regiões. O resultado encontrado no grupo exposto foi um aumento da quantidade de muco ácido, neutro, intraepitelial e total. Observou-se também uma diminuição na espessura da camada epitelial comparado ao grupo exposto. Todos os parâmetros analisados foram estatisticamente significantes ($p < 0,001$).

Tabela 2 - Volume de muco ácido, muco neutro, muco intraepitelial (muco ácido + muco neutro), muco total (muco ácido + muco neutro + muco excretado) e espessura do epitélio nas 3 regiões. Média e Desvio Padrão (DP).

	Controle	Exposto
Proporção de volume muco ácido (%)	7,59 ± 1,32	16,93 ± 3,61 $p < 0,001$
Proporção de volume muco neutro (%)	2,66 ± 0,82	7,43 ± 3,11 $p < 0,001$
Proporção de volume muco intraepitelial (ácido+neutro) (%)	10,25 ± 1,99	24,36 ± 3,86 $p < 0,001$
Muco total (número de pontos)	2,96 ± 0,46	5,83 ± 0,87 $p < 0,001$
Espessura do epitélio (número de pontos)	28,51 ± 1,71	22,74 ± 1,36 $p < 0,001$

Figura 14 - Proporção de volume do muco ácido, neutro e intraepitelial nos grupos controle e exposto nas 3 regiões da mucosa nasal. As figuras representam a proporção de volume por animal e as barras representam a soma de 2 erros padrão em relação à média ($p < 0,001$ para todas as variáveis analisadas).

Figura 15 - Volume de muco total e espessura do epitélio nos grupos controle e exposto nas 3 regiões da mucosa nasal. As figuras representam os valores por animal e as barras representam a soma de 2 erros padrão em relação à média ($p < 0,001$ para todas as variáveis analisadas).

4.2.3.2 Análise em separado das regiões da mucosa nasal

Região 1 ou proximal

A tabela 3, figuras 16 e 17 mostram a análise da região 1 ou proximal. Houve um aumento da quantidade de muco ácido, neutro, intraepitelial e total no grupo exposto em relação ao controle, sendo que houve aumento significativo na proporção de volume de muco ácido ($p < 0,001$), muco intraepitelial ($p < 0,001$) e total ($p = 0,001$). Não houve diferença estatística na proporção de volume de muco neutro ($p = 0,109$). A espessura do epitélio nasal diminuiu significativamente no grupo exposto em relação ao controle ($P = 0,001$).

Tabela 3 - Volume de muco ácido, muco neutro, muco intraepitelial (muco ácido + muco neutro), muco total (muco ácido + muco neutro + muco excretado) e espessura do epitélio na região 1. Média e Desvio Padrão (DP).

	Controle	Exposto
Proporção de volume muco ácido (%)	12,95 ± 2,96	22,61 ± 6,96 $p < 0,001$
Proporção de volume muco neutro (%)	3,63 ± 2,09	5,64 ± 3,26 $p = 0,109$
Proporção de volume muco intraepitelial (ácido+neutro) (%)	16,58 ± 4,95	28,25 ± 5,45 $p < 0,001$
Muco total (número de pontos)	4,44 ± 1,02	6,77 ± 1,45 $p = 0,001$
Espessura do epitélio (número de pontos)	26,75 ± 2,67	23,03 ± 2,09 $p = 0,001$

Figura 16 - Proporção de volume do muco ácido, neutro e intraepitelial nos grupos controle e exposto na região 1 (proximal) da mucosa nasal. As figuras representam a proporção de volume por animal e as barras representam a soma de 2 erros padrão em relação à média ($p < 0,001$ para muco ácido e epitelial e $p = 0,109$ para muco neutro).

Figura 17 - Volume de muco total e espessura do epitélio nos grupos controle e exposto na região 1 (proximal) da mucosa nasal. As figuras representam os valores por animal e as barras representam a soma de 2 erros padrão em relação à média ($p < 0,001$ para muco total e $p = 0,001$ para epitélio).

Região 2 ou medial

A tabela 4, figuras 18 e 19 mostram a análise da região 2 ou medial. Houve um aumento da quantidade de muco ácido, neutro, intraepitelial e total no grupo exposto em relação ao controle, sendo que houve diferença estatística em todos os parâmetros analisados ($p < 0,001$). A espessura no

epitélio diminuiu significativamente no grupo exposto em relação ao controle (P=0,002).

Tabela 4 - Volume de muco ácido, muco neutro, muco intraepitelial (muco ácido + muco neutro), muco total (muco ácido + muco neutro + muco excretado) e espessura do epitélio na região 2. Média e Desvio Padrão (DP).

	Controle	Exposto	
Proporção de volume muco ácido (%)	2,83 ± 1,09	9,70 ± 2,64	p<0,001
Proporção de volume muco neutro (%)	3,10 ± 1,85	9,69 ± 3,68	p<0,001
Proporção de volume muco intraepitelial (ácido+neutro) (%)	5,93 ± 2,42	19,39 ± 5,08	p<0,001
Muco total (número de pontos)	1,65 ± 0,41	4,53 ± 0,87	p<0,001
Espessura do epitélio (número de pontos)	25,55 ± 3,29	22,34 ± 1,60	p=0,002

Figura 18 - Proporção de volume do muco ácido, neutro e intraepitelial nos grupos controle e exposto na região 2 (medial) da mucosa nasal. As figuras representam a proporção de volume por animal e as barras representam a soma de 2 erros padrão em relação à média ($p < 0,001$ para todos os parâmetros).

Figura 19 - Volume de muco total e espessura do epitélio nos grupos controle e exposto na região 2 (medial) da mucosa nasal. As figuras representam os valores por animal e as barras representam a soma de 2 erros padrão em relação à média ($p < 0,001$ para muco total e $p = 0,002$ para epitélio).

2 Região 3 ou distal

A tabela 5, figuras 20 e 21 mostram a análise da região 3 ou distal. Houve um aumento da quantidade de muco ácido, neutro, intraepitelial e total no grupo exposto em relação ao controle, sendo que houve diferença estatística no muco ácido, intraepitelial e total ($p < 0,001$) e o muco neutro não

mostrou significância estatística ($p=0,011$). A espessura do epitélio foi significativamente menor no grupo exposto em relação ao grupo controle ($p<0,001$).

Tabela 5 - Volume de muco ácido, muco neutro, muco intraepitelial (muco ácido + muco neutro), muco total (muco ácido + muco neutro + muco excretado) e espessura do epitélio na região 3. Média e Desvio Padrão (DP).

	Controle	Exposto	
Proporção de volume muco ácido (%)	6,99 ± 1,80	18,49 ± 4,93	$p<0,001$
Proporção de volume muco neutro (%)	1,25 ± 0,86	6,94 ± 6,10	$p=0,011$
Proporção de volume muco intraepitelial (ácido+neutro) (%)	8,25 ± 2,10	25,44 ± 6,64	$p<0,001$
Muco total (número de pontos)	2,78 ± 0,66	6,19 ± 1,82	$p<0,001$
Espessura do epitélio (número de pontos)	33,22 ± 2,02	22,84 ± 1,73	$p<0,001$

Figura 20 - Proporção de volume do muco ácido, neutro e intraepitelial nos grupos controle e exposto na região 3 (distal) da mucosa nasal. As figuras representam a proporção de volume por animal e as barras representam a soma de 2 erros padrão em relação à média ($p < 0,001$ para muco ácido e intraepitelial e $p = 0,011$ para muco neutro).

