

ABORDAGEM MULTIDISCIPLINAR DO COMPLEXO AMIGDALÓIDE DO RATO EXPOSTO À COCAÍNA: MODELO DE NEUROTOXICOLOGIA EXPERIMENTAL NO DESENVOLVIMENTO

MARIA AMÉLIA TAVARES (IAFMUP e ICBASUP)

IVONE CASTRO VALE (UNIBMCP)

ANA ISABEL GUIMARÃES (UNIBMCP)

TERESA SUMMAVIELLE (UNIBMCP)

LILIANA DE SOUSA (UNIBMCP e ICBASUP)

RESUMO: O presente estudo tem como finalidade contribuir para a demonstração dos efeitos decorrentes da exposição à cocaína numa fase de desenvolvimento activo e, consequentemente, vulnerável do SNC, tendo como área alvo a amígdala. Para tal utilizou-se um modelo animal no rato (Wistar) para estabelecer eventuais homologias no estudo da exposição humana à cocaína durante o período referido: administração crónica diária de cocaína ao rato durante os primeiros 30 dias de vida. Ao grupo controlo foi administrado soro fisiológico. Foi estabelecida uma abordagem multidisciplinar contemplando aspectos do comportamento, da estrutura e da neuroquímica.

Os animais expostos a cocaína apresentavam diminuição da tentativa de escapar no TNF, aumento dos padrões da actividade e menor nível de defecação até ao DPN21; depois desta idade apresentavam menor actividade e maior defecação. Em relação às interações sociais apresentavam mais comportamentos de cheirar, de posições erectas ofensiva e defensiva. No estudo neuroquímico verificou-se que a amígdala dos ratos do grupo exposto à cocaína tinha menor concentração de DA e maior *turnover* da DA e ainda neste grupo a concentração de DA era mais elevada na amígdala esquerda.

Assim, verifica-se existirem efeitos diferenciais dos sistemas neurotransmissores subjacentes aos mecanismos de dependência e de adicção às drogas de abuso. No que concerne o sistema dopaminérgico é possível adiantar, com base nos resultados deste estudo, que as alterações do comportamento demonstradas nos filhos de mulheres que consumiram cocaína durante a gravidez, como a deficiente regulação da atenção e da activação, podem estar relacionadas com diminuição da DA na amígdala que se verifica nas fases mais activas do desenvolvimento do SNC.

Palavras-Chave: Amígdala; Cocaína; Comportamento; Morfologia; Neuroquímica; Rato; Desenvolvimento; Sistema Nervoso Central.

RÉSUMÉ: Cette étude a comme but contribuer à la démonstration des effets de l'exposition à la cocaïne dans une phase de développement actif et, en conséquence, vulnérable du SNS, ayant comme cible l'amygdale. Ainsi, on a utilisé un modèle animal avec le rat (Wistar) pour établir éventuelles homologies dans l'étude de l'exposition humaine à la cocaïne pendant la période suivante: administration chronique quotidienne au rat pendant les premiers 30 jours de vie. On a administré de la solution saline au groupe de contrôle. Une approche multidisciplinaire, qui a considéré aspects du comportement humain, de la structure et de la neurochimie, a été établie.

L'administration de cocaïne au rat pendant le période initial de développement postnatal a diminué l'espoir d'échapper au test forcé de la natation, a occasionné plus d'activité et moins de défécation jusqu'au 21 (vingt et

unième) jour postnatal; après cet age ils présentaient moins d'activité et plus de défécation. En ce qui concerne les interactions sociales, ils présentaient plus de comportements de flairer, de positions verticales, offensives et défensives. L'étude neurochimique a montré que l'amygdale des animaux exposés à la cocaïne avait moins de concentration de DA et un *turnover* plus élevé de DA; dans ce groupe, la concentration de DA était plus élevée dans l'amygdale gauche.

Ainsi, il y en a des effets différentiels des systèmes neurotransmetteurs sous-jacents aux mécanismes de dépendance aux drogues d'abus. En ce qui concerne le système dopaminérgique on peut dire, en voyant les résultats de cette étude, que les modifications de comportement montrées par les enfants des femmes consommatrices de cocaïne pendant la grossesse, comme les troubles déficitaires de l'attention et le contrôle de l'excitation, peuvent être liées avec la diminution de DA dans l'amygdale pendant les périodes plus actifs du développement du SNC.

Mots-Clé: Amygdale; Cocaïne; Comportement; Morphologie; Neurochimie; Rat; Développement; Système nerveux central.

ABSTRACT: The present study aims to demonstrate the effects of the exposure to cocaine in vulnerable periods of the development of the CNS, having the amygdala as the target area; this work will contribute to the understanding of the mechanisms underlying cocaine related neuro-behavioral toxicology in what they depend on the amygdala, in a period comparable to the second half of human gestation. An animal model extensively applied to study human exposure to cocaine during the referred period has been used: chronic administration of cocaine to the Wistar rat in the first 30 days of life. The control group has received saline solution. A multidisciplinary approach has been designed by applying to the same model and using the same animals for behavioural, morphologic and neurochemical evaluations.

Cocaine administration to the rat during the early postnatal period of development decreased the hope to escape from the forced swim test, caused more activity and less defecation until the postnatal day 21 (weaning day) and from there on less activity and more defecation, determined more behaviours of sniffing, of defensive and offensive erect positions. The neurochemical study revealed that the amygdala of the exposed animals had lower concentration of DA and higher DA turnover; in this group, the DA concentration was higher in the left amygdala.

The altered behaviour found in this study is associated with lower level of the amygdala dopaminergic *tonus* but no association with the serotonergic pathways was found. As far as the dopaminergic system is concerned – and it has been pointed as a major target in drug abuse – we can advance that the altered behavior described in children whose mothers used cocaine during pregnancy, such as deficiencies in attention and arousal regulation, may be related with a decrease in the levels of dopamine in the amygdala during the more active periods of the CNS development.

Key Words: Amygdala; Cocaine; Behaviour; Morphology; Neurochemistry; Rat; Development; Central Nervous System.

INTRODUÇÃO

O aumento do consumo de drogas de abuso e, de entre estas, da cocaína (Balsa *et al.*, 2001; Musto, 1989), coloca desafios médicos e sociais de difícil solução, particularmente quando a população alvo são as mulheres em idade fértil. Sabe-se que recém-nascidos e crianças expostos à cocaína durante a gestação apresentam, no decurso do desenvolvimento pós-natal, problemas vários (Chasnoff *et al.*, 1985, 1987; Delaney-Black *et al.*, 1998; Dixon *et al.*, 1987; Doberczak *et al.*, 1987; Mayes *et al.*, 1995; Neuspiel e Hamel, 1991; Oro e Dixon, 1987), os quais podem eventualmente condicionar o seu desenvolvimento e até proporcionar, em fases adiantadas da maturação, i.e. na adolescência e adultos jovens, um terreno neurobiológico mais propício ao consumo de cocaína. Esta droga de abuso produz elevação do humor (euforia), sensação de aumento da auto-estima e do bem-estar psicológico geral, aumento da acuidade mental e das capacidades físicas, diminuindo o apetite e a necessidade de sono (Jaffe, 1990). Em doses euforizantes a cocaína reduz o metabolismo cerebral incluindo o metabolismo da amígdala (London *et al.*, 1990).

O consumo crónico de cocaína pode levar a perturbações profundas da personalidade e do comportamento podendo, se prolongado, produzir um estado psicótico semelhante à esquizofrenia paranóide (Post, 1975). O consumo repetido mas intermitente desta droga leva à sensibilização persistente dos seus efeitos de estimulação locomotora e ao desencadear de estereotípias (e.g. Post, 1976). No início, a administração de cocaína pode ser tolerada com um mínimo de ansiedade, mas quando efectuada repetidamente pode levar ao aparecimento de componentes mais ansiogénicos e disfóricos, podendo mesmo instalar-se um quadro de ataques de pânico relacionados com a cocaína após cada administração, sendo sugerido para este fenómeno uma progressão de tipo *kindling* (Post *et al.*, 1995b).

A apresentação de estímulos associados ao uso de cocaína no Homem tem demonstrado a possibilidade de desencadear *craving* (Ehrman *et al.*, 1992) e a amígdala, entre outras áreas cerebrais, mostra aumento da actividade metabólica durante a apresentação desses estímulos (Childress *et al.*, 1999; Grant *et al.*, 1996).

As vítimas de *overdose* de cocaína que apresentaram *delirium* pré-terminal com agitação apresentaram hiper-regulação selectiva dos receptores opióides κ na amígdala (Mash e Staley, 1999). No cérebro humano há expressão preferencial do mRNA para a prodinorfina nas áreas relacionadas com o sistema límbico incluindo a amígdala sugerindo papel importante do sistema da dinorfina no comportamento emocional (Hurd, 1996). Têm sido efectuados alguns estudos que demonstram possível papel dos agonistas opióides dos receptores κ no tratamento da dependência à cocaína, principalmente aqueles que tiverem também actividade nos receptores μ (Mello e Negus, 2000).

A investigação dos efeitos de exposição pré-natal de cocaína sugere que os recém-nascidos de mulheres consumidoras de cocaína apresentam desenvolvimento anormal de vinculações sociais, estado organizativo deficitário, padrões de sono anormais, défices alimentares, disfunções visuais, irritabilidade, excitabilidade, tremor, anormalidades no electroencefalograma e maior incidência de síndrome de morte súbita (Chasnoff e *et al.*, 1985, 1987; Dixon *et al.*, 1987; Doberczak *et al.*, 1987; Neuspiel e Hamel, 1991; Oro e Dixon, 1987). Mayes *et al.* (1995) verificaram que as crianças expostas durante a gestação à cocaína apresentavam, aos 3 meses, menor reactividade à novidade, sugerindo deficiências na regulação da atenção e da activação, para as quais tem sido atribuído papel importante à amígdala (Holland e Gallagher, 1999). Parece demonstrar-se a existência de associação entre a exposição pré-natal de cocaína e maior frequência de comportamentos problemáticos em crianças no início da idade escolar (Delaney-Black *et al.*, 1998). Além de ser atribuído à cocaína papel na teratogénese neurocomportamental, também está amplamente demonstrado que provoca lesões estruturais no cérebro em desenvolvimento (Dow-Edwards, 1991; Gingras *et al.*, 1992; Hutchings, 1993; Spear e Heyser, 1992). Os mecanismos propostos que podem contribuir para estes efeitos relacionam-se, por um lado, com a acção da cocaína na circulação que produz isquemia da placenta levando a que o feto tenha um menor aporte de oxigénio e nutrientes (e.g. Woods *et al.*, 1987), e por outro lado, com os efeitos da cocaína no próprio cérebro em desenvolvimento, inibindo a mitose (Anderson-Brown *et al.*, 1990) e lentificando a diferenciação celular (e.g. Seidler e Slotkin, 1993).

A amígdala é uma estrutura do SNC identificada por Burdach no início do século XIX (referido em LeDoux, 2000) e assim designada por se assemelhar a uma amêndoa. A organização citológica e neuroquímica da amígdala no rato tem sido alvo de investigações no campo das neurociências básicas que possibilitam hoje conhecer detalhadamente a organização estrutural deste complexo conjunto de núcleos (De Olmos *et al.*, 1985; Alheid *et al.*, 1995). As conexões extrínsecas e intrínsecas da amígdala no rato são hoje bem conhecidas e podem ser revistas nos trabalhos de De Olmos *et al.* (1985), Price *et al.* (1987), Pitkanen *et al.* (1997), Pitkanen (2000) e McDonald (1998). Estas revisões são cruciais pois abordam a amígdala sob múltiplos aspectos, em alguns casos comparando dados obtidos no rato com os obtidos no gato e no macaco (Price *et al.*, 1987; Amaral *et al.*, 1992; McDonald, 1998; Paré e Smith, 1998). A cocaína é um alcalóide extraído da planta *Erythroxylon coca* (Johanson e Fischman, 1989). O seu efeito biológico resulta da inibição dos três transportadores de monoaminas (dopamina, serotonina e noradrenalina), potenciando a transmissão monoaminérgica (Cregler e Mark, 1986; Nunes e Rosecan, 1987; Johanson e Fischman, 1989; Volpe, 1992). O sistema dopaminérgico tem sido apontado como o alvo farmacológico preferencial da cocaína (Johanson e Fischman, 1989). O sistema mesolímbocortical da dopamina (DA), que projecta de modo marcado para a amígdala, parece ser o substrato mais importante para os efeitos da cocaína, quer dos que condicionam estimulação psicomotora, quer dos referentes às acções de reforço (Ettenberg *et al.*, 1982).

No que respeita ao sistema serotoninérgico, a amígdala possui receptores de tipo 3 para a serotonina (5-HT) nos núcleos cortical, lateral, basilar e basimedial (Morales *et al.*, 1998). Foi demonstrado que a aplicação de antagonistas deste receptor na amígdala aumentou a interacção social em ratos (Higgins *et al.*, 1991) enquanto que a administração sistémica tem efeitos ansiolíticos, sugerindo papel dos neurónios da amígdala que possuem estes receptores na génese da ansiedade (Costal *et al.*, 1990; Nevins e Anthony, 1994). Cunningham *et al.* (1992) verificaram que a sensibilização à cocaína parece estar relacionada também com alterações na autorregulação do metabolismo da 5-HT secundárias à alteração da recaptação. Zeigler *et al.* (1991) verificaram que os ratos expostos de forma contínua durante

5 dias a cocaína apresentavam, 30 dias após cessar a exposição, aumento da marcação dos receptores GABAA e diminuição da marcação dos receptores colinérgicos muscarínicos na amígdala.

Também os receptores opióides são afectados pela administração repetida de cocaína em cobaias, tendo sido demonstrada a redução do número dos receptores opióides μ na amígdala (Itzhak, 1993); contudo, quando esta administração é efectuada em ratos produz uma hiper-regulação dos receptores m na amígdala basilar (Unterwald *et al.*, 1992, 1994). Também foi verificado aumento do mRNA para os receptores opióides μ na amígdala após a administração aguda, em dose elevada e única de cocaína (Yuferov *et al.*, 1999). Estes dados sugerem a participação do sistema opióide da amígdala na expressão comportamental induzida pela cocaína.

A administração de cocaína a ratos quer em ambiente familiar, quer em ambiente estranho, induz a expressão de mRNA do c-Fos na amígdala lateral e basilar e a administração em ambiente estranho induz significativamente essa expressão comparando com a administração em ambiente familiar, sugerindo que o contexto em que a cocaína é administrada altera de forma diferenciada uma estrutura que tem sido relacionada com o reforço a drogas e com o comportamento emocional (Day *et al.*, 2001). A administração de cocaína de forma não condicionada aumentou a expressão Fos no núcleo central da amígdala, enquanto que a exposição a ambiente associado à cocaína aumentou a expressão Fos na amígdala basilar (Baker *et al.*, 1999).

