Júlio Cezar Zorzetto

**Avaliação dos efeitos da inalação crônica de
cocaína crack na espermatogênese 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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva

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

Zorzetto, Júlio Cezar

Avaliação dos efeitos da inalação crônica de cocaína crack na espermatogênese de camundongos / Júlio Cezar Zorzetto. -- São Paulo, 2007.

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

Departamento de Patologia.

Área de concentração: Patologia.

Orientador: Paulo Hilário Nascimento Saldiva.

Descritores: 1.Cocaína crack/toxicidade 2.Testículo/anatomia & histologia
3.Espermatogênese 4.Camundongos

USP/FM/SBD-109/07

Dedicatória

*A minha esposa Marta
por iluminar meus passos, por me dar idéias e
por participar ativamente de todas as fases da minha vida.*

*Aos meus filhos Pedro e Luis
por serem o que me faz querer crescer e levá-los comigo.*

Agradeço à:

Dr. Paulo Saldiva por ter me acolhido no laboratório de Poluição Atmosférica Experimental, aceitado e se interessado pela minha idéia e por sua orientação;

Dra. Heloisa Bueno pela ajuda incondicional, por ter sido fundamental desde o início até a conclusão deste trabalho, pelo bom humor nas situações difíceis, pela orientação e acima de tudo pela amizade;

Adriana Pires, companheira de pós que analisou as lâminas deste trabalho e que deu total apoio nos momentos decisivos;

Aos professores Mauricio Yanomami e Raphael Caio da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP pela análise da cocaína no sangue dos animais;

Dra. Débora Gonçalves de Carvalho pela análise da concentração de cocaína no crack usado neste trabalho

Dr. Luis Antonio Cardoso e sua esposa, enfermeira Cristina Peres Cardoso pelo companheirismo e amizade;

Márcia, Dalva e Eliane, secretárias do laboratório de Poluição que sempre foram muito solícitas, pacientes e dedicadas;

Dra. Thaís Mauad pelo apoio e todas as sugestões sempre pertinentes;

Funcionárias da histologia Cássia, Rosely, Kelly, Keyla, Marina, Ady e Celina, pela paciência e dedicação no preparo das lâminas deste trabalho;

Angélica Baganha Ferreira, Sandra Regina de Castro Soares e Dolores Helena do laboratório de poluição pela ajuda no sacrifício dos animais;

Ana Júlia e Aline Presto Braga pelo apoio na coleta e preparo do material;

Dr. Décio Divanir Mazeto (Juiz de Direito da Comarca de Marília), Dr. Flávio José Rino Guimarães (Delegado DISE Marília), Dr. Paulo Roberto de Lara Silva (Del. DISE Marília), Getúlio Tomoyuki Sato (Escrivão DISE Marília), Rosana Deliza e (Perita Criminal Marília), Nelma Aparecida Rossini (Perita Criminal Marília) pela autorização de entrega do crack para a realização deste estudo;

Agradecimento especiais:

Dr. Luis Carlos da Silva, diretor do Núcleo de Perícias Médico Legal de Marília, que foi quem me apresentou ao Dr. Saldiva.

Dr. Neivo Luiz Zorzetto, meu grande incentivador.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

I. INTRODUÇÃO	1
I.a. Drogas ilícitas	2
I.b. O uso popular da cocaína.....	5
I.c. Cocaína em forma de Crack.....	6
I.d. Cocaína Crack: um problema sócio-econômico e de saúde pública.....	10
I.e. Intoxicação sistêmica: o testículo como órgão alvo da cocaína.....	17
I.f. Histologia do Testículo.....	18
I.g. Espermatogênese	21
I.h. Histopatologia dos testículos	26
II. OBJETIVO	29
III. MÉTODO	31
III.a. Protocolo experimental.....	32
III.a.1. Animais.....	32
III.a.2. Material Teste.....	33
III.a.3. Grupos Experimentais	34
III.a.4. Exposição.....	35
III.a.5. Coleta, fixação e preparo de material biológico	42
III.a.6. Parâmetros avaliados em testículo	43
III.a.7. Análises estatísticas	44

IV. RESULTADOS.....	45
IV.a. Material teste.....	46
IV.a.1. Concentração de cocaína no material teste :	
crack.....	46
IV.b. Animais	46
IV.b.1. Peso Animal.....	47
IV.b.2. Concentração Sérica de Cocaína.....	49
IV.b.3. Peso do testículo.....	49
IV.b.4. Túbulos em fase VII.....	50
IV.b.5. Células Somáticas	52
V. DISCUSSÃO.....	57
VI. CONCLUSÕES	78
VII. ANEXOS	80
VIII. REFERÊNCIAS	85

Lista de Figuras

Figura 1. Pedras de crack.....	7
Figura 2. Parafernália para consumo do crack.....	9
Figura 3. Criança fumando crack.	13
Figura 4. Anatomia interna do testículo.....	20
Figura 5. Corte histológico transversal de testículo.....	21
Figura 6. Representação gráfica da espermatogênese.....	23
Figura 7. Epitélio Seminífero	24
Figura 8. Fases de maturação da espermatogênese de pequenos roedores.....	25
Figura 9. Porções de crack preparadas para experimentação.	35
Figura 10. Artefato de queima e produção de fumaça de crack.....	37
Figura 11. Câmara de inalação.....	38
Figura 12. Controle de fluxo da fumaça	40
Figura 13. Sistema de exposição animal à fumaça de cocaína crack.....	41
Figura 14. Pesos médios dos animais dos grupos experimentais ao longo do período de exposição.	48
Figura 15. Número de túbulos em fase VII em testículo dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	51
Figura 16. Quantificação de Células de Sertoli em epitélio seminífero de camundongos dos diferentes grupos experimentais...	52
Figura 17. Quantificação de células de Leydig em região intertubular de testículo de animais dos diferentes grupos experimentais.....	53
Figura 18. Degeneração de espermátides alongadas em Epitélio germinativo de camundongos expostos ao crack.....	56

Lista de Tabelas

Tabela 1. Pesos Médios dos animais dos diferentes grupos experimentais	47
Tabela 2. Pesos médios de testículos dos animais dos grupos experimentais.....	49
Tabela 3. Quantificação de túbulos em fase VII encontrados em testículos de animais dos diferentes grupos experimentais	50
Tabela 4. Quantificação de células germinativas em epitélio seminífero de camundongos expostos e não expostos ao crack, em diferentes períodos de maturação gonadal	54
Tabela 5. Quantificação de células germinativas degeneradas em epitélio seminífero	55

RESUMO

Zorzetto JC. *Avaliação dos efeitos da inalação crônica de cocaína crack na espermatogênese de camundongos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 89p.

Neste estudo foram investigados os efeitos da inalação crônica de cocaína crack na espermatogênese de camundongos púberes e maduros. Camundongos Balb/c machos de duas diferentes idades, jovem e adulta (n=20), foram expostos à fumaça de 5g de cocaína crack em uma câmara de inalação, 5 dias por semana, durante 2 meses. Animais controle (n=10) foram mantidos em biotério durante o período de experimentação. Análises morfométricas quantitativas de cortes histológicos de testículos foram feitas em microscopia óptica. A qualidade da espermatogênese foi avaliada durante a fase VII de maturação do epitélio seminífero, através da quantificação dos tipos celulares normais e degenerados presentes nos espaços intra e intertubular (células germinativas, células de Sertoli e células de Leydig). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. O número de túbulos seminíferos em fase VII por testículo mostrou significativa redução ($p = 0,023$) em animais jovens expostos. Houve redução significativa observada no número de células de Sertoli ($p = 0,000$) e espermátides alongadas ($p = 0,005$) de animais jovens expostos. A degeneração celular é aumentada em todos os grupos expostos, com maior severidade no grupo jovem ($p = 0,000$). A inalação de fumaça de cocaína crack induz a alterações na espermatogênese, sendo sua toxicidade maior em animais jovens expostos durante a fase de maturação gonadal. Estes achados são de interesse na saúde pública e mais investigações devem ser feitas focando efeitos similares em homens.

Descritores: 1.Cocaína crack/toxicidade 2.Testículo/anatomia & histologia 3.Espermatogênese 4.Camundongos.

SUMMARY

Zorzetto JC. *Evaluation of the effects of the chronic inhalation of crack cocaine on the spermatogenesis of mice* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 89p.

In the present study, the effects of chronic inhalation of crack cocaine on the spermatogenesis of pubertal and mature mice were investigated. Balb/c mice of two different ages, young and adult (n=20), were exposed to the smoke of 5g of crack in an inhalation chamber for 5 days a week during 2 months. Correspondents control animals (n=10) were kept in animal house during experimentation. Morphological quantitative analyses of testis were made in optical microscope. The spermatogenesis was evaluated during phase VII of maturation of the seminiferous epithelium. The number of spermatogenesis cell types (germ cells and Sertoli cells), the germ cell degenerations and the intertubular Leydig cells population was scored. Differences were considered significant when $p < 0.05$. The number of tubular phase VII per testis showed significant ($p = 0,023$) reduction in young exposed animals. Significant reductions ($p = 0,000$) were observed in Sertoli cells and spermatids elongated ($p = 0,005$) in young intoxicated animals. Apoptosis is also increased in all intoxicated groups being more severe in young groups ($p = 0,000$). Inhalation of crack cocaine smoke induced spermatogenesis disruption of chronic exposed mice. Crack toxicity was more severe in pubertal mice when sexual gonad undergoes maturation. We think that our findings should be of public health concern and that further investigations focusing similar effects on human males are warranted.

Descriptors: 1.Crack cocaine/toxicity 2.Testis/anatomy
3.Spermatogenesis 4.Mice.

INTRODUÇÃO

I.a. Drogas ilícitas

A Organização Mundial da Saúde define toxicomania ou toxicofilia como “um estado de intoxicação periódica ou crônica, nociva ao indivíduo ou à sociedade, produzida pelo repetido consumo de uma droga natural ou sintética”.

A toxicomania tem como características aumentar a dose, necessidade de consumir a droga, podendo ainda causar dependência psíquica e física, sendo a dependência a uma droga definida como o condicionamento do indivíduo a ela e que quando na falta da mesma desencadeia a crise ou síndrome de abstinência. Isto faz com que o usuário busque rapidamente nova dose, aumentando a frequência e a quantidade de uso (Moreau, 1996).

Segundo Moreau (1996) as principais substâncias utilizadas pelos usuários de drogas nos dias atuais são:

Maconha: também denominada marijuana, é conhecida na China e na Índia há 9 mil anos, sendo extraída das folhas da *Canabis sativa*. Seu consumo é principalmente em forma de cigarros. Alguns não a consideram propriamente um tóxico, por não trazer

dependência, tolerância, nem crises de abstinência. É um excitante de graves perturbações psíquicas e leva 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.

Morfina: é um alcalóide derivado do ópio e apresenta-se em forma de líquido incolor. É um narcótico utilizado sob a forma de injeção intramuscular. No início do uso da droga o usuário sente-se eufórico, disposto, loquaz e alegre. Com o passar dos tempos vem o emagrecimento, envelhecimento precoce, angústia, impotência sexual, inapetência e vômitos. Passa à uma fase de caquexia, vindo a falecer quase sempre de tuberculose ou de problemas cardíacos.

Heroína: é um produto sintético (diacetilmorfina). Tem a forma de pó branco e cristalino. Pode ser injetado após a diluição ou ser misturado ao fumo do cigarro. Os efeitos são semelhantes aos da morfina, porém, cinco vezes mais potente. Com 30 dias de uso, o dependente necessita de uma injeção a cada duas horas.