Figura 21 - Volume de muco total e espessura do epitélio nos grupos controle e exposto na região 3 (distal) da mucosa nasal. As figuras representam os valores por animal e as barras representam a soma de 2 erros padrão em relação à média ($p < 0,001$ para todas as variáveis).

4.2.4 Pulmões

4.2.4.1 Peso pulmonar

A tabela 6 e a figura 22 mostram a média $\pm$ DP do peso pulmonar (g). Não houve diferença estatística significativa entre os dois grupos estudados ($p = 0,439$).

Tabela 6 - Média do peso pulmonar nos grupos controle e exposto. DP (Desvio Padrão).

	Controle	Exposto
Média (g)	0,28	0,27
DP	$1,94^{-2}$	$2,16^{-2}$

Figura 22 - Média $\pm$ DP do peso pulmonar (g) entre os dois grupos estudados. As figuras representam o peso em gramas por animal e as barras representam a soma de 2 erros padrão em relação à média ($p=0,439$).

4.2.4.2 Espessura do epitélio e quantidade de muco brônquico

A tabela 7 e as figuras 23 e 24 mostram a proporção de volume de muco ácido, neutro e intraepitelial (ácido+neutro) expresso em porcentagem e muco total (ácido+neutro+excretado) e espessura de células epiteliais expresso em número de pontos no epitélio brônquico. A espessura epitelial diminuiu significativamente no grupo exposto em relação ao controle ($p <$

0.001) (figura 25). Não houve diferença significativa na quantidade de muco entre os grupos ($p=0,746$).

Tabela 7 - Volume de muco ácido, muco neutro, muco intraepitelial (muco ácido + muco neutro), muco total (muco ácido + muco neutro + muco excretado) e espessura do epitélio brônquico. Média e Desvio Padrão (DP).

	Controle	Exposto	
Proporção de volume muco ácido (%)	1,62 ± 2,06	0,62 ± 1,26	$p=0,231$
Proporção de volume muco neutro (%)	0,42 ± 0,75	0,71 ± 1,87	$p=0,746$
Proporção de volume muco intraepitelial (ácido+neutro) (%)	2,05 ± 2,66	1,34 ± 2,04	$p=0,423$
Muco total (número de pontos)	0,57 ± 0,76	0,20 ± 0,33	$p=0,075$
Espessura do epitélio (número de pontos)	24,25 ± 5,24	14,90 ± 1,90	$p < 0.001$

Figura 23 - Proporção de volume do muco ácido, neutro e intraepitelial entre os dois grupos estudados no epitélio brônquico. As figuras representam a proporção de volume e as barras representam a soma de 2 erros padrão em relação à média ($p = 0,231$ para muco ácido, $p = 0,746$ para muco neutro e $p = 0,423$ para muco epitelial).

Figura 24 - Volume de muco total e de epitélio nos grupos controle e exposto no epitélio brônquico. As figuras representam o volume (número de pontos) por animal e as barras representam a soma de 2 erros padrão em relação à média ($p = 0,075$ para volume de muco total $p < 0,001$ para volume de epitélio).

A

B

Figura 25 - Representação histológica do epitélio brônquico (setas) no grupo controle (A) e no grupo exposto (B). Observe que no grupo exposto há uma diminuição da espessura epitelial (PAS/AB 400x).

4.2.4.3 Artérias pulmonares de pequeno calibre

Foram avaliados os parâmetro luz/parede (como indicador de vasoconstrição) e a espessura da parede de artérias pulmonares de pequeno calibre.

Não houve diferença estatística no índice de espessura da parede das artérias ($p=0,782$), como demonstrado na tabela 8 e a figura 26.

Tabela 8 - Média da espessura da parede de artérias pulmonares de pequeno calibre no grupo controle e exposto. DP (Desvio Padrão)

	Controle	Exposto
Média	2.22	2.30
DP	0.84	0.50 $p=0,782$

Figura 26 - Índice de espessura da parede de artérias de pequeno calibre entre o grupo controle e exposto. O índice foi calculado como números de pontos na parede dividido pelo número de interceptos que cruzam a membrana limitante elástica externa. As figuras representam o índice por animal e as barras representam a soma de 2 erros padrão em relação à média ($p=0,782$).

A tabela 9 e a figura 27 mostram que a média do índice de vasoconstrição das artérias de pequeno calibre do grupo exposto é superior ao grupo controle, apresentando diferença estatística entre os grupos ($p = 0,034$) (figura 28).

Tabela 9 - Média do índice de vasoconstrição das artérias pulmonares de pequeno calibre nos grupos controle e exposto. DP (Desvio Padrão)

	Controle	Exposto
Média	2,74	3,45
DP	0,79	0,83
		$p=0,034$

Figura 27 - Índice de vasoconstrição de artérias de pequeno calibre entre o grupo controle e exposto. O índice foi calculado como o número de pontos na luz do vaso dividido pela luz da parede do vaso. As figuras representam o índice por animal e as barras representam a soma de 2 erros padrão em relação à média ($p = 0,034$).

Figura 28 - Representação histológica de artéria de pequeno calibre (seta) com luz ampla do grupo controle (A) e artéria de pequeno calibre (seta) com vasoconstrição do grupo exposto (B) (HE 400x).

4.2.4.4 Quantificação da hemossiderina pulmonar

A tabela 10 e a figura 29 mostram a quantificação da hemossiderina pela técnica de Perls no parênquima pulmonar. O resultado mostrou um maior número de estruturas Perls positivas no grupo exposto em relação ao controle ($p < 0.001$) (figura 30).

Tabela 10 - Proporção de volume (n° pontos Perls positivo/ n° pontos no parênquima pulmonar) de estruturas Perls positivas entre o grupo controle e exposto. DP (Desvio Padrão)

	Controle	Exposto
Média (*1000)	0.70	19.66
DP	0.45	14.51
		$p < 0.001$

Figura 29 - Representação gráfica da proporção de volume de estruturas Perls positiva no parênquima pulmonar no grupo controle e exposto. As figuras representam os valores por animal e as barras representam a soma de 2 erros padrão em relação à média ($p < 0.001$).

A **B**
Figura 30 - Representação histológica de parênquima pulmonar exibindo negatividade na coloração de Perls do grupo controle (A) e grande quantidade de estruturas Perls positivo (em azul) do grupo exposto (B) (setas) (Perls 400x).

4.2.4.5 Densidade de macrófagos pulmonares

A tabela 11 e a figura 31 mostram a média da densidade celular de macrófagos por mm² na região alveolar. Houve um aumento significativo na densidade celular no grupo exposto em relação ao controle (figura 32) ($p = 0,001$).

Tabela 11 - Densidade de macrófagos no grupo controle e exposto. DP (Desvio Padrão)

	Controle	Exposto
Média (macrófagos alveolares/mm ²)	249,16	436,06
DP	92,06	140,89 $p=0,001$
DP – Desvio Padrão

Figura 31 - Representação gráfica da densidade celular de macrófagos alveolares no grupo controle e exposto. As figuras representam o índice por animal e as barras representam a soma de 2 erros padrão em relação à média ($p= 0,001$).