A administração crónica de cocaína a ratos adultos durante 14 dias reduziu significativamente a taxa regional de metabolismo da glicose na amígdala basilar e central, mas só a partir do décimo dia, comparando com a administração de soro fisiológico (Hammer e Cooke, 1994).

Ainda na neurobiologia da díada amígdala-cocaína estão já demonstradas alterações comportamentais decorrentes desta exposição. A administração precoce de cocaína a ratos induz aumento dos movimentos locomotores e cruzamento de matrizes até aos 21 dias de vida, bem como aumento dos comportamentos de *grooming* até aos 35 dias de vida (Spear e Brick, 1979), indução de comportamentos de tipo ansioso (Blanchard *et al.*, 1998; Blanchard e Blanchard, 1999; Herbert *et al.*, 1999; Spear, 1997), aumento de compor-

tamentos de fuga e defesa, de imobilidade (Blanchard *et al.*, 1998), de hipersensibilidade (Bilitzke e Church, 1992) e comportamentos de medo (Blanchard e Blanchard, 1999), que caracterizam os estados depressivos. As respostas comportamentais precoces à exposição à cocaína podem indicar que a imaturidade dos sistemas neurotransmissores que as justificam são capazes de ser estimulados de modo a exercerem algum efeito no comportamento (Spear e Brick, 1979). Tendo, também, sido salientado o envolvimento da amígdala na aprendizagem envolvendo estímulos naturais apetitivos e aversivos (Everitt *et al.*, 1989; Gaffan *et al.*, 1993; Schafe e Bernstein, 1996), é lícito admitir que os mesmos mecanismos se apliquem a outros estímulos reforçadores como são as drogas de abuso.

Grande parte dos estudos de comportamento relativos aos efeitos da cocaína relacionados com a amígdala usam o paradigma da auto-administração de cocaína (Whitelaw *et al.*, 1996) tendo sido demonstrado que ratos com lesão excitotóxica da amígdala basilar não atingiam níveis adequados de resposta num programa de reforço de 2ª ordem pela cocaína, mas não impediram a aquisição da auto-administração de cocaína *i.v. per se*. Portanto, a aquisição do comportamento de procura de cocaína na presença de pistas associadas à droga requer a integridade desta parte da amígdala, mas não os efeitos reforçadores primários da cocaína. Estas observações apoiam a hipótese de que a amígdala basilar é essencial para desencadear a representação afectiva do reforçador primário, o que é consistente com outros dados relativos ao condicionamento apetitivo em geral (Burns *et al.*, 1993; Cador *et al.*, 1989; Everitt *et al.*, 1989; Whitelaw *et al.*, 1996). Também foi demonstrado que a preferência condicionada a um lugar associado à cocaína depende da amígdala basilar (Brown e Fibiger, 1993) e que a exposição a ambiente associado à cocaína induz a expressão de c-fos na amígdala, entre outras estruturas corticais límbicas (Brown *et al.*, 1992). Diversos estudos comportamentais permitiram associar alterações deste comportamento com a administração de diferentes tipos de drogas e, tornar esta interpretação preditora dos efeitos destas substâncias no Homem. Têm sido, assim, muito úteis na compreensão dos comportamentos associados a drogas de abuso e indicadores das áreas do SNC responsáveis pelas alterações encontradas.

No contexto dos trabalhos efectuados nesta linha de investigação, na área da neurotoxicologia das drogas de abuso, foi sendo emergente o envolvimento de outras áreas do SNC relacionadas com funções comportamentais e cognitivas. Foi-se também tornando óbvio que as alterações progressivamente reconhecidas nestas áreas poderiam estar relacionadas com o consumo da cocaína. Igualmente, é óbvio que só uma abordagem multidisciplinar – no mesmo modelo e utilizando os mesmos animais – poderia contribuir para obter a visão integrada e integradora dos efeitos das drogas de abuso sobre os padrões, tão complexos, do desenvolvimento de áreas-alvo do SNC. De entre estas é evidente o papel da amígdala em processos de recompensa e reforço do consumo de cocaína (Childress *et al.*, 1999; Grant *et al.*, 1996; Whitelaw *et al.*, 1996). No âmbito desta problemática, o presente estudo aborda esta área do SNC de extrema importância neurobiológica para o desenvolvimento das perturbações relacionadas com o consumo de cocaína (Weiss *et al.*, 2000).

O objectivo geral deste trabalho consiste em avaliar os efeitos da exposição à cocaína no padrão do desenvolvimento do SNC seleccionando uma área alvo de enorme relevância para avaliar e intervir nas consequências da exposição a esta droga de abuso: a amígdala. Para obter dados que permitam a consecução desse objectivo geral, utilizando num modelo animal experimental de exposição à cocaína no período mais activo de desenvolvimento pós-natal do rato, foram delineados os seguintes objectivos:

- 1) Estudar a expressão comportamental nos testes de natação forçada, actividade no *open-field* e interacções sociais;
- 2) Avaliar a organização morfológica da amígdala;
- 3) Quantificar os níveis de dopamina (DA), de serotonina (5-HT) e respectivos metabolitos na amígdala do rato.

Pretende-se, deste modo, contribuir para o avanço no conhecimento da expressão dos efeitos da exposição à cocaína durante fases de desenvolvimento precoce do SNC num modelo experimental, tanto quanto permite a possibilidade de traçar homologias com a situação no Homem, tendo como área alvo de referência neste modelo o complexo amigdalóide.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Modelo animal

Os ratos usados neste estudo foram machos nascidos de fêmeas Wistar nulíparas, com cerca de 60 dias de idade, adquiridas da Colônia do Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal. Foram cruzados no Biotério da Unidade de Neurocomportamento do IBMC. Foram seguidas as orientações da Instituição relativamente à experimentação animal. Todos os ratos foram mantidos num ciclo de 12 horas luz/escuro (luzes acesas às 7:00h) e tinham livre acesso a comida e água. No início, as fêmeas foram colocadas com machos entre as 20:00h e as 8:00h do dia seguinte. As ninhadas foram reduzidas a 8 crias (4 machos e 4 fêmeas). Os ratos do grupo da cocaína receberam injecções por via subcutânea de hidrocloreto de cocaína (Sigma Chemical Co., St. Luis, MO), na dose de 15 mg/Kg de peso corporal/dia, em soro fisiológico 0,9%, numa concentração de 1,5% desde o dia a seguir ao nascimento (dia pós-natal 1 ou DPN1) até ao DPN30. Cada dose diária foi dividida em duas partes iguais, a primeira administrada entre as 8:30h e as 9:00h e a segunda entre as 18:00h e as 20:00h. Os controlos receberam soro fisiológico, por via subcutânea, em doses isovolumétricas de acordo com o mesmo protocolo experimental. As crias foram separadas das mães no DPN21 (Magalhães *et al.*, 2001a, b; Magalhães *et al.*, 2002; Silva-Araújo *et al.*, 1991a; Silva-Araújo *et al.*, 1993, 1995a, b, 1996b; Silva-Araújo e Tavares, 1995; Silva-Araújo e Tavares, 1996; Summavielle *et al.*, 2000, 2002; Tavares e Silva, 1993).

2. Avaliação comportamental

2.1. Teste de natação forçada – TNF (“forced swim test”)

Foi usado o método descrito por Porsolt *et al.* (1977) com algumas modificações. Originalmente, este método consiste em colocar ratos individualmente num cilindro vertical de *plexiglass* (altura de 40 cm e diâmetro de 18 cm), com 15 cm de água mantida à temperatura de 25 °C. Depois de permanecerem 15 min. no cilindro, os ratos são retirados e são secos durante 15 min. numa cabina de calor (32 °C) antes de voltarem para as suas gaiolas individuais. Vinte e

quatro horas depois os ratos são de novo colocados no cilindro onde é medida a duração total de imobilidade num teste de 5 minutos (Magalhães, 2001a, b, 2002). Está descrito que os ratos submetidos a este procedimento ficam imóveis durante 75% do tempo de duração do teste.

No presente trabalho foi usado um recipiente cilíndrico (54 cm de altura) com 45 cm de água para evitar que as caudas dos animais tocassem o fundo do recipiente, e com diâmetro de 47 cm para proporcionar maior variedade de comportamentos. A temperatura da água foi de 24 °C (+/- 1 °C). Foram avaliados neste teste 16 ratos do grupo controlo e 16 do grupo exposto à cocaína, individualmente, aos 26 e 27 dias de idade, durante 5 minutos entre as 12:00h e as 14:00h. As sessões foram gravadas por câmara de vídeo colocada à altura de 1 metro de distância do recipiente. Após cada sessão cada rato era seco com tecido absorvente e recolocado na sua gaiola. Foram definidas as seguintes categorias comportamentais: natação rápida, natação lenta, braçadas, boiar, deslizar, mergulhar e mergulhar a cabeça. Estas categorias comportamentais foram definidas por observação *ad libitum* do comportamento dos ratos no cilindro. A análise dos dados foi efectuada com o Observer 4.0 (Noldus, Information Technology) e cada categoria comportamental na água foi pontuada pela duração (Magalhães *et al.*, 2002).

2.2. Actividade no *open-field*

A actividade no *open-field* (San Diego Instruments) foi registada para as idades DPN14, 21 e 30 em 3 sessões por idade de 15 minutos cada, 5 horas a seguir à primeira injecção diária. Foram testados 40 ratos do grupo exposto à cocaína e 40 do grupo controlo. Para avaliar a actividade correspondente à idade DPN14 e DPN21 os ratos foram testados no próprio dia e nos dois dias seguintes. Para registar a actividade correspondente ao DPN30 os ratos foram testados no próprio dia e nos dois dias anteriores. Foram determinados os seguintes parâmetros do comportamento: pôr-se de pé e actividade no centro e na periferia. A soma destes comportamentos foi considerada como a actividade global. A arena do *open field* foi limpa antes de cada animal ser testado e foi considerado um período de 2 minutos de adaptação antes do início das contagens (Magalhães *et al.*, 2002).

2.3. Interações sociais

A partir do DPN21 os ratos foram filmados em grupos de quatro provenientes da mesma ninhada, para apreciação das interações sociais. No primeiro dia juntaram-se quatro machos, no segundo quatro fêmeas e no terceiro dois machos e duas fêmeas e assim sucessivamente até ao DPN29. Foram colocados numa caixa branca de plástico com serim com 40 cm de altura, 60 cm de comprimento e 53 cm de largura, com uma luz infravermelha de 100W a uma distância de 120 cm da base da caixa em altura. As sessões foram gravadas com câmara de vídeo colocada a 116 cm de altura dos ratos. Tiveram a duração de 1 hora, com início entre as 17:00h e as 18:00h, antes da 2ª injeção diária. No presente trabalho foram utilizados, para análise das interações sociais, os primeiros 15 min. do filme efectuado no DPN29 em que interagiram dois machos e duas fêmeas de cada ninhada. Foram analisadas 5 ninhadas, 3 de ratos expostos à cocaína e 2 de ratos controlo. O registo e análise dos dados foi efectuada com o Observer 4.0 (Noldus, Information Technology) e as interações sociais foram pontuadas pela frequência. Foram definidas as seguintes categorias: boxe, luta, ataque, perseguição, postura erecta ofensiva, *grooming* agressivo, postura de ameaça, postura dominante, morder, pontapear, empurrar, postura erecta defensiva, postura de submissão, postura erecta de submissão, fuga, petrificado, rastejar por baixo e cheirar (Magalhães *et al.*, 2002).

3. Avaliações Morfológicas

No DPN30, 2 machos e 2 fêmeas de cada ninhada foram anestesiados com solução de ketamina e acepromazina (500 µL/rato) e, em seguida, perfundidos por via intracardiaca com 150 a 250 ml duma solução fixadora de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4). O cérebro foi cuidadosamente retirado e colocado durante 90 min. na mesma solução fixadora, após o que foi transferido para uma solução de sacarose a 30% em tampão fosfato 0,1M para criopreservação. Depois de devidamente criopreservado o cérebro foi seccionado num micrótomo de congelação em secções de 40 µm e estas seriadamente recolhidas para a solução de PBS. As secções foram distribuídas pelos seguintes procedimentos: **1)** técnica de Nissl; **2)** imunocolo-

ração com anticorpo anti-TH; e **3)** imunocoloração com anticorpo anti-5-HT.

3.1. Técnica de Nissl

As secções obtidas foram coradas usando um procedimento de Nissl modificado (Moore e Bloom, 1978). As secções foram lavadas em PBS 0,1M para remover vestígios da solução fixadora, colocadas em lâminas cobertas de gelatina e deixadas a secar a 4 °C. Depois de secas as lâminas foram colocadas em etanol a 70% durante 2H. Depois foram coradas com uma solução de azul de tionina, lavadas em água destilada, diferenciadas em etanol absoluto e clarificadas em xilol. As lâminas foram montadas com Histomount.

3.2. Expressão imunocitoquímica do anticorpo anti-TH

As secções de cérebro foram lavadas com PBS, tratadas com H₂O₂ em PBS numa concentração de 3%, incubadas durante uma hora numa solução PBS 0,1M com soro normal de porco (DACO A/S, Denmark) e 0,3% de Triton X-100. Depois de lavadas, foram incubadas durante uma noite a 4 °C, em soro primário anti-TH (Affiniti Research Products Ltd.) (anticorpo de coelho policlonal purificado com afinidade anti-TH, a 1:2000 na solução anterior). Em seguida as secções foram incubadas em anticorpo secundário (DACO A/S, Denmark) (imunoglobulina de porco isolada com afinidade à biotina para imunoglobulina de coelho), e depois tratadas com complexo ABC (complexo avidina-biotina) (Vector Laboratories) e reveladas com 3,3-diaminobenzidina (DAB). Finalmente, depois de lavadas, as secções foram montadas em lâminas gelatinadas, desidratadas e montadas com Histomount. A observação das lâminas foi efectuada com o microscópio óptico Olympus BX 50. Foram observadas secções ao nível 29 do Atlas de Palkovits e Brownstein (1988) onde foi realizada a caracterização dos neurónios com expressão para o anticorpo anti-TH no núcleo central da amígdala e as fibras com a mesma expressão nos núcleos central e medial da amígdala, bem como as do grupo de núcleos basilar lateral.