LSD: é uma droga eminentemente alucinógena, um produto semi-sintético extraído da ergotina do centeio (diatilacina do ácido lisérgico). Consome-se em tabletes de açúcar ou em fragmento de

cartolina manchado sutilmente da droga, dissolvido na água e ingerido. É uma droga de vários poderes alucinógenos conhecidos. O usuário torna-se deprimido, triste e fadigado. Apresenta perturbações da percepção do mundo exterior delírios e alucinações.

Anfetaminas (Ecstasy): têm se tornado no momento um grande problema médico e social. São usadas por todos os toxicômanos que não dispõem do seu tipo de tóxico. Usam para evitar a sonolência, para desinibir, para euforizar. Tem a forma de comprimidos, são ingeridos com água ou bebida alcoólica.

Por fim, a *Cocaína*: um alcalóide extraído das folhas do arbusto *Erytroxylon coca*, nativo dos países andinos. Devido a suas propriedades estimulantes centrais que abrandam a fome, a sede e cansaço, os habitantes dessa região há milênios a utilizam em forma de chá ou mastigando a folha *in natura*.

Em 1859 Albert Niemann obteve o princípio ativo da planta, de natureza básica e que contém uma função amina, a cocaína. A cocaína foi introduzida na prática anestesiológica através de Carl Holler, em 1884, que conduziu uma série de experimentos que envolviam a instilação de cocaína na córnea de animais e pacientes, comprovando sua propriedade anestésica local. Simultaneamente,

seu colega 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 (Chasin e Salvadori, 1996).

As folhas do *Erythroxylum coca*, são prensadas juntamente com ácido sulfúrico e um solvente tipo éter, querosene ou até mesmo gasolina, que confere a forma básica, uma pasta contendo 90% de sulfato de cocaína. Numa segunda fase, então, o ácido clorídrico é adicionado a esta pasta de cocaína, com o objetivo de refinar o produto e eliminar as impurezas remanescentes do processo anterior, resultando num pó branco e inodoro, o cloridrato de cocaína, que é solúvel em água e que se decompõe pelo aquecimento (Chasin e Salvadori, 1996).

I.b. O uso popular da cocaína

As vias de introdução da droga cocaína por suas características de absorção são: oral, intranasal, intravenosa e respiratória (ato de fumar). A absorção da cocaína ocorre a partir de qualquer ponto de aplicação, porém quando administrada via oral é amplamente hidrolizada no tubo gastrointestinal tornando-se pouco eficaz. A utilização da cocaína (pó) por via nasal (aspirar, cheirar) ou pela

mucosa bucal, vias muito utilizadas popularmente, tem baixa velocidade de absorção, devido às propriedades vasoconstritoras do fármaco. A via nasal sob forma de cloridrato (pó) é enviada para o sangue pela mucosa nasal. Pelo seu alto poder vasoconstritor pode desenvolver ulcerações nas narinas e perfuração do septo nasal. A via parenteral utilizada é a endovenosa, pois a intramuscular, devido à constrição, causaria necrose local (Chasin e Salvadori, 1996).

No entanto, devido ao alto custo do pó de cocaína no comércio ilícito, a droga é adulterada pelos traficantes, adicionando ainda ao pó de cocaína, substâncias isomórficas como pó de mármore, giz, talco, etc. constituindo-se no produto conhecido como cocaína de rua (Chasin e Salvadori, 1996). Dizia-se que os usuários de cocaína de maior poder aquisitivo cheiravam e os pobres injetavam na veia, aproveitando o máximo do efeito com pequenas quantidades, não podendo se dar ao luxo de “cheirar o pó”.

I.c. Cocaína em forma de Crack

Em 1984, houve o surgimento no Broux, Estados Unidos, de um derivado químico álcali, de efeito mais rápido e mais potente que a apresentação em pó da cocaína. Era a pasta básica de cocaína (folha de coca + ácido sulfúrico) misturada a bicarbonato de sódio,

numa proporção de 1:1, utilizando água como veículo para mistura. Em seguida esta mistura era aquecida deixando-se evaporar a água, restando uma espécie de sabão de cor que tende do bege ao amarelado e que endurece em forma de pedras (Figura 1). Essas pedras, quando aquecidas produzem fumaça inalável a qual durante o processo de queima, caracteristicamente estalam ou crepitam, dando origem ao nome “CRACK” (Corradini, 1996).

Figura 1. Pedras de crack.

Figura 1. Forma de apresentação do crack. Cada centímetro cúbico representa o equivalente a 1g da droga.

O crack é a forma de cocaína básica auto-administrada pelo ato de fumar. Uma pequena massa, aproximadamente 200 miligramas do material (Wood et al., 1996) é acondicionada em aparatos do tipo cachimbo, onde é diretamente queimada com uma chama enquanto o usuário aspira a fumaça produzida. Quando o aquecimento é aplicado à droga há rápida mudança do estado sólido para líquido e para vapor. A base de cocaína possui ponto de fusão a 98°C e manifesta pressão de vapor adequada para disponibilizar cocaína acima de 160°C (Lawrence et al., 1984). A ignição e a combustão do material podem ocorrer em temperaturas bem maiores, mas a degradação pirólica é mais comum e se inicia em torno dos 170°C. Como o vapor de cocaína percorre um caminho que muda do quente para o frio, o vapor condensa formando a fumaça, que é na verdade, a condensação da composição aerossol da base de cocaína associada aos produtos pirólicos (Wood et al., 1996).

A velocidade de absorção da cocaína inalada (pó) ou fumada (crack) promove pico de concentração plasmática, com duração e intensidade de efeitos que podem ser comparados aos da via intravenosa de administração (Seibel e Toscano Jr, 2001).

O crack é mais barato do que a cocaína, pois não necessita do refino. Além disso, é 6 vezes mais potente, age rapidamente (5 a 10 segundos) e exige freqüente repetição da dose, dando mais lucro ao traficante (Corradini, 1996). Para o usuário, oferece “vantagens” por não deixar marcas externas (flebites), não expor às doenças

transmitidas pelo uso de seringas (AIDS, hepatite) e ainda pelo baixo custo, fator principal de seu alto consumo.

As pedras de crack são queimadas e fumadas em cachimbos especiais (chamados de “maricas”) muitas vezes improvisados de diversas maneiras, como adaptações em latas, papel de alumínio, partes de pequenas tubulações hidráulicas ou misturados aos cigarros de tabaco ou maconha, Figura 2.

Figura 2. Parafernália para consumo do crack.

Figura 2. Cachimbos ou “maricas” como artefatos caseiros e improvisados para fumar o crack.

I.d. Cocaína Crack: um problema sócio-econômico e de saúde pública

O problema da utilização de drogas psicotrópicas é tão velho quanto a própria civilização. Em todo mundo, muitas sociedades e culturas têm usado drogas para alterar a disposição e o humor, os pensamentos e os sentimentos (Das, 1993). A cocaína, heroína e a maconha são as drogas mais utilizadas de modo abusivo e não aprovado. Desde 1987 o uso de cocaína vem aumentando em todo o mundo, principalmente na forma de pedra, o crack (Das, 1993; Dunn et al., 1996; Ferri et al., 1997 *apud* Ferreira Filho, 2003).

A cocaína crack é hoje a forma mais barata, mais fácil de obter e consumir, estando em ritmo crescente entre os usuários de droga, principalmente aqueles de menor poder econômico (Ferreira Filho, 2003).

Em 1999, nos Estados Unidos, 30 milhões de indivíduos já havia usado cocaína, sendo que cerca de 6,6 milhões eram usuários regulares (Li et al., 1999b).

No Brasil, até o início do século XX, não havia relato sobre abuso e dependência ou uma preocupação maior com o consumo de cocaína. A substância era vendida em farmácia para alívio de laringites e tosse (ação anestésica). Na década de 1910-20, começa a haver grandes preocupações com o uso não médico nas grandes

idades como São Paulo e Rio de Janeiro. O país não é um produtor significativo de cocaína, mas faz parte da rota colombiana do tráfico para os Estados Unidos e Europa, e, mais recentemente, ingressou na conexão nigeriana, vindo a droga entrar em grandes quantidades no país (Carlini et al., 1995 *apud* Ferreira Filho, 2001)

A maior parte da atenção e esforços para enfrentar o problema das drogas é dirigida ao combate do tráfico. Pouco se sabe a respeito do padrão de uso e das características específicas do usuário, o que dificulta realização de estudos dando ênfase ao problema de saúde (Ferri et al., 1997 *apud* Ferreira Filho, 2001).

De maneira geral, os usuários de droga estão escondidos da sociedade, tanto por usar uma droga ilegal como pela criminalidade a ela relacionada, ficando, assim, difícil determinar com precisão o seu número. Eles podem ser encontrados em serviços especializados no tratamento da dependência química, em delegacias, cadeias e presídios ou hospitais devido às condições de saúde conseqüentes ao uso da droga (Haverkos e Lange, 1990 *apud* Ferreira Filho, 2003).

Um levantamento realizado pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas – CEBRID, do Departamento de Psicologia da Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP - no período compreendido entre 1987 e 1993, mostra um aumento significativo do percentual de estudantes de 1º e 2º graus que

usaram cocaína, pó ou pedra, pelo menos uma vez na vida, passando de 0,5% em 1987 para 1,2% em 1993, (Figura 3).

Ferreira Filho et al. (2003) fizeram uma avaliação do perfil sociodemográfico e de padrões de uso entre dependentes de cocaína hospitalizados na grande São Paulo/Brasil, entrevistando 440 pacientes, maiores de 18 anos, internados em unidades de serviço de recuperação do usuário de droga. A pesquisa revelou que 38,4% dos usuários fumavam crack, ao passo que 1,6% se utilizavam da droga de forma injetável. Havia uma prevalência de usuários do sexo masculino, somente 18 (4,1%) eram mulheres. A maioria não tinha companheiro e pertencia as classes sociais C, D e E (69,8%). A faixa etária dos pacientes estudados era bastante jovem (85,0% dos dependentes químicos tinham menos de 35 anos de idade), com média de $27,5 \pm 6,9$ anos, mínimo de 18 e máximo de 51 anos. A faixa etária jovem é comum entre os adictos, por ser um público de maior exposição e grande penetração das drogas.

Figura 3. Criança fumando crack.

Figura 3. Menino acende pedras de crack em adaptação de cachimbo feito com frasco de leite fermentado e peça de caneta. Foto publicada no Jornal Folha de São Paulo, 1992.

Vários autores vêm demonstrando um aumento crescente no consumo de crack entre os jovens (Dunn et al., 1996; Ferri et al., 1997; Strang et al., 1990 *apud* Ferreira Filho, 2003). Nos Estados Unidos o fenômeno atingiu proporções epidêmicas. Estudos epidemiológicos do final da década de 80 mostraram que de cada 4 americanos 1 usou cocaína e que no Canadá cerca de 2% dos estudantes de Ontário e British Columbia entre 13 e 18 anos eram usuários de crack (Spitz e Rosecan, 1987 e Smart, 1991 *apud* George et al., 1996). Atualmente, nos Estados Unidos, cerca de 6 milhões de pessoas são adictos da cocaína e seu uso vem se espalhando entre os jovens. Na classe média americana, predomina usuários da comunidade adolescentes branca (média de 16,5 anos), onde 15% usou cocaína ou crack de 10 a 50 vezes e 18% são usuários “pesados” tendo utilizado-se da droga mais de 50 vezes (Schwartz et al., 1991).

Em pesquisa realizada no Estado de São Paulo em 2001, Ferreira Filho et al. registraram que 45,8% dos usuários disseram acreditar que é fácil obter cocaína e 36,1% apontaram sobre a facilidade de se obter o crack. A noção dos danos causados pela droga também já foi assimilado sendo que 98,8% dos usuários, envolvidos na pesquisa, reconhecem que há riscos graves no consumo desta droga. Os dependentes de crack apresentavam baixa escolaridade, encontravam-se com maior frequência desempregados, havia morado nas ruas, usavam maiores quantidade de droga e

tenham sido presos maior número de vezes do que aqueles que usavam outras vias de administração da cocaína. Os usuários de crack apresentam pior condição socioeconômica e maior envolvimento com a violência e a criminalidade.