A

B

Figura 32 - Representação histológica de pulmão com quantidade habitual de macrófagos alveolares (células esparsas) no grupo controle (setas) (A) e pulmão com grande quantidade de macrófagos alveolares (setas) no grupo exposto (B) (Imunohistoquímica para macrófagos 200x).

A tabela 12 e a figura 33 mostram a média da densidade de macrófagos em regiões peribrônquicas. O grupo exposto mostrou maior quantidade de macrófagos peribrônquicos do que o grupo controle (figura 34) ($p = 0,001$).

Tabela 12 - Densidade de macrófagos (cels/mm²) nas regiões peribrônquicas no grupo controle e exposto. DP (Desvio Padrão)

	Controle	Exposto
Média	102,84	317,45
DP	57,40	294,37 $p=0,001$

Figura 33 - Densidade celular de macrófagos (cels/mm²) nas regiões peribrônquicas nos grupos controle e exposto. As figuras representam os valores por animal e as barras representam a soma de 2 erros padrão em relação à média ($p=0,001$).

A **B**
Figura 34 - Representação histológica de pulmão do grupo exposto com grande quantidade de macrófagos (setas) nas regiões peribrônquicas (Imunohistoquímica para macrófagos A e B 400x).

4.2.4.6 Densidade de neutrófilos pulmonares

Os neutrófilos foram quantificados nas regiões alveolares e peribrônquicas.

A tabela 13 e a figura 35 mostram a média de neutrófilos por mm² nas regiões alveolares. No grupo exposto ao “crack”, observou-se um maior número de neutrófilos do que no grupo controle (figura 36), com diferença estatística significativa ($p = 0,002$).

Tabela 13 - Média de neutrófilos (cels/mm²) nos grupos controle e exposto. DP (Desvio Padrão)

	Controle	Exposto
Média (neutrófilos/mm ²)	107.72	223.14
DP	35.91	142.32 $p=0,002$

Figura 35 - Representação gráfica da densidade celular de neutrófilos (cels/mm²) na região alveolar nos grupos controle e exposto. As figuras representam o valor por animal e as barras representam a soma de 2 erros padrão em relação à média ($p= 0,002$).

A

B

Figura 36 - Representação histológica de pulmão negativo para neutrófilos alveolares no grupo controle (A) e pulmão com grande quantidade de neutrófilos (setas) no grupo exposto (B) (Imunohistoquímica para neutrófilos 400x).

A tabela 14 e a figura 37 mostram a média da densidade celular de neutrófilos nas regiões peribrônquicas (cels/mm²). Não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,419$).

Tabela 14 - Média de neutrófilos nas regiões peribrônquicas dos grupos controle e exposto. DP (Desvio Padrão)

	Controle	Exposto
Média	224,18	186,46
DP	127,38	114,50

$p=0,419$

Figura 37 - Número de neutrófilos (cels/mm²) nas regiões peribrônquicas nos grupos controle e exposto. As figuras representam o valor por animal e as barras representam a soma de 2 erros padrão em relação à média ($p=0,419$).

.....**DISCUSSÃO**

5. Discussão

Neste estudo, nós desenvolvemos um modelo experimental de exposição crônica ao “crack” em camundongos, a fim de estudar os efeitos desta droga no tecido nasal e pulmonar. Não foi encontrado na literatura nenhum estudo utilizando exposição à cocaína na forma fumada (“crack”) conduzido de maneira semelhante ao nosso experimento. A maioria dos estudos experimentais utiliza como via principal de administração a cocaína na forma injetada (Robin et al., 1989; Barroso-Moguel et al., 1999). Em humanos, poucos estudos analisam o tecido pulmonar de usuários crônicos, sendo a grande maioria dos estudos realizados por meio da análise do lavado broncoalveolar (BAL) (Gallouj et al., 1999; Janjua et al., 2001; Baldwin et al., 2002) e de autópsias de pacientes que morreram por overdose (Murray et al., 1989; Bailey et al., 1994).

O animal de experimentação utilizado foi o camundongo, considerado de fácil manipulação e amplamente utilizado em estudos experimentais de inalação (Pires Neto et al., 2006; Hodges-Bell et al., 2007; Hamm et al., 2007). Neste experimento, estudamos os animais machos, por estes não possuírem variações hormonais tão acentuadas como as fêmeas, uma vez que hormônios femininos parecem poder interferir nos níveis séricos da

cocaína (Collins et al., 2007). A idade escolhida para o início do experimento foi de 60 dias, sendo então o animal considerado um adulto jovem (Andersen et al., 2004). Entre os adultos jovens, encontramos a maior incidência de usuários de drogas no Brasil (Ferreira Filho et al., 2003; Guindalini et al., 2006).

O “crack” utilizado no experimento foi proveniente de uma apreensão da Delegacia de Investigação sobre Entorpecentes de Marília (DISE) da Polícia Civil de São Paulo, sendo encaminhado para o Instituto Médico Legal (IML) de São Paulo, Núcleo de Toxicologia Forense, mostrando um percentual de 57,66% de cocaína, sendo considerado adequado para o estudo experimental.

O “crack”, quando aquecido, pode passar do estado sólido para o gasoso em temperaturas relativamente baixas (95°C), portanto podendo ser fumado (Haim et al., 1995). Durante a queima da droga os vapores são absorvidos pela mucosa respiratória, atingindo rapidamente a circulação sanguínea (Terra Filho et al., 2004) e causando os efeitos no sistema nervoso central. A fumaça do “crack” expõe os pulmões não apenas a cocaína vaporizada, mas também a uma variedade de substâncias, incluindo seus produtos de pirólise como metilanidroecgonina e impurezas no qual a cocaína pode estar misturada como cafeína, giz, talco, pó de mármore, farinha e outros produtos usados para baratear a droga (Jatlow, 1987; Costa Leite e Andrade, 1999), sendo que cada “lote” da droga tem uma composição variada destes ou outros elementos.

A dose fumada da droga por dia, por cada usuário, varia grandemente, havendo relatos de uso de até 15 g diários. Em nosso estudo, utilizamos 5 g por dia, sendo a dose média referida por alguns usuários, segundo o estudo de Nassif Filho et al., 1999. Nesta quantidade de droga administrada, a concentração sérica de cocaína imediatamente após à inalação de “crack” atingiu 212,5 ng/ml. Collins et al. em 2007, a fim de estudar os efeitos da cocaína inalada no ciclo menstrual, se valeram de mulheres usuárias crônicas de cocaína. Estas voluntárias fizeram neste estudo o uso de valores considerados não letais e que se aproximavam de doses utilizadas habitualmente pelas mesmas. Quando inalavam 0,69 mg/kg de cocaína apresentavam um nível sérico de 114,7 ($\pm 16,0$) ng/ml na fase folicular e 129,7 ($\pm 17,4$) ng/ml na fase luteínica. Com a dose de 1,37mg/kg o nível foi de 284,7 ($\pm 73,7$) ng/ml na fase folicular e 354,3 ($\pm 94,4$) ng/ml na fase luteínica. Portanto, o nível sérico de cocaína atingido em nosso experimento (212,5 ng/ml), equivaleria ao nível sérico apresentado por doses sabidamente não letais e comumente utilizadas pelos usuários, como exemplificado acima. Koehler et al. (2005) estudaram um caso de “overdose” por cocaína encontrando nível sérico de 4,67 mg/ L. Virmani et al. em 1988 estudando vários casos de “overdose” por cocaína, detectaram níveis sanguíneos variando entre 5,3 e 8,1 mg/ L, sugerindo haver uma variação individual da dose letal humana. Estes níveis séricos são bem maiores do que a dose sérica encontrada em nossos camundongos.