3.3. Expressão imunocitoquímica do anticorpo anti-5-HT

O procedimento foi semelhante ao anterior com anticorpo primário anti 5-HT (oferta do Professor J. Parnavelas, University College, Londres) diluído a 1:15000 tendo a incubação decorrido durante 2 noites.

De cada animal foi seleccionada, por observação em microscópio óptico Olympus BX 50, uma secção correspondente ao nível 30 do atlas de Palkovits e Brownstein (1988), em que estivesse bem representada a amígdala basilateral. Em cada secção foram consideradas e discriminadas as amígdalas esquerda e a direita. A zona basilateral da amígdala foi então fotografada com ampliação de 10x com a câmara Olympus Camedia Digital C-2000Z e a imagem tratada com o programa de software Olympus DP-Soft de forma a delimitar e medir a área da amígdala basilateral onde foram contados os corpos celulares com expressão positiva do anticorpo anti-5-HT. A densidade de superfície dos perfis celulares foi expresso em número de células/mm² tendo sido calculado, para cada secção, o valor médio entre a amígdala direita e esquerda. Relativamente à distribuição das fibras serotoninérgicas foi efectuada uma análise semi-quantitativa por observação directa ao microscópio óptico de toda a amígdala, direita e esquerda, nas duas secções seleccionadas. Foram consideradas 3 categorias: muitas fibras, poucas fibras e um nível intermédio.

4. Determinações Neuroquímicas

No DPN30, 2 machos e 2 fêmeas de cada ninhada foram decapitados e a amígdala dissecada de ambos os hemisférios cerebrais, de acordo com o Atlas de Palkovits e Brownstein (1988). As amígdalas esquerda e direita foram depois congeladas e armazenadas a -80 °C até serem usadas para as determinações. As concentrações de dopamina (DA), serotonina (5-HT), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) foram quantificadas por um método modificado de cromatografia líquida de alta resolução com detecção electroquímica (HPLC/EC) (Ali *et al.*, 1993) num sistema da Gilson Medical Electronics, Inc (Pump 307, Electrochemical Detector 142, Autoinjector 234 e 712 HPLC Controller Software versão 1.30). As amígdalas dissecadas foram pesadas e diluídas em 300 µl de ácido perclórico a 0,2 N. O tecido foi desagregado por ultrasonificação e centrifugado (15000 g; 7 min.), o sobrenadante foi filtrado através do filtro Costar micro centrifuge (0.2 µm) e 50 µl foram injectados no sistema HPLC/EC para separação da DA, da 5-HT e dos seus metabolitos. A razão entre o DOPAC e a DA foi determinada para cada animal e usada como índice da taxa de *turnover* da

DA. A razão entre o 5-HIAA e a 5-HT foi usada como índice da taxa de *turnover* da 5-HT (Summavielle *et al.*, 2002).

5. Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi efectuada através dos testes paramétricos, t teste e análise de variância, e pelo teste não paramétrico Mann-Whitney.

RESULTADOS

1. Avaliações Comportamentais

1.1. Teste de natação forçada (TNF)

O Quadro 1 mostra, em resumo, as médias, os desvios-padrão, e as diferenças obtidas, relativamente à 1ª sessão do TNF, entre os grupos de controlo e de animais expostos à cocaína, para o tempo de duração das categorias comportamentais consideradas: natação rápida, natação lenta, braçadas, boiar, mergulhar e mergulhar a cabeça. Verifica-se que os ratos do grupo exposto à cocaína passaram menos tempo em natação rápida e em natação lenta do que os ratos do grupo controlo.

Quadro 1 – Médias (M), desvios-padrão (DP) e diferenças para a duração das categorias estudadas no teste de natação forçada para os dois grupos na 1ª sessão.

Categorias	Controlo (n=16)		Cocaína (n=16)	
	M (DP)	M (DP)	t(30)	p
Natação rápida	33,63 (11,92)	17,75 (10,98)	-3,92	<0,001
Natação lenta	69,44 (32,94)	47,88 (25,57)	-2,07	<0,05
Braçadas	129,19 (23,05)	149,81 (50,58)	1,48	0,15
Boiar	60,56 (27,19)	75,75 (37,40)	1,31	0,20
Deslizar	6,25 (6,69)	8,69 (9,30)	0,85	0,40
Mergulhar	0,31 (1,25)	0,06 (0,25)	-0,78	0,44
Mergulhar cabeça	0,13 (0,50)	0,06 (0,25)	-0,45	0,66

O Quadro 2 mostra as médias, os desvios-padrão, e as diferenças, relativamente à 2ª sessão do teste para a duração das mesmas categorias. Verifica-se que os ratos do

grupo de animais expostos à cocaína passam menos tempo em natação rápida e em natação lenta e mais tempo a boiar do que os do grupo de controlo.

Quadro 2 – Médias (M), desvios-padrão (DP) e diferenças para a duração das categorias estudadas no teste de natação forçada para os dois grupos na 2ª sessão.

Categorias	Controlo (n=16)		Cocaína (n=16)	
	M (DP)	M (DP)	t(30)	p
Natação rápida	17,00 (7,89)	10,25 (6,73)	-2,60	<0,05
Natação lenta	85,06 (41,85)	54,06 (37,63)	-2,20	<0,05
Braçadas	80,94 (26,38)	77,31 (47,28)	-0,27	0,79
Boiar	106,88 (37,85)	144,00 (48,63)	2,41	<0,05
Deslizar	9,06 (10,42)	13,75 (16,43)	0,96	0,34
Mergulhar	0,94 (2,77)	0,50 (1,41)	-0,56	0,58
Mergulhar cabeça	0,31 (0,70)	0,13 (0,34)	-0,96	0,35

A análise de variância que compara grupo (controlo vs. cocaína) x sessão (1ª sessão vs. 2ª sessão) indica que, para a categoria natação rápida, há diferença de grupo ($F(1,30)=17,62$, $p<0,001$); os ratos do grupo exposto à cocaína nadaram menos; há diferença entre sessões ($F(1,30)=33,81$, $p<0,000$), na 2ª sessão os ratos nadaram menos; e há interacção entre o efeito de grupo e o de sessão ($F(1,30)=4,84$, $p<0,05$) (Figura 1), pelo facto de serem de diferentes grupos, têm comportamentos diferentes nas duas sessões a que foram submetidos.

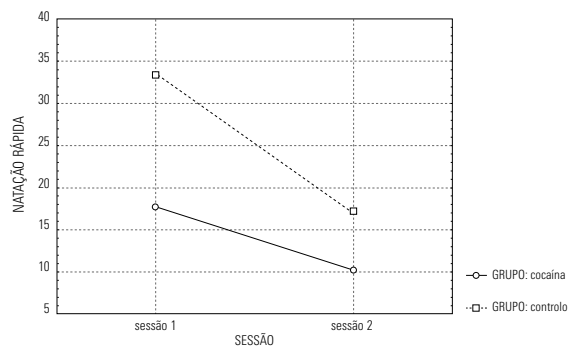


Figura 1 – Representação gráfica do tempo dispendido em natação rápida durante a primeira e a segunda sessões de testes.

Para a categoria natação lenta apenas existe diferença entre grupo ($F(1,30)=6,32$, $p<0,05$), os ratos do grupo exposto à cocaína nadaram menos. Para a categoria braçadas apenas existe diferença entre sessões ($F(1,30)=150,76$, $p<0,000$), na 2ª sessão os ratos passaram menos tempo no comportamento de braçadas; acresce ainda a interacção entre o efeito de grupo e o de sessão ($F(1,30)=6,08$, $p<0,05$) (Figura 2).

Para a categoria boiar só há diferença de grupo ($F(1,30)=5,27$, $p<0,05$), os ratos do grupo exposto à cocaína boiaram mais; e entre sessões ($F(1,30)=59,05$, $p<0,000$), na 2ª sessão os ratos boiaram mais. Para as categorias deslizar, mergulhar e mergulhar a cabeça não existem diferenças na análise de variância efectuada.

Foi efectuada a análise de variância que compara grupo (controlo vs. cocaína) x sexo (fêmea vs. macho) x sessão (1ª sessão vs. 2ª sessão) para cada uma das categorias de comportamento considerada no teste de natação forçada. Verificou-se apenas existir a interacção entre grupo, sexo e sessão para categoria comportamental deslizar ($F(1,28)=6,37$,

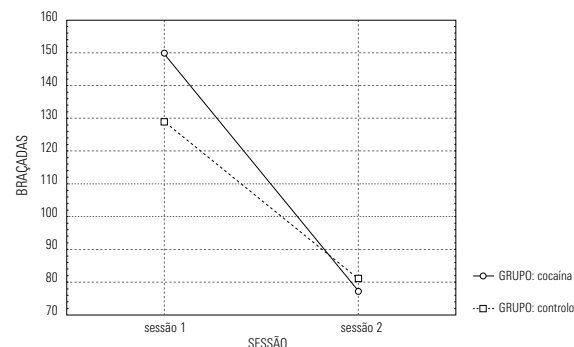


Figura 2 – Representação gráfica do tempo dispendido em braçadas durante a primeira e a segunda sessões de testes.

$p<0,05$), significando que os machos sujeitos a exposição à cocaína deslizaram mais na 2ª sessão.

1.2. Actividade no open field

Os Quadros 3, 4 e 5 representam o resumo dos resultados – médias e desvios-padrão - e as diferenças encontradas para os grupos de controlo e de animais expostos à cocaína. Foram consideradas as actividades no *open field* de acordo com as diferentes categorias: levantar, actividade no centro,

actividade na periferia e a actividade global, para as 3 sessões correspondentes ao DPN14, DPN21 e DPN30, respectivamente. No DPN14 os ratos do grupo exposto à cocaína foram mais activos nas 3 sessões, relativamente às categorias actividade na periferia e actividade global. No DPN21 os ratos do grupo exposto à cocaína foram mais activos, apenas na 1ª sessão, relativamente às categorias actividade na periferia e

actividade global. No DPN30, os ratos do grupo exposto à cocaína foram menos activos, apenas na 1ª sessão, no que se refere à actividade de levantar e no centro.

Foi efectuada uma análise de variância que compara grupo (controlo vs. cocaína) x sessão (1ª sessão vs. 2ª sessão vs. 3ª sessão), para cada idade e para cada categoria de comportamento.

Quadro 3 – Médias (M), desvios-padrão (DP) e diferenças para a actividade estudada no *open field* nos dois grupos para as 3 sessões correspondentes ao DPN14.

	1ª sessão				2ª sessão				3ª sessão			
	Controlo (n=40)		Cocaína (n=40)		Controlo (n=40)		Cocaína (n=40)		Controlo (n=40)		Cocaína (n=40)	
	M (DP)	M (DP)	t(78)	p	M (DP)	M (DP)	t(78)	p	M (DP)	M (DP)	t(78)	p
Levantar	19,43 (22,79)	18,10 (20,10)	0,28	0,78	12,10 (19,10)	11,25 (9,85)	0,25	0,80	17,05 (33,12)	23,13 (22,17)	-0,96	0,34
Centro	5,70 (15,23)	2,43 (4,06)	1,31	0,19	0,43 (1,71)	2,90 (9,17)	-1,68	0,10	1,08 (3,31)	2,38 (4,94)	-1,38	0,17
Periferia	115,13 (120,28)	245,55 (239,22)	-3,08	<0,01	53,13 (88,46)	153,55 (118,27)	-4,30	<0,001	46,85 (82,39)	133,23 (117,23)	-3,81	<0,001
Activ. global	140,25 (137,59)	266,08 (257,33)	-2,73	<0,01	65,65 (106,75)	167,70 (125,22)	-3,92	<0,001	64,98 (115,85)	158,73 (137,31)	-3,30	<0,01

Quadro 4 – Médias (M), desvios-padrão (DP) e diferenças para a actividade estudada no *open field* nos dois grupos para as 3 sessões correspondentes ao DPN21.

	1ª sessão				2ª sessão				3ª sessão			
	Controlo (n=40)		Cocaína (n=40)		Controlo (n=40)		Cocaína (n=40)		Controlo (n=40)		Cocaína (n=40)	
	M (DP)	M (DP)	t(78)	p	M (DP)	M (DP)	t(78)	p	M (DP)	M (DP)	t(78)	p
Levantar	40,78 (33,96)	50,58 (57,77)	-0,92	0,36	28,83 (27,42)	23,78 (20,83)	0,93	0,36	44,45 (30,68)	42,50 (36,99)	0,26	0,80
Centro	7,38 (9,22)	13,68 (19,44)	-1,85	0,07	3,05 (5,80)	4,65 (5,14)	-1,31	0,20	8,15 (9,28)	6,73 (8,94)	0,70	0,49
Periferia	187,35 (100,81)	281,78 (213,72)	-2,53	<0,05	149,13 (92,50)	192,53 (105,97)	-1,95	0,06	212,10 (112,76)	250,03 (155,72)	-1,95	0,22
Activ. global	235,50 (136,63)	346,03 (282,36)	-2,23	<0,05	181,00 (118,53)	220,95 (124,92)	-1,46	0,15	264,60 (144,25)	299,25 (195,47)	-0,90	0,37

Quadro 5 – Médias (M), desvios-padrão (DP) e diferenças para a actividade estudada no *open field* nos dois grupos para as 3 sessões correspondentes ao DPN30.

	1ª sessão				2ª sessão				3ª sessão			
	Controlo (n=40)		Cocaína (n=40)		Controlo (n=40)		Cocaína (n=40)		Controlo (n=40)		Cocaína (n=40)	
	M (DP)	M (DP)	t(78)	p	M (DP)	M (DP)	t(78)	p	M (DP)	M (DP)	t(78)	p
Levantar	44,06 (29,83)	30,05 (22,46)	2,37	<0,05	44,93 (25,62)	38,90 (25,55)	1,05	0,30	53,03 (39,19)	40,65 (36,91)	1,45	0,15
Centro	13,61 (13,15)	8,55 (8,72)	2,03	<0,05	13,45 (17,39)	10,20 (9,22)	1,04	0,30	17,50 (19,38)	11,10 (11,73)	1,79	0,08
Periferia	257,18 (100,21)	223,45 (110,45)	1,43	0,16	271,20 (123,35)	249,63 (119,42)	0,79	0,43	274,33 (120,41)	268,25 (160,40)	0,19	0,85
Activ. global	314,85v (132,25)	262,05 (135,18)	1,77	0,08	338,20 (168,10)	304,88 (143,90)	0,95	0,34	340,20 (161,29)	320,00 (203,28)	0,49	0,62

DPN14

Para a categoria - levantar - existe apenas diferença entre sessões ($F(2,156)=4,59$, $p<0,05$). Para a categoria - actividade no centro - não existem diferenças. Para a categoria - actividade na periferia - há diferenças de grupo ($F(1,78)=20,47$, $p<0,000$), os ratos do grupo exposto à cocaína tiveram mais actividade na periferia, e diferenças de sessão ($F(2,156)=15,68$, $p<0,000$), houve decréscimo da actividade na periferia ao longo das 3 sessões. Para a categoria actividade global há diferenças de grupo ($F(1,78)=16,64$, $p<0,001$) (Figura 3) e diferenças de sessão ($F(2,156)=13,72$, $p<0,000$) (Figura 4).

