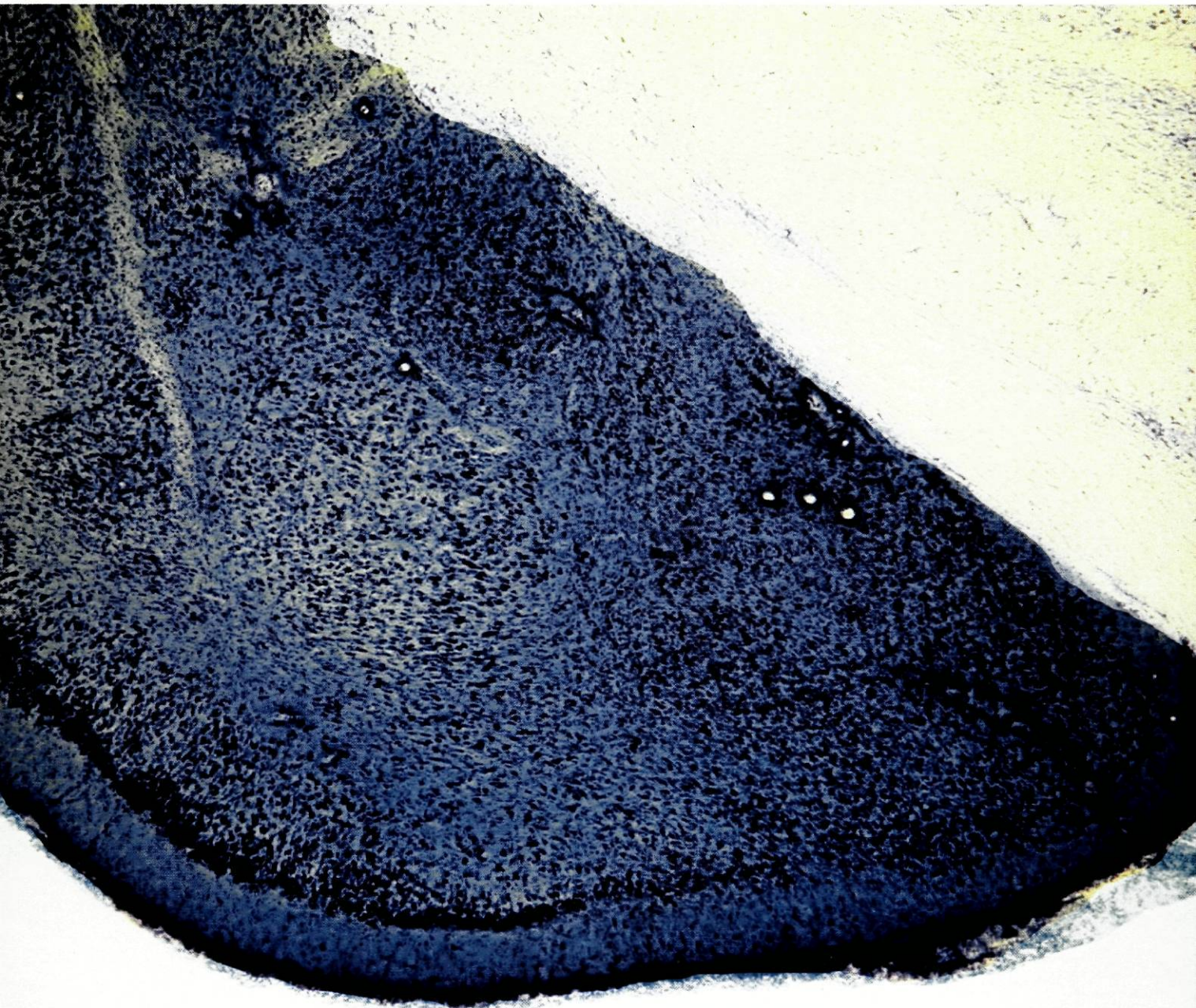


Ivone Luísa de Castro Vale

A Díada **AMÍGDALA-COCAÍNA** como Paradigma Neurobiológico  
num Modelo de Neurotoxicologia do Desenvolvimento



Ivone Luísa de Castro Vale

A Díada **AMÍGDALA-COCAÍNA** como Paradigma Neurobiológico num  
Modelo de Neurotoxicologia do Desenvolvimento

Dissertação de Mestrado em Psiquiatria e Saúde Mental

Apresentada à

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Orientador Professor Doutor Rui Coelho

Faculdade de Medicina

Universidade do Porto

2002

Ao Domingos

e

aos meus pais e irmãos

pela ciência

## **Agradecimentos**

O trabalho agora apresentado não teria sido possível sem o apoio e a colaboração de várias pessoas a quem devo a minha gratidão:

Ao Professor Doutor Rui Coelho, orientador da presente dissertação, agradeço por me ter aberto o caminho da investigação básica em neurociências.

À Professora Doutora Maria Amélia Tavares por a ter tornado possível, pelo estímulo, empenho, dinamismo contagiante, sugestões e correcções, pelo apoio ilimitado e pela amizade.

À Professora Doutora Liliana de Sousa pela disponibilidade, partilha, incentivo, pelo contributo estatístico, sugestões e correcções, pelo apoio e pela amizade.

Ao Professor Doutor António Pacheco Palha coordenador do mestrado em Psiquiatria e Saúde Mental.

Ao Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto agradeço a disponibilidade de espaço e material necessários à realização dos estudos morfológicos.

À Unidade de Neurocomportamento do Instituto de Biologia Molecular e Celular agradeço a disponibilização de todo o espaço e material necessários ao tratamento do modelo animal, testes de comportamento, estudo neuroquímico e parte dos estudos morfológicos.

À Mestre Ana Magalhães pelo contributo e apoio na realização dos testes de comportamento e pelo contributo bibliográfico.

À Dr.<sup>a</sup> Teresa Summavielle pelos doseamentos neuroquímicos por HPLC, pelo contributo bibliográfico e pelo apoio no processamento do material animal.

À Mestre Joana Gomes da Silva pelo apoio no processamento do material animal, nomeadamente para estudo morfológico imunocitoquímico.

Ao Mestre Pedro Melo pelo apoio no tratamento do modelo animal.

Ao Doutor Pedro Monteiro e à Mestre Lorena Rodrigues pelo apoio informático e bibliográfico, respectivamente.

Às técnicas de laboratório, D. Manuela Pacheco e D. Ana Carolina, pelo apoio na preparação do material para estudo morfológico. À D. M<sup>a</sup> de Lourdes Brito do Instituto de Anatomia da FMUP pelo contributo na recolha de bibliografia.

Ao Dr. Luís Garcia pela tradução do resumo para francês.

Ao Eng. Domingos Dias pelo apoio logístico e informático e abdicação.

Ao Joaquim Vale, à Margarida Castro, ao Rui Vale e ao Paulo Vale porque contribuíram para que chegasse até aqui.

Por fim, e não menos importante, a todos os que directa ou indirectamente me apoiaram para que este trabalho fosse uma realidade.

## Resumo

A amígdala é uma estrutura do Sistema Nervoso Central (SNC) relacionada com o comportamento emocional e social, com a aprendizagem e memória e tem-lhe sido atribuído papel importante na associação de estímulos condicionados ao consumo de cocaína.

O aumento do consumo de cocaína por mulheres em idade fértil tem determinado que muitas crianças tenham sido expostas a esta droga durante a gestação. A investigação tem demonstrado que estas crianças apresentam, entre outras, deficiências na regulação da atenção e da activação, funções a que a amígdala também tem sido associada.

O presente estudo pretende contribuir para a compreensão dos mecanismos subjacentes à teratologia neurocomportamental da cocaína no que decorre do envolvimento da amígdala. Para tal utilizou-se um modelo animal no rato (Wistar) já bem aferido para estabelecer eventuais homologias no estudo da exposição humana à cocaína durante o período referido: administração crónica diária de cocaína ao rato durante os primeiros 30 dias de vida. Ao grupo controlo foi administrado soro fisiológico. Os animais foram estudados em parâmetros de âmbito comportamental (teste de natação forçada, *open-field* e interacções sociais) e a amígdala avaliada nos aspectos morfológico e neuroquímico: organização geral, expressão imunocitoquímica dos anticorpos anti-TH e anti-5-HT e determinação das concentrações de DA e 5-HT, seus metabolitos, respectivamente DOPAC e HIAA e *turnover* respectivos.

A administração de cocaína ao rato no período de desenvolvimento pós-natal diminuiu a tentativa de escapar no TNF, causou maior actividade e menor defecação até ao DPN21 e depois deste dia menor actividade e maior defecação, determinou ainda em interacções sociais mais comportamentos de cheirar, de posições erectas ofensiva e defensiva. No estudo neuroquímico verificou-se que a amígdala dos ratos do grupo exposto à cocaína tinha uma menor concentração de DA e maior *turnover* da DA e ainda neste grupo que a concentração de DA foi maior na amígdala esquerda. Não foram encontradas diferenças entre os grupos no estudo neuroquímico da 5-HT. Também não foram encontradas diferenças entre os grupos relativamente à morfologia e estudo imunocitoquímico efectuado. As fêmeas do grupo exposto à cocaína apresentaram maior número de células com expressão do anticorpo anti-5-HT do que os machos no grupo de núcleos basilateral.

As alterações do comportamento encontradas estão associadas a diminuição do *tonus* dopaminérgico na amígdala mas não com alterações serotoninérgicas na mesma estrutura. Estes resultados sugerem que as alterações do comportamento que têm sido encontradas nos filhos de mães que consumiram cocaína durante a gravidez, como a deficiente regulação da atenção e da activação, podem estar relacionadas com diminuição da DA na amígdala.

## Abstract

The amygdala is a Central Nervous System structure associated with emotional and social behavior, with learning and memory, to which has been assigned an important role in the association of conditioned stimuli with cocaine use.

The increase of cocaine use by women in childbearing age has exposed many children to this drug during gestation. Research has showed these children display, among others, deficiencies in attention and arousal regulation, functions to which the amygdala has been associated.

The present study aims to contribute to the understanding of the mechanisms supporting cocaine related neurobehavioral teratology in the second half of gestation in what they depend on the amygdala. For this it has used an animal model extensively applied to study human exposure to cocaine during the referred period: chronic administration of cocaine to the rat in the first 30 days of life. The control group has received saline solution. Behavioral tests were conducted: forced swim test, open-field and social interations; morfological and neurochemical (concentrations of DA and 5-HT, their turnover and metabolites, DOPAC and HIAA, respectively) aspects of the amygdala were also considered, as well as the immunocitochemical expression of the anti-bodies anti-TH and anti-5-HT.

Cocaine administration to the rat during the post-natal period of development decreased hope to escape from the forced swim test, caused more activity and less defecation until the 21<sup>st</sup> post-natal day and from there on less activity and more defecation, determined more behaviors of sniffing, of defensive and ofensive erect positions. The neurochemical study revealed that the amygdala of the exposed animals had inferior concentration of DA, greater DA turnover and that in this group the DA concentration was superior in the left amygdala. Diferencias were not found between groups regarding 5-HT neurochemical study. Diferencias between groups were also not found in the morfological and immunocitochemical analisis. Females from the exposed group had more cells with expression of the anti-body anti-5-HT than males in the basolateral group of nuclei.