Nossos resultados mostraram que o trato respiratório é extensamente afetado pela inalação do “crack”, desde a cavidade nasal até o compartimento alveolar.

O nariz é a primeira região a entrar em contato com os vapores resultantes da pirólise do “crack”. Um estudo realizado em humanos (Mari et al., 2002) mostrou alterações nasais locais pela inalação da cocaína na forma de pó como rinite, diminuição do olfato, epistaxe e perfuração nasal, ocorrendo principalmente devido a seus efeitos vasoconstritores e anestésicos, sendo que este último efeito ocorre devido a uma inibição da permeabilidade para o sódio durante a despolarização da membrana plasmática dos neurônios (Laposata e Mayo, 1993; Egred e Davis, 2005). No caso da cocaína “crack”, a inalação dos vapores quentes e outras substâncias irritantes presentes na droga pode ocasionar lesões nasais como hiperemia na mucosa, edema e aumento da secreção (Nassif Filho et al., 1999). Tierney e Stadelmann, 1999, relatam a presença de necrose nasal acompanhada de infecção no tecido subcutâneo em usuário de “crack”.

Em nosso estudo todas as porções do nariz (proximal, medial e distal) foram estudadas para melhor evidenciar a localização das lesões. Pudemos observar um aumento dos mucos ácidos e neutros nas localizações intraepiteliais e excretados na porção apical da célula, havendo uma diminuição da espessura de células epiteliais em toda a mucosa nasal. Quando feita à análise por regiões, pudemos observar aumento dos mucos

ácidos, intraepiteliais, excretados e diminuição da espessura epitelial nas 3 regiões. O aumento do muco neutro foi significativo apenas na região 2.

A constituição glicoproteica do muco está relacionada com sua função protetora ao sistema respiratório. Um aumento das glicoproteínas ácidas (muco ácido) no muco aumenta sua viscosidade e com isso diminui o batimento ciliar, prejudicando a defesa pulmonar (Puchelle et al., 1998). Estudo experimental em camundongos expostos cronicamente à poluição atmosférica também mostrou um aumento de células mucosas ácidas (Pires Neto et al., 2006). Saldiva et al. em 1992, estudando as alterações respiratórias provocadas por exposição crônica à poluição na mucosa nasal de ratos, mostraram um aumento dos dois tipos (ácidas e neutras) de secreção mucosa, resultado semelhante encontrado em nosso estudo, sugerindo que inicialmente em uma fase mais aguda ocorra um aumento da secreção do muco neutro (mais fluído) como uma forma de defesa contra o agente agressivo e em uma fase mais crônica possivelmente haja uma mudança na composição química com um aumento das glicoproteínas ácidas, deixando o muco mais viscoso. Quando nós analisamos separadamente o nariz em cada uma das 3 regiões, pudemos observar que o muco ácido aumenta nas três regiões, e o neutro apenas em uma, mostrando que o crack ocasiona uma agressão de caráter crônico ao epitélio nasal.

Em relação à espessura do epitélio, os estudos com poluição (Saldiva et al., 1992; Pires Neto et al., 2006), mostraram um aumento da proporção de

volume das células epiteliais. Renne et al. em 2003 citaram que ratos submetidos à inalação de metais como zinco e níquel mostraram atrofia de porções do epitélio olfatório, resultado semelhante ao nosso estudo. Possivelmente a atrofia encontrada em nosso estudo esteja relacionada com a diminuição das células ciliadas, pois as células caliciformes secretoras mostraram um aumento de muco no seu interior. Esta diminuição do tamanho das células pode ser consequência de um efeito tóxico direto ao epitélio nasal ou ao efeito vasoconstritor da droga, mostrado pelas alterações nos 3 segmentos da mucosa nasal.

Como neste modelo não houve a inalação de vapores quentes pela mucosa nasal, as alterações encontradas foram provocadas pela cocaína e outras substâncias tóxicas presentes na pirólise da cocaína “crack” e não à temperatura. Nossos resultados certamente contribuem para caracterizar alterações nasais presentes em usuários de “crack”.

Estudos prévios descreveram uma série de alterações pulmonares em humanos (Alberstson et al., 1995; Haim et al., 1995; Terra Filho et al., 2004), sendo os sintomas variados e não específicos. Os principais sintomas pulmonares agudos citados variam de tosse com secreção escura, dor torácica, dificuldades em respirar, dispnéia e até hemoptise. Estas observações são limitadas pelo número reduzido de pacientes em cada estudo, pelo uso concomitante de outras drogas pelos usuários e pela composição química diferente das amostras “fumadas”. Poucos estudos descreveram alterações provocadas pelo uso crônico do “crack” no trato

respiratório. A maioria deles foi através de exames necroscópicos em pacientes que morreram por “overdose” de cocaína (Murray et al., 1989; Bailey et al., 1994) ou através de lavado broncoalveolar (LBA) (Janjua et al., 2001; Baldwin et al., 2002) em usuários crônicos. Conseqüentemente o uso de um modelo experimental é importante para melhor descrever as alterações histológicas do trato respiratório causada pela inalação de crack.

Edema pulmonar não cardiogênico causado pelo uso do “crack” foi referido em alguns estudos anteriores (Thadani, 1996; Terra Filho et al., 2004; Kleerup et al., 2002). Um caso de edema cardiogênico decorrente de uma falência ventricular esquerda (Laposata e Mayo, 1993), pelo uso abusivo de cocaína fumada (“crack”), também já foi relatado. Uma das causas postuladas do edema não cardiogênico poderia ser um processo inflamatório pulmonar resultante do uso do “crack”, alterando a permeabilidade da microcirculação, resultando em acúmulo de líquidos no parênquima pulmonar (Montenegro e Franco, 1999). Em nosso estudo não foram observadas diferenças significativas no peso pulmonar entre os grupos do estudo. Do ponto de vista histopatológico também não se observou edema pulmonar agudo.

