

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: PSIQUIATRIA**



TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE IL-6, IL-10, BDNF
E TBARS EM GESTANTES USUÁRIAS DE CRACK E NO SANGUE
DO CORDÃO UMBILICAL DOS SEUS FILHOS**

Victor Mardini

Orientador: Prof. Dr. Luis Augusto Paim Rohde

Coorientadora: Dra. Claudia Maciel Szobot

Porto Alegre, janeiro de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: PSIQUIATRIA



TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE IL-6, IL-10, BDNF
E TBARS EM GESTANTES USUÁRIAS DE CRACK E NO SANGUE
DO CORDÃO UMBILICAL DOS SEUS FILHOS**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Psiquiatria, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria.

Victor Mardini

Orientador: Prof. Dr. Luis Augusto Paim Rohde

Coorientadora: Dra Claudia Maciel Szobot

Porto Alegre, janeiro de 2016

CIP - Catalogação na Publicação

MARDINI, VICTOR

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE IL-6, IL-10, BDNF
E TBARS EM GESTANTES USUÁRIAS DE CRACK E NO SANGUE
DO CORDÃO UMBILICAL DOS SEUS FILHOS / VICTOR
MARDINI. -- 2016.

134 f.

Orientadora: LUIS AUGUSTO PAIM ROHDE.

Coorientadora: CLAUDIA MACIEL SZOBOT.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria, Porto
Alegre, BR-RS, 2016.

1. Biomarcadores. 2. Gravidez. 3. Recém-Nascido.
4. Crack. 5. Sangue de Cordão Umbilical. I. ROHDE,
LUIS AUGUSTO PAIM, orient. II. SZOBOT, CLAUDIA
MACIEL, coorient. III. Título.

DEDICATÓRIA

À minha amada esposa Thaís R.W. Mascarenhas pela compreensão, carinho e pela oportunidade de compartilhar lindos momentos desde que a conheci.

Aos meus amados filhos Bernardo e Eduarda, pelo convívio afetoso e pelo contínuo ensinamento de como ser pai.

À minha querida mãe Ilda, que há 54 anos me apoia, incondicionalmente, e sempre está de braços abertos para me receber.

À minha sobrinha Júlia e a minha cunhada Rosangela pelos ótimos momentos que passamos juntos.

Ao meu falecido pai, João Mardini que lamento muito não poder tê-lo conosco neste momento, e que sempre buscou estimular meu crescimento respeitando minhas ideias.

Ao meu falecido irmão, que lastimo ter compartilhado pouco tempo de vida e que, certamente, teria ensinado mais a alegria de viver.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Rohde, por sua segurança, sua imensa capacidade produtiva, por sua profunda dedicação, contribuindo decisivamente para elevar a qualidade do nosso Serviço.

À minha coorientadora, Cláudia, por sua competência, generosidade, tranquilidade e disponibilidade, abrindo mão de prioridades pessoais. Agradeço sua tolerância em me orientar. Realmente devo muito a ela.

À Lucrécia agradeço por ser uma pessoa acolhedora, afetiva e profissional dedicada, sempre priorizando nosso aprendizado e compartilhando suas ideias e experiências de que relação mãe-bebê, pautada pelo afeto, possibilita uma evolução emocional saudável das crianças.

Aos membros da banca examinadora, pela honra de tê-los avaliando meu trabalho.

Aos parceiros do início, meio e fim desta jornada, pela sua eficiência e disponibilidade: Amanda Angonese, Fabiana Guarienti, Fernanda Rosa, Fernando Xavier, Leticia Pereira, Luiza Manna, Mariana Sehbe, Natalia Canabarro, Natalia Cambogi, Rodrigo Parciannelo, Rosana Fogaça.

Às mulheres que, mesmo no momento do puerpério, num ambiente não familiar e com o desconforto, dor e incertezas quanto aos cuidados dos seus bebês, gentilmente, cederam seu sangue e sangue do cordão umbilical de seus bebês sem requererem nada em troca, mas pelo apoio a um maior conhecimento que poderia ajudar a busca de respostas de como ajudá-las.

Aos meus colegas do Serviço de Psiquiatria Infantil queridos Ana Margareth, Christian, Marcelo Schmitz, Olga Falceto, David, Silza, Thiago Pianca, Thiago Rocha que, além de modelos profissionais, me inspiraram para este trabalho. Todos me apoiaram e assumiram inúmeras tarefas para que eu pudesse dispor de tempo, necessário para realizar este trabalho. Aos residentes e cursistas do Serviço de Psiquiatria da Infância e da Adolescência por tolerarem meus afastamentos das atividades de ensino.

Aos meus queridos amigos e demais familiares que toleraram minha ausência, por muito tempo, para que este trabalho pudesse ser realizado.

À Mara Luisa Santos pela competência com que assessorou a equipe de pesquisa nos quatro anos do trabalho e realizou a tarefa de finalização desta tese.

Às incansáveis secretárias, Clarissa Paim e Fabiane Leusin, pelo suporte fundamental para a pesquisa.

À Gabrielle Bocchese da Cunha que, gentilmente, “abriu as portas”, para nossa equipe, para a coleta de dados Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas (HMIPV).

Aos amigos do Laboratório de Psiquiatria Experimental, em especial, a Keila, Gabriel, Gabriela Colpo, Carolina Gubert e Emily.

A Liane Marise Rohsig, Chefe da Unidade de Criobiologia e Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pela inestimável colaboração e cuidado com as amostras de sangue de cordão umbilical.

À farmacêutica Marilei Wolfart por disponibilizar o setor de coletas ambulatoriais do HCPA para o treinamento dos auxiliares de pesquisa
Ao Claudio Martins por, afetosamente, apoiar nosso trabalho no HMIPV.

À equipe de enfermagem, em especial a enfermeira Magda Flores, pela coleta do sangue do cordão umbilical no Centro Obstétrico do HCPA.

A equipe de enfermagem do CO do HMIPV, em especial a enfermeira Fabiane Steffens pela dedicação e disponibilidade na coleta de sangue de cordão umbilical das parturientes.

À Maria Calixto e equipe de enfermagem da Internação Psiquiátrica do HMIPV, pelo apoio de retaguarda dos auxiliares de pesquisa nas coletas.

À equipe do alojamento conjunto do HCPA e do HMIPV que ajudaram no atendimento as gestantes e as receberam com atenção e disponibilidade.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-graduação do HCPA, em especial Luciano Guimarães, pela orientação na análise estatística deste trabalho.

À bibliotecária Maria Luiza Campos por atender gentil e prontamente aos meus pedidos.

À secretária do PPG Ciências Médicas: Psiquiatria, Claudia Grabinski, por sua disponibilidade.

ÍTACA

*Se partires um dia rumo à Ítaca,
faz votos de que o caminho seja longo
repleto de aventuras, repleto de saber.
Nem lestrigões, nem ciclopes,
nem o colérico Poseidon te intimidem!
Eles no teu caminho jamais encontrarás
Se altivo for teu pensamento,
Se sutil emoção o teu corpo e o teu espírito tocar
Nem lestrigões, nem ciclopes
Nem o bravo Poseidon hás de ver
Se tu mesmo não os lebares dentro da alma
Se tua alma não os puser dentro de ti.
Faz votos de que o caminho seja longo.
Numerosas serão as manhãs de verão
Nas quais com que prazer, com que alegria
Tu hás de entrar pela primeira vez um porto
Para correr as lojas dos fenícios
e belas mercancias adquirir.
Madrepérolas, corais, âmbar, ébanos
E perfumes sensuais de toda espécie*

*Quanto houver de aromas deleitosos.
A muitas cidades do Egipto peregrinas
Para aprender, para aprender dos doutos.
Tem todo o tempo Ítaca na mente.
Estás predestinado a ali chegar.
Mas, não apresses a viagem nunca.
Melhor muitos anos lebares de jornada
E fundeares na ilha, velho enfi m.
Rico de quanto ganhaste no caminho
Sem esperar riquezas que Ítaca te desse.
Uma bela viagem deu-te Ítaca.
Sem ela não te ponhas a caminho.
Mais do que isso não lhe cumpre dar-te.
Ítaca não te iludiu
Se a achas pobre.
Tu te tornaste sábio, um homem de experiência.
E, agora, sabes o que significam Ítacas.*

Konstantin Petrou Kaváfis (1863-1933)

RESUMO

A presente tese abordou o tema de potenciais biomarcadores em uma população altamente vulnerável – díades mães/bebês com história de exposição ao crack na gestação. Foram avaliados 57 bebês expostos e 99 não expostos, e as suas mães. No primeiro artigo, a ênfase foi à ativação inflamatória, onde se detectou um aumento da IL-6 (perfil pró-inflamatório) nos expostos, mesmo mediante ajuste para confundidores (10.208,54 IC95% 1.328,54–19.088,55 vs. 2.323,03 IC95% 1.484,64–3.161,21; $p=0.007$). A IL-10 (perfil antiinflamatório) também se mostrou elevada nos bebês expostos (432,22 IC95% 51,44–812,88 vs. 75,52 IC95% 5,64–145,39, $p=0.014$). A IL-6 esteve aumentada nas mães expostas ao crack (25.160,05, IC95% 10.958,15–39.361,99 vs. 8.902,14 IC95% 5.774,97–12.029,32; $p=0.007$), sem alterações de IL-10 entre as puérperas. Não houve correlação entre os níveis de citocina materna e do bebê (Spearman test; $p \geq 0.28$). Neste estudo, concluiu-se que IL-6 e IL-10 podem ser marcadores da ativação inflamatória precoce em bebês com exposição intrauterina ao crack. Nossos resultados corroboram com os achados da literatura indicando que as citocinas possam ser mediadores potenciais para explicar os efeitos comportamentais e cognitivos do estresse pré-natal sobre o feto, integrando imunologia e a hipótese da neuroinflamação a saúde mental da criança. No segundo artigo, avaliou-se uma medida de estresse oxidativo (EO), o TBARS, e de Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), nas referidas díades. Os resultados encontrados na análise multivariada do TBARS no sangue de cordão umbilical (SCU) apontam para um menor EO nos bebês expostos (63,97 IC95% 39,43 – 88,50 em expostos vs 177,04 IC95% 140,93 – 213,14 em não expostos, $p < 0.001$). Trata-se de um achado inovador, apontando na direção de uma ativação do sistema antioxidante endógeno nos recém-nascidos expostos, em função da ruptura da homeostase causada pela toxicidade do crack durante a gestação. O feto mobilizaria rotas de antioxidantes endógenos desde muito precocemente no seu desenvolvimento, como a promovida pela *Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript* (CART). Ainda neste estudo, pode-se ver um aumento de BDNF nos bebês expostos (3,86 IC95% 2,29 – 5,43 vs 0,85 IC95% 0,47- 1,23; $p < 0.001$), mas uma diminuição nas gestantes expostas em relação às não expostas (4,03 IC95% 2,87 – 5,18 vs 6,67 IC95% 5,60 – 7,74; $p = 0.006$). Os dados de BDNF em bebês expostos ao crack são bastante inovadores, mas coerentes com a literatura, no sentido de uma reação de neuroplasticidade. Em gestantes, o dado surpreende, tendo em vista que a literatura de adultos indica aumento de BDNF em usuários de crack em relação a controles. Uma possibilidade para explicar este achado é uma possível variação na cronicidade e intensidade no consumo de crack do grupo teste. Alternativamente, a maior prevalência de estresse pós-traumático (TEPT) nas gestantes usuárias de crack poderia justificar este achado. Pacientes com TEPT tendem a apresentar níveis de BDNF menores que os controles normais. Em suma, apontam-se quatro possíveis biomarcadores, em uma população de difícil acesso e de alta relevância em saúde pública. Percebe-se que pode haver diferentes respostas de acordo com a etapa do desenvolvimento e que gestantes podem ter um perfil de recrutamento de neurotrofinas, e talvez outros biomarcadores, diferentes do que não gestantes. Portanto, observa-se que as mudanças estruturais, fisiológicas e moleculares promovidas pela cocaína resultam do envolvimento de uma vasta rede de neurotransmissores, interligados, e atuantes em diferentes áreas do cérebro e em diferentes momentos de maturação.

ABSTRACT

The present thesis addressed the theme on potential biomarkers in a highly vulnerable population – dyads mothers/babies with a history of exposure to crack/cocaine during the pregnancy 57 exposed babies and 99 not exposed babies and their mothers were assessed. In the first article, the emphasis was the inflammatory activation, were detected an increase of IL-6 (pro-inflammatory profile) in exposed, even within adjustments for confounders (10,208.54, 95%CI 1,328.54–19,088.55 vs. 2,323.03, 95%CI 1,484.64–3,161.21; $p=0.007$). The IL-10 (anti-inflammatory profile) was also shown elevated on exposed babies (432.22, 95%CI 51.44–812.88 vs. 75.52, 95%CI 5.64–145.39, $p=0.014$). The IL-6 was increased in the mothers exposed to crack (25,160.05, 95%CI 10,958.15–39,361.99 vs. 8,902.14, 95%CI 5,774.97–12,029.32; $p=0.007$), without alterations of IL-10 amongst the mothers. There were no correlation amongst the levels of maternal cytosine and the babies (Spearman test; $p\geq 0.28$). In this study, it was concluded that IL-6 and IL-10 could be markers of early inflammatory activation on babies exposed to crack/cocaine. Our results support the findings of the literature indicating that the cytosine could be potential mediators to explain the behavior and cognitive effects of prenatal stress on the fetus, integrating immunology and the hypothesis of the neuroinflammation to the child's mental health. In the second article, we assessed a measurement of oxidative stress, the TBARS and the BDNF in the referred dyads. The results found in the multivariate analysis of the TBARS in the umbilical chord's blood (UCB) point to a less oxidative stress in the babies exposed to (63.97, 95%CI 39.43 – 88.50 in exposed vs. 177.04, 95%CI 140.93 – 213.14 non exposed, $p < 0.001$). This is an innovative finding, pointing in the direction of an endogenous antioxidant activation system on the newly born exposed, on the basis of the homeostasis rupture caused by the crack toxicity during the pregnancy. The fetus would mobilize endogenous antioxidant routes since very early in its development, as promoted by *Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript* (CART). Still in this study, we can see the increase of the BDNF in the exposed babies (3.86, 95%CI 2.29 – 5.43 vs 0.85, 95%CI 0.47- 1.23; $p < 0.001$), but a decrease in the exposed pregnant women in relation to the non-exposed (4.03, 95%CI 2.87 – 5.18 vs. 6.67, 95%CI 5.60 – 7.74; $p = 0.006$). The data of BDNF in babies exposed to crack are highly innovative, but consistent to the literature in the sense of a reaction of neuroplasticity. In pregnant women the data is surprising, having in mind that the adult literature indicates an increase of BDNF in crack/cocaine users in relation to controllers. A possibility to explain this finding is a possible variation in the practicality and intensity of usage of crack/cocaine from the test group. Alternatively the most prevalence post-traumatic stress (PTSD) in the crack pregnant users could justify this finding. Patients with PTSD tend to present levels of BDNF less than the normal controllers. This leads us to four possible biomarkers, in a population difficult to access and in a highly relevance to public health. We can tell that there are different answers according to the development stage and that the pregnant women could have a neurotrophins recruitment profile and perhaps other biomarkers, different to non pregnant. Therefore, we can observe that structural, physiological, molecular changes promoted by cocaine result from an involvement from a vast network of neurotransmitters integrated and active in different areas of the brain and in different moments of maturation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-HNE	4-hidroxinoneal ou <i>trans</i> -4-hidroxi-2-nonenal
ABR	<i>Auditory Brainstem Response</i>
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana
ATP	Trifosfato de Adenosina
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro / <i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
BHE	Barreira Hemato-Encefálica
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CART	<i>Cocaine and Amphetamine Regulator Transcript</i> / Transcritor Regulador da Cocaína e da Anfetamina
CAT	Catalase
CCQ	<i>Cocaine Craving Questionnaire</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEBRID	Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas
CI	Intervalo de Confiança
DAT	Transportador de Dopamina
EM	Entrevistas Motivacionais
EN	Exposed Newborn – Recém-nascido Exposto
EO	Estresse Oxidativo
EPC	Exposição pré-natal à cocaína
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	<i>Federal Drug Agency</i>
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HClO	Ácido Hipocloroso
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HCV	Vírus da Hepatite C
HNPC	Células progenitoras neuronais humanas / <i>Human Neural Progenitor Cells</i>
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IQ	<i>Intelligence Quotient</i>
MC	Manejo de Contingência
MDA	Malondialdeído
MINI	<i>Mini International Neuropsychiatric Interview</i>
NNNS	<i>NYCU Network Neurobehavioral Scale</i>
n	Número de Sujeitos / <i>Sample Size</i>
NA	<i>Nucleus Accumbens</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NIDA	<i>National Institute on Drug Abuse</i>
NSDU	<i>National Survey on Drug Use and Health</i>
NT-3	Neurotrofina 3
O ₂ ^{-*}	Superóxido
OH [*]	Hidroxil

PARP 1	(Poli[ADP-ribose] polimerase1)
PASs	<i>Psychoactive Substances</i>
PCC	Conteúdo de Proteína Carbonil
PL	Peroxidação Lipídica
PNPD	Programa Nacional de Pós Doutorado
PRKCE	<i>Protein kinase C epsilon</i>
QI	Quociente de Inteligência
RL	Radical Livre
RM	Ressonância Magnética
RMf	Ressonância Magnética funcional
RN	Recém-Nascido
RO*	Peroxil
ROO*	Alcoxil
ROOH	Hidroperóxido Orgânico
SCU	Sangue do Cordão Umbilical
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Desmutase
SPA	Substâncias Psicoativas
TBARS	<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i> / Substância Reativa ao Ácido Tiobarbitúrico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF-ALFA	Fator de Necrose Tumoral
TRAP	Potencial Reativo Antioxidante Total
UCB	<i>Umbilical Cord Blood</i>
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VHC	Vírus da Hepatite C
vs	<i>Versus</i>
VTA	Área Tegumentar Ventral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE O CRACK	15
2.2 EPIDEMIOLOGIA DO USO DE CRACK E COCAÍNA	17
2.3 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DO USO DE CRACK/COCAÍNA NA GESTAÇÃO.....	21
2.4 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A COCAÍNA NA GESTANTE E NO BEBÊ EM DESENVOLVIMENTO.....	23
3 BIOMARCADORES RELACIONADOS AO USO DE COCAÍNA E CRACK.....	30
3.1 BIOMARCADORES UTILIZADOS EM RELAÇÃO À COCAÍNA.....	31
4 COCAÍNA E INTERLEUCINAS	32
5 COCAÍNA E ESTRESSE OXIDATIVO.....	36
6 COCAÍNA E BDNF	40
7 OBJETIVOS	45
8 HIPÓTESE.....	46
9 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	47
10 ESTUDO 1 - ARTIGO PRINCIPAL 1.....	48
11 ESTUDO 2 - ARTIGO PRINCIPAL 2.....	72
12 DISCUSSÃO INTEGRATIVA.....	84
13 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
ANEXOS:	
1 - CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO	109
2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - CASOS.....	111
3 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - CONTROLES...	113
4 - E-MAIL DE ACEITAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DO ARTIGO PELA TRENDS IN PSYCHIATRY AND PSYCHOTHERAPY	115
5 - MATERIAL COMPLEMENTAR – ARTIGO 3	116

1 INTRODUÇÃO

Este projeto faz parte de uma linha de pesquisa maior, financiada pelo Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que visa a estudar o uso do crack nas diferentes etapas do ciclo vital. A presente tese aborda o tema de gestantes usuárias de crack e seus bebês. O uso de crack por gestantes é um grave problema de saúde pública. Entre os usuários de crack, as gestantes são uma população que merece maior atenção. Um estudo transversal realizado na cidade onde a presente tese foi conduzida demonstrou que 4,6% dos recém-nascidos foram expostos à cocaína (CUNHA, 2007). Em um levantamento nacional, viu-se que cerca de 10% das usuárias brasileiras entrevistadas relataram estar grávidas no momento da entrevista e mais da metade já havia engravidado ao menos uma vez desde o início do uso (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2013). Devido ao seu baixo peso molecular, a cocaína e seus metabólitos rapidamente atravessam a placenta e atingem os tecidos fetais em altas concentrações (RIEZZO, et al., 2012), com trágicos efeitos ao desenvolvimento infantil (CAMBELL, 2003). A cocaína é altamente tóxica, agindo de forma dinâmica e complexa. Interfere em diversos mecanismos intracelulares, entre eles as citocinas, a geração de radicais livres e o BDNF.

Vários mecanismos podem perturbar o desenvolvimento do feto. Dentre eles, se incluem efeitos diretos no desenvolvimento sináptico, hipoxemia pela diminuição do fluxo sanguíneo uterino e privação de oxigênio, e prejuízo vascular afetando o desenvolvimento neuronal (BENVENISTE, et al., 2010; MALANGA, KOSOFSKY, 1999).

Os bebês expostos ao crack intraútero apresentam alterações neurocomportamentais. Os mecanismos neurobiológicos envolvidos na origem desses distúrbios ainda são pouco conhecidos. Tampouco se sabe se os possíveis biomarcadores avaliados em dependência química apresentam o mesmo padrão de resposta no período gestacional e puerpério. Assim, a presente tese tem como objetivo ampliar o conhecimento sobre possíveis biomarcadores do uso de crack em períodos vulneráveis do desenvolvimento humano, quais sejam, período intrauterino e puerpério. Mais especificamente, existe na literatura uma carência de estudos avaliando citocinas, estresse oxidativo (EO) e o BDNF em humanos usuários de crack, a despeito das inúmeras pesquisas em modelo animal e mesmo em humanos em outras etapas do desenvolvimento. Trabalha-se com o objetivo de comparar os níveis das interleucinas IL-6 e IL-10, o EO a partir da dosagem do TBARS e os níveis de BDNF entre recém-nascidos

expostos ao crack durante a gestação e recém-nascidos não expostos, a partir da dosagem no sangue do cordão umbilical (SCU) e no sangue periférico de suas mães por ocasião do parto.

Inicialmente, faz-se uma breve revisão sobre o crack. A seguir, comenta-se a respeito de gestantes usuárias de crack e seus bebês. Comenta-se sobre as possíveis dificuldades de interação mãe-filho nesse contexto, com possibilidades terapêuticas. Discorre-se depois a cerca de biomarcadores, apresentando-se uma revisão da literatura a respeito de interleucinas, EO, BDNF e crack e/ou cocaína, com ênfase em bebês e gestantes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A presente tese aborda a busca de biomarcadores em díades de puérperas e seus bebês com história de exposição ao crack no período gestacional. São avaliados biomarcadores em comparação a puérperas e bebês controles sem história de uso de substâncias psicoativas (SPA). Inicia-se a revisão com um maior detalhamento sobre o crack em si. A seguir, são revisados estudos sobre o crack na gestação e efeitos da cocaína ou crack no bebê e ao longo do desenvolvimento infantil. Após um maior detalhamento sobre biomarcadores em si, são revisados os estudos que abordam os biomarcadores aqui avaliados – IL6, IL10, BDNF e TBARS, com especial atenção na população em estudo. Ressalta-se que, em muitos momentos da revisão, são apresentados dados sobre cocaína, por serem escassas as publicações específicas sobre o crack.

2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE O CRACK

O crack é um dos vários derivados da cocaína, que é um dos preparados a partir da folha de coca, cuja árvore se chama "*Erytroxylon coca*". As misturas utilizadas antes da queima são variadas, o que dificulta identificar exatamente a composição do crack. Os principais passos da produção do crack são os seguintes: "as folhas são maceradas em álcool, junto com querosene ou gasolina" (von DIEMEN, 2013, p. 20). A esse preparado, é adicionado ácido sulfúrico, cal e amoníaco. "Da filtração dessa solução é formada a pasta de cocaína" (von DIEMEN, 2013, p. 20). A pasta de cocaína tem uma concentração de cocaína que varia de 40% a 90% (INCIARDI, 1991). Esta pasta de cocaína, à qual podem ser adicionados novos ingredientes, passa por nova filtração, formando a pasta base. A partir da pasta base, podem derivar a merla e o cloridrato de cocaína. O cloridrato de cocaína dá origem à base livre e ao crack. O crack pode ser obtido através do aquecimento de cloridrato de cocaína com a adição de bicarbonato de sódio, amônia e água a 95°C, até o ponto de precipitação dos cristais. Os cristais de cocaína vão se solidificando, à medida que a água se evapora. O precipitado remanescente é resfriado, finalizando o processo de obtenção do crack. O termo crack foi utilizado devido ao estalo que ocorre na queima da pedra.

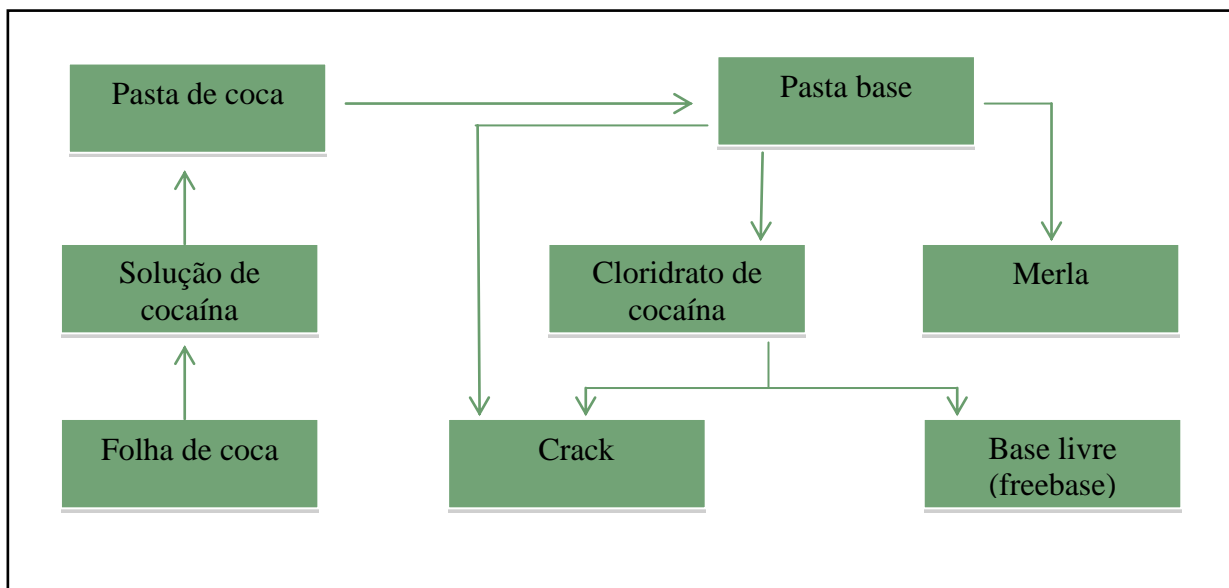


Figura 1 - Etapas envolvidas na produção do crack

Fonte: www.uniad.org.br/desenvolvimento/images/stories/publicações/ensino/aulas/cocaína.pdf (UNIAD, 2013).
(Von DIEMEN, 2013, p. 20)

A farmacocinética da cocaína depende da via pela qual é absorvida. Quando fumada sob a forma de crack, atinge rapidamente altos níveis séricos. O usuário de crack precisa fumar com muito maior frequência e com intervalos cada vez menores, gerando o comportamento de uso compulsivo (WEISS, IANNUCCI, 2009). O pico plasmático é rápido, oscilando entre oito e dez segundos para o início de sua ação, e a duração de efeito é de cinco a dez minutos (ROMANO, RIBEIRO, MARQUES, 2002).

A cocaína é metabolizada por duas vias principais. A maior transformação consiste na hidrólise em seus grupos ésteres, os quais aparentemente não têm importância nas suas manifestações tóxicas. A menor rota é a oxidativa, que tem atraído maior atenção devido a sua toxicidade. Essa rota gera os seguintes metabólitos considerados tóxicos: norcocaína, nitróxido norcocaína, N-hidroxi norcocaína e norcocaína nitrosonium (KOVACIC, 2005). A vida média, em adultos, de tais metabólitos é de 50 a 90 minutos. No fígado, na presença do álcool, a cocaína é convertida em etilcocaína ou cocaetileno. O cocaetileno produz um efeito farmacológico “cocalike”, que tem uma vida média maior e pode ser mais tóxico do que a própria cocaína (WEISS, IANNUCCI, 2009, p.1322). Somente 1 a 5% da cocaína é excretada intacta, os demais 95% são excretados como metabólitos. O metabólito benzoylecgonina é detectado na urina, de dois a três dias depois do “binge”. Nos usuários pesados, esse metabólito pode ser detectável mesmo após 10 a 14 dias do uso (WEISS, IANNUCCI, 2009).

Em relação à farmacodinâmica, o principal mecanismo de ação da cocaína é a sua ligação ao transportador de dopamina (DAT), responsável pela recaptação da dopamina da

fenda para o neurônio pré-sináptico, com resultante acúmulo de dopamina. A cocaína atua principalmente em áreas com maior densidade de DAT, como o putamen, caudato e a área tegumentar ventral (VTA). (WEISS, IANNUCCI, 2009; DESAI, et al., 2014; DEHENES, et al., 2014). O mecanismo de ação da cocaína em nível intracelular é complexo e dependente de muitas variáveis, entre elas, a etapa do desenvolvimento no qual incide. Uma das interações da cocaína é com o Transcritor Regulador da Cocaína e da Anfetamina, ou *Cocaine and Amphetamine Regulator Transcriptor (CART)*, um peptídeo encontrado em regiões do cérebro mediadoras do sistema de recompensa das drogas. Parece que funciona como um neurotransmissor, embora receptores específicos para esse peptídeo sejam de difícil caracterização. A CART está contida em neurônios do Nucleus Accumbens (NA) que se projetam para o VTA. A injeção de CART no NA diminui as respostas locomotoras nos ratos tratados com cocaína, demonstrando que possivelmente tenha um efeito neuroprotetor. A administração da cocaína e da anfetamina *upregulates* a produção de CART, resultando em menor efeito dopaminérgico (ALBERTSON, et al., 2004; ANDERSON, PIERCE, 2005; BANNON, KAPATOS, ALBERTSON, 2005).

2.2 EPIDEMIOLOGIA DO USO DE CRACK E COCAÍNA

O abuso de SPAs é um dos problemas mais importantes em saúde pública da atualidade. Dados referentes aos anos 2012 e 2013 apontam que 24,6 milhões de norte-americanos (9,4% da população) com idade acima de 12 anos eram usuários de drogas ilícitas no último mês (SAMHSA, 2014). A idade média do primeiro consumo entre os iniciados em cocaína, na faixa etária entre 12 a 49, foi de 20,4 anos. (SAMHSA, 2014). Segundo dados da *National Survey on Drug Use and Health (NSDU)*, as mulheres representam aproximadamente 30% da população de usuários de cocaína (SAMHSA, 2014).

Enquanto os dados, globalmente, mostram uma tendência de diminuição no consumo de cocaína, impulsionado pela diminuição do consumo na América do Norte e na Europa, a cocaína permanece a principal droga de preocupação na América Latina e no Caribe. Essas regiões têm os maiores mercados de cocaína do mundo, e o consumo de cocaína é mais elevado (UNODC, 2015).

Na América do Sul, a prevalência anual de uso de cocaína aumentou de 0,7% em 2010 (1,84 milhões de usuários) para 1,2% em 2012 (3,34 milhões de usuários), três vezes o nível

médio estimado do consumo global (UNODC, 2015). O aumento do consumo de cocaína na América do Sul é impulsionado pelo uso crescente no Brasil, que é o maior mercado de cocaína nesse continente. Estima-se uma prevalência de uso de cocaína de 1,75% entre a população de adultos no Brasil (UNODC, 2015). O Brasil (particularmente, desde 2010) e a Argentina são os países de trânsito de cocaína mais apontados em grandes apreensões individuais de drogas (UNODC, 2015).

O Brasil, de acordo com levantamento nacional de álcool e drogas (INPAD, 2015), é o segundo país em número absoluto de consumidores de crack, conforme a Figura 2:

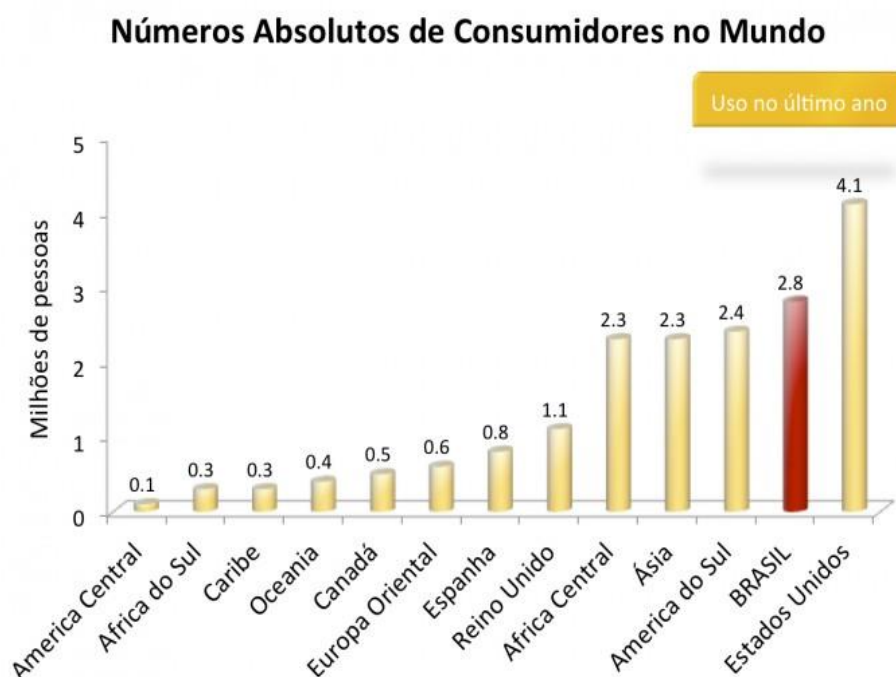


FIGURA 2 - Números absolutos de consumidores de crack no último ano
Fonte: INPAD (2015).

A posição geográfica do Brasil, próximo aos maiores produtores mundiais de cocaína (Peru, Colômbia e Bolívia); a grande proporção de jovens na população brasileira; o aumento da condição socioeconômica da população do país, na última década, e o custo baixo da cocaína são apontados por Abdalla, et al. (2014), como justificativa do maior consumo de cocaína no Brasil. Outros dados que chamam atenção para o consumo de cocaína no Brasil são que, de acordo com o *World Drug Report 2012*, a apreensão de cocaína triplicou no país em 2010 (27 toneladas) comparada à quantidade apreendida em 2004.

Atualmente, o Brasil vive um aumento na prevalência do uso de SPAs ilícitas. Quase seis milhões de brasileiros (4% da população adulta) já experimentaram alguma apresentação

de cocaína. Em 2005, a prevalência de uso foi de 2,6 milhões de adultos (2%) e de 244 mil adolescentes (2%). De cada 100 adultos, um usou crack no último ano, o que representa um milhão de pessoas (CARLINI, 2007). A cocaína utilizada sob a forma de *crack* é acessível a baixo custo e seu uso está associado a diversas situações de risco como infecções, má nutrição, distúrbios familiares e violência (PECHANSKY, SZOBOT, SCIVOLETTO, 2004; GALDURÓZ, et al., 2005; EIDEN, et al., 2006; MITSUHIRO, et al., 2006). Esse aumento na prevalência repercute, também, em fetos e bebês, a partir da exposição materna a diferentes formas de cocaína. Esta é uma população extremamente vulnerável que necessita de maior atenção no meio acadêmico e na atenção primária à saúde.

Pesquisas com uma amostra de 50.890 estudantes da faixa etária entre 10 e 19 anos (rede pública 61,5%; sexo feminino 51,2%, faixa etária predominante 13 a 15 anos 42,1%; estudantes sem defasagem série/idade 80,4%; classes sociais predominantes foram C 34,2% entre os estudantes da rede pública e B 42,4% entre os da particular) em todas as capitais brasileiras (27 cidades) mostraram um aumento do consumo de cocaína, no último ano, de 1,7% para 1,9% e de 2,0% para 2,8% em relação ao uso na vida. (CEBRID, 2010). Conforme ilustrado nas Figuras 3 e 4, o aumento do uso de cocaína destoava das tendências vistas para as outras SPAs.