Os resultados de Ferreira Filho et al. (2003) sugerem que o uso de drogas é um grave problema de saúde pública na Grande São Paulo, mostrado por pacientes internados em hospitais por dependência a droga cocaína.

Segundo França (2001), os efeitos do crack são os mesmos da cocaína, pois a droga é a mesma, apenas difere na forma de uso. A cocaína é capaz de produzir estimulação do sistema nervoso central e tem propriedades simpaticomimética e anestésica local. Tais atividades manifestam-se de maneira dose dependente.

As propriedades psicoestimulantes devem-se à influência sobre a transmissão dopaminérgica, induzindo euforia e sensação de clarividência, responsáveis pelo uso abusivo e pela farmacodependência. O bloqueio de recaptura de neurotransmissores adrenérgicos, em neurônios periféricos, contribui para a hiperatividade simpática com repercussões cárdio-vasculares. A cocaína tem a capacidade de liberar catecolaminas, particularmente adrenalina, de reservas teciduais e, também, estimula o efluxo simpato-adrenal, com influência sobre o sistema renina-angiotensina (França, 2001).

A cocaína é pirogênica. Três fatores concorrem para elevar a temperatura: maior atividade muscular, vasoconstrição devido a estimulação vasomotora central que reduz a perda de calor e, por último, parece ter a cocaína ação direta sobre o centro termoregulador, estimulando o aumento de temperatura (França, 2001).

A via fumada (crack) atravessa a membrana alveolar pulmonar e determina os efeitos comparados aos da via endovenosa. O crack em sua metabolização produz metilecgonidina que tem atividade biológica sistêmica. Cook et al. (1985 *apud* Chasin e Salvadori, 1996) demonstraram que 50mg de crack fumado em intervalos de 30 segundos e por 5 minutos, induzem a efeitos psicológicos e cardíacos da mesma magnitude que 20 mg de cocaína por via intravenosa. As doses de pó para uso intravenoso variam entre 25 e 50 mg, já na aspiração nasal as doses individuais variam entre 30 e 70 mg.

Há referências de que a média de uso por fârmacodependente seja de 4 a 5 gr por semana. O uso crônico da cocaína crack desenvolve tolerância, havendo relatos de uso diário que excedem 1g, considerado letal para indivíduo adulto (Chasin e Salvadori, 1996).

A dose letal (“overdose”) de cocaína para humanos varia de 1,0 a 5,0g. Ao receber uma overdose, o paciente torna-se rapidamente excitado, inquieto, ansioso e perturbado. Seus reflexos tornam-se exacerbados. É comum a cefaléia. O pulso torna-se rápido (taquicardia e eventual fibrilação ventricular), a respiração torna-se irregular, há

elevação da temperatura, as pupilas tornam-se dilatadas e ocorre exoftalmia. Há náuseas, vômitos e dores abdominais. Finalmente, há delírio, respiração de Cheyne-Stokes, convulsões e inconsciência. A morte sobrevém devido à parada cardio-respiratória. Entretanto, conhecem-se efeitos tóxicos com doses menores e há usuários que suportam doses maiores (França, 2001).

I.e. Intoxicação sistêmica: o testículo como órgão alvo da cocaína

Os efeitos crônicos do uso recreativo de drogas no sistema reprodutivo masculino têm se tornado foco de crescente interesse nos últimos anos.

O testículo humano é sabidamente um órgão alvo de injúrias conseqüentes da ação de agentes terapêuticos e tóxicos ambientais, promovendo vários possíveis mecanismos e manifestações de seu efeito tóxico na espermatogênese (Boeckelheide, 2005). Um exemplo clássico seria a nicotina, quando inalada (tabagismo) induz mudanças na função gonadal como a deficiência na maturação do espermatozóide e redução no potencial de fertilização (Yamamoto et al., 1998).

Assim como a nicotina, a cocaína é metabolizada por via hidrolítica e oxidativa (Li et al., 1999a). Estudos experimentais demonstram uma grande afinidade da droga em tecidos testiculares (Sweet et al., 1987). De fato, quando cocaína radioativa é injetada subcutaneamente em ratos, são detectadas em tecidos testiculares concentrações que excederam às aquelas encontradas em tecido muscular, hepático, cardíaco ou sanguíneo. Apenas as concentrações de cocaína radioativa encontradas em tecido cerebral foram maiores às aquelas concentradas nos testículos (Mule e Misra, 1977 *apud* George et al., 1996).

I.f. Histologia do Testículo

Os testículos se referem às gônadas masculinas. Neles são constantemente produzidos os gametas X e Y, compreendidos nos milhões de espermatozóides produzidos diariamente por um mamífero, como o homem.

Os testículos estão envolvidos por uma grossa cápsula de tecido conjuntivo denso. Em seu interior existem septos fibrosos que o dividem em cerca de 250 a 350 compartimentos piramidais chamados lóbulos dos testículos, sendo cada um destes formado por 1 a 4 túbulos seminíferos (Junqueira e Carneiro, 2004). Os túbulos

seminíferos formam alças enoveladas que percorrem toda a extensão axial do testículo, (Figura 4). Sob microscopia ótica, um corte histológico transversal dessa compacta organização dentro do órgão, permite a visualização de secções com a nítida representação dos tipos celulares que congregam estruturas intersticiais e intra - tubulares (Russel et al., 1990), Figura 5.

Os túbulos seminíferos estão dentro de um tecido conjuntivo frouxo e rico em vasos sangüíneos e linfáticos, nervos e células de Leydig (células intersticiais). Os capilares sangüíneos são fenestrados e permitem a passagem livre de macromoléculas, como as proteínas do sangue. Há uma imensa rede linfática, o que explica a semelhança entre a linfa e o fluido intersticial (Junqueira e Carneiro, 2004). A organização linfática é formada por canais irregulares ou sinusóides ligados por células endoteliais. Os fluidos linfáticos penetram através das células do interstício. Os túbulos seminíferos são circundados pelo endotélio linfático, células miódes e elementos acelulares, que juntos delimitam a membrana limitante do túbulo (Russel et al., 1990).

Figura 4. Anatomia interna do testículo.

Figura 4. Estrutura interna do testículo mostrando organização dos túbulos seminíferos e em detalhe.

O tipo celular mais frequentemente encontrado no interstício intertubular é a célula de Leydig. Esta célula é, além da testosterona, fonte de uma variedade de hormônios estrogênicos. A célula de Leydig possui abundante retículo endoplasmático liso e mitocôndrias com cristas tubulares, ambos contendo enzimas associadas com a síntese de esteróides. Macrófagos e outras células derivadas da medula óssea são também comumente vistos no espaço intersticial (Russel et al., 1990).

Figura 5. Corte histológico transversal de testículo.

Figura 5. Detalhe de fotomicrografia de corte histológico de testículo em coloração Hematoxilina/Eosina (HE), mostrando espaço intertubular preenchido por células de Leydig e capilares.

Os dois compartimentos, intersticial e tubular, juntos concorrem para o funcionamento normal da fisiologia do testículo e de sua principal função, a de produzir gametas masculinos durante o processo da espermatogênese (Russel et al., 1990).

I.g. Espermatogênese

Os túbulos seminíferos são revestidos de um epitélio de maturação e proliferação de células germinativas masculinas, denominado epitélio seminífero. Este epitélio é responsável pela espermatogênese, produção de espermatozóides, um processo cíclico

e contínuo. A partir da membrana basal, que constitui a parede do túbulo, são produzidas células imaturas, que sofrem subseqüentes divisões e diferenciações celulares até a efetiva produção do gameta masculino. Baseado em considerações funcionais, a espermatogênese pode ser dividida em 3 fases de amadurecimento de células germinativas: 1. *proliferativa*, que consiste na formação de espermatogônias por processo de rápida divisões mitóticas; 2. *meiótica*, formação de espermatócitos nos quais o material genético é recombinado e segregado e; 3. *diferenciação*, na qual espermátides redondas se transformam em espermátides alongadas, células estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar o ovo, os espermatozóides (Russel et al., 1990), Figura 6.

No entanto, o epitélio seminífero não é constituído apenas de células germinativas, possui um tipo celular somático denominado célula de Sertoli. As células de Sertoli fomentam o desenvolvimento e mantêm a viabilidade das células germinativas, responsável pelo transporte de hormônios e nutrientes através de compartimentos especializados, as barreiras hemato-testiculares. As células de Sertoli envolvem as células germinativas, formando sítios de ligação entre células germinativas que servem tanto para manter uma estreita associação quanto prover suporte físico entre os tipos celulares do epitélio seminífero (Russel et al., 1990), Figura 7.

Figura 6. Representação gráfica da espermatogênese

Figura 6. Representação do processo de maturação de células germinativas do testículo.

Figura 7. Epitélio Seminífero

Figura 7. Compartimentos inter e intratubulares, limitados pela membrana basal dos túbulos, com representação dos tipos celulares do interstício (Cel. Leydig) e do epitélio seminífero (Cél. de Sertoli, espermatogônias, espermatócitos e espermátides), responsáveis pela espermatogênese.

A evolução de células germinativas do homem até a formação de espermatozóide adulto demora entre 69 a 79 dias. O processo da espermatogênese não ocorre de maneira sincronizada, mas em pequenas ondas de diferentes fases de maturação em toda a extensão do túbulo (Russel, 1990). Em pequenos roedores, ratos e camundongos, a espermatogênese compreende de 12 a 14 fases de maturação que se completa em 2 meses (Russel, 1990). Sendo assim, em um corte histológico de testículo pode-se observar secções de túbulos seminíferos em diferentes fases de maturação epitelial.

Particularmente, a fase VII possui todos os tipos celulares expressos, com espermatozóides formados e prestes a serem lançados à luz do túbulo, como produto final da espermatogênese (Figura 8).

Figura 8. Fases de maturação da espermatogênese de pequenos roedores.

Figura 8. Representação histológica das várias fases de maturação do epitélio seminífero. O ciclo segue a seqüência das 14 fases esquematicamente apresentadas “tipo pizza”. Peculiarmente a fase VII apresenta todos os tipos celulares do epitélio seminífero, incluindo espermatozóides alinhados em torno do lúmen tubular.

I.h. Histopatologia dos testículos

Se considerarmos todo o processo de espermatogênese, existem apenas 4 esquemas gerais que podem levar a uma diminuição no número de espermatozóides produzidos no testículo. Podem ocorrer separadamente ou em combinação:

1. interrupção do padrão de divisão das células de origem;
2. degeneração e fagocitose de células germinativas;
3. prisão e atraso da espermatogênese;
4. sacrifício das células germinativas (apoptose).

A taxa de divisão das espermatogônias de origem é variável, dependente do “status” da espermatogênese. A espermatogônia de origem se divide periodicamente para repopular a elas mesmas e também para dar origem a células que efetivamente participarão da espermatogênese. Muitas condições de anormalidade na espermatogênese levam a um epitélio depletado de células germinativas, com exceção das espermatogônias. Estas células residuais são as espermatogônias de origem, geralmente menos vulneráveis a uma variedade de agentes que afetam o testículo. Possuem a capacidade de permanecerem, de certa forma, dormentes sem se diferenciarem ou se dividirem, por um período relativamente longo. Quando a espermatogênese está se

recuperando existe uma aceleração na taxa de divisão das células de origem (Russel et al., 1990).

Quando uma célula espermatogônia se diferencia o processo até a formação do espermatozóide é irreversível. A única outra opção desta célula é não seguir seu processo de maturação e degenerar (Russel et al., 1990).