Existem evidências que pacientes usuários de “crack” possam desenvolver sintomas relacionados às vias aéreas, como asma, broncoespasmo e tosse. Assim, neste estudo analisamos a mucosa epitelial brônquica. Não houve alterações significativas quanto à quantidade de muco encontrada no epitélio brônquico. Semelhantemente ao encontrado na mucosa nasal, observou-se uma atrofia no epitélio brônquico. Estes

resultados nos mostram que possivelmente os efeitos tóxicos do “crack” no epitélio brônquico afetaram diretamente as células ciliadas com uma atrofia ou indiretamente, por uma redução da vascularização devido ao efeito vasoconstritor. Estudos prévios em humanos (Fligiel et al., 1997; Barsky et al., 1998) mostram que usuários de maconha, cocaína e/ou cigarros apresentam alterações da mucosa traqueobronquial incluindo hiperplasia de células basais, hiperplasia de células mucosas e metaplasia de células escamosas. Estes resultados não foram reproduzidos em nosso modelo. Tal discrepância pode ser explicada pelas diferenças entre os estudos como: diferenças entre o epitélio brônquico humano e de murinos, diferentes tipos de drogas e diferentes tempos de exposição às drogas.

A cocaína atua como um agente simpaticomimético, bloqueando receptores pré-sinápticos de noradrenalina e dopamina (Laposata e Mayo, 1993), como consequência induzindo a uma vasoconstrição sistêmica (Haim et al., 1995). A presença de inervação para receptores α - e β -adrenérgicos foram descritos no músculo liso de vasos pulmonares. A administração de agonistas como a cocaína aumenta o tônus vascular pulmonar (Laposata e Mayo, 1993). Muitos autores referem aumento da pressão arterial pulmonar em usuários de “crack” e cocaína (Thadani, 1996; Egred e Davis, 2005). Em um estudo onde 13 usuários crônicos de cocaína intravenosa foram analisados, 8 deles demonstraram hipertensão pulmonar (pressão maior que 30 mmHg) à ecocardiografia transtorácica (Yakel e Eisenberg, 1995).

Em 20 necropsias de usuários que fumavam pasta de cocaína e morreram por “overdose”, Murray et al. (1989) observaram através de

exames histopatológicos, uma hipertrofia da camada média da artéria pulmonar, sugerindo que a vasoconstrição pulmonar prolongada levaria a hipertensão pulmonar. Em nossos dados não encontramos diferenças na espessura da parede das pequenas artérias entre o grupo controle e exposto, mostrando que a diminuição da luz das artérias pulmonares no nosso experimento ocorreu significativamente por uma vasoconstrição. Possivelmente um maior tempo de exposição à droga seria necessário para o desenvolvimento de alterações das estruturas vasculares pulmonares.

Há fortes evidências que a cocaína tenha efeitos sobre a microcirculação pulmonar (Haim et al., 1995; Baldwin et al., 2002). Segundo Haim et al. (1995), um dos sintomas mais relatados por usuários de “crack” é a hemoptise, que resultaria da ruptura de vasos sanguíneos submucosos da traquéia, brônquios e de capilares alveolares. Estudos com usuários crônicos de “crack”, mostram um aumento do número de macrófagos com pigmento hemossiderínico intracitoplasmático (sendo um indicador de hemorragia alveolar) e do nível de endotelina-1, um potente vasoconstritor, em lavados broncoalveolares (Janjua et al., 2001; Baldwin et al., 2002). Exames necroscópicos de 20 usuários de cocaína, que foram a óbito por “overdose”, evidenciaram sinais de hemorragia oculta no tecido pulmonar em 35% dos pacientes (Murray et al., 1989). Também através de necropsia, Bailey et al. (1994) estudaram 52 pacientes com exames toxicológicos positivos para cocaína, mostrando em 58 % dos casos hemorragia aguda e em 40% hemorragia crônica ao exame do tecido pulmonar. Alguns estudos mostraram que usuários de “crack” apresentam uma menor difusão

pulmonar de monóxido de carbono (Itkonen et al., 1984; Tashkin et al., 1992), sendo esta anormalidade um sinal de dano direto à barreira alvéolo-capilar. Nossos resultados sugerem que a inalação pelo “crack” cause alterações da estrutura microvascular, mostrado pelo aumento acentuado da hemossiderina no parênquima pulmonar no grupo exposto. Barroso-Moguel e colegas (1999), estudando os efeitos crônicos da administração sistêmica de cocaína em ratos, verificaram que lesões vasculares foram observadas em períodos mais curtos de administração da droga (30 dias), sendo gradativamente substituídas por fibrose alveolar em períodos mais prolongados (75 dias). Em nosso modelo experimental não observamos fibrose pulmonar, mas não é possível excluir que a fibrose possa aparecer após 60 dias de exposição. Também é possível que diferentes tempos de exposição e doses da droga contribuam para as diferenças.

No nosso estudo, avaliamos duas importantes células que participam na resposta inflamatória pulmonar aguda: neutrófilos e macrófagos. A densidade destas células foi avaliada na região alveolar e peribrônquica.

Nós observamos um aumento significativo na densidade de macrófagos e neutrófilos na região alveolar dos animais do grupo exposto, e de macrófagos na região peribrônquica, sugerindo que a exposição ao “crack” module uma resposta inflamatória nos pulmões. Estudos prévios com usuários crônicos de cocaína ou “crack” utilizaram o lavado broncoalveolar (LBA) como modo de se avaliar a inflamação pulmonar distal. Janjua et al. (2001) e Baldwin et al. (2002), mostraram um aumento do número de macrófagos com pigmentos hemossiderínicos. Os macrófagos, além das

suas atividades fagocitárias, desempenham funções importantes na apresentação de antígenos e na produção de várias citocinas essenciais, não só na inflamação, como também em fenômenos imunitários (Montenegro e Franco, 1999). Alguns autores mostram que a atividade antibacteriana dos macrófagos é prejudicada em fumantes de cocaína “crack”, pela incapacidade da utilização do óxido nítrico na destruição de *Stafilococcus aureus* (Baldwin et al., 1997b; Roth et al., 2003). Frente ao exposto acima, podemos sugerir que apesar do número aumentado de macrófagos presentes nos animais expostos (e em humanos), estes têm sua função fagocitária prejudicada, podendo contribuir com o aumento da suscetibilidade a infecções presentes em usuários de “crack” (Baldwin et al., 1997b; Roth et al., 2003).

Baldwin e colegas em 1997a, mostraram que a inalação de “crack” ou o uso sistêmico de cocaína causa ativação dos neutrófilos. O aumento do número de neutrófilos parece ser mediado por níveis elevados da interleucina 8 (IL-8), um importante fator quimiotático. No nosso estudo, verificamos que os neutrófilos aumentaram no parênquima pulmonar. É possível que um aumento da atividade inflamatória pulmonar neutrofílica, ocasione danos ao endotélio pulmonar, contribuindo para a patogênese das lesões pulmonares causadas pelo “crack” (Baldwin et al., 1997a)

Este estudo possui importantes limitações. Nós não fomos capazes de discriminar as outras substâncias presentes na amostra do “crack” usado neste estudo, portanto não podemos excluir que partes das alterações por nós encontradas, estejam também relacionadas a estas substâncias ou com

os produtos de sua pirólise. A metilanidroecgonina é um dos principais produtos de degradação do “crack”, sendo detectada em fluídos biológicos de usuários de cocaína na forma fumada (Scheidweiler et al., 2003), podendo ser usada como um marcador do uso desta forma de cocaína. Alguns estudos citam um efeito broncoconstritor da metilanidroecgonina (Willets et al., 1995; Wood et al., 1996). Chen et al. (1995), demonstraram um efeito broncoconstritor em um estudo experimental com cobaias, utilizando uma nebulização de metilanidroecgonina no ambiente dos animais na proporção de 13 ± 1 mg/litro de ar. Estes autores sugerem que a metilanidroecgonina provoque um reflexo de broncoconstrição por causar irritação pulmonar. No entanto, segundo Wood et al. (1996), apenas 5% da cocaína se transforma em metilanidroecgonina. No nosso estudo, foi utilizado um único “lote” de “crack” durante todo o experimento, sendo que cada “lote” exibe uma composição química provavelmente diferente. É possível de se especular que utilizando-se outro tipo de “pedra” de “crack” poderíamos ter resultados diferentes dos obtidos. No entanto, parte de nossos resultados é similar ao encontrado em estudos com cocaína administrada na forma injetada (por exemplo danos vasculares) (Robin et al., 1989; Barroso-Moguel et al., 1999), sendo que pelo menos parte das lesões pulmonares por nós descritas, advém realmente da cocaína.