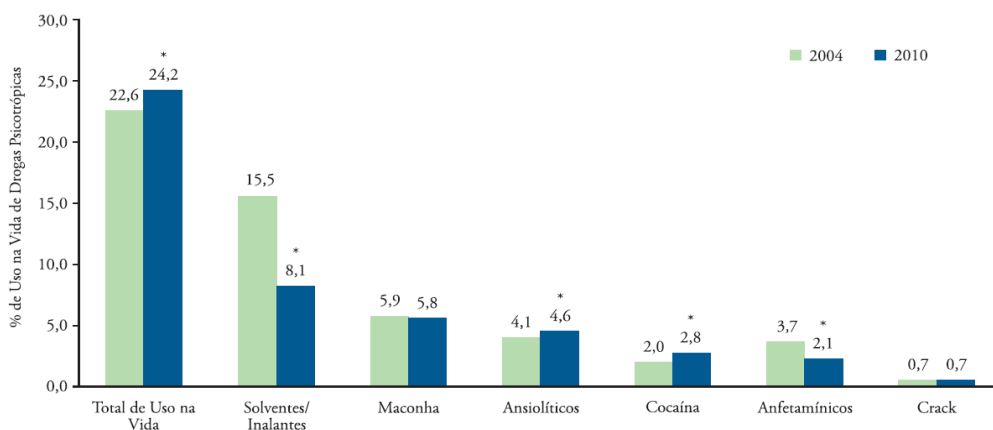


Figura 3 - Uso na vida de drogas psicotrópicas, das cinco drogas mais consumidas e de crack, exceto álcool e tabaco, entre estudantes de ensino fundamental e médio da rede pública das 27 capitais brasileiras, comparando-se os anos de 2004 e 2010

Fonte: VI Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio das Redes Pública e Privada de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras (pp. 503). Sao Paulo: CEBRID - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas: UNIFESP; 2010.

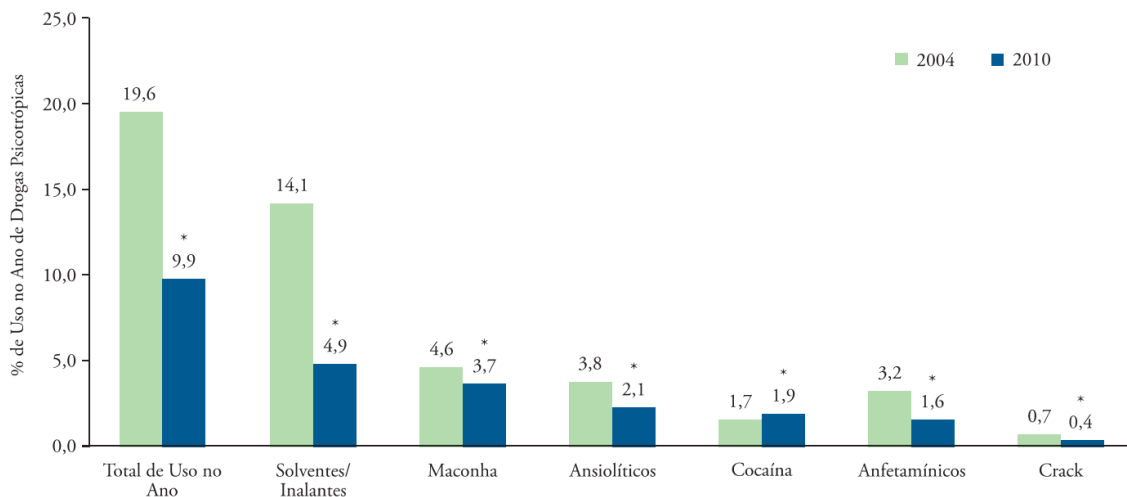


Figura 4 - Uso no ano de drogas psicotrópicas, das cinco drogas mais consumidas e de crack, exceto álcool e tabaco, entre estudantes de ensino fundamental e médio da rede pública das 27 capitais brasileiras, comparando-se os anos de 2004 e 2010.

Fonte: VI Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio das Redes Pública e Privada de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras (pp. 503). São Paulo: CEBRID - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas: UNIFESP; 2010.

A falta de aumento no consumo de crack na pesquisa do CEBRID pode ser justificada por uma taxa de prevalência de uso de crack subestimada, visto que a amostra baseou-se em uma população de estudantes. Usuários de crack geralmente encontram-se nas ruas e fora das escolas (ABDALLA, 2014).

Mais recentemente, os dados de anos anteriores foram reforçados em novo levantamento nacional. Os resultados de Abdalla, et al. (2014), baseados no *Second Brazilian National Alcohol Survey* (conduzido entre novembro 2011 e março 2012) mostraram que a taxa de consumo de alguma forma de cocaína (via aspirada ou fumada) no último ano foi de 2,2%, representando quase 3,2 milhões de pessoas (com idade entre 14 anos ou mais). Cerca de dois milhões de brasileiros fumaram crack pelo menos uma vez em sua vida: 1,5% entre os adultos e 0,8% entre os adolescentes, e um em cada cem adultos usou crack no ano anterior.

Ou seja, observa-se que o Brasil é um dos maiores mercados mundiais de crack, reforçando a temática da presente tese. Da mesma forma, ao contrário da tendência de vários países, a nossa realidade é de aumento de consumo de cocaína, em suas diferentes apresentações. Apesar de a cocaína e de o crack não serem as substâncias mais consumidas em termos de prevalência, as suas consequências em termos de saúde para o indivíduo (RIBEIRO, 2007; KESSLER, 2008; CHUAN-YU, 2009; NAPPO, 2011; ARIAS, et al., 2013; ABDALLA, 2014) e para a sociedade (KESSLER, 2008; DEGENHARDT, 2012;

ABDALLA, 2014) são devastadoras, fazendo com que ganhe grande proporção em termos de saúde pública. A promiscuidade sexual ou troca de sexo por drogas acompanham o uso de crack. (EDWARDS, 2006; INCIARDI, 2006; NAPPO, 2011). A prevalência de gravidez não planejada é estimada em 40% - 85 milhões de gestações - na população geral (SEDGH, 2014), e espera-se que essa taxa seja maior em mulheres com dependência química (HEIL, 2011), fazendo com que períodos críticos da embriogênese ocorram com a presença de drogas no ambiente intrauterino.

2.3 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DO USO DE CRACK/COCAÍNA NA GESTAÇÃO

As consequências da exposição pré-natal a SPAs podem ser trágicas no desenvolvimento das crianças e essa problemática é descrita na maioria dos países. Nos Estados Unidos, entre as gestantes na faixa etária de 15 a 44 anos, 5,4% eram usuárias de drogas ilícitas no momento, para 2012 e 2013. (SAMHSA, 2014).

Dados do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), avaliando a presença de síndrome de abstinência neonatal em três hospitais da Florida entre 2010 e 2011 evidenciaram que, dos recém-nascidos com a síndrome confirmada, 14,1% foram expostos à cocaína durante a gestação. (LIND, 2015).

Lendoiro, et al. (2013), compararam a entrevista clínica com a dosagem de 35 substâncias psicoativas no cabelo materno durante períodos diferentes da gestação em 209 mulheres. Na entrevista, 4,3% das mães declararam uso de drogas ilícitas durante a gestação (cocaína 1,4%, THC 2,9% e opioides 1%); 3,3%, medicamentos (metadona 1,9%, benzodiazepínicos 1,9%, e antidepressivos 0,5%); 21,5%, tabaco, e 13,7% álcool. Nessa mesma amostra, os autores pesquisaram as referidas substâncias em amostras de cabelo materno, encontrando prevalências maiores do que as relatadas, quais sejam, 15,4% de drogas ilícitas vs 4,3% com base no relato. Os dados por droga específica, com base na análise do cabelo, foram cocaína em 12,4%, THC em 3,8%, opioides em 1% e cetamina em 1%. Também havia 22,5% de uso de medicamentos (metadona 3,3%, benzodiazepínicos 11%, antidepressivos 9,1%, zopiclona - hipnótico não benzodiazepínico - 1%, e fentanil 1,4%). Nessa amostra, a análise do cabelo materno detectou 3,9% de exposição ao álcool.

Estudos sobre a prevalência do abuso de substâncias durante a gestação no Brasil ainda são escassos, mas o uso de cocaína e de crack parecem ter aumentado muito nos últimos

anos (CARLINI, et al., 2001). A gestante usuária de cocaína no Brasil é, na maioria das vezes, usuária de SPAs lícitas e maconha, assim como acontece em outros países (BAUER, et al., 2002).

Uma forma de avaliar o uso é aferir a prevalência da exposição intrauterina a partir de análises por ocasião do parto ou ao longo da gestação, seja na mãe (cabelo, urina e relato maternos; mecônio, urina e cabelo de RN). Um estudo transversal com 1.000 adolescentes grávidas em um centro obstétrico da cidade de São Paulo, com idade média de 16,9 anos, \pm 1,51, o uso de substâncias de abuso foi avaliado a partir da urina e do cabelo no terceiro trimestre gestacional. Foi uma amostragem de conveniência, com as pacientes já internadas. Os autores encontraram a prevalência de 6% de uso de drogas, sendo 4% maconha, 1,7% cocaína e 0,3% ambas as substâncias (MITSUHIRO, et al., 2006). Neste trabalho, o uso de drogas no primeiro e segundo trimestres não foi investigado, ou seja, a prevalência geral de exposição pré-natal a drogas pode estar subestimada. Wong (2000) registrou, em coletas realizadas em urina, no mecônio e no cabelo dos RN, prevalência de 20,5% de EPC em uma amostra de 44 RNs de baixo peso ao nascer em São Paulo. No mesmo estado, Martins-Celini (2001) observou a prevalência do uso de cocaína na gestação da ordem de 6%, mediante entrevista materna e triagem toxicológica em 479 puérperas.

Um estudo transversal, realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), avaliou a EPC a partir de 739 recém-nascidos, consecutivamente recrutados no ano de 1999. A presença de cocaína foi triada no mecônio e/ou por entrevista materna positiva, sendo que a idade média materna foi 24,4, anos \pm 6,8, sendo 73,9% de etnia branca e 78,5% com companheiro. Considerando apenas a entrevista, os autores detectaram 16 casos positivos (2,4%); todavia, avaliando a análise do mecônio, encontraram 25 casos (3,4%), sendo a prevalência final estimada em 4,6% quando os métodos para detecção foram utilizados de forma combinada. (CUNHA, 2000; CUNHA, et al., 2001). Dados desse mesmo estudo evidenciaram que, 43,7% das usuárias de cocaína suspenderam o uso após o primeiro trimestre da gestação. Recente levantamento nacional, que ouviu 25.000 pessoas em casa sobre as características das pessoas dos indivíduos que integram suas redes de relacionamentos, revelou que cerca de 10% das mulheres que usavam substâncias mencionaram que estavam grávidas no momento da entrevista e que mais da metade delas já havia engravidado ao menos uma vez desde o início do uso (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2013).

Um dos raros estudos em humanos, abordando gestantes usuárias de crack, foi realizado no nosso meio (ZAVASCHI, et al., 2014). O estudo foi transversal, com uma amostra de conveniência composta por 56 duplas de usuárias de crack e 89 duplas não expostas. A prevalência de uso de crack durante a gestação foi de 4,4%. A maioria das usuárias de crack, em comparação com as não usuárias, não tinha um parceiro (10,52% vs 4,4%, P = 0,001) e apresentou um QI mais baixo (78,15, +/- 8,07 vs 84,27 +/- 9,87; P = 0,002). A prevalência de transtorno de personalidade antissocial e risco de suicídio nas gestantes usuárias foi maior do que nas não usuárias (respectivamente, 24,44% vs nenhum, P<0,001; 28,26% vs 10,46%, P = 0,01). A maioria das mulheres com uso de crack não realizou atendimento de pré-natal (75%). Os bebês expostos ao crack durante a gestação pesavam significativamente menos do que os dos controles (2.858g vs 3.240g, P = 0,002). (ZAVASCHI, et al., 2014).

Salienta-se que a maioria das gestantes usuárias de crack é poliusuária, esperando-se principalmente exposição também ao álcool, nicotina e maconha (ZULE, et al., 2002; TORCHALLA, et al., 2011; ZAVASCHI et al., 2014).

2.4 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À COCAÍNA NA GESTANTE E NO BEBÊ EM DESENVOLVIMENTO

Na gestante, o uso de cocaína foi associado à desnutrição, hipertensão, doenças sexualmente transmissíveis, distúrbios psiquiátricos, acidentes vasculares e infarto agudo do miocárdio (CAIN, 2013). Sabe-se que se trata de uma população mais vulnerável, com menor sistema de apoio que se reflete, por exemplo, em menos consultas de pré-natal e mais doenças sexualmente transmissíveis. (LESTER, TRONICK, 2004; LESTER, et al., 1998; CUNHA, 2000; EIDEN, et al., 2006; INCIARDI, 2006; EDWARDS, HALPERN, WECHSBERG, 2006; KESSLER, et al., 2008; NAPPO, SANCHEZ, OLIVEIRA, 2011).

Em relação ao bebê e seu desenvolvimento, existem vários estudos a respeito da exposição a drogas na gestação, com a ressalva de ser difícil isolar o que seria efeito da cocaína no neurodesenvolvimento ou efeito de outras adversidades que acompanham a mãe e o ambiente familiar com dependência química (NAUD, et al., 1993; ZUCKERMAN, 1996; SISON, et al., 1997; LESTER, et al., 2002; MAYES, 2002; EIDEN, et al., 2006; BAGNER, et al., 2009). Por isso, um dos objetivos desta Tese de Doutorado é avaliar os biomarcadores

no sangue de cordão umbilical, enquanto o efeito do ambiente extrauterino ainda não teve oportunidade de se expressar.

A cocaína e alguns dos seus metabólitos são armazenados tanto no miométrio como na membrana placentária e são constantemente liberados no líquido amniótico, colocando o feto em uma exposição contínua à droga. (de GIOVANNI, MARCHETTI, 2012). Em relação ao feto e ao recém-nascido (RN), é frequente o abortamento e morte fetal (LUTIGER, et al., 1991; PICHINI, et al., 2005); descolamento prematuro de placenta (SHIONO, et al., 1995; BAUER, et al., 2002); líquido amniótico meconial (CHASNOFF, et al., 1987; MASTROGIANNIS, et al., 1990); síndrome de aspiração de mecônio, contratilidade uterina anormal, ruptura uterina, prematuridade (CHASNOFF, et al., 1987; BADA, et al., 2002; BAUER, et al., 2005); placenta prévia, rompimento prematuro de membranas, crescimento intrauterino retardado, diminuição do peso, do comprimento e do perímetro cefálico médio dos RNs (COHEN, et al., 1991; LESTER, et al., 1991; SOTO, 2013; JANISSE, et al., 2014), e asfixia perinatal (RYAN, et al., 1987).

Várias revisões e meta-análises têm revisado a EPC através da infância precoce. Muitas vezes, o crescimento pré-natal é restrito no útero, levando ao encurtamento do tempo gestacional e de um peso de nascimento inferior. (GOUIN, 2011; NORDATROM-KLEE, 2002).

Malformações congênitas geniturinárias (LUTIGER, et al., 1991; SOTO, 2013), visuais (TSAY, et al., 1996), auditivas (LESTER, et al., 2003), cardiovasculares (MEHTA, et al., 2001; 2002; REGALADO, et al., 2001), esqueléticas e gastrointestinais foram associadas à EPC.

A literatura tem demonstrado que a exposição a drogas durante a gestação está associada a alterações neurocomportamentais, que podem envolver alterações da interação do bebê ou da criança e seus pais e demais indivíduos (JOHNSON, et al., 2002; MINNES, et al., 2005; TRONICK, et al., 2005). São descritos, por exemplo, distúrbios do desenvolvimento cognitivo e da linguagem (JACOBSON, et al., 1996; SINGER, et al., 2001; MILLER-LONCAR, et al., 2005; ACKERMAN, et al., 2010), dificuldades de aprendizado (MORROW, 2006), anormalidades neurológicas e comportamentais, tais como irritabilidade, labilidade, diminuição da regulação do comportamento autônomo e pobre estado de alerta e de orientação (CHIRIBOGA, et al., 1995; DELANEY-BLACK, et al., 1996; EYLER, 1999; BENNETT, BENDERSKY, LEWIS, 2002; BENDERSKY, BENNETT, LEWIS, 2006;

DENNIS, et al., 2006; CHIRIBOGA, KUHN, WASSERMAN, 2007; ACKERMAN, et al., 2010).

Em comparação com crianças não expostas, crianças com PCE podem demonstrar menor desempenho motor, reflexos e orientação durante as três ou quatro semanas após o parto (HELD, 1999) e menor pontuação nas medidas de funcionamento neurocomportamental: atenção e expressividade emocional (BANDSRA, 2010; FRANK, 2001) e desenvolvimento da fala e da linguagem nas idades de 4 a 6 anos. (CONE-WESSON, 2005).

A EPC está associada a alterações em alguns exames, como a ecografia cerebral (DIXON, BEJAR, 1989; SMIT, et al., 1994; KING, et al., 1995). Também há relato de alterações em eletroencefalograma, com irritabilidade do sistema nervoso central (SNC), com pontas ondas agudas e espigas (DOBERCZAK, et al., 1988; LEGIDO, et al., 1992). Há manifestações clínicas, como dificuldades na alimentação e no sono (MAONE, et al., 1992; REGALADO, et al., 1995; GEWOLB, et al., 2004) e sintomas de abstinência (ORO, DIXON, 1987; LESTER, et al., 1991; KING, et al., 1995).

O retardo na transmissão neuronal, ocasionado por atrasos na mielinização, foi documentado por vários autores que avaliaram RNs expostos à cocaína através de *auditory brainstem response* (ABR). (SHIH, CONE-WESSON, REDDIX, 1988; SALAMY, et al., 1990; POTTER, et al., 2000; LESTER, et al., 2003; TAN-LAXA, et al., 2004). O estudo do choro dos RNs expostos demonstrou dois padrões distintos: aumento da excitabilidade associado ao efeito direto da cocaína e padrão menos reativo, que decorre do efeito da cocaína sobre a nutrição fetal e que está associado à redução do peso do RN (LESTER, et al., 1991). Outros autores descreveram uma relação entre a quantidade de uso e os efeitos no choro do RN (CORWIN, et al., 1992).

Em uma meta-análise desenvolvida em 1999, Held, Riggs e Dorman, revisando 18 pesquisas sobre o efeito neurocomportamental da EPC – publicadas entre os anos de 1985 e 1998, encontraram diferenças no desenvolvimento motor, nos reflexos anormais e na presença de alterações do sistema nervoso autônomo (SNA), mas apontaram como principal achado a pequena magnitude dos efeitos da cocaína sobre o neurocomportamento do RN. Ressalta-se, no entanto, que efeitos neurocomportamentais sutis não devem ser considerados menos importantes do ponto de vista clínico ou epidemiológico. Diferenças de alguns pontos no quociente de inteligência (QI) das crianças expostas e dificuldades escolares e emocionais têm

intenso impacto pessoal, social e econômico (LESTER, 1998; LESTER, LAGASSE, BIGSBY, 1998; LESTER, LAGASSE, SEIFER, 1998).

Linda Mayes (2002) ressalta os efeitos teratogênicos da exposição perinatal à cocaína. A cocaína, incidindo sobre seres em desenvolvimento, pode alterar a ontogenia do sistema nervoso e, por extensão, o perfil dos mecanismos neurocomportamentais. A ação da cocaína sobre o sistema nervoso central (SNC) do feto depende do momento em que ele foi exposto. O desenvolvimento do SNC inicia no 28º dia após a concepção e continua durante a gestação e toda a infância, conferindo-lhe uma vulnerabilidade biológica continuada a insultos tóxicos (MALANGA, KOSOFSKY, 1999; RODIER, 2004). Em 1990, Salmay, et al., descreveram alterações na transmissão cerebral sugerindo uma mielinização alterada associada à EPC.

Por mais de duas décadas, investigadores conduziram estudos que examinaram os efeitos da exposição pré-natal à cocaína (EPC) nas habilidades de linguagem das crianças, mostrando resultados contraditórios. (HAWLEY, HALLE, DRASIN, THOMAS, 1995; HURT, MALMUD, BETANCOURT, BRODSKY, GIANNETTA, 1997; DELANEY-BLACK, et al., 2000, MORROW, et al., 2003; SINGER, et al., 2001). Lewis, et al. (2013), examinaram crianças que foram expostas à cocaína no útero (n = 183) e crianças que não foram expostas (n = 181) e que foram seguidas prospectivamente desde o nascimento até os 12 anos de idade. Os autores concluíram que a interpretação do significado da exposição à cocaína no pré-natal em relação às habilidades da fala e linguagem é difícil de ser mensurada devido aos múltiplos fatores biológicos e ambientais que afetam essas crianças. No estudo, os autores encontraram efeitos pequenos, mas significativos da EPC sobre as medidas padronizadas de linguagem. Esse grande estudo longitudinal documentou deficiências neurocomportamentais sutis em vários domínios cognitivos em toda a trajetória de desenvolvimento impactando a linguagem e os resultados acadêmicos. Embora as preocupações iniciais de que as crianças com EPC pudessem ter deficiências graves não tenham sido apoiadas, pequenas deficiências na linguagem e outras deficiências cognitivas foram observadas, podendo ter consequências negativas no rendimento escolar e realização profissional ao longo do tempo.

A EPC parece ser um fator de risco para problemas de externalização na infância. Estudos em modelo animal sugerem que EPC está relacionada com maior agressividade (JOHNS, MEANS, WOODLEY, MEANS, 1994; WOOD, SPEAR, 1998), e vários estudos em humanos encontraram que a EPC está associada ao aumento dos problemas de externalização em crianças pequenas (BADA, et al, 2011;. BENDERSKY, BENNETT,

LEWIS, 2006; DELANEY-BLACK, et al., 2004; LINARES, et al., 2006; MINNES, et al., 2010; RICHARDSON, GOLDSCHMIDT, SANGUESSUGA, WILLFORD, 2011; SOOD, et al., 2005). Outros estudos, no entanto, não encontraram relação entre EPC e problemas de externalização (ACCORNERO, ANTHONY, MORROW, XUE, BANDSTRA, 2006; BENNETT, BENDERSKY, LEWIS, 2002; GREENWALD, et al., 2011.; KILBRIDE, CASTOR, FUGER, 2006; MORROW, et al., 2009), levantando a questão sobre os problemas de externalização que ocorreriam apenas na presença de certos moderadores (sexo do bebê, riscos ambientais, problemas médicos neonatais). BENNETT, et al. (2013), avaliaram os efeitos da EPC em problemas de externalização em uma coorte de crianças de 8-10 anos (179 crianças: 74 expostas à cocaína no pré-natal), considerando também os efeitos da exposição pré-natal ao álcool, cigarros e maconha, saúde neonatal, risco ambiental, rede de apoio e sexo da criança. Os resultados do estudo indicaram que a EPC pode prever maior risco de problemas de externalização no final da infância. A relação entre EPC e os problemas de externalização foi encontrada após o controle de saúde neonatal, outras exposições pré-natais, riscos ambientais, e sexo.

Há sugestões na literatura de que alguns efeitos da EPC continuariam ao longo da infância, quiçá da adolescência. Um estudo longitudinal que avaliou crianças aos três, cinco e sete anos de idade revelou um efeito negativo e independente da EPC na trajetória de problemas de comportamento dessas crianças (JOSEPH, 1996). Beeghly, et al. (2014), examinaram 137 crianças de 9,5 anos de idade, nascidas a termo, provenientes de contextos urbanos de baixa renda (51% do sexo masculino), a partir de um estudo longitudinal prospectivo em andamento. Os resultados indicaram que o nível de exposição à cocaína no útero foi associado com menor pontuação nas tarefas de Atenção Auditiva e Memória Narrativa, sendo que ambos requerem processamento da informação auditiva e atenção sustentada para o desempenho bem-sucedido.

Uma revisão com adolescentes de 13 anos de idade encontrou associações entre EPC e problemas de comportamento, atenção, linguagem, cognição. (LESTER, 2009). Nesse sentido, Singer, et al. (2015), a partir do estudo da coorte de Cleveland, com uma amostra de 218 recém-nascidos expostos à cocaína e a outras drogas e 197 não expostos acompanhados desde o nascimento até a adolescência, revelaram que a exposição pré-natal à cocaína associou-se a efeitos significativos no crescimento fetal, na atenção, na linguagem, na organização perceptual visomotora, função executiva, problemas comportamentais externalizantes e risco de abuso de substância.

Outros estudos têm verificado uma associação entre EPC e desinibição comportamental (FISHER, 2011), uso de substâncias (LESTER, 2012) e maior comportamento sexual (de GENNA, 2014; LAMBERT, 2013). Minnes, et al. (2014), avaliando 358 adolescentes (183 com EPC e 175 não expostos à cocaína no pré-natal), também verificaram que os adolescentes com EPC usavam duas vezes mais tabaco, 2,2 vezes mais álcool e 1,8 vezes mais maconha do que adolescentes não expostos à cocaína no pré-natal.

Estudos de imagens também têm associado alterações morfológicas e funcionais com EPC. As anormalidades cerebrais foram estudadas por Lucca e Baldisserotto (2013), a partir de exames de ultrassom transfontanelar e revisão de prontuários em recém-nascidos expostos ao crack durante a gestação. Foram encontrados os seguintes achados: anormalidades em 45 dos 129 bebês (34,9%) dos quais 24 (18,6%) apresentavam cistos ependimais, 18 (14%) com vasculopatia lenticuloestriata, nove (7%) com hemorragia subependimal, e nove bebês (7%) com cistos no plexo coroide.

Liu, et al. (2013), por meio de RM em 40 adolescentes entre 13 e 15 anos de idade (20 com EPC e 20 sem EPC) e após controle para covariáveis, verificaram que a espessura cortical do córtex pré-frontal dorsolateral direito foi significativamente menor em adolescentes com PCE, enquanto o volume do pallidum foi menor em adolescentes após a exposição pré-natal ao tabaco. Impulsividade foi correlacionada com o volume do tálamo, quer após a PCE ou à exposição ao tabaco pré-natal. Os autores sugerem que a exposição pré-natal à cocaína ou ao tabaco pode afetar a maturação cerebral durante a adolescência, levando a uma maior suscetibilidade ao aumento da impulsividade. GREWEN, et al. (2014), estudou através de Ressonância Magnética (RM) RNs com 5 semanas de vida agrupados em 3 grupos: 33 RNs com EPC comorbido com outras drogas, 46 RNs controles livres de drogas e 40 com exposição pré-natal a outras drogas (nicotina, álcool, maquiagem, opioides, SSRIs), mas sem exposição à cocaína. O estudo revelou que as diferenças na substância cinzenta do cérebro foram impulsionadas principalmente pelo menor volume de substância cinzenta em regiões pré-frontais e frontais do cérebro em crianças com EPC. Os autores sugerem que a EPC está associada a deficiências estruturais na substância cinzenta cortical neonatal, especificamente em regiões pré-frontais e frontais envolvidas na função executiva e controle inibitório. Com metodologia semelhante, Salzwedel, et al. (2015), utilizando RM Funcional (RMf) numa amostra de 152 neonatos com EPC comorbido com outras drogas (tais como nicotina, álcool, maquiagem, e antidepressivos) vs neonatos expostos a drogas, mas não expostos à cocaína, e a

neonatos-controles sem exposição a nenhuma droga, detectaram um efeito específico da cocaína em uma sub-região da área fronto-amigdaliana. Os autores consideraram que essa via pode desempenhar um papel importante na regulação da excitação, a qual se tem mostrado comprometida em crianças e adolescentes com EPC.

Em suma, observa-se que as crianças com EPC apresentam alterações desde o pós-parto imediato, que podem permanecer ao menos até a adolescência. Tais alterações incluem, por exemplo, a desregulação autonômica, dificuldades no aprendizado e linguagem, problemas externalizantes e alterações na morfologia e circuitos cerebrais. Desconhecem-se, todavia, possíveis mecanismos neurobiológicos subjacentes e biomarcadores, o que seria de grande valia, tendo em vista a alta prevalência do problema.

3 BIOMARCADORES RELACIONADOS AO USO DE COCAÍNA E CRACK

A *Federal Drug Agency* (FDA) define **biomarcadores** como “uma característica que é objetivamente medida e é um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas biológicas a intervenções terapêuticas (WAGNER, 2002). No contexto do estudo das doenças e de seus tratamentos, a principal diferença entre biomarcadores e desfechos intermediários seria a de que um biomarcador é uma espécie de “candidato” a desfecho intermediário, no sentido de que ainda não foi devidamente **validado** e **qualificado**, mas que é “bastante provável” que tenha ligação direta com o desfecho clínico (KATZ, 2004). Define-se como **validação** o processo de verificação de desempenho do biomarcador em medir o que é proposto, incluindo sensibilidade (a capacidade de detectar quando o resultado é positivo acertadamente), especificidade (a capacidade de detectar quando o resultado é negativo acertadamente) e reprodutibilidade (mostrar sempre o mesmo resultado, quando a avaliação é repetida). Já a **qualificação** é o processo de relacionar o biomarcador com o desfecho clínico de interesse, de forma a ele poder funcionar como desfecho intermediário. Frequentemente, esses dois processos são usados como sinônimos na literatura, mas o *Biomarkers Definitions Working Group* reforça a necessidade de que sejam diferenciados adequadamente (WAGNER, 2002). É interessante perceber que, por essas definições, o FDA possivelmente aceita como desfechos intermediários biomarcadores que foram validados, mas não exige que tenham sido qualificados.

Há vários tipos de biomarcadores descritos (BOUGH, et al., 2013):

- Biomarcadores mecanísticos: referem-se a processos patofisiológicos subjacentes à doença. Por exemplo, na classificação molecular de um fenótipo, como a dependência à cocaína.
- Biomarcador de toxicidade: referem-se à medida dos efeitos biológicos consequentes a uma doença, sem ter uma relação mecanística com a mesma. Por exemplo, as consequências do abuso de cocaína.
- Biomarcador diagnóstico: uma medida mecanística de um fenótipo de doença, usada para definir o curso de um desfecho clínico.
- Biomarcador prognóstico: uma medida de “risco” que indica a probabilidade de progressão de uma doença
- Biomarcador farmacodinâmico: uma medida farmacoterapêutica que poderia ser usada para avaliar eficácia clínica.

- Biomarcador preditivo: uma medida que indica se um paciente provavelmente responderá a um determinado tratamento *a priori*.

3.1 BIOMARCADORES UTILIZADOS EM RELAÇÃO À COCAÍNA

A busca por novos candidatos a Biomarcadores é um assunto de grande relevância para a pesquisa clínica em Dependência Química. Existem alguns candidatos a biomarcadores já relatados na literatura, mas ainda nenhum que já tenha sido adequadamente validado e qualificado. De fato, o desenvolvimento de biomarcadores para dependência à cocaína ainda é incipiente, com diversos enfoques possíveis. (BOUGH, et al., 2013). Entre eles, há alguns achados em neuroimagem (BOUGH, et al., 2013; KOOB, VOLKOW, 2010), expressão gênica (DUCCI, GOLDMAN, 2012; LI, MAO, WEI, 2008), algumas alterações neurocognitivas (DUKA, CROMBAG, STEPHENS, 2011), e neurotrofinas. Em relação às neurotrofinas, elas ainda são pouco estudadas especificamente em relação ao uso de *crack*, sobretudo em adolescentes, e serão aqui revisadas. É sabido que psicoestimulantes como a cocaína afetam o sistema imune e os níveis séricos de citocinas inflamatórias, podendo inclusive influenciar o desempenho cognitivo e comportamental, o que pode lhes conferir papel na etiologia da dependência a estimulantes (YAMADA, NABESHIMA, 2004).

4 COCAÍNA E INTERLEUCINAS

O sistema imunológico é uma rede complexa concebida para proteger o hospedeiro contra ameaças externas (tais como bactérias e vírus) e ameaças internas (neoplasias). O sistema imunológico está organizado em resposta imune inata e adaptativa e ambos lançam mão de células imunes para realizar seus intentos de proteção do organismo. A imunidade mediada por células envolve as interações de células T helper e células T citotóxicas com uma variedade de células alvo sugestão: células-alvo (ex.: macrófagos, monócitos e linfócitos, células dendríticas, entre outras). Tais células do sistema imune e outras células não imunes (fibroblastos, células endoteliais) produzem uma variedade de produtos, entre eles as interleucinas (citocinas), que promovem uma intercomunicação entre células e regulam a reação inflamatória de defesa. As interleucinas se comportam como se fossem os hormônios do sistema imunitário. (CHAPLIN, 2006).

As citocinas apresentam atividades tanto pró quanto antiinflamatórias. Em recente revisão da literatura sobre maus tratos na infância e marcadores inflamatórios, Coelho, et al. (2014), mencionam que a IL-6 estaria associada aos processos pró-inflamatórios, enquanto a IL-10, aos processos anti-inflamatórios em concordância com outros estudos (KHANDAKER, 2014; WANG, 2015)

Sabe-se que o sistema imunológico neonatal é imaturo, em relação ao sistema imunológico adulto (DIESNER, 2012). Ou seja, há uma predominância da resposta anti-inflamatória, provavelmente em decorrência da imunossupressão fisiológica durante a gestação necessária para manter o feto sem rejeitá-lo como um corpo estranho (CHATTERJEE, 2014). À ou Diante da ausência relativa de produção de interleucina 12, que não atinge os níveis de adultos até o final da infância, tem sido sugerido favorecer respostas anti-inflamatórias. (DIESNER, 2012). Durante a gravidez, espera-se um balanço dinâmico delicado entre as citocinas inflamatórias e anti-inflamatório, a fim de proteger o crescimento e desenvolvimento do feto e da placenta (CHATTERJEE, 2014).

Estudos em modelo animal evidenciam que os psicoestimulantes, como a cocaína, afetam o sistema imune e alteram os níveis circulantes de citocinas inflamatórias os quais influenciam alterações cognitivas e comportamentais em roedores (YAMADA, NABESHIMA 2004). No SNC, as citocinas interagem com o metabolismo dos neurotransmissores e com a plasticidade neural no cérebro (DANTZER, et al., 2008). As citocinas têm a capacidade de influenciar a síntese, liberação e recaptção de

neurotransmissores relevantes para o humor, incluindo as monoaminas e glutamato em áreas relacionadas com a recompensa (GUYON, et al. 2009). Esses mediadores pró-inflamatórios são importantes para fornecer suporte trófico para neurônios dopaminérgicos, aumentando a neurogênese hipocampal (BACHSTETTER, et al. 2011), também modulam a sobrevivência de células dopaminérgicas e pioram sua viabilidade no contexto da neuroinflamação (KOPRICH, et al., 2008; CIPRIANI, et al., 2011). Outros estudos indicam envolvimento glial na remodelação sináptica sendo mediados por meio de citocinas as quais podem afetar ambas as funções sinápticas e a morfologia dos neurônios (BOULANGER, 2009; PAOLICELLI, et al., 2011).

Alguns trabalhos têm relatado que as ações farmacodinâmicas de drogas de abuso também são produzidas e reforçadas pela ativação central de sinalização imune em áreas e vias relacionadas aos processos de dependência (COLLER, HUTCHINSON, 2012). Algumas citocinas (entre elas a IL-6), estimuladas pelo uso de cocaína, interferem nas moléculas de aderência aumentando a permeabilidade da Barreira Hemato-Encefálica (BHE), ampliando ainda mais a inflamação, por meio do ingresso de outros componentes do processo inflamatório no SNC. (URIGÜEN, CALLADO, 2010; CABRAL, 2006.)

A dependência à cocaína é um estado de estresse crônico. (SINHA, 2001). Os efeitos da EPC sobre a atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) infantil medidos pela reatividade ao cortisol aos sete meses de idade revelaram que crianças expostas tiveram uma alta amplitude de reatividade do cortisol em comparação com crianças nãoexpostas à cocaína (EIDEN, 2009). Estresse persistente desencadeia uma série de alterações nas citocinas. O estresse crônico leva à ativação do eixo HPA, eixo do sistema nervoso simpático e das fibras do nervo vago, que promovem a secreção de glicocorticóides, catecolaminas e acetilcolina, desse modo perturbando a homeostase das citocinas (TIAN, 2014).