The altered behavior found in this study is associated with inferior level of amygdala dopaminergic *tonus* but no serotonergic alteration. These results sugest that the altered behavior that has been found in children whose mothers used cocaine during pregnancy, such as deficiencies in attention and arousal regulation, may be related with a decrease in amygdala's DA.

## Résumé

L'amygdale est une structure du Système Nerveux Central associée au comportement émotionnel et social, à l'apprentissage et à la mémoire, à laquelle est attribué un rôle important dans l'association de stimuli conditionnés à la consommation de la cocaïne.

L'augmentation de la consommation de la cocaïne par des femmes en âge fertile a impliqué l'exposition d'un grand nombre d'enfants à cette drogue pendant la gestation. L'investigation a démontré que ces enfants présentent, entre autres, des déficiences du contrôle de l'attention et de l'activation, fonctions auxquelles l'amygdale est associée.

La présente étude prétend contribuer à la compréhension des mécanismes relatifs à la tératologie neurocomportementale de la cocaïne en ce qui concerne l'importance de l'amygdale. Pour cela a été utilisé un modèle animal, le rat (Wistar) si bien étudié pour établir d'éventuelles homologies dans l'étude de l'exposition humaine à la cocaïne pendant la période citée: administration chronique quotidienne de la cocaïne au rat pendant les trente premières journées de vie. Le groupe de contrôle reçut du sérum physiologique. Les animaux ont été étudiés selon les paramètres de niveau comportemental (test de nage forcée, *open-field* et interactions sociales) et l'amygdale évaluée selon les aspects morphologique et neurochimique: organisation générale, expression immunocitochimique des anticorps anti-TH et anti-5-HT et la détermination des concentrations de DA et 5-HT, leurs métabolites, respectivement DOPAC et HIAA et leurs *turnover*.

L'administration de la cocaïne au rat pendant la période de développement postnatale a réduit la tentative d'échapper au test de nage forcée, a provoqué une plus grande activité et une plus petite défécation jusqu'au 21<sup>e</sup> jour de vie et, ensuite, une plus petite activité et une plus grande défécation. L'administration de la cocaïne a déterminé en interactions sociales un plus grand nombre de comportements de sensations de l'odorat, des positions de dressage offensif et défensif. Dans l'étude neurochimique on a vérifié que l'amygdala des rats du groupe exposé à la cocaïne avait une moindre concentration de DA et un plus grand *turnover* de DA et que la concentration de DA était plus grande dans l'amygdale gauche. Nous n'avons pas remarqué de différences entre les groupes dans l'étude neurochimique de 5-HT. Nous n'avons pas, non plus, remarqué de différences entre les groupes relativement à la morphologie et à l'étude immunocitochimique réalisée. Les femelles du groupe exposé à la cocaïne ont présenté un plus grand nombre de cellules avec l'expression de l'anticorps anti-5-HT que les mâles dans le groupe de nucléos basilateral.

Les changements du comportement vérifiés sont associés à la réduction du tonus dopaminérgique dans l'amygdale mais sans changements sérotoninérgiques dans la même structure. Ces résultats suggèrent que les changements du comportement vérifiés dans les enfants

des mères consommatrices de cocaïne pendant la grossesse, ainsi que la déficiente régulation de l'attention et de l'activation, peuvent être en relation avec la réduction de DA dans l'amygdale.

# Índice

<b>Glossário</b>	<b>1</b>
<b>Preâmbulo</b>	<b>2</b>
<b>Introdução</b>	<b>4</b>
Amígdala	5
Aspectos neuropsicológicos da amígdala no animal de experiência	5
Neurobiologia da amígdala no Homem: o normal e o patológico	8
Amígdala e cocaína	14
Aspectos fisiológicos da díada amígdala-cocaína	14
Aspectos comportamentais da díada amígdala-cocaína	20
Díada amígdala-cocaína no Homem	26
Objectivos	29
<b>Material e métodos</b>	<b>30</b>
Modelo animal	31
Testes comportamentais	32
Teste de natação forçada (“forced swim test”)	32
Actividade no <i>open-field</i>	33
Interacções sociais	33
Estudos morfológicos	36
Imunocitoquímica	36
Técnica de Nissl	36
Expressão imunocitoquímica do anti-corpo anti-TH	37
Expressão imunocitoquímica do anti-corpo anti-5-HT	37
Determinações neuroquímicas	38
Análise estatística	39

<b>Resultados</b>	<b>40</b>
Testes comportamentais	41
Teste de natação forçada	41
Actividade no <i>open-field</i>	44
Interacções sociais	51
Estudos morfológicos	52
Coloração de Nissl	52
Expressão imunocitoquímica do anti-corpo anti-TH	54
Expressão imunocitoquímica do anti-corpo anti-5-HT	54
Determinações neuroquímicas	58
<b>Discussão</b>	<b>61</b>
Os modelos animais	63
A expressão comportamental	65
A organização morfológica	69
A neuroquímica	70
Sinopse	72
<b>Conclusões</b>	<b>74</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>78</b>

## Glossário

- 5-HT - 5-hidroxitriptamina, serotonina
- CART - transcripto regulado pela cocaína e anfetamina
- CRF - factor libertador de corticotropina
- DA - dopamina
- Dalz - doença de Alzheimer
- DOPAC - ácido 3,4-dihidroxifenilacético
- DP - desvio padrão
- DPN - dia pós-natal
- EC - estímulo condicionado
- ELT - epilepsia do lobo temporal
- EPM - erro padrão da média
- fMRI - ressonância magnética nuclear funcional
- GABA - ácido *gama*-aminobutírico
- HIAA - ácido hidroxindolacético
- IBMC - Instituto de Biologia Molecular e Celular
- MRI - ressonância magnética nuclear
- mRNA - ácido ribonucleico mensageiro
- PET - tomografia por emissão de positrões
- PPST - perturbação pós-*stress* traumático
- SNC - sistema nervoso central
- TNF - teste de natação forçada

## Preâmbulo

No Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e na Unidade de Neurocomportamento do Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC) tem-se vindo a estudar os efeitos da exposição a drogas psicoestimulantes no desenvolvimento estrutural do sistema nervoso central (SNC) do rato (Gomes-da-Silva *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 1995; Silva-Araújo *et al.*, 1995a; Silva-Araújo *et al.*, 1993; Silva-Araújo *et al.*, 1995b; Silva-Araújo *et al.*, 1996a; Silva-Araújo & Tavares, 1995; Silva-Araújo & Tavares, 1996; Silva-Araújo *et al.*, 1996b; Summavielle *et al.*, 2000; Tavares & Silva, 1993; Tavares & Silva, 1996; Tavares *et al.*, 1996). Nos últimos anos têm também sido avaliados os efeitos desta exposição no comportamento (Magalhães *et al.*, 2001a; Magalhães *et al.*, 2001b; Summavielle *et al.*, 2002) e, particularmente, a eventual associação entre alterações comportamentais e a expressão de neuromediadores monoaminérgicos (Summavielle *et al.*, 2002).

No contexto dos trabalhos progressivamente publicados na área da neurotoxicologia das drogas de abuso foi sendo emergente o envolvimento de outras áreas do SNC relacionadas com funções comportamentais e cognitivas reconhecidamente afectadas pelo consumo da cocaína. De entre estas é evidente o papel da amígdala em processos de recompensa e reforço do consumo de cocaína (Bonson *et al.*, 2002; Childress *et al.*, 1999; Ciccocioppo *et al.*, 2001; Grant *et al.*, 1996; Whitelaw *et al.*, 1996). No âmbito desta problemática o presente estudo aborda esta área do SNC de extrema importância neurobiológica para o desenvolvimento das perturbações relacionadas com o consumo de cocaína (Weiss *et al.*, 2000b).

O aumento do consumo de cocaína (Balsa *et al.*, 2001; Musto, 1989) coloca desafios médicos e sociais de difícil solução, particularmente quando iniciado nas

mulheres em idade fértil. Sabe-se que os recém-nascidos e as crianças que foram expostos à cocaína durante a gestação apresentam problemas vários (Chasnoff *et al.*, 1987 ; Chasnoff *et al.*, 1985; Delaney-Black *et al.*, 1998; Dixon *et al.*, 1987; Doberczak *et al.*, 1987; Mayes *et al.*, 1995; Neuspiel & Hamel, 1991; Oro & Dixon, 1987), os quais podem eventualmente condicionar o seu desenvolvimento e até proporcionar em fases adiantadas da maturação, i.e. na adolescência e quando adultos jovens, um terreno neurobiológico mais propício ao consumo de cocaína.

Os estudos em modelos animais experimentais são fundamentais para guiar e ampliar os estudos em humanos permitindo o progresso no conhecimento cada vez mais profundo das doenças mentais, com o objectivo da sua melhor abordagem terapêutica. Eis a justificação para um trabalho experimental no rato num Mestrado em Psiquiatria e Saúde Mental.

## **Introdução**

## **Amígdala**

A amígdala é uma estrutura do SNC identificada por Burdach no início do século XIX e assim designada por se assemelhar a uma amêndoa (Aggleton, 1993). A organização citológica e neuroquímica da amígdala no rato pode ser revista em de Olmos *et al.* (1985) e Alheid *et al.* (1995). As conexões extrínsecas e intrínsecas da amígdala no rato podem ser pormenorizadamente revistas nos trabalhos de de Olmos *et al.* (1985), Price *et al.* (1987), Pitkänen *et al.* (1997), Pitkänen (2000) e McDonald (1998). Estas revisões são muito importantes pois abordam a amígdala sob múltiplos aspectos e em alguns casos comparam os dados obtidos no rato com outros mamíferos, como o gato e o macaco (McDonald, 1998; Price *et al.*, 1987; Amaral *et al.*, 1992; Paré & Smith, 1998).

### **Aspectos neuropsicológicos da amígdala no animal de experiência**

As primeiras informações relativas às funções da amígdala foram sugeridas pelos estudos de Klüver e Bucy (1937, citado em LeDoux, 2000) em macacos com lesão bilateral dos lobos temporais. Estes animais apresentavam agnosia visual, hiperoralidade, hipermetamorfose, embotamento dos sentimentos de medo e de raiva e hipersexualidade, constelação de sinais designada de síndrome de Klüver e Bucy. Estudos posteriores vieram a confirmar que este conjunto de sinais é da responsabilidade da lesão bilateral da amígdala (Weiskrantz, 1956, citado em LeDoux, 2000).

O conjunto de núcleos que constitui o complexo amigdalóide, designado em terminologia anatómica por amígdala, está relacionado com o comportamento emocional e social, com a aprendizagem e a memória (e.g. Aggleton, 1993). Os estudos efectuados em modelos animais sobre as funções da amígdala utilizam técnicas de

condicionamento (e.g. Hatfield *et al.*, 1996) e de lesão selectiva desta estrutura (e.g. Roozendaal *et al.*, 1991). Estes trabalhos avaliam também a ansiedade e a depressão (e.g. Duncan *et al.*, 1986), o *kindling* eléctrico e químico (ex.: cocaína) (e.g. Kalynchuk *et al.*, 1997) e as interacções sociais (e.g. Emery *et al.*, 1998).