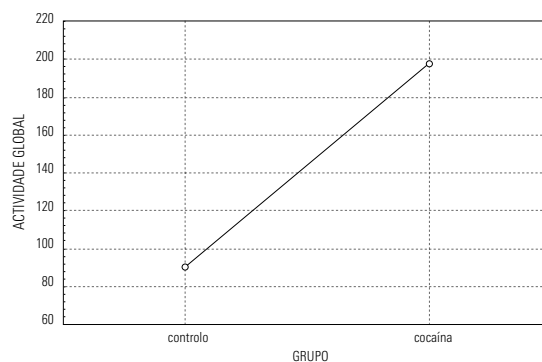


Figura 3 – Actividade global no *open-field* no DPN14, efeito principal para o grupo (controlo vs cocaína) ($F(1,78)=16,64$; $p<0,000$).

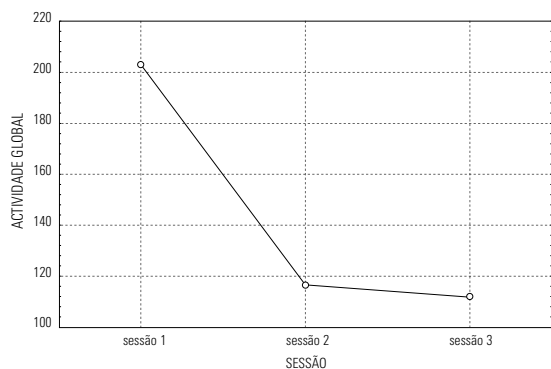


Figura 4 – Atividade global no *open-field* no DPN14, efeito principal para a sessão (1ª sessão vs 2ª sessão vs 3ª sessão) ($F(2,156)=13,72$; $p<0,000$).

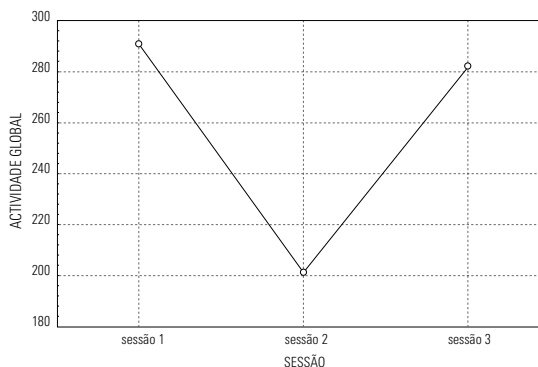


Figura 6 – Atividade global no *open-field* no DPN21, efeito principal para a sessão (1ª sessão vs 2ª sessão vs 3ª sessão) ($F(2,156)=8,98$; $p<0,000$).

DPN21

Para a categoria – levantar – há diferenças entre sessões ($F(2,156)=11,27$, $p<0,000$). Para a categoria – atividade no centro – há diferenças entre sessões ($F(2,156)=8,71$, $p<0,001$). Para a categoria – atividade na periferia – há diferenças de grupo ($F(1,78)=7,11$, $p<0,01$), os ratos do grupo exposto à cocaína tiveram mais atividade na periferia e de sessão ($F(2,156)=7,52$, $p<0,001$). Para a categoria – atividade global – há diferenças de grupo ($F(1,78)=4,58$, $p<0,05$), os ratos do grupo exposto à cocaína tiveram mais atividade global (Figura 5) e de sessão ($F(2,156)=8,98$, $p<0,001$) (Figura 6).

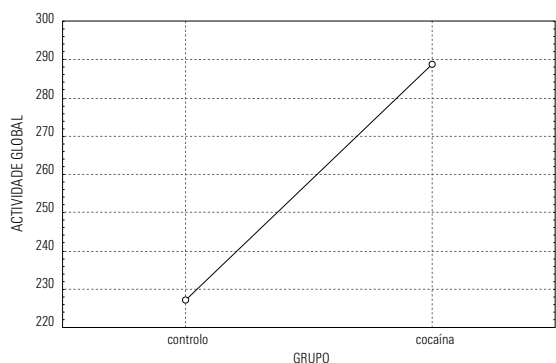


Figura 5 – Atividade global no *open-field* no DPN21, efeito principal para o grupo (controle vs cocaína) ($F(1,78)=4,58$; $p<0,05$).

DPN30

Para a categoria – levantar – há diferenças de grupo ($F(1,78)=5,21$, $p<0,05$), os ratos do grupo exposto à cocaína levantaram-se menos. Para a categoria – atividade no centro – há diferenças de grupo ($F(1,78)=5,03$, $p<0,05$), os ratos do grupo exposto à cocaína tiveram menos atividade no centro. Para a categoria – atividade na periferia – não há diferenças de grupo ou de sessão. Para a categoria – atividade global – não há diferenças de grupo ou de sessão (Figuras 7 e 8).

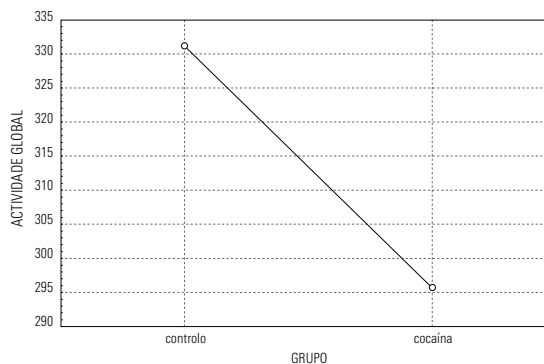


Figura 7 – Atividade global no *open-field* no DPN30, efeito principal para o grupo (controle vs cocaína) ($F(1,78)=2,35$; ns).

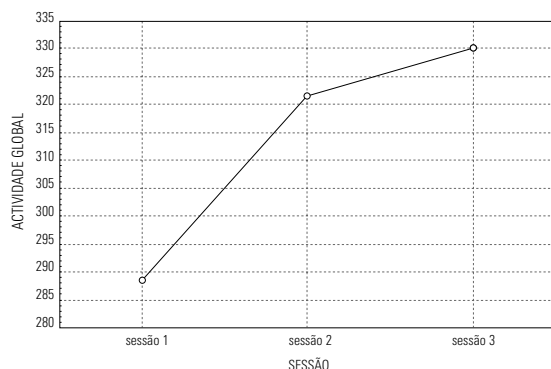


Figura 8 – Atividade global no *open-field* no DPN30, efeito principal para a sessão (1ª sessão vs. 2ª sessão vs. 3ª sessão) ($F(2,156)=1,76$; ns).

Para as categorias comportamentais consideradas foi efectuada a análise de variância que compara grupo (controlo vs. cocaína) x idade (DPN14 vs. DPN21 vs. DPN30) e verificou-se que para a categoria – levantar – há diferenças de idade ($F(2,156)=44,43$, $p<0,000$), aumentando com a idade. Para a categoria – actividade no centro – há diferenças de idade ($F(2,156)=43,47$, $p<0,000$), aumentando com a idade, e interacção entre o efeito de grupo e o de idade ($F(2,156)=5,85$, $p<0,01$).

Para a categoria – actividade na periferia – há diferenças de grupo ($F(1,78)=9,41$, $p<0,01$), há diferenças de idade ($F(2,156)=60,00$, $p<0,000$) e interacção entre o efeito de grupo e o de idade ($F(2,156)=13,39$, $p<0,000$) (a actividade na periferia aumentou com a idade e foi maior no grupo de ratos exposto à cocaína).

Para a categoria – actividade global – há diferenças de grupo ($F(1,78)=5,24$, $p<0,05$), há diferenças de idade ($F(2,156)=63,78$, $p<0,000$) e há interacção entre o efeito de grupo e de idade ($F(2,156)=11,66$, $p<0,000$), a actividade global aumentou com a idade e foi maior no grupo de ratos expostos à cocaína (Figura 9).

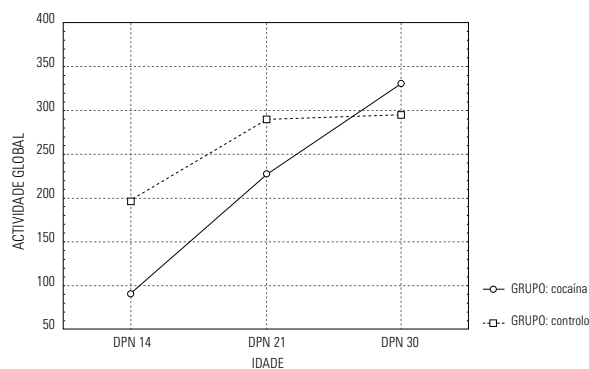


Figura 9 – Atividade global no *open-field*, interacção entre efeito de grupo (controlo vs. cocaína) e de idade (DPN14 vs. DPN21 vs. DPN30) ($F(2,156)=11,66$; $p<0,000$).

Foi utilizada a análise de variância que compara grupo (controlo vs. cocaína) x sexo (fêmea vs. macho) x sessão (1ª sessão vs. 2ª sessão vs. 3ª sessão) para as categorias comportamentais – levantar, idas ao centro e idas à periferia – para cada idade estudada. Verificou-se que, para a categoria – levantar – no DPN30, há interacção entre grupo sexo e sessão ($F(2,152)=5,21$, $p<0,01$); para a categoria – idas ao centro - no DPN30 há interacção entre grupo sexo e sessão ($F(2,152)=3,28$, $p<0,05$); para a categoria – idas à periferia - no DPN14 há interacção entre grupo sexo e sessão ($F(2,152)=4,89$, $p<0,01$). Para a categoria – actividade global – utilizou-se a análise de variância que compara grupo (controlo vs. cocaína) x sexo (fêmea vs. macho) x idade (DPN14 vs. DPN21 vs. DPN30) não havendo quaisquer diferenças significativas.

Para a análise da defecação no *open-field* foi efectuada a média dos valores obtidos nas respectivas sessões das idades DPN21 e DPN30. Na idade DPN14 não defecaram. Os resultados são apresentados no Quadro 6. Da análise efectuada verificou-se não haver diferenças entre os sexos. A análise de variância efectuada, grupo (controlo vs. cocaína) x idade (DPN21 vs. DPN30), demonstrou haver interacção entre grupo e idade ($F(1,28)=15,42$, $p<0,001$) (Figura 10). Os animais do grupo exposto à cocaína no DPN30 defecaram mais.

Quadro 6 – Médias, desvios-padrão e diferenças na defecação no *open-field* para os ratos do grupo controlo e do grupo exposto à cocaína nos DPN21 e DPN30.

Idade	Controlo (n=16)		Cocaína (n=16)	t(30)	p
	M (DP)	M (DP)	M (DP)		
DPN21	2,69 (1,15)	1,78 (1,02)	2,36	<0,05	
DPN30	2,10 (1,45)	3,42 (1,50)	-2,53	<0,05	

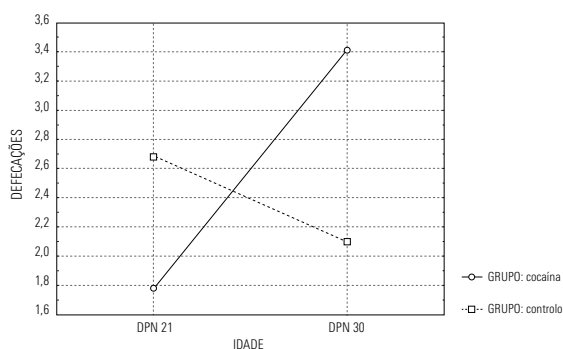


Figura 10 – Defecação no *open-field*, interação entre efeito de grupo (controlo vs. cocaína) e de idade (DPN21 vs. DPN30) ($F(1,28)=15,42$; $p<0,001$)

1.3. Interações sociais

Os comportamentos – postura de ameaça e petrificado – não foram observados em nenhum animal em qualquer dos grupos. O Quadro 7 mostra as médias, os desvios-padrão e as diferenças para cada comportamento registado. A comparação entre as médias foi feita pelo teste U de Mann-Whitney. Verifica-se que os ratos do grupo exposto à cocaína têm mais comportamentos de postura erecta ofensiva, de postura erecta defensiva e de cheirar. Foram efectuadas análises que demonstraram não haver diferenças entre os sexos.

Quadro 7 – Médias, desvios-padrão e diferenças para os comportamentos registados nas interações sociais.

Idade	Controlo (n=8)		Cocaína (n=12)	
	M (DP)	M (DP)	z	p
Boxe	4,88 (3,64)	4,50 (3,50)	-0,16	ns
Luta	23,88 (20,61)	36,83 (13,88)	-1,24	ns
Perseguição	6,00 (4,84)	6,75 (4,18)	-0,43	ns
Fuga	6,88 (4,26)	6,75 (3,98)	-0,12	ns
Ataque	16,25 (11,22)	19,58 (9,96)	-0,81	ns
Postura erecta ofensiva	0,00 (0,00)	0,75 (0,87)	-2,29	<0,05
Grooming agressivo	5,13 (4,09)	7,83 (5,69)	-0,93	ns
Morder	0,63 (0,74)	0,83 (0,72)	-0,67	ns
Pontapear	3,63 (4,50)	5,17 (4,30)	-0,97	ns
Empurrar	8,25 (7,21)	12,42 (5,74)	-1,40	ns
Postura erecta defensiva	1,88 (2,47)	5,67 (3,52)	-2,52	<0,05
Postura erecta de submissão	0,00 (0,00)	0,25 (0,45)	-1,50	ns
Postura de submissão	0,38 (0,52)	0,83 (0,83)	-1,23	ns
Rastejar por baixo	0,88 (1,13)	1,50 (1,31)	-1,12	ns
Cheirar	25,25 (5,20)	33,00 (8,40)	-2,05	<0,05

2. Estudos morfológicos

2.1. Coloração de Nissl

A Figura 11 apresenta a secção mais rostral, a intermédia e a mais caudal da amígdala direita dum animal do grupo controlo. O primeiro corte corresponde ao nível 21 do Atlas de Palkovits e Brownstein (1988) e distam 240 μm entre eles. Não foram encontradas diferenças citoarquitectónicas entre as amígdalas do grupo de animais exposto à cocaína e o grupo controlo.