Estudos especificamente envolvendo medida de interleucinas e humanos expostos à cocaína são pouco comuns. Existe relato de mais altos níveis circulantes de interleucinas IL-1 β , TNF- α e IL-10 em estudo com 53 homens expostos a crack/cocaína em comparação a 50 controles (NARVAEZ, et al., 2013). Gan, et al. (1998), estudaram os níveis de IL-10 em pacientes dependentes de cocaína em abstinência de quatro dias, antes e após uma infusão de cocaína intravenosa, e compararam os níveis aos de controles não-usuários de drogas. Encontraram níveis aumentados de IL-10 nos pacientes em relação a controles e a diminuição de tais níveis após a administração de cocaína nos mesmos (sugestão) pacientes. Concluíram que o uso crônico de cocaína parecia aumentar IL-10, enquanto o uso agudo suprimia sua

secreção, correlacionando esses dados à grande vulnerabilidade dos dependentes de cocaína ao HIV. Porém, cabe ressaltar que os níveis só foram medidos após um breve período de abstinência e que não foram considerados os efeitos da abstinência aguda sobre os níveis das medidas. Outro estudo com metodologia semelhante, (IRWIN, et al., 2007), encontrou níveis reduzidos de IL-6 em pacientes dependentes de cocaína abstinentes por dois dias, em relação a controles não usuários, além de uma capacidade menor de secreção de IL-6 em resposta a uma estimulação do sistema imune por antígenos de bactérias. Moreira, et al. (2015), avaliando os níveis séricos de IL-6 e IL-10 em 12 usuários de cocaína (9 homens e 3 mulheres) e 24 controles saudáveis, entre 18 e 35 anos de idade, na cidade de Pelotas, RS, Brasil, verificaram um aumento estatisticamente significativo na IL-6 ($p=0.037$) e uma diminuição nos níveis de IL-10 (0.007), sugerindo uma ativação do sistema imune nos usuários de cocaína em comparação ao grupo controle e um distúrbio no balanço das citocinas pro e anti-inflamatórias (MOREIRA, 2015).

Identificaram-se dois estudos avaliando medidas de citocinas e exposição pré-natal à cocaína. Em ambos, as citocinas não foram a medida de desfecho principal. Johnson, et al. (1996), avaliaram os efeitos da abstinência aguda de cocaína no sistema imune de mulheres grávidas, não mostrando diferenças entre as medidas de IL-2 (citocina pró-inflamatória) em gestantes usuárias de cocaína ($n=13$), gestantes não usuárias de cocaína e em mulheres sem exposição à cocaína que não estavam grávidas. Nesse estudo, não foi realizada medida das citocinas nos bebês. Outro estudo, investigando 5 casos e 5 controles de um total de 91 indivíduos (a perda foi justificada, em virtude de, poucas amostras de sangue coletado possuírem quantidade suficiente de soro para a análise das citocinas), descreveu uma redução nos níveis de IL-1 (citocina pró-inflamatória) e IL-2 (citocina pró-inflamatória) nos recém-nascidos, através de medidas no sangue de cordão umbilical. Os autores não evidenciaram alterações nas medidas de IL-4 (citocina anti-inflamatória) e interferon- γ (citocina pró-inflamatória). (KARLIX, 1998).

O interesse de estudar as interleucinas no sangue de cordão umbilical nos bebês seria mais um passo na busca de algum marcador biológico de neuroinflamação causada pelo uso do crack feito pela mãe durante a gestação e, conseqüentemente, na busca de integrar a hipótese da neuroinflamação na saúde mental da criança. O crack expõe o feto a um estresse crônico. Estudos envolvendo fatores de risco desenvolvimental, resiliência e psicopatologia demonstram alterações no eixo HPA. O cortisol e os glicocorticoides têm demonstrado efeitos no sistema imune, bem como tem surgido hipóteses para um efeito na direção oposta. Vários

estudos têm evidenciado associação entre neuroinflamação e transtornos psicológicos em adultos (ansiedade, depressão e alterações na função cognitiva) e autismo em crianças. Além de tentar ampliar o entendimento de um possível mecanismo de vulnerabilidade neurobiológica na nossa amostra de recém-nascidos expostos, buscamos também pesquisar precocemente alguma alteração que nos permita a identificação de biomarcadores muito cedo no processo de neurodesenvolvimento, antes da exposição a outras adversidades externas, comuns na evolução dessas crianças.

5 COCAÍNA E ESTRESSE OXIDATIVO

A produção de radicais livres é um processo natural da fisiologia celular (IKONOMIDOU, KAINDL, 2011). Os radicais livres existem em diversos órgãos do corpo, desempenhando funções no sistema imune, por exemplo, como importantes agentes antimicrobianos dentro das células fagocíticas (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007a). Desempenham, também, importante papel como sinalizadores intracelulares. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007a). Sua produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de Trifosfato de Adenosina (ATP) (energia), por meio da cadeia transportadora de elétrons. Porém, a produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos. A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos culminou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante. Esses têm o objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes (HALLIWELL, POUSEN, 2006). A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pela mitocôndria é usualmente considerada a principal causa de EO (KRAUSE, 2007). A instalação do processo de EO decorre de um desequilíbrio entre a produção de compostos oxidantes (espécies reativas de oxigênio) e a capacidade do sistema antioxidante de neutralizá-los (SIES, 1997). Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (HALLIWELL, 2007b).

Embora exista um considerável corpo de conhecimento a respeito da geração de radicais livres em consequência da exposição à cocaína, o possível papel dos radicais livres ainda está longe de ser elucidado (POMIERNY-CHAMIOLO, et al., 2013; ÁLVARO-BARTOLOMÉ, et al., 2011).

Acredita-se que a cocaína possa aumentar o EO pela contração dos vasos uterinos e placentários (DOLKART, PLESSINGER, WOODS, 1990; LIPTON, et al., 2002; PATEL, et al., 1999; WOODS, 1992) com consequente hipóxia ao feto (HARGRAVE, CASTLE, 1995). Outra forma de a cocaína levar à indução do EO é por meio da toxicidade de seus metabólitos, como a norcocaína, nitróxido norcocaína, N-hidroxinorcocaína e norcocaína nitrosonium, entre outros (KOVACIC, COOKSY, 2005). Tais metabólitos geram ERO como o superóxido, e uma das consequências pode ser a peroxidação lipídica, a qual pode ser mensurada laboratorialmente pelo TBARS. Dietrich, et al. (2005), demonstraram que a administração de

cocaína, aguda ou crônica, aumentou a produção de hidroperóxido e peróxido lipídico no córtex frontal e estriado, duas estruturas cerebrais que contêm numerosos terminais nervosos dopaminérgicos. É sabido que a cascata respiratória mitocondrial produz ERO como um dos seus subprodutos, por meio da respiração normal (BOVERIS, et al., 1972). A formação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) ocorre da transferência de elétrons livres a locais específicos do oxigênio molecular na cascata de transporte dos elétrons, situada na membrana interna da mitocôndria.

Lipton, et al. (2003), demonstraram que, após uma injeção de cocaína em ratas grávidas, seus fetos apresentavam uma redução de 16,38% no nível de glutathione cerebral, significando maior recrutamento do sistema antioxidante. Nesse estudo, a hipótese para o achado foi de que a vasoconstrição causada pela cocaína resultou em hipóxia no feto, aumentando o EO, com consumo de antioxidantes como a glutathione. Em outro estudo em modelo animal, os autores injetaram cocaína em ratas grávidas, medindo o óxido nítrico e o TBARS pós-natal. Também testaram a capacidade de aprendizado dos filhotes expostos à cocaína. Inicialmente, viram que os filhotes nasceram com maiores níveis de TBARS e óxido nítrico em comparação aos controles, no hipocampo. Após 25 dias, foram realizados testes de comportamento em parte da amostra desses animais (aquela que não foi sacrificada para medidas de hipocampo *post mortem*), vendo-se que o grupo que recebeu cocaína intraútero teve menor desempenho (BASHKATOVA, et al., 2006).

Pomierny-Chamiolo, et al. (2013), estudaram o efeito da cocaína por meio da atividade da Superóxido Desmutase (SOD), a qual faz parte do sistema antioxidante enzimático, em ratos, demonstrando aumento dessa enzima no hipocampo (+ 18% ± 8), córtex frontal (+ 41% ± 14,5; $p < 0,05$) e estriato dorsal (+ 88% ± 9; $p < 0,001$), após a autoadministração de cocaína em comparação à autoadministração de solução salina. Os mesmos autores avaliaram os níveis de malondialdeído (MDA), produto do EO, em ambos os grupos e encontraram uma diminuição do MDA no hipocampo (-12% dos controles) e no córtex frontal (-14% dos controles, $p < 0,05$) no grupo de autoadministração de cocaína. No estriato dorsal, ocorreram reduções de MDA em ambos, tanto na administração ativa (-16% ± 7; $p < 0,05$) quanto na administração passiva (-11% ± 0,5; $p < 0,01$). Os achados indicam que existe uma associação entre biomarcadores de EO nos processos motivacionais relacionados ao uso voluntário de cocaína em ratos. Indicam, ainda, que a cocaína autoadministrada leva a um dano oxidativo mais potente do que a administração passiva. O EO influencia a memória e o aprendizado. Danos nessas funções podem estar envolvidos em mecanismos de toxicidade e

adição a drogas. Macêdo, et al. (2009), após administrarem doses elevadas de cocaína a ratos, observaram que aqueles pré-tratados com vitamina E (tocoferol) obtiveram menores índices de convulsão (60% x 100%) e maiores índices de sobrevivência (40% x 87,5%) do que os não tratados, indicando a possibilidade de efeito antioxidante da vitamina E.

Estudos em humanos sobre os níveis de TBARS periférico têm mostrado resultados conflitantes. O estudo de Narvaez, et al. (2013), não mostrou alterações entre pacientes dependentes de cocaína em tratamento ambulatorial e controles usuários de outras substâncias, enquanto outro estudo do mesmo grupo (SORDI, et al., 2014), apesar de não mostrar diferença entre pacientes e controles numa comparação direta, mostrou uma significativa elevação dos níveis de TBARS de pacientes mais gravemente dependentes após período de abstinência em internação, quando comparados àqueles com dependência menos grave.

Em estudo de cultura com células progenitoras neuronais humanas (*Human Neural Progenitor Cells* - HNPC) com cocaína, foram dosados diferentes marcadores de EO. Os autores encontraram um aumento do EO, medido pelo carbonil após 48h da exposição aguda à cocaína, que seguiu aumentando até 96h, em comparação às células que não receberam cocaína, nas quais não houve aumento de carbonil em momento algum. Um curso similar foi observado com a peroxidação lipídica e a glutatona, que passou a diminuir após 48h. A morte celular, medida pelo citocromo C, ocorreu após 72-96h, não sendo observada no grupo de células controle (POON, et al., 2007). Álvaro-Bartolomé, et al. (2011), demonstraram, em necropsia de cérebros humanos de usuários de cocaína, uma degradação aumentada da PARP 1 (Poli[ADP-ribose] polimerase1), um marcador de apoptose, indicando a possibilidade de morte celular aberrante.

Observa-se que a maioria dos estudos advém de modelo animal. Há poucos estudos especificamente em humanos, havendo distintas formas na avaliação do EO. Zaparte, et al. (2015), pesquisaram os níveis séricos de proteína carbonil, conteúdo proteico de tióis, superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), glutatona reduzida (GSH) e potencial reativo antioxidante total (TRAP) em 30 pacientes femininas internadas por dependência ao crack (não gestantes). Encontraram níveis elevados de proteína carbonil e conteúdo total de tióis nas pacientes após quatro dias de abstinência, e níveis significativamente mais baixos de SOD, GPx, GSH e TRAP, quando comparadas a controles. Após 18 dias de abstinência, elevaram-se os níveis de SOD, GPx, GSH e TRAP nas pacientes, enquanto os níveis de proteína carbonil e conteúdo proteico de tióis haviam diminuído. Em

conjunto, esses dados sugerem que mulheres dependentes de crack apresentam, ao internar, aumento do EO e que o tratamento, incluindo a abstinência do crack, conseguiu reduzir o EO nas pacientes, diminuindo os níveis dos marcadores associados com a oxidação e aumentando os níveis das enzimas antioxidativas.

Apesar do benefício de se poder isolar o que é especificamente efeito da cocaína em animais, há uma série de limitações nos modelos animais, como dose, via de administração, ausência de exposição a eventos ambientais adversos usualmente vistos em dependentes químicos. Ao buscar estudos sobre EO e cocaína em humanos, a literatura é bem mais incipiente. Em gestantes usuárias de crack ou cocaína e/ou bebês com exposição intraútero a estas substâncias, não foram encontrados estudos. Tal lacuna na literatura motivou a avaliação do TBARS como um possível biomarcador, com resultado explorado no segundo manuscrito.

6 COCAÍNA E BDNF

O grupo de Kapczinski (KAPCZINSKI, et al., 2008) adaptou o modelo da **carga alostática** para o transtorno bipolar e propôs uma série de medidas bioquímicas para avaliar o impacto cerebral e físico do transtorno bipolar. **Alostase** significa, literalmente, manter o equilíbrio – ou homeostase – durante a mudança; no contexto da fisiologia cerebral, significa a adaptação hormonal e resposta ao estresse necessária para manter a sobrevivência (física e mental) do indivíduo perante estressores. (McEWEN, 2000). É como se, numa situação de privação, estresse ou toxicidade, o equilíbrio normal do organismo – a homeostase – não fosse mais possível de ser mantido, e um novo ponto de equilíbrio que levasse em consideração a situação adversa necessitasse ser encontrado e mantido – e a isso denominaríamos alostase. A **carga alostática**, por sua vez, é o preço que o organismo paga por ter de se manter esse equilíbrio fora da homeostase – apesar de alto, menor do que o preço de perder totalmente o equilíbrio.

Algumas medidas indicadoras sistêmicas de **alostase e toxicidade** são as neurotrofinas BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), NT-3 (Neurotrophin 3), GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor), marcadores de stress oxidativo - TBARS (thiobarbituric acid reactive substances), PCC (protein carbonyl content), TRAP (total reactive antioxidant potential) e mediadores inflamatórios (IL8, IL1b, IL6, IL10, TNF). Em outro estudo publicado por esse grupo (KAPCZINSKI, et al., 2010), os pesquisadores construíram um índice desses biomarcadores, que estava baixo em pacientes eufímicos e controles, elevado em maníacos e deprimidos e muito elevado em pacientes com sepse. Tais achados sugerem que esses possam ser um pool de biomarcadores periféricos que se alteram após uma agressão ao organismo. Esses biomarcadores não são específicos para transtorno bipolar, pelo contrário, são marcadores inespecíficos associados a diversas patologias e acredita-se que possam mediar esse processo adaptativo do organismo frente a estressores, incluindo substâncias de abuso. Já há alguns estudos apontando que a alostase relacionada ao Transtorno Bipolar poderia levar a uma desregulação do sistema de recompensa cerebral, levando à necessidade de automedicação com drogas de abuso por parte dos pacientes, ligando, portanto, ambos os transtornos por esse modelo (PETTORRUSO, et al., 2014).

A investigação da relação entre a dependência de crack e a alteração das neurotrofinas pode contribuir para a identificação de mecanismos bioquímicos por meio dos quais ocorre a redução de volume cerebral e deficiências cognitivas. As neurotrofinas, em especial o BDNF,

parecem estar implicadas na base fisiopatológica de diversas doenças neurodegenerativas e psiquiátricas. Os fatores neurotróficos são responsáveis pelo crescimento neuronal e o estabelecimento das conexões sinápticas entre os neurônios. Evidências clínicas (CUNHA, et al., 2006; ROSA, et al., 2006; RYBAKOWSKI, BORKOWSKA, CZERSKI, SKIBIŃSKA, HAUSER, 2003) e experimentais (FREY, ANDREAZZA, CERESÉR, et al., 2006; FREY, ANDREAZZA, ROSA, et al., 2006; WALZ, et al., 2008) revelaram que os níveis de fatores neurotróficos estão alterados em pacientes com transtornos do humor, bem como em modelos animais desses transtornos. O BDNF parece mediar os principais processos dependentes de estímulo externo, como aprendizado, experiências e memórias, incluindo efeito das substâncias de abuso (JANAK, et al., 2006). Ainda, o BDNF é expresso em áreas do sistema nervoso central relacionadas à adição, como amígdala, córtex pré-frontal e neurônios dopaminérgicos mesolímbicos, e estudos em animais sugerem que o BDNF possa ter um papel importante nos efeitos agudos, na sensibilização, nas respostas condicionadas, na fissura e na recaída de estimulantes (COROMINAS, RONCERO, RIBASES, CASTELLS, CASAS, 2007).

O estudo conduzido por Grimm, et al. (2003), com um modelo de autoadministração de cocaína usando ratos encontrou resultados bastante interessantes em relação aos níveis de BDNF em três áreas cerebrais: Área Tegmental Ventral (VTA), Accumbens e Amígdala. Para esse propósito, compararam os níveis de BDNF de uma amostra do tecido dessa área cerebral em grupos de ratos que haviam sido submetidos ao processo de dependência à cocaína e posterior abstinência de 1, 30 ou 60 dias, além de ratos controles que auto-administravam sucrose. O resultado encontrado é que os níveis de BDNF aumentam conforme aumenta o tempo de abstinência nas três áreas pesquisadas, apesar de ser mais discreto na VTA, em que aumenta apenas até 30 dias de abstinência, depois se mantendo estável. Na Amígdala e no Accumbens, aumenta aos 30 dias e aumenta ainda mais em 90 dias. Os níveis encontrados são sempre mais altos do que nos controles, a partir da medida de 30 dias de abstinência. Esses resultados ilustram como a abstinência de cocaína produz alterações nos níveis de BDNF mesmo após 90 dias de abstinência, sugerindo que as alterações induzidas pela cocaína (ou sua abstinência) são bastante duradoras. Os autores correlacionam esse achado com a responsividade a estímulos relacionados à cocaína encontrados nesses ratos, também medida no estudo. É interessante assinalar que os pesquisadores também mediram os níveis de NGF nessas mesmas amostras, mas não encontraram alterações.

O papel do BDNF na dependência à cocaína é controverso e ainda bastante confuso, mesmo após diversos estudos em modelos animais (LI, WOLF, 2014). Em relação à abstinência, ele pode ser associado tanto à incubação como à supressão da mesma, dependendo da forma, do tempo e do local em que é medido (LI, WOLF, 2014).

Existem alguns estudos relacionando os níveis de BDNF à dependência de cocaína em humanos. Em um estudo em humanos com dependência de cocaína, não houve alteração do BDNF em relação a controles. (ANGELUCCI, et al., 2007). Esse mesmo estudo mostrou uma redução do NGF (*nerve growth factor*) em usuários de cocaína em relação a controles. O NGF é outra neurotrofina, a qual tem um papel importante na função e sobrevivência dos neurônios colinérgicos. Um estudo de caso-controle com pacientes adultos dependentes de cocaína e controles saudáveis (D'SA, FOX, HONG, DILEONE, SINHA, 2011) mostrou níveis mais elevados de BDNF periférico em dependentes de cocaína após três semanas de abstinência, quando comparados a controles. Além disso, mostrou também que níveis de BDNF mais altos entre os pacientes estavam associados a maiores taxas de recaída em 90 dias, cada unidade a mais de BDNF correspondendo a um aumento em 9% na chance de recaída em 90 dias.

Outro estudo (COROMINAS-ROSO, et al., 2013), com amostra similar, de pacientes adultos dependentes de cocaína, mediu os níveis de BDNF no momento da internação (início da abstinência, com uso de cocaína no dia anterior) e após 12 dias de abstinência, e comparou tais níveis com os de controles saudáveis. Encontraram diminuição dos níveis de BDNF nos pacientes em relação aos controles, sendo que o período de abstinência de 12 dias aumentou os níveis de BDNF nos casos. Adicionalmente, encontraram associação do aumento do nível de BDNF com os sintomas de fissura, medidos com a escala CCQ (*cocaine craving questionnaire*), nos pacientes, concluindo que o BDNF possivelmente estivesse aumentado em regiões cerebrais relacionadas com a fissura e que poderia ser considerado um marcador de dependência à cocaína.

O estudo de Narvaez, et al. (2013), com pacientes adultos com diagnóstico de Dependência de crack em tratamento ambulatorial foi o primeiro do tipo realizado no Brasil. Encontraram níveis aumentados de BDNF nos pacientes em comparação com controles saudáveis. Essa associação só era encontrada nos pacientes que haviam utilizado crack nos 30 dias anteriores, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os que estavam abstinentes e os controles.

Um estudo com uma amostra de pacientes adultos masculinos dependentes de crack mostrou níveis reduzidos de BDNF nos pacientes no momento da internação, em comparação

a controles (von DIEMEN, et al., 2014). Os níveis de BDNF aumentaram durante a internação até a alta, mas ainda eram significativamente inferiores aos encontrados nos controles saudáveis. Além disso, havia uma correlação entre os níveis de BDNF e o número de pedras de crack consumidas nos 30 dias anteriores à internação, com um maior número de pedras consumidas associado a menores níveis de BDNF.

Outro estudo do mesmo grupo (SORDI, et al., 2014), também com pacientes masculinos internados para desintoxicação de crack, mostrou resultados similares, com níveis de BDNF significativamente menores nos pacientes internados em relação a controles saudáveis e com aumento significativo desses níveis durante a internação, aproximando-se aos de controles a ponto de não haver diferença estatisticamente significativa entre ambos. Além disso, por meio de um procedimento de estratificação de gravidade do uso de crack que levava em consideração o tempo de uso, a precocidade de início de uso e a quantidade média de uso de crack, demonstraram que pacientes menos graves apresentavam maiores níveis de BDNF no momento da alta, em comparação aos menos graves.

Viola, et al. (2014) pesquisaram, em uma amostra de 104 pacientes femininas dependentes de crack internadas, os níveis de um conjunto de neurotrofinas, incluindo o BDNF. Avaliaram também se a presença de trauma na infância se associava a alterações nesses níveis. Encontraram que os níveis de BDNF estavam significativamente mais elevados nas pacientes, tanto no quarto dia da internação como no 18º dia (as duas medições realizadas), sem alteração nos níveis durante a internação e aparentemente sem relação com a presença de trauma na infância.

Os estudos em humanos de BDNF e cocaína, até o momento, restringem-se a adultos (NARVAEZ, et al., 2013; von DIEMEN, 2013; COROMINAS-ROSO, 2013). Estudos em diferentes estágios do desenvolvimento são necessários, pois os níveis de BDNF variam de acordo com a etapa evolutiva. Na gestação, por exemplo, um estudo longitudinal em mulheres normotensas mostrou que os níveis de BDNF no primeiro trimestre são mais baixos em relação aos níveis no 2º e 3º trimestres (GARCÉS, 2014; D'SOUZA, 2014). Os níveis de BDNF no sangue do cordão umbilical aumentam com o aumento da idade gestacional (COUTHAL, 2003; MATOBA, 2009), demonstrando uma correlação positiva com a maturidade neuronal. Durante o desenvolvimento normal do cérebro, o BDNF mostra aumentada expressão em crianças quando ele desempenha um papel crucial na escultura e poda de circuitos sinápticos. No entanto, na idade adulta, a expressão constitutiva de BDNF diminui (KNAPSKA, KACZMAREK, 2004; AID, et al., 2007; GREENBERG, et al., 2009;

COHEN-CORY, 2010; McCARTHY, 2014). Assim, o BDNF mostra-se influenciável pela exposição à cocaína, esperando-se diferentes respostas de acordo com a faixa etária. Como tem um importante papel no desenvolvimento cerebral, é válido conhecer a sua expressão em bebês expostos ao crack/cocaine. O mesmo vale para gestantes, população ainda não avaliada nesse sentido.

Pelo exposto, parece não haver ainda, na literatura, dados que apontem para um comportamento uniforme nos níveis do BDNF periférico em usuários de cocaína e crack. Os diferentes desenhos de estudo e características específicas das amostras não nos permitem unificar os resultados adequadamente. Não há estudos específicos sobre o comportamento dessa neurotrofina em gestantes usuárias de crack.

7 OBJETIVOS

A presente linha de pesquisa tem dois objetivos gerais, contemplados, respectivamente, nos artigos 1 e 2.

1º) Avaliar a ativação inflamatória, a partir de IL-6 e IL-10, em bebês expostos ao crack intraútero em comparação a bebês não expostos, a partir do sangue de cordão umbilical (SCU) e no sangue periférico de suas mães no pós-parto imediato;

2º) Avaliar o EO, por medidas de substâncias reativas do ácido barbitúrico (TBARS) e BDNF- este como um possível marcador de desenvolvimento cerebral, em bebês expostos ao crack intraútero em comparação a bebês não expostos, no SCU e no sangue periférico de suas mães no pós-parto imediato.

8 HIPÓTESE

Hipótese do artigo 1: Bidirecional, em que bebês e mães expostas ao crack apresentarão diferença na ativação inflamatória em comparação às mães e aos bebês não expostos.

Hipótese do artigo 2: Para o TBARS em bebês, trabalha-se com uma hipótese bidirecional, em que os bebês com exposição intraútero à cocaína podem:

a) ter maior EO pelo efeito direto da cocaína - pela contração dos vasos uterinos e placentários com consequente hipóxia ao feto; ou pela toxicidade de seus metabólitos;

b) ter menor EO, ou ausência de diferença com o grupo controle, caso defesas antioxidantes endógenas sejam mobilizadas.

Para as puérperas e TBARS, espera-se uma diferença entre os grupos, bidirecional.

Para o BDNF, espera-se que os bebês expostos apresentem maiores níveis de BDNF em relação aos não expostos (unidirecional). Para as puérperas, espera-se uma diferença entre os grupos, bidirecional.

9 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Neste projeto, o processo de consentimento informado consistiu de um diálogo com as potenciais participantes sobre os objetivos, riscos e benefícios do estudo, além de explicação sobre a participação das mesmas no projeto. Foi fornecido um material impresso com os dados do estudo e foram solicitadas, após aceite para participação no estudo, a leitura e a assinatura do TCLE diferenciado para casos e controles, conforme anexos.

Este projeto está de acordo com a regulamentação 196/96, que regulamenta a pesquisa em seres humanos no Brasil. De acordo com as normas de pesquisa em saúde do Conselho Nacional de Saúde, o exame de fluidos corporais não é invasivo, a entrevista e o exame físico são considerados de risco mínimo para o paciente.

O nível de desconforto previsto para a intervenção é aceitável, e os benefícios potenciais sobrepujam esse nível de desconforto. Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa do HCPA com o título “Avaliação dos níveis séricos das neurotrofinas BDNF e nt-3 (neurotrofina 3), das citocinas IL-4 (interleucina-4) e IL-6 (Interleucina-6), (TNF-ALFA) fator de necrose tumoral, TRAP (potencial reativo antioxidante total), TBARS (substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico) e PCC (conteúdo de proteína carbonil) em gestantes usuárias de crack e no sangue do cordão umbilical (SCU) dos seus filhos”; projeto número 11-0095.

Apresenta-se nos anexos um artigo suplementar (Artigo 3), Relato de Caso, para o qual houve o consentimento da paciente e em que foram tomados os cuidados para não a identificar.

10 ESTUDO 1 – ARTIGO PRINCIPAL 1

Questão de pesquisa: Avaliar os níveis de IL-6 e IL-10 nas gestantes usuárias de crack e no sangue umbilical de seus recém-nascidos em comparação com as não usuárias.

Níveis de IL-6 e IL-10 no sangue de cordão umbilical de recém-nascidos com história de exposição ao crack/cocaína no útero: um estudo comparativo

IL-6 and IL-10 levels in the umbilical cord blood of newborns with history of crack/cocaine exposure in utero: a comparative study.

In press, Trends in Psychiatry and Psychotherapy

IL-6 and IL-10 levels in the umbilical cord blood of newborns with history of crack/cocaine exposure in utero: a comparative study.

Victor Mardini,^{a,b} Luis Augusto Rohde,^{a,b,c,d} Keila Maria Mendes Ceresér,^{b,e} Carolina de Moura Gubert,^e Emily Galvão da Silva,^e Fernando Xavier,^f Rodrigo Porcianello,^b Liane Marise Röhsig,^g Flávio Pechansky,^{b,d,h} Thiago G. Pianca,^{a,h} Claudia M. Szobot^{a,b,h}

^a Child and Adolescent Psychiatry Service (SPIA), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Rua Ramiro Barcelos, 2350, 4º andar, sala 400N, Santa Cecília, Zip Code 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Graduate Program in Medicine: Psychiatry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos, 2400, Santa Cecília, Zip Code 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Deputy Coordinator, Instituto Nacional de Psiquiatria do Desenvolvimento (INPD), Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 785, 1º andar, sala 6, Ala Sul, Cerqueira Cesar, Zip Code 05403-010, São Paulo, SP, Brazil.

^d Professor, Department of Psychiatry, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2400, Santa Cecília, Zip Code 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

^e Laboratory of Molecular Psychiatry and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), HCPA, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Santa Cecília, Zip Code 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.

^f Undergraduate Program in Biomedical Sciences, Centro Universitário Metodista–IPA, Rua Dona Leonor, 340, Rio Branco, Zip Code 90420-004, Porto Alegre, RS, Brazil.

^g Cord Blood Bank and Cryobiology Unit, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Santa Cecília, Zip Code 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.

^h Center for Drug and Alcohol Research, HCPA, UFRGS, Rua Professor Álvaro Alvim, 400, Rio Branco, Zip Code 90420-020, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail addresses: vmardini@hcpa.edu.br (V Mardini); lrohde@terra.com.br (LA Rohde); keila.cereser@uol.com.br (KMM Ceresér); cgubert@hcpa.edu.br (CM Gubert); emilydasilva@hcpa.edu.br (EG da Silva); fernando.coxavier@gmail.com (F Xavier); roudris@hotmail.com (R Porcianello); lrohsig@hcpa.edu.br (LM Röhsig); flaviopechansky@gmail.com (F Pechansky); cszobot@gmail.com (CM Szobot).

Corresponding author:

Victor Mardini
Rua Ramiro Barcelos, 2350, sala 400
90035-903 - Porto Alegre, RS
Brazil
vmardini@hcpa.edu.br
Tel.: +55-51-3359-8413; +55-51-3359-8294

ABSTRACT

Background: Prenatal cocaine exposure (PCE) is associated with neurobehavioral problems during childhood and adolescence. Early activation of the inflammatory response may contribute to such changes.

Methods: Our aim was to compare inflammatory markers (IL-6 and IL-10) both in umbilical cord blood (UCB) and in maternal peripheral blood at delivery between newborns with history of crack/cocaine exposure in utero (EN, $N=57$) and non-exposed newborns (NEN, $N=99$).

Results: After adjusting for potential confounders, mean IL-6 was significantly higher in EN than in NEN (10,208.54, 95%CI 1,328.54–19,088.55 vs 2,323.03, 95%CI 1,484.64–3,161.21; $p=0.007$; generalized linear model [GLM]). Mean IL-10 was also significantly higher in EN than in NEN (432.2189, 95%CI 51.44–812.88 vs 75.52, 95%CI 5.64–145.39, $p=0.014$; GLM). Adjusted postpartum measures of IL-6 were significantly higher in mothers with history of crack/cocaine use (25,160.05, 95%CI 10,958.15–39,361.99 vs 8,902.14, 95%CI 5,774.97–12,029.32; $p=0.007$; GLM), with no significant differences for IL-10. There was no correlation between maternal and neonatal cytokine levels (Spearman test; $p \geq 0.28$ for all measures). IL-6 and IL-10 might be early biomarkers of PCE in newborns.

Conclusions: These findings might help elucidate neurobiological pathways underlying neurodevelopmental changes and broaden the range of possibilities for early intervention.

Keywords: cytokines, pregnancy, crack cocaine, umbilical cord blood, newborn, interleukins.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A exposição pré-natal à cocaína está associada a problemas neurocomportamentais durante a infância e adolescência. A ativação precoce da respoustainflamatória pode contribuir para tais alterações.

MÉTODOS: Neste estudo transversal, o objetivo foi comparar os marcadores inflamatórios (IL-6 e IL-10) no sangue do cordão umbilical (SCU) e no sangue periférico materno na hora do parto, entre os recém-nascidos expostos ao crack intra-útero (RNE, n = 57) e recém-nascidos não expostos (RNNE, n = 99). Dados sociodemográficos e perinatais, psicopatologia materna, consumo de nicotina e outras substâncias foram sistematicamente coletados em casos e controles.

RESULTADOS: Após o ajuste para potenciais confundidores, a média de IL-6 foi significativamente maior nos RNE em comparação aos RNNE (10.208,54, IC95% 1.328,54 - 19.088,55 vs 2.323,03, IC95% 1.484,64-3.161,21; p = 0,007; modelo linear generalizado [MLG]). A média ajustada de IL-10 foi significativamente maior nos RNE do que RNNE (432,2189, IC95% 51,44 - 812,88 vs 75,52, IC95% 5,64 - 145,39, p = 0,014; MLG). Medidas pós-parto ajustada de IL-6 foram significativamente maiores nas mães que usaram de crack / cocaína (25.160,05, IC95% 10.958,15 - 39.361,99 vs. 8.902,14, IC95% 5.774,97 - 12.029,32; p = 0,007; MLG), sem diferenças significativas para IL -10. Não houve correlação entre os níveis maternos e neonatais de citocinas (teste de Spearman, $p \geq 0,28$ para todas as medidas).

CONCLUSÕES: IL-6 e IL-10 podem ser biomarcadores precoces da exposição pré-natal a cocaína em recém-nascidos. Estes resultados podem ajudar a elucidar as vias neurobiológicas subjacentes às alterações do desenvolvimento.

PALAVRAS-CHAVE: Cocaína crack, interleucinas, recém-nascido, gestação.

1 INTRODUCTION

Prenatal cocaine exposure (PCE) is considered a marker for potential development of neurobehavioral problems just after delivery and during childhood/adolescence¹⁻³. The harmful effects of intrauterine cocaine exposure are not restricted to mental illness. In animal models, changes in the cardiovascular system have been described⁴. In humans, changes in the neuroendocrine system and metabolic processes, with increased weight gain and childhood obesity, have been described^{5,6}. Taken together, these data suggest the hypothesis of a systemic effect promoted by cocaine exposure. Nevertheless, the pathways underlying these systemic effects in exposed newborns remain uncertain. One possible explanation, consistent with other conditions⁷⁻¹⁴, is the early activation of the inflammatory response.

Cocaine dependence is a chronic stress state¹⁵. This has been suggested by studies with neurobiological markers. Fox et al.¹⁶ compared 28 adults with cocaine dependence to 27 social drinkers and demonstrated an elevated inflammatory state, as measured by interleukin-10 (IL-10), among other factors. Another report found higher circulating levels of IL-1 β , TNF- α , and IL-10 in 53 male crack/cocaine addicts in comparison to 50 controls¹⁷.

Cocaine and its metabolites readily cross the placenta, reaching fetal tissues at high concentrations^{18,19} and deregulating fetal homeostasis. The effects of PCE on the activity of the infant hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and reactivity at 7 months of infant age revealed that exposed infants had a high amplitude of cortisol reactivity trajectory compared to non-cocaine-exposed infants²⁰. Sustained stress triggers a series of changes in cytokines. Chronic stress leads to the activation of the HPA axis, sympathetic nervous system axis, and vagus fibers, which promote the secretion of glucocorticoid, catecholamines, and acetylcholine, thus disturbing cytokine homeostasis¹⁴.

During child and adolescent development, it is difficult to distinguish what effects might be due to PCE and which may be due to other adversities. Cocaine-exposed infants experience higher levels of environmental risk and unstable caregiving²¹. This highlights the importance of identifying neurobiological markers temporally closer to intrauterine exposure. Studies focusing specifically on crack/cocaine–or cocaine–exposure and cytokines in newborns are scarce. There is only one study, in which cytokine levels were not the primary outcome measure and the sample size was small (five exposed infants and five controls)²².

It is known that the neonatal immune system is immature, relative to the adult immune system²³. Namely, there is a predominance of anti-inflammatory Th2 response, probably a

consequence of the gestational immunosuppression that is necessary to maintain the fetus without rejecting it as a foreign body²⁴. There is a relative absence of IL-12 production until the end of infancy, favoring Th2 response²³. During pregnancy, it is expected a dynamic and delicate balance between inflammatory and anti-inflammatory cytokines, in order to protect the growth and development of fetus and placenta²⁴.

Given the close relation between cocaine exposure and inflammatory response, the present study aims to evaluate markers of inflammation (IL-6 and IL-10) in newborns with history of crack/cocaine exposure in utero (exposed newborns, EN) as compared to non-exposed newborns (NEN) by measuring these markers in umbilical cord blood (UCB). This strategy enables identification of biomarkers very early in the neurodevelopment process, before exposure to other external adversities. The hypothesis is that greater activation of the inflammatory response will be observed in newborns with history of crack/cocaine exposure in utero. Secondly, we intend to evaluate the same markers in the postpartum period in the mothers of these newborns.

2 MATERIALS AND METHODS

Data were collected at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and Hospital Materno Infantil Presidente Vargas (HMIPV), in the city of Porto Alegre, Brazil, from January 2012 to September 2013. Both facilities are teaching hospitals as well as centers of excellence for high-risk pregnancy. All mothers provided written informed consent for participation, and the project was approved by the Research Ethics Committees of both hospitals.

2.1 Study design and sample

This was a cross-sectional study. The study factor was history of intrauterine exposure to crack/cocaine, and the outcome measures were serum levels of the cytokines interleukin (IL)-6 and IL-10 in UCB. As a secondary outcome, the same markers were evaluated in the serum of the newborns' mothers.