Destes estudos emergem dados que, de modo convergente, indicam que a amígdala (e as suas múltiplas eferências) representa um sistema central que controla quer a expressão quer a aquisição do medo condicionado e não condicionado (Davis, 2000). A amígdala recebe informação sensitiva processada principalmente através dos seus núcleos lateral e basal, que projectam para o núcleo central e deste as projecções dividem-se para áreas alvo do hipotálamo e tronco cerebral, mediando os sinais específicos do medo e da ansiedade (Davis, 2000). A maior parte dos estudos de medo condicionado têm usado estímulos auditivos como estímulos condicionados (ECs), que actuam através de vias diferentes no condicionamento ao medo dependendo da natureza do estímulo e da tarefa de aprendizagem (Davis, 2000). Neste contexto sabe-se que, para condicionamento a um tom, estão envolvidas projecções do núcleo lateral para o central, enquanto que para o condicionamento contextual são necessárias projecções do hipocampo para o núcleo basal e/ou basal acessório. Por outro lado, para aprender uma resposta instrumental de medo controlada por um EC sonoro são usadas projecções do núcleo lateral para o basal. Neste caso, LeDoux (2000) demonstrou que a resposta é controlada por projecções do núcleo basal para o estriado. Durante o condicionamento ao medo as propriedades de despolarização das células do núcleo lateral alteram-se, mas isto não significa que a amígdala seja um local de armazenamento de memória (Cahill & McGaugh, 1998); em vez disso, modula as memórias que são armazenadas noutros locais. Há múltiplos sistemas de memória no cérebro e a amígdala modula a memória

declarativa ou explícita formada através de circuitos do hipocampo ou memórias de hábitos formadas através de circuitos do estriado (Packard *et al.*, 1994).

Aos estudos anteriores acrescem outros que sugerem que a amígdala desempenha papel crucial em vários aspectos da cognição social, que incluem a regulação de respostas emocionais, a aquisição e manutenção de ligações sociais, a descodificação de sinais sociais sensitivos dos outros indivíduos e o desenvolvimento de comportamentos sexuais adequados e respostas maternais apropriadas (Bachevalier, 2000). Dada a relação da amígdala com as respostas emocionais e comportamentais, não surpreende que esta estrutura afecte quase todos os aspectos da cognição social (Kling & Brothers, 1992). Estudos de interações sociais demonstram a contribuição significativa da amígdala nos comportamentos de afiliação (Emery *et al.*, 1998; Kling *et al.*, 1979). Vários estudos indicam que a amígdala codifica e processa os movimentos faciais, as posturas corporais e os gestos que são sinais importantes para a produção e a modulação de respostas sociais e emocionais face a outros indivíduos (e.g. Perrett *et al.*, 1984; Rolls, 1994). Como descrito por Klüver e Bucy (1937, citado em LeDoux, 2000), a amigdalectomia está associada a hipersexualidade e Kling (1972) encontrou profundos efeitos sobre o comportamento maternal em casos de lesão da amígdala. O núcleo medial da amígdala integra a informação olfactiva vinda dos sistemas olfactivos principal e acessório e proporciona eferências para várias partes do sistema olfactivo (Canteras *et al.*, 1995). Dado que a informação olfactiva modula os comportamentos defensivo e sexual, entre outros (Edwards *et al.*, 1993; Lehman & Winans, 1982; Lehman *et al.*, 1980) será plausível que o núcleo medial da amígdala desempenhe papel importante nestes comportamentos, modulando o influxo de informação olfactiva através das suas projecções para outras regiões prosencefálicas. O núcleo medial da amígdala possui receptores para os estrogénios e androgénios (Simerly *et al.*, 1990) e é

cerca de 20% mais volumoso nos machos do que nas fêmeas (Hines *et al.*, 1992). Nos roedores, este núcleo faz parte do circuito dimórfico sexual que é dominado por eferências do órgão vomeronasal (Simerly *et al.*, 1989).

O *kindling* é um paradigma experimental usado como modelo da epilepsia do lobo temporal (Weiss *et al.*, 2000a), em que a estimulação eléctrica repetida de estruturas do SNC leva ao desenvolvimento progressivo de convulsões motoras (Goddard, 1967). A compreensão dos mecanismos subjacentes ao *kindling* pode revelar os substratos da plasticidade que ocorrem em situações não epiléticas desde a formação normal da memória até às perturbações neuropsiquiátricas (Weiss *et al.*, 2000a). Neste contexto, é de salientar a extrema vulnerabilidade da amígdala ao *kindling* (e.g. Kalynchuk *et al.*, 1999; Kalynchuk *et al.*, 1997; Morgan *et al.*, 1999; Tober *et al.*, 1996).

### **Neurobiologia da amígdala no Homem: o normal e o patológico**

Estudos relativos à função da amígdala em humanos foram primeiro levados a cabo em casos de lesão da amígdala, quer em consequência de doença (Markowitsch *et al.*, 1994; Adolphs *et al.*, 1994), quer por ressecção cirúrgica no tratamento da epilepsia do lobo temporal (LaBar *et al.*, 1995; Phelps *et al.*, 1998). Actualmente, com as técnicas de neuroimagem funcional como a tomografia por emissão de positrões (PET) e a ressonância magnética nuclear funcional (fMRI), tem sido possível o estudo das funções da amígdala humana *in vivo* (Bonson *et al.*, 2002; Irwin *et al.*, 1996; Morris *et al.*, 1996; Schneider *et al.*, 1997).

Estudos realizados em modelos animais revelaram o papel crítico das estruturas mediais do lobo temporal, particularmente a amígdala, na resposta emocional associativa simples e complexa. Em humanos com lobectomia temporal anterolateral

unilateral (LaBar *et al.*, 1995), quer as tarefas discriminativas simples quer as condicionadas mostraram diminuição na aquisição da resposta condicionada relativamente aos controlos, o que foi relacionado primariamente com lesão da amígdala. Este resultado sugere que o papel das estruturas subjacentes às associações condicionadas simples e complexas ao medo, como postulado para os modelos animais de medo condicionado, é encontrado também no cérebro humano (LaBar *et al.*, 1995). Num estudo de lesão bilateral da amígdala, Bechara *et al.* (1995) encontraram bloqueio da capacidade de adquirir respostas condicionadas de condutância da pele ao estímulo condicionado (imagens monocromáticas e sons gerados por computador) mas não impediu a aquisição de informação acerca de quais estímulos, visuais ou auditivos, estavam associados aos estímulos não condicionados. Os autores sugerem que a amígdala é indispensável ao condicionamento emocional e ao emparelhamento da informação sensitiva exteroceptiva com a informação interoceptiva relativa a estados somáticos (emoção e afecto).

Adolphs *et al.* (1994) estudaram um paciente com doença de Urbach-Wiethe, que causou a destruição bilateral quase completa da amígdala, e demonstraram alteração grave de reconhecimento específico ao medo e incapacidade de perceber a semelhança entre expressões de diferentes emoções, mas preservação da capacidade de reconhecimento da identidade única das faces. Desta situação, os autores concluíram que a amígdala, por constituir importante componente do sistema neuronal, fundamenta a cognição social devido ao seu envolvimento em reconhecer os sinais faciais essenciais para o comportamento adequado num contexto social complexo. Noutro estudo, que envolveu dois doentes com a mesma doença e lesões semelhantes da amígdala, Markowitsch *et al.* (1994) encontraram deficiências em certas tarefas de memória (ex. Auditory Verbal Learning, LGT-3), especialmente aquelas que era provável terem

afectado os doentes emocionalmente. Os autores concluíram que a amígdala (e o núcleo septal) são estruturas que influenciam a *performance* mnésica estruturando, seleccionando e filtrando informação de diferente relevância para o indivíduo (Markowitsch *et al.*, 1994).

Irwin *et al.* (1996) foram os primeiros a demonstrar activação da amígdala (usando fMRI echo-planar), numa amostra de humanos normais, em resposta a estímulos visuais com uma conotação afectiva negativa quando a comparação é efectuada com estímulos visuais neutros. A tristeza induzida experimentalmente aumenta o fluxo sanguíneo da amígdala esquerda (Schneider *et al.*, 1995) e a tristeza e felicidade aumentam a intensidade de sinal da amígdala esquerda medida por fMRI (Schneider *et al.*, 1997). Morris *et al.* (1996) estudaram a actividade neuronal por PET, em sujeitos normais, na resposta a figuras de expressão facial de medo ou de felicidade e encontraram activação da amígdala esquerda relacionada com faces de medo e com a intensidade da emoção (quanto mais amedrontadora mais activação e o oposto com a felicidade). Estes estudos são consistentes com a importância da amígdala nas interacções sociais.

Tem sido demonstrado o envolvimento da amígdala na ansiedade, depressão (Sheline *et al.*, 1998), em várias perturbações demenciais (Chow & Cummings, 2000) e na esquizofrenia (Pearlson *et al.*, 1997).

Doentes com história de depressão *major* recorrente apresentavam volumes significativamente menores dos núcleos do *core* da amígdala bilateralmente (grupo basilateral) do que os respectivos controlos, mas não apresentavam redução significativa das áreas que rodeavam os núcleos do *core* nem a redução destes foi resultado de atrofia cerebral generalizada (Sheline *et al.*, 1998). Tebartz van Elst *et al.* (1999) encontraram aumento muito significativo dos volumes das amígdalas esquerda e direita (usando MRI

quantitativa) em doentes com epilepsia do lobo temporal (ELT) e com distímia quando comparados com voluntários saudáveis. Estes autores também demonstraram existir correlação positiva entre os volumes da amígdala esquerda e a sintomatologia depressiva (avaliada através do Inventário de Depressão de Beck) e os volumes da amígdala foram significativamente maiores nas mulheres do que nos homens. Acresce a possibilidade de que o aumento do processamento de informação emocional poderá aumentar o fluxo sanguíneo da amígdala e resultar em hipertrofia desta estrutura. Noutro estudo, Tebartz van Elst *et al.* (2000) também encontraram volumes da amígdala significativamente mais elevados em doentes deprimidos com ELT e nas mulheres. O metabolismo da glicose e o fluxo sanguíneo cerebral em repouso estão anormalmente elevados na amígdala dos deprimidos e esta estrutura tem sido a única em que estes parâmetros se correlacionam positivamente com as pontuações da gravidade da sintomatologia depressiva (Abercrombie *et al.*, 1996; Drevets *et al.*, 1992; Drevets *et al.*, 1995).

Bogerts (1984) e Bogerts *et al.* (1985) em estudos *postmortem* de doentes com esquizofrenia encontraram reduções significativas do volume da amígdala bem como de outras estruturas límbicas. Fudge *et al.* (1998) apresentam um caso de psicose crónica em que o exame *postmortem* revelou dois pequenos hamartomas no núcleo basal da amígdala esquerda que coraram com um anticorpo para o bcl-2, um marcador de neurónios imaturos em desenvolvimento (Yachnis *et al.*, 1997). A volumetria da amígdala por MRI de 46 esquizofrénicos comparada com 60 controlos e 27 doentes com perturbação afectiva bipolar demonstrou redução dos volumes da amígdala direita na esquizofrenia bem como dos volumes da amígdala esquerda na perturbação afectiva bipolar (Pearlson *et al.*, 1997). Hirayasu *et al.* (1998) usando MRI, estudaram 18 doentes com um primeiro episódio de esquizofrenia, 16 com um primeiro episódio de

perturbação afectiva e 18 sujeitos emparelhados relativamente à idade, todos dextrímanos, e encontraram assimetria esquerdo-menor-que-o-direito do complexo amígdala-hipocampo no grupo de sujeitos psicóticos.