A degeneração pode ocorrer por morte celular programada ou apoptose que é um mecanismo conservado evolutivamente e necessário para o desenvolvimento embrionário e homeostase tecidual (Reed, 2000), que equilibra a proliferação celular mantendo o número de células constante nos tecidos (Vermeulen et al., 2003).

A apoptose é caracterizada por mudanças morfológicas que incluem o encolhimento celular progressivo, com condensação e fragmentação da cromatina nuclear e formação de vesículas com eventual fragmentação da célula formando corpos apoptóticos que são fagocitados sem que haja reação inflamatória, diferentemente da morte por necrose. A liberação destes corpos dá nome ao mecanismo, pois do grego significa queda, como as folhas que caem de uma árvore (Kerr et al., 1972).

Por conta de seus efeitos no testículo, a intoxicação sistêmica pela cocaína parece ser maior em mamíferos do sexo masculino, onde menores doses e concentrações no plasma seriam requeridas para provocar toxicidade (Morishima et al., 1993). A cocaína promove

alterações morfológicas em tecidos testiculares de ratos como constrição de vasos sanguíneos do testículo (Li et al., 1998), depleção de anti-oxidantes testiculares e indução de degeneração (apoptose) de células germinativas masculinas (Li et al., 1999c), levando à redução na produção de espermatozóides (Li et al., 1997a; George et al., 1996).

No entanto, as pesquisas que investigam os efeitos tóxicos da cocaína na espermatogênese foram realizadas com a droga em pó, diluída e aplicada via subcutânea, endovenosa ou intraperitonal. Não existe na literatura estudos utilizando a cocaína crack, droga muito consumida especialmente pela população jovem, como tóxico inalatório potencialmente deletério aos tecidos testiculares.

Sendo assim, este estudo visa explorar a via de absorção inalatória da cocaína através da fumaça de crack, como promotora de efeitos semelhantes aos encontrados na literatura. Este trabalho reproduz as condições de exposição dos usuários de forma muito próxima da realidade nas ruas. Além disso, o uso deste entorpecente representa um problema de saúde pública com potencial comprometimento das funções reprodutivas no futuro.

OBJETIVO

Diante das informações acima citadas, o presente estudo se propõe a ***investigar os possíveis efeitos tóxicos da cocaína inalada sobre a espermatogênese, através da quantificação de células germinativas produzidas em testículos de camundongos, jovens e adultos, cronicamente expostos à fumaça de cocaína crack.***

MÉTODOS

III.a. Protocolo experimental

III.a.1. Animais

Foram utilizados 60 camundongos machos da linhagem isogênica Balb/c, em duas diferentes idades:

- 21 dias, representando animais jovens e sexualmente imaturos;
- 60 dias, representando animais adultos e sexualmente maduros.

Os camundongos foram 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 Animals, Intitute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, D.C.; 1996 e aos princípios éticos da legislação brasileira e Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Durante o período experimental, os animais receberam alimentação comercial balanceada para camundongos e água *ad libitum*. Registros periódicos de peso (semanal) e ocorrências de morte (diário) foram feitos.

III.a.2. Material Teste

A droga cocaína 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 da droga “crack” provenientes da Delegacia de Investigação sobre Entorpecentes de Marília (D.I.S.E.) 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*”, 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).

III.a.3. Grupos Experimentais

Todos os animais, 60 machos Balb/c, jovens e adultos, foram aclimatados às condições de laboratório durante 3 dias antes do início do ensaio e, posteriormente, divididos ao acaso para a formação de 4 grupos, 2 expostos e 2 não expostos, a saber:

- **Grupo Exposto Jovem:** (n=20) camundongos Balb/c, macho de 21 dias de idade , expostos ao crack.
- **Grupo Exposto Adulto:** (n=20) camundongos Balb/c, macho de 60 dias de idade, expostos ao crack.
- **Grupos Não Exposto (Controle):** representados por 2 grupos (n=10) de camundongos Balb/c, macho, o primeiro composto por animais de 21 dias de idade (**Jovem**) e outro composto por animais de 60 dias de idade (**Adulto**), utilizados como controle negativo, e portanto, mantidos em instalação de biotério sem sofrer exposição ao crack.

III.a.4. Exposição

Os grupos experimentais de exposição (Jovem e Adulto), foram submetidos a 5 minutos de exposição à fumaça produzida pela queima de 5 g de crack, durante 5 dias por semana, por 2 meses. Para tanto, todo o lote de crack foi pesado e dividido em porções de 5 g, mantido em recipientes de alumínio (formas de empadas) e coberto por filme plástico até sua utilização em protocolo de exposição (Figura 9).

Figura 9. Porções de crack preparadas para experimentação.

Figura 9. Recipiente contendo porções 5g de crack.

A fim de simular a uso da droga de forma real, ou seja, fumada, um modelo de exposição por via inalatória foi especialmente desenvolvido para o protocolo experimental deste estudo. Tratou-se de um sistema de exposição de camundongos à fumaça de crack em câmara de inalação. O sistema foi composto de 3 partes complementares:

1. **Artefato de queima e produção de fumaça de crack**, composto de apoio de ferro apoiando o recipiente de alumínio (forma de empada), contendo 5 g da droga *in natura*, e sob ela uma chama produzida por álcool etílico 92,8° INPM 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. A fumaça produzida foi represada em funil de pirex, (Figura 10).

Figura 10. Artefato de queima e produção de fumaça de crack

Figura 10. Componentes do artefato de queima e produção de fumaça de crack. a) lamparina; b) pedras de crack em recipiente de alumínio; c) funil de captura de fumaça; d) mangueira de silicone; e) conector em Y.

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 instalados simultaneamente os dois grupos de camundongos expostos, jovem e adulto. Para que os grupos não se misturassem, foi adaptada uma rede de malha grossa

disposta de lado a lado, subdividindo a câmara em dois ambientes de dimensões proporcionais (22,5cm). 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 (Figura 11).

Figura 11. Câmara de inalação

Figura 11. Câmara de inalação com dois ambientes para exposição simultânea dos dois grupos de camundongos, (Jovem e Adulto), por 5 minutos/5 dias/semana/2 meses.

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. A pressão da bomba à vácuo foi controlada por válvula de vazão e medida em fluxômetro (Figura 12). O fluxo ideal para exposição foi determinado em 20L/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. Esse artifício também permitiu uma simulação mais real do ato de aspiração de fumaça de crack.

Figura 12. Controle de fluxo da fumaça

Figura 12. Aparelhos de controle de pressão e fluxo de ar e fumaça no interior da câmara de inalação. a) bomba de vácuo; b) fluxômetro; c) válvula controladora de vazão.

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 exaurido para o ambiente externo (Figura 13).

Figura 13. Sistema de exposição animal à fumaça de cocaína crack

Figura 13. Sistema de exposição montado em capela de fluxo ar com pressão negativa.

Os grupos controle negativos foram formados por animais nas mesmas condições dos grupos expostos, ou seja, camundongos na puberdade e adultos, porém não foram expostos ao tóxico durante os dois meses de suas manutenções.

Durante o período experimental foram medidos os pesos médios dos animais uma vez por semana. Observações de alterações de comportamento, bem como, ocorrências de óbitos foram registradas.

III.a.5. Coleta, fixação e preparo de material biológico

Após dois meses de experimentação, os animais foram pesados, anestesiados e sacrificados para coleta de material biológico, que são:

- Testículos;
- Sangue.

Os dois testículos de cada animal foram retirados e pesados separadamente. Após microperfurações com agulha de insulina os testículos foram mantidos 2h em imersão de solução de Bouin e posteriormente transferidos para solução de álcool 70%. Cada testículo foi seccionado transversalmente em 3 partes e encaminhados para confecção de lâminas histológicas de 5µm de espessura. De cada animal foram feitas, então, 2 lâminas histológicas, uma para cada

testículo, fixadas em duas colorações específicas: Hematoxilina/Eosina (HE) e Ácido periódico de Shiff/Alcian Blue (PAS/AB).

A concentração total do crack absorvido pelos animais, foi determinada através do nível sérico de cocaína no sangue. Para tanto foi coletado sangue de 10 animais, 1mL de sangue de cada um, logo após a última exposição, sendo colhidos 10 mL de sangue em tubos heparinizados. O material hematológico foi encaminhado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP e submetido à análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.

III.a.6. Parâmetros avaliados em testículo

Foram feitas análises morfométricas quantitativas em microscopia ótica. Com o auxílio de retículo de pontos como referência de área analisada e foram medidos os seguintes parâmetros:

- Quantificação de túbulos seminíferos na fase VII em lâminas de cortes histológicos corados em PAS/AB, nos 3 cortes transversais de cada testículo/animal, em aumento de 400x;
- Quantificação de células somáticas extratubulares de Leydig presentes em áreas referência de retículo, em aumento de 200x;

- Quantificação de células intratubulares (somática e germinativas) como sertoli, espermatogônias, espermatócitos, espermátides arredondadas e espermátides alongadas em um dos cortes no qual foram analisadas 4 fases VII da espermatogênese e em cada uma delas dois campos aleatórios, totalizando 8 leituras por lâmina em aumento de 400x.

III.a.7. Análises estatísticas

Os dados obtidos neste estudo receberam tratamento estatístico pelas Análises One-Way-ANOVA e Modelo Linear Multivariado, do programa SPSS V.10. As diferenças foram consideradas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

IV.a. Material teste

IV.a.1. Concentração de cocaína no material teste : crack

Uma aliquota do crack, utilizado no protocolo experimental deste estudo, foi encaminhada para o Núcleo de Toxicologia Forense (NTF) do Instituto Médico Legal de São Paulo, a fim de detectar e quantificar a presença de cocaína.

As análises cromatográficas realizadas pela técnica de cromatografia a gás forneceram resultado POSITIVO para presença de COCAÍNA, cuja quantificação evidenciou o percentual de 57,66% desta droga na amostra de crack enviada (Anexo 4).

IV.b. Animais

Durante o período de 2 meses de exposição diária à fumaça de crack, as medidas de peso dos animais nos diferentes grupos experimentais apresentaram os seguintes resultados:

IV.b.1. Peso Animal

Os pesos médios dos grupos animais obtidos através do peso do grupo/número da amostra e medidos semanalmente durante a exposição estão discriminados na Tabela 1 e Figura 14. Não foram encontradas diferenças entre os grupos experimentais neste parâmetro.

Tabela 1. Pesos Médios dos animais dos diferentes grupos experimentais

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

Tabela 1. Descrição de média de peso inicial e final dos grupos experimentais. Lembramos que para formação dos grupos jovens foram utilizados animais recém-desmamados (21 dias de idade) cujo padrão de peso é em torno de 10-12g. Os dados mostram equivalência entre os pesos dos grupos experimentais, ao final da experimentação.

Figura 14. Pesos médios dos animais dos grupos experimentais ao longo do período de exposição.

Figura 14. O gráfico mostra as curvas dos pesos médios dos animais dos grupos experimentais, medidos periodicamente (semanal ou quinzenal) durante o período de estudo. O peso médio atingido pelos animais do grupo Exposto Jovem durante a 2ª, 4ª e 6ª semana experimental atinge valores maiores em relação aos obtidos pelos animais do grupo controle jovem. Os animais do grupo Adulto exposto ao crack mantiveram pesos médios menores que seu respectivo controle Adulto não exposto.

Ao final do período experimental de 2 meses, os animais foram sacrificados e submetidos à necropsia para obtenção dos dados que deram origem aos seguintes resultados:

IV.b.2. Concentração Sérica de Cocaína

A amostra de sangue (10 ml) coletada logo após a última exposição animal à inalação de fumaça crack, encaminhada para o Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, permitiu a detecção de **212,5 ng de cocaína/mL** de sangue ao nível sérico, através da análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.