Mother/newborn dyads with history of crack/cocaine exposure underwent consecutive sampling at HMIPV. Mothers were questioned about use of substances of abuse at admittance to the hospital. During the study period, 2,228 births took place at HMIPV, and 105 mothers (4.7%) were identified as having history of crack/cocaine users. Of these 105 mothers, 62 (59%) were invited to participate in the study and we ultimately analyzed the UCB of 57 newborns (54%). Losses occurred due to a variety of reasons, including refusal, no report of past crack/cocaine use at the time of delivery, and absence of technical conditions for UCB collection.

To ascertain the profile of the pregnant crack/cocaine users who were not included in the sample ($N=43.41\%$), we used medical records to compare maternal age, educational attainment, ethnicity, presence of a partner, prenatal treatment status, mode of delivery, and presence of infectious diseases (hepatitis C, syphilis, and/or HIV) between participants and non-participants. We also compared Apgar scores at 1 and 5 minutes, newborn weight, and gestational age (GA) at neonatal examination. Newborn weight was significantly lower in mothers that did not participate in the study (2,653.46 vs. 2,878.09 g, $p = 0.02$), as were GA (37.30 [SD 2.50] vs. 38.64 [SD 2.4] weeks, $p = 0.02$) and prenatal care attendance ($p = 0.02$), with no other significant between-group differences (data available upon request).

The control sample of newborns and mothers without history of cocaine exposure was obtained from a group of pregnant women who participated in the HCPA Umbilical Cord and Placental Blood Bank (*Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário*, BSCUP) project. During the study period, 6,312 births took place at HCPA. Of this total, 1,050 pregnant women (16.6%) were screened for inclusion using systematic approach (Monday through Friday, from 8 a.m. to 11 p.m.). Of the screened women, 770 (73.3%) were eligible for the data collection, according to the Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy (FACT) criteria²⁵, which establish technical regulations for the operation of laboratories that process hematopoietic stem cells (HSC) from bone marrow and peripheral blood, as well as umbilical cord and placental blood banks. Among the 770 eligible women, the umbilical cords of 112 (14.5%) were discarded by the BSCUP due to low cellularity and/or low blood volume. These were the mothers and umbilical cords eligible for use in our control group. The discarded bags were sent to the laboratory where the present study was underway for processing and storage. Of the 112 potential participants, 99 (88.3%) actually entered the study as controls. Losses were due to refusal to participate in the survey, or because the

mother and newborn had been discharged from the hospital before the research team could invite them to participate.

To verify the representativeness of the mothers included in the control group, we randomly selected 68 (10.3%) pregnant women whose UCB had been collected during the study period and kept at BSCUP and reviewed their medical records. We compared the age, ethnicity, prenatal care, and mode of delivery of these women to those of mothers included in the study control group. We also compared infant gender, need for hospitalization, Apgar scores at 1 and 5 minutes, birth weight, GA at neonatal examination, and classification for GA between these groups. There was a significant difference in newborn weight (3,144.79 [SD 438.39] g in the study controls *vs.* 3,357.35 [SD 418.87] g in other donors; $p = 0.002$) and GA at neonatal examination (38.86 [SD = 1.24] weeks in study newborns *vs.* 39.26 [SD = 1.15] weeks among newborns not included; $p = 0.04$). No other significant differences were found (data available upon request).

The maternal inclusion criteria for the case group were history of crack/cocaine use and age 18–45 years, and the exclusion criteria were inability to understand and complete the neuropsychiatric questionnaires in the immediate postpartum period. The inclusion and exclusion criteria for controls relied on FACT criteria²⁵ (Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy, 2013). All mothers included in the control group were confirmed as non-drug users by their history and urinary tests (Bioeasy® cocainetest, Alere™, Brazil).

2.2 Instruments and variables

The independent variable was the history of crack/cocaine use during pregnancy. Potential confounders were: maternal IQ, maternal psychopathology, use of other psychoactive substances, and demographic and perinatal data. IQ was estimated by using the cube and vocabulary subtests of the WAIS-III^{26,27}. Maternal psychopathology was assessed using the Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI), Brazilian version 5.0.0/DSM-IV/Current²⁸. Use of psychoactive substances was evaluated with the Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test (ASSIST)²⁹, as previously used by our group³⁰. By taking these measures, we were able to evaluate substance use in the 3 months prior to delivery. Socioeconomic level was based on the ABA/ABIPEME criterion and dichotomized into high socioeconomic status (classes A and B) or low socioeconomic status

(classes C, D, and E)³¹. Age, self-reported ethnicity, marital status, and other sociodemographic variables were systematically collected using a standard form. Ethnicity was dichotomized as non-white or white. The following neonatal variables were obtained by review of medical records: weight, Apgar score at 1 and 5 minutes, GA at neonatal examination, sex, need for hospitalization, and classification for GA. Data on the clinical status of the mother (syphilis, HIV, and/or hepatitis C), mode of delivery, and prenatal care were also collected from medical records. The outcome measures level of IL-6 and level of IL-10 in UCB and maternal blood were collected and assayed as described below.

2.3 Blood collection and processing

Total blood (10 mL) were collected by venipuncture into an anticoagulant-free vacuum tube. Immediately after collection, blood samples were centrifuged at 4000 rpm/min for 10 min and serum (from patients and controls) or plasma (from newborns) was aliquoted, labeled, and stored at -80°C until the time of testing.

2.4 Cytokine measurement

Cytokine concentrations were determined via flow cytometry using the BD™ Cytometric Bead Array (CBA), Human IL-6, and IL-10 Enhanced Sensitivity Flex Set (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Sample processing and data analysis were performed according to manufacturer instructions. Briefly, homogenate samples and standard curves ranging from 274 to 200,000 fg/mL of each cytokine were incubated with the three cytokine capture beads for 2h, then the Human Detection Reagent was added and incubated for another 2h. The Enhanced Sensitivity Detection Reagent was incubated for 1h after being washed twice. Subsequently, samples were washed and sample data acquired using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). All incubations were performed at room temperature and protected from light. Results were generated in graphical and tabular form using the BD CBA FCAP Array™ Software v.3 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) and expressed as fg/mL.

2.5 Statistical analysis

The categorical and quantitative variables were analyzed respectively by the chi-square and Student *t* tests for independent samples, if normally distributed. In case of non-normal distribution, the Mann–Whitney *U* test was used instead and values presented as median and range. The main outcome measure was analyzed by generalized linear model (GLM) analyses (gamma distribution), and the confounders were chosen on the basis of statistical criteria (association with both study factor and outcome measure at a significance level of $p \leq 0.2$). Confounders were entered into the model together with each outcome variable, according to the statistical criterion above. The accepted significance level was $p \leq 0.05$. Data were processed and analyzed in PASW Statistics 18.0.

3 RESULTS

The sample comprised 57 newborns with history of prenatal crack/cocaine exposure and 99 without history of exposure. Selected characteristics of the newborns and their mothers are shown in Table 1. Unadjusted IL levels [median (minimum and maximum) and mean (SD)] are displayed in Table 1. There was no report of use of intravenous drugs, club drugs, or hallucinogens.

3.1 Main outcome variable: IL levels in UCB

In the GLM analyses for IL-6, results were adjusted for intensity of alcohol, tobacco, and cannabis use in the last 3 months, maternal ethnicity, presence of any maternal psychopathology, and Apgar score at 5 minutes. Adjusted mean IL-6 was significantly higher in newborns with history of crack/cocaine exposure in utero (10,208.54, 95%CI 1,328.54 to 19,088.55) than in non-exposed newborns (2,323.03, 95%CI 1,484.64 to 3,161.21; $p = 0.007$), as shown in Figure 1. Besides history of crack/cocaine exposure, variables associated with significant differences in IL-6 were Apgar score at 5 minutes ($p < 0.001$), cannabis use ($p = 0.01$), and ethnicity ($p = 0.004$). For IL-10 GLM analysis, results were adjusted for intensity of alcohol, tobacco, and cannabis use in the last 3 months, maternal ethnicity,

presence of any maternal psychopathology, Apgar score at 5 minutes, infant weight, maternal infectious disease (HIV, syphilis, and/or hepatitis C), and educational attainment. Adjusted mean IL-10 was significantly higher in newborns with history of crack/cocaine exposure in utero (432.2189, 95%CI 51.44 to 812.88) in comparison to non-exposed newborns (75.52, 95%CI 5.64 to 145.39, $p=0.014$), as shown in Figure 2. In addition to history of crack/cocaine exposure, Apgar score at 5 minutes contributed to the IL-10 model (95%CI -0.55 to -0.01, $p=0.042$).

There was no correlation between IL-6 and IL-10 levels in maternal serum and in UCB plasma (all p -values ≥ 0.28 ; Spearman correlation), for both between- and within-group comparisons. Regarding sex, there was a significant difference in the case group (Mann-Whitney U), where median IL-6 was significantly higher in boys (median = 6,726.20; range = 177.63 – 583,892.27; interquartile range = 990.30 to 18,429.06; $N=19$) than in girls (median = 856.92; range = 56.64 to 203,797.48; interquartile range = 597.13 to 3,017.68; $N=24$; $p=0.022$). Although the median IL-10 level was also higher in newborn boys with history of crack/cocaine exposure in utero than in exposed girls (196.16 vs. 68.16), the difference did not reach statistical significance ($p=0.14$). Interestingly, we found no significant differences for IL-10 ($p=0.42$) or IL-6 ($p=0.33$) when considering the control newborns in an isolated manner. Although newborn sex did not reach statistical criteria for entry into multivariate analysis, we conducted the same GLM for both IL-10 and IL-6 in UCB by adding newborn sex as an additional variable. There were no major changes for the IL-6 model. However, for IL-10, newborn sex had a significant contribution (Wald = 18.42, $p\leq 0.001$), while the predictor variable, history of exposure to crack/cocaine during pregnancy and the confounder Apgar score at 5 minutes, remained significant (data available upon request).

3.2 Secondary outcome measures: maternal IL levels in the immediate postpartum period

According to GLM analysis, with a model including intensity of alcohol and tobacco use in the last 3 months, mode of delivery, and maternal ethnicity, IL-6 measures in the immediate postpartum period were significantly higher in mothers with history of crack/cocaine use (25,160.05, 95%CI 10,958.15 to 39,361.99) than in control mothers

(8,902.14, 95%CI 5,774.97 to 12,029.32, $p = 0.007$), as shown in Figure 3. Intensity of alcohol and tobacco use and mode of delivery were also significant in the model ($p = 0.010$, 0.001 , and < 0.001 , respectively). Univariate analysis found no difference in IL-10 levels between case and control groups expressed as median (minimum-maximum) [195.14 (0-34,305.03) vs. 310.36 (0-9,441.20) respectively; $p = 0.12$]. The confounders entered into the model for IL-10 were mode of delivery, estimated IQ, and intensity of tobacco use in the last 3 months. No variable reached significance, and there was no difference in adjusted mean IL-10 between exposed and non-exposed mothers (1,086.40 vs. 1,200.42 respectively, $p = 0.83$).

4 DISCUSSION

This study analyzed early neurobiological markers involved in inflammatory activation in newborns with history of crack/cocaine exposure in utero. These markers were measured at delivery, when the newborn has not yet been exposed to other stressors. We found a significant increase in inflammatory activation of newborns with history of intrauterine crack/cocaine exposure, as assessed both by IL-6 and by IL-10 measures; this finding remained after adjusting for confounders. In pregnant women who reported crack/cocaine use, inflammatory activation (measured by IL-6) was also observed, considering confounders. Among those newborns, the male newborns seemed particularly vulnerable to inflammatory activation. The understanding of our findings is complex, and may involve a variety of mechanisms that interact with each other.

Other studies have evaluated peripheral inflammatory markers in cocaine users, and have found a trend toward greater inflammatory activation^{16,17}. However, specific studies in mother/newborn dyads exposed to crack/cocaine are scarce, limiting the comparison of our findings. Cocaine may be associated with inflammation resulting from the neuronal damage or death that it entails¹⁷. In terms of neuronal death, crack/cocaine would be more hazardous than snorted cocaine, as a result of the byproducts of pyrolysis, which generates anhydroecgonine methyl ester³². Cocaine administration increases levels of dopamine and its metabolites, resulting in an exacerbated production of reactive oxygen species^{33,34}. Oxidative stress per se promotes inflammation³⁵, triggering the generation of proinflammatory cytokines and chemokines. In addition, cocaine has a vasoconstrictor effect on the uterine artery, resulting in fetal hypoxia and increased catecholamine release and thus exposing the

developing embryo/fetus to a state of stress²⁰. This stress on the fetus would lead to disturbances in cytokine homeostasis through activation of the HPA axis, sympathetic nervous system, and fibers of the vagus nerve^{14,36}. Such factors may have contributed to the inflammatory activation seen in newborns with history of crack/cocaine exposure in utero. Although our measures were “peripheral”, there is communication between the central nervous system (CNS), the hormonal system and the innate immune system^{37,38}. The repercussions of inflammatory activation on neurodevelopment, the HPA axis, and epigenetics have recently been discussed elsewhere^{39,40}. Our results corroborate the findings of Glover⁴¹, who stated that cytokines are potential mediators for explaining the behavioral and cognitive effects of prenatal stress on the fetus and child. Studies have demonstrated the role of proinflammatory cytokines in several disorders, including depression and anxiety, as well as in cognitive function. Abnormalities in immune function have been reported in neurodevelopmental disorders⁴⁰.

We found no correlation between maternal and neonatal IL-6 and IL-10 levels, whether in between-group or within-group comparisons. In other words, our results show different reactions among pregnant women and their newborns; e.g., we did not find any difference in IL-10 levels in pregnant women, but did find such a difference in UCB measures, even with a smaller sample size. Developmental changes in immune and neuroendocrine function mediate the perception and the physiology of stress that extend throughout life^{40,41}. Different responses are expected in pregnant women who use crack/cocaine in comparison to their newborns, in light of an accumulation of stressors to which they are exposed throughout the life course, coupled with the need to adapt to these factors. Our study, for example, detected several other chronic stressors (some prior to pregnancy) in those who reported crack/cocaine use when compared to controls (Table 1). Our findings agree with previous studies reporting that gestational stress is associated with higher inflammatory activation⁴²⁻⁴⁴, which places newborns in a more vulnerable position, either because of the intensity of activation or because of changes in IL-6 and IL-10 levels. Furthermore, boys with history of crack/cocaine exposure in utero were significantly more likely to exhibit increased IL levels when compared to girls. This finding is in agreement with other studies^{45,46}.

Thus, this study may contribute to the search of neurobiological markers for the future clinical and/or neuropsychiatric repercussions of intrauterine crack/cocaine exposure demonstrated in previous research^{1,3}. Such clinical changes, persisting into adulthood, have

been understood through the developmental programming model and the telomere shortening phenomenon, with repercussions for generations to come^{40,47-49}. Knowing that exposure to cocaine alters corticostriatal gene expression⁵⁰, which also changes the stress response, we can expect these newborns to develop a more active warning system, leaving them vulnerable to addictive behavior. Although we did not assess cerebral morphology, studies have suggested an inverse association between IL-6 levels and hippocampal volume^{51,52}. These changes in the hippocampus may contribute to the cognitive deficits observed in infants, toddlers, and children exposed to cocaine in utero⁵³⁻⁵⁷. In an animal model, gestational cocaine exposure induced significant changes in the electrophysiological properties of hippocampal neurons⁵⁸. Intrauterine exposure to crack/cocaine could cause an immunological scar, making these infants vulnerable to physical and/or psychiatric disorders throughout life. In this sense, the present study helps elucidate neurobiological mechanisms underlying these phenomena and contribute with research topics for future interventions. So far there has been no evidence to support treatments directed to the immune system from the psychiatric point of view. However, minocycline has been reported to reduce inflammatory activation in schizophrenic adults⁵⁹ and agents that target inflammatory processes are being considered for the treatment of depression⁶⁰⁻⁶².

The present study has some limitations. We used two measures to assess deregulation of the immune system (IL-10 and IL-6), but other markers are available. However, much research on neuroinflammation has been based on changes in IL-6 and IL-10⁶³⁻⁶⁶. Our sample was composed of pregnant polydrug users; this increases the external validity of the study and, in multivariate analysis, the data were adjusted for use of other substances. However, because of the size of the sample, the study does not have enough power to isolate all the factors that could influence inflammation response. Also, information about drug use was collected through retrospective interview, therefore it is subject to recall bias. We could not evaluate many of the crack/cocaine women at delivery time (sample lost); however, we made a careful chart review to analyze the lost profile, concluding we lost, probably, most severe cases (type II error). We did not measure maternal body mass index (BMI). BMI is a good measure for the pre-gestational stage, however not clinically useful when data collection take place at the time of delivery, as in our study. Also, the method of blood collection did not account for time of the day and time of fasting state, factors that could influence the cytokine values. Additionally, it is important to remember that we are dealing with a difficult-to-reach

population of women who received, for instance, none or incomplete prenatal care. Finally, as this was a cross-sectional study, it cannot establish causal associations.

5 CONCLUSION

This study found elevated markers of inflammatory activation in the umbilical cord blood of newborns with history of crack/cocaine exposure in utero and in peripheral blood samples from their mothers when compared to non-exposed controls. These changes can be regarded as neurobiological markers, which represent a link between neurodevelopmental and clinical changes. Confirmation of these findings in future studies could be used to support preventive intervention strategies that address the immune system of the newborn, perhaps improving prognosis as a result.

REFERENCES

1. Lester, B. M. *et al.* The maternal lifestyle study: effects of substance exposure during pregnancy on neurodevelopmental outcome in 1-month-old infants. *Pediatrics* **110**, 1182–92 (2002).
2. Min, M. O. *et al.* Externalizing behavior and substance use related problems at 15 years in prenatally cocaine exposed adolescents. *J. Adolesc.* **37**, 269–79 (2014).
3. Richardson, G. A., Goldschmidt, L., Larkby, C. & Day, N. L. Effects of prenatal cocaine exposure on child behavior and growth at 10 years of age. *Neurotoxicol. Teratol.* **40**, 1–8.
4. Meyer, K. D. & Zhang, L. Short- and long-term adverse effects of cocaine abuse during pregnancy on the heart development. *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.* **3**, 7–16 (2009).
5. LaGasse, L. L. *et al.* Prenatal cocaine exposure and childhood obesity at nine years. *Neurotoxicol. Teratol.* **33**, 188–97.
6. Shankaran, S. *et al.* Prenatal cocaine exposure and BMI and blood pressure at 9 years of age. *J. Hypertens.* **28**, 1166–75 (2010).
7. Coussens, L. M. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860–7.
8. Dandona, P., Aljada, A. & Bandyopadhyay, A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.* **25**, 4–7 (2004).

9. Hansson, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1685–95 (2005).
10. Kiecolt-Glaser, J. K., Gouin, J.-P. & Hantsoo, L. Close relationships, inflammation, and health. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **35**, 33–8 (2010).
11. Libby, P., Ridker, P. M. & Maseri, A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* **105**, 1135–43 (2002).
12. Lin, W.-W. & Karin, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J. Clin. Invest.* **117**, 1175–83 (2007).
13. Pickup, J. C. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* **27**, 813–23 (2004).
14. Tian, R., Hou, G., Li, D. & Yuan, T.-F. A possible change process of inflammatory cytokines in the prolonged chronic stress and its ultimate implications for health. *ScientificWorldJournal.* **2014**, 780616 (2014).
15. Sinha, R. How does stress increase risk of drug abuse and relapse? *Psychopharmacology (Berl).* **158**, 343–59 (2001).
16. Fox, H. C. *et al.* Immune system inflammation in cocaine dependent individuals: implications for medications development. *Hum. Psychopharmacol.* **27**, 156–66 (2012).
17. Narvaez, J. C. M. *et al.* Peripheral toxicity in crack cocaine use disorders. *Neurosci. Lett.* **544**, 80–4 (2013).
18. De Giovanni, N. & Marchetti, D. Cocaine and its metabolites in the placenta: a systematic review of the literature. *Reprod. Toxicol.* **33**, 1–14 (2012).
19. Riezzo, I. *et al.* Side effects of cocaine abuse: multiorgan toxicity and pathological consequences. *Curr. Med. Chem.* **19**, 5624–46 (2012).
20. Eiden, R. D., Veira, Y. & Granger, D. A. Prenatal cocaine exposure and infant cortisol reactivity. *Child Dev.* **80**, 528–43.
21. Brown, J. V, Bakeman, R., Coles, C. D., Platzman, K. A. & Lynch, M. E. Prenatal cocaine exposure: a comparison of 2-year-old children in parental and nonparental care. *Child Dev.* **75**, 1282–95.
22. Karlix, J. L. *et al.* Cocaine suppresses fetal immune system. *Pediatr. Res.* **44**, 43–6 (1998).
23. Diesner, S. C. *et al.* Perspectives on immunomodulation early in life. *Pediatr. Allergy Immunol.* **23**, 210–223 (2012).

24. Chatterjee, P., Chiasson, V. L., Bounds, K. R. & Mitchell, B. M. Regulation of the Anti-Inflammatory Cytokines Interleukin-4 and Interleukin-10 during Pregnancy. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
25. Netcord & FACT. International Standards For Cord Blood Collection, Banking, And Release For Administration. (2012).
26. Nascimento, E. do & Figueiredo, V. L. M. de. WISC-III e WAIS-III: alterações nas versões originais americanas decorrentes das adaptações para uso no Brasil. *Psicol. Reflexão e Crítica* **15**, 603–612 (2002).
27. Wechsler, D. *WAIS-III: Escala de Inteligência Wechsler para Adultos*. (Casa do Psicólogo, 2004).
28. Amorim, P. Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI): validação de entrevista breve para diagnóstico de transtornos mentais. *Rev. Bras. Psiquiatr.* **22**, 106–115 (2000).
29. Henrique, I. F. S., De Micheli, D., Lacerda, R. B. de, Lacerda, L. A. de & Formigoni, M. L. O. de S. [Validation of the Brazilian version of Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test (ASSIST)]. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **50**, 199–206 (2004).
30. Szobot, C. M. *et al.* Is attention-deficit/hyperactivity disorder associated with illicit substance use disorders in male adolescents? A community-based case-control study. *Addiction* **102**, 1122–30 (2007).
31. Mattar, F. N. Análise crítica dos estudos de estratificação sócio-econômica ABA-Abipeme. *Rev. Adm.* 57–74 (1995).
32. Manrique-Garcia, E. *et al.* Cannabis, schizophrenia and other non-affective psychoses: 35 years of follow-up of a population-based cohort. *Psychol. Med.* **42**, 1321–8 (2012).
33. Hermida-Ameijeiras, A., Méndez-Alvarez, E., Sánchez-Iglesias, S., Sanmartín-Suárez, C. & Soto-Otero, R. Autoxidation and MAO-mediated metabolism of dopamine as a potential cause of oxidative stress: role of ferrous and ferric ions. *Neurochem. Int.* **45**, 103–16 (2004).
34. Smythies, J. & Galzigna, L. The oxidative metabolism of catecholamines in the brain: a review. *Biochim. Biophys. Acta* **1380**, 159–62 (1998).
35. Vaziri, N. D. Causal link between oxidative stress, inflammation, and hypertension. *Iran. J. Kidney Dis.* **2**, 1–10 (2008).
36. Haroon, E., Raison, C. L. & Miller, A. H. Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacology* **37**, 137–62 (2012).
37. Dantzer, R. Cytokine, sickness behavior, and depression. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* **29**, 247–64 (2009).

38. Sternberg, E. M. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 318–28 (2006).
39. Leckman, J. F. Commentary: What does immunology have to do with brain development and psychopathology?--a commentary on O'Connor et al. (2014). *J. Child Psychol. Psychiatry.* **55**, 632–4 (2014).
40. O'Connor, T. G., Moynihan, J. A. & Caserta, M. T. Annual research review: The neuroinflammation hypothesis for stress and psychopathology in children--developmental psychoneuroimmunology. *J. Child Psychol. Psychiatry.* **55**, 615–31 (2014).
41. Glover, V. Prenatal stress and its effects on the fetus and the child: possible underlying biological mechanisms. *Adv. Neurobiol.* **10**, 269–83 (2015).
42. Cheng, C. Y. & Pickler, R. H. Perinatal stress, fatigue, depressive symptoms, and immune modulation in late pregnancy and one month postpartum. *ScientificWorldJournal.* **2014**, 652630 (2014).
43. Coussons-Read, M. E., Okun, M. L. & Nettles, C. D. Psychosocial stress increases inflammatory markers and alters cytokine production across pregnancy. *Brain. Behav. Immun.* **21**, 343–50 (2007).
44. Ruiz, R. J., Fullerton, J. & Dudley, D. J. The interrelationship of maternal stress, endocrine factors and inflammation on gestational length. *Obstet. Gynecol. Surv.* **58**, 415–28 (2003).
45. Delaney-Black, V. *et al.* Prenatal cocaine: quantity of exposure and gender moderation. *J. Dev. Behav. Pediatr.* **25**, 254–63 (2004).
46. Nordstrom Bailey, B. *et al.* Gender and alcohol moderate prenatal cocaine effects on teacher-report of child behavior. *Neurotoxicol. Teratol.* **27**, 181–9.
47. Kiecolt-Glaser, J. K. *et al.* Childhood adversity heightens the impact of later-life caregiving stress on telomere length and inflammation. *Psychosom. Med.* **73**, 16–22 (2011).
48. Lester, B. M. & Padbury, J. F. Third pathophysiology of prenatal cocaine exposure. *Dev. Neurosci.* **31**, 23–35 (2009).
49. Tyrka, A. R., Burgers, D. E., Philip, N. S., Price, L. H. & Carpenter, L. L. The neurobiological correlates of childhood adversity and implications for treatment. *Acta Psychiatr. Scand.* **128**, 434–47 (2013).
50. Sadri-Vakili, G. Cocaine triggers epigenetic alterations in the corticostriatal circuit. *Brain Res.* (2014). doi:10.1016/j.brainres.2014.09.069
51. Baune, B. T. *et al.* Interleukin-6 gene (IL-6): a possible role in brain morphology in the healthy adult brain. *J. Neuroinflammation* **9**, 125 (2012).

52. Marsland, A. L., Gianaros, P. J., Abramowitch, S. M., Manuck, S. B. & Hariri, A. R. Interleukin-6 covaries inversely with hippocampal grey matter volume in middle-aged adults. *Biol. Psychiatry* **64**, 484–90 (2008).
53. Bandstra, E. S. *et al.* Longitudinal influence of prenatal cocaine exposure on child language functioning. *Neurotoxicol. Teratol.* **24**, 297–308.
54. Delaney-Black, V. *et al.* Expressive language development of children exposed to cocaine prenatally: literature review and report of a prospective cohort study. *J. Commun. Disord.* **33**, 463–80; quiz 480–1.
55. Eyler, F. D., Behnke, M., Conlon, M., Woods, N. S. & Wobie, K. Birth outcome from a prospective, matched study of prenatal crack/cocaine use: II. Interactive and dose effects on neurobehavioral assessment. *Pediatrics* **101**, 237–41 (1998).
56. Potter, S. M., Zelazo, P. R., Stack, D. M. & Papageorgiou, A. N. Adverse effects of fetal cocaine exposure on neonatal auditory information processing. *Pediatrics* **105**, E40 (2000).
57. Singer, L. T. *et al.* Cognitive and motor outcomes of cocaine-exposed infants. *JAMA* **287**, 1952–60 (2002).
58. Baraban, S. C. & Schwartzkroin, P. A. Effects of prenatal cocaine exposure on the developing hippocampus: intrinsic and synaptic physiology. *J. Neurophysiol.* **77**, 126–36 (1997).
59. Chaudhry, I. B. *et al.* Minocycline benefits negative symptoms in early schizophrenia: a randomised double-blind placebo-controlled clinical trial in patients on standard treatment. *J. Psychopharmacol.* **26**, 1185–93 (2012).
60. Lotrich, F. E., Sears, B. & McNamara, R. K. Elevated ratio of arachidonic acid to long-chain omega-3 fatty acids predicts depression development following interferon-alpha treatment: relationship with interleukin-6. *Brain. Behav. Immun.* **31**, 48–53 (2013).
61. Miyaoka, T. *et al.* Minocycline as adjunctive therapy for patients with unipolar psychotic depression: an open-label study. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **37**, 222–6 (2012).
62. Raison, C. L. *et al.* A randomized controlled trial of the tumor necrosis factor antagonist infliximab for treatment-resistant depression: the role of baseline inflammatory biomarkers. *JAMA psychiatry* **70**, 31–41 (2013).
63. Carpenter, L. L. *et al.* Association between plasma IL-6 response to acute stress and early-life adversity in healthy adults. *Neuropsychopharmacology* **35**, 2617–23 (2010).
64. Mesquita, A. R. *et al.* IL-10 modulates depressive-like behavior. *J. Psychiatr. Res.* **43**, 89–97 (2008).

65. Meyer, U. *et al.* Adult behavioral and pharmacological dysfunctions following disruption of the fetal brain balance between pro-inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory signaling. *Mol. Psychiatry* **13**, 208–21 (2008).
66. Sukoff Rizzo, S. J. *et al.* Evidence for sustained elevation of IL-6 in the CNS as a key contributor of depressive-like phenotypes. *Transl. Psychiatry* **2**, e199 (2012).

FIGURE LEGENDS

Figure 1

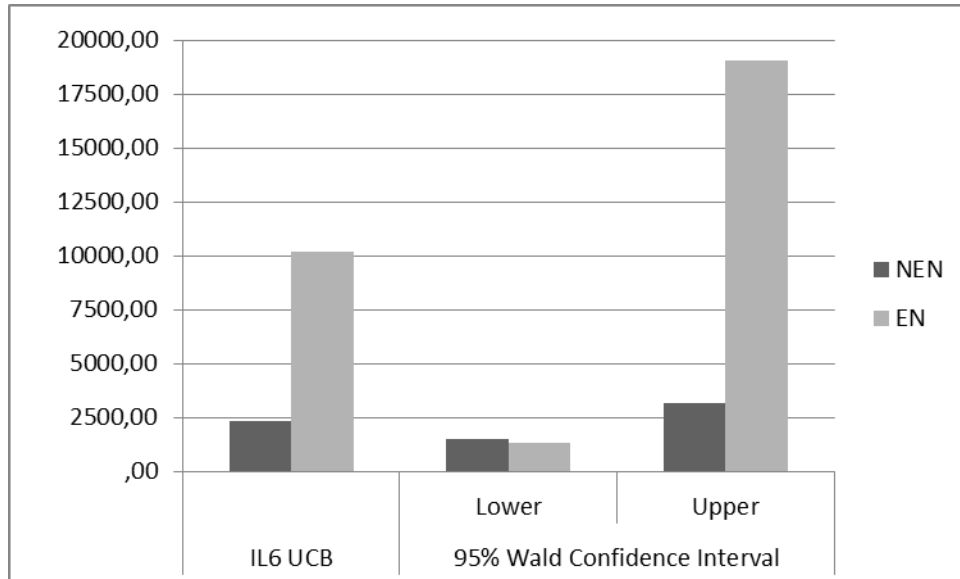


Figure 1. IL-6 levels in the umbilical cord blood of newborns with history of crack/cocaine exposure (EN; case group) during pregnancy compared to controls (NEN); mean adjusted for intensity of maternal alcohol, tobacco, and cannabis use in the last 3 months, maternal ethnicity, presence of any maternal psychopathology, and 5-minute Apgar score.

Figure 2

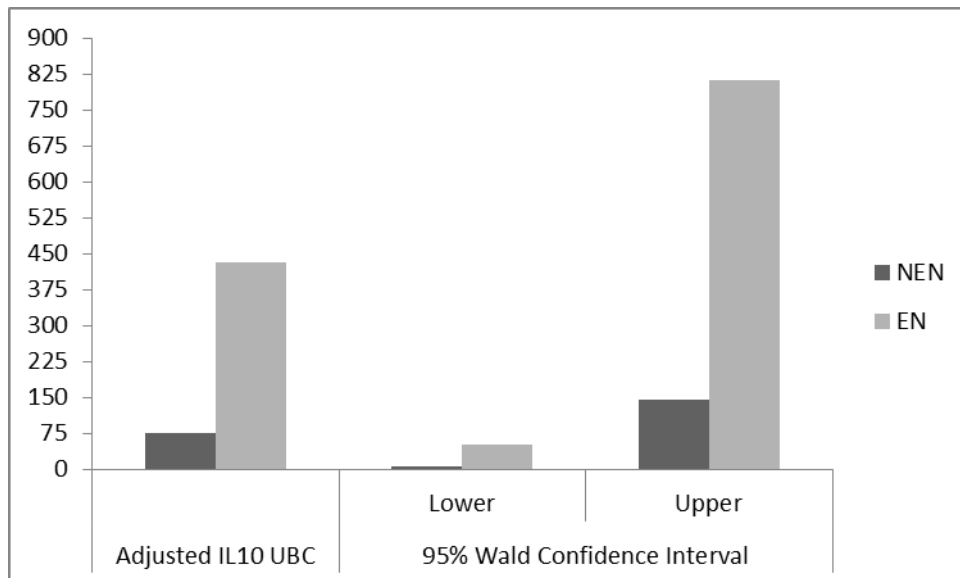


Figure 2. IL-10 levels in the umbilical cord blood of newborns with history of crack/cocaine exposure during pregnancy (EN) compared to controls (NEN); mean adjusted for intensity of maternal alcohol, tobacco, and cannabis use in the last 3 months, maternal ethnicity, presence of any maternal psychopathology, 5-minute Apgar score, newborn weight, maternal educational attainment, and maternal infectious diseases (HIV, syphilis, or hepatitis C).

Figure 3

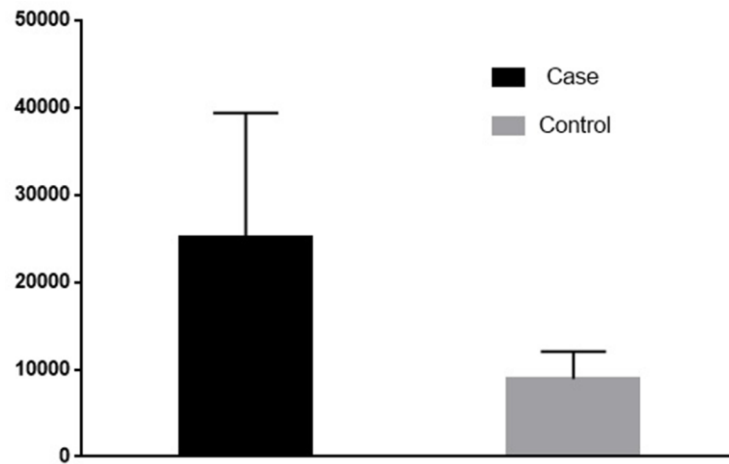


Figure 3. IL-6 levels in peripheral blood in women with history of crack/cocaine use vs. control mothers. Mean IL-6 adjusted for intensity of alcohol and tobacco use in the last 3 months, mode of delivery, and maternal ethnicity.