A amígdala relaciona-se também com a fisiopatologia da fobia social, com activação mostrada por fMRI quando estes doentes foram expostos a diapositivos de faces neutras comparando com sujeitos controlos (Birbaumer *et al.*, 1998).

De Bellis *et al.* (2001) mediram os volumes da amígdala e de regiões cerebrais de comparação de 12 crianças e adolescentes com perturbação de ansiedade generalizada e 24 controlos e encontraram, no grupo de estudo, um aumento significativo do volume da amígdala esquerda e do volume total da amígdala. Os autores concluem que estes dados, embora preliminares, estão de acordo com a perspectiva que alterações na estrutura e na função da amígdala podem estar associadas com a perturbação de ansiedade generalizada na população pediátrica.

Na perturbação pós-*stress* traumático (PPST) parece haver elementos de uma progressão de tipo *kindling*. Nesta perturbação, acontecimentos traumáticos podem condicionar alterações permanentes da hiperexcitabilidade neuronal, reexperiências intrusivas persistentes e comportamentos de evitamento (Post *et al.*, 1995a). É considerada a hipótese de que a PPST é uma repetição espontânea ou desencadeada de memórias emocionais semelhante aos fenómenos convulsivos que ocorrem no modelo de *kindling* da amígdala (Post *et al.*, 1998). Embora estudos de imagem por MRI de doentes com PPST ou história de trauma precoce tenham falhado em mostrar diferenças comparativamente a controlos saudáveis (De Bellis *et al.*, 2001; Bonne *et al.*, 2001; Driessen *et al.*, 2000), Shin *et al.* (1997) encontraram aumento de fluxo sanguíneo na amígdala direita de sujeitos com PPST quando imaginavam cenas de combate comparados com os sujeitos controlo.

Schneider *et al.* (2001) estudaram um grupo de 10 doentes alcoólicos recentemente abstinentes antes e depois de 3 semanas de terapia comportamental “standardizada” com intervenção psicofarmacológica e 10 controlos emparelhados usando fMRI para mapear a resposta cerebral ao odor do etanol. Encontraram activação da amígdala/hipocampo direitos em resposta ao *craving* induzido pela pista no grupo dos alcoólicos apenas antes do tratamento, sugerindo os aspectos emocionais do *craving*. Resultados semelhantes foram obtidos para o *craving* à cocaína (Bonson *et al.*, 2002; Childress *et al.*, 1999) e para pistas de tabaco em fumadores (Due *et al.*, 2000).

Durante o envelhecimento normal a amígdala perde 2% do seu volume e esta perda atinge os 25,8% nos doentes com doença de Alzheimer (DAIz) (Herzog & Kemper, 1980). Jamada e Mehraein (1968, citado em Chow & Cummings, 2000) encontraram maior densidade de tranças neurofibrilares e placas na amígdala do que noutras áreas neocorticais de cérebros com DAIz. O estadiamento do desenvolvimento longitudinal de tranças neurofibrilares em casos de DAIz demonstrou que a amígdala é a segunda região, a seguir ao córtex entorrinal, a desenvolver tranças neurofibrilares isoladas (Braak e Braak, 1991). De acordo com a hipótese colinérgica da DAIz a deficiência em acetilcolina do núcleo basal de Meynert desactivaria a amígdala (Chow & Cummings, 2000). A modulação pela noradrenalina da activação colinérgica também seria deficiente dado que no locus coeruleus também há perda neuronal na DAIz (Forstl *et al.*, 1992). Estes resultados anatomopatológicos trouxeram esperança relativamente ao papel dos estudos de imagem na detecção precoce da DAIz, mas a MRI não tem sido útil embora tenha demonstrado reduções no volume da amígdala (e.g. Mori *et al.*, 1999). Pelo contrário, estudos de neuroimagem funcional com PET poderão ser úteis para correlacionar alterações cognitivas e comportamentais na DAIz com a actividade da amígdala.

O autismo também tem sido associado à disfunção da amígdala (e.g. deLong, 1992; Brothers, 1989). As anomalias sociais-emocionais frequentemente começam nos primeiros anos de vida e persistem até à idade adulta. Há relatos que mostram que as pessoas com autismo estão limitadas no reconhecimento de faces e na identificação da expressão facial das emoções (Hobson *et al.*, 1988; MacDonald *et al.*, 1989). Resultados semelhantes foram obtidos em humanos sem autismo mas com lesões da amígdala (Adolphs *et al.*, 1994). Assim, a disfunção da amígdala bem como das outras estruturas neuronais que suportam a cognição social, constitui uma proposta importante para a investigação do autismo (e.g. Baron-Cohen *et al.*, 1999).

## **Amígdala e Cocaína**

### **Aspectos fisiológicos da diáda amígdala-cocaína**

A cocaína é um alcalóide extraído da planta *Erythroxylon coca* (Johanson & Fischman, 1989). O seu efeito biológico resulta da inibição dos três transportadores de monoaminas (dopamina, serotonina e noradrenalina), potenciando a transmissão monoaminérgica (Cregler & Mark, 1986; Nunes & Rosecan, 1987; Johanson & Fischman, 1989; Volpe, 1992). O sistema dopaminérgico é o alvo farmacológico preferencial da cocaína (Johanson & Fischman, 1989). O sistema mesocorticolímbico da dopamina (DA), que projecta maciçamente para a amígdala estendida, parece ser o substrato mais importante para os efeitos da cocaína, quer os que condicionam estimulação psicomotora (Kelly & Iversen, 1976), quer os referentes às acções de reforço (Ettenberg *et al.*, 1982).

Baumann *et al.* (1993) estudaram o efeito da administração crónica de cocaína a ratos na síntese de DA e serotonina (5-HT) em várias áreas cerebrais implicadas no reforço às drogas e verificaram que a administração de cocaína em ratos não sujeitos previamente a cocaína resultou numa supressão dramática da síntese de DA e 5-HT em todas as regiões estudadas incluindo a amígdala basilateral, enquanto que nos ratos sujeitos a administração crónica de cocaína não houve alteração significativa na síntese de DA ou 5-HT, sugerindo que a administração crónica de cocaína não é neurotóxica e/ou que provoca uma dessensibilização nos mecanismos que regulam a supressão da síntese de monoaminas induzida pela cocaína.

O bloqueio dos receptores D1 da DA no núcleo central da amígdala do rato, através da microinjecção de SCH 23390 (antagonista dos receptores D1 da DA) aumentou, de forma dependente da dose, a taxa de auto-administração de cocaína, sendo consistente com atenuação parcial dos efeitos da cocaína nestas condições, o que sugere que os receptores D1 na amígdala podem constituir importante substrato para as acções de reforço da cocaína (Caine *et al.*, 1995).

A administração de cocaína após treino aumentou, de forma dependente da dose, a capacidade de retenção numa tarefa de evitamento por inibição numa tentativa. Este efeito foi bloqueado por lesões da amígdala, que os autores sugerem dever-se a bloqueio das aferências dopaminérgicas da amígdala bem como ao envolvimento da noradrenalina e interacção da DA com outros neurotransmissores (Cestari *et al.*, 1996).

Hurd *et al.* (1997) demonstraram *in vivo* importante papel da DA, provavelmente por acção nos receptores D1 da amígdala, no comportamento de auto-administração de cocaína no rato.

A microinfusão de cocaína, bem como do agonista da DA SKF 38393 na amígdala central, aumentaram, de forma dependente da dose, a resposta proliferativa

dos esplenócitos à concanavilina A, enquanto que a microinfusão do antagonista da dopamina SCH 23390 na amígdala central, reduz de forma dependente da dose a resposta proliferativa dos esplenócitos à concanavilina A. Estes dados sugerem que a cocaína pode produzir alguns dos seus efeitos no sistema imunitário através da activação da neurotransmissão da DA cerebral e que a amígdala central poderá representar uma estrutura importante para mediar a proliferação das células T induzida pela cocaína (Caroleo *et al.*, 1998).

A amígdala possui receptores de tipo 3 para a 5-HT (5-HT<sub>3R</sub>) nos núcleos cortical, lateral, basal e basal acessório (Morales *et al.*, 1998) e a aplicação de antagonistas deste receptor na amígdala aumentou a interacção social em ratos (Higgins *et al.*, 1991); enquanto que a administração sistémica tem efeitos ansiolíticos, sugerindo papel dos neurónios da amígdala que possuem estes receptores na génese da ansiedade (Costal *et al.*, 1990; Nevins & Anthony, 1994). Cunningham *et al.* (1992) verificaram que a sensibilização à cocaína parece estar relacionada também com alterações na autorregulação do metabolismo da 5-HT secundárias à alteração da recaptção. Zeigler *et al.* (1991) verificaram que os ratos expostos de forma contínua durante 5 dias a cocaína apresentavam, 30 dias após cessar a exposição, aumento da ligação (3H)flunitrazepam, (marca os receptores GABA<sub>A</sub>) e diminuição da ligação (3H)QNB (quinuclidinyl benzilate) (marca os receptores colinérgicos muscarínicos) na amígdala. Verificaram ainda que havia uma diminuição da ligação (3H)ketanserin (marca os receptores de tipo 2 para a 5-HT) na amígdala relativamente aos ratos que receberam cocaína por injeção diária durante 5 dias.

Quer a administração aguda quer crónica de cocaína em ratos aumenta o nível de beta-endorfinas circulantes (Forman & Estilow, 1988; Moldow & Fischman, 1987) e os antagonistas opióides podem bloquear os efeitos de recompensa da cocaína (Bain &

Kornetski, 1987; Houdi *et al.*, 1989). A neurotransmissão dopaminérgica mesolímbica é modulada pelos opióides endógenos que actuam nos receptores opióides  $\mu$  e  $\kappa$  regulando a libertação de DA nos centros de recompensa do estriado (Di Chiara & Imperato, 1988; Spanagel *et al.*, 1990; Spanagel *et al.*, 1992). Contudo, o sistema dopaminérgico nigroestriado também modula o sistema opióide pois o efeito inicial dos agonistas dopaminérgicos levou à libertação de peptídeos opióides (Li *et al.*, 1988; Taylor *et al.*, 1991; Trujillo *et al.*, 1990). A auto-administração de cocaína em ratos é atenuada pelo tratamento prévio com o antagonista opióide naltrexona (Corrigal & Coen, 1991). A administração repetida de cocaína em cobaias diminuiu o número de receptores opióides  $\mu$  na amígdala (Itzhak, 1993) e quando esta administração é efectuada em ratos produz uma hiper-regulação dos receptores  $\mu$  na amígdala basilar (Unterwald *et al.*, 1992; Unterwald *et al.*, 1994). Também foi verificado aumento do mRNA para os receptores opióides  $\mu$  na amígdala após a administração aguda, maciça, e única de cocaína (Yuferov *et al.*, 1999). Estes dados sugerem a participação do sistema opióide da amígdala na expressão comportamental induzida pela cocaína.