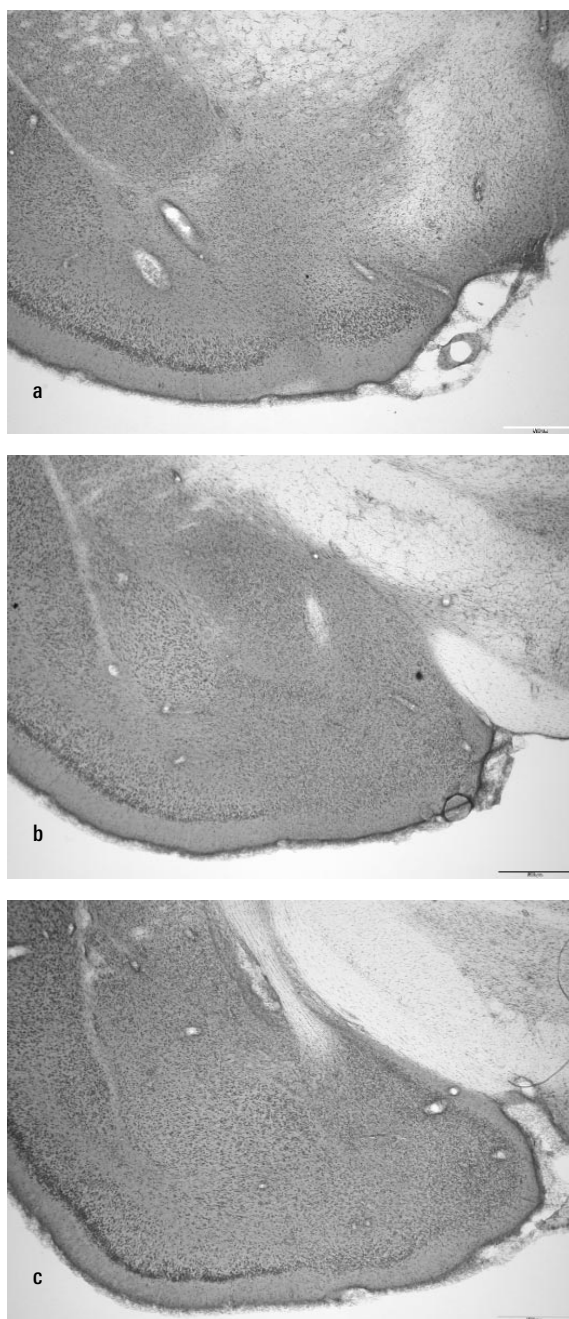


Figura 11 – Fotografias de secções da amígdala direita (obtidas no sentido rostrocaudal) de um animal do grupo controle no DPN30 coradas pelo método de Nissl. A primeira secção corresponde ao nível 21 do Atlas de Palkovits e Brownstein (1988) e distam 240 µm entre si. Barra=500 µm.

2.2. Expressão imunocitoquímica do anticorpo anti-TH

Não foram observadas alterações morfológicas na expressão imunocitoquímica do anticorpo anti-TH a nível dos corpos celulares do núcleo central da amígdala para o grupo de animais expostos a cocaína em relação ao grupo controle. Também a distribuição desta expressão não parece ter sido alterada. Este núcleo foi o único a demonstrar corpos celulares com expressão do anticorpo anti-TH. Também não foram encontradas diferenças na distribuição das fibras nos núcleos central, medial e grupo basilateral de núcleos entre o grupo de animais tratados com cocaína e o grupo controle.

2.3. Expressão imunocitoquímica do anticorpo anti-5-HT

Quanto à análise da densidade de superfície (número de perfis celulares) por mm² de área analisada do grupo de núcleos basilateral da amígdala de ratos com DPN30 não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos exposto à cocaína e controle, bem como relativamente à morfologia e distribuição das células e das fibras. Também não foram encontradas diferenças significativas devidas à lateralidade hemisférica da amígdala. Os machos do grupo de controle apresentaram em média a densidade de superfície de (n=3) 343 células/mm² (erro padrão da média (EPM) de 232), e as fêmeas (n=3) 364 (EPM de 246). Do grupo exposto à cocaína os machos apresentaram em média (n=3) 293 células/mm² (EPM de 16), e as fêmeas (n=3) 152 (EPM de 55). Verifica-se que apenas há diferenças significativas entre os machos e fêmeas expostos à cocaína. As fêmeas apresentaram maior número de células com expressão do anticorpo anti-5-HT (Mann-Whitney, $z = -1,96$, $p = 0,05$). Quanto à análise semiquantitativa da distribuição das fibras com expressão do anticorpo anti-5-HT na amígdala, não se encontraram diferenças entre os grupos. No grupo de animais exposto à cocaína a distribuição de fibras foi classificada mais frequentemente nos níveis 1 e 2 e no grupo controle nos níveis 2 e 3.

3. Determinações Neuroquímicas

A concentração de dopamina (DA) (Quadro 8) foi significativamente inferior no DPN30 no grupo de animais exposto à cocaína ($F(1,23)=13,79$, $p<0,01$) e houve interação entre grupo, sexo e lado ($F(1,23)=7,85$, $p<0,05$) (Figura 12).

Quadro 8 – Concentrações de DA e DOPAC, e *turnover* da DA na amígdala de ratos com DPN30 expostos à cocaína e respectivos controlos. Valores representam médias (DP) expressas em ng/100 mg peso de tecido húmido.

Grupo	Género	Lado	DA	DOPAC	<i>turnover</i> DA
Controlo	Macho	Direito	45,92 (5,08) (n=5)	24,41 (2,10) (n=5)	0,54 (0,08) (n=5)
		Esquerdo	51,17 (3,84) (n=5)	25,03 (5,41) (n=5)	0,49 (0,08) (n=5)
	Fêmea	Direito	48,29 (5,00) (n=5)	24,38 (2,13) (n=5)	0,51 (0,09) (n=5)
		Esquerdo	46,98 (4,68) (n=5)	23,85 (3,03) (n=5)	0,51 (0,08) (n=5)
Cocaína	Macho	Direito	41,06 (2,50) (n=8)	25,51 (6,82) (n=8)	0,62 (0,18) (n=8)
		Esquerdo	40,83 (4,40) (n=8)	24,48 (8,52) (n=7)	0,59 (0,18) (n=7)
	Fêmea	Direito	37,25 (7,30) (n=10)	24,73 (6,58) (n=10)	0,67 (0,13) (n=10)
		Esquerdo	41,31 (7,84) (n=10)	25,72 (4,90) (n=10)	0,65 (0,19) (n=10)

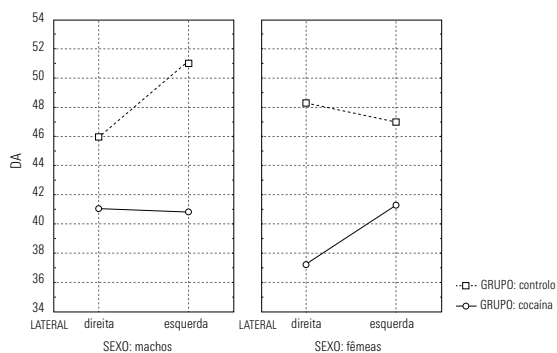


Figura 12 – Doseamento neuroquímico da DA na amígdala do rato dos grupos controlo e exposto à cocaína, interação entre grupo, sexo e lado ($F(1,23)=7,85$; $p<0,05$).

O teste de *Scheffé* revelou para a DA haver diferença significativa para a lateralidade hemisférica da amígdala em que a esquerda apresentou maior concentração ($p<0,05$). Não foram encontradas diferenças para a concentração de DOPAC. A taxa de *turnover* da DA foi significativamente superior no grupo de animais exposto à cocaína ($F(1,22)=5,02$, $p<0,05$) (Figura 13). Não foram encontradas diferenças no conteúdo catecolaminérgico devidas à lateralidade hemisférica da amígdala relativamente à concentração de DOPAC ou ao *turnover* da DA.

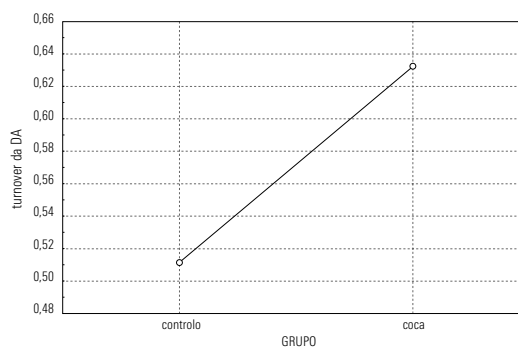


Figura 13 – *Turnover* da DA na amígdala do rato dos grupos controlo e exposto à cocaína, efeito principal para o grupo ($F(1,22)=5,02$; $p<0,05$).

Não foram demonstradas diferenças significativas relativamente às concentrações de 5-HT, HIAA ou ao *turnover* da 5-HT entre o grupo de ratos expostos à cocaína e o grupo controlo. Também não foram encontradas diferenças no conteúdo serotoninérgico devidas à lateralidade hemisférica da amígdala ou ao sexo do animal.

DISCUSSÃO

A cocaína é uma droga de abuso usada frequentemente pelas mulheres em idade fértil decorrendo deste consumo grande número de crianças expostas durante a gestação

àquela droga. A cocaína, como a maioria das drogas, atravessa a placenta entrando em contacto com os tecidos fetais incluindo o cérebro (Gingras *et al.*, 1992; Spear *et al.*, 1989; Volpe, 1992). Vários estudos clínicos têm atribuído consequências adversas ao uso de cocaína/múltiplas drogas durante a gravidez (e.g. Chasnoff *et al.*, 1987; Oro e Dixon, 1987; Zuckerman *et al.*, 1989). A investigação tem sugerido que as crianças expostas à cocaína durante a gestação apresentam alterações do comportamento neonatal como deficiente estado organizativo, anomalias nos padrões de sono, défices alimentares (Chasnoff *et al.*, 1985, 1987; Neuspiel e Hamel, 1991; Oro e Dixon, 1987), identificados quer aos três meses (Mayes *et al.*, 1995) quer mais tardiamente, no início da idade escolar (Delaney-Black *et al.*, 1998). No entanto, não foi ainda possível estabelecer um efeito causal pois as conclusões destes estudos são confundidas por vários factores que incluem má nutrição, abuso de várias drogas, doenças sexualmente transmissíveis, cuidados pré-natais deficientes, e o uso materno de outras substâncias entre as quais são frequentes o tabaco e o álcool (Neuspiel e Hamel, 1991).

Os modelos animais em neurotoxicologia

Desde há mais de uma década que têm vindo a ser publicados, com frequência crescente, resultados que demonstram os efeitos deletérios da cocaína no desenvolvimento do SNC. Estes trabalhos, de índole experimental, surgiram na sequência de descrições de situações clínicas no Homem tendo os modelos animais sido desenvolvidos na tentativa de discriminar os efeitos da cocaína dos de outros factores sistematicamente associados ao consumo de drogas de uso ilícito no Homem. Muitos dos problemas metodológicos relacionados com os estudos clínicos da toxicologia do desenvolvimento das drogas de abuso não se verificam nos estudos em animais. O papel dos modelos animais é relevante na problemática da toxicod dependência, designadamente na avaliação dos efeitos de consumo nas fases mais vulneráveis do desenvolvimento. Estes estudos permitem ultrapassar a confusão de conceitos em particular os que confrontam moralidade com ciência na área das toxicod dependências permitindo a discriminação dos efeitos das

drogas *per se* dos relacionados com outros factores associados (Coles, 1993). A escolha do modelo animal implica que consideremos os custos, a informação já existente sobre a espécie e o estadio de maturidade na altura do nascimento. Na altura do nascimento o cérebro do rato (um dos animais mais utilizado como modelo da exposição a drogas durante a gestação) encontra-se numa fase de desenvolvimento que corresponde grosseiramente ao cérebro humano na 19ª semana de gestação (Bayer *et al.*, 1993). Portanto, a administração de cocaína ao rato no período pós-natal constitui um modelo da exposição humana à cocaína correspondente à última metade da gravidez. Outro aspecto importante a considerar é o método de administração da droga. Idealmente deveria ser usada a mesma via de exposição que se verifica no Homem. A administração de cocaína por via subcutânea ao rato tem sido associada a absorção rápida e completa (Misra, 1976) e os níveis máximos são atingidos 2 horas após a administração crónica diária (Nayak *et al.*, 1976). A dose da droga deve ser aquela que produz níveis no cérebro ou plasma fetais semelhantes entre o animal de experiência e o homem (Kutscher e Nelson, 1985), o que nos roedores é normalmente conseguido com a administração de doses superiores às do homem dadas as diferenças farmacocinéticas entre as espécies (Rees *et al.*, 1990). A frequência da administração de cocaína é particularmente importante dado que sendo uma droga estimulante pode induzir compensações fisiológicas diferentes (sensibilização ou tolerância) dependendo do tipo de exposição (episódica ou contínua) (para revisão ver Post, 1980). Outros aspectos metodológicos importantes nos estudos de toxicologia do desenvolvimento em animais são a determinação do tamanho da amostra (usando a ninhada como unidade de análise), o controlo de deficiente nutrição induzida pela droga, o controlo de alterações no comportamento materno induzidas pela droga (questão que não se coloca no presente estudo dado o uso de um modelo de exposição pós-natal à cocaína) e a escolha das variáveis dependentes que pode consistir em testes comportamentais mais dirigidos havendo informação prévia sobre a neurotoxicologia comportamental da droga ou se o seu mecanismo de acção for conhecido no adulto, como é o caso da cocaína (Spear, 1997; Spear *et al.*, 1989).