TABLE**Table 1.** Sociodemographic, clinical characteristics and IL levels of pregnant crack/cocaine users and their newborns in comparison to a control group

Infant variables	EN (N = 57) Mean (SD)	NEN (N = 99) Mean (SD)	p
Weight, g	2,882.15 (473.32)	3,144.80 (439.39)	0.001
Apgar, 1-minute	7.8 (2.12)	8.41 (1.31)	0.06
Apgar, 5-minute	8.94 (1.24)	9.38 (0.74)	0.007
Gestational age, weeks (estimated at neonatal examination)	38.58 (2.06)	38.86 (1.24)	0.37
Male sex, N (%)	28 (50.9)	46 (46.5)	0.72
Need for hospitalization, N (%)	36 (67.9)	15 (15.5)	< 0.001
Classification for gestational age, N (%)			
Adequate	43 (87.8)	75 (77.3)	
Small	4 (8.2)	16 (16.5)	0.31
Large	2 (4.1)	6 (6.2)	
Maternal variables	Cases (N = 57) Mean (SD)	Controls (N = 99) Mean (SD)	p
Ethnicity, N (%)			
White	17 (32.1)	74 (76.3)	< 0.001
Non-white	36 (67.9)	23 (23.7)	
Age, years	27.00 (5.76)	26.17 (5.87)	0.39
IQ	77.39 (8.75)	84.17 (9.59)	< 0.001
Socioeconomic status, N (%)			
High (class A or B)	6 (11.8)	18 (18.8)	0.19
Low (class C, D, or E)	45 (88.2)	78 (81.3)	
Educational attainment, n (%)			
Some primary, completed primary, or some secondary	39 (81.3)	51 (53.1)	
Completed secondary, some higher, or completed higher	9 (18.8)	45 (53.1)	0.002
Prenatal care, N (%)*	36 (73.5)	99 (100)	< 0.001
Presence of infectious diseases, N (%)* (syphilis, HIV, and/or hepatitis C)	26 (46.4)	0	< 0.001
Mode of delivery (Cesarean delivery), N (%)	19 (35.2)	34 (35.1)	1.00
Marital status (married/cohabiting), N (%)*	29 (50.9)	94 (94.9)	< 0.001
Drug use by mothers during pregnancy – ASSIST total score**			
	Cases	Controls	
Total score for nicotine***	17.50 (0–31)	0.00 (0–39)	< 0.001
Total score for alcohol***	6.00 (0–33)	0.00 (0–13)	< 0.001
Total score for cannabis***	0.00 (0–25)	-	-
Substance use in the last 3 months prior to delivery			
Nicotine, N (%)	Cases (N = 32)	Controls (N = 22)	
Daily/almost every day	22 (68.75)	5 (22.7)	< 0.001
Weekly	1 (0.03)	-	
Monthly	4 (0.13)	-	
Once or twice	2 (0.06)	17 (77.3)	
Never	3 (0.09)	-	
Alcohol, N (%)	Cases (N = 28)	Controls (N = 33)	
Daily/almost every day	2 (7.14)	-	< 0.001
Weekly	10 (35.70)	-	
Monthly	3 (10.70)	-	
Once or twice	4 (14.30)	5 (15.20)	
Never	9 (32.10)	28 (84.80)	

Crack/cocaine, <i>N</i> (%)	Cases (<i>N</i> = 32)	Controls (<i>N</i> = 32)	
Daily/almost every day	9 (28.1)	-	-
Weekly	13 (40.6)	-	-
Monthly	3 (9.4)	-	-
Once or twice	1 (3.1)	-	-
Never	6 (10.5)	-	-
Cannabis, <i>N</i> (%)	Cases (<i>N</i> = 26)	Controls (<i>N</i> = 26)	
Daily/almost every day	2 (7.7)	-	-
Weekly	5 (19.2)	-	-
Monthly	2 (7.7)	-	-
Once or twice	1 (3.8)	-	-
Never	16 (61.5)	-	-
Presence of current psychopathology in mothers			
	Cases	Controls	
Suicide risk, <i>N</i> (%)	13 (31.70)	9 (9.78)	0.002
PTSD, <i>N</i> (%)* . ****	4 (10.00)	0 (0.00)	0.007
Antisocial personality disorder, <i>N</i> (%)*	9 (21.43)	0 (0.00)	< 0.001
MINI positive for any diagnoses, <i>N</i> (%)	25 (61.0)	32 (33.3)	0.005
Unadjusted UCB IL levels*****			
	EN (<i>N</i> = 45)	NEN (<i>N</i> = 93)	
IL-6 in UCB			
Median (minimum and maximum)	2.013.95; (0-583.892.27)	737.61; (0-29,649.70)	0.004
Mean (SD)	36.885.01 (1.17186 ^{E5})	2.049.53 (4.027.94)	
IL10 at UCB			
Median (minimum and maximum)	109.93 (0-2,445.83)	9.14; (0-1,016.84)	< 0001
Mean (SD)	335.62 (591.70)	47.41 (121.43)	
Unadjusted IL levels at immediate postpartum, mothers*****			
	Cases (<i>N</i> = 48)	Controls (<i>N</i> = 83)	
Maternal IL-6 levels			
Median (minimum and maximum)	3.022.09 (0-1.201,174.90)	6.664.98 (62.40-171.500.39)	0.11
Mean (SD)	43.591.24 (1,77086 ^{E5})	12.981.55 (21.877.39)	
Maternal IL-10 levels, immediate postpartum			
Median (minimum and maximum)	195.14 (0-34,305.03)	310.36 (0-9,441.20)	0.12
Mean (SD)	1.215.63 (4,954.13)	1.105.25 (1,894.63)	

*Fisher's exact test; **Based on ASSIST; ***Mann-Whitney *U* test; median and range; ****Posttraumatic stress disorder; ***** *p*-value just for median comparisons, Mann-Whitney *U* test.

EN, newborns exposed to crack/cocaine in utero; IL, interleukin; NEN, non-exposed newborns; UCB, umbilical blood cord

11 ESTUDO 2 - ARTIGO PRINCIPAL 2

Questão de pesquisa: Avaliar os níveis de BDNF e TBARS nas gestantes usuárias de crack e no sangue umbilical de seus recém-nascidos em comparação com as não usuárias.

**TBARS and BDNF changes in newborns exposed to crack/cocaine during pregnancy –
a comparative study**

**Alterações em TBARS e BDNF nas gestantes usuárias de crack e no sangue umbilical
de seus recém-nascidos em comparação com as não usuárias.**

Status: submetido, Revista Brasileira de Psiquiatria, como *Brief Communication*

TBARS and BDNF changes in newborns exposed to crack/cocaine during pregnancy – a comparative study

Victor Mardini,^{a,b} Luis Augusto Rohde,^{a,b,c,d} Keila Maria Mendes Ceresér,^{b,e} Carolina de Moura Gubert,^e Emily Galvão da Silva,^e Fernando Xavier,^f Rodrigo Parcianello,^b Liane Marise Röhsig,^g Flávio Pechansky,^{b,d,h} Claudia M. Szobot^{a,b,h}

^a Child and Adolescent Psychiatry Service (SPIA), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Rua Ramiro Barcelos, 2350, 4º andar, sala 400N, Santa Cecília, Zip Code 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Graduate Program in Medicine: Psychiatry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos, 2400, Santa Cecília, Zip Code 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Deputy Coordinator, Instituto Nacional de Psiquiatria do Desenvolvimento (INPD), Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 785, 1º andar, sala 6, Ala Sul, Cerqueira Cesar, Zip Code 05403-010, São Paulo, SP, Brazil.

^d Professor, Department of Psychiatry, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2400, Santa Cecília, Zip Code 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

^e Laboratory of Molecular Psychiatry and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), HCPA, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Santa Cecília, Zip Code 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.

^f Undergraduate Program in Biomedical Sciences, Centro Universitário Metodista–IPA, Rua Dona Leonor, 340, Rio Branco, Zip Code 90420-004, Porto Alegre, RS, Brazil.

^g Cord Blood Bank and Cryobiology Unit, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Santa Cecília, Zip Code 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.

^h Center for Drug and Alcohol Research, HCPA, UFRGS, Rua Professor Álvaro Alvim, 400, Rio Branco, Zip Code 90420-020, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author:

Claudia Szobot; Rua Ramiro Barcelos, 2350, sala 400; 90035-903 - Porto Alegre, RS [Brazil](#)
cszobot@gmail.com Tel.: +55-51-3359-8413; +55-51-3359-8294

Word count in text: 1581

ABSTRACT

Objectives: To compare the levels of lipid peroxidation (TBARS) and BDNF in umbilical cord blood (UCB) between newborns exposed to crack/cocaine in utero (EN, $N = 57$) and non-exposed newborns (NEN, $N = 99$), and in maternal peripheral blood at delivery. **Methods:** Cross-sectional study. Potential confounders were assessed. **Results:** After adjusting for potential confounders, adjusted mean BDNF was significantly higher in EN than in NEN (3.86, 95%CI 2.29 – 5.43 vs 0.85, 95%CI 0.47- 1.23; $p < 0.001$; effect size -Cohen $d = 1.12$), and significantly smaller in crack/cocaine mothers than in controls (4.03 95%CI 2.87 – 5.18 vs 6.67 95%CI 5.60 – 7.74; $p = 0.006$; $d = 0.61$). Mean adjusted TBARS was significantly smaller in EN (63.97, 95%CI 39.43 - 88.50) in comparison to NEN (177.04, 95%CI 140.93 - 213.14, $p < 0.001$; $d = 0.84$), without differences between mothers groups ($p = 0.86$). **Conclusions:** The changes in TBARS levels in EN suggest that the fetus exposed to cocaine mobilize endogenous antioxidant routes since very early in development. The increase in BDNF levels in EN might indicate changes in fetus development, whereas BDNF mothers' results point to the complex metabolic process during pregnancy and drug use.

Keywords: TBARS, BDNF, pregnancy, crack/cocaine, umbilical cord blood, newborn

INTRODUCTION

Cocaine and some of its metabolites are stored in both the myometrium and the placental membrane and are continuously delivered into the amniotic fluid, putting the fetus in a state of slow release cocaine delivery (De Giovanni and Marchetti, 2012). Prenatal drug exposure affects neonatal brain functional connectivity, and cocaine has a specific effect on the amygdala-frontal network, for instance (Salzwedel et al., 2015). The pathways enrolled in such changes remains unclear. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and other neurotrophic factors can play a crucial role in the development and maintenance of the central nervous system and might influence the formation and elimination of neural connections (Yves-Alain, 1990). It is reasonable to consider that intra-uterine cocaine exposure (IUCE) can disrupte this process. Cocaine also contributes to an imbalance in the oxidative/antioxidant system by increasing the production of Reactive Oxygen Species (ROS) (Kovacic, 2005), and disrupting the antioxidant system in the embryonic period (Peng et al., 2005). Thus, IUCE could damage neurovelopment since very early embryonic stages. Despite some studies on BDNF and oxidative stress (OE) on crack/cocaine in adults and animal models, no data is available for newborns with history of IUCE, neither for pregnant women. Thus, the purpose of this study is to compare the levels of OS (lipid peroxidation, measured by Thiobarbituric Acid Reactive Substances - TBARS) and the levels of BDNF in newborns exposed (EN) to crack-cocaine during pregnancy and non-exposed newborns (NEN), and in their mothers in the immediate postpartum.

METHODS

Data were collected at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and Hospital Materno Infantil Presidente Vargas (HMIPV), in the city of Porto Alegre, Brazil. All mothers provided written informed consent, and the project was approved by the Research Ethics Committees of both hospitals. This was a cross-sectional study. The predictive variable was history of intrauterine exposure (IU) to crack/cocaine and the outcome measures were serum levels of the Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) in the umbilical cord blood (UCB) and in maternal peripheral blood at delivery. Participants were mother/newborn dyads exposed to crack/cocaine, which underwent

consecutive sampling at HMIPV. The control sample of newborns and mothers was obtained from a group of pregnant women who participated in the HCPA Umbilical Cord and Placental Blood Bank (Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário, BSCUP) project, according to the Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy (FACT) criteria (FACT, 2013). The maternal inclusion criteria for the case group were crack/cocaine use and age 18–45 years, and the exclusion criteria were inability to understand and complete the psychiatric questionnaires. The inclusion and exclusion criteria for controls relied on FACT criteria. All mothers included in the control group were confirmed as non-drug users by their history and urinary tests (Bioeasy® cocainetest, Alere™, Brazil). The potential confounders were: maternal IQ (WAIS-III) (Wechsler, 2004) and psychopathology [Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI), Brazilian version 5.0.0/DSMIV/Current (Amorin, 2000)], use of other psychoactive substances, [Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test (ASSIST) (Henrique et al., 2004)]; sociodemographic data (age, self-reported ethnicity, marital status, educational attainment); perinatal and obstetric data. The following neonatal variables were obtained by review of medical records: weight, Apgar score at 1 and 5 minutes, gestational age (GA) at neonatal examination, sex, and classification for GA. Data on the clinical status of the mother (syphilis, HIV, and/or hepatitis C), mode of delivery, and prenatal care were also collected from medical records. Blood collection and processing, BDNF and TBARS measurement was done as usual performed in our laboratory (Narvaez et al., 2013). The main outcome measure was analyzed by generalized linear model (GLM) analyses (gamma distribution), and the confounders were chosen on the basis of statistical criteria (association with both study factor and outcome measure at a significance level of $p \leq 0.2$). The accepted significance level was $p \leq 0.05$. Data were processed and analyzed in PASW Statistics 18.0.

RESULTS

The sample was comprised by 57 newborns exposed to crack/cocaine in utero and 99 non-exposed newborns. Selected characteristics of the newborns and their mothers are shown in Table 1. There was no report of use of intravenous drugs, club drugs, or hallucinogens. There was no difference between groups for gestational age ($p=0.37$), baby gender ($p=0.72$), maternal age ($p=0.39$) and cesarean delivery ($p=1$).

INSERT TABLE 1 ABOUT HERE

In the GLM analyses for *BDNF at UCB*, results were adjusted for intensity of alcohol, tobacco, and cannabis use in the last 3 months, presence of any maternal infection, baby weight and marital status. Adjusted mean BDNF was significantly higher in newborns exposed to crack/cocaine in utero (3.86, 95%CI 2.29 – 5.43) than in non-exposed newborns (0.85, 95%CI 0.47- 1.23; $p < 0.001$; Wald = 20.75), as shown in Table 1. Besides crack/cocaine exposure, no other variable came up significant. For *TBARS analysis at UCB*, results were adjusted for intensity of alcohol, tobacco, and cannabis use in the last 3 months, presence of any maternal psychopathology, maternal infectious disease, prenatal care, marital status and estimated IQ. Variables that did not contribute to the model were withdrwed from the model (according to higher p value). Mean adjusted TBARS was significantly smaller in newborns exposed to crack/cocaine in utero (63.97, 95%CI 39.43 to 88.50) in comparison to non-exposed newborns (177.04, 95%CI 140.93 to 213.14, $p < 0.001$; Wald = 19.71). In addition to crack/cocaine exposure, presence of any maternal psychopathology ($p=0.04$, Wald = 4.42) and estimated IQ were also significant ($p < 0.001$; Wald = 17.62). According to GLM analysis, with a model including intensity of cannabis use in the last 3 months, presence of any maternal psychopathology and APGAR at minute 5, *TBARS measures in the immediate postpartum* period were not significantly different between crack/cocaine-using mothers (30.52, 95%CI 17.79 - 43.25) and control mothers (29.21, 95%CI 23.95 - 34.47 $p=0.86$). There was a difference between groups *for BDNF in postpartum*, significantly smaller in crack/cocaine users than in controls (adjusted for intensity of use of alcohol and tocacco; 4.03 95%CI 2.87 – 5.18 vs 6.67 95%CI 5.60 – 7.74 Wald = 7.52; $p = 0.006$). Cohen d effect size was 1.12 (CI95% 0.66-1.56) for BDNF at UCB, 0.84 (IC95% 0.39-1.28) for TBARS at UCB and 0.61 (CI95% 0.17-1.03) for BDNF at postpartum.

INSERT FIGURE 1 ABOUT HERE

DISCUSSION

In our study, we were able to demonstrate differences in a general state of oxidative stress in EN, measured by TBARS, with a large effect size. Among possible explanations, Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript (CART), an endogenous antioxidant stimulated by dopamine presence, should be considered. According to animal models, CART is expressed very early during the embryonic neurodevelopment (Risold et al., 2006), being more present in the cortex, nucleus accumbens and VTA, undergoing a progressive decrease in its expression as the fetus develops (Rodrigues, Cavalcante and Elias, 2011). Dopaminergic stimulation, as seen in crack/cocaine dependence, regulates CART expression, together with other factors. In our study, high levels of dopamine due to mother's crack/cocaine intake might have affected fetus homeostasis. This maturational decrease in CART levels, among others, could help to explain the absence of difference in TBARS levels seen among pregnant women.

BDNF has a major role in cellular plasticity during development and maturation of the brain. In agreement with our results, which demonstrated a large effect size for the BDNF difference between babies groups, young rats treated with stimulants exhibited increased BDNF protein levels in the prefrontal cortex compared to the saline-treated group (Simchon et al., 2015). However, studies in adults (males) with crack/cocaine dependence indicate a BDNF increase in comparison to controls (for instance, Narvaez et al., 2013). Pregnancy is characterized by several metabolic changes that interact with circulating BDNF levels. In usual circumstances, it is expected a lower BDNF level in the first gestational trimester, with further increase (Garcés et al., 2014). We can suppose that, under a drug use condition, this expected normal increase was not achieved. In this regard, a previous study suggest lower BDNF levels among pregnant with preeclampsia in comparison to health pregnant (D'Souza et al., 2014).

The present study has some limitations. We used one measure for oxidative imbalance (TBARS), but other markers are available. Our sample was composed of pregnant polydrug users; this increases the external validity of the study and, in multivariate analysis, the data were adjusted for use of other substances. We did not measure maternal body mass index because, although it is a good measure for the pre-gestational stage, it is not useful when data collection take place at the time of delivery, as in our study. Additionally, it is important to remember that we are dealing with a difficult-to-reach population of women who received, for

instance, incomplete prenatal care. Finally, as this was a cross-sectional study, we cannot establish causal associations. Our study has specific strengths, such as measuring TBARS and BDNF in UCB, when the newborns have not yet been exposed to other stressors. Besides, to the the best of our knowledge, this is the first report of such biomarkers in newborns with history of crack/cocaine exposure.

Taken together, our results in the exposed newborns and their mothers could be understood in the same direction: age-dependent neuroprotective changes in REDOX system (lower TBARS in EN; no significant difference among women in postpartum) and neuroplastic response (higher BDNF in EN; lower BDNF among women in postpartum) promoted by crack/cocaine. Our data suggest the need of further investigations on fetal endogenous antioxidant system (like CART), as well pregnancy related changes under drug use.

ACKNOWLEDGEMENTS: This study was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and by the Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) – all together provided financial suport for study development, lab test and all other expenses.

DISCLOSURE: Dr. Szobot is of the speakers' bureau of Novartis in the last 3 years. Luis A. Rohde has received Honoraria, has been on the speakers' bureau/advisory board and/or has acted as a consultant for Eli-Lilly, Janssen-Cilag, Novartis and Shire in the last three years. He receives authorship royalties from Oxford Press and ArtMed. He also received travel awards for taking part of 2014 APA and 2015 WFADHD meetings from Shire. The ADHD and Juvenile Bipolar Disorder Outpatient Programs chaired by him received unrestricted educational and research support from the following pharmaceutical companies in the last three years: Eli-Lilly, Janssen-Cilag, Novartis, and Shire. Dr. Luis A. Rohde was on the speakers' bureau and/or acted as consultant for Eli-Lilly, Janssen-Cilag, Novartis, and Shire in the last 3 years. The ADHD and Juvenile Bipolar Disorder Outpatient Programs chaired by LR received unrestricted educational and research support from the following pharmaceutical companies in the last 3 years: Eli-Lilly, Janssen-Cilag, Novartis, and Shire. Dr. Pechansky and other authors: have no conflict of interest do declare.

REFERENCES:

1. Amorim, P., 2000. Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI): validação de entrevista breve para diagnóstico de transtornos mentais. *Rev Bras Psiquiatr.* 22(3):106-15.
2. De Giovanni, N., Marchetti, D., 2012. Cocaine and its metabolites in the placenta: a systematic review of the literature. *Reprod Toxicol.* 2012;33(1):1-14.
3. D'Souza, V., Patil, V., Pisal, H., Randhir, K., Joshi, A., Mehendale, S., Wagh, G., Gupte, S., Joshi, S., 2014. Levels of brain derived neurotrophic factors across gestation in women with preeclampsia. *Int J Dev Neurosci* 37:36-40. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2014.06.008.
4. Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy, 2013. Netcord - FACT international standards for cord blood collection, banking and release for administration.
5. Garcés, M.F., Sanchez, E., Torres-Sierra, A.L., Ruíz-Parra, A.I., Angel-Müller, E., Alzate, J.P., Sánchez, Á.Y., Gomez, M.A., Romero, X.C., Castañeda, Z.E., Sanchez-Reboredo, E., Diéguez, C., Nogueiras, R., Caminos, J.E., 2014. Brain-derived neurotrophic factor is expressed in rat and human placenta and its serum levels are similarly regulated throughout pregnancy in both species. *Clin Endocrinol (Oxf).* 81(1):141-51. doi: 10.1111/cen.12391.
6. Henrique, I.F.S., De Micheli, D., De Lacerda, R.B., De Lacerda, L.A., Formigoni, M.L.O.S., 2004. Validação da versão brasileira do teste de triagem do envolvimento com álcool, cigarro e outras substâncias (ASSIST). *Rev Assoc Med Bras.* 50(2):199-206.
7. Kovacic, P., 2005. Role of oxidative metabolites of cocaine in toxicity and addiction: oxidative stress and electron transfer. *Med Hypotheses.* 64(2):350-6.
8. Narvaez, J.C., Magalhaes, P.V., Fries, G.R., Colpo, G.D., Czepielewski, L.S., Vianna, P., Chies, J.A., Rosa, A.R., Von Diemen, L., Vieta, E., Pechansky, F., Kapczinski, F., 2013. Peripheral toxicity in crack cocaine use disorders. *Neurosci Lett.* 544:80-4.
9. Peng, Y., Kwok, K.H., Yang, P.H., Ng, S.S., Liu, J., Wong, O.G., He, M.L., Kung, H.F., Lin, M.C., 2005. Ascorbic acid inhibits ROS production, NF-kappa B activation and prevents ethanol-induced growth retardation and microencephaly. *Neuropharmacology.* 48(3):426-34.
10. Risold, P.Y., Bernard-Franchi, G., Collard, C., Jacquemard, C., La Roche, A., Griffond, B., 2006. Ontogenetic expression of CART-peptides in the central nervous system and the periphery: a possible neurotrophic role? *Peptides.* 27(8):1938-41.
11. Rodrigues, B.C., Cavalcante, J.C., Elias, C.F., 2011. Expression of cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the rat forebrain during postnatal development. *Neuroscience.* 2011;195:201-14.

12. Salzwedel, A.P., Grewen, K.M., Vachet, C., Gerig, G., Lin, W., Gao, W., 2015. Prenatal drug exposure affects neonatal brain functional connectivity. *J Neurosci.* 8;35(14):5860-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4333-14.2015.
13. Simchon Tenenbaum, Y., Weizman, A., Rehavi, M., 2015. The Impact of Chronic Early Administration of Psychostimulants on Brain Expression of BDNF and Other Neuroplasticity-Relevant Proteins. *J Mol Neurosci.* 57(2):231-42. doi: 10.1007/s12031-015-0611-9.
14. Wechsler, D., 2004. WAIS-III: Escala de Inteligência Wechsler para adultos. 3rd edition. São Paulo: Casa do Psicólogo.
15. Yves-Alain, B., 1990. The nerve growth factor family. *Prog Growth Factor Res.* 2:237-248.

Table 1. Sociodemographic, clinical characteristic, TBARS and BDNF of pregnant crack/cocaine users and their newborns in comparison to a control group

Infant variables	EN (N=57) Mean (SD)	NEN (N=99) Mean (SD)	<i>p</i>
Weight, G	2,882.15 (473.32)	3,144.80 (439.39)	0.001
Apgar, 1-minute	7.8 (2.12)	8.41 (1.31)	0.06
Apgar, 5-minute	8.94 (1.24)	9.38 (0.74)	0.007
Maternal variables	Cases (N=57) Mean (SD)	Controls (N=99) Mean (SD)	<i>p</i>
Ethnicity, <i>N</i> (%)			
White	17 (32.1)	74 (76.3)	<0.001
Non-white	36 (67.9)	23 (23.7)	
IQ	77.39 (8.75)	84.17 (9.59)	<0.001
Educational attainment, <i>n</i> (%)			
primary, completed primary, or some secondary	39 (81.3)	51 (53.1)	
secondary, some higher, or completed higher	9 (18.8)	45 (53.1)	0.002
Prenatal care, <i>N</i> (%)*	36 (73.5)	99 (100)	<0.001
Presence of infectious diseases, <i>N</i> (%)* (syphilis, HIV, and/or hepatitis C)	26 (46.4)	0	<0.001
Marital status (married/cohabiting), <i>N</i> (%)*	29 (50.9)	94 (94.9)	<0.001
Drug use by mothers during pregnancy - ASSIST total score**			
	Cases	Controls	
Total score for nicotine***	17.50 (0-31)	0.00 (0-39)	<0.001
Total score alcohol***	6.00 (0-33)	0.00 (0-13)	<0.001
Total score for cannabis***	0.00 (0-25)	-	-
Presence of current psychopathology in mothers			
	Cases	Cases	
MINI positive for any diagnosis, <i>N</i> (%)	25 (61.0)	32 (33.3)	0.005
Biomarkers (adjusted mean and 95%CI;GLM)			
	Cases	Cases	
BDBF UBC****	3.86 (2.29 - 5.43)	0.85 (0.47 - 1.23)	<0.001
TBARS UBC****	63.97 (39.43 - 88.50)	177.04 (140.93 - 213.14)	<0.001
TBARS mothers****	30.52 (17.79 - 43.25)	29.21 (23.95 - 34.47)	0.86
BDNF mothers****	4.03 (2.87 - 5.18)	6.67 (5.60 - 7.74)	0.006

*Fisher's exact test; **Based on ASSIST; ***Mann-Whitney *U* test; median and range EN, newborns exposed to crack/cocaine in utero; NEN, non-exposed newborns; UBC, umbilical blood cord; GLM, general linear models; ****BDNF at UBC adjusted for intensity of alcohol, tobacco, and cannabis use in the last 3 months, presence of any maternal infection, baby weight and marital status; TBARS at UBL were adjusted for intensity of alcohol, tobacco, and cannabis use in the last 3 months, presence of any maternal psychopathology, maternal infectious disease (HIV, syphilis, and/or hepatitis C), prenatal care, marital status and estimated IQ. TBARS in mothers analysis adjusted for intensity of cannabis use in the last 3 months, presence of any maternal psychopathology and APGAR at minute 5.

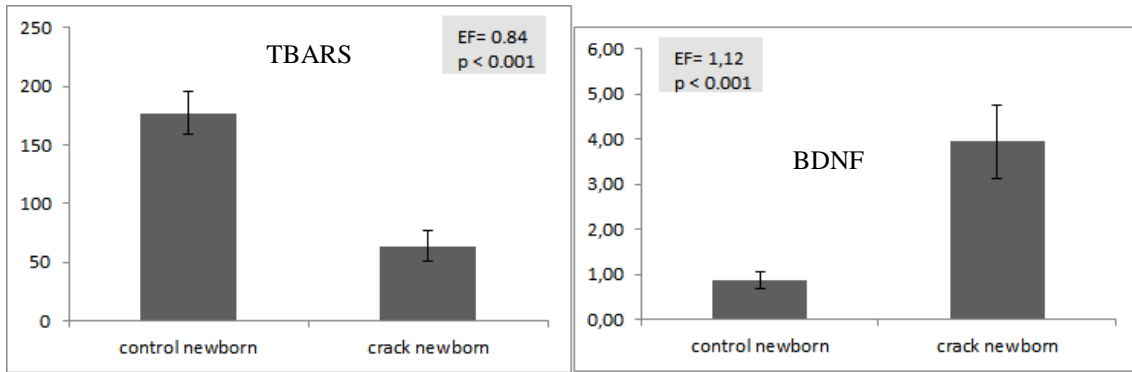


Figura 1: adjusted mean, and Cohen *d* effect size (ES) for TBARS and BDNF between newborns (NB) exposed and non exposed to crack/cocaine during pregnancy.

12 DISCUSSÃO INTEGRATIVA

At present, the lessons for practitioners will come as no surprise. Let us do our best to enhance the wellbeing of children by improving the environments in which they dwell from their embryonic life in utero to their life with their parents and siblings. If we can make a difference by reducing harsh punishment and encouraging parents to provide positive, stimulating, and harmonious early childhoods, we can safely predict that many peripheral biomarkers associated with neuroinflammation may well be reduced and we will have a more peaceful world. We are also beginning to appreciate more fully how cost-effective early interventions are when viewed from a longitudinal perspective. (James F. Leckman, 2014).

A presente tese abordou biomarcadores em uma população altamente vulnerável – díades mães/bebês - com história de exposição ao crack na gestação. Foram avaliados 57 bebês expostos e 99 não expostos e suas mães. Destacamos que o grupo teste, foi constituído por uma população de mulheres com importantes agravos psicossociais (Tabela 1 – Artigo 1). A metade das usuárias de crack não tinha companheiro, seu nível de instrução era muito baixo, e tinham uma medida do QI estimado 7 pontos mais baixos em relação as mulheres controles. Também buscaram menos assistência pré-natal, e foram acometidas de mais quadros infecciosos. Além disso, muitas utilizavam outras drogas como maconha, álcool e nicotina e uma boa parte delas apresenta alguma psicopatologia no MINI.

No primeiro artigo, a ênfase foi a ativação inflamatória em que se detectou um aumento da IL-6 (perfil pró-inflamatório) nos expostos, mesmo mediante ajuste para confundidores. A IL-10 (perfil anti-inflamatório) também se mostrou elevada nos bebês expostos. A IL-6 esteve aumentada nas mães expostas ao crack, sem alterações de IL-10 entre as puérperas. Não houve correlação entre os níveis de citocina materna e do bebê. Estudos têm evidenciado que o uso crônico de cocaína leva a ativação de componentes específicos da resposta imune inata, com consequente desequilíbrio da homeostase do SNC levando a neurotoxicidade. A ausência de diferença entre a IL-10 entre casos e controles mostra seu recrutamento para diminuição da resposta das citocinas pró-inflamatórias. Nestas mulheres, o aumento de IL-6 e manutenção de IL-10 em níveis semelhantes aos controles indica uma resposta predominantemente inflamatória (TH1), possivelmente relacionado a maior prevalência de psicopatologia. Neste estudo, conclui-se que IL-6 e IL-10 podem ser marcadores da ativação inflamatória precoce em bebês com exposição intra-uterina ao crack. As repercussões da ativação inflamatória no neurodesenvolvimento, no eixo HPA, e da epigenética vêm sendo discutidas recentemente. Nossos resultados corroboram com os achados da literatura em que se discute que as citocinas podem ser mediadores potenciais para explicar os efeitos comportamentais e cognitivos do estresse pré-natal sobre o feto, integrando

imunologia e a hipótese da neuroinflamação à saúde mental da criança. Algumas pesquisas têm demonstrado o papel das citocinas pró-inflamatórias em várias doenças, incluindo depressão e ansiedade na função cognitiva, bem como em transtornos do desenvolvimento neurológico. Futuros trabalhos podem confirmar nossos achados e talvez o uso de intervenções farmacológicas que diminuam o desajuste no balanço pró e anti-inflamatório nessas gestantes possa minimizar as perturbações neurocognitivas e comportamentais comuns à evolução dessas crianças.

Por outro lado, o aumento dos valores de IL-6 nos bebês poderia indicar neuroproteção. Apesar dos trabalhos considerarem a IL-6 como uma citocina com perfil pró-inflamatório (COELHO, 2014; KHANDAKER, 2014; WANG, 2015) e existirem relatos da sua associação com, doenças neuropsiquiátricas como a depressão (BRIETZKE, 2009) e a Doença de Alzheimer (ANGELOPOULOS, 2008), e com diminuição do volume de substância cinzenta no hipocampo em adultos (MARSLAND, 2008), a interleucina 6, também, tem demonstrado propriedades neuroprotetoras (PENG, 2005; GODBOUT, 2004). Algumas proteínas do sistema imune inato são também expressas nos neurônios tendo um papel não imunológico (BOULANGER, 2009). A IL-6 e receptor mRNA são expressos nos neurônios e são regulados ao longo do desenvolvimento em cérebro de ratos com altos níveis detectados no hipocampo de ratos adultos. (GADIENT, OTTEN, 1994). Wagner, 1996, refere que a IL-6 pode atuar como um fator neurotrófico, e tem sido mostrado que esta interleucina melhorar a sobrevivência in vitro de várias classes de neurônios (HAMA, et al., 1991; AKANEYA, et al., 1995). Estudos demonstraram que a IL-6 pode desempenhar um papel importante na promoção da plasticidade sináptica, LTP, e na consolidação da memória (PICKERING et al., 2007; VITKOVIC, et al., 2000; VIVIANI et al., 2007).

Outro aspecto importante a ressaltar, além dos resultados envolvendo o período desenvolvimental dos bebês, é a especificidade dos dados encontrados para mulheres e para gestantes. Diferenças de gênero têm sido descritas em usuários de cocaína incluindo diferenças na iniciação, progressão do abuso para a dependência, recaída após período de abstinência e resposta ao tratamento. Estas diferenças têm sido ligadas a atividade hormonal (esteróides gonadais), ciclo menstrual, reatividade do Eixo HPA, e fatores neurobiológicos. Pedraz, et al. (2015) avaliando 55 sujeitos em abstinência a cocaína (40 homens e 15 mulheres) e 73 controles saudáveis (48 homens e 25 mulheres) mediram, entre alguns biomarcadores, citocinas pró e anti-inflamatórias. As concentrações plasmáticas de IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF α mostraram-se maiores em mulheres saudáveis em comparação com os

homens. Curiosamente, estas diferenças estavam ausentes em indivíduos diagnosticados com transtorno de uso de cocaína ao longo da vida. Estas diferenças observadas destacam a importância de que as alterações dos mediadores inflamatórios devem ser comparadas entre pessoas do mesmo sexo, e acreditamos que também do mesmo desenvolvimento maturacional em virtude de diferenças na resposta imune. Além das vulnerabilidades sociais já descritas, e de alguns papéis sociais, como cuidados dos filhos, ficarem mais a cargo das mulheres, o que pode representar uma dificuldade de acesso a tratamento nesta população, tendo em vista que o sistema de saúde não está organizado para a sua realidade - visitas domiciliares seriam mais apropriadas.

No segundo artigo, avaliou-se uma medida de EO (peroxidação lipídica), através do TBARS, nas referidas díades. Os resultados encontrados na análise multivariada do TBARS no sangue de cordão umbilical (SCU) apontam para um menor EO nos bebês expostos. Trata-se de um achado inovador, apontando na direção de uma ativação do sistema antioxidante endógeno nos recém-nascidos expostos, em função da ruptura da homeostase causada pela toxicidade do crack durante a gestação. O feto mobilizaria rotas de antioxidantes endógenos desde muito precocemente no seu desenvolvimento, como o promovido pela CART. Os nossos achados podem sugerir um dano na homeostase do feto pelos altos níveis de dopamina causada pelo uso de crack pelas gestantes. O aumento da regulação da dopamina pode induzir mecanismos de proteção celular pela CART (MAO, et al., 2013). Um dos seus mecanismos de ação citoprotetora está relacionada com a manutenção da integridade da função mitocondrial durante períodos de isquemia e hipóxia, devido à remoção direta das EROs (MAO, et al., 2012). Um outro mecanismo conhecido é o aumento da fosforilação de CREB (SARKAR, et al., 2004). A partir daí, a CART iria realizar a sua função antioxidante (SHA, et al., 2013), através da remoção direta de EROs (MAO, et al., 2012), e do aumento da fosforilação de CREB (SARKAR, et al., 2004). Dessa forma, o cérebro do bebê iria proteger-se do efeito de oxidação esperados pelo uso de crack - aumento das EROs promovido pela cocaína (CERRETANI, et al., 2012; POMIERNY-CHAMIOLO, et al., 2013). Considerando que a CART está presente e funcional desde o período embrionário precoce que é ativada por altos níveis de dopamina e que induz a uma redução do balanço do EO, é razoável considerar a sua participação na forma como reage o sistema de Reações de Redução-Oxidação ou Oxirredução (REDOX) dos fetos de mães usuárias de crack. O TBARS não se mostrou diferente entre as gestantes, indicando a possibilidade de períodos críticos no

desenvolvimento para a ativação de defesas em relação às rupturas à homeostase dopaminérgica promovida pela cocaína.

Ainda neste estudo, pode-se ver um aumento de BDNF nos bebês expostos, mas uma diminuição nas gestantes expostas em relação às não expostas. Os dados de BDNF em bebês expostos ao crack são bastante inovadores, mas coerentes com a literatura, no sentido de uma reação de neuroplasticidade.

Em gestantes, o dado surpreende, tendo em vista que a literatura de adultos indica, em geral, aumento de BDNF em usuários de crack em relação a controles. Tais estudos são, na maioria com homens, e não há análise de gestantes, apesar da alta prevalência de uso de drogas na gestação e de todos os malefícios associados ao conceito. O entendimento desse dado é complexo. Uma possibilidade para explicar esse achado é a variação do tempo entre o último consumo de crack e a coleta, bem como a quantidade e o tempo de uso ao longo da vida, desde o início do consumo entre as gestantes usuárias de crack. Talvez a análise dos casos de gestantes com maior intensidade e cronicidade de consumo de crack em comparação com as gestantes não usuárias possa evidenciar alguma diferença nos níveis séricos do BDNF. Outra alternativa é que pacientes com transtorno de estresse pós-traumático crônico (HAUCK, et al., 2009; 2010), situação mais frequente nas pacientes expostas ao crack, tendem a apresentar níveis de BDNF menores que os controles normais.

Integrando os nossos resultados co relação aos marcadores biológicos estudados nesta dissertação podemos pensar que a elevação das interleucinas estudadas (inclusive o papel neuroprotetor para a IL-6), o menor estresse oxidativo e o aumento do BDNF podem estar implicados em mecanismos neurobiológicos protetores nos bebês e que talvez sejam responsáveis pelo menor comprometimento clínico de bebês e crianças EPC quando comparado a, por exemplo, bebês expostos ao álcool durante a gestação.