Douglass *et al.* (1995) identificaram um peptídeo cujo gene se altera especificamente no estriado após administração de cocaína e anfetamina. A expressão do RNAm para este peptídeo mostrou distribuição restrita a certas regiões cerebrais que incluem o núcleo accumbens, a amígdala, o hipocampo e hipotálamo (Couceyro *et al.*, 1997; Douglass *et al.*, 1995), sendo-lhe atribuído papel como neurotransmissor (Hurd *et al.*, 1999). Koylu *et al.* (1998) encontraram expressão do fragmento peptídico 106-129 do transcripto regulado pela cocaína e anfetamina (CART), como tem sido designado, na amígdala basilar e núcleo accumbens sugerindo papel na recompensa e reforço induzidos por drogas. Foi observado aumento da expressão do mRNA do CART na amígdala central em ratos machos após administração aguda e maciça de cocaína

(Fagergren & Hurd, 1999). Vrang *et al.* (1999) encontraram indução de imunorreatividade c-Fos no núcleo central da amígdala em resposta à administração intracerebroventricular de um peptídeo CART (42-89). Hurd & Fagergren (2000) estudaram a expressão do mRNA do CART em cérebros humanos normais *post-mortem* e encontraram níveis elevados de expressão na amígdala (núcleos central, cortical e medial). Os autores estudaram também amostras de cérebro de rato e encontraram expressão semelhante na amígdala.

A administração repetida de cocaína (30 mg/Kg/dia i.p. durante 10 dias) em ratos aumenta a libertação do factor libertador de corticotropina (CRF) induzida pela cocaína (10 mg/Kg i.p.) no núcleo central da amígdala. A sensibilização da libertação de CRF pode ter papel importante no fenómeno de sensibilização induzido por psicoestimulantes (Richter *et al.*, 1995). Ambrosio *et al.* (1997) verificaram que a administração de cocaína a ratos durante 10 dias, por via intravenosa, num regime parecido com um paradigma de auto-administração (1 mg/kg cada 12 min. durante 2 h cada dia), induziu um nível de lugares de fixação ao receptor 1 do CRF, 31% inferior no grupo da cocaína quando comparado com o de controlo, no núcleo basilateral da amígdala apenas nas amostras de tecido colhidas 15 min. após a última infusão de cocaína e não naquelas colhidas 10 dias depois. Estes resultados sugerem que mecanismos neuroendócrinos e não neuroendócrinos associados aos receptores 1 do CRF não contribuirão para os efeitos de abstinência a longo prazo. No entanto, existem estudos que mostram que a abstinência à cocaína activa os neurónios do CRF na amígdala entre a 11<sup>a</sup> e a 12:<sup>a</sup> horas após a exposição a esta droga (Richter & Weiss, 1999).

Lee *et al.* (1991) verificaram que a sensibilização comportamental induzida pela cocaína não está relacionada com alterações dos neurónios GABA na amígdala lateral e basilateral.

A administração única de cocaína por via intraperitoneal a ratos aumenta 1 hora depois os níveis de histamina e o *turnover* da histamina na amígdala, bem como a actividade de correr numa roda. O tratamento prévio (30 min.) com L-histidina inibe o aumento da actividade de correr na roda induzido pela cocaína de forma dependente da dose (Ito *et al.*, 1997).

A administração de cocaína a ratos quer em ambiente familiar, quer em ambiente estranho, induz a expressão de mRNA do c-Fos na amígdala lateral e basilateral e a administração em ambiente estranho induz significativamente essa expressão comparando com a administração em ambiente familiar, sugerindo que o contexto em que a cocaína é administrada altera de forma diferenciada uma estrutura que tem sido relacionada com o reforço a drogas e com o comportamento emocional (Day *et al.*, 2001). A administração de cocaína de forma não condicionada aumentou a expressão Fos no núcleo central da amígdala, enquanto que a exposição a ambiente associado à cocaína aumentou a expressão Fos na amígdala basilateral (Baker *et al.*, 1999). Também a administração crónica de cocaína a ratos adultos durante 14 dias reduziu significativamente, mas só a partir do décimo dia, a taxa regional do metabolismo da glicose na amígdala basilateral e central, quando confrontado com a administração de soro fisiológico (Hammer, Jr & Cooke, 1994).

## Aspectos comportamentais da diada amígdala-cocaína

Está demonstrado que a administração precoce de cocaína a ratos induz aumento dos movimentos locomotores e cruzamento de matrizes até aos 21 dias de vida bem como aumento dos comportamentos de *grooming* até aos 35 dias de vida (Spear & Brick, 1979), e o aparecimento de comportamentos de tipo ansioso (Blanchard *et al.*, 1998; Blanchard & Blanchard, 1999; Herbert *et al.*, 1999; Spear, 1997), aumento de comportamentos de fuga e defesa, de imobilidade (Blanchard *et al.*, 1998), de hipersensibilidade (Bilitzke & Church, 1992) e comportamentos de medo (Blanchard & Blanchard, 1999), que caracterizam os estados depressivos. As respostas comportamentais precoces à exposição à cocaína podem indicar que a imaturidade dos sistemas neurotransmissores que as justificam são capazes de ser estimulados de modo a exercerem algum efeito no comportamento (Spear & Brick, 1979).

Tendo, também, sido salientado o envolvimento da amígdala na aprendizagem envolvendo estímulos naturais apetitivos e aversivos (Everitt *et al.*, 1989; Gaffan *et al.*, 1993; Schafe & Bernstein, 1996), é plausível que os mesmos mecanismos se apliquem a outros estímulos reforçadores como são as drogas de abuso.

Grande parte dos estudos de comportamento relativos aos efeitos da cocaína relacionados com a amígdala usam o paradigma da auto-administração de cocaína (e.g. Ciccocioppo *et al.*, 2001; Homberg *et al.*, 2002; Kantak *et al.*, 2002; Pilla *et al.* 1999; Weiss *et al.*, 2000b; Whitelaw *et al.*, 1996); nestes modelos, os ratos são treinados para auto-administrarem cocaína em que se associa um emparelhamento com EC luminoso. Neste paradigma experimental o EC suporta a resposta por um período de tempo anterior à exposição do psicoestimulante, dando origem à procura de droga que, contudo, não é afectada pelos efeitos condicionados pelas suas características farmacológicas. Whitelaw *et al.* (1996) verificaram, noutro modelo experimental, que

ratos com lesão excitotóxica da amígdala basilar não adquiriram níveis adequados de resposta mas, contudo, não foi inibida a possibilidade de auto-administração de cocaína. Assim, a integridade desta parte da amígdala é crucial para a aquisição do comportamento de procura de cocaína na presença de pistas associadas à droga; contudo não parece ter igual importância no que se refere aos efeitos reforçadores primários da cocaína (Meil & See, 1997; Whitelaw *et al.*, 1996). Estas observações apoiam a hipótese de que a amígdala basilar é essencial para que o EC desencadeie a representação afectiva do reforçador primário, o que também corrobora outros dados relativos ao condicionamento apetitivo em geral (Burns *et al.*, 1993; Cador *et al.*, 1989; Everitt *et al.*, 1989; Hatfield *et al.*, 1996; Whitelaw *et al.*, 1996). A amígdala basilar também foi implicada na explicação da preferência condicionada a um lugar associado à cocaína (Brown & Fibiger, 1993). A exposição a ambiente associado à cocaína induz a expressão de *c-fos* na amígdala, entre outras estruturas corticais límbicas (Brown *et al.*, 1992; Ciccocioppo *et al.*, 2001). Contudo, é de salientar que outras respostas não são afectadas por lesão da amígdala basilar, de que são exemplos a actividade locomotora condicionada induzida pela exposição a ambiente associado à cocaína, a resposta locomotora não condicionada à cocaína (Brown & Fibiger, 1993), e a sensibilização da actividade locomotora às drogas psicoestimulantes (e.g. Pierce *et al.*, 1998). Acresce que, outros estudos, onde é efectuada a manipulação do sistema dopaminérgico da amígdala têm revelado que lesões induzidas pela 6-hidroxidopamina apenas provocam efeitos discretos na auto-administração de cocaína (McGregor *et al.*, 1994). Contudo, as experiências que utilizam infusões de antagonistas do receptor D1 da dopamina aumentam a auto-administração de cocaína (Caine *et al.*, 1995; Hurd *et al.*, 1997), enquanto que o BP 897, agonista parcial do receptor D3 da dopamina, reduz selectivamente a resposta aos estímulos condicionados à cocaína (Pilla *et al.*, 1999). É

possível adiantar que o núcleo central da amígdala seja responsável pelos efeitos obtidos após a manipulação dopaminérgica, uma vez que é a área nuclear que recebe a maior projecção dopaminérgica. Estes achados, enquadram-se na concepção da amígdala estendida (“extended amygdala”) que tem sido apontada como a estrutura mediadora dos efeitos reforçadores das drogas de uso ilícito (Koob, 1999); contudo, pode ainda reflectir a influência do núcleo central da amígdala na transmissão dopaminérgica (Schulteis *et al.*, 2000).

O teste de natação forçada (TNF) é um paradigma comportamental introduzido por Porsolt *et al.* (1977) muito usado como predictor de actividade antidepressora nos roedores e no estudo do *stress* em animais (Bilitzke & Church, 1992; Connor *et al.*, 1997). Neste paradigma, o rato é forçado a nadar num cilindro de água a 25 °C durante 15 min. e 24:00h depois durante 5 min.. Na segunda sessão do teste, os ratos rapidamente adquirem uma postura imóvel, fazendo apenas os movimentos necessários para manter a cabeça fora da água, indicando um estado de desespero. A administração crónica e subcrónica de tratamento antidepressor diminui a imobilidade induzida no TNF (Borsini & Meli, 1988). Duncan *et al.* (1986) verificaram que a infusão de imipramina e pargilina na amígdala produziu respostas comportamentais semelhantes à administração intraperitoneal das mesmas substâncias e que essas respostas eram dependentes muito selectivamente dos núcleos central, basal e/ou lateral da amígdala. A resposta obtida no TNF após administração por via sistémica de iprindole, anfetamina e atropina não foi atingida quando estas substâncias foram administradas directamente na amígdala. Estes resultados indicam que a amígdala é o alvo da acção de certos antidepressores nas respostas ao TNF.

Connor *et al.* (1997), estudando as alterações neuroquímicas induzidas pelo TNF, verificaram um aumento do *turnover* da serotonina na amígdala 60 e 90 min. após a segunda sessão, mas não aos 120 min.. Este aumento do *turnover* da serotonina na amígdala em resposta ao TNF foi atenuado pela administração intraperitoneal prévia de reboxetina, um antidepressor inibidor selectivo da recaptção de noradrenalina (Conner *et al.*, 1999). Num outro trabalho, Connor *et al.* (2000), estudaram o efeito do tratamento subcrónico com desipramina, paroxetina e venlafaxina na exposição do rato ao TNF, e verificaram que só a desipramina diminuiu a imobilidade, embora todos os antidepressores estudados tivessem atenuado o aumento do *turnover* da serotonina na amígdala. Este estudo sugere que outros mecanismos neuroquímicos independentes do aumento da actividade serotoninérgica estão na base da normalização das respostas comportamentais no TNF. Por outro lado, sabe-se que a própria situação de natação forçada reduz os níveis de 5-HT na amígdala o que pode estar relacionado com a capacidade de os antidepressores alterarem selectivamente o desempenho comportamental no TNF (Kirby *et al.*, 1995).

Duncan *et al.* (1993) observaram indução importante de imunoreactividade Fos-*like* no núcleo central da amígdala após tratamento de ratos com imipramina.

Num estudo de Daenen *et al.* (2001) os ratos submetidos a lesão da amígdala no DPN7 apresentaram diminuição da imobilidade no TNF relativamente aos controlos. Já em 1992, Bilitzke e Church demonstraram que ratos no DPN120 que tinham recebido cocaína durante a gestação estavam menos imóveis, no TNF, sugerindo que a exposição pré-natal de cocaína afecta adversamente o comportamento em situações de *stress* ou provocadoras de medo.