Neste estudo, não investigamos os mecanismos pelos quais o “crack” leva às alterações vasculares e inflamatórias no pulmão. Esta investigação pode levar a uma nova e interessante linha de estudo em nosso laboratório.

Em resumo neste estudo, nós descrevemos as alterações decorrentes da inalação crônica do “crack” no aparelho respiratório de camundongos, mostrando que seu uso crônico pode causar danos extensos em vários segmentos do nariz e pulmões.

O “crack” sendo uma droga barata e fácil de adquirir, é utilizada principalmente por usuários jovens e de baixa renda, incluindo adolescentes e crianças, tornando-se um grave problema de saúde e social em muitos países, incluindo o Brasil. Acreditamos que o entendimento sobre os efeitos prejudiciais do uso crônico do “crack” no trato respiratório, como almejado neste estudo, é importante. Nossos dados contribuem para melhor entender o espectro das lesões sistêmicas causadas pelo uso desta droga.

.....CONCLUSÕES

6. Conclusões

A inalação crônica do “crack” promoveu alterações no aparelho respiratório de camundongos na forma de:

- Aumento do muco no epitélio nasal;
- Atrofia do epitélio nasal;
- Atrofia do epitélio brônquico;
- Aumento da hemossiderina pulmonar;
- Vasoconstrição de artérias pulmonares de pequeno calibre;
- Aumento na densidade de macrófagos nas regiões alveolares e peribrônquicas;
- Aumento na densidade de neutrófilos alveolares.

.....ANEXOS

ANEXO 1

SECRETARIA DA SEGURANÇA PÚBLICA
SUPERINTENDÊNCIA DA POLÍCIA TÉCNICO-CIENTÍFICA

NÚCLEO DE PERÍCIAS MÉDICO LEGAIS DE MARÍLIA/SP

Ofício nº 12/2003

Marília, 29 de janeiro de 2003.

Senhor Delegado:-

Eu, **Julio César Zorzetto** RG: 6734405, médico legista lotado no Núcleo de Perícias Médico Legal de Marília e professor de Medicina Legal e Hísta Médica da Faculdade de Medicina de Marília, iniciei em março de 2003 curso de Pós Graduação na Universidade de São Paulo (USP), nível de doutorado, onde pretendo desenvolver pesquisa na área da toxicologia voltada a medicina legal. O projeto de pesquisa é expor camundongas prenhes ao "crack" em câmaras fechadas, fazendo com que os animais do experimento aspirem a droga durante todo o período gestacional. O objetivo é estudar os efeitos tóxicos do crack nas camundongas prenhes, na prole e os índices teratogênicos. A escolha do crack para pesquisa se deu primeiro por ser um tóxico de grande consumo e de baixo valor econômico se comparado à cocaína, e segundo porque na literatura médica mundial não encontramos pesquisa semelhante que utiliza somente o crack. Nossa proposta é utilizar parte da droga apreendida pela DISE.

Isto posto, solicito de vossa senhoria especial atenção em viabilizar tal projeto científico, fornecendo cerca de duzentos gramas de crack para realização do trabalho experimental. Encaminho anexo projeto de pesquisa e atestado de matrícula do curso de Pós Graduação da USP.

Sem mais para o momento, envio protestos de elevada estima e distinta consideração.

DR. JULIO CEZAR ZORZETTO
MÉDICO LEGISTA CRM 37429

AO ILMO. SR.
DR. ROBERTO TERRAZ
DELEGADO DE POLÍCIA SECCIONAL
DA DESECPOL DE MARÍLIA/SP.

D.J.S.E. Mendez - SP
PROT. n.º 1000
Lima, 20 de Mayo de 1955
D. Carrillo de Polanco

ANEXO 3

 SECRETARIA DE ESTADO DOS NEGÓCIOS DA SEGURANÇA PÚBLICA
 POLÍCIA CIVIL DE SÃO PAULO
 DELEGACIA DE INVESTIGAÇÃO E DESEMPENHO DE DEVERES DE MARÍLIA
 DESE
 Av. Nilo de Almeida s/nº 187, Centro, Mar. 401-700

AUTO DE ENTREGA

Aos 06 de março de 2003, nesta cidade de Marília, na Delegacia de Investigações sobre Entorpecentes - D.I.D.E., compareceu o Doutor FLÁVIO JOSÉ RINO GUIMARÃES, Delegado de Polícia, comigo Escrivão de Polícia ao final assinado, presente Dr. JÚLIO CÉSAR ZENETTO, RS. 5.734.405/SP, residente à Rua São Jorge, 810, nesta cidade, pela mesma autoridade foi feita entrega de 162,00 GRAMAS DE TRANK LAURADO COM O LACRE Nº 004130 DO NÚMERO DE PERÍCIAS MÉDICAS LEGAIS DO INSTITUTO DE CRIMINALÍSTICA DE MARÍLIA, expedida de IP. nº 130/1991, relativa ao processo nº 1096/2002, conforme determinação judicial, tendo em vista o ofício nº 204/2003, da 2ª Vara Criminal, Exceções Criminais, Corregedoria dos Presídios e da Polícia Judiciária de Marília, datado de 14.02.2003, Circ. Fed. nº 01/02 - Excd.T. Nada mais havendo a tratar, mandou a autoridade expedir este auto, que depois de lido e achado conforme, foi devidamente assinado. Eu, Genília T. Passo, Escrivão de Polícia que o digitei.