IV.b.3. Peso do testículo

Tabela 2. Pesos médios de testículos dos animais dos grupos experimentais

GRUPO	n	PESO MÉDIO (g)	ERRO PADRÃO	MÍNIMO (g)	MÁXIMO (g)
Controle Adulto	10	0,0968	0,0023	0,08	0,11
Controle Jovem	09	0,0991	0,0019	0,09	0,11
Exposto Adulto	20	0,0880	0,0021	0,07	0,11
Exposto Jovem	18	0,0919	0,0043	0,03	0,11

Tabela 2. Expressos os pesos médios ($\pm$ Erro Padrão), número amostral (n) e valores máximos e mínimos de pesos de testículos nos diferentes grupos experimentais. O peso médio de testículos dos animais Expostos Adultos se encontram menores com relação ao valor encontrado em seu respectivo grupo Controle, no entanto não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais no parâmetro peso testicular.

IV.b.4. Túbulos em fase VII

Tabela 3. Quantificação de túbulos em fase VII encontrados em testículos de animais dos diferentes grupos experimentais

GRUPO	n	MÉDIA	ERRO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO
Controle Adulto	20	23,316	2,1186	13,7	45,0
Controle Jovem	12	34,500	5,2412	11,7	75,0
Exposto Adulto	30	17,911	1,6247	3,67	42,3
Exposto Jovem	30	23,911	1,6281	2,00	40,0

Tabela 3. Expressas as médias ($\pm$ Erro Padrão), número amostral (n) e os valores absolutos mínimos e máximos de túbulos seminíferos em fase VII de maturação, quantificados em 3 diferentes cortes histológicos de testículo/animal. O grupo Exposto Jovem apresenta redução do número de túbulos seminíferos em fase VII quando comparado ao seu respectivo grupo controle ($P=0,023$). Os grupos adulto, controle e exposto, não apresentam diferença significativa entre os valores encontrados para o mesmo parâmetro.

Figura 15. Número de túbulos em fase VII em testículo dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Figura 15. Representação gráfica dos valores médios ($\pm$ Erro Padrão) do número de túbulos na fase VII encontrados em cortes histológicos de testículo dos animais nos diferentes grupos experimentais. Pode-se observar a redução de túbulos nesta fase em ambos grupos expostos (Adulto e Jovem) em relação aos seus respectivos grupos controles, com diferença estatística entre os valores médios encontrados entre os animais dos grupos Jovens ($p=0,023$).

IV.b.5. Células Somáticas

Figura 16. Quantificação de Células de Sertoli em epitélio seminífero de camundongos dos diferentes grupos experimentais.

Figura 16. Representação gráfica do número de células de Sertoli quantificadas em secções de túbulos seminíferos em fase VII de maturação de animais dos diferentes grupos experimentais. Houve redução significativa ($p=0,000$) no número de células de Sertoli por comprimento de membrana basal (μm) em epitélio germinativo de animais jovens expostos ao crack, com relação aos animais jovens não expostos. O grupo exposto adulto apresenta aumento não significativo de células de Sertoli quando comparado ao grupo controle adulto.

Figura 17. Quantificação de células de Leydig em região intertubular de testículo de animais dos diferentes grupos experimentais

Figura 17. Representação gráfica da quantificação de células de Leydig presentes em região intertubular por área de testículo (μm^2) de camundongos dos diferentes grupos experimentais. Houve redução significativa ($p=0,023$) no número de células de Leydig em testículos de camundongos adultos expostos ao crack, com relação aos animais adultos não expostos.

Tabela 4. Quantificação de células germinativas em epitélio seminífero de camundongos expostos e não expostos ao crack, em diferentes períodos de maturação gonadal

TIPO CELULAR	GRUPO	MÉDIA	ERRO PADRÃO	N	SIGNIFICÂNCIA
Espermatogônia	AC	4,47	0,15	20	
	JC	4,01	0,21	18	
	AE	4,34	0,12	40	
	JE	4,05	0,18	34	
Espermatócito	AC	6,56	0,19	20	
	JC	6,39	0,23	18	
	AE	6,56	0,13	40	
	JE	6,87	0,19	34	
Espermátide Redonda	AC	19,67	0,61	20	
	JC	18,17 *	0,52	18	* p= 0,001
	AE	18,11	0,41	40	
	JE	21,59 *	0,60	34	
Espermátide Alongada	AC	9,56	0,47	20	
	JC	9,88 *	0,51	18	*p= 0,005
	AE	9,88	0,38	40	
	JE	7,39 *	0,50	34	

Tabela 4. Tabela descritiva dos valores médios na quantificação dos diferentes tipos celulares em epitélio seminífero de camundongos jovens (J) e adultos (A), expostos (E) ou não expostos (C) à inalação de 5g crack, 5 vezes/semana durante 2 meses. * Diferença significativa entre valores obtidos através de Comparação Multivariada entre os grupos relacionados ($p < 0,005$). Houve redução significativa na população de espermátides alongadas e aumento de espermátides redondas de animais jovens expostos ao crack, com relação aos seus respectivos animais controle.

Tabela 5. Quantificação de células germinativas degeneradas em epitélio seminífero

TIPO CELULAR degenerado	GRUPO	MÉDIA	ERRO PADRÃO	N	SIGNIFICÂNCIA
Células germinativas (exceto espermatíde alongada)	AC	0,11*	0,059	20	** p< 0.05
	JC	0,11#	0,070	18	
	AE	0,17*	0,042	40	
	JE	0,24#	0,047	34	
Espermatíde Alongada	AC	9,66*	0,47	20	** p<0,05
	JC	5,53#	0,51	18	
	AE	12,73*	0,38	40	
	JE	19,47#	0,50	34	

Tabela 5. Valores médios e erro padrão obtidos através da quantificação de tipos celulares germinativos degenerados, presentes em epitélio germinativo de túbulos seminíferos em fase VII de maturação, de camundongos jovens (J) e adultos (A), expostos (E) ou não expostos (C) à inalação crack. ** Diferença significativa entre valores obtidos através de Comparação Multivariada entre os grupos relacionados ($p<0,005$). Houve aumento significativo de degeneração celular de células germinativas, com maior severidade em espermatídes alongadas, os espermatozóides.

Figura 18. Degeneração de espermátides alongadas em Epitélio germinativo de camundongos expostos ao crack.

Figura 18. Detalhe da degeneração celular de espermátides alongadas (setas) em epitélio germinativo durante a fase VII de maturação de túbulos seminíferos, de camundongos jovens e adultos submetidos à inalação de crack e em seus respectivos controles. Fotomicrografia em aumento de 1000x (objetiva de imersão) de corte histológico transversal de testículo em coloração Hematoxilina/Eosina (HE).

DISCUSSÃO

A análise realizada pela técnica de cromatografia a gás na amostra cocaína crack, enviada ao Núcleo de Toxicologia Forense (NTF) do Instituto Médico Legal de São Paulo, forneceu resultado POSITIVO para presença de COCAÍNA, detectando o percentual de 57,66% de cocaína em sua composição (Anexo 4). Assim, o montante de cocaína crack adquirido foi considerado adequado para utilização como substância teste do protocolo experimental deste estudo.

A fim de reproduzir em laboratório os efeitos da cocaína crack na espermatogênese de usuários jovens e adultos, foi idealizado um sistema de exposição que simulasse, de maneira experimental, as condições reais de consumo desta droga, ou seja, fumada. Um sistema basicamente composto de dispositivo de queima de crack, câmara de inalação e pressão de ar, permitiu a exposição crônica de camundongos Balb/c machos em duas fases de maturação de gônadas, jovens de 21 dias de idade (n=20) e adultos de 60 dias de idade (n=20), à fumaça produzida pela queima de 5g de crack cocaína, 5 vezes por semana, durante 2 meses. Outros dois grupos de camundongos, jovens e adultos (n=10), compuseram os controles negativos do protocolo experimental, mantidos sem contato com a droga pelo mesmo período.

A toxicidade da cocaína crack inalada foi avaliada nos camundongos através dos seguintes parâmetros biológicos:

- Nível sérico de cocaína;
- Peso corpóreo animal (g);
- Mortalidade;
- Peso dos testículos (g);
- Qualidade de maturação do epitélio seminífero através da quantificação de túbulos na fase VII da espermatogênese;
- Quantificação de células somáticas de suporte à espermatogênese: Células de Leydig e Células de Sertoli;
- Quantificação de células germinativas normais e degeneradas do epitélio seminífero: células de Sertoli, espermatogônia, espermatócitos, espermátides redondas e alongadas;

Em 2 meses de exposição, todos os animais foram mantidos em biotério de manutenção com controle das condições macro-ambientais (temperatura, umidade e pureza de ar) e micro-ambientais (densidade de confinamento, higiene, comida e água *ad libitum*), portanto sob conforto mínimo para a manutenção da boa saúde animal experimental.

Durante o período experimental, os grupos expostos, jovem e adulto, foram avaliados quanto a possibilidade de alteração de peso corpóreo provocada pela intoxicação de cocaína inalada, com relação

aos seus respectivos grupos controle sem contato com a droga. Não foram tomadas medidas de peso animal individual. Dentro de um mesmo grupo, os animais foram pesados em conjunto e o peso coletivo foi fracionado pelo número de animais (n). Os valores médios de peso inicial obtidos para os grupos jovens controle e exposto foram 12,1g e 11,5g, respectivamente, e para os grupos adultos controle e exposto foram 21,8g e 20,8g, respectivamente. Os grupos experimentais deste estudo foram constituídos de maneira aleatória e previamente às exposições, portanto, o fato de grupos destinados à inalação de cocaína crack (jovem ou adulto) apresentarem peso médio inicial menor, com relação aos seus respectivos controles, foi mero acaso. Ainda, a diferença de peso médio $\leq 1g$ entre os grupos relacionados, expostos e controle, não os desclassifica como grupos homogêneos sob esse parâmetro.

No período de 2 meses de exposição, os animais dos grupos jovem atingiram os pesos médios finais de 24,2g (controle) e 24,5g (exposto), mostrando equivalência de crescimento e ganho de peso. Animais dos grupos adulto atingiram 25,9g (controle) e 23,4g (exposto), mostrando que a diferença de peso médio inicial, medida previamente à exposição, é mantida, não podendo ser atribuída à qualquer efeito da exposição, Tabela 1.

No que se refere à alteração de peso pelo uso de cocaína, relatos epidemiológicos afirmam que, caracteristicamente, a cocaína

provoca inapetência em seus usuários, com sintoma de emagrecimento numa intoxicação crônica (Ferreira Filho, 2001; Seibel e Toscano Jr, 2001).

Neste estudo, quando distribuímos os pesos médios atingidos pelos grupos experimentais ao longo do tempo (Figura 14), os animais adultos expostos apresentam curva de crescimento proporcionalmente abaixo àquela de seu grupo controle durante todo período de exposição, sem indicação de emagrecimento.

Diversamente, o crescimento ponderal dos animais do grupo jovem exposto apresenta flutuações diferentes àquelas apresentadas pelo seu grupo jovem não exposto. Chegam a obter pesos médios superiores aos valores atingidos pelos animais de seu grupo controle, em 3 momentos experimentais: 2^a semana (30 dias de idade e início da puberdade), 4^a semana (45 dias de idade e puberdade) e 6^a semana (60 dias de idade e início da fase adulta), Figura 14.

Todos os grupos experimentais apresentam decréscimo de peso entre a 4^a e 6^a semana de exposição Figura 14. Este fenômeno se expressa de maneira mais acentuada em animais do grupo jovem, que passam pela maturação sexual (puberdade), com maior severidade no grupo jovem exposto ao crack. Após a 6^a semana, quando esses animais jovens iniciam a fase adulta, prosseguem com peso médio crescente até o final da exposição. No entanto, os valores

de peso médio registrados durante o período experimental não apresentaram diferença significativa entre os grupos relacionados.