O teste do *open field* foi introduzido por Calvin Hall em 1932 (Walsh & Cummins, 1976) e consiste em medir os comportamentos provocados pela colocação dum sujeito num espaço aberto novo de onde a fuga é impedida por uma parede limitativa. É um teste muito usado pois requer uma aparelhagem simples, permite a medição fácil e rápida de comportamentos bem definidos e a interpretação destes comportamentos é amplamente aceite (Walsh & Cummins, 1976). Segundo alguns autores (Walsh & Cummins, 1976) os comportamentos provocados dependem da interacção do animal com uma variedade de factores: 1) a estimulação resultante da retirada do ambiente familiar da gaiola; 2) a estimulação que envolve a transferência do animal para o *open-field*; 3) a exposição ao ambiente do teste, que consiste no próprio *open-field* e seus arredores; e 4) toda a experiência prévia da situação de teste. No caso de serem usadas várias sessões de testes há também a considerar a estimulação prévia que envolve a remoção do animal da situação de teste e a sua transferência e nova exposição ao ambiente familiar da gaiola. No caso de serem usadas várias sessões estamos também a medir a habituação e aprendizagem em resposta ao ambiente do teste (Walsh & Cummins, 1976). Têm sido extensivamente investigadas cinco medidas do *open-field*: a latência para a mobilização, a actividade locomotora e a penetração ao centro são principalmente índices de descarga motora; a defecação é principalmente um índice de equilíbrio autonómico; urinar no *open-field* é principalmente um índice de marcação do território (Royce, 1977). Os animais que demonstram pouca actividade motora (deambulação e levantar), elevados níveis de defecação e baixos níveis de *grooming* são chamados por alguns investigadores de “ratos emocionais” (Walsh & Cummins, 1976; Royce, 1977). Ao contrário, os ratos com elevada actividade motora, níveis baixos de defecação e altos níveis de *grooming* são considerados “ratos não emocionais” (Walsh & Cummins, 1976; Royce, 1977). Recentemente, Daenen *et al.*

(2002) ao observarem no *open-field* ratos submetidos no DPN7 a lesão da amígdala verificaram que apresentavam estereotipias motoras.

Nos modelos de exposição pré-natal à cocaína, quando efectuada de forma intermitente, esta, aumenta significativamente a actividade no *open-field* dos ratos no DPN60 (Johns *et al.*, 1992). A administração pré-natal de cocaína nas fases média e tardia da gestação provocou nos machos níveis mais elevados do comportamento de levantar do que nas fêmeas e inibiu significativamente o comportamento sexual nas fêmeas ao contrário dos machos, nos quais se verificou facilitação do comportamento sexual (Vathy *et al.*, 1993). Contudo, a exposição de ratos adultos a injeção de cocaína diária (durante 5 dias) provocou aumento da actividade no *open-field* quando testados 30 dias depois de terminada a exposição, relativamente ao grupo controlo, enquanto que os que receberam cocaína continuamente foram menos activos (Zeigler *et al.*, 1991). Neste mesmo modelo foi observado aumento da actividade de levantar bem como do *grooming* mútuo no *open-field* social quando os animais expostos à cocaína são testados 30 dias depois de terminada a exposição, relativamente ao grupo controlo (Zeigler *et al.*, 1991).

Trabalhos de investigação têm sugerido que o núcleo medial da amígdala está envolvido nos processos de aprendizagem social que modulam os comportamentos agonísticos, quer porque a lesão deste núcleo resultou na impossibilidade completa no evitamento condicionado a um oponente dominante (Luiten *et al.*, 1985), quer porque reduziu o comportamento agressivo depois de adquirida experiência em interações agressivas (Vochtelo & Koolhaas, 1987). O núcleo medial da amígdala também tem papel importante no comportamento copulatório, quer nos machos quer nas fêmeas, dos

roedores (Harris & Sachs, 1975; Lehman *et al.*, 1980; Pfaus *et al.*, 1993; Rajendren & Moss, 1993).

File desenvolveu no seu laboratório um teste de interacção social usado para avaliar o impacto ansiolítico de lesões, drogas, peptídeos, e estímulos ansiogénicos naturais como o odor dum predador (e.g. File, 1980; File, 1993; File & Hyde, 1978). O índice de ansiedade é calculado com base no tempo dispendido em interacção social, sendo considerado que as pontuações mais baixas se associam a um animal mais ansioso. File e colaboradores têm também usado este teste para compreender melhor o papel dos mecanismos serotoninérgicos, incluindo os da amígdala, na ansiedade do animal (File *et al.*, 1996; Gonzalez *et al.*, 1996). Sajdyk e colaboradores também têm usado o teste de interacção social para estudar outros mecanismos mediadores da ansiedade na amígdala, particularmente na amígdala basilateral (e.g. Sajdyk & Gehlert, 2000; Sajdyk & Shekhar, 2000; Sajdyk & Shekhar, 1997; Sajdyk *et al.*, 2002). Estudos (Johns *et al.* 1998; Wood e Spear, 1998) de exposição pré-natal à cocaína têm demonstrado que os ratos jovens têm alteração do comportamento social que inclui aumento da agressividade. Outros estudos (Wood *et al.*, 1994; Wood *et al.*, 1995) encontraram diminuição dos níveis de brincadeira com maior submissão e menor probabilidade de solicitar brincadeira do que os animais não expostos.

### **Díada amígdala-cocaína no Homem**

A cocaína é uma droga de abuso psicoestimulante (McKim, 1991) cujo consumo tem aumentado no ocidente, incluindo em Portugal (Balsa *et al.*, 2001; Musto, 1989) e que produz elevação do humor (euforia), sensação de aumento da auto-estima e do bem-estar psicológico geral, aumento da acuidade mental e das capacidades físicas,

diminuindo o apetite e a necessidade de sono (Jaffe, 1990). Em doses euforizantes a cocaína reduz o metabolismo cerebral incluindo na amígdala (London *et al.*, 1990).

O abuso crónico de cocaína pode levar a perturbações profundas da personalidade e do comportamento podendo, se prolongado, produzir um estado psicótico semelhante à esquizofrenia paranóide (Post, 1975). O consumo repetido mas intermitente desta droga leva a sensibilização persistente dos seus efeitos de estimulação locomotora e ao desencadear de estereotípias (Kalivas *et al.*, 1988; Post, 1976). No início, a administração de cocaína pode ser tolerada com um mínimo de ansiedade, mas quando efectuada repetidamente pode levar ao aparecimento de componentes mais ansiogénicos e disfóricos, podendo mesmo instalar-se um quadro de ataques de pânico relacionados com a cocaína após cada administração, sendo sugerido para este fenómeno uma progressão de tipo *kindling* (Post *et al.*, 1995b).

A apresentação de estímulos associados ao uso de cocaína tem demonstrado a possibilidade de desencadear *craving* em humanos dependentes de cocaína (Ehrman *et al.*, 1992) e a amígdala, entre outras áreas cerebrais, mostra aumento da actividade metabólica durante a apresentação desses estímulos (Bonson *et al.*, 2002; Childress *et al.*, 1999; Grant *et al.*, 1996).

As vítimas de *overdose* de cocaína que apresentaram *delirium* pré-terminal com agitação apresentaram uma hiper-regulação selectiva dos receptores opióides  $\kappa$  na amígdala (Mash & Staley, 1999). No cérebro humano há expressão preferencial do mRNA para a prodinorfina nas áreas relacionadas com o sistema límbico incluindo a amígdala sugerindo papel importante do sistema da dinorfina no comportamento emocional (Hurd, 1996). Têm sido efectuados alguns estudos de investigação que demonstram possível papel dos agonistas opióides dos receptores  $\kappa$  no tratamento da

dependência à cocaína, principalmente aqueles que tiverem também actividade nos receptores  $\mu$  (Mello & Negus, 2000).

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

## Objectivos

No contexto da introdução apresentada a finalidade deste trabalho consiste em avaliar os efeitos da exposição à cocaína no padrão do desenvolvimento do SNC, num modelo de neurotoxicologia experimental bem caracterizado e numa área de importante expressão funcional em termos neuropsicológicos: a amígdala. Nesta contextualização, esta finalidade enquadra-se no âmbito da temática subjacente ao programa do Mestrado de Psiquiatria e Saúde Mental da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto na perspectiva dos fundamentos biológicos e comportamentais subjacentes à problemática das perturbações de dependência de substâncias.

Para a consecussão desta finalidade, são objectivos específicos

- 1) Estudo da expressão comportamental nos testes de TNF, actividade no *open-field* e interações sociais.
- 2) Estudo morfológico da amígdala.
- 3) Estudo da expressão dos neuromediadores DA e 5-HT na amígdala.

Pretende-se assim contribuir para o avanço no conhecimento da expressão dos efeitos da exposição à cocaína durante fases de desenvolvimento precoce do SNC do homem pela possibilidade de traçar homologias com o modelo animal no que poderá estar dependente do papel da amígdala.

## **Material e Métodos**

Neste estudo usaram-se ninhadas de ratos da estirpe Wistar, expostas à cocaína desde o 1º dia de vida, e controlos aos quais se administrou soro fisiológico. Cada rato foi estudado do ponto de vista comportamental com os testes descritos adiante e ao fim de 30 dias de vida foram sacrificados e os cérebros tratados para estudo morfológico, imunocitoquímico e neuroquímico da amígdala.

## **Modelo Animal**

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

## Testes Comportamentais

### Teste de natação forçada (“forced swim test”)

Foi usado o método descrito por Porsolt *et al.* (1977) com algumas modificações. Originalmente, este método consiste em colocar ratos individualmente num cilindro vertical de *plexiglass* (altura de 40 cm e diâmetro de 18 cm) com 15 cm de água mantida à temperatura de 25 °C. Depois de estarem 15 min. no cilindro os ratos são retirados e são secos durante 15 min. numa cabina de calor (32 °C) antes de voltarem para as suas gaiolas individuais. Vinte e quatro horas depois os ratos são recolocados no cilindro onde é medida a duração total de imobilidade num teste de 5 min. Os ratos submetidos a este procedimento ficaram imóveis durante 75% do tempo de duração do teste.

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

### **Actividade no *open-field***

A actividade no *open-field* (San Diego Instruments) (Figura 1. b) foi registada para as idades DPN14, 21 e 30 em 3 sessões por idade de 15 minutos cada, 5 horas a seguir à primeira injeção diária. Foram testados 40 ratos do grupo exposto à cocaína e 40 do grupo controlo. Para avaliar a actividade correspondente à idade DPN14 e DPN21 os ratos foram testados no próprio dia e nos dois dias seguintes. Para registar a actividade correspondente ao DPN30 os ratos foram testados no próprio dia e nos dois dias anteriores. Foram determinados os seguintes parâmetros: comportamento de se pôr de pé e actividade no centro e na periferia. A soma destes comportamentos foi considerada como a actividade global. A arena do *open field* foi limpa antes de cada animal ser testado e foi considerado um período de 2 minutos de adaptação antes do início das contagens.