Para as mães, mulheres adultas e em outra fase do desenvolvimento neurobiológico e com exposição a vários estressores psicossociais ao longo de suas vidas, comuns a esta população, observamos que estes mecanismos estão sobrecarregados, não sendo suficientes para lidar com agravos crônicos e sobrepostos e tanto o BDNF, O EO e a IL-10 mostraram em perfil diferente. Talvez nas mães o aumento de IL-6 constatado no grupo de casos possa expressar um perfil predominantemente inflamatório e não tanto neuroprotetor.

Em suma, apresentamos dados sobre quatro possíveis biomarcadores em uma população de difícil acesso e de alta relevância em saúde pública. Os estudos têm mostrado interações complexas e recíprocas entre neurotrofinas, enzimas antioxidantes e EO. Percebe-

se que pode haver diferentes respostas de acordo com a etapa do desenvolvimento e que gestantes podem ter um perfil de recrutamento de neurotrofinas e, talvez, de outros biomarcadores, diferentes do que não gestantes. Portanto, observa-se que as mudanças estruturais, fisiológicas e moleculares promovidas pela cocaína resultam do envolvimento de uma vasta rede de neurotransmissores, interligados e atuantes em diferentes áreas do cérebro e em diferentes momentos de maturação.

A presente tese, além dos conhecimentos acima referidos, está colaborando também com um mestrado na Pós-Graduação em Psiquiatria, para o qual a CART foi dosada nesta mesma amostra, visando-se a melhor compreender o sistema antioxidante endógeno em bebês mediante exposição à cocaína. Da mesma forma, o material biológico aqui coletado está sendo investigado colaborativamente com o programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM) da UFRGS, contribuindo com um Doutorado, em que está sendo realizada uma análise epigenética nas amostras. Será avaliado o padrão de metilação de alguns genes-alvo a partir do sequenciamento por bissulfito, comparando esse padrão entre os casos e controles (tanto para as mães quanto para os bebês). Serão avaliados os genes envolvidos em EO, tais como genes relacionados ao BDNF, IL6, IL10 e CART, e serão comparados com as dosagens bioquímicas que foram obtidas no nosso estudo. Ainda será avaliado, em outro estudo deste programa de pós-graduação, contribuindo com um mestrado, o gene Protein kinase C epsilon (PRKCE) que parece sofrer alterações de metilação em modelos animais, frente à exposição embrionária a crack/cocaína

Por fim, ao longo da coleta de dados, gerou-se uma demanda clínica que não foi interrompida. A partir desta tese, criou-se um grupo psicoterápico para pais/bebês com exposição a drogas, do qual o autor da presente tese é um dos coordenadores. Da mesma forma, mais atenção vem sendo dada ao uso de drogas entre as gestantes e puérperas no HCPA, sendo uma contribuição direta da pesquisa para a clínica.

13 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdalla RR, Madruga CS, Ribeiro M, Pinsky I, Caetano R, Laranjeira R. Prevalence of cocaine use in Brazil: data from the II Brazilian National Alcohol and Drugs Survey (BNADS). *Addictive Behaviors*. 2014;39:297-301.

Accornero VH, Anthony JC, Morrow CE, Xue L, Bandstra ES. Prenatal cocaine exposure: an examination of childhood externalizing and internalizing behavior problems at age 7 years. *Epidemiologia e Psichiatria Sociale*. 2006;15:20-9.

Akaneya Y, Takahashi M, Hatanaka H. Interleukin-1 beta enhances survival and interleukin-6 protects against MPP + neurotoxicity in cultures of fetal rat dopaminergic neurons. *Exp Neurol* 1995, 136:44-52.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Conversão de energia: mitocôndrias e cloroplastos. In: _____ *Biologia molecular da célula*. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2011. p. 813-78.

Albertson DN, Pruetz B, Schmidt CJ, Kuh DM, Kapatos G, Bannon MJ. Gene expression profile of the nucleus accumbens of human cocaine abusers: evidence for dysregulation of myelin. *J Neurochem*. 2004;88(5):1211-9.

Álvaro-Bartolomé M, La Harpe R, Callado LF, Meana JJ, García-Sevilla JA. Molecular adaptations of apoptotic pathways and signaling partners in the cerebral cortex of human cocaine addicts and cocaine-treated rats. *Neuroscience*. 2011;196:1-15.

Anderson SM, Pierce RC. Cocaine-induced alterations in dopamine receptor signaling: implications for reinforcement and reinstatement. *Pharmacol Ther*. 2005;106:389-403.

Angelopoulos P, Agouridaki H, Vaiopoulos H, Siskou E, Doutsou K, Costa V, et al. Cytokines in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Int J Neurosci* 2008, 118:1659-72.

Araos P, Pedraz M, Serrano A, Lucena M, Barrios V, García-Marchena N, et al. Plasma profile of pro-inflammatory cytokines and chemokines in cocaine users under outpatient treatment: influence of cocaine symptom severity and psychiatric co-morbidity. *Addiction Biology*. 2015;20(4):756-72.

Arias F, Szerman N, Vega P, Mesias B, Basurte I, Morant C, et al. Cocaine abuse or dependency and other psychiatric disorders. Madrid study on dual pathology. *Rev Psiquiatr Salud Ment*. 2013;6(3):121-8.

Ashley OS, Marsden ME, Brady TM. Effectiveness of substance abuse treatment programming for women: a review. *Am J Drug Alcohol Abuse*. 2003;29(1):19-53.

Bachstetter AD, Morganti JM, Jernberg J, Schlunk A, Mitchell SH, Brewster KW, et al. Fractalkine and CX 3 CR1 regulate hippocampal neurogenesis in adult and aged rats. *Neurobiol Aging*. 2011;32:2030-44.

Bada HS, Bann CM, Bauer CR, Shankaran S, Lester B, LaGasse L, et al. Preadolescent behavior problems after prenatal cocaine exposure: relationship between teacher and caretaker ratings (Maternal Lifestyle Study). *Neurotoxicology and Teratology*. 2011;33:78-87.

Bada HS, Das A, Bauer CR, Shankaran S, Lester BM, Wright LL, et al. Central and autonomic system signs with in utero drug exposure. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2002;87(2):F106-12.

Bagenholm R, Nilsson UA, Kjellmer I. Formation of free radicals in hypoxic ischemic brain damage in the neonatal rat, assessed by an endogenous spin trap and lipid peroxidation. *Brain Res*. 1997;773(1-2):132-8.

Bandstra ES, Morrow CE, Mansoor E, Accornero VH. Prenatal drug exposure: infant and toddler outcomes. *J Addict Dis*. 2010;29(2):245-58.

Bannon M, Kapatos G, Albertson D. Gene expression profiling in the brains of human cocaine abusers. *Addict Biol*. 2005;10(1):119-26.

Bard KA, Coles CD, Platzman KA, Lynch MA. The effects of prenatal drug exposure, term status, and caregiving on arousal and arousal modulation in 8-week-old infants. *Dev Psychobiol*. 2000;36:194-212.

Bashkatova V, Meunier J, Vanin A, Maurice T. Nitric oxide and oxidative stress in the brain of rats exposed in utero to cocaine. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1074:632-42.

Baune BT, Konrad C, Grotegerd D, Suslow T, Birosova E, Ohrmann P, et al. Interleukin-6 gene (IL-6): a possible role in brain morphology in the healthy adult brain. *J Neuroinflammation*. 2012;9:125.

Bauer CR, Langer JC, Shankaran S, Bada HS, Lester B, Wright LL, et al. Acute neonatal effects of cocaine exposure during pregnancy. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2005;159(9):824-34.

Bauer CR, Shankaran S, Bada HS, Lester B, Wright LL, Krause-Steinrauf H, et al. The maternal lifestyle study: drug exposure during pregnancy and short-term maternal outcomes. *Am J Obstet Gynecol*. 2002;186(3):487-95.

Beeghly M, Rose-Jacobs R, Martin BM, Cabral HJ, Heeren TC, Frank DA. Level of intrauterine cocaine exposure and neuropsychological test scores in preadolescence: subtle effects on auditory attention and narrative memory. *Neurotoxicol Teratol*. 2014;45:1-17.

Behnke M, Smith VC, Committee on substance abuse; committee on fetus and newborn. Prenatal substance abuse: short- and long-term effects on the exposed fetus. *Pediatrics*. 2013;131(3):e1009-24.

Bendersky M, Bennett DS, Lewis M. Aggression at age five as a function of prenatal exposure to cocaine, gender and environmental risk. *Journal of Pediatric Psychology*. 2006;31:1-14.

Bendersky M, Lewis M. Arousal modulation in cocaine-exposed infants. *Dev Psychol.* 1998;34:555-64.

Bennett DS, Bendersky M, Lewis M. Children's intellectual and emotional-behavioral adjustment at 4 years as a function of cocaine exposure, maternal characteristics, and environmental risk. *Dev Psychol.* 2002;38(5):648-58.

Bennett DS, Marini VA, Berzenski SR, Carmody DP, Lewis M. Externalizing problems in late childhood as a function of prenatal cocaine exposure and environmental risk. *J Pediatr Psychol.* 2013;38(3):296-308.

Benveniste H, Fowler JS, Rooney WD, Scharf BA, Backus WW, Izrailtyan I, et al. Cocaine is pharmacologically active in the nonhuman primate fetal brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(4):1582-7.

Bough KJ, Amur S, Lao G, Hemby SE, Tannu NS, Kampman KM, et al. Biomarkers for the development of new medications for cocaine dependence. *Neuropsychopharmacology.* 2014;39(1):1-18.

Boulanger LM. Immune proteins in brain development and synaptic plasticity. *Neuron.* 2009;64:93-109.

Boveris A, Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide *Biochem J.* 1972;128(3):617-30.

Brasil. Lei n. 8.069, de 13 de julho de 1990. Dispõe sobre o Estatuto da Criança e do Adolescente e dá outras providências. Brasília, DF; 1990. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L8069.htm>. Acesso em: 18/dez/2015.

Brasil. Ministério da Saúde. Assistência Pré-Natal: manual técnico. Brasília: Ministério da Saúde; 2000a.

Brasil. Ministério da Saúde. Manual Técnico de Gestação de Alto Risco. 3ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2000b.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Protocolo para a prevenção de transmissão vertical de HIV e sífilis. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.

Brasil. Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome. Plano Nacional de Promoção, Proteção e Defesa do Direito de Crianças e Adolescentes à Convivência Familiar e Comunitária. Brasília: Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome; 2006.

Brietzke E, Stertz L, Fernandes BS, Kauer-Sant'anna M, Mascarenhas M, Escosteguy Vargas A, et al. Comparison of cytokine levels in depressed, manic and euthymic patients with bipolar disorder. *J Affect Disord* 2009, 116:214-7.

Cabral GA. Drug of abuse, immune modulation, and AIDS. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2006;1:280-95.

- Cain MA, Bornick P, Whiteman V. The maternal, fetal, and neonatal effects of cocaine exposure in pregnancy. *Clin Obstet Gynecol.* 2013;56(1):124-32.
- Cambell S. Prenatal cocaine exposure and neonatal/infant outcomes. *Neonatal Netw.* 2003;22(1):19-21.
- Cerretani D, Fineschi V, Bello S, Riezzo I, Turillazzi E, Neri M. Role of oxidative stress in cocaine-induced cardiotoxicity and cocaine-related death. *Current medicinal chemistry.* 2012;19(33):5619-23.
- Chakraborty S, Bornhorst J, Nguyen TT, Aschner M. Oxidative stress mechanisms underlying parkinson's disease-associated neurodegeneration in *C elegans*. *Int J Mol Sci.* 2013;14(11):23103-28.
- Chaplin DD. Overview of the human immune response. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2006;117(2 Suppl Mini-Primer):S430-5.
- Chasnoff IJ, Burns KA, Burns WJ. Cocaine use in pregnancy: perinatal morbidity and mortality. *Neurotoxicol Teratol.* 1987;9(4):291-3.
- Chatterjee P, Chiasson VL, Bounds KR, Mitchell BM. Regulation of the Anti-Inflammatory Cytokines Interleukin-4 and Interleukin-10 during Pregnancy. *Front. Immunol.* 2014;5:253.
- Chiriboga CA, Vibbert M, Malouf R, Suarez MS, Abrams EJ, Heagarty MC, et al. Neurological correlates of fetal cocaine exposure: transient hypertonia of infancy and early childhood. *Pediatrics.* 1995;96(6):1070-77.
- Chiriboga CA, Kuhn L, Wasserman GA. Prenatal cocaine exposures and dose-related cocaine effects on infant tone and behavior. *Neurotoxicol Teratol.* 2007;29(3):323-30.
- Chuan-Yu Chen P, Storr CL, ScDb A, James C. Early-onset drug use and risk for drug dependence problems. *Addictive Behaviors.* 2009;34(3):319-22.
- Cipriani R, Villa P, Chece G, Lauro C, Paladini A, Micotti E, et al. CX3CL1 is neuroprotective in permanent focal cerebral ischemia in rodents. *J Neurosci.* 2011;31:16327-35.
- Coelho R, Viola TW, Walss-Bass C, Brietzke E, Grassi-Oliveira R. Childhood maltreatment and inflammatory markers: a systematic review. *Acta Psychiatr Scand.* 2014;129(3):180-92.
- Cohen HR, Green JR, Crombleholme WR. Peripartum cocaine use: estimating risk of adverse pregnancy outcome. *Int J Gynecol Obstet.* 1991;35(1):51-4.
- Coller JK, Hutchinson MR. Implications of central immune signaling caused by drugs of abuse: mechanisms, mediators and new therapeutic approaches for prediction and treatment of drug dependence. *Pharmacol Ther.* 2012;134:219-45.
- Cone-Wesson B. Prenatal alcohol and cocaine exposure: influences on cognition, speech, language, and hearing. *J Commun Disord.* 2005;38(4):279-302.

Cunha GB, Rotta NT, Silva AR, Dieder AL, Wolf AL, Moser C et al. Prevalência da exposição pré-natal à cocaína em uma amostra de recém-nascidos de um hospital geral universitário. *J Pediatr (Rio J.)*. 2001;77(5):369-73.

Cunha GB. Epidemiologia da exposição pré-natal à cocaína em uma amostra de recém-nascidos do HCPA [Dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2000.

Cunha GB. Exposição pré-natal à cocaína e efeitos neurocomportamentais no recém-nascido. [Tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007.

Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9:46-56.

De Genna N, Goldschmidt L, Richardson GA. Prenatal cocaine exposure and age of sexual initiation: direct and indirect effects. *Drug Alcohol Depend*. 2014;145:194-200.

De Giovanni N, Marchetti D. Cocaine and its metabolites in the placenta: a systematic review of the literature. *Reprod. Toxicol*. 2012;33:1-14.

Degenhardt L, Hall W. Extent of illicit drug use and dependence, and their contribution to the global burden of disease. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61138-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61138-0) (S0140-6736(11)61138-0 [pii])>. Acesso em: 15/dezembro/2015.

Dehnes Y, Shan J, Beuming T, Shi L, Weinstein H, Javitch JA. Conformational changes in dopamine transporter intracellular regions upon cocaine binding and dopamine translocation. *Neurochem Int*. 2014;73:4-15.

Delaney-Black V, Covington C, Nordstrom B, Ager J, Janisse J, Hannigan JH, et al. Prenatal cocaine: quantity of exposure and gender moderation. *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics*. 2004;25:254-63.

Delaney-Black V, Covinton C, Templin T, Kershaw T, Nordstrom-Klee B, Ager J, Sokol RJ. Expressive language development of children exposed to cocaine prenatally: Literature review and report of a prospective cohort study. *Journal of Communication Disorders*. 2000;33:463-81.

Delaney-Black V. Prenatal cocaine and neonatal outcome: evaluation of dose-responses relationship. *Pediatrics*. 1996;98(4):735-40.

Dennis T, Bendersky M, Ramsay D, Lewis M. Reactivity and regulation in children prenatally exposed to cocaine. *Dev Psychol*. 2006;42(4):688-97.

Desai RI, Grandy DK, Lupica CR, Katz JL. Pharmacological characterization of a dopamine transporter ligand that functions as a cocaine antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014;348(1):106-15.

- Diesner SC, Förster-Waldl E, Olivera A, Pollak A, Jensen-Jarolim E, Untersmayr E. Perspectives on immunomodulation early in life. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2012;23:210-23.
- Dietrich JB, Mangeol A, Revel MO, Burgun C, Aunis D, Zwiller J. Acute or repeated cocaine administration generates reactive oxygen species and induces antioxidant enzyme activity in dopaminergic rat brain structures. *Neuropharmacology.* 2005;48(7):965-74.
- Dolkart LA, Plessinger MA, Woods JRJ. Effect of Alpha 1 receptor blockade upon maternal and fetal cardiovascular responses to cocaine. *Obstet Gynecol.* 1990;75(5):745-51.
- Ducci F, Goldman D. The genetic basis of addictive disorders. *The Psychiatric Clinics of North America,* 2012;35(2):495-519.
- Dudish SA, Hatsukami DK. Gender differences in crack users who are research volunteers. *Drug Alcohol Depend.* 1996;42(1):55-63.
- Duka T, Crombag HS, Stephens DN. Experimental medicine in drug addiction: towards behavioral, cognitive and neurobiological biomarkers. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England).* 2011;25(9):1235-55.
- Edwards JM, Halpern CT, Wechsberg WM. Correlates of exchanging sex for drugs or money among women who use crack cocaine. *AIDS Educ Prev.* 2006;18(5):420-9.
- Eiden RD, Stevens A, Schuetze P, Dombkowski LE. Conceptual model for maternal behavior among polydrug cocaine-using mothers: the role of postnatal cocaine use and maternal depression. *Psychol Addict Behav.* 2006;20(1):1-10.
- Eiden RD, Veira Y, Granger DA. Prenatal cocaine exposure and infant cortisol reactivity. *Child Dev.* 2009;80:528-43.
- Eyler FD, Behnke M. Early development of infants exposed to drugs prenatally. *Clin Perinatol.* 1999;26(1):107-50.
- Federico A, Cardaioli E, da Pozzo P, Formichi P, Gallus GN, Radi E. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *J Neurol Sci.* 2012;322(1-2):254-62.
- Ferreira PEM, Martini RK. Cocaína: lendas, história e abuso. *Rev Bras Psiqu.* 2001;23:96-9.
- Finger B, Schuetze P, Eiden RD. Behavior problems among cocaine exposed children: role of physiological regulation and parenting. *Neurotoxicol Teratol.* 2014;42:51-9.
- Finnegan L. Outcomes of newborns of pregnant women using drugs. In: *Substance abuse in Canada: licit and illicit drug use during pregnancy: maternal neonatal and early childhood consequences.* Ottawa, ON: Canadian Centre of Substance Abuse; 2013. p. 34-61.
- Fisher P, Lester B, DeGarmo D, LaGasse L, Lin H, Shankaran S, et al. The combined effects of prenatal drug exposure and early adversity on neurobehavioral disinhibition in childhood and adolescence. *Dev Psychopathol.* 2011;23:777-88.

Fox HC, D'Sa C, Kimmerling A, Siedlarz KM, Tuit KL, Stowe R, et al. Immune system inflammation in cocaine dependent individuals: implications for medications development. *Hum. Psychopharmacol.* 2012;27(2):156-66.

Frank DA, Augustyn M, Knight WG, Pell T, Zuckerman B. Growth, development, and behavior in early childhood following prenatal cocaine exposure: a systematic review. *JAMA.* 2001;285(12):1613-25.

Freud S. Carta 79. In: _____. Edição standard brasileira das obras psicológicas completas de Sigmund Freud. Rio de Janeiro: Imago; 1977. p. 367-9.

Freud S. Über coca. In: Byck R. Editor. Freud e a Cocaina. Rio de Janeiro: Espaço e tempo; 1989. p. 63-86.

Fundação Oswaldo Cruz. Perfil dos usuários de crack e/ou similares no Brasil. Rio de Janeiro, RJ. Disponível em: <<http://portal.fiocruz.br/pt-br/content/maior-pesquisa-sobre-crack-já-feita-no-mundo-mostra-o-perfil-do-consumo-no-brasil>>. Acesso em: 15/dez/2015.

Gadient RA, Otten U. Expression of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-6 receptor (IL-6R) mRNAs in rat brain during postnatal development. *Brain Res.* 1994;637:10-4.

Gargari SS, Fallahian M, Haghghi L, Hosseinezhad-Yazdi M, Dashti E, Dolan K. Maternal and neonatal complications of substance abuse in Iranian pregnant women. *Acta Med Iran.* 2012;50(6):411-6.

Gendle MH, White TL, Strawderman M, Mactutus CF, Booze RM, Levitsky DA, et al. Enduring effects of prenatal cocaine exposure on selective attention and reactivity to errors: evidence from an animal model. *Behav Neurosci.* 2004;118:290-97.

Glatt SJ. Effects of prenatal cocaine exposure on dopamine system development: a meta-analysis. *Neurotoxicol Teratol.* 2000;22(5):617-29.

Godbout JP, Johnson RW. Interleukin-6 in the aging brain. *J Neuroimmunol* 2004, 147:141-4.

Gouin K, Murphy K, Shah PS. Knowledge synthesis group on determinants of low birth weight and preterm births. Effects of cocaine use during pregnancy on low birthweight and preterm birth: systematic review and metaanalyses. *Am J Obstet Gynecol.* 2011;204:340.e1-340.12.

Greenwald MK, Chiodo LM, Hannigan JH, Sokol RJ, Janisse J, Delaney-Black V. Teens with heavy prenatal cocaine exposure respond to experimental social provocation with escape not aggression. *Neurotoxicology and Teratology.* 2011;33:198-204.

Grewen K, Burchinal M, Vachet C, Gouttard S, Gilmore JH, Lin W, et al. Prenatal cocaine effects on brain structure in early infancy *Neuroimage.* 2014;101:114-23.

Grinspoon L, Bakalar JB. Coca and cocaine as medicines: an historical review. *J Ethnopharmacol.* 1981;3(2-3):149-59.

Gubert C, Stertz L, Pfaffenseller B, Panizzutti BS, Rezin GT, Massuda R, et al. Mitochondrial activity and oxidative stress markers in peripheral blood mononuclear cells of patients with bipolar disorder, schizophrenia, and healthy subjects. *J Psychiatr Res.* 2013;47(10):1396-402.

Guyon A, Skrzydelski D, De Giry I, Rovere C, Conductier G, Trocello JM. Long term exposure to the chemokine CCL2 activates the nigrostriatal dopamine system: a novel mechanism for the control of dopamine release. *Neuroscience.* 2009;162:1072-80.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen is a toxic gas - an introduction to oxygen toxicity and reactive species. In: _____. *Free radicals in biology and medicine.* New York: Oxford University Press; 2007. p. 1-29.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen is a toxic gas - an introduction to oxygen toxicity and reactive species. In: _____. *Free radicals in biology and medicine.* New York: Oxford University Press; 2007. p. 1-29.

Halliwell B, Gutteridge JMC. The chemistry of free radicals and related 'reactive species'. In: _____. *Free radicals in biology and medicine.* New York: Oxford University Press; 2007. p.30-78.

Halliwell B, Gutteridge JMC. The chemistry of free radicals and related 'reactive species'. In: _____. *Free radicals in biology and medicine.* New York: Oxford University Press; 2007. p. 30-78.

Halliwell B, Poulsen HE. Oxidative stress. In:_____. (Ed). *Cigarette smoke and oxidative stress.* New York: Springer; 2006. p.1-4.

Hama T, Kushima Y, Miyamoto M, Kubota M, Takei N, Hatanaka H. Interleukin-6 improves the survival of mesencephalic catecholaminergic and septal cholinergic neurons from postnatal, two-week-old rats in cultures. *Neuroscience* 1991, 40:445-52.

Hargrave B, Castle MC. Intrauterine exposure to cocaine increased plasma ANP (Atrial Natriuretic Peptide) but did not alter hypoxanthine concentrations in the sheep fetus. *Life Sci.* 1995;56(20):1689-97.

Hawley LT, Halle TG, Drasin RE, Thomas NG. Children of addicted mothers: effects of the 'crack epidemic' on the caregiving environment and the development of preschoolers. *American Journal of Orthopsychiatry.* 1995;65:364-79.

Heil SH, Jones HE, Arria A, et al. Unintended pregnancy in opioid-abusing women. *J Subst Abuse Treat.* 2011;40(2):199-202.

Held JR, Riggs ML, Dorman C. The effect of prenatal cocaine exposure on neurobehavioral outcome: a meta-analysis. *Neurotoxicol Teratol.* 1999;21(6):619-5.

Howell E M, Heiser N, Harrington M. A review of recent findings on substance abuse treatment for pregnant women. *J Subst Abuse Treat.* 1999;16(3):195-219.

- Hurt H, Malmud L, Betancourt NL, Brodsky NL, Giannetta JA. A prospective evaluation of early language development in children with in utero cocaine exposure in control subjects. *Journal of Pediatrics*. 1997;130:310-2.
- Ikonomidou C, Kaindl AM. Neuronal death and oxidative stress in the developing brain. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(8):1535-50.
- Ikonomidou C, Kaindl AM. Neuronal death and oxidative stress in the developing brain. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(8):1535-50.
- Inciardi JA, Surratt HL, Pechansky F, Kessler F, von Diemen L, da Silva EM, et al. Changing patterns of cocaine use and HIV risks in the South of Brazil. *J Psychoactive Drugs*. 2006;38(3):305-10.
- Inciardi JA. Crack-cocaine in Miami. *NIDA Res Monogr*. 1991;110:263-74.
- INPAD. Segundo Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (II LENAD). São Paulo, SP. Disponível em: <<http://inpad.org.br/lenad/cocaina-e-crack/resultados-preliminares/>>. Acesso em: 15/dez/2015.
- Janisse JJ, Bailey BA, Ager J, Sokol RJ. Alcohol, tobacco, cocaine, and marijuana use: relative contributions to preterm delivery and fetal growth restriction. *Subst Abus*. 2014;35(1):60-7.
- Johns JM, Means MJ, Woodley BE, Means LW. Prenatal exposure to cocaine: Effects on aggression on Sprague-Dawley rats. *Developmental Psychobiology*. 1994;27:227-39.
- Johns JM, Nelson C, Meter KE, Lubin DA, Couch CD, Ayers A, Walker CH. Dose-dependent effects of multiple acute cocaine injections on maternal behavior and aggression in Sprague-Dawley rats. *Dev Neurosci*. 1998;20:525-32.
- Johnson AL, Morrow CE, Accornero VH, Xue L, Anthony JC, Bandstra ES. Maternal cocaine use: estimated effects on mother-child play interactions in the preschool period. *Dev Behav Pediatr*. 2002;23(4):191-202.
- Joseph RE Jr, Su TP, Cone EJ. In vitro binding studies of drugs to hair: influence of melanin and lipids on cocaine binding to Caucasoid and Africoid hair. *J Anal Toxicol*. 1996;20(5):338-44.
- Kaltenbach K, Finnegan L. Prevention and treatment issues for pregnant cocaine-dependent women and their infants. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;846:329-34.
- Karlix JL, Behnke M, Davis-Eyler F, Wobie K, Adams V, Freiburger B, et al. Cocaine suppresses fetal immune system. *Pediatr. Res*. 1998;44:43-6.
- Karmel BZ, Gardner JM. Prenatal cocaine exposure effects on arousal-modulated attention during the neonatal period. *Dev Psychobiol*. 1996;29:463-80.
- Katz R. Biomarkers and surrogate markers: an FDA perspective. *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2004;1(2):189-95.

Kessler F, Woody G, de Boni R, von Diemen L, Benzano D, Faller S, et al. Evaluation of psychiatric symptoms in cocaine users in the Brazilian public health system: need for data and structure. *Public Health*. 2008;122(12):1349-55.

Khandaker GM, Pearson RM, Zammit S, Lewis G, Jones PB. Association of serum interleukin 6 and C-reactive protein in childhood with depression and psychosis in young adult life: a population-based longitudinal study. *JAMA Psychiatry*. 2014;71(10):1121-8.

Kilbride HW, Castor CH, Fuger KL. School-age outcome of children with prenatal cocaine exposure following early case management. *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics*. 2006;27:181-7.

Koller C. On the use of cocaine for producing anesthesia on the eye. *The Lancet*. 1884;124(3197):990-2.

Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2010;35(1):217-38.

Koprach JB, Reske-Nielsen C, Mithal P, Isacson O. Neuroinflammation mediated by IL-1beta increases susceptibility of dopamine neurons to degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation*. 2008;5:8.

Kovacic P, Cooksy AL. Unifying mechanism for toxicity and addiction by abused drugs: electron transfer and reactive oxygen species. *Med Hypotheses*. 2005;64(2):357-66.

Kovacic P. Role of oxidative metabolites of cocaine in toxicity and addiction: oxidative stress and electron transfer. *Med Hypotheses*. 2005;64(2):350-6.

Krause KH. Aging: a revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidases. *Exp Gerontol*. 2007;42(4):256-62.

Kuhn TS. Anomaly and the emergence of scientific discoveries. In: _____. *The structure of scientific revolutions*. 3rd Ed. Chicago: The University of Chicago Press; 1996. p. 52-65.

Lambert BL, Bauer CR. Developmental and behavioral consequences of prenatal cocaine exposure: a review. *J Perinatol*. 2012;32:819-28.

Lambert BL, Bann CM, Bauer CR, Shankaran S, Bada HS, Lester BM, et al. Risk-taking behavior among adolescents with prenatal drug exposure and extrauterine environmental adversity. *J Dev Behav Pediatr*. 2013;34(9):669-79.

Lappas M, Hiden U, Desoye G, Froehlich J, Hauguel-de Mouzon S, Jawerbaum A. The role of oxidative stress in the pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(12):3061-100.

Lendoiro E, González-Colmenero E, Concheiro-Guisán A, de Castro A, Cruz A, López-Rivadulla M, Concheiro M. Maternal hair analysis for the detection of illicit drugs, medicines, and alcohol exposure during pregnancy. *Ther Drug Monit*. 2013;35(3):296-304.

Lester BM, Corwin MJ, Sepkoski C, Seifer R, Peucker M, McLaughlin S, et al. Neurobehavioral syndromes in cocaine-exposed newborn infants. *Child Dev.* 1991;62(4):694-705.

Lester BM, Lagasse L, Seifer R, Tronick EZ, Bauer CR, Shankaran S, et al. The Maternal Lifestyle Study (MLS): effects of cocaine and/or opiate exposure on auditory brain response at one month. *J Pediatr.* 2003;142(3):279-85.

Lester BM, Lagasse LL, Bigsby R. Prenatal cocaine exposure and child development: what do we know and what do we do? *Semin Speech Lang.* 1998;19(2):123-46.

Lester BM, Lagasse LL. Children of addicted women. *J Addict Dis.* 2010;29(2):259-76.

Lester BM, Tronick EZ. History and description of the Neonatal Intensive Care Unit Network Neurobehavioral Scale. *Pediatrics.* 2004;113(3 pt. 2):634-40.

Lester BM, Lin H, Degarmo DS, Fisher PA, Lagasse LL, Levine TP, et al. Neurobehavioral disinhibition predicts initiation of substance use in children with prenatal cocaine exposure. *Drug Alcohol Depend.* 2012;126(1-2):80-6.

Lewis BA, Minnes S, Short EJ, Min MO, Wu M, Lang A, Weishampel P, Singer LT. Language outcomes at 12 years for children exposed prenatally to cocaine. *J Speech Lang Hear Res.* 2013;56(5):1662-76.

Li C-Y, Mao X, Wei L. Genes and (common) pathways underlying drug addiction. *PLoS Computational Biology.* 2008;4(1):e2.

Lidow MS, Song ZM. Primates exposed to cocaine in utero display reduced density and number of cerebral cortical neurons. *J Comp Neurol.* 2001;435(3):263-75.

Linares TJ, Singer LT, Kirchner HL, Short EJ, Min MO, Hussey P, et al. Mental health outcomes of cocaine-exposed children at 6 years of age. *Journal of Pediatric Psychology.* 2006;31:85-97.

Lind JN, Petersen EE, Lederer PA, Phillips-Bell GS, Perrine CG, Li R, et al. Infant and maternal characteristics in neonatal abstinence syndrome--selected hospitals in Florida, 2010-2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2015 Mar 6;64(8):213-6.

Lipton JW, Vu TQ, Ling Z, Gyawali S, Mayer JR, Carvey PM. Prenatal cocaine exposure induces an attenuation of uterine blood flow in the rat. *Neurotoxicol Teratol.* 2002;24(2):143-8.

Lipton JW, Gyawali S, Borys ED, Koprach JB, Ptaszny M, McGuire SO. Prenatal cocaine administration increases glutathione and alpha-tocopherol oxidation in fetal rat brain. *Brain Res. Dev Brain Res.* 2003;147(1-2):77-84.

Litt J, McNeil M. Biological markers and social differentiation: crack babies and the construction of the dangerous mother. *Health Care Women Int.* 1997;18(1):31-41.

- Liu J, Lester BM, Neyzi N, Sheinkopf SJ, Gracia L, Kekatpure M, Kosofsky BE. Regional brain morphometry and impulsivity in adolescents following prenatal exposure to cocaine and tobacco. *JAMA Pediatr.* 2013;167(4):348-54.
- Lucca J, Baldisserotto M. Cerebral ultrasound findings in infants exposed to crack cocaine during gestation. *Pediatr Radiol.* 2013;43(2):212-8.
- Lutiger B, Graham K, Einarson TR, Koren G. Relationship between gestational cocaine use and pregnancy outcome: a meta-analysis. *Teratology.* 1991;44(4):405-14.
- Lyons P, Rittner B. The construction of the crack babies phenomenon as a social problem. *Am J Orthopsychiatry.* 1998;68(2):313-20.
- Macêdo DS, Vasconcelos SMM, Andrade-Neto M, Belchior LD, Honório Junior JER, Gonçalves DO, et al. Cocaine-induced status epilepticus and death generate oxidative stress in Prefronta Cotex and Striatum of mice. *Neurochem Int.* 2010;56(1):183-7.
- Malanga CJ, Kosofsky BE. Mechanisms of action of drugs of abuse on the developing fetal brain. *Clin Perinatol.* 1999;26(1):17-37.
- Mao P, Meshul CK, Thuillier P, Goldberg NR, Reddy PH. CART peptide is a potential endogenous antioxidant and preferentially localized in mitochondria. *PloS one.* 2012;7(1):e29343.
- Mao P, Meshul CK, Thuillier P, Reddy PH. Neurotransmitter CART as a new therapeutic candidate for Parkinson's disease. *Pharmaceuticals.* 2013;6(1):108-23.
- Marsland AL, Gianaros PJ, Abramowitch SM, Manuck SB, Hariri AR. Interleukin-6 covaries inversely with hippocampal grey matter volume in middle-aged adults. *Biol Psychiatry* 2008, 64:484-90.
- Mastrogiannis DS, Decavalas GO, Verma U, Tejani N. Perinatal outcome after recent cocaine usage. *Obstet Gynecol.* 1990;76(1):8-11.
- Mathai S, Gunn AJ, Backhaus RA, Guan J. Window of opportunity for neuroprotection with an antioxidant, allene oxide synthase, after hypoxia-ischemia in adult male rats. *CNS Neurosci Ther.* 2012;18(11):887-94.
- Mayes LC, Grillon C, Granger RH, Schottenfeld R. Regulation of arousal and attention in preschool children exposed to cocaine prenatally. In: Harvey JA, Kosofsky B. Editors. *Cocaine: effects on the developing brain.* New York: New York Academy of Sciences; 1998. p. 126-43.
- Mayes LC. A behavioral teratogenic model of the impact of prenatal cocaine exposure on arousal regulatory systems. *Neurotoxicol Teratol.* 2002;24(3):385-95.
- McMurtrie C, Rosenberg KD, Kerker BD, Kan J, Graham EH. A unique drug treatment program for pregnant and postpartum substance-using women in New York City: results of a pilot project, 1990-1995. *Am J Drug Alcohol Abuse.* 1999;25(4):701-13.