George et al. (1996) observaram efeito de redução de peso provocado pela cocaína injetada em ratos jovens, expressado apenas a partir da idade adulta, caracterizada pela completa maturação das gônadas. Em estudo experimental, os autores constataram equivalência de peso entre os animais expostos e controle, durante a fase de puberdade. A partir da idade adulta e completa maturação sexual, os pesos médios de ratos expostos passam a apresentar reduções significativas em relação ao grupo não exposto, que se intensificam até o final do período experimental (5 meses).

A absorção sistêmica da droga pelos camundongos submetidos à inalação de fumaça de crack foi comprovada. A amostra de sangue coletada logo após a última exposição animal à inalação de fumaça de crack, permitiu a detecção de 212,5 ng de cocaína/mL de sangue ao nível sérico.

A fumaça de crack é um aerossol inalável de base de cocaína. Snyder et al. (1987) com o auxílio de modelos de cachimbo para gerar fumaça de cocaína semelhante àquela inalada por humanos usuários de crack, demonstraram que 93,5% do produto da combustão do crack era constituído de partícula, sendo o restante representado por vapor. Utilizando um impactador de partículas em cascata determinaram que a dimensão média das partículas geradas era de

2,3 μm , pequena o suficiente para garantir a deposição em regiões alveolares de pulmões de primatas. Já em pequenos roedores, por serem farejadores obrigatórios e consequentemente possuírem olfato mais sensível e de maior eficiência de sistema de filtragem de partículas respiradas (mecanismo de defesa muco-ciliar), 90% desta distribuição de massa em minúsculas partículas seriam retidas nas vias aéreas superiores, não atingindo deposição alveolar e absorção sistêmica. Talvez, devido a esta maior proteção no trato respiratório, a concentração sérica encontrada no sangue dos camundongos deste estudo (0,0212 mg/L) tenha sido, no mínimo, 10 vezes menor à documentada em trabalhos clínicos previamente reportados. Em estudo de autópsias Virmani et al., detectou níveis sangüíneos de cocaína variando entre 0,3 e 5,3 mg/L, sugerindo a variabilidade de sensibilidade individual humana em relação à dose letal.

Com relação ao parâmetro mortalidade deste estudo, as perdas animais somaram a fuga de 01 animal do grupo Controle Jovem e 02 animais mortos do grupo Exposto Jovem, um aos 25 dias e outro aos 37 dias de experimentação. Os óbitos ocorreram durante sua permanência em biotério e, devido ao estado adiantado de decomposição, não houve possibilidade de necropsia e definição de *causa mortis*. Não se pode definir dose individual nem mesmo creditar magnitude tóxica à concentração de cocaína detectada no “pool” de sangue coletado dos animais dos grupos expostos, deste estudo.

Considerando que nenhum animal morreu durante as 24 horas seguintes a inalação, pode-se deduzir que a dose diária de 5g cocaína crack, baseada na dose diária consumida por usuários de crack (Chasin e Salvadori, 1996), foi sub-letal para os camundongos nas condições deste protocolo experimental. Ainda, sob observação empírica, nenhum animal apresentou sinais de inanição, lesões externas ou alteração de comportamento.

Na verdade, à concentração de cocaína detectada no sangue dos animais deste estudo, pode-se apenas inferir que a droga absorvida nos pulmões teve perfusão sistêmica e, conseqüentemente, possível ação tóxica em qualquer órgão deste modelo experimental mamífero.

De fato, Mule e Misra (1977) injetando subcutaneamente cocaína radioativa em ratos, observaram concentrações variadas da droga em diferentes tecidos e órgãos. Os autores relatam que a afinidade da cocaína por tecidos cerebrais e testiculares é maior com relação a qualquer outro tecido do organismo.

Os testículos podem ser afetados por substâncias tóxicas inaláveis que promovem alterações estruturais morfológicas com expressões na alteração de volume e massa destes órgãos (Watanabe, 2004). Contudo, neste estudo, a assimilação sistêmica da droga por via inalatória, não promoveu alterações significativas de peso dos testículos coletados de camundongos expostos ao crack. Ao final do experimento, os valores de peso médio e erro padrão obtidos para os

animais do grupo Jovem, controle ($0,0991 \pm 0,0019$) e exposto ($0,0919 \pm 0,0043$), bem como para os animais do grupo Adulto controle ($0,0968 \pm 0,0023$) e exposto ($0,0880 \pm 0,0021$), mostram equivalência. De forma semelhante, o estudo de George et al. (1996), relata que a exposição crônica (5 meses) à cocaína injetada em ratos jovens e adultos, não afeta o peso dos testículos.

Em oposição às observações macroscópicas aqui relatadas, quando submetemos estes órgãos à análise histológica em microscopia óptica, nítidas manifestações tóxicas da cocaína crack inalada são expressadas em tecidos testiculares de camundongos expostos.

O primeiro parâmetro quantificado foi o número de túbulos seminíferos apresentando epitélio em fase VII de maturação espermatogênica.

Túbulos em fase VII são reconhecidos por apresentarem em seu epitélio seminífero características de diferenciação celular específicas no processo de transformação da espermatíde redonda em espermatíde alongada. Não envolve divisão celular. É um fenômeno de alteração morfológica, onde uma célula germinativa redonda adquire a peculiar forma do espermatozóide, através do desenvolvimento estrutural do acrossomo. Quando submetemos cortes histológicos de testículo à coloração específica PAS, estes acrossomos se destacam em vermelho e são facilmente reconhecidos. Iniciam-se como um botão nas espermatídes redondas em fases precoces de maturação, até sua

expressão final de composição da cabeça do espermatozóide ou espermátide alongada. Diante do campo microscópico óptico, podemos distinguir túbulos na fase VII por apresentarem espermátides redondas com núcleos encostados à superfície celular e manifestação crescente de formação do acrossomo, até envolver parte da membrana citoplasmática num arco de 120 a 150°.

Assim, os túbulos em fase VII foram identificados e quantificados nas secções histológicas de testículos coletados de animais dos diferentes grupos animais deste estudo.

A análise morfométrica quantitativa evidenciou a redução significativa ($p=0,023$) dos valores médios ($\pm EP$) encontrados para o número de túbulos na fase VII de maturação por parte dos animais pertencentes ao grupo Exposto Jovem ($23,911 \pm 1,6281$), quando comparado ao grupo Controle Jovem ($34,500 \pm 5,2412$). Os animais do grupo Exposto Adulto também apresentaram valores menores para número de túbulos em fase VII ($17,911 \pm 1,6247$) com relação ao seu respectivo controle ($23,316 \pm 2,1186$), porém sem diferença significativa.

As 12 fases que compõe a espermatogênese do camundongo classificam em estágios o processo de maturação do epitélio seminífero. Durante a fase VII, estão presentes no epitélio seminífero todos os tipos celulares participam desse processo, incluindo seu produto final, os espermatozóides, representados pelo alinhamento de espermátides alongadas com características cabeças encurvadas e

separadas do material citoplasmático e caudas projetadas em redor da luz do túbulo.

A redução no número de túbulos em fase VII de maturação por secção histológica de testículo, pode ser indicativo de que a maturação do epitélio seminífero não se procede a contento, com chance aumentada da existência de porções tubulares imaturas ou atrasadas e possível comprometimento na produção de espermatozóides.

De fato, a Fase VII da espermatogênese é utilizada como marcador de avaliação para contagem de células germinativas (George, 1996). Nela foram feitas as quantificações dos tipos celulares que compõe o epitélio seminífero, descritas neste estudo.

Os valores médios ($\pm$ EP) determinados na análise morfológica quantitativa para número de células germinativas apontam aumento significativo de espermátides redondas ($p=0,001$) e depleção de alongadas ($p=0,005$), em epitélio seminífero de animais do grupo jovem exposto à cocaína crack ($18,17 \pm 0,52$ e $9,88 \pm 0,51$, redonda e alongada respectivamente) com relação aos animais jovens não expostos ($21,59 \pm 0,60$ e $7,39 \pm 0,50$, redonda e alongada respectivamente). O grupo adulto exposto não apresenta alteração de número de espermátides redondas e alongadas, com relação ao epitélio seminífero de seu grupo controle.

Estes resultados mostram que a cocaína tem efeito deletério no testículo e corrobora com o estudo experimental de Li et al. (1999a),

que demonstraram o efeito adverso da cocaína injetada, expressado na redução de espermátides alongadas e conseqüente prejuízo na produção de espermatozóides em pequenos roedores.

A diminuição de espermátides alongadas por sua vez, estimula os espermatócitos a se proliferarem, o que aumenta a quantidade de espermátides redondas, mas uma falha na espermiogênese atrasa a diferenciação das espermátides (van der Weyden et al., 2006).

Células somáticas de Sertoli e Leydig também exibiram alterações quando quantificadas pela análise morfométrica. No epitélio seminífero de camundongos expostos, a população de células de Sertoli (Figura 16) encontra-se significativamente reduzida no grupo jovem ($p=0,000$), apresentando valores médios de $1,060 (\pm 0,47 \text{ EP})$ e diferentes do seu respectivo controle jovem ($1,416 \pm 0,070 \text{ EP}$). Os animais do grupo adulto expostos ao crack tiveram um aumento não significativo do mesmo tipo celular ($1,526 \pm 0,425$) com relação aos obtidos pelos animais adultos controle ($1,358 \pm 0,059$) (Figura 17).

No interstício foi observada a redução significativa ($p=0,023$) da quantidade média de células de Leydig presentes em testículos de camundongos adultos expostos ao crack ($57,56 \pm 1,44 \text{ EP}$), com relação aos valores determinados para os animais adultos não expostos ($62,22 \pm 1,69 \text{ EP}$).

Além da função de carreamento das células germinativas em maturação no epitélio seminífero até o lúmen do túbulo seminífero, as células de Sertoli são responsáveis pela estreita conexão entre o

sistema linfático/vascular das regiões intertubulares e o epitélio germinativo no interior do túbulo. Apropriadamente também chamadas de células ponte (da terminologia inglesa “bridge cells”), elas transmitem substâncias nutrientes e/ou sinalizadoras às células germinativas (Russel et al., 1990). As células de Sertoli exibem numerosos dispositivos de junção à outras células e elementos acelulares. Estão ligadas a membrana basal do túbulo, umas às outras no epitélio seminífero e às células germinativas através de mecanismos de estreita junção entre membranas celulares, basicamente os desmossomos e as tight junctions. Assim, promovem a comunicação célula à célula, desempenhando funções mediadoras e reguladoras da espermatogênese (Russel et al., 1990).

Muito do desenvolvimento de células germinativas é controlado via hormonal e mediado ao epitélio seminífero através das células de Sertoli. As células de Sertoli possuem receptores para o hormônio folículo estimulante (FSH) e para o hormônio testosterona (T), com respostas bioquímicas e morfológicas específicas ao estímulo de ambos hormônios, expressadas no epitélio germinativo. A testosterona é produzida e secretada pelas células de Leydig, presentes no interstício testicular, e atua como principal estímulo na diferenciação de células germinativas. Através da barreira hemato-testicular formada pelas células de Sertoli, a testosterona difunde-se para os túbulos seminíferos, onde estimula a espermatogênese. A produção de testosterona, por sua vez, é regulada por um hormônio

produzido pela hipófise, o hormônio luteinizante (LH), também conhecido como hormônio estimulante de células intersticiais (ICSH). A hipófise ainda contribui na espermatogênese pela liberação do hormônio folículo estimulante (FSH), com ação direta na produção de proteína androgênica de ligação (ABP) pelas células de Sertoli. A ABP se liga à testosterona e sua liberação acredita-se ser controlada pelo feedback negativo, através da produção de um polipeptídeo chamado inibina, que é também produzido pelas células de Sertoli (Stevens e Lowe, 1992).