### **Interacções sociais**

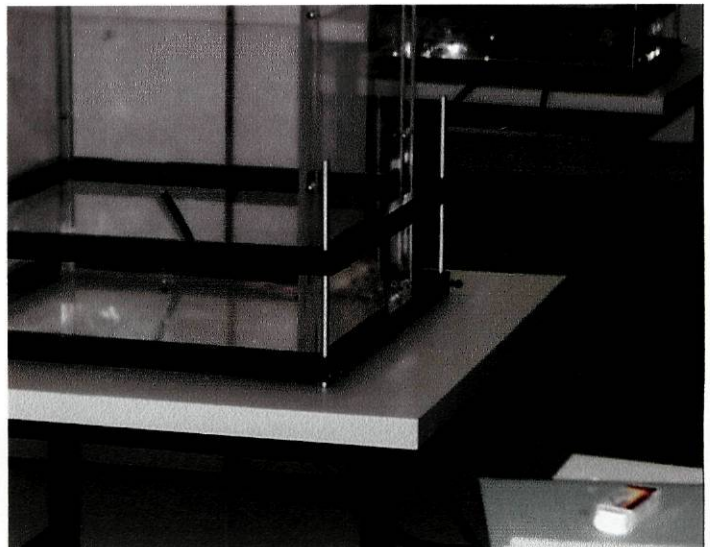
A partir do DPN21 os ratos foram filmados em grupos de quatro provenientes da mesma ninhada, para apreciação das interacções sociais. No primeiro dia juntaram-se quatro machos, no segundo quatro fêmeas e no terceiro dois machos e duas fêmeas e assim sucessivamente até ao DPN29. Foram colocados numa caixa branca de plástico com serrim com 40 cm de altura, 60 cm de comprimento e 53 cm de largura, com uma luz infravermelha de 100W a uma distância de 120 cm da base da caixa em altura (Figura 1. c). As sessões foram gravadas com câmara de vídeo colocada a 116 cm de altura dos ratos. Tiveram a duração de 1 hora, com início entre as 17:00h e as 18:00h, antes da 2ª injeção diária. No presente trabalho foram utilizados, para análise das interacções sociais, os primeiros 15 min. do filme efectuado no DPN29 em que interagiram dois machos e duas fêmeas de cada ninhada. Foram analisadas 5 ninhadas, 3

de ratos expostos à cocaína e 2 de ratos controlo. A análise dos dados foi feita com o Observer 4.0 (Noldus, Information Technology) e as interações sociais foram pontuadas pela frequência. Foram definidas as seguintes categorias: boxe, luta, ataque, perseguição, postura erecta ofensiva, *grooming* agressivo, postura de ameaça, morder, pontapear, empurrar, postura erecta defensiva, postura de submissão, postura erecta de submissão, fuga, petrificado, rastejar por baixo e cheirar.

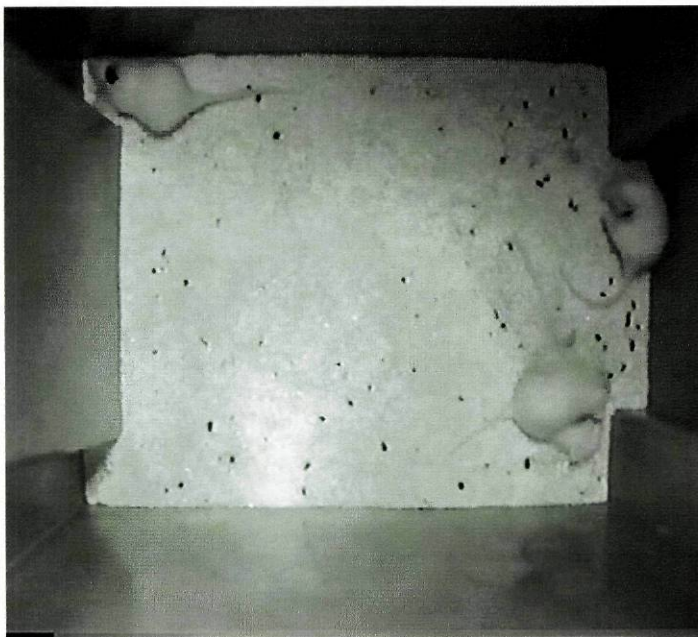
Figura 1. Testes comportamentais. a) TNF; b) *open-field*; c) interações sociais.



a



b



c

## **Estudos Morfológicos**

### **Imunocitoquímica**

No DPN30, 2 machos e 2 fêmeas de cada ninhada foram anestesiados com solução de ketamina e acepromazina (500 µL/rato) e foram perfundidos por via intracardíaca com 150 a 250 ml duma solução fixadora de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4). De seguida, o cérebro foi cuidadosamente retirado e colocado durante 90 min. na mesma solução fixadora após o que foi mudado para uma solução de sacarose a 30% em tampão fosfato 0,1M para criopreservação. Depois de devidamente criopreservado o cérebro foi cortado num micrótomo de congelação em secções de 40 µm e estas seriadamente recolhidas para solução de PBS. As secções foram distribuídas pelos seguintes procedimentos: 1) técnica de Nissl modificada; 2) imunocoloração com anticorpo anti-TH; e 3) imunocoloração com anticorpo anti-5-HT.

### **Técnica de Nissl**

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

### **Expressão imunocitoquímica do anticorpo anti-TH**

As secções de cérebro foram lavadas com PBS, tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em PBS numa concentração de 3%, incubadas durante uma hora numa solução PBS 0,1M com soro normal de porco (DACO A/S, Denmark) e 0,3% de Triton X-100. Depois de lavadas, foram incubadas durante uma noite a 4 °C, em soro primário anti-TH (Affiniti Research Products Ltd.) (anticorpo de coelho policlonal purificado com afinidade anti-TH, a 1:2000 na solução anterior). Posteriormente as secções foram incubadas em anticorpo secundário (DACO A/S, Denmark) (imunoglobulina de porco isolada com afinidade à biotina para imunoglobulina de coelho), e depois tratadas com complexo ABC (complexo avidina-biotina) (Vector Laboratories) e reveladas com 3,3-diaminobenzidina (DAB). Finalmente, depois de lavadas, as secções foram montadas em lâminas gelatinadas, desidratadas e montadas com Histomount. A observação das lâminas foi efectuada com o microscópio óptico Olympus BX 50. Foram observadas secções correspondentes ao nível 29 do Atlas de Palkovits e Brownstein (1988), onde foi realizada a caracterização dos neurónios com expressão para o anticorpo anti-TH no núcleo central da amígdala e as fibras com a mesma expressão nos núcleos central e medial da amígdala, bem como as do grupo de núcleos basilateral.

### **Expressão imunocitoquímica do anticorpo anti-5-HT**

O procedimento foi semelhante ao anterior mas o anticorpo primário usado foi o que tem afinidade para a 5-HT (oferta do Professor J. Parnavelas, University College, Londres) a 1:15000 e a incubação decorreu durante 2 noites.

De cada animal foi seleccionada, por observação em microscópio óptico Olympus BX 50, uma secção correspondente ao nível 30 do atlas de Palkovits e Brownstein (1988), em que estivesse bem representada a amígdala basilateral. Em cada

secção foi considerada e discriminada a amígdala esquerda e a direita. A zona basilateral da amígdala foi então fotografada com ampliação de 10X com a câmara Olympus Camedia Digital C-2000Z e a imagem tratada com o programa de software Olympus DP-Soft de forma a delimitar e medir a área da amígdala basilateral onde foram contados os corpos celulares com expressão do anticorpo anti-5-HT, com recurso à observação no microscópio óptico para confirmação. O número de células foi expresso em células/mm<sup>2</sup> e foi efectuada para cada secção a média entre a amígdala direita e esquerda.

Relativamente à distribuição das fibras serotoninérgicas foi efectuada uma análise semi-quantitativa por observação directa ao microscópio óptico de toda a amígdala, direita e esquerda, nas duas secções seleccionadas. Foram consideradas 3 categorias: muitas fibras, poucas fibras e um nível intermédio.

## **Determinações Neuroquímicas**

No DPN30 2 machos e 2 fêmeas de cada ninhada foram decapitados e a amígdala dissecada (de acordo com o Atlas de Palkovits e Brownstein (1988)) de ambos os hemisférios cerebrais. As amígdalas esquerda e direita foram depois congeladas e armazenadas a -80 °C até serem usadas para as determinações. As concentrações de dopamina (DA), serotonina (5-HT), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) foram quantificadas por um método modificado de cromatografia líquida de alta resolução com detecção electroquímica (HPLC/EC) (Ali *et al.*, 1993) num sistema da Gilson Medical Electronics, Inc (Pump 307, Electrochemical Detector 142, Autoinjector 234 e 712 HPLC Controller Software versão 1.30). As

amígdalas dissecadas foram pesadas e diluídas em 300 µl de ácido perclórico a 0,2 N. O tecido foi desagregado por ultrasonificação e centrifugado (15000 g; 7 min.), o sobrenadante foi filtrado através do filtro Costar micro centrifuge (0.2 µm) e 50 µl foram injectados no sistema HPLC/EC para separação da DA, da 5-HT e dos seus metabolitos. A razão entre o DOPAC e a DA foi determinada para cada animal e usada como índice da taxa de *turnover* da DA. A razão entre o 5-HIAA e a 5-HT foi usada como índice da taxa de *turnover* da 5-HT.

## **Análise Estatística**

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

## **Resultados**

## Testes Comportamentais

### Teste de natação forçada

O Quadro 1 mostra as médias, os desvios-padrão, e as diferenças obtidas, relativamente à 1ª sessão do teste de natação forçada, entre os grupos de controlo e de animais expostos à cocaína, para o tempo de duração das categorias comportamentais consideradas: natação rápida, natação lenta, braçadas, boiar, mergulhar e mergulhar a cabeça. Verifica-se que os ratos do grupo exposto à cocaína passaram menos tempo em natação rápida e em natação lenta do que os ratos do grupo controlo. O Quadro 2 mostra as médias, os desvios-padrão, e as diferenças, relativamente à 2ª sessão do teste para a duração das mesmas categorias. Verifica-se que os ratos do grupo de animais expostos à cocaína passam menos tempo em natação rápida e em natação lenta e mais tempo a boiar do que os do grupo de controlo.

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

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

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

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

Utilizou-se uma análise de variância que compara grupo (controlo vs. cocaína) X sessão (1ª sessão vs. 2ª sessão) e os resultados indicam que, para a categoria natação rápida, há uma diferença de grupo ( $F(1,30)=17,62$ ,  $p<0,001$ ), os ratos do grupo exposto à cocaína nadaram menos; há uma diferença entre sessões ( $F(1,30)=33,81$ ,  $p<0,000$ ), na 2ª sessão os ratos nadaram menos; e há uma interação entre o efeito de grupo e o de sessão ( $F(1,30)=4,84$ ,  $p<0,05$ ) (Figura 2), pelo facto de serem de diferentes grupos, têm comportamentos diferentes nas duas sessões a que foram submetidos. Para a categoria natação lenta apenas existe diferença entre grupo ( $F(1,30)=6,32$ ,  $p<0,05$ ), os ratos do grupo exposto à cocaína nadaram menos. Para a categoria braçadas apenas existe diferença entre sessões ( $F(1,30)=150,76$ ,  $p<0,000$ ), na 2ª sessão os ratos passaram menos tempo no comportamento de braçadas; acresce ainda a interação entre o efeito de grupo e o de sessão ( $F(1,30)=6,08$ ,  $p<0,05$ ) (Figura 3). Para a categoria boiar só há diferença de grupo ( $F(1,30)=5,27$ ,  $p<0,05$ ), os ratos do grupo exposto à cocaína boiaram mais; e entre sessões ( $F(1,30)=59,05$ ,  $p<0,000$ ), na 2ª sessão os ratos boiaram mais. Para

as categorias deslizar, mergulhar e mergulhar a cabeça não existem diferenças na análise de variância efectuada.