- Mehta SK, Super DM, Connuck D, Kirchner HL, Salvator A, Singer L, et al. Autonomic alterations in cocaine-exposed infants. *Am Heart J.* 2002;144(6):1109-15.
- Mehta SK, Super DM, Salvator A, Singer L, Connuck D, Fradley LG, et al. Heart rate variability in cocaine-exposed newborn infants. *Am Heart J.* 2001;142(5):828-32.
- Miller-Loncar C, Lester BM, Seifer R, Lagasse LL, Bauer CR, Shankaran S, et al. Predictors of motor development in children prenatally exposed to cocaine. *Neurotoxicol Teratol.* 2005;27(2):213-20.
- Minnes S, Singer LT, Arendt R, Satayathum S. Effects of prenatal cocaine/polydrug use on maternal-infant feeding interactions during the first year of life. *Dev Behav Pediatr.* 2005;26(3):194-200.
- Minnes S, Singer LT, Kirchner HL, Short E, Lewis B, Satayathum S, et al. The effects of prenatal cocaine exposure on problem behavior in children 4-10 years. *Neurotoxicology and Teratology.* 2010;32:443-51.
- Minnes S, Singer L, Min MO, Wu M, Lang A, Yoon S. Effects of prenatal cocaine/polydrug exposure on substance use by age 15. *Drug Alcohol Depend.* 2014;134:201-10.
- Mitsuhiro SS, Chalem E, Barros MM, Guinsburg R, Laranjeira R. Gravidez na adolescência: uso de drogas no terceiro trimestre e prevalência de transtornos psiquiátricos. *Rev Bras Psiquiatr.* 2006;28(2):122-5.
- Moreira FP, Medeiros JR, Lhullier AC, Souza LD, Jansen K, Portela LV, et al. Cocaine abuse and effects in the serum levels of cytokines IL-6 and IL-10. *Drug Alcohol Depend.* 2016;158:181-5.
- Morrow CE, Accornero VH, Xue L, Manjunath S, Culbertson JL, Anthony JC, et al. Estimated risk of developing selected DSMIV disorders among 5-year-old children with prenatal cocaine exposure. *Journal of Child and Family Studies.* 2009;18:356-64.
- Morrow CE, Bandstra ES, Anthony JC, Ofir AY, Xue L, Reyes MB. Influence of prenatal cocaine exposure on early language development: Longitudinal findings from four months to three years of age. *Developmental and Behavioral Pediatrics.* 2003;24:39-50.
- Morrow CE, Culbertson JL, Accornero VH, Xue L, Anthony JC, Bandstra ES. Learning disabilities and intellectual functioning in school-aged children with prenatal cocaine exposure. *Dev Neuropsychol.* 2006;30(3):905-31.
- Murphy-Oikonen J, Montelpare WJ, Southon S, Bertoldo L, Persichino N. Identifying infants at risk for neonatal abstinence syndrome: a retrospective cohort comparison study of 3 screening approaches. *J Perinat Neonatal Nurs.* 2010;24(4):366-72.
- Nappo SA, Sanchez Z, Oliveira LG. Crack, AIDS, and women in São Paulo, Brazil. *Subst Use Misuse.* 2011;46(4):476-85.
- Narvaez J. Trauma infantil e função executiva em usuários de crack [Dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2010.

Narvaez JC, Magalhães PV, Fries GR, Colpo GD, Czepielewski LS, Vianna P, et al. Peripheral toxicity in crack cocaine use disorders. *Neurosci. Lett.* 2013;544:80-4.

NIDA - National Institute on Drug Abuse. Population projections. Based on the National Survey on Drug Abuse, 1982. DHHS Pub. No.(ADM) 83-1303. Washington, DC: Supt Docs, US Govt Print off; 1983.

NIDA - National Institute on Drug Abuse. Treatment statistics. NIDA; 2011.

Nordstrom-Klee B, Delaney-Black V, Covington C, Ager J, Sokol R. Growth from birth onwards of children prenatally exposed to drugs: a literature review. *Neurotoxicol Teratol.* 2002;24(4):481-8.

Overstreet DH, Moy SS, Lubin DA, Gause LR, Lieberman JA, Johns JM. Enduring effects of prenatal cocaine administration on emotional behavior in rats. *Physiol Behav.* 2000;70:149-56.

Paim Kessler FH, Barbosa Terra M, Faller S, Ravy Stolf A, Carolina Peuker A, Benzano D, et al. Crack users show high rates of antisocial personality disorder, engagement in illegal activities and other psychosocial problems. *Am J Addict.* 2012;21(4):370-80.

Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science.* 2011;333:1456-8.

Patel TG, Laungani RG, Grose EA, Dow-Edwards DL. Cocaine decreases uteroplacental blood flow in the rat. *Neurotoxicol Teratol.* 1999;21(5):559-65.

Pechansky F, Woody G, Inciardi J, Surratt H, Kessler F, Von Diemen L, et al. HIV seroprevalence among drug users: an analysis of selected variables based on 10 years of data collection in Porto Alegre, Brasil. *Drug Alcohol Depend.* 2006;82(Suppl 1):S109-13.

Pedraz M, Araos P, García-Marchena N, Serrano A, Romero-Sanchiz P, Suárez J. Sex differences in psychiatric comorbidity and plasma biomarkers for cocaine addiction in abstinent cocaine-addicted subjects in outpatient settings. *Front Psychiatry.* 2015;6:17.

Peng YP, Qiu YH, Lu JH, Wang JJ. Interleukin-6 protects cultured cerebellar granule neurons against glutamate-induced neurotoxicity. *Neurosci Lett* 2005, 374:192-6.

Pichini S, Puig C, Zuccaro P, Marchei E, Pellegrini M, Murillo J, et al. Assessment of exposure to opiates and cocaine during pregnancy in a Mediterranean city: preliminary results of the "Meconium Project". *Forensic Sci Intern.* 2005;153(1):59-65.

Pickering M, O'Connor JJ. Pro-inflammatory cytokines and their effects in the dentate gyrus. *Prog Brain Res.* 2007; 163:339-54.

Pomierny-Chamiolo L, Moniczewski A, Wydra K, Suder A, Filip M. Oxidative stress biomarkers in some rat brain structures and peripheral organs underwent cocaine. *Neurotox Res.* 2013;23(1):92-102.

Rasheed N, Ahmad A, Al-Sheeha M, Alghasham A, Palit G. Neuroprotective and anti-stress effect of A68930 in acute and chronic unpredictable stress model in rats. *Neurosci Lett*. 2011;504(2):151-5.

Regalado MG, Schechtman VL, Khoo MC, Bean XD. Spectral analysis of heart rate variability and respiration during sleep in cocaine-exposed neonates. *Clin Physiol*. 2001;21(4):428-36.

Ribeiro M, Dunn J, Sesso R, Lima MS, Laranjeira R. Crack cocaine: a five-year follow-up study of treated patients. *European Addiction Research*. 2007;13(1):11-9.

Richardson GA, Goldschmidt L, Larkby C. Effects of prenatal cocaine exposure on Growth: a longitudinal analysis. *Pediatrics*. 2007;120(4):1017-27.

Richardson GA, Goldschmidt L, Leech S, Willford J. Prenatal cocaine exposure: effects on mother- and teacher-rated behavior problems and growth in school-age children. *Neurotoxicology and Teratology*. 2011;33:69-77.

Riezzo I, Fiore C, de Carlo D, Pascale N, Neri M, Turillazzi E, et al. Side effects of cocaine abuse: multiorgan toxicity and pathological consequences. *Curr Med Chem*. 2012;19(33):5624-46.

Rivera MA, Aufderheide AC, Cartmell LW, Torres CM, Langsjoen O. Antiquity of coca-leaf chewing in the south central Andes: a 3,000 year archaeological record of coca-leaf chewing from northern Chile. *J Psychoactive Drugs*. 2005;37(4):455-8.

Rodier PM. Environmental causes of central nervous system maldevelopment. *Pediatrics*. 2004;113(4 Suppl):1076-83.

Rohde LA. The relevance of family variables in child and adolescent mental health. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2013;22(11):651-652.

Romano M, Ribeiro M, Marques ACPR. Abuso e dependência de cocaína, projetos diretrizes. Associação Brasileira e Conselho Federal de Medicina; 2002. Disponível em: <http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/005.pdf>. Acesso em: 11/mar/2013.

Ryan L, Ehrlich S, Finnegan L. Cocaine abuse in pregnancy: effects on the fetus and newborn. *Neurotoxicol Teratol*. 1987;9(4):295-9.

Salamy A, Eldredge L, Anderson J, Bull D. Brain-stem transmission time in infants exposed to cocaine in utero. *J Pediatr*. 1990;117(4):17-37.

Salzwedel AP, Grewen KM, Vachet C, Gerig G, Lin W, Gao W. Prenatal drug exposure affects neonatal brain functional connectivity. *J Neurosci*. 2015;35(14):5860-9.

SAMHSA - Substance Abuse and Mental Health Services Administration. Results from the 2009 National Survey on Drug Use and Health: Volume I. Summary of National Findings (Office of Applied Studies, NSDUH Series H-38A, HHS Publication No. SMA 10-4586 Findings) (Rockville, Maryland, 2010).

- Sarkar S, Wittmann G, Fekete C, Lechan RM. Central administration of cocaine- and amphetamine-regulated transcript increases phosphorylation of cAMP response element binding protein in corticotropin-releasing hormone-producing neurons but not in prothyrotropin-releasing hormone-producing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain research*. 2004;999(2):181-92.
- Schuetze P, Eiden RD, Danielewicz S. The association between prenatal cocaine exposure and physiological regulation at 13 months of age. *J Child Psychol Psychiatr*. 2009;50:1401-9.
- Schuetze P, Eiden RD. The association between maternal cocaine use during pregnancy and physiological regulation in 4- to 8-week-old infants. An examination of possible mediators and moderators. *J Pediatr Psychol*. 2006;31:15-26.
- Schuetze P, Eiden RD, Molnar DS, Colder CD. Empathic responsivity at 3 years of age in a sample of cocaine-exposed children. *Neurotoxicol Teratol*. 2014;42:1-8.
- Sedgh G, Singh S, Hussain R. Intended and unintended pregnancies worldwide in 2012 and recent trends. *Stud Fam Plann*. 2014;45(3):301-14.
- Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*. 1936;138(3479):32-3.
- Sha D, Wang Z, Qian L, Han Y, Zhang J, Gu S, et al. A cocaine-regulated and amphetamine-regulated transcript inhibits oxidative stress in neurons deprived of oxygen and glucose. *Neuroreport*. 2013;24(13):698-703.
- Sheinkopf SJ, Lester BM, LaGasse LL, Seifer R, Bauer CR, Shankaran S, et al. Interactions between maternal characteristics and neonatal behavior in the prediction of parenting stress and perception of infant temperament. *J Pediatr Psychol*. 2006;31(1):27-40.
- Shiono PH, Klebanoff MA, Nugent RP, Cotch MF, Wilkins DG, Rollins DE, et al. The impact of cocaine and marijuana use on low birth weight and preterm birth: a multicenter study. *Am J Obstet Gynecol*. 1995;172(1 Pt 1):19-27.
- Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. 1997;82(2):291-5.
- Silvestri JM, Long JM, Weese-Mayer DE, Barkov GA. Effect of prenatal cocaine on respiration, heart rate and sudden infant death syndrome. *Pediatr Pulmonol*. 1991;11:328-34.
- Singer LT, Arendt R, Minnes S, Salvator A, Siegel AC, Lewis BA. Developing language skills of cocaine-exposed infants. *Pediatrics*. 2001;107(5):1057-64.
- Singer LT, Minnes S, Min MO, Lewis BA, Short EJ. Prenatal cocaine exposure and child outcomes: a conference report based on a prospective study from Cleveland. *Hum Psychopharmacol*. 2015;30(4):285-9.
- Sinha R. How does stress increase risk of drug abuse and relapse? *Psychopharmacology (Berl)*. 2001;158:343-59.

- Slotkin T. A Fetal nicotine or cocaine exposure: which one is worse? *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;285(3):931-45.
- Sobrian SK, Burton LE, Robinson NL, Ashe WK, James H, Stokes DL, et al. Neurobehavioral and immunological effects of prenatal cocaine exposure in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1990;35:617-29.
- Sood BG, Bailey BN, Covington C, Sokol RJ, Ager J, Janisse J, et al. Gender and alcohol moderate caregiver reported child behavior after prenatal cocaine. *Neurotoxicology and Teratology.* 2005;27:191-201.
- Sorce S, Krause KH. NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(10):2481-504.
- Sordi AO, Pechansky F, Kessler FH, Kapczinski F, Pfaffenseller B, Gubert C, de Aguiar BW, de Magalhães Narvaez JC, Ornell F, von Diemen L. Oxidative stress and BDNF as possible markers for the severity of crack cocaine use in early withdrawal. *Psychopharmacology (Berl).* 2014 Oct;231(20):4031-9.
- Soto E, Bahado-Singh R. Fetal abnormal growth associated with substance abuse. *Clin Obstet Gynecol.* 2013;56(1):142-53.
- Spear LP, Campbell J, Snyder K, Silveri MM, Katovic NM. Animal behavior models: increased sensitivity to stressors and other environmental experiences after prenatal cocaine exposure. In: Harvey JA, Kosfosky BE., Editors. New York: New York Academy of Sciences; 1998. p. 76-88.
- Stein MD, Cyr MG. Women and substance abuse. *Med Clin of North Am.* 1997;81(4):979-98.
- Stephen J, Lester BM, LaGasse LL, Seifer R, Bauer CR, Shankaran S, et al. Interactions between maternal characteristics and neonatal behavior in the prediction of parenting stress and perception of infant temperament. *J Pediatr Psychol.* 2006;31(1):27-40.
- Terplan M, Lui S. Psychosocial interventions for pregnant women in outpatient illicit drug treatment programs compared to other interventions. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007;(4):CD006037.
- Thadani PV. Biological mechanisms and perinatal exposure to abused drugs. *Synapse.* 1995;19(3):228-32.
- Tian R, Hou G, Li D, Yuan TF. A possible change process of inflammatory cytokines in the prolonged chronic stress and its ultimate implications for health. *Scientific World Journal.* 2014;780616.
- Torchalla I, Strehlau V, Li K, Krausz M. Substance use and predictors of substance dependence in homeless women. *Drug Alcohol Depend.* 2011;118(2-3):173-9.

Tronick EZ, Messinger DS, Weinberg MK, Lester BM, Lagasse L, Seifer R, et al. Cocaine exposure is associated with subtle compromises of infants' and mothers' social-emotional behavior and dyadic features of their interaction in the face-to-face still-face paradigm. *Dev Psychol.* 2005;41(5):711-22.

Tsay CH, Partridge JC, Villarreal SF, Good WV, Ferriero DM. Neurologic and ophthalmologic findings in children exposed to cocaine in utero. *J Child Neurol.* 1996;11(1):25-30.

U.S. Department of Health and Human Services. Applied Studies. SAMHSA Results from The National Survey on Drug Use and Health National Findings, Rockville, M.D: U.S. Department of Health and Human Services; 2010. Disponível em: <<http://www.samhsa.gov/data/2k10NSDUH/2k10Results.htm#FIG2-2>>. Acesso em: jun/2012.

U.S. Department of Health and Human Services. National Household Survey on Drug Abuse: population estimates. Rockville: National Institute on Drug Abuse; 1991. p. 91-1732.

UNIAD - Unidade de Pesquisas em Álcool e Drogas - Departamento de Psiquiatria da UNIFESP. São Paulo, Brasil, 2013. Disponível em: <www.uniad.org.br/desenvolvimento/images/stories/publicacoes/ensino/aulas/cocaína>. Acesso em: 4/mar/2014.

United Nations Office on Drugs and Crime (2012). World Drug Report 2012. Disponível em: https://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/WDR2012/WDR_2012_web_small.pdf>. Acesso em: 15/Dec/2015.

United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), World Drug Report 2015 (United Nations publication, Sales No. E.15.XI.6). Disponível em: <https://www.unodc.org/documents/wdr2015/World_Drug_Report_2015.pdf>. Acesso em: 4/mar/2014.

Urigüen L, Callado LF. Cocaína y cérebro. *Transtornos adictivos.* 2010;12(4):143-8.

Viola TW, Tractenberg SG, Levandowski ML, Pezzi JC, Bauer ME, Teixeira AL, Grassi-Oliveira R. Neurotrophic factors in women with crack cocaine dependence during early abstinence: the role of early life stress. Disponível em: <<http://doi.org/10.1503/jpn.130027>>. Acesso em: 2014.

von Diemen L, de Boni R, Kessler F, Benzano D, Pechansky F. Risk behaviors for HCV and HIV seroprevalence among female crack users from Porto Alegre, Brasil. *Arch of Womens Ment Health.* 2010;13(3):185-91.

von Diemen L. Avaliação de soroprevalência HCV/HIV e marcadores bioquímicos de toxicidade sistêmica em usuários de crack. [Tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2013.

Vitkovic L, Konsman JP, Bockaert J, Dantzer R, Homburger V, Jacque C. Cytokine signals propagate through the brain. *Mol Psychiatry* 2000;5:604-15.

Viviani B, Gardoni F, Marinovich M. Cytokines and neuronal ion channels in health and disease. *Int Rev Neurobiol.* 2007;82:247-63.

Wagner JA. Is IL-6 both a cytokine and a neurotrophic factor? *J Exp Med* 1996, 183:2417-9.

Wagner JA. Overview of biomarkers and surrogate endpoints in drug development. *Disease Markers.* 2002;18(2):41-6.

Wang K, Bao JP, Yang S, Hong X, Liu L, Xie XH, et al. A cohort study comparing the serum levels of pro- or anti-inflammatory cytokines in patients with lumbar radicular pain and healthy subjects. *Eur Spine J.* 2015 Dec 18. [Epub ahead of print]

Weiss RD, Iannucci RA. Cocaine-related disorders. In: Sadock BJ, Sadock VA, Ruiz P. (Ed). *Kaplan & Sadock's comprehensive textbook of psychiatry.* 9th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2009. p.1318-31.

Wood RD, Bannoura MD, Johanson IB. Prenatal cocaine exposure: effects on play behavior in the juvenile rat. *Neurotoxicol Teratol.* 1994;16:139-44.

Wood RD, Molina VA, Wagner JM, Spear LP. Play behavior and stress responsivity in periadolescent offspring exposed prenatally to cocaine. *Pharmacol Biochem Behav.* 1995;52:367-74.

Wood RD, Spear LP. Prenatal cocaine alters social competition of infant, adolescent and adult rats. *Behav Neurosci.* 1998;112:419-31.

Woods JR Jr. Cardiovascular effects of cocaine in pregnancy and on the fetus. *NIDA Res Monogr.* 1992;119:111-5.

Wright A, Walker J. Management of women who use drugs during pregnancy. *Semin Fetal Neonatal Medicine.* 2007;12(2):114-8.

Yamada K, Nabeshima T. Pro- and anti-addictive neurotrophic factors and cytokines in psychostimulant addiction: mini review. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1025:198-204.

Yamaguchi ET, Cardoso MMSC, Torres MLA, Andrade AG. Drogas de abuso e gravidez. *Rev Psiq Clin.* 2008;35(Suppl 1):44-7.

Zaparte A, Viola TW, Grassi-Oliveira R, da Silva Morrone M, Moreira JC, Bauer ME. Early abstinence of crack-cocaine is effective to attenuate oxidative stress and to improve antioxidant defences. Disponível em: <<http://doi.org/10.1007/s00213-014-3779-8>>. Acesso em: 2014.

Zavaschi MLS, Costa FMC, Záchia S, Brunstein C, Lorenzon, SF, Tramontina S, et al. Influência da separação precoce na interação mãe-bebê. *Revista ABP-APAL.* 1997;19(1):18-24.

Zavaschi MLS, Mardini V, Cunha GB, Martins-Costa SHA, Guarienti F, Pianca TG, Pechansky F, Rohde LAP, Kapczinski F, Cereser K, Szobot CM. Socio-demographic and clinical characteristics of pregnant and puerperal crack-cocaine using women: preliminary data. *Arch. Clin. Psychiatry*. 2014;41(5):121-3.

Zugno AI, Chipindo HL, Volpato AM, Budni J, Steckert AV, de Oliveira MB, et al. Omega-3 prevents behavior response and brain oxidative damage in the ketamine model of schizophrenia. *Neuroscience*. 2014;259:223-31.

Zule WA, Flannery BA, Wechsberg WM, Lam WK. Alcohol use among out-of-treatment crack using African-American women. *Am J Drug Alcohol Abuse*. 2002;28(3):525-44.

ANEXO 1

CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A Comissão Científica e o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP/HCPA), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 110095

Data da Versão do Projeto: 17/02/2011

Data da Versão do TCLE: 30/05/2011

Pesquisadores:

CLAUDIA MACIEL SZOBOT
FLAVIO KAPCZINSKI
FLAVIO PECHANSKY
VICTOR MARDINI
KEILA MARIA MENDES CERESER
GABRIELLE BOCCHESI DA CUNHA
MARIA ROSA KRAMER IORRA
DANIEL LUDWIG PAIM
LETICIA PAULINO PEREIRA
ROSANA FERNANDA HOCHMULLER FOGAÇA
FERNANDA SCHETTINI ROSA
RODRIGO RITTER PARCIANELLO
NATALIA GAMBONI RODRIGUES
FELIX HENRIQUE PAIM KESSLER
MARIA LUCRÉCIA SCHERER ZAVASCHI
LUIS AUGUSTO PAIM ROHDE

Título: AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DAS NEUROTROFINAS BDNF (FATOR NEUROTROFICO DERIVADO DO CÉREBRO) E NT-3 (NEUROTROFINA 3), DAS CITOCINAS IL-4 (INTERLEUCINA-4) E IL-6 (INTERLEUCINA-6), (TNF-ALFA) FATOR DE NECROSE TUMORAL, TRAP (POTENCIAL REATIVO ANTIOXIDANTE TOTAL), TBARS (SUBSTÂNCIAS REAGENTES AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO) E PCC (CONTEÚDO DE PROTEÍNA CARBONIL) EM GESTANTES USUÁRIAS DE CRACK E NO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL (SCU) DOS SEUS FILHOS.

HCPA
Prof. Nadine C. ...
Coordenadora do Grupo de
e Pós-Graduação




**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos, bem como o respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais de pesquisa clínica, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

- Os membros da Comissão Científica e do Comitê de Ética em Pesquisa não participaram do processo de avaliação dos projetos nos quais constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.
- Somente poderá ser utilizado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no qual conste o carimbo de aprovação do CEP/HCPA.

Porto Alegre, 01 de junho de 2011.


Profª Nadine Clausell
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - CASOS

(Amostra Casos)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Número do caso no estudo: ____

Você está convidada a participar de uma pesquisa que está sendo realizada no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Trata-se de uma pesquisa envolvendo gestantes usuárias de crack e outras drogas. Estamos estudando o comportamento de determinadas substâncias presentes no sangue que se acredita tenham papel no desenvolvimento do cérebro dos bebês.

Você só participará deste estudo se desejar.

O que você vai ter que fazer?

- Você vai responder perguntas sobre seu estado emocional e dados pessoais.
- Você necessitará coletar sangue (10 mililitros – um copinho medida pequeno) em duas ocasiões: uma vez durante a gravidez, quando entrar na pesquisa, e a outra vez quando nascer seu bebê. Talvez fique um pequeno hematoma (mancha roxa) no local da coleta que em poucos dias desaparecerá.
- Após seu bebê nascer será coletado sangue da sua placenta. Normalmente a placenta e o cordão umbilical são jogados fora (no lixo hospitalar) depois do nascimento do seu filho.

- No caso do seu bebê necessitar coletar sangue para exames por uma indicação médica e sobrar sangue utilizaremos este sangue para nossa pesquisa.

O objetivo do nosso estudo é comparar a medida destas substâncias nos três momentos de coleta mencionados acima. (início do pré-natal, no parto e no sangue do cordão umbilical).

Para que estamos fazendo isso? Para conhecer melhor as condições de saúde das gestantes que usam *crack* e outras drogas e procuram o Hospital de Clínicas, e para pesquisar as alterações que estas substâncias podem apresentar durante a gestação. Este conhecimento poderá ser bastante útil para você, para seu bebê e para outras gestantes em situação semelhante no futuro.

O único risco a sua participação neste estudo é um possível desconforto ao responder as perguntas feitas pelo entrevistador.

Neste momento a senhora e seu bebê não terão benefícios diretos desta pesquisa, mas através de sua participação, futuras gestantes usuárias de crack e seus bebês poderão ser beneficiadas.

As suas informações pessoais serão sempre tratadas em sigilo. Os resultados do estudo poderão ser publicados em revista científica ou submetidos a discussão com profissionais da saúde, sempre sem citar seu nome, do seu bebê, ou qualquer outra forma de identificação.

Se você decidir não participar mais em qualquer momento deste estudo, isto não prejudicará seu atendimento no HCPA.

O projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA.

Esta pesquisa não acarretará nenhum gasto financeiro para a Senhora.

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPG/HCPA

VERSÃO APROVADA

01, 06, 2011

110095 TA

Eu, _____, declaro que fui informada dos objetivos e de como vou participar deste estudo de forma clara e detalhada. Todas minhas dúvidas foram respondidas e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Também fui informada que receberei uma via deste documento.

Porto Alegre, _____ de _____ 2011.

Para esclarecimento de dúvida contatar Comitê de Ética do HCPA
Telefone: 3359 8285

Pesquisador responsável pelo estudo:

Dr. Luis Augusto Paim Rohde Serviço de Psiquiatria da Infância e da Adolescência do HCPA - Sala 400N - 4º andar Norte
Telefone: 3359 8294 / 3359 8413

Nome do participante: _____

Assinatura do participante: _____

Data: ____/____/____

Nome do Representante Legal: _____

Assinatura do Representante Legal: _____

Data: ____/____/____

Nome do pesquisador que aplicou este Termo de Consentimento:

Assinatura do pesquisador que aplicou o Termo de Consentimento:

Data: ____/____/____

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPG/HCPA
VERSÃO APROVADA
01/06/2011
110095 TRV

ANEXO 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - CONTROLES

(Amostra Controles)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Número do caso no estudo: ____

Você está convidada a participar de uma pesquisa que está sendo realizada no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Trata-se de uma pesquisa envolvendo gestantes. Estamos estudando o comportamento de determinadas substâncias presentes no sangue que se acredita tenham papel no desenvolvimento do cérebro dos bebês.

Você só participará deste estudo se desejar.

O que você vai ter que fazer?

- Você vai responder perguntas sobre seu estado emocional e dados pessoais. Também solicitaremos uma amostra da sua urina para comprovar que você não usa drogas.

Em algumas situações o sangue do cordão umbilical do seu bebê que você doou ao Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário do HCPA não será aproveitado. Este sangue do cordão umbilical, juntamente com o que foi coletado de você para exames serão eliminados, jogados fora no lixo hospitalar. Utilizaremos este sangue para nossa pesquisa.

Este estudo não influenciará no aproveitamento do sangue que você doou para o Banco de Sangue do Cordão e Placentário.

Ou seja, você não sofrerá nenhuma coleta de sangue a mais que qualquer outra gestante que doe sangue do cordão umbilical necessitaria coletar.

- No caso do seu bebê necessitar coletar sangue para exames por uma indicação médica e sobrar sangue utilizaremos este sangue para nossa pesquisa.

O objetivo do nosso estudo é comparar a medida destas substâncias nos dois momentos de coleta mencionados acima, (durante o período próximo ao parto e no sangue do cordão umbilical).

O único risco a sua participação neste estudo é um possível desconforto ao responder as perguntas feitas pelo entrevistador.

Neste momento a senhora e seu bebê não terão benefícios diretos desta pesquisa, mas através de sua participação, futuras gestantes usuárias de crack e seus bebês poderão ser beneficiados.

De maneira indireta como benefício você receberá uma avaliação psiquiátrica e, se for detectada alguma condição que necessite tratamento, enviaremos nossos achados para a unidade básica de saúde que lhe atenderá.

Para que estamos fazendo isso? Para conhecer melhor as condições de saúde das gestantes que procuram o Hospital de Clínicas, e para pesquisar as alterações que estas substâncias podem apresentar durante a gestação. Este conhecimento poderá ser bastante útil para você, para seu bebê e para outras gestantes em situação semelhante no futuro.

A participação neste estudo não agrega riscos para você e seu bebê, e pode potencialmente trazer benefícios para sua saúde, sua qualidade de vida e para a saúde e o desenvolvimento do seu bebê.

As suas informações pessoais serão sempre tratadas em sigilo. Os resultados do estudo poderão ser publicados em revista científica ou submetidos a discussão com profissionais da saúde, sempre sem citar seu nome, do seu bebê, ou qualquer outra forma de identificação.

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPG/HCPA

VERSÃO APROVADA

01, 06, 2011

110095 TAV

Se você decidir não participar mais em qualquer momento deste estudo, isto não prejudicará seu atendimento no HCPA.

O projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA.

Esta pesquisa não acarretará nenhum gasto financeiro para a Senhora.

Eu, _____, declaro que fui informada dos objetivos e de como vou participar deste estudo de forma clara e detalhada. Todas minhas dúvidas foram respondidas e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Também fui informada que receberei uma via deste documento.

Porto Alegre, _____ de _____ 2011.

Para esclarecimento de dúvida contactar Comitê de Ética do HCPA
Telefone: 3359 8285

Pesquisador responsável pelo estudo:

Dr. Luis Augusto Paim Rohde Serviço de Psiquiatria da Infância e da Adolescência do HCPA - Sala 400N - 4º andar Norte
Telefone: 3359 8294 / 3359 8413

Nome do participante: _____

Assinatura do participante: _____

Data: ____ / ____ / ____

Nome do Representante Legal: _____

Assinatura do Representante Legal: _____

Data: ____ / ____ / ____

Nome do pesquisador que aplicou este Termo de Consentimento:

Assinatura do pesquisador que aplicou o Termo de Consentimento:

Data: ____ / ____ / ____

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPG/HCPA

VERSÃO APROVADA

01, 06, 2011

110095 TRV

ANEXO 4

E-MAIL DE ACEITAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DO ARTIGO PELA TRENDS IN PSYCHIATRY AND PSYCHOTHERAPY

18-Dec-2015

Dear Dr. Pianca:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "IL-6 and IL-10 levels in the umbilical cord blood of newborns with history of crack/cocaine exposure in utero: a comparative study." in its current form for publication in the Trends in Psychiatry and Psychotherapy.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Trends in Psychiatry and Psychotherapy, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Dr. Elisa Brietzke
Associate Editor, Trends in Psychiatry and Psychotherapy
elisabrietzke@hotmail.com

Entire Scoresheet:

ANEXO 5

MATERIAL COMPLEMENTAR – ARTIGO 3

Abordagem terapêutica de puérpera usuária de crack

Maria Lucrecia Scherer Zavaschi*

Thais Anzzulin Ayub **

Victor Mardini***

Gabrielle Bocchese da Cunha****

Luis Augusto P. Rohde*****

Claudia Maciel Szobot*****

*Médica psiquiatra pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, psicanalista pela Sociedade Psicanalítica de Porto Alegre, professora adjunta do Departamento de Psiquiatria e Medicina Legal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, coordenadora da equipe de Psiquiatria da Infância e Adolescência do Centro de Atenção Psicossocial da Infância e Adolescência e do Ambulatório Pais e Bebês do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil.

**Graduanda em Psicologia pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

***Médico Pediatra (SBP), Psiquiatra (ABP), Psiquiatra Contratado do Serviço de Psiquiatria da Infância e Adolescência do HCPA. Professor convidado do CELG. Membro Aspirante Graduado da SPPA. Doutorando do Programa de Pós Graduação em Psiquiatria da UFRGS. Porto Alegre, RS, Brasil.

**** Doutora em Pediatria pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Pediatra do Programa de Atendimento a Bebês Expostos a Substâncias Químicas do Hospital Materno Infantil Presidente Vargas, de Porto Alegre, pesquisadora do Centro de Pesquisa em Álcool e Drogas da UFRGS.

***** Mestre e Doutor em Medicina pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Professor Titular de Psiquiatria do Departamento de Psiquiatria e Medicina Legal da UFRGS. Vice-Diretor do Instituto de Psiquiatria do Desenvolvimento para Infância e Adolescência (inpd).

***** Mestre, Doutora com pós-doutorado em Ciências Médicas: Psiquiatria, pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Médica contratada do HCPA, Serviço de Psiquiatria da Infância e Adolescência, Unidade de Álcool e Drogas, e pesquisadora do Programa de Déficit de Atenção/Hiperatividade - HCPA e do Centro de Pesquisa em Álcool e Drogas (CPAD), HCPA.

RESUMO

Este é o relato do atendimento de uma das mães dependentes do crack e seu bebê que frequentam o ambulatório de Psiquiatria da Infância e da Adolescência do HCPA. Esta específica abordagem terapêutica visa atender ao bebê ainda antes do nascimento, a fim de preservar um de seus direitos básicos, que é o de não ser intoxicado tão prematuramente.

Palavras-chave: Gestantes, Bebês, Cocaína Crack, Terapêutica.

ABSTRACT

This is the report of the treatment of one of the crack-dependent mothers and her baby who attended the Childhood and Adolescence Psychiatry outpatient clinic of the HCPA. This specific approach aims at attending the baby, even before birth, in order to preserve one of his/her basic rights, which is: not be intoxicated so prematurely.

Key Words: Pregnant Women, Babies, Crack Cocaine, Therapeutics.

INTRODUÇÃO

Este é o relato do atendimento de uma das mães dependentes químicas de crack, maconha, e álcool e em tratamento prévio com Lítio e Clorpromazina que frequentou o Ambulatório de Psiquiatria da Infância e Adolescência do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Trata-se de um trabalho que se propõe a atender ao bebê, ainda no ventre de sua mãe, em uma de suas mais básicas condições de sobrevivência, que é a do direito de se desenvolver sem ser intoxicado por drogas tão prematuramente. Propõe-se também a acompanhar a dupla mãe-bebê em seus primeiros meses de vida. O artigo ressalta os principais dados da história dessa paciente, que, proveniente de meio social e familiar violento e caótico, dependente há quinze anos do crack, conseguiu emergir dessa situação, após prolongada internação, participando de um atendimento de grupo conjuntamente com seu bebê e outras gestantes e puérperas, também dependentes.

A MÃE

Rita, aos trinta e dois anos, chegou ao Grupo Operativo de Psicoeducação para Gestantes e Puérperas Usuárias de Substâncias Psicoativas por recomendação da psiquiatra e da pediatra que a atenderam no Hospital Presidente Vargas de Porto Alegre, no qual foi internada, na Unidade de Psiquiatria, após tentativa de suicídio. Nessa internação, permaneceu voluntariamente, para a desintoxicação por uso de crack, no ano de dois mil e oito, até o nascimento de seu filho. Imersa na negligência e na solidão, que pela vida a acompanharam, buscou nessa oportunidade, pela primeira vez, lutar contra sua dependência química e estabelecer-se, finalmente, na postura de progenitora de sua família.

Os dados que se seguem foram colhidos ao longo de anos, uma vez que a complexidade de sua história só veio à tona à medida que ela adquiriu laços de confiança com a equipe.

Sua mãe, que engravidou aos quinze anos, tentou abortá-la. Após a tentativa frustrada, Rita nasceu, tendo sido entregue a uma tia, irmã mais velha de sua mãe, pois sua mãe era muito jovem e inexperiente. Rita relata que sentia muita falta da mãe durante toda a primeira infância. A tia, apesar de atendê-la em suas necessidades básicas, era alcoolista e costumava

incumbi-la de comprar cachaça em um armazém frequentado por homens, alcoolizados e desrespeitosos, que não perdiam oportunidade de dizer-lhe gracinhas e palavras obscenas. No caminho de volta para casa, ela bebia parte da cachaça e substituía o volume consumido por água, pois ficava curiosa pelos “bons efeitos” da tal bebida. Passados nove anos, essa tia veio a falecer de cirrose. Rita lamentou a morte da tia, pois com ela nunca passara fome nem brutalidades físicas.

A circunstância de quase orfandade levou-a a ter que morar com a mãe e seu companheiro, homem inescrupuloso e perverso. Sua mãe também é alcoólatra e impulsiva, irritando-se facilmente com a filha. Rita relata que costumava apanhar violentamente da mãe. O padrasto procurava resgatá-la das surras. No entanto, tinha um ritual de sedar a mãe e abusar sexualmente da menina. No início, tocava suas partes íntimas.

Quando a menina revelou o abuso à mãe, esta se indignou, dizendo que ela mentia e desejava destruir seu casamento. Diante da categórica negação da mãe, o padrasto viu-se livre e, vingativo, estuprou-a, não sem antes sedar a mãe. Revoltada, Rita tornou-se uma menina inquieta, irreverente, agressiva, em casa e no colégio. Nessa época, acabou sendo expulsa do colégio, devido a sua agitação, postura desafiadora e ao mau comportamento. Para preservar o casamento, a mãe de Rita colocou-a em um internato.

O padrasto, após alguns anos, deixou a mãe de Rita para juntar-se à tia dela, irmã bem mais nova que sua mãe. O novo casal, juntamente com os filhos que foram nascendo, passou a viver no mesmo terreno em que moravam Rita e a mãe, pois ambas dependiam desse local para morar. O constrangimento e o rancor acompanham Rita até hoje.