Amígdala e cocaína – a expressão comportamental

O TNF tem sido usado experimentalmente para estudar a depressão (e.g. Weiss *et al.*, 1998). Quando os roedores são expostos ao TNF tipicamente assumem uma postura imóvel, que é atribuída a um estado de desespero comportamental, considerando que os animais perderam a esperança de escapar (Porsolt *et al.*, 1978). Neste trabalho os ratos foram submetidos ao TNF após exposição crónica diária de cocaína desde o DPN1. Assim, os resultados reflectem o efeito da exposição crónica à cocaína durante o período final do desenvolvimento do rato. Os ratos do grupo exposto à cocaína passaram menos tempo em natação rápida e lenta logo na 1ª sessão relativamente ao grupo controlo, sugerindo menor persistência em procurar uma saída. Na 2ª sessão, os ratos do grupo exposto à cocaína além de passarem menos tempo em natação rápida e lenta, passaram mais tempo a boiar o que sugere poderem ter menor esperança de escapar que os do grupo controlo. Os estudos sobre os efeitos da exposição à cocaína durante o desenvolvimento do rato são controversos. Overstreet *et al.* (2000) também encontraram aumento da imobilidade, mas em ratos expostos à cocaína durante o período pré-natal. No entanto, outros estudos obtiveram diminuição da imobilidade como resultado da exposição pré-natal à cocaína (Bilitzke e Church, 1992; Molina *et al.*, 1994). Esta diferença de resultados pode estar relacionada com a dose de cocaína administrada, a duração da administração, o período do desenvolvimento em que é administrada, e as diferenças metodológicas no procedimento experimental. De acordo com Cabib *et al.* (1995), o procedimento metodológico usado no TNF pode ser um determinante fundamental na obtenção de diferentes resultados. A 1ª sessão serviu fundamentalmente para avaliar o comportamento dos ratos expostos no período pós-natal precoce à cocaína face a uma situação nova e provocadora de *stress*. Enquanto que a 2ª sessão serviu para avaliar a estabilidade desses comportamentos bem como a influência da memória e aprendizagem nessa mesma expressão comportamental. Segundo a hipótese de Porsolt *et al.* (1977) a diminuição da actividade na segunda sessão do teste de natação deve-se ao facto de os ratos saberem da experiência prévia que não podiam escapar, e esta situação levar a um estado de desespero. No presente estudo houve uma interacção entre

grupo e sessão para os comportamentos de natação rápida e braçadas. A duração do comportamento de natação rápida diminuiu de maneira diferente nos dois grupos entre as duas sessões: o grupo controlo teve maior diminuição do que o grupo de animais expostos à cocaína. Este facto sugere que o comportamento dos ratos expostos à cocaína não teve grande variação entre as sessões porque na 1ª sessão já estariam num estado “pré-depressivo” e reagiram de forma menos activa. O tempo dispendido no comportamento de braçadas foi significativamente maior na 1ª sessão relativamente à 2ª mas, embora não se tenha verificado efeito principal para o grupo, houve uma interacção entre grupo e sessão. O comportamento de braçadas está relacionado com a primeira reacção a uma situação nova e geradora de *stress* em que os ratos estão muito activos e a tentar encontrar uma saída.

Neste trabalho o teste de *open-field* permitiu avaliar os índices de descarga motora e de equilíbrio autonómico (Royce, 1977). O primeiro pode ser inferido pela actividade locomotora e pela penetração ao centro. O segundo pode ser inferido pela defecação. Dado que foram testados os mesmos ratos em diversas idades, e para cada idade em várias sessões, também nos permite medir a habituação e aprendizagem em resposta ao ambiente do teste (Walsh e Cummins, 1976). Por outro lado, o comportamento de levantar em reacção a um ambiente novo é considerado reflectir não só a actividade exploradora mas também o estado emocional do rato (Gironi-Carnevale *et al.*, 1990; Sadile, 1996).

Na primeira sessão do DPN14 não houve diferenças significativas entre os animais expostos à cocaína e os controlos. Apenas na primeira sessão do DPN30 se verifica que os ratos do grupo exposto à cocaína se levantaram menos, o que pode sugerir o efeito depressor da administração crónica de cocaína neste período de desenvolvimento do rato na reacção face a um ambiente estranho. Por outro lado, quer no DPN14 (nas 3 sessões) quer no DPN21 (apenas na 1ª sessão) os ratos do grupo exposto à cocaína tiveram maior actividade na periferia e global, denotando que os efeitos de estimulação motora provocados pela cocaína só se verificaram até aos 21 dias de vida, repetindo os resultados de estudos anteriores (Spear e Brick, 1979). No DPN30 não existem diferenças significativas entre os grupos exposto à cocaína e controlo para a actividade na periferia e global mas nota-se um padrão inverso ao que se verificou nas idades anteriores. Estes dados corroboram os

resultados obtidos para a actividade de levantar e no centro nesta idade em que os ratos do grupo exposto à cocaína têm pontuações significativamente menores.

A análise da defecação no *open-field* mostrou que o grupo de ratos exposto à cocaína no período pós-natal precoce é distinto do grupo controlo. No DPN21 aqueles defecaram menos e no DPN30 mais. Estes resultados, juntamente com os dados da actividade no *open-field* sugerem que os ratos expostos durante o período pós-natal precoce à cocaína aproximam-se do conceito proposto por alguns autores de “ratos emocionais” no DPN30, pois apresentam pouca actividade motora e elevados níveis de defecação (Walsh e Cummins, 1976; Royce, 1977).

Para avaliar as interacções sociais neste estudo foi observado o comportamento de ratos da mesma ninhada em interacção no DPN29 após várias sessões prévias em que os mesmos ratos já tinham sido colocados no mesmo ambiente, o que lhes permitiu habituação às condições do teste. Johns *et al.* (1998) e Wood e Spear (1998), ao estudarem ratos com exposição pré-natal à cocaína, verificaram que os animais jovens se tornaram mais agressivos quer nas interacções sociais quer na competição para o consumo de água, enquanto que outros constataram alteração no comportamento precoce de brincadeira com maior submissão e menor probabilidade de solicitar brincadeira do que outros animais (Wood *et al.*, 1994, 1995). No presente estudo os animais do grupo exposto à cocaína apresentaram mais comportamentos de postura erecta ofensiva, postura erecta defensiva e de cheirar. O comportamento de postura erecta ofensiva é claramente uma manifestação de agressividade, pelo que este resultado vai de encontro aos achados de Johns *et al.* (1998) e Wood e Spear (1998), que encontraram ratos mais agressivos quando expostos à cocaína durante o desenvolvimento, embora num período diferente. O comportamento de cheirar induzido pela cocaína parece estar relacionado com a defesa, o que juntamente com o aumento do comportamento de postura erecta defensiva encontrado neste trabalho é apoiado pelos resultados de outros estudos que demonstram o aumento dos comportamentos defensivos após exposição à cocaína (Blanchard *et al.*, 2000; Ujike *et al.*, 1996; White *et al.*, 1998).

Amígdala e cocaína – a expressão morfológica

Não temos conhecimento da existência de estudos prévios da organização citológica da amígdala no desenvolvimento do rato exposto à cocaína. Contudo, foram encontradas alterações morfológicas noutras zonas do SNC no mesmo modelo de exposição pós-natal à cocaína no DPN30 (Silva-Araújo *et al.*, 1991a, b, 1993; Silva-Araújo e Tavares, 1995). Porém, na observação das secções coradas pelo método de Nissl não foram encontradas diferenças citoarquitectónicas na amígdala entre o grupo de animais exposto à cocaína e o grupo controlo.

Não foram encontradas diferenças significativas na expressão imunocitoquímica do anticorpo anti-TH na amígdala relativamente à morfologia e distribuição dos corpos celulares e das fibras. Vários estudos referem que a exposição à cocaína durante o desenvolvimento pode ter consequências transitórias ou definitivas sobre várias áreas do SNC dos roedores (Gingras *et al.*, 1992; Spear e Heyser, 1992; Tavares e Silva, 1996; Tavares *et al.*, 1996). Summavielle *et al.* (2000), no mesmo modelo animal de exposição pós-natal à cocaína, verificaram não existirem alterações significativas na morfologia ou distribuição das células com expressão imunocitoquímica do anti-corpo anti-TH na retina do Rato, no DPN30.

Também não foram encontradas diferenças significativas na expressão imunocitoquímica do anticorpo anti-5-HT na amígdala relativamente à morfologia e distribuição dos corpos celulares e das fibras, nem relativamente ao número de células do grupo basilateral. As fêmeas do grupo exposto à cocaína apresentaram maior número de células com expressão do anticorpo anti-5-HT relativamente aos machos. Frick e Dow-Edwards (1995) encontraram maior sensibilidade das fêmeas em relação aos efeitos da cocaína com aumento do metabolismo em várias estruturas cerebrais, incluindo a amígdala e nomeadamente a amígdala basilateral.

Amígdala e cocaína – a expressão neuroquímica

Ao sistema dopaminérgico mesolímbico é atribuído o papel principal na capacidade de a cocaína proporcionar reforço e recompensa (Weed *et al.*, 1993; Woolverton e Johnson, 1992). Sabe-se que a capacidade de reforço da cocaína

depende do da actividade do núcleo accumbens (Hurd *et al.*, 1989; Wise *et al.*, 1995), enquanto que a amígdala parece ter papel importante na associação de estímulos condicionados ao consumo de cocaína (Weiss *et al.*, 2000). Sendo assim é de esperar um efeito da administração crónica de cocaína sobre o sistema dopaminérgico que projecta para a amígdala. Neste estudo verificou-se que a administração crónica de cocaína a ratos no período neonatal induziu diminuição da DA na amígdala no DPN30. Além deste efeito ainda se verificou aumento do *turnover* da DA na mesma estrutura. A cocaína liga-se aos transportadores pré-sinápticos inibindo a recaptação da DA, 5-HT e noradrenalina, prolongando a neurotransmissão monoaminérgica (Cregler e Mark, 1986; Nunes e Rosecan, 1987; Johanson e Fischman, 1989; Volpe, 1992). Tem sido postulado que, quer a DA quer a 5-HT actuam como factores morfogenéticos durante o desenvolvimento do cérebro dos mamíferos (Chubakov *et al.*, 1986; Whitaker-Azmitia, 1991; Whitaker-Azmitia *et al.*, 1987; para rever ver Lauder, 1988), e a administração de cocaína por via subcutânea inibe a mitose até ao DPN11 (Anderson-Brown *et al.*, 1990). Deste modo, os resultados deste estudo reflectem os efeitos da administração de cocaína quer sobre o desenvolvimento dos neurónios da amígdala, quer possíveis efeitos de dessensibilização no sistema dopaminérgico e o aumento do *turnover* reflecte uma resposta à diminuição da DA.

Baumann *et al.* (1993) verificaram que o efeito da administração aguda de 15mg/Kg de cocaína a ratos adultos inibiu a síntese de DA na amígdala basilar, mas a administração crónica bi-diária de cocaína durante uma semana não alterou os níveis basais de síntese de DA, sugerindo uma dessensibilização dos mecanismos que medeiam a supressão da síntese desta monoamina induzida pela cocaína. Wilson *et al.* (1994) não encontraram alteração dos níveis de DA na amígdala ou alteração na concentração do transportador da DA após quatro semanas de administração diária, durante 1 hora, de cocaína ao rato adulto, mas a dose de cocaína foi menor que a usada no presente estudo.

O presente estudo não permitiu demonstrar alterações significativas nos níveis de 5-HT ou no *turnover* da 5-HT na amígdala no DPN30 após exposição à cocaína desde o DPN1, tendo apenas demonstrado alterações no sistema dopaminérgico. Frick e Dow-Edwards (1995) administrando a ratos

uma dose diária superior de cocaína (25 mg/Kg), entre o DPN11 e o DPN21, verificaram que a inibição da recaptação da DA contribui de forma mais significativa para os efeitos metabólicos da cocaína do que a inibição da recaptação da 5-HT. Baumann *et al.* (1993) também não encontraram alteração dos níveis basais de síntese de 5-HT na amígdala após exposição crónica bi-diária de cocaína, embora tenham usado ratos adultos e a exposição tenha apenas durado uma semana. Wilson *et al.* (1994), embora com administração de dose menor de cocaína, ao fim de 4 semanas de administração diária durante uma hora a ratos adultos, também não encontraram alteração dos níveis de 5-HT na amígdala.

EM CONCLUSÃO

O presente estudo mostra que a exposição crónica à cocaína no período pós-natal precoce leva à diminuição da DA na amígdala no DPN30 e que, ao longo deste período, se verifica alteração do comportamento dos ratos de tal modo que, até aos 21 dias de vida estes apresentam maior actividade, menor defecação e depois invertem este padrão. Foi também verificado que no TNF passam mais tempo imóveis e em interacções sociais têm mais comportamentos de cheirar e de posições erectas ofensiva e defensiva. É de realçar que as crianças expostas no período pré-natal à cocaína apresentam, aos 3 meses, menor reactividade à novidade, o que sugere deficiências na regulação da atenção e da activação (Mayes *et al.*, 1995). Tem sido, do mesmo modo, atribuído papel importante à amígdala nestas funções (Holland e Gallagher, 1999) tendo sido demonstrado por Eylar *et al.* (1998) relação negativa entre a quantidade de cocaína consumida no 3º trimestre de gravidez com orientação, atenção e resposta de alerta nos recém-nascidos. Dado que o período pós-natal precoce do rato corresponde grosseiramente ao último trimestre de gestação do homem (Bayer *et al.*, 1993), os resultados deste trabalho apoiam a hipótese de que as alterações do comportamento que têm sido encontradas nos filhos de mães que consumiram cocaína durante a gravidez, como a deficiente regulação da atenção e da activação, desenvolvimento anormal de vinculações sociais e estado organizativo deficitário poderão estar relacionadas com redução do componente dopaminérgico na amígdala.

Tal como sugerido por Koob e Bloom (1998) e assinalado por Tavares *et al.* (2002) ainda se mantém actual o desafio à comunidade científica: caracterizar a sequência biológica que explique os mecanismos moleculares subjacentes aos achados comportamentais, celulares e neuroquímicos que produzem alterações profundas e permanentes na cognição, motivação e comportamento, consequentes ao consumo de drogas ilícitas em qualquer fase da vida do Homem.

Agradecimentos

Este trabalho traduz a concretização de grande número de investigações que foram levadas a cabo com colaborações desenvolvidas com vários investigadores, clínicos e docentes de instituições nacionais e estrangeiras, em diferentes fases do tempo e dos métodos, a quem prestamos os nossos agradecimentos. Para a realização deste trabalho, foi prestiosa a colaboração de vários elementos da Unidade de Neurocomportamento do IBMC em particular os Doutores Pedro Monteiro e Joana Gomes da Silva, e os Mestres Pedro Melo e Lorena Rodrigues. Às técnicas de laboratório, D. Manuela Pacheco e D. Ana Carolina agradecemos o apoio na preparação do material para estudo morfológico.

Estes trabalhos foram subsidiados por Projectos concedidos pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), designadamente PSAU/C/SAU/8/96, PBI/14239/98, PRAXIS/P/SAU/12287/98.