Autoridade Policial: _____
 Recebedor: _____
 Testemunha: _____
 Testemunha: _____
 Escrivão de Polícia: _____

CÓPIA

ANEXO 4

SECRETARIA DA REGULAÇÃO PÚBLICA
SUPERINTENDÊNCIA DA POLÍCIA TÉCNICO-DENTÍFICA

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 César 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% (cinquenta 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

.....REFERÊNCIAS

Referências

- Albertson TE, Walby WF, Derlet RW. Stimulant-induced pulmonary toxicity. *Chest*. 1995; 108: 1140-9.
- Andersen ML, D' Almeida V, Mi Ko G, Kawakami R, Martins PJF. *Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação*. São Paulo: UNIFESP; 2004.
- Bailey ME, Fraire AE, Greenberg SD, Barnard J, Cagle PT. Pulmonary histopathology in cocaine abusers. *Hum Pathol*. 1994; 25: 203-7.
- Baldwin GC, Buckley DM, Roth MD, Shay AH, Kleerup EC, Simmons MS, Tashkin DP. Acute activation of circulating polymorphonuclear neutrophils following in vivo administration of cocaine. *Chest*. 1997a; 111: 698-705.
- Baldwin GC, Tashkin DP, Buckley DM, Park AN, Dubinett SM, Roth MD. Marijuana and cocaine impair alveolar macrophage function and cytokine production. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997b; 156: 1606-13.
- Baldwin GC, Choi R, Roth MD, Shay AH, Kleerup EC, Simmons MS, Tashkin DP. Evidence of chronic damage to the pulmonary microcirculation in habitual users of alkaloidal ("Crack") cocaine. *Chest*. 2002; 121: 1231-8.
- Barsky SH, Roth MD, Kleerup EC, Simmons M, Tashkin DP. Histopathologic and molecular alterations in bronchial epithelium in habitual smokers of marijuana, cocaine, and/or tobacco. *J Natl Cancer Inst*. 1998; 90: 1198-205.
- Batalha JRF, Saldiva PHN, Clarke RW, Couli BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GKG, Koutrakis P, Godleski JJ. Concentrated Ambient Air Particles Induce Vasoconstriction of Small Pulmonary Arteries in Rats. *Environmental Health Perspective*. 2002; 110: 1191-97.
- Barroso-Moguel R, Villeda-Hernandez J, Mendez-Armenta M, Santamaria A, Galvan-Arzate S. Alveolar lesions induced by systemic administration of cocaine to rats. *Toxicol Lett*. 1999; 110: 113-8.
- Björk M, Pettersson KJ, Osterlof G. Capillary gas chromatographic method for the simultaneous determination of local anaesthetics in plasma samples. *J Chromatogr*. 1990; 533: 229-34.
- Chen LC, Graefe JF, Shojaie J, Willets J, Wood RW. Pulmonary effects of the cocaine pyrolysis product, methylecgonidine, in guinea pigs. *Life Sci*. 1995; 56: PL7-12.

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

Costa Leite M, Andrade AG. Cocaína e Crack. São Paulo: Artmed; 1999.

Cucco RA, Yoo OH, Cregler L, Chang JC. Nonfatal pulmonary edema after "freebase" cocaine smoking. *Am Rev Respir Dis.* 1987; 136: 179-81.

Delbono EA, O'Brien K, Murphy RLH Jr. Lung sound abnormalities in cocaine freebasers. *Substance abuse.* 1989; 10: 201-08.

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

Ellenhorn MJ, Schonwald S, Ordog G, Wasserberger J. *Ellenhorn's Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment of Human Poisoning.* Maryland, William & Wilkins, 1997.

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

Fligiel SE, Roth MD, Kleerup EC, Barsky SH, Simmons MS, Tashkin DP. Tracheobronchial histopathology in habitual smokers of cocaine, marijuana, and/or tobacco. *Chest.* 1997 ;112: 319-26.

França GV. *Medicina Legal.* 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

Gallouj K, Brichet A, Lamblin C, Wallaert B. Syndrome hémorragique pulmonaire après inhalation de cocaïne. *Rev Mal Respir.* 1999 ; 16: 560-2.

Gardner E, Gray DJ, O' Rahilly R. *Anatomia: estudo regional do corpo humano.* 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1988.

Gartner LP, Hiatt JL. *Tratado de histologia.* 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003.

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

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.

- Gurney JW, Bates FT. Pulmonary cystic disease: comparison of *Pneumocystis carinii* pneumatoceles and bullous emphysema due to intravenous drug abuse. *Radiology*. 1989; 173: 27-31
- Guyton AC, Hall JE. A ventilação e a circulação pulmonar. In: Guyton AC, Hall JE. *Fisiologia Humana e Mecanismos de doenças*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998.
- Haim DY, Lippmann L, Goldberg SK, Walkenstein MD. The pulmonary complications of crack cocaine. *Chest*. 1995; 107: 233-40.
- Halbower AC, Mason RJ, Abman SH, Tudor RM. Agarose infiltration improves morphology of cryostat section of lung. *Lab Invest*. 1994; 71: 149-53.
- Hamm JT, Yee S, Rajendran N, Morrissey RL, Richter SJ, Misra M. Histological alterations in male A/J mice following nose-only exposure to tobacco smoke. *Inhal Toxicol*. 2007; 19: 405-18.
- Hedrich HH, editor. *The laboratory mouse*. Amsterdam: Elsevier; 2004.
- Herbert RA, Leininger JR. Nose, Larynx and Trachea. In: Maronpot RR. *Pathology of the mouse: Reference and Atlas*. Hardcover; 1999.
- Hodge-Bell KC, Lee KM, Renne RA, Gideon KM, Harbo SJ, McKinney WJ. Pulmonary inflammation in mice exposed to mainstream cigarette smoke. *Inhal Toxicol*. 2007; 19: 361-76.
- Irvin CG, Bates JH. Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size. *Respir Res*. 2003; 4: 4.
- Itkonen J, Schnoll S, Glassroth J. Pulmonary dysfunction in "freebase" cocaine users. *Arch Intern Med*. 1984; 144: 2195-7.
- Janjua TM, Bohan AE, Wesselius LJ. Increased lower respiratory tract iron concentrations in alkaloidal ("crack") cocaine users. *Chest*. 2001 ;119: 422-7.
- Jatlow PI. Drug of abuse profile: cocaine. *Clin Chem*. 1987; 33 (Suppl 11) 66-71B.
- Jones R, Reid L. Secretory cells and their glycoproteins in health and disease. *Br Med Bull*. 1978; 34: 9-16.
- Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

Kasahara Y, Tuder RM, Iaraseviciene- Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, Waltenberger J, Voelkel NF. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest*. 2000; 106 : 1311-19.

Kleerup EC, Koyal SN, Marques-Magallanes JA, Goldman MD, Tashkin DP. Chronic and acute effects of "crack" cocaine on diffusing capacity, membrane diffusion, and pulmonary capillary blood volume in the lung. *Chest*. 2002; 122: 629-38.

Klinger JR, Bensadoun E, Corrao WM. Pulmonary complications from alveolar accumulation of carbonaceous material in a cocaine smoker. *Chest*. 1992; 101: 1171-3.

Koehler SA, Ladham S, Rozin L, Shakir A, Omalu B, Dominick J, Wecht CH. The risk of body packing: a case of a fatal cocaine overdose. *Forensic Sci Int*. 2005; 151: 81-4.

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: 1-9.

Magalhães SS, Santos MA, Silva MO, Fontes ES, Ferneztian S, Garippo AL, Castro I, Castro FF, Arruda MM, Saldiva PH, Mauad T, Dolhnikoff M. Inflammatory cell mapping of the respiratory tract in fatal asthma. *Clin Exp Allergy*. 2005; 35: 602-11.

Mari A, Arranz C, Gimeno X, Lluch J, Pericot J, Escuder O, Monner A, Piulachs P. Nasal cocaine abuse and centofacial destructive process: report of three cases including treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002; 93: 435-9.