Sendo assim, a regulação endócrina das gônadas masculinas poderia ser afetada pela injúria causada em células somáticas testiculares, com efeitos diretos na maturação do epitélio seminífero. Os resultados de diminuição de espermátides alongadas em testículo de animais jovens expostos à cocaína, poderia ser consequência da igual redução das células de suporte da espermatogênese, Sertoli e Leydig, mediadoras de substâncias sinalizadoras do processo de maturação do epitélio seminífero.

A cocaína provoca desequilíbrio hormonal em homens, aumentando a liberação de gonadotrofinas que estimulam a hipófise a liberar LH e FSH, porém a testosterona sérica permanece inalterada (Heesch *et al.*, 1996). Em estudo experimental George *et al.* (1996), demonstraram que ratos cronicamente submetidos à altas doses de

cocaína injetada não apresentaram alterações significativas no nível sérico de testosterona, FSH, e LH.

Em cultura de células de Sertoli, a cocaína e seus metabólitos (benzoilecgonina e ecgonina) causam diminuição na secreção de transferrina e ABP (Zhang e Loughlin, 1996), mostrando que a diminuição de células da linhagem germinativa pode ser provocada ou agravada pela queda nos níveis destas proteínas secretadas pela célula de Sertoli e reconhecidas pelas células de Leydig, prejudicando a comunicação endócrina testicular.

Investigações detalhadas sobre a toxicidade da cocaína em testículo também exploram os mecanismos de ação através de vias como: afinidade molecular pela presença de sítios de ligação à cocaína em tecidos testiculares (Li et al., 1997b e 2003b) e constrição de vasos sangüíneos do testículo (Li et al., 1999c).

Os testículos possuem sítios de ligação específicos para cocaína. O estudo de Li et al. (1997b) demonstrou a presença de receptores de membrana (sup 3 H) associados à proteínas do sistema de captação de dopamina, que se ligam a cocaína de maneira saturada e específica. A cocaína, um potente agente vasoconstritor, inibe a captura de dopamina nas terminações nervosas pré-sinápticas, podendo promover a isquemia de vasos sangüíneos em tecidos testiculares. Em avaliação do fluxo sangüíneo em testículos de ratos após administração de cocaína subcutânea, Li et al. (1999c)

demonstraram o prolongado efeito vasoconstritor e isquemia tecidual. Assim, a isquemia e a reperfusão pós-esquêmica podem ser mecanismos pelos quais a cocaína compromete a função da barreira hemato-testicular e promove dano na espermatogênese.

Os mesmos autores ainda exploram um outro mecanismo de ação lesiva da cocaína no testículo: a depleção de antioxidantes testiculares e indução de apoptose em células germinativas via estresse oxidativo (Li et al., 1999b).

A cocaína é rapidamente metabolizada por vias hidrolíticas gerando reações oxidativas e radicais superóxidos durante sua metabolização, além de espécies reativas de oxigênio (ROS) na metabolização e durante a reperfusão da injúria causada (Li et al., 1999a).

Dentre os possíveis biomecanismos pelo qual a cocaína exerce citotoxicidade, o dano oxidativo direto através de espécies reativas de oxigênio e a subsequente peroxidação lipídica parece ser o mais importante.

Em tecidos testiculares são encontrados um grande número de substâncias anti-oxidantes como a glutathione redutase e a glutathione peroxidase, essenciais na função de detoxificação da célula. Estas enzimas são agentes antioxidantes de proteção da membrana celular contra ataques de radicais livres, agindo contra a decomposição peroxidativa. A redução de substâncias antioxidantes celulares poderia aumentar a injúria peroxidativa testicular.

Defeitos na produção de espermatozoides em homens inférteis estão associados ao aumento da peroxidação lipídica e prejuízo na função de enzimas antioxidantes no espermatozoide (Aitken et al., 1989 apud Li et al., 1999b).

Li et al. (1999b) descrevem a redução de glutathione redutase e glutathione peroxidase em testículo de ratos submetidos à injeção crônica de cocaína, mostrando que os efeitos adversos da cocaína nos testículos podem advir de distúrbios funcionais da defesa antioxidativa e conseqüente peroxidação lipídica em tecidos testiculares.

A peroxidação lipídica gera radicais livres mediadores de uma reação em cadeia que, uma vez iniciada resulta na destruição da membrana lipídica promovendo citotoxicidade (Rosenblum et al., 1989 apud Li et al., 1999b). A membrana testicular é rica em gorduras poli-insaturadas, o que faz dos testículos substratos primordiais para a injúria peroxidativa (Li et al., 1999b). Sendo assim, o processo de peroxidação lipídica poderia explicar a degeneração de células do epitélio seminífero.

No presente estudo, foram detectadas degenerações de células germinativas em todos os animais expostos à inalação de cocaína crack. Houve aumento significativo ($p \leq 0,05$) de degeneração em todos tipos celulares germinativos, com maior severidade em espermátides alongadas, (Tabela 5).

A análise morfométrica quantitativa para células germinativas apontou que o tipo celular mais sensível à degeneração pela ação da inalação do crack foi a espermátide alongada, com proporções 80 vezes maiores (até 19,47 cél./ μm) com relação ao conjunto de degenerações encontradas em espermatogônias, espermatócitos e espermátides redondas (até 0,24 cél./ μm). Ainda, camundongos jovens mostraram ser mais susceptíveis ao dano.

Animais expostos jovens apresentaram valores médios de degeneração de espermátides alongadas ($19,47 \pm 0,50$ EP) e para demais tipos celulares germinativos ($0,24 \pm 0,047$ EP), superiores aos encontrados em animais adultos expostos ($12,73 \pm 0,38$ EP e $0,17 \pm 0,042$ EP, respectivamente). Os valores encontrados para degeneração celular em tipos celulares germinativos (exceto espermátide alongada) para os animais dos grupos controle, são equivalentes ($0,11 \pm 0,059$ EP e $0,11 \pm 0,70$ EP, adulto e jovem). Interessantemente, animais adultos controle possuem número de degeneração em espermátide alongada ($9,66 \pm 0,47$) superior ao encontrado em camundongos controle jovem ($5,53 \pm 0,51$ EP).

O efeito citotóxico da cocaína em células germinativas também poderia ser explicado através do fenômeno natural de apoptose celular, potencializado pelo estresse oxidativo.

Li et al. (1999a) descreve que a geração de ROS pela administração de cocaína, injetada em ratos jovens, possivelmente está

envolvida na ativação da apoptose de células germinativas. Entretanto, outros importantes genes e moléculas de ativação apoptótica, como bcl-2/bax, ligante Fas e p53, estão presentes no testículo.

A indução à apoptose de células germinativas é promovida por um sistema ativo de programação de morte celular. O testículo possui naturalmente um sistema ativo de sobrevivência e morte celular que trabalham juntos na regulação da produção de células germinativas. A proliferação de células germinativas normalmente é excessiva e um sistema regulador de apoptose fisiológica otimiza a produção destas células ao nível sustentável pelo epitélio germinativo. Um sistema apoptótico deficiente em espermatogônias imaturas pode ocasionar a super-população destas células no epitélio seminífero, ocupando lugar de células germinativas maduras. A ocorrência excessiva de apoptose pode resultar na produção insuficiente de células germinativas maduras. Ambos processos, apoptose deficiente ou excessiva, levam à redução de produção de espermatozóides (Boekelheide, 2005).

O funcionamento da apoptose depende de uma família de proteínas, as caspases, que estão inativas sob a forma de procaspases. Estas são ativadas quando proteínas adaptadoras as unem e esta proximidade faz com que se clivem mutuamente. O sinal para esta ativação pode ser extrínseco sendo que ocorre ativação de receptores de morte presentes na superfície das células o que leva à ativação das caspases. A ativação intrínseca ocorre quando uma célula por estresse ou dano celular promove a agregação das

procaspases e ativação de dentro da célula. Estes dois mecanismos ocorrem sob a regulação de famílias de proteínas reguladoras, como a família Bcl-2, que tem membros pró e anti apoptóticos e a família IAP, inibidora de apoptose (Alberts et al, 2004).

No início da adolescência uma onda apoptótica ocorre nas células germinativas masculinas, sendo este um evento raro no adulto e que afeta principalmente as espermatogônias (Rodriguez *et al*, 1997). Essa onda espontânea limita as células germinativas que cada célula de Sertoli pode suportar (Richburg, 2000), assim, há equilíbrio entre proliferação e morte nos testículos, havendo para isso um sistema pró e anti-apoptótico. Como há alta taxa proliferativa, a apoptose garante o número adequado de células germinativas que podem ser adequadamente mantidas em epitélio seminífero, sendo que o seu desequilíbrio, tanto a redução quanto o aumento de apoptose, provoca menor liberação de espermatozóides (Boekelheide, 2005). Um dos mecanismos que provocam este fenômeno entre as células germinativas é o desequilíbrio na expressão de proteínas pró-apopticas, como a proteína bax e anti-apoptóticas como bclxL da família bcl/2, que são fundamentais para a onda apoptótica (Rodriguez et al., 1997).

Ainda, a cocaína pode induzir apoptose em células testiculares de animais tratados, pela liberação de citocromo c da mitocôndria para o citoplasma e pelo aumento na ativação das caspases-3 e 9 (Li *et al.*, 2003a).

Fica claro, então, que o uso da cocaína afeta a espermatogênese com redução de proteínas importantes para a maturação do espermatozóide, aumento do estresse oxidativo, alteração do fluxo sanguíneo, alterações morfométricas, diminuição da população de células da linhagem germinativa e maior quantidade de células degeneradas e de apoptose.

No entanto, todas as pesquisas sobre os efeitos tóxicos da cocaína na espermogênese, citadas e relacionadas a este estudo, foram realizadas com a cocaína em pó diluída e aplicada via subcutânea, via endovenosa ou via intraperitonal. Não foi encontrado na literatura nenhum relato utilizando a exposição biológica à cocaína sob a forma de crack.

Os resultados descritos neste estudo, demonstram que a cocaína crack inalada promove efeitos deletérios em tecidos testiculares, semelhantes aos investigados com cocaína via injetada, com principal expressão na redução de células germinativas. Ainda, que a toxicidade que inalação crônica de cocaína crack exerce no testículo é mais severa quando as gônadas masculinas atravessam a puberdade.

A cocaína crack, uma droga barata e fácil de adquirir, é consumida primordialmente por usuários jovens, incluindo adolescentes e crianças. Portanto, este estudo experimental incita o problema de saúde pública de comprometimento da qualidade reprodutiva desta e de futuras gerações.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pela exposição crônica de camundongos machos, em diferentes estágios de maturação gonadal, à fumaça de cocaína crack, concluiu-se que:

- Houve absorção sistêmica da droga em expostos, comprovada através da determinação da concentração de cocaína sérica;
- Não houve alteração de peso corpóreo e de testículos em animais expostos;
- A cocaína inalada através da fumaça de crack promoveu efeito tóxico em tecidos testiculares;
- A toxicidade da cocaína crack foi caracterizada pela redução de tipos celulares, somáticos e germinativos, de participação na espermatogênese;
- A citotoxicidade na espermatogênese foi expressada pela degeneração de células germinativas;
- Os efeitos tóxicos promovidos na espermatogênese de camundongos expostos à cocaína crack apresentaram maior severidade em animais jovens, expostos durante a fase de maturação de gonadas;

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 Júlio César Zorzetto RG; 6734405, médico legista lotado no Núcleo de Perícias Médico Legal de Marília e professor de Medicina Legal e Ética Médica da Faculdade de Medicina de Marília, inicio 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 DELSECPOL DE MARÍLIA/SP.