CONTACTO

Professora Doutora Maria Amélia Tavares
 Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina do Porto
 Alameda Hernâni Monteiro
 4200-319 Porto
 Telefone: 225 096 808
 Fax: 225 505 640
 E-mail: anatclin@med.up.pt

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alheid, G. F., de Olmos, J. e Beltramino, C. A. (1995). "Amygdala and extended amygdala", in G. Paxinos (ed.), *The Rat Nervous System*, pp. 495-579. California: Academic Press.
- Ali, S. F., David, S. N. e Newport, G. D. (1993). "Age-related susceptibility to MPTP-induced neurotoxicity in mice". *Neurotoxicology*, 14: 29-34.
- Amaral, D. G., Price, J. L., Pitkänen, A. e Carmichael, S. T. (1992). "Anatomical organization of the primate amygdaloid complex", in J. P. Aggleton (Ed.), *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory, and Mental Dysfunction*, pp. 1-66. New York: Wiley-Liss.
- Anderson-Brown, T., Slotkin, T. A. e Seidler, F. J. (1990). "Cocaine acutely inhibits DNA synthesis in developing rat brain regions: evidence for direct actions". *Brain Res*, 537: 197-202.
- Baker, D. A., Fuchs, R. A., Tran-Nguyen, L. T., Palmer, A. J., Marshall, J. F., McPherson, R. J. e Neisewander, J. L. (1999). "Cocaine-seeking behavior and Fos expression in the amygdala produced by cocaine or a cocaine self-administration environment". *Ann N Y Acad Sci*, 877: 796-799.
- Balsa, C., Farinha, T., Nunes, J. P. e Chaves, M. (2001). *Inquérito nacional ao consumo de substâncias psico-ativas na população portuguesa*. CEOS. Lisboa: Fac. de Ciências Sociais e Humanas, Universidade Nova de Lisboa.
- Baumann, M. H., Raley, T. J., Partilla, J. S. e Rothman, R. B. (1993). "Biosynthesis of dopamine and serotonin in the rat brain after repeated cocaine injections: a microdissection mapping study". *Synapse*, 14: 40-50.
- Bayer, S. A., Altman, J., Russo, R. J. e Zhang, X. (1993). "Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat". *Neurotoxicology*, 14: 83-144.
- Bilitzke, P. J. e Church, M. W. (1992). "Prenatal cocaine and alcohol exposure affect rat behavior in a stress test (the Porsolt swim test)". *Neurotoxicol Teratol*, 14: 359-364.
- Blanchard, D. C. e Blanchard, R. J. (1999). "Cocaine potentiates defensive behaviors related to fear and anxiety". *Neurosci Biobehav Rev*, 23: 981-991.
- Blanchard, R. J., Hebert, M. A., Dulloog L., Kaawaloa N., Nishimura O. e Blanchard D. C. (1998). "Acute cocaine effects on stereotypy and defense: an ethoexperimental approach". *Neurosci Biobehav Rev*, 23: 179-188.
- Blanchard, R. J., Hebert, M., Dulloog, L., Markham, C., Figueira, R., Nishimura, O., Newsham, K., Kaawaloa, J. N., e Blanchard, D. C. (2000). "Cocaine-induced sniffing stereotypy changes in response to threat". *Pharmacol Biochem Behav*, 66: 249-256.

- Brown, E. E. e Fibiger, H. C. (1993). "Differential effects of excitotoxic lesions of the amygdala on cocaine-induced conditioned locomotion and conditioned place preference". *J Neurosci*, 113: 123-130.
- Brown, E. E., Robertson, G. S. e Fibiger, H. C. (1992). "Evidence for conditional neuronal activation following exposure to a cocaine-paired environment: role of forebrain limbic structures". *J Neurosci*, 12: 4112-4121.
- Burns, L. H., Robbins, T. W. e Everitt, B. J. (1993). "Differential effects of excitotoxic lesions of the basolateral amygdala, ventral subiculum and medial prefrontal cortex on responding with conditioned reinforcement and locomotor activity potentiated by intra-accumbens infusions of D-amphetamine". *Behav Brain Res*, 55: 167-183.
- Cabib, S., Zocchi, A. e Puglisi-Allegra, S. (1995). "A comparison of the behavioral effects of minaprine, amphetamine and stress". *Psychopharmacology (Berl)*, 121: 73-80.
- Cador, M., Robbins, T. W. e Everitt, B. J. (1989). "Involvement of the amygdala in stimulus-reward associations: interaction with the ventral striatum". *Neuroscience*, 30: 77-86.
- Chasnoff, I. J., Burns, K. A. e Burns, W. J. (1987). "Cocaine use in pregnancy: perinatal morbidity and mortality". *Neurotoxicol Teratol*, 9: 291-293.
- Chasnoff, I. J., Burns, W. J., Schnoll, S. H. e Burns, K. A. (1985). "Cocaine use in pregnancy". *N Engl J Med*, 313: 666-669.
- Childress, A. R., Mozley, P. D., Mozley, P. D., McElgin, W., Fitzgerald, J., Reivich, M. e O'Brien, C. P. (1999). "Limbic activation during cue-induced cocaine craving". *Am J Psychiatry*, 156: 11-18.
- Chubakov, A. R., Gromova, E. A., Konovalov, G. V., Sarkisova, E. F. e Chumasov, E. I. (1986). "The effects of serotonin on the morpho-functional development of rat cerebral neocortex in tissue culture". *Brain Res*, 369: 285-297.
- Coles, C. D. (1993). "Saying "goodbye" to the "crack baby"". *Neurotoxicol Teratol*, 15: 290-292.
- Costall, B., Naylor, R. J. e Tyers, M. B. (1990). "The psychopharmacology of 5-HT₃ receptors". *Pharmacol Ther*, 47: 181-202.
- Cregler, L. L. e Mark, H. (1986). "Medical complications of cocaine abuse". *N Engl J Med*, 315: 1495-1500.
- Cunningham, K. A., Paris, J. M. e Goeders, N. E. (1992). "Chronic cocaine enhances serotonin autoregulation and serotonin uptake binding". *Synapse*, 11: 112-123.
- Day, H. E., Badiani, A., Uslander, J. M., Oates, M. M., Vitzo, N. M., Robinson, T. E., Watson Jr., S. J. e Akil, H. (2001). "Environmental novelty differentially affects c-fos mRNA expression induced by amphetamine or cocaine in subregions of the bed nucleus of the stria terminalis and amygdala". *J Neurosci*, 21: 732-740.
- Delaney-Black, V., Covington, C., Templin, T., Ager, J., Martier, S. e Sokol, R. (1998). "Prenatal cocaine exposure and child behavior". *Pediatrics*, 102: 945-950.
- De Olmos, J., Alheid, G. F. e Beltramino, C. A. (1985). "Amygdala". in G. Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System*, pp. 317-223. Australia: Academic Press.
- Dixon, S. D., Coen, R. W. e Crutchfield, S. (1987). "Visual dysfunction in cocaine exposed infants". *Pediatr Res*, 21: 359A.
- Doberczak, T. M., Shanzer, S. e Kandall, S. R. (1987). "Neonatal effects of cocaine abuse in pregnancy". *Pediatr Res*, 21: 359A.
- Dow-Edwards, D. L. (1991). "Cocaine effects on fetal development: a comparison of clinical and animal research findings". *Neurotoxicol Teratol*, 13: 347-352.
- Ehrman, R. N., Robbins, S. J., Childress, A. R., e O'Brien, C. P. (1992). "Conditioned responses to cocaine-related stimuli in cocaine abuse patients". *Psychopharmacology*, 107: 523-529.
- Ettenberg, A., Pettit, H. O., Bloom, F. E. e Koob, G. F. (1982). "Heroin and cocaine intravenous self-administration in rats: mediation by separate neural systems". *Psychopharmacology*, 78: 204-209.
- Everitt, B. J., Cador, M. e Robbins, T. W. (1989). "Interactions between the amygdala and ventral striatum in stimulus-reward associations: studies using a second-order schedule of sexual reinforcement". *Neuroscience*, 30: 63-75.
- Eyler, F. D., Behnke, M., Conlon, M., Woods, N. S. e Wobie, K. (1998). "Birth outcome from a prospective, matched study of prenatal crack/cocaine use: II. Interactive and dose effects on neurobehavioral assessment". *Pediatrics*, 101: 237-241.
- Frick, G. S. e Dow-Edwards, D. L. (1995). "The effects of cocaine on cerebral metabolic function in perinatal rats: the roles of serotonergic and dopaminergic uptake blockade". *Brain Res Dev Brain Res*, 88: 158-170.
- Gaffan, D., Murray, E. A. e Fabre-Thorpe, M. (1993). "Interaction of the amygdala with the frontal lobe in reward memory". *Eur J Neurosci*, 5: 968-975.
- Gingras, J. L., Weese-Mayer, D. E., Hume, R. F., Jr. e O'Donnell, K. J. (1992). "Cocaine and development: mechanisms of fetal toxicity and neonatal consequences of prenatal cocaine exposure". *Early Hum Dev*, 31: 1-24.

- Gironi Carnevale, U. A., Vitullo, E. e Sadile, A. G. (1990). "Post-trial NMDA receptor allosteric blockade differentially influences habituation of behavioral responses to novelty in the rat". *Behav Brain Res*, 39: 187-195.
- Grant, S., London, E. D., Newlin, D. B., Villemagne, V. L., Liu, X., Contoreggi, C., Phillips, R. L., Kimes, A. S. e Margolin, A. (1996). "Activation of memory circuits during cue-elicited cocaine craving". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 12040-12045.
- Hammer, R. P., Jr. e Cooke, E. S. (1994). "Gradual tolerance of metabolic activity is produced in mesolimbic regions by chronic cocaine treatment, while subsequent cocaine challenge activates extrapyramidal regions of rat brain". *J Neurosci*, 14: 4289-4298.
- Herbert, M. A., Blanchard, D. C. e Blanchard, R. J. (1999). "Intravenous cocaine precipitates panic-like flight responses and lasting hyperdefensiveness in laboratory rats". *Pharmacol Biochem Behav*, 63: 349-360.
- Higgins, G. A., Jones, B. J., Oakley, N. R. e Tyers, M. B. (1991). "Evidence that the amygdala is involved in the disinhibitory effects of 5-HT₃ receptor antagonists". *Psychopharmacology*, 104: 545-551.
- Holland, P. C. e Gallagher, M. (1999). "Amygdala circuitry in attentional and representational processes". *Trends Cogn Sci*, 3: 65-73.
- Hurd, Y. L. (1996). "Differential messenger RNA expression of prodynorphin and proenkephalin in the human brain". *Neuroscience*, 72: 767-783.
- Hurd, Y. L., Weiss, F., Koob, G. F., And, N. E. e Ungerstedt, U. (1989). "Cocaine reinforcement and extracellular dopamine overflow in rat nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study". *Brain Res*, 498: 199-203.
- Hutchings, D. E. (1993). "The puzzle of cocaine's effects following maternal use during pregnancy: are there reconcilable differences?" *Neurotoxicol Teratol*, 15: 281-286.
- Itzhak, Y. (1993). "Differential regulation of brain opioid receptors following repeated cocaine administration to guinea pigs". *Drug Alcohol Depend*, 33: 53-9.
- Jaffe, J. H. (1990). "Drug addiction and drug abuse", in A. G. Gilman, T. W. Rall, A. S. Nies e P. Taylor (eds.), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th edn., pp.522-573. New York: Pergamon Press.
- Johanson, C. E. e Fischman, M. W. (1989). "The pharmacology of cocaine related to its abuse". *Pharmacol Rev*, 41: 3-52.
- Johns, J. M., Noonan, L. R., Zimmerman, L. I., McMillen, B. A., Means, L. W., Walker, C. H., Lubin, D. A., Meter, K. E., Nelson, C. J., Pedersen, C. A., Mason, G. A. e Lauder, J. M. (1998). "Chronic cocaine treatment alters social/aggressive behavior in Sprague-Dawley rat dams and in their prenatally exposed offspring". *Ann N Y Acad Sci*, 846: 399-404.
- Koob, G. F. e Bloom, F. E. (1998). "Cellular and molecular mechanisms of drug dependence". *Science* 242: 715-723.
- Kutscher, C. L. e Nelson, B. K. (1985). "Dosing considerations in behavioral teratology testing". *Neurobehav Toxicol Teratol*, 7: 663-664.
- Lauder, J. M. (1988). "Neurotransmitters as morphogens". *Prog Brain Res*, 73: 365-387.
- LeDoux, J. (2000). "The amygdala and emotion: A view through fear", in J. P. Aggleton (Ed.), *The Amygdala. A Functional Analysis*, 2nd ed., pp. 289-310. New York: Oxford University Press.
- London, E. D., Cascella, N. G., Wong, D. F., Phillips, R. L., Dannals, R. F., Links, J. M., Herning, R., Grayson, R., Jaffe, J. H. e Wagner, H. N., Jr. (1990). "Cocaine-induced reduction of glucose utilization in human brain. A study using positron emission tomography and [fluorine 18]-fluoro-deoxyglucose". *Arch Gen Psychiatry*, 47: 567-574.
- Magalhães, A., Summavielle, T., Tavares, M. A. e de Sousa, L. (2001a). "Open-field activity along the development of rats postnatally exposed to cocaine". Livro de resumos do *8th Meeting of the International Neurotoxicology Association*. 120.
- Magalhães, A., Castro-Vale, I., Tavares, M. A. e de Sousa, L. (2001b). "The effects of postnatal cocaine exposure in the performance of rats in a forced swim test". Livro de resumos do *8th Meeting of the International Neurotoxicology Association*. 121.
- Magalhães, A., Tavares, M. A., de Sousa, L. (2002). "Postnatal cocaine exposure: effects on behavior of rats in forced swim test". *Ann.N. Y. Acad. Sci.*, 965: 529-534.
- Mash, D. C. e Staley, J. K. (1999). "D₃ dopamine and kappa opioid receptor alterations in human brain of cocaine-overdose victims". *Ann N Y Acad Sci*, 877: 507-522.
- Mayes, L. C., Bornstein, M. H., Chawarska, K. e Granger, R. H. (1995). "Information processing and developmental assessments in 3-month-old infants exposed prenatally to cocaine". *Pediatrics*, 95: 539-545.
- McDonald, A. J. (1998). "Cortical pathways to the mammalian amygdala". *Prog Neurobiol*, 55: 257-332.
- Mello, N. K. e Negus, S. S. (2000). "Interactions between kappa opioid agonists and cocaine. Preclinical studies". *Ann N Y Acad Sci*, 909: 104-132.
- Misra, A. S. (1976). "Disposition and biotransformation of cocaine", in S. J. Mule (ed.), *Cocaine: Chemical, Biological, Clinical, Social and Treatment Aspects*, pp. 73-90. Cleveland, OH: CRC Press.