Ao sair do internato, com quinze anos, Rita foi trabalhar como empregada doméstica. Neste período, conheceu seu primeiro companheiro, que vivia na clandestinidade, envolvido com tráfico e jogos ilegais.

Ele a convidou para participar de um de seus jogos. Essa participação levou-a a perder todo seu salário. O rapaz propôs favores sexuais para ressarcir-la do prejuízo. Chegando ao motel, percebeu que ele injetava-se cocaína. Rita lhe perguntou o motivo de tal conduta, ao que ele respondeu que assim procedia devido a um sentimento de intensa solidão.

Relatou o ocorrido ao grupo, lamentando sua ingenuidade ao pensar que poderia ajudá-lo. “Eu disse para ele não usar mais drogas, pois, a partir dali, ele não precisaria mais ficar só, eu estaria com ele”. O resultado foi muito pior: ele não só não parou de usar a droga como ela, para acompanhá-lo, passou a cheirar cocaína e a dormir com ele em motéis. Hoje,

Rita diz que se tivesse alguém para buscar apoio, familiar ou não, não teria ficado tão vulnerável. Mas simplesmente não tinha a quem recorrer.

Rita logo ficou viciada. Os dois usavam cocaína diariamente, ele sob a forma injetável, e ela sob a forma inalada. Nesta época, contraiu HIV. E, como sua mãe, Rita concebeu, com esse homem, sua primeira filha, ainda aos quinze anos. O rapaz nunca a ajudou a cuidar da filha. Ao contrário, por estar envolvido com roubos e tráfico, foi preso diversas vezes.

Enquanto o companheiro estava na prisão, Rita conheceu outro homem, que veio a ser o pai de sua segunda filha. Com o passar do tempo, para criar as duas filhas, trabalhou como doméstica, deixando-as com uma babá, que também foi abusada por esse segundo companheiro. Por este motivo, separou-se pela segunda vez, pois temia que ele também pudesse abusar de suas filhas.

Subsequentemente, passou a frequentar festas e a usar crack. Para financiar sua droga e levar algum dinheiro para a mãe, que na ocasião ficava com suas filhas, prostituía-se e acabava, muitas vezes, por dormir nas ruas, descuidando-se da saúde e da higiene.

Nessa mesma época, conheceu seu terceiro companheiro, usuário de crack, perverso e violento. Este foi o pai de seu terceiro filho, João. Não se sabia grávida até a tentativa de suicídio, ao atear-se fogo, após ter derramado álcool no corpo. Relata que tentou se matar por ser viciada havia quinze anos, era um “trapo humano”, “um bicho” que não tinha mais nada além de vergonha e compulsão pela droga. Considerava que o suicídio seria um alívio para si e para sua família.

A internação de emergência deveu-se à violenta tentativa de suicídio. Pelo fato de permanecer internada até o parto, a dupla, mãe e bebê, recebeu atendimento desde a gestação até o momento do nascimento, por parte da pediatra, pesquisadora do grupo.

A pesquisadora realizou o exame pediátrico: ele foi um bebê eutrófico, apresentou apgar 9 e 10 (com líquido meconial). Foram realizadas avaliações de rotina que incluíram avaliação cardiológica, visual, auditiva, ecografia cerebral, sendo todas normais. Na aplicação da NNNS*, apresentou hipertonia marcada, moderada hiperreflexia, aumento dos movimentos e choro agudo acompanhado de sinais de estresse e ou abstinência com náuseas, bocejos, espirros, choro agudo, tremores e evitação do olhar ao exame. O exame foi realizado na presença da mãe que foi orientada sobre os achados e de como poderia lidar com a sensibilidade de seu bebê. Aos dois meses, o bebê seguia bem cuidado. Aos três meses, seguia apresentando desenvolvimento neuropsicomotor. Até os dois anos, foi acompanhado pela pediatra, apresentando boa evolução e melhora do crescimento.

A relação que se estabeleceu com esta pediatra foi facilitadora de um bom vínculo dessa mãe com seu bebê. A pediatra desempenhou um papel maternal para com ela. Constituiu-se uma boa figura de identificação, que, ao invés de alijá-la de seu bebê, como seria rotina nos hospitais brasileiros, ao contrário, reforçou-a em suas capacidades, apontando igualmente as competências do bebê, para o processo de maturação. A paciente não só saiu do hospital com seu filho, como também demonstrou grande satisfação em poder fazê-lo. Apresentava afeição e bons cuidados de higiene para com seu bebê, embora a guarda tenha sido designada, provisoriamente, a uma de suas tias.

A puérpera era assídua e pontual nas consultas pediátricas, seguia com regularidade as recomendações prescritas. Sua atitude construtiva e perseverante motivou a pediatra a convidá-la a participar do Grupo Operativo Psicoeducativo para Gestantes e Puérperas Dependentes de Substâncias Psicoativas, agora, na qualidade de mãe colaboradora. Sua experiência, altamente positiva, e bastante diferente de outras gestantes e puérperas usuárias de substâncias psicoativas, poderia auxiliar outras mães a resgatarem a esperança de abandonar o vício.

Sempre comparecia ao grupo com seu bebê, sendo cuidadosa com ele. Trocava suas fraldas, dava-lhe mamadeira, tecia elogios ao seu desenvolvimento, e falava com ele olhando-o nos olhos. Essa atitude foi sempre grandemente estimulada por todos os técnicos.

Nos primeiros meses de sua participação, após faltar a um dos grupos, relatou, de forma quase casual, que naquela semana havia faltado devido à morte do marido. Presenciou seu assassinato, à queima-roupa, provavelmente por dívidas do tráfico. Apesar de não desejar esse fim para ele, acredita que sua morte prematura e o conseqüente afastamento do círculo de relações com traficantes e usuários facilitaram muito sua abstinência. Ela tem sido a frequentadora mais assídua do grupo até a presente data. Diante das novas gestantes que chegam ao grupo, costuma ressaltar a importância do terceiro filho, João, como grande motivador para manter-se abstinência. Porém, durante o tratamento no grupo, que já dura quatro anos, Rita recaiu no crack por três vezes. As três situações ocorreram na vigência do álcool, em festas, em companhia de pessoas que usavam crack. Essas recaídas foram breves, durando dois ou três dias. No momento em que se propôs a abandonar o hábito da bebida e começou a tomar regularmente suas medicações, Propranolol, Fluoxetina 20mg e Clorpromazina 25mg, além das medicações antirretrovirais que lhe foram prescritas no posto de saúde, não mais recaiu no crack.

Ao deixar o crack, aproximou-se das filhas, Maria, de dezoito anos, e Helena, de onze. Rita, sentindo-se reconhecida em sua capacidade de auxiliar outras gestantes e mães, convidou sua mãe e suas filhas a comparecerem a várias reuniões. Uma dessas reuniões foi marcante para todos, técnicos e pacientes, pois a jovem de dezoito anos relatou de forma contundente e emocionada seus ressentimentos pelo desamparo que sentira devido ao abandono materno. Trata-se de uma moça altamente resiliente, articulada, que pratica atletismo e, na ocasião, estava no terceiro ano do ensino médio e pleiteava um lugar na universidade. Relata que o esporte a ajudou muito a enfrentar suas tristezas.

Da mesma forma que com as filhas, Rita conseguiu resgatar o tênue relacionamento que mantinha com a mãe, trazendo-a com frequência quinzenal ao grupo, também com objetivo de estimulá-la a parar com o abuso de álcool. Nessa ocasião, a mãe de Rita pôde relatar também seu desespero, por semanas e meses, devido ao desaparecimento da filha, inclusive revisando os cadáveres no Instituto Médico Legal de Porto Alegre, para ver se a encontrava.

Com sua progressiva evolução no grupo, a manutenção de sua abstinência, a melhora de seus cuidados pessoais e familiares e a melhora de sua autoestima, passou a gerenciar melhor sua vida. Com a pensão que recebera, comprou um apartamento na planta, e o grupo acompanha com entusiasmo suas conquistas.

Em meados de 2013, recaiu no álcool, com um novo companheiro que tem o hábito de tomar cerveja nos fins de semana. Ela minimizava o fato diante das intervenções do grupo, dizendo que se tratava de um hábito social. Apesar de entender que o dependente químico é um doente, que precisa sempre estar alerta para não recair, e descrever os malefícios da doença, ainda negava o prejuízo que o álcool poderia acarretar em pessoa tão vulnerável quanto ela. Após ameaça de suicídio da filha menor diante do abuso de álcool da mãe e das manifestações do grupo, ela resolveu parar de beber. Atualmente, está novamente abstêmia de álcool. Segue com bom vínculo com a mãe e os filhos. Todavia, é frequente a paciente dizer que não recaiu com crack, como se recaídas com álcool fossem aceitáveis. Neste período, mudou-se a medicação para Ácido Valpróico e Risperidona.

O GRUPO

Diante das limitações dos recursos disponíveis na rede pública brasileira e da enorme dificuldade de tratar de gestantes usuárias de crack, além do conhecimento de que os períodos embrionário e da lactação representam janelas cruciais para o desenvolvimento do indivíduo, o presente grupo de trabalho procurou realizar, em caráter experimental, uma intervenção terapêutica com estas mulheres. A intervenção se propõe a trabalhar com grupos operativos de reflexão, de caráter psicoeducativo. O grupo é aberto, de maneira que as pacientes podem trazer seus familiares, tantos e quando quiserem. A condição para a entrada no grupo é de que as gestantes ou puérperas sejam dependentes de crack. Algumas referências, porém, são estáveis e previsíveis. Os grupos são realizados nas quintas-feiras, das dez horas ao meio-dia, em local estabelecido, com equipe permanente.

A equipe embasou-se em diversos autores, entre eles Pichón Rivière¹, que entende por grupo: indivíduos que possuam necessidades semelhantes, reunidos para realizar uma tarefa específica. Mesmo que haja um objetivo mútuo, cada integrante do grupo é único e possui um papel distinto. O mesmo dissertou sobre Grupos Operativos, apresentando-os como grupos de trabalho que possuem também uma função terapêutica, pois, além da tarefa, o grupo auxilia na gestão de ansiedades, na quebra de estereótipos e na superação da resistência a mudanças. Um dos pontos altos da teoria deste autor são os estudos sobre os papéis dos grupos. Rivière¹ refere que, em determinados momentos, os integrantes acabam assumido papéis que podem ser rotativos. Os papéis de líder, sabotador, bode-expiatório, representante do silêncio e porta-voz são representações de aspectos grupais latentes. O líder, por exemplo, busca a mudança, ajuda o grupo a levar a tarefa a diante e arrisca-se diante do novo. Faz-se depositário de aspectos positivos do grupo.

Grupos Operativos abrangem diferentes modalidades. O grupo eleito pela equipe de trabalho é denominado “Grupo de Reflexão”. Essa modalidade possibilita aos integrantes uma maior reflexão sobre sua vida, permitindo uma abordagem diferenciada dos fatos. Tem como finalidade servir como instrumento de primeira grandeza para a área do ensino-aprendizagem, isto é, da educação^{2,3}. A educação é uma característica intrínseca ao grupo. A partir da psicoeducação, as pacientes aprendem a respeito de seu próprio funcionamento psíquico, sua doença e tratamento. A instrução didática é empregada de diversas formas na terapia de grupo: transferindo informação, alterando padrões de pensamento destrutivos, estruturando o

grupo e explicando a respeito da doença.⁴ A psicoeducação permite também que a paciente possa dirimir suas dúvidas, pois estas são geradoras de grandes ansiedades.

O grupo de reflexão pode ainda constituir-se um espaço “continente”², no qual são depositadas as ansiedades dessas mães, que são recebidas pelos terapeutas, que, por sua vez, tentam entendê-las e decodificá-las, para devolvê-las de forma mais compreensível. Os grupos constituem-se em uma oportunidade de experimentação, protética, de reedição de uma experiência familiar diferente da original, na qual as figuras representacionais de pai, mãe e irmãos ressurgem a partir da transferência, podendo ser entendidas por seus participantes, propiciando a veiculação das ansiedades psicóticas⁵ que subjazem às patologias das adições.

Em raros momentos, também foi possível, com algumas destas pacientes, encontrar as motivações inconscientes do uso de drogas, na medida em que se encontravam as identificações com os agressores, pais ou mães, e que estas situações, de abandono e maus-tratos, se reeditaram agora, com seus filhos e consigo próprias. A compreensão das motivações inconscientes de seus atos permitiu que elas se aliviassem de suas angústias e assim descobrissem como poderiam direcionar suas vidas, a partir da abstinência.

O grupo favoreceu também o estabelecimento de novos vínculos³ entre pessoas atribuladas pelos mesmos problemas ou portadoras de patologias graves. Propiciou ainda o estabelecimento de vínculos com profissionais que não as acusavam, como estavam habituadas até então. Ao contrário, buscavam entendê-las e sinalizar seus recursos e as habilidades que poderiam ser desenvolvidas. Especialmente as habilidades maternas que eram latentes, mas que estavam obstruídas por identificações primitivas de abandono e maus tratos.

O bebê como catalisador

A presença do bebê no setting terapêutico propicia e evocação de sentimentos muito primitivos relativos às ansiedades maternas, devido às identificações projetivas e à dimensão transgeracional nas patologias relacionais precoces. Selma Fraiberg⁶ criou a metáfora “fantasmas no quarto do bebê” para identificar a precipitação de inquietantes objetos internos dos pais, que são carregados ao bebê desde sua gestação e nascimento. Nesse sentido, o bebê se constitui em um catalisador de conflitos, bem como facilitador de entendimento e esperança de mudanças. Por essa razão, as terapias conjuntas de pais e bebês favorecem resultados mais rápidos em termos de entendimento dos conflitos que envolvem a mãe e seus antigos objetos

primários. Essas terapias costumam ser breves e visam liberar o bebê dessas paralisantes identificações projetivas que podem dificultar seu desenvolvimento.^{7,8} No entanto, em se tratando de patologias mais graves, como no caso de mães aditas a drogas, o curso do tratamento deve ser bem mais longo, tendo em vista os enormes riscos de recaídas dessas mães e consequentes abandonos ou agravantes como maus tratos, em reedição a vivências anteriores.

Alguns técnicos da presente experiência terapêutica já haviam tido a oportunidade de trabalhar com duplas de mães-bebês no Ambulatório de Pais e Bebês do HCPA⁸ e também de aplicar essa mesma técnica a grupos de Pais e bebês de risco, bem como a grupos de bebês institucionalizados e seus cuidadores.

Um dos objetivos dos grupos de pais e bebês é o de propiciar a facilitação do vínculo entre a mãe e o bebê, uma vez que se trata de elemento vital para o desenvolvimento de todo indivíduo. Sabe-se que os vínculos existem desde a vida intrauterina. Há uma notável continuidade entre a vida fetal e a vida pós-natal. Aspectos constitucionais do bebê vão sendo estruturados a partir de sua bagagem genética e do ambiente que vai se apresentando durante todo o período gestacional, bem como sua continuidade, no período pós-natal.⁹

A equipe de trabalho lançou a hipótese de que a presença do bebê poderia constituir-se em um catalisador vital dos afetos dessas mães, bem como um estimulante derradeiro para o resgate de suas mães.

Abuso, violência e negligência intrafamiliar, uma constante

A pobreza e a baixa escolaridade contribuem para a entrada no grupo de risco de dependência química, negligência, abuso e maus tratos. Os lares caóticos dos quais provém as mulheres dependentes químicas apresentam infâncias permeadas de primitivos abandonos, abusos sexuais e violência. Para enfrentar tais situações traumáticas, mobilizam os mais primitivos mecanismos de defesa. Com frequência, essas mulheres se valem da negação, da identificação com os agressores, da negação maníaca. Há uma dificuldade intrínseca de enfrentamento de lutos e perdas, tamanha a frequência com que os sucessivos traumas incidiram sobre suas infâncias. Daí que, com frequência, o estupro, a negligência, maus tratos físicos e assassinatos sejam considerados situações cotidianas, deixando a conotação do extraordinário. O trauma é regra nestas pacientes. A sucessão de traumas também. O

esgotamento das reservas vitais vai gradativamente dando lugar a uma mórbida identificação com seus agressores.

O trauma seria compreendido como um choque violento, capaz de romper a barreira protetora do ego, podendo acarretar perturbações duradouras sobre a organização psíquica do indivíduo¹⁰. Segundo Freud (*op.cit*) o trauma pode se referir a um acontecimento externo ou a um acúmulo deles. Assinalou ainda o duplo destino do trauma: aquele que estrutura e organiza o ego e o trauma negativo, que se torna um verdadeiro entrave para o desenvolvimento do psiquismo, que impede o processo de pensar, levando em alguns casos à devastadora desorganização do ego. Seria “aquilo que chega ao sujeito de fora dele, sem que consiga ‘incorporar’ tal ocorrência ao seu psiquismo. O trauma, assim, causa aturdimiento e fica, na vida do sujeito, enquistado como um corpo estranho sem sentido e sem elaboração”.¹¹ As consequências do trauma dependerão dos recursos psíquicos prévios de cada indivíduo. Os traumas, incidindo sobre um ego frágil, poderão levar ao desenvolvimento de patologias.

O abuso sexual infantil é uma violência desigual, proveniente de uma atitude prepotente e perversa por parte do abusador. A gravidade das consequências do trauma dependem de vários fatores, entre eles a idade da criança, o grau de intimidade com o abusador, da credibilidade que a criança obtém de seus cuidadores ao revelar o abuso, entre outros. O incesto ou qualquer outro tipo de abuso sexual nos primeiros anos de vida destroem a autoestima da criança, que não se sente mais com o direito de ser protegida. A confusão de seu pensamento, o ataque às suas percepções e a dificuldade em identificar seus sentimentos levam-na a uma situação de miséria humana, que foi denominada por Shengold¹² de “assassinato da alma”.

Uma estrutura familiar caótica, onde não existam relações coesas entre seus membros, pode levar a criança à nefasta experiência de abusos físicos e sexuais. É comum que, neste ambiente, as mães, ao se tornarem cientes do incesto, ignorem-no, temendo atitudes violentas por parte do companheiro.¹³

O restabelecimento dos vínculos

A terapia de grupo opera de diversas maneiras. De momento, este trabalho se dispõe a apresentar apenas alguns recortes da função “continente” que o grupo terapêutico significou para essa paciente e, conseqüentemente, para seu bebê. Oportunizou o estabelecimento de

novos vínculos positivos com técnicos e companheiras de grupo. A compreensão de suas vivências de abandono e abuso possibilitou o restabelecimento dos antigos vínculos, que nunca haviam se estabelecido ou que haviam sido rompidos pelo uso da droga. Mesmo frágeis, esses vínculos vêm a ser estruturantes, tanto para essa paciente quanto para seu bebê.

A evolução do presente caso clínico se destaca pela manutenção da abstinência dessa mãe. Embora a abstinência tenha sido relativa, tendo tido três pequenas recaídas em quatro anos, sua perseverança é notável. Sabe-se da enorme dificuldade que é o abandono do uso do crack pela maioria dos adictos. No início de seu tratamento em ambulatório, Rita deixava evidente sua ambivalência acerca da droga. Apresentava o ardente desejo de nunca mais voltar a usá-la, ressaltando todas as vantagens dessa conquista, como a alegria de ter o filho. Ao mesmo tempo, relatava a tentação constante desde que saía de casa, pela manhã, para trabalhar. A maioria de seus vizinhos era usuária ou traficante. Até a poluição dos ônibus da cidade lembrava-lhe o cheiro do crack fumado, provocando-lhe a lembrança ou até “fissura”.

No começo de suas participações no grupo, assumia uma postura cautelosa quanto a sua história. Mais observava que falava. Na medida em que foi adquirindo confiança nos coordenadores do grupo e em suas parceiras de infortúnio, e, sobretudo, percebendo que não era acusada por sua doença, sendo aceita, na sua individualidade, com seus diagnósticos* e com seus recursos de ego, tornou-se falante e muito participativa. Assumiu logo um papel de liderança, buscando estimular outras gestantes e puérperas a suspenderem o uso do crack. Foi desvelando sua história, ressaltando suas progressivas conquistas, testemunhando a possibilidade de sobressair-se à droga. Se ela conseguia livrar-se, suas colegas também conseguiriam. Um esboço de reparação se delineava com esses reiterados diálogos de encorajamento para com suas colegas de grupo. Trazia reiteradas vezes o tema dos traumas causados pelos sucessivos abandonos de sua infância, até o abuso sexual que sofrera por parte do padrasto e a desilusão com a mãe, quando esta não acreditou em sua denúncia, mandando-a para um internato, preferindo o abusador à própria filha. Esses relatos tinham eco nas demais participantes, pois sua história era a história de suas colegas de grupo. As drogas para elas eram como anestésicos, baniam seus passados e davam-lhes a impressão de poder, euforia e bem estar. Essas defesas maníacas estavam sempre presentes na argumentação pelo uso da droga.

Na tentativa de compreender a adição compulsiva de Rita, encontra-se, como primeiro fator de risco, o uso da própria droga, que entra no circuito cerebral de recompensa, estimulando os receptores de dopamina, conferindo-lhe o caráter aditivo. Trata-se do mesmo

circuito de recompensa que concorre, juntamente com outros, para a manutenção da vida, ou seja, o da alimentação e o da libido.^{14, 15} O segundo fator de risco para tão intensa e duradoura adição deve-se ao substrato genético da família. Os demais fatores de risco estão associados às terríveis condições ambientais às quais essa mulher foi submetida, desde sua vida intrauterina. Entre elas, parecem ter tido forte influência a gravidez indesejada na adolescência da mãe, o alcoolismo desta, os sucessivos abandonos, a violência física, além do abuso sexual na infância. A própria paciente relata intensa sensação de vazio e sofrimento devido à constante ausência de figuras parentais, desde o início de sua vida.¹⁶

A bebida aparece há muito tempo na literatura como uma possibilidade de preenchimento do vazio e também como uma fuga do sofrimento, sem a necessidade da concorrência de outra pessoa.¹⁷ Neste caso, é possível que uma das formas que Rita tenha encontrado para lidar com o vazio materno tenha sido o uso da bebida, desde muito cedo. Alguns fatores de risco encontrados nesta paciente estão consoantes com os achados de Pechansky e colaboradores¹⁸, que também identificaram os baixos níveis socioeconômicos e baixa escolaridade como possíveis fatores de risco para a dependência. Rita, durante toda a vida, residiu em favelas, dispondo de recursos financeiros precários, teve dificuldades escolares, sendo expulsa por mau comportamento, agitação e agressividade, sintomas comuns em crianças negligenciadas, abusadas e maltratadas. Não conseguiu concluir o primeiro grau. A droga, no entanto, era uma constante, estava sempre a sua disposição, enquanto que sua família estava quase sempre ausente ou, se presente, de forma abusiva e violenta. A droga representava o lenitivo, a negação maníaca da realidade.

O grupo representou para Rita um espaço continente, no qual podia depositar suas aflições, suas raivas, suas decepções, seus rancores e seus desejos de vingança em relação ao seu padrasto (representante paterno e materno). Essas manifestações foram acolhidas. Aos poucos, também passou a veicular sua culpa pelo abandono das filhas e pelo intenso uso do crack durante as gravidezes e quando elas eram pequenas. Pôde verbalizar seus desatinos em vender tudo o que tinha para comprar crack, deixando-as aos cuidados de sua mãe alcoólatra. Quando, aos poucos, passou a compreender que reeditava situações de abandono e negligência que havia sofrido para castigar-se pelo ódio que sentia da mãe e do padrasto e a compreender sua identificação com a mãe que a abandonara, pôde aliviar-se, ficando mais fortalecida.

Após alguns meses de tratamento, tornou-se mais reflexiva, modulando mais seus afetos, que já podiam estar ligados a vivências anteriores. Em um dos grupos, Rita pôde

verbalizar os sentimentos associados às situações traumáticas de abuso vivenciadas na infância, referindo que “se o meu padrasto não tivesse me abusado, a minha vida seria diferente”. Rita relata que “apesar de todos os problemas, era uma criança cheia de sonhos” e que seu padrasto os havia destruído. Após três anos do ingresso no grupo, a paciente conseguiu trazer o seguinte relato: “Ele era meu padrasto, depois foi meu marido, porque tirou minha virgindade, e agora ele é meu tio, porque casou com a minha tia”. (...) “Se eu tivesse denunciado, poderia dormir tranquila. Ele tirou os meus sonhos, me faz muito mal.” “Agora tenho medo que abuse de minha filha menor que ainda mora comigo, no mesmo terreno. Por isso quero me mudar logo.” A mãe já havia se mudado desse terreno, com sua filha mais velha.

Em diversos momentos de sua vida, Rita entende que reedita, guardadas as proporções, a história de sua mãe. Assim como ela, não conheceu seu pai. Ambas engravidaram aos quinze anos. Tornaram-se, também, adictas a substâncias psicoativas desde muito cedo. Ambas abandonaram suas filhas. Ambas estiveram ligadas pelo vazio, pelo ódio e pelo abandono. Agora, ambas tentam, mesmo que de forma tímida, resgatar algo do vínculo precocemente rompido.

Após anos de abstinência, mantendo o vínculo com o grupo e com a equipe, Rita obteve diversas conquistas: manteve-se abstêmia, assim como manteve os cuidados com seu bebê. Conseguiu resgatar a relação com as duas filhas, primeiro com Helena, a filha do meio, que até então estava claramente deprimida. Depois, recuperou a relação com a filha mais velha, Maria, da qual cuidou com desvelo quando a mesma teve problemas de saúde. Por fim, Rita trouxe sua mãe ao grupo, conseguindo, pela primeira vez, estabelecer uma relação razoável com sua mãe real.

O vínculo com o bebê já havia iniciado quando de sua vida intrauterina, durante o tempo de internação, que teve o propósito de salvá-la, inicialmente da morte e, posteriormente, do crack. Teve também o propósito de salvar seu filho e preservar a possibilidade desta criança permanecer com a mãe, porém, em condições melhores do que em abrigos.

Depois de duas gestações acidentais, gravemente comprometidas pela intoxicação do crack, Rita decidiu que este bebê teria uma mãe. Seria uma terceira oportunidade de experimentar o papel materno, de renunciar à condição de “bicho”, de “farrapo de gente”, como ela mesma se denominava.

Para essa decisão, corroboraram importantes fatores terapêuticos, tais como a manutenção dos cuidados recebidos durante a internação psiquiátrica. Tratou-se de uma internação longa, de aproximadamente três meses, que oportunizaram não só a desintoxicação, mas também cuidados gestacionais e perinatais.

O grupo de técnicos que trabalhou com esta paciente acredita que a internação psiquiátrica até o momento do parto possibilita não só desintoxicação, mas também o desenvolvimento de vínculos com a equipe terapêutica que, por sua vez, manterá um “cordão umbilical” com a mãe, que, de maneira geral, está a essa altura abandonada pela família. A gestante, sentindo-se amparada e tendo novos padrões de identificação materna, mesmo que protéticos, poderá vir a desempenhar suas funções maternas, quem sabe, pela primeira vez, como no caso de Rita.

Rita chamava seu bebê de “meu anjo salvador”, seu grande incentivador para a manutenção da abstinência. Mesmo que essa percepção materna represente uma inversão de expectativa quanto a cuidados, pois é de esperar que quem cuide sejam os pais e quem seja cuidado seja o bebê, não é desconhecido o fato de que há bebês, filhos de mães depressivas, que “curam” suas mães. Os filhos de mães dependentes químicas, ponderando vários fatores, entre eles um mínimo de sanidade e desejo da mãe, bem como de uma estrutura mínima de amparo a ela, poderão resgatá-la. Essa condição poderá ser ainda melhor do que os abrigos que são oferecidos pelo governo e que também, pelo excesso de demanda, estão sobrecarregados e têm claras limitações de atendimento.

Ao chegar a uma família, o bebê pode estar preenchendo um lugar que antes continha expectativas. A família projeta sobre seu novo integrante desejos e medos, conscientes e inconscientes, que, muitas vezes, pouco têm a ver com ele. Os pais projetam suas vivências, boas e más, internalizadas, no bebê que chega. Ao longo de seu desenvolvimento, o bebê poderá se identificar com tais projeções, determinando sua saúde mental, ou a falta da mesma.¹⁹

Winnicott, por volta de 1940, fez a seguinte declaração “não há tal coisa como um bebê”, pois sempre que existe um bebê, ou seja, para sua sobrevivência, necessariamente deve haver um cuidado materno, o que significa não só o cuidado instrumental, mas sobretudo os afetos envolvidos entre a mãe e o bebê, que representam a chave para o desenvolvimento.²⁰ Com o nascimento de um bebê, a mãe entra em uma nova e única organização psíquica, temporária, a qual Stern chamou de “constelação da maternidade” quando a mãe foca sua existência vinculada ao bebê. A mãe apresenta três preocupações e discursos diferentes e

relacionados, que acontecem interna e externamente: o primeiro se refere à relação da mãe com sua própria mãe – a mãe como mãe quando ela era pequena; o segundo, o discurso consigo mesma – ela como mãe –; e, por fim, o discurso com seu bebê. Essa trilogia da maternidade passa a ser a maior preocupação da mãe e requer um grande trabalho psíquico de reelaboração mental.²¹ Observa-se, a partir dos grupos terapêuticos, que mesmo as mães adictas, ainda que por curto espaço de tempo, apresentam essa trilogia da maternidade, provavelmente o que explique sua motivação inicial para a abstinência. Nos casos destas mães, contudo, encontra-se uma relação extremamente problemática das gestantes e puérperas com suas próprias mães. A inexperiência e o abandono inauguram sua própria maternidade, que se depara com um bebê, na maioria das vezes prematuro ou apresentando alguma deficiência. Esta trilogia representa uma enorme vulnerabilidade para a relação que poderá estabelecer-se entre a mãe e o bebê. Um equilíbrio delicado que requer, portanto, maiores cuidados por parte dos terapeutas.

Em diversos momentos do grupo, a mãe Rita refere-se ao filho como “um milagre” que lhe deu ânimo para viver, e viver melhor: “ele veio ao mundo para me salvar”.

Por ocasião do aniversário de Rita, os técnicos do grupo festejaram suas conquistas com um bolo e um presente. Este evento se deu na presença de todo o grupo, inclusive de sua mãe e seus três filhos. Quando terminou a comemoração, ela disse à mãe: “viu mãe, agora eu sou gente”.

Comemorações concretas – como a finalização de seu apartamento, o ingresso da filha na faculdade, a manutenção dos cuidados do filho, hoje com quatro anos, dos laços com ambas as filhas e a mãe – conseguem, mesmo que ainda com falhas e vazios, povoar, de forma concreta e também simbólica, seu sofrido mundo interno.

Considerações finais

Ainda não foi encontrado o método terapêutico ideal para pacientes dependentes do crack. Muitos esforços têm sido despendidos nessa direção. Ashley, Marsden e Brady²² revisaram 38 publicações que davam conta de resultados de programas para mulheres, dos quais sete foram estudos randomizados. Os autores identificaram, entre outros achados, que as mulheres diferem dos homens quanto a etiologia, progressão da doença e acesso ao tratamento. Elas iniciam o uso da droga após eventos traumáticos, em geral violência física e

abuso sexual, estimuladas pelos companheiros, e são criadas em ambientes nos quais há pesado abuso de álcool. Diferentemente dos homens, apresentam baixa autoestima, sentimentos de culpa e autoacusação, bem como altos índices de doença mental, tais como transtorno bipolar, ansiedade, estresse pós-traumático e ideação suicida. Além disso, assinalam que a legislação pune as mães que usam drogas na gestação e as separam de seus filhos, o que dificulta o acesso dessas mulheres aos serviços de atendimento. Elas são ainda mais vulneráveis ao HIV do que os homens. Para essas mulheres, os tratamentos mais bem-sucedidos são os que oferecem tratamento específico para mulheres, mas que, concomitantemente, prestam atendimento para suas crianças, que oferecem tratamento pré-natal e possibilitam que essas mães fiquem com seus bebês em comunidades terapêuticas por longo tempo. Observaram que as mães que ficaram com seus bebês permaneceram aproximadamente 300 dias em tratamento, enquanto que as que foram privadas dos filhos abandonaram o tratamento em 140 dias.

O Grupo Operativo de Psicoeducação para Gestantes e Puérperas Usuárias de Substâncias Psicoativas oportuniza a participação conjunta da mãe e seu bebê no tratamento, a flexibilidade de entrada de familiares, desde que com a concordância e o desejo das mães, a assistência concomitante às crianças, quando possível e, especialmente, os vínculos estabelecidos desde o momento da internação da paciente até o ingresso no grupo. Esta modalidade de atendimento mostrou-se efetiva para esta determinada paciente e sua família.

Referências:

1. Pichon-Riviere E. El proceso grupal de la psicanalisis a la psicologia social. Bueno Aires: Ed. Nueva Vision, 1977.
2. Zimerman DE. A função “continente” do grupo. In:_____. Fundamentos básicos das grupoterapias. 2.ed. Porto Alegre: Artmed; 2000, p. 97-102.
3. Zimerman DE. Vínculos e configurações vinculares. In:_____. Os quatro vínculos: amor, ódio, conhecimento, reconhecimento na psicanálise e em nossas vidas. Porto Alegre: Artmed; 2010, p. 21-35.
4. Yalom ID. Psicoterapia de grupo: teoria e prática. Porto Alegre: Artmed, 2006.

5. Jaques E. Una contribución al estudio psicoanalítico de procesos sociales. In: Menzies IEP, Jaques E. Los sistemas sociales como defensa contra La ansiedad. 2. ed. Buenos Aires: Hormé; 1974, p.15-52.
6. Freiberg S. Clinical Studies in infant mental health: the first year of life, London: Tavistok Publications, 1980.
7. Cramer B, Palacio-Espasa F. O funcionamento mental do pós-parto: uma nova tópica. In:_____Técnicas psicoterápicas mãe/bebê: estudos clínicos e técnicos. Porto Alegre: Artes Médicas; 1993, p.25-39.
8. Zavaschi MLS, Costa F, Brunstein C, Filho AGC, Zimermann H, Kruter BCç, Estrella CHG. Ambulatório pais-bebês: experiência em um hospital escola. Revista HCPA 1999;19(1):108-16.
9. Piontelli A. De feto a criança: um estudo observacional e psicanalítico. Rio de Janeiro: Imago, 1995.
10. Freud S.(1920). Além do princípio do prazer: In: Edição standard brasileira das obras psicológicas de Sigmund Freud. Rio de Janeiro: Imago; 1974. v.18, p.13-85.
11. Mees LA. Abuso sexual: trauma infantil e fantasias femininas. Porto Alegre: Artes e Ofícios, 2012.
12. Shengold L. Murder, violence, and soul murder: did it really happen?" and a note on therapy. In:_____Soul murder revisited: thoughts about therapy, hate, love, and memory. New Have and London: Yale University Press; 1999, p. 257-86.
13. Tetelbom M, Quinalha ABF, Defavery R, Zavaschi MLS. Abuso sexual intrafamiliar: um alerta. J. bras. Psiquiatr. 1991;40(3):145-8.
14. Weiss, R. D.; iannucci, R. A.. Cocaine-related disorders. In. Sadock, B. J.; Sadock, V. A.; ruiz, P (ed). Kaplan & Sadock's comprehensive textbook of psychiatry. 9th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2009. p.1318-31.
15. Stein MD, Cyr MG. Women and substance abuse. Medical Clinics of North America. 1997; 81(4):979-98.
16. Ramos, S de P. What can we learn from psychoanalysis and prospective studies about chemically dependent patients? Int J Psychoanal_ 2004;85(2):467-87.
17. Abraham K. Las relaciones psicológicas entre la sexualidad y el alcoholismo (1908). In._____. Psicoanálisis clínico. Buenos Aires: Hormé, 1959. p.60-67.

18. Pechansky F. et al. HIV seroprevalence among drug users: an analysis of selected variables based on 10 years of data collection in Porto Alegre, Brasil. *Drug and Alcohol Dependence*, EUA. 2006;82(1):S109-S113.
19. Albornoz ACG. Fantasmas no berço e o psiquismo do bebê. 2006 pag. 155-163 *Barbarói Revista do Departamento de Ciências Humanas e do Departamento de Psicologia*. 2006;25(2):155-63.
20. Winnicott DW. Teoria do relacionamento paterno-infantil (1960). In:_____O ambiente e os processos de maturação: estudos sobre a teoria do desenvolvimento emocional. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, p.38-54.
21. Stern DN. A constelação da maternidade. In:_____A constelação da maternidade: o panorama da psicoterapia pais/bebê. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.
22. Ashley OS, Marsden ME, Brady TM. Effectiveness of Substance Abuse Treatment Programming for Women: A Review. *Am J Drug Alcohol Abuse* 2003;29(1):19-53.