ANEXO 2

PODER JUDICIÁRIO
SÃO PAULO

COMARCA DE MARÍLIA - SP

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

Rua Lourival Freire, n.110 - Bairro Fragata "B" - Marília - SP
C.E.P. 17519-050 - fone (XX14) - 433 22 33 - ramal 213

Df. nº 266/003

Corre.Pres. nº 01/02 - Exec.I

Senhor Delegado,

Em atenção a pedido formulado através do ofício n.561/03, datado de 06 de fevereiro p.p., comunico a Vossa Senhoria que este juízo autorizou a liberação e entrega de 195,200 gramas de "crack", apreendidos nos autos de I.P. n. 270/02, relativo ao processo n. 1096/02, ao doutor JULIO CESAR ZORZETTO, destinado a realização de trabalho experimental, devendo a autoridade policial tomar as providências necessárias.

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

DÉCIO DIVANIR MAZETO
JUIZ DE DIREITO

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

DELEGACIA SECCIONAL DE POLÍCIA - DE MARÍLIA -	
Prot. N.º	4107
Livro N.º	Fls. 199
Data	18.1.02/2003

D.I.S.E. - Marília - SP.	
CERTIFICO conferir com original	
Dou fé	
Marília,	06 MAR 2003 200
O Escrivão de Polícia	
Getúlio Zommarini Neto	
RG 7.104.677 - Escrivão de Polícia	

D.I.S.E. Marília - SP.	
PROT. n.º	123/2003
L. n.º	107 Fls. 22
Marília	19 FEV 2003
O Escrivão de Polícia	

ANEXO 3

SECRETARIA DE ESTADO DOS NEGÓCIOS DA SEGURANÇA PÚBLICA
POLÍCIA CIVIL DE SÃO PAULO
DELEGACIA DE INVESTIGAÇÕES SOBRE ENTORPECENTES DE MARÍLIA
D.I.S.E.

Av. Nelson Spielmann n.º 337, Centro, fone: 423-7022

AUTO DE ENTREGA

Aos 06 de março de 2003, nesta cidade de Marília, na Delegacia de Investigações sobre Entorpecentes - D.I.S.E., presente o Doutor FLÁVIO JOSÉ RINO GUIMARÃES, Delegado de Polícia, comigo Escrivão de Polícia ao final assinado, presente Dr. JÚLIO CÉSAR ZORZETTO, RG. 6.734.405/SP, residente à Rua São Jorge, 550, nesta cidade, pela mesma autoridade foi feita entrega da 195.200 GRAMAS DE "CRACK", LACRADO COM O LACRE Nº 0047430, DO NÚCLEO DE PERÍCIAS MÉDICAS LEGAIS, DO INSTITUTO DE CRIMINALÍSTICA DE MARÍLIA, relacionado ao I.P. nº 270/2002, relativo ao processo nº 1096/2002, conforme determinação Judicial, tendo em vista o ofício nº 266/2003, da 3ª Vara Criminal, Execuções Criminais, Corregedoria dos Presídios e da Polícia Judiciária de Marília, datado de 14.02.2003, Corre. Pres. Nº 01/02 - Exec.I. Nada mais havendo a tratar, mandou a autoridade encerrar este auto, que depois de lido e achado conforme, vai devidamente assinado. Eu, Getúlio T. Sato, Escrivão de Polícia que o digitei.

Autoridade Policial: _____

Recebedor: _____

Testemunha: _____

Gilberto Akio Imazumi

Testemunha: _____

Eldes Zorretto

Escrivão de Polícia: _____

CÓPIA

ANEXO 4

SECRETARIA DA SEGURANÇA PÚBLICA
SUPERINTENDÊNCIA DA POLÍCIA TÉCNICO-CIENTÍFICA

RESULTADO DE ANÁLISE

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

Resultado:

As análises cromatográficas realizadas pela técnica de cromatografia a gás forneceram resultado qualitativo **POSITIVO** para COCAÍNA e a quantificação evidenciou um percentual de 57,66% (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

- Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S, Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol. Reprod.* 1989. 41: 183-97.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia molecular da célula*. 2004. 4^a Ed. Editora Artmed. Porto Alegre.
- Boekelheide K. Mechanisms of toxic damage to spermatogenesis. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 34: 6-8. 2005.
- Carlini EA, Galduróz JCF, Noto AR, Nappo S, Lima E, Adiala JC. Perfil de uso da cocaína no Brasil. *J Bras Psiquiatr.* 1995. 44:287-303.
- CEBRID (Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas). www.unifesp.br/dpsicobio/cebrid/catalogo/index.php3.
- Chasin AAM, Salvadori MC. Estimulantes do sistema nervoso central. In: Oga Z. *Fundamentos de Toxicologia*. 1996 Editora Atheneu. São Paulo. 515pp.
- COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). www.cobea.org.br.
- Cook CE, Jeffcoat R, Perez-Reyes M. Pharmacokinetic studies of cocaine and phencyclidine in man. *Pharmacokinetic and Pharmacodynamics of Psychoactive Drugs*. Barnett, G and Chiang CN Eds. Biomedical Publications: Foster City. CA. 1985.
- Corradini HB. Cocaína: efeitos na gestante e nas crianças. *Pediatrics* (São Paulo), 1996. 18(2): 170-174.
- Das G. Cocaine abuse in North America: a milestone in history. *J Clin Pharmacol.* 1993. 33:296-310.
- Dunn J, Laranjeira RR, Silveira DX, Formigoni MLOS, Ferri CP. Crack cocaine: an increase in use among patients attending clinics in São Paulo: 1990-1993. *Subst Use Misuse.* 1996. 31: 519-27.
- Ferri CP, Laranjeira RR, Da Silveira DX, Dunn J, Formigoni MLOS. Aumento da procura de tratamento por usuários de crack em dois ambulatórios na cidade de São Paulo, nos anos 1990 a 1993. *Rev Ass Med Brasil.* 1997. 43:25-8.

Ferreira Filho OF, Turchi MD, Laranjeira R, Castelo A. Perfil sociodemográfico e de padrões de uso entre dependentes de cocaína hospitalizados. *Rev Saúde Pública*. 2003. 37(6):751-9.

França GV. *Medicina legal*. 6.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, 2001. 579p.

George VK, Li H, Teloken C, Grignon DJ, Lawrence WD, Dhabuwala CB. Effects of long-term cocaine exposure on spermatogenesis and fertility in peripubertal male rats. *J Urol*. 1996.155: 327-31.

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Intitute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, D.C. 1996.

Haverkos HW, Lange WR. Serious infections other than human immunodeficiency virus among intravenous drug abusers. *J Infect Dis*. 1990. 161:894-902.

Heesch CM, Negus BH, Bost JE, Keffer JH, Snyder RW, Eichhom EJ. Effects os cocaine on anterior pituitary and gonadal hormones. 1996. 278: 1195-200.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. Editora Guanabara Koogan. 10^a edição, Rio de Janeiro. 2004.

Kerr JF, Wylie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetcs. *Br J Cancer*. 1972.26:239-257.

Lawrence AH, Elias L, Authier-Martin M. Determination of amphetamine, cocaine, and heroin vapor pressures using a dynamic gas blending system and gas chromatographic analysis. *Can J Chem*. 1984. 62;1886-8.

Li H, George VK, Bianco FJ, Lawrence WD, Dhabuwala CB. Histopathological changes in the of prepubertal male rats after chronic administration of cocaine. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 1997a. 16: 67-71.

Li H, Crossland WJ, Anderson GF, Dhabuwala CB. Characterization of cocaine binding sites in the rat testes. *J Urol*. 1997b. 158: 962-5.

Li H, Jiang Y, Rajpurkar A, Dunbar JC, Dhabuwala CB. Cocaine induced apoptosis in rat testes. *The Journal of Urology*. 1999a. 162: 213-6.

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

Li H, George VK, Crawford SC, Dhabuwala CB. Effects of cocaine on testicular blood flow in rats: evaluation by percutaneous injection of xenon-133. *J. Environ. Phatol. Toxicol. Oncol*. 1999c. 18: 73-7.

Li H, Xu L, Dunbar JC, Dhabuwala CB. Role of mitochondrial cytochrome c in cocaine induced in rat testes. *Urology*. 2003a. 61: 646-50.

Moreau RLM. Fármacos e drogas que causam dependência. In: Oga S. Fundamentos de Toxicologia. Editora Atheneu. São Paulo. 1996. 515pp.

Morishima, HO; Abe, Y; Maisuo, M; Akkiba, K; Massaoca, T; Cooper, TB. Gender-related differences in cocaine toxicity in rat. *J. Lab. Clin. Med*. 1993. 122: 1557.

Mule, SJ; e Misra, AL. Cocaine: distribution and methabolism in animals. In: Cocaine and other stimulants. Edited by EH Ellinwood and MM Kilbey. New York and London Plenum Press. 1977. 215-228.

Oga, Z. Fundamentos de Toxicologia. 1996 Editora Atheneu. São Paulo. 515pp.

Reed, JC. Mecchanisms of apoptosis. *AM. J. Pathol*. 2000. 157:1415-30.

Richburg, J H. The relevance of spontaneous- and chemically-induced alterations in testicular germ cell apoptosis to toxicology. *Toxicology Letters*. 2000. 112-113, 79-86.

Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassali P. Na early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J*. 1997. 16:2262-2270.

Rosenblun ER, Gavalier JS, Van Thiel DH. Lipid peroxidation: a mechanism for alcohol-induced testicular injury. *Free Radic Biol Med*. 1989. 7: 569-77.

Russel LD, Ettlin IP, Sinha HAP, Clegg ED. Histopathology of the testis. Clearwater, Florida: Cache River Press. 1990. chap. 6, pp. 212-64.

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

- Seibel S D, Toscano Jr A. Dependência de Drogas. Editora Atheneu. São Paulo. 2001. 560pp.
- Smart RG. Crack cocaine use in Canada. A new epidemic? *Am J Epidemiol.* 1991. 127: 1315.
- Snyder CA, Wood RW, Graefe JF, Bowers A, Magar K. "Crack smoke" is a respirable aerosol of cocaine base. *Pharmacol Biochem Behav.* 1987. 29: 93-95.
- Spitz, HI e Rosecan,JS. Cocaine abuse: New directions in treatment and research. *New York: Bruner/Mazel*, 1987. p.xiii.
- Stevens A, Lowe J. Histology. Gower Medical Publishing. New York. 1992.
- Strang J, Griffiths P, Gossop M. Crack and cocaine use in London drug addicts: 1987-1989. *Br J Addict.* 1990. 85:193-6.
- Sweet F, Murdock GL. Affinity labeling of hormone specific proteins. *Endocr Rev.* 1987. 8:154.
- Virmani R, Robinowitz M, Smialek JE, Smyth DF. Cardiovascular effects of cocaine: an autopsy study of 40 patients. *Amer. Heart J.* 1988. 115: 1068.
- Watanabe N. Decreased number of sperms and Sertoli cells in mature rats exposed to diesel exhaust as fetuses. *Toxicology Letters.* 2004. 155: 51-58.
- Van der Weyden L, Arends MJ, Chausiaux OE, Ellis PJ, Lange UC, Surani MA, Alffara N, Murakami Y, Adams DJ, Bradley A. Loss of TSLC1 causes male infertility due to a defect at the spermatid stage of spermatogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 2006. 26:3595-609.
- Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele R. Cell cicle and apoptosis. *Cell Prolif.* 2003. 36:165-175.
- Wood RW, Shojaie J, Fang CP, Graefe JF. Methylecgonidine coats and the crack particle. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 1996. Vol. 53, Nº 1, 57-66.
- Yamamoto Y, Isoyama E, Sofikitis N, Miyagawa I. Effects os smoking on testicular function and fertilizing potential in rats. *Uril. Res.* 1998. 26: 45-48.
- Zhang H e Laughlin KR. The effect of cocaine and its metabolites on Sertoli cell function. *The Journal of Urology.* 1996. Vol.155,163-166.