Meleca RJ, Burgio DL, Carr RM, Lolachi CM. Mucosal injuries of the upper aerodigestive tract after smoking crack or freebase cocaine. *Laryngoscope*. 1997; 107: 620-5.

Mittleman RE, Wetli CV. Cocaine and sudden "natural" death. *J Forensic Sci*. 1987; 32: 11-9.

Montenegro MR, Franco M. *Patologia processos gerais*. 4ª ed. São Paulo: Atheneu; 1999.

Murray RJ, Smialek JE, Golle M, Albin RJ. Pulmonary artery medial hypertrophy in cocaine users without foreign particle microembolization. *Chest*. 1989 ; 96: 1050-3.

Nassif Filho ACN, Bettiga SG, Lunedo S, Maestri JE, Gortz F. Repercussões otorrinolaringológicas do abuso de cocaína e/ou crack em dependentes de drogas. *Rev Ass Med Brasil*. 1999; 45: 237-41.

Oga S. *Fundamentos da Toxicologia*. São Paulo: Atheneu; 1996.

Perri CP, Dunn J. Overdose por cocaína – uma revisão crítica. *Rev Bras Clin Terap*. 1999; 25: 185-91.

Pires Neto RC, Julia Lichtenfels A, Regina Soares S, Macchione M, Hilario Nascimento Saldiva P, Dolhnikoff M. Effects of Sao Paulo air pollution on the upper airways of mice. *Environ Res*. 2006; 101: 356-61.

Prinzleve M, Haasen C, Zurhold H, Matali JL, Bruguera E, Gerevich J, Bacsikai 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: 147-55.

Puchelle E, Herard AL, Zahm JM. Airway mucociliary epithelium injury and repair. In: Baum GL. *Cilia, Mucus and Mucociliary interactions*. New York: Marcel Dekker Ed; 1998.p 203-17.

Putt FA. *Manual of histopathological staining methods*. John Wiley & Sons; 1972. p207.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Farmacologia*. 4ª ed. RJ: Guanabara Koogan; 2001.

Renne RA, Dungworth DL, Keenan CM, Morgan KT, Hahn FF, Schwartz LW. Non-proliferative lesions of the respiratory tract in rats. In: *Guides for Toxicologic Pathology*. 2003. STP/ARP/AFIP. Washington, DC. P 1-16.

Ribeiro M, Dunn J, Laranjeira R, Sesso R. High mortality among young crack cocaine users in Brazil: a 5-year follow-up study. *Addiction*. 2004; 99: 1133-5.

Ribeiro M, Laranjeira R. Cocaína: Neurobiologia e Tratamento. UNIAID Unidade de Pesquisa em Álcool e Drogas. São Paulo: Hospital Albert Einstein, 2004 [citado fev 2007]; [10p.], Disponível em: <http://72.21.62.210/alcooledrogas/atualizacoes/ac.htm>.

Robin ED, Wong RJ, Ptashne KA. Increased lung water and ascites after massive cocaine overdosage in mice and improved survival related to beta-adrenergic blockage. *Ann Intern Med*. 1989; 110: 202-7.

Roth MD, Whittaker K, Salehi K, Tashkin DP, Baldwin GC. Mechanisms for impaired effector function in alveolar macrophages from marijuana and cocaine smokers. *J Neuroimmunol*. 2003 ;147: 82-6.

Saldiva PHN, King M, Delmonte VLC, Macchione M, Parada MAC, Daliberto ML, et al. Respiratory alterations due to urban air pollution: an experimental study in rats. *Environ Res*. 1992; 57: 19-33.

- Scheidweiler KB, Plessinger MA, Shojaie J, Wood RW, Kwong TC. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Methylecgonidine, a Crack Cocaine Pyrolyzate. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 307: 1179-87.
- Scivoletto S, Henriques JR SG, Andrade AG. Uso de drogas por adolescentes que buscam atendimento ambulatorial: comparação entre “crack” e outras drogas ilícitas: um estudo piloto. *ABP-APAL*. 1997;19: 7-17.
- Silva P. *Farmacologia*. 7a ed. RJ: Guanabara Koogan; 2006.
- Substance Abuse and Mental Health Service Administration (SAMHSA): *National Household Survey on Drug Abuse (NHSDA)*. 2003. Report
- Suhl J, Gorelick DA. Pulmonary function in male cocaine smokers. *Am Rev Respir Dis*. 1998; 137: A448.
- Tashkin DP, Khalsa ME, Gorelick D, et al. Pulmonary status of habitual cocaine smokers. *Am Rev Respir Dis*. 1992; 145: 92-100.
- Tashkin DP. Airway effects of marijuana, cocaine, and other inhaled illicit agents. *Curr Opin Pulm Med*. 2001; 7: 43-61.
- Terra Filho M, Yen CC, Santos UP, Munoz DR. Pulmonary alterations in cocaine users. *São Paulo Med J*. 2004; 122: 26-31.
- Thadani PV. NIDA conference report on cardiopulmonary complications of “crack” cocaine use. *Chest*. 1996; 110: 1072-76.
- Tierney BP, Stadelmann WK. Necrotizing infection of the face secondary to intranasal impaction of “crack” cocaine. *Ann Plast Surg*. 1999; 43: 640-3.
- Velasco A, Lorenzo P, Serrano JS, Andres-Trelles F. *Velazquez Farmacologia*. 16ª ed. New York: Interamericana McGraw-Hill; 1993.
- Virmani R, Robinowitz M, Smialek JE, Smyth DF. Cardiovascular effects of cocaine: an autopsy study of 40 patients. *Am Heart J*. 1988; 115: 1068-76.
- Ward JM, Parsoneault E. Mouse dissection for principles of biology. 2007 [citado julho 2007]. Disponível em: http://www.ksu.edu/biology/pob/mouse_dissection.pdf.
- Warner E. Cocaine abuse. *Arch Intern Med*. 1993; 119: 226-35.
- Warth MP, Maldonado EAL, Ferneztlian SM, Leme AS, Perini A, Saldiva PHN, Martins MA. Neurokinin depletion attenuates pulmonary changes

induced by antigen challenge in sensitized guinea pigs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1995; 268: 781-88.

Weibel ER. Morphometry: stereological theory and practical methods. In: Gil, J. (Ed.), *Models of Lung Disease*. 5ª ed. Dekker; 1990. p.199-252.

Weibel ER, Cruz-Orive LM. Morphometric methods. In: Crystal, R.G.; Wests, J.B.E.A. (Eds), *The Lung: Scientific Foundations*. 2ª ed. Lippincott-Raven;1997. p333-334.

Weiss RD, Mirin SM, Bartel RL. Cocaine. 2ª ed. Washington,DC: American Psychiatric Press, 1994.

Willetes J, Chen LC, Graefe JF, Wood RW. Effects of methylecgonidine on acetylcholine-induced bronchochoconstriction and indicators of lung injury in guinea pigs. *Life Sci*. 1995; 57: PL225-30.

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

Yakel DL, Eisenberg MJ. Pulmonary artery hypertension in chronic intravenous cocaine users. *Am Heart J*. 1995; 130: 398-9.

Zanini AC, Oga S. *Farmacologia aplicada*. 3ª ed. SP: Atheneu; 1985.