- Molina, V. A., Wagner, J. M. e Spear, L. P. (1994). "The behavioral response to stress is altered in adult rats exposed prenatally to cocaine". *Physiol Behav*, 55: 941-945.
- Moore, R. Y. e Bloom, F. E. (1978). "Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the dopamine systems". *Annu Rev Neurosci*, 1: 129-169.
- Morales, M., Battenberg, E. e Bloom, F. E. (1998). "Distribution of neurons expressing immunoreactivity for the 5HT3 receptor subtype in the rat brain and spinal cord". *J Comp Neurol*, 402: 385-401.
- Musto, D. F. (1989). "Evolution of American attitudes toward substance abuse", in D. E. Hutchings (ed.), *Prenatal Abuse of Licit and Illicit Drugs*, *Ann N Y Acad Sci*, 562: 3-7.
- Nayak, P. K., Misra, A. L. e Mule, S. J. (1976). "Physiological disposition and biotransformation of (3H) cocaine in acutely and chronically treated rats". *J Pharmacol Exp Ther*, 196: 556-569.
- Nevins, M. E. e Anthony, E. W. (1994). "Antagonists at the serotonin-3 receptor can reduce the fear-potentiated startle response in the rat: evidence for different types of anxiolytic activity?". *J Pharmacol Exp Ther*, 268: 248-254.
- Neuspiel, D. R. e Hamel, S. C. (1991). "Cocaine and infant behavior". *J Dev Behav Pediatr*, 12: 55-64.
- Nunes, E. V. e Rosecan, J. S. (1987). "Human neurobiology of cocaine", in H. I. Spitz e J. S. Rosecan (eds.), *Cocaine Abuse: New directions in treatment and research*, pp. 48-93. New York: Brunner/Hazel Publisher.
- Oro, A. S. e Dixon, S. D. (1987). "Perinatal cocaine and methamphetamine exposure: maternal and neonatal correlates". *J Pediatr*, 111: 571-578.
- Overstreet, D. H., Moy, S. S., Lubin, D. A., Gause, L. R., Lieberman, J. A. e Johns, J. M. (2000). "Enduring effects of prenatal cocaine administration on emotional behavior in rats". *Physiol Behav*, 70: 149-156.
- Palkovits, M. e Brownstein, M. J. (1988). *Maps and Guide to Microdissection of the Rat Brain*. New York: Elsevier Science Publishing.
- Paré, D. e Smith, Y. (1998). "Intrinsic circuitry of the amygdaloid complex: common principles of organization in rats and cats". *Trends Neurosci*, 21: 240-241.
- Pitkänen, A. (2000). "Connectivity of the rat amygdaloid complex", in J. P. Aggleton (ed.), *The Amygdala. A Functional Analysis*, 2nd edn., pp. 31-115. New York: Oxford University Press.
- Pitkänen, A., Savander, V. e LeDoux, J. E. (1997). "Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala". *Trends in Neuroscience*, 20: 517-523.
- Porsolt, R. D., Anton, G., Blavet, N. e Jalfre, M. (1978). "Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments". *Eur J Pharmacol*, 47: 379-391.
- Porsolt, R. D., Le Pichon, M. e Jalfre, M. (1977). "Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments". *Nature*, 266: 730-732.
- Post, R. (1976). "Clinical aspects of cocaine: assessment of acute and chronic effects in animals and men", in S. J. Mule (ed.), *Cocaine: Chemical, Biological, Social, and Treatment Aspects*, pp. 203-215. Cleveland.
- Post, R. M. (1975). "Cocaine psychoses: a continuum model". *Am J Psychiatry*, 132: 225-231.
- Post, R. M. (1980). "Intermittent versus continuous stimulation: effect of time interval on the development of sensitization or tolerance". *Life Sci*, 26: 1275-1282.
- Post, R. M., Weiss, S.R., Smith, M., Rosen, J. e Frye, M. (1995b). "Stress, conditioning, and the temporal aspects of affective disorders". *Ann N Y Acad Sci*, 771: 677-696.
- Price, J. L., Russchen, F. T. e Amaral, D. G. (1987). "The limbic region. II: The amygdaloid complex", in A. Björklund, T. Hökfelt e L. W. Swanson (eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol. 5, Integrated Systems of the CNS, Part I*, pp. 279-388. Amsterdam: Elsevier.
- Rees, D. C., Francis, E. Z. e Kimmel, C. A. (1990). "Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicants: a workshop summary". *Neurotoxicology*, 11: 257-269.
- Royce, J. R. (1977). "On the construct validity of open-field measures". *Psychological Bulletin*, 84: 1098-1106.
- Sadile, A. G. (1996). "Long term habituation of theta-related activity components of albino rats in the lát-maze", in P.R. Sanberg, K.P. Ossenkopp e M. Kovaliers (eds.), *Motor activity and movement disorders*, pp. 3-55. Totowa: Humana Press.
- Schafe, G. E. e Bernstein, I. L. (1996). "Forebrain contribution to the induction of a brainstem correlate of conditioned taste aversion: I. The amygdala". *Brain Res*, 741: 109-116.
- Seidler, F. J. e Slotkin, T. A. (1993). "Prenatal cocaine and cell development in rat brain regions: effects on ornithine decarboxylase and macromolecules". *Brain Res Bull*, 30: 91-99.

- Silva-Araújo, A., Abreu-Dias, P., Silva, M. C. e Tavares, M. A. (1995a). "Effects of prenatal cocaine exposure in the photoreceptor cells of the rat retina". *Mol Neurobiol*, 11: 77-86.
- Silva-Araújo, A., Salgado-Borges, J., Cardoso, V., Silva, M. C., Castro-Correia, J. e Tavares, M. A. (1993). "Changes in the retinal ganglion cell layer and optic nerve of rats exposed neonatally to cocaine". *Exp Eye Res*, 56: 199-206.
- Silva-Araújo, A., Salgado-Borges, J. e Tavares, M. A. (1991a). "Morphological changes in the optic nerve after chronic exposure of neonatal rats to cocaine and amphetamine". *Ophthalmic Res*, 23: 295-302.
- Silva-Araújo, A., Salgado-Borges, J. e Tavares, M. A. (1991b). "Morphometric study of the optic nerve after postnatal exposure to psychostimulants in the rat". *Eur J Neurosci*, Suppl. 2: 265.
- Silva-Araújo, A., Silva, M. C., Abreu-Dias, P. e Tavares, M. A. (1995b). "Effects of prenatal cocaine exposure in the retinal ganglion cell layer of the rat". A morphometric analysis. *Mol Neurobiol*, 11: 87-97.
- Silva-Araújo, A. L. e Tavares, M. A. (1995). "Expression of glial fibrillary acidic protein in the rat retina after exposure to psychostimulants". *Retina*, 15: 241-247.
- Silva-Araújo, A. e Tavares, M. A. (1996). "Development of the eye after gestational exposure to cocaine. Vascular disruption in the retina of rats and humans". *Ann N Y Acad Sci*, 801: 274-288.
- Silva-Araújo, A., Tavares, M. A., Patacao, M. H. e Carolino, R. M. (1996b). "Retinal hemorrhages associated with in utero exposure to cocaine. Experimental and clinical findings". *Retina*, 16: 411-418.
- Spear, L. P. (1997). "Neurobehavioral abnormalities following exposure to drugs of abuse during development", in B. A. Johnson, J. D. Roache (Eds.), *Drug Addiction and its Treatment: Nexus of Neuroscience and Behavior*, pp. 233-255. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
- Spear, L. P. e Brick, J. (1979). "Cocaine-induced behavior in the developing rat". *Behavioral and Neural Biology*, 26: 401-415.
- Spear, L. P., Frambes, N. A. e Kirstein, C. L. (1989). "Fetal and maternal brain and plasma levels of cocaine and benzoylecgonine following chronic subcutaneous administration of cocaine during gestation in rats". *Psychopharmacology*, 97: 427-431.
- Spear, L. P. e Heyser, C. J. (1992). "Cocaine and the developing nervous system: laboratory findings", in I. S. Zagon e T. A. Slotkin (Eds.), *Maternal Substance Abuse and the Developing Nervous System*, pp. 155-175. San Diego: Academic Press.
- Spear, L. P., Kirstein, C. L. e Frambes, N. A. (1989). "Cocaine effects on the developing central nervous system: behavioral, psychopharmacological, and neurochemical studies". *Ann N Y Acad Sci*, 562: 290-307.
- Summavielle, T., Silva-Araujo, A., Silva, M. C. e Tavares, M. A. (2000). "Effects of neonatal exposure to cocaine in the development of the neurotransmitters retinal systems: an immunocytochemical and neurochemical study". *Ann N Y Acad Sci*, 914: 418-430.
- Summavielle, T., Magalhães, A., Castro-Vale, I., de Sousa, L., Tavares, M. A. (2002). "Neonatal exposure to cocaine: altered dopamine levels in the amygdala and behavioral outcomes in the developing rat". *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 965: 515-521.
- Tavares, M. A. e Silva, M. C. (1993). "Body weight gain and hippocampal volumes of rats exposed neonatally to psychostimulants". *Brain Res*, 619: 137-145.
- Tavares, M. A. e Silva, M. C. (1996). "Differential effects of prenatal exposure to cocaine and amphetamine on growth parameters and morphometry of the prefrontal cortex in the rat". *Ann N Y Acad Sci*, 801: 256-273.
- Tavares, M. A., Silva, M. C., Silva-Araujo, A., Xavier, M. R. e Ali, S. F. (1996). "Effects of prenatal exposure to amphetamine in the medial prefrontal cortex of the rat". *Int J Dev Neurosci*, 14: 585-596.
- Tavares, M. A., Silva-Araújo, A., Lopes, I., Gomes-da-Silva, J., de Sousa, L. (2002). "Drogas de abuso – o discurso da biologia". *Toxicodependências*, 8 (2): 3-16.
- Ujike, H., Kuroda, S. e Otsuki, S. (1996). "Sigma receptor antagonists block the development of sensitization to cocaine". *Eur J Pharmacol*, 296: 123-128.
- Unterwald, E. M., Horne-King, J. e Kreek, M. J. (1992). "Chronic cocaine alters brain mu opioid receptors". *Brain Res*, 584: 314-318.
- Unterwald, E. M., Rubinfeld, J. M. e Kreek, M. J. (1994). "Repeated cocaine administration upregulates kappa and mu, but not delta, opioid receptors". *Neuroreport*, 5: 1613-1616.
- Volpe, J. J. (1992). "Effect of cocaine use on the fetus". *N Engl J Med*, 327: 399-407.
- Walsh, R. N. e Cummins, R. A. (1976). "The open-field test: a critical review". *Psychological Bulletin*, 83: 482-504.
- Weed, M. R., Vanover, K. E. e Woolverton, W. L. (1993). "Reinforcing effect of the D1 dopamine agonist SKF 81297 in rhesus monkeys". *Psychopharmacology*, 113: 51-52.

- Weiss, J. M., Cierpial, M. A. e West, C. H. (1998). "Selective breeding of rats for high and low motor activity in a swim test: toward a new animal model of depression". *Pharmacol Biochem Behav*, 61: 49-66.
- Weiss, F., Maldonado-Vlaar, C. S., Parsons, L. H., Kerr, T. M., Smith, D. L. e Ben-Shahar, O. (2000). "Control of cocaine-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats: effects on recovery of extinguished operant-responding and extracellular dopamine levels in amygdala and nucleus accumbens". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 4321-4326.
- Whitaker-Azmitia, P. M. (1991). "Role of serotonin and other neurotransmitter receptors in brain development: basis for developmental pharmacology". *Pharmacol Rev*, 43: 553-561.
- Whitaker-Azmitia, P. M., Lauder, J. M., Shemmer, A. e Azmitia, E. C. (1987). "Postnatal changes in serotonin receptors following prenatal alterations in serotonin levels: further evidence for functional fetal serotonin receptors". *Brain Res*, 430: 285-289.
- White, I. M., Doubles, L. e Rebec, G. V. (1998). "Cocaine-induced activation of striatal neurons during focused stereotypy in rats". *Brain Res*, 810: 146-152.
- Whitelaw, R. B., Markou, A., Robbins, T. W. e Everitt, B. J. (1996). "Excitotoxic lesions of the basolateral amygdala impair the acquisition of cocaine-seeking behaviour under a second-order schedule of reinforcement". *Psychopharmacology*, 127: 213-224.
- Wilson, J. M., Norega, J. N., Corrigall, W. A., Coen, K. M., Shannak, K. e Kish, S. J. (1994). "Amygdala dopamine levels are markedly elevated after self- but not passive-administration of cocaine". *Brain Res*, 668: 39-45.
- Wise, R. A., Newton, P., Leeb, K., Burnette, B., Pocock, D. e Justice, J. B., Jr. (1995). "Fluctuations in nucleus accumbens dopamine concentration during intravenous cocaine self-administration in rats". *Psychopharmacology (Berl)*, 120: 10-20.
- Wood, R. D., Bannoura, M. D. e Johanson, I. B. (1994). "Prenatal cocaine exposure: effects on play behavior in the juvenile rat". *Neurotoxicol Teratol*, 16: 139-144.
- Wood, R. D., Molina, V. A., Wagner, J. M. e Spear, L. P. (1995). "Play behavior and stress responsivity in periadolescent offspring exposed prenatally to cocaine". *Pharmacol Biochem Behav*, 52: 367-374.
- Wood, R. D. e Spear, L. P. (1998). "Prenatal cocaine alters social competition of infant, adolescent, and adult rats". *Behav Neurosci*, 112: 419-431.
- Woods, J. R., Jr., Plessinger, M. A. e Clark, K. E. (1987). "Effect of cocaine on uterine blood flow and fetal oxygenation". *Jama*, 257: 957-961.
- Woolverton, W. L. e Johnson, K. M. (1992). "Neurobiology of cocaine abuse". *Trends Pharmacol Sci*, 13: 193-200.
- Yuferov, V., Zhou, Y., Spangler, R., Maggos, C. E., Ho, A. e Kreek, M. J. (1999). "Acute "binge" cocaine increases mu-opioid receptor mRNA levels in areas of the rat mesolimbic mesocortical dopamine system". *Brain Res Bull*, 48: 109-112.
- Zeigler, S., Lipton, J., Toga, A. e Ellison, G. (1991). "Continuous cocaine administration produces persisting changes in brain neurochemistry and behavior". *Brain Res*, 552: 27-35.
- Zuckerman, B., Frank, D. A., Hingson, R., Amaro, H., Levenson, S. M., Kayne, H., Parker, S., Vinci, R., Aboagye, K., Fried, L. E., Cabral, H., Timperi, R. e Bauchner, H. (1989). "Effects of maternal marijuana and cocaine use on fetal growth". *N Engl J Med*, 320: 762-768.