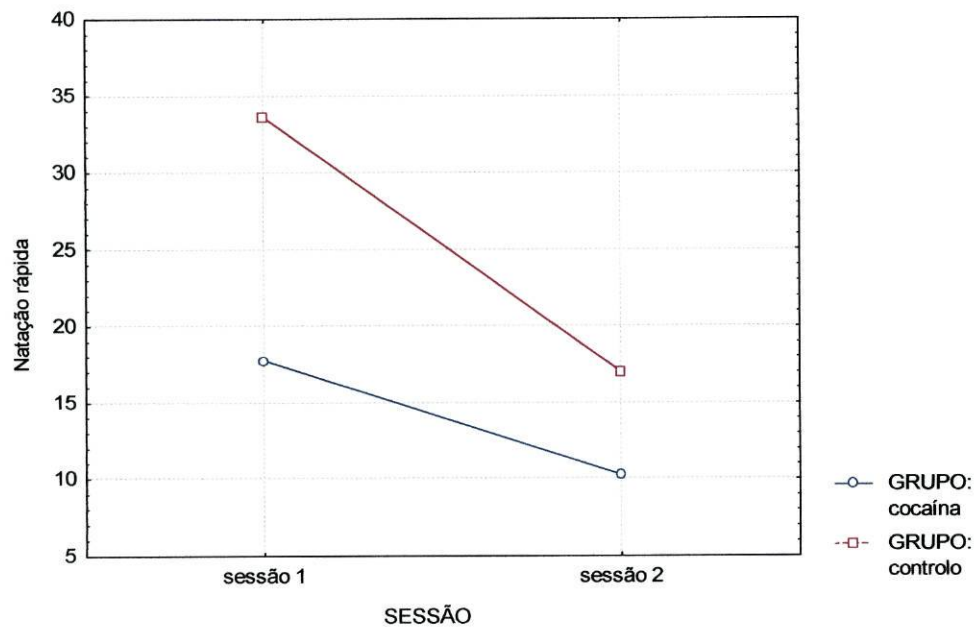


Figura 2. Tempo dispendido em natação rápida durante a primeira e a segunda sessões de testes.

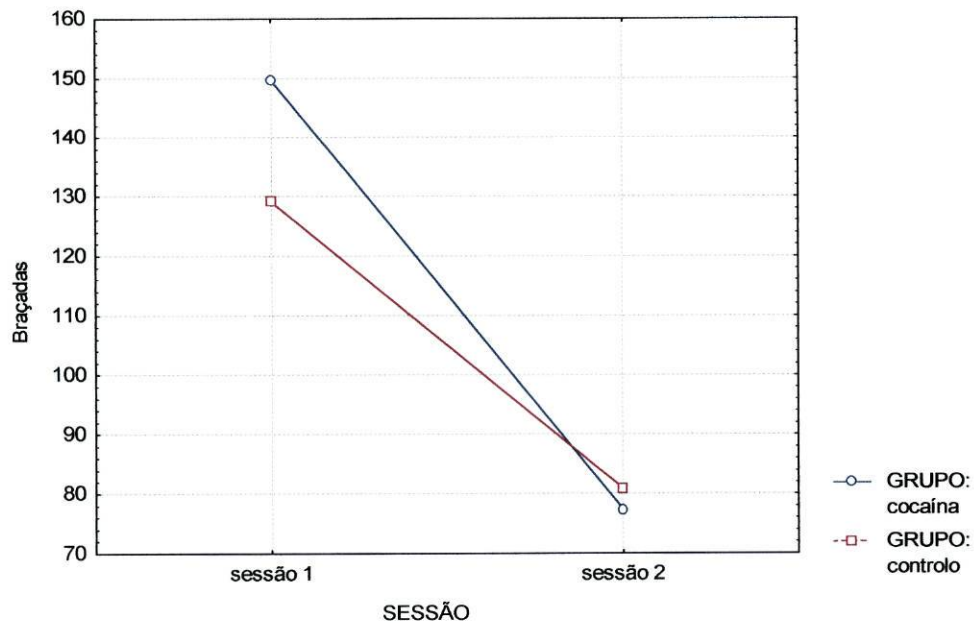


Figura 3. Tempo dispendido em braçadas durante a primeira e a segunda sessões de testes.

Foi efectuada uma análise de variância que compara grupo (controlo *vs.* cocaína) X sexo (fêmea *vs.* macho) X sessão (1ª sessão *vs.* 2ª sessão) para cada categoria de comportamento considerada no teste de natação forçada. Verificou-se apenas uma interacção entre grupo, sexo e sessão para categoria comportamental deslizar ( $F(1,28)=6,37$ ,  $p<0,05$ ), significando que os machos sujeitos a exposição à cocaína deslizarão mais na 2ª sessão.

### **Actividade no *Open Field***

Os Quadros 3, 4 e 5 mostram as médias, desvios-padrão e diferenças para os grupos de controlo e de animais expostos à cocaína relativamente à actividade no *open field* de acordo com as categorias de actividade consideradas: levantar, actividade no centro, actividade na periferia e a actividade global, para as 3 sessões correspondentes ao DPN14, DPN21 e DPN30, respectivamente. No DPN14 os ratos do grupo exposto à cocaína foram mais activos, nas 3 sessões, relativamente às categorias actividade na periferia e actividade global. No DPN21 os ratos do grupo exposto à cocaína foram mais activos, apenas na 1ª sessão, relativamente às categorias actividade na periferia e actividade global. No DPN30, os ratos do grupo exposto à cocaína foram menos activos, apenas na 1ª sessão, no que se refere à actividade de levantar e no centro.

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

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

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

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

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

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

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

#### DPN14

Para a categoria levantar existe apenas diferença entre sessões ( $F(2,156)=4,59$ ,  $p<0,05$ ). Para a categoria actividade no centro não existem diferenças. Para a categoria actividade na periferia há diferenças de grupo ( $F(1,78)=20,47$ ,  $p<0,000$ ), os ratos do grupo exposto à cocaína tiveram mais actividade na periferia, e diferenças de sessão ( $F(2,156)=15,68$ ,  $p<0,000$ ), houve decréscimo da actividade na periferia ao longo das 3 sessões. Para a categoria actividade global há diferenças de grupo ( $F(1,78)=16,64$ ,  $p<0,000$ ) (Figura 4) e diferenças de sessão ( $F(2,156)=13,72$ ,  $p<0,000$ ) (Figura 5).

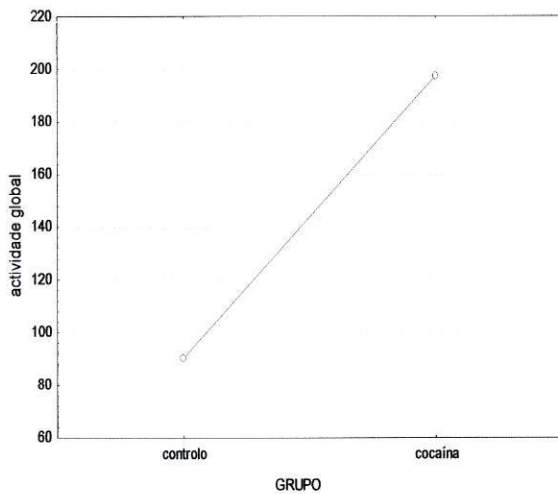


Figura 4. Actividade global no *open-field* no DPN14, efeito principal para o grupo (controle vs. cocaína) ( $F(1,78)=16,64$ ;  $p<0,000$ ).

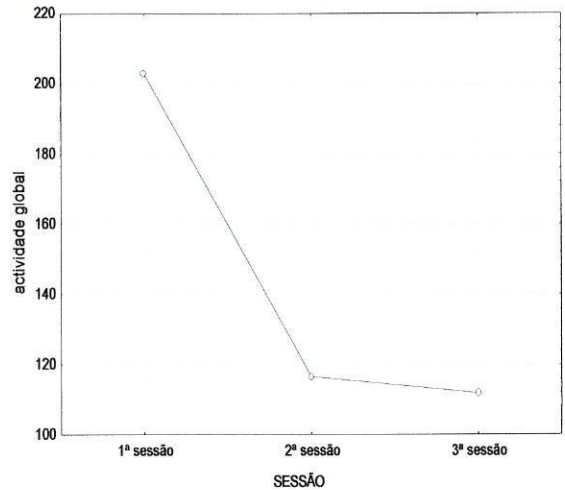


Figura 5. Actividade global no *open-field* no DPN14, efeito principal para a sessão (1ª sessão vs. 2ª sessão vs. 3ª sessão) ( $F(2,156)=13,72$ ;  $p<0,000$ ).

## DPN21

Para a categoria levantar há diferenças entre sessões ( $F(2,156)=11,27$ ,  $p<0,000$ ).

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

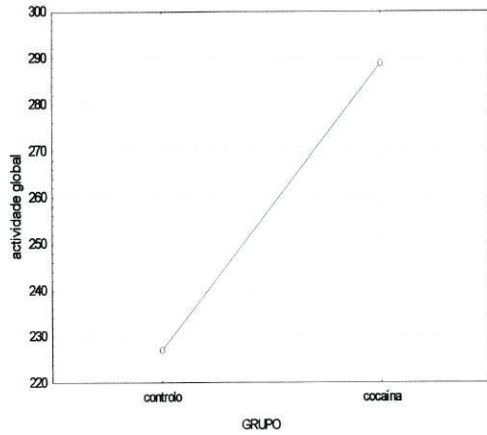


Figura 6. Actividade global no *open-field* no DPN21, efeito principal para o grupo (controle vs. cocaína) ( $F(1,78)=4,58$ ;  $p<0,05$ ).

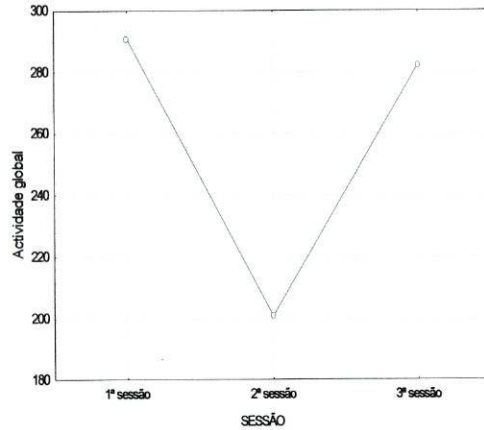


Figura 7. Actividade global no *open-field* no DPN21, efeito principal para a sessão (1ª sessão vs. 2ª sessão vs. 3ª sessão) ( $F(2,156)=8,98$ ;  $p<0,000$ ).

### DPN30

Para a categoria levantar há diferenças de grupo ( $F(1,78)=5,21$ ,  $p<0,05$ ), os ratos do grupo exposto à cocaína levantaram-se menos. Para a categoria actividade no centro há diferenças de grupo ( $F(1,78)=5,03$ ,  $p<0,05$ ), os ratos do grupo exposto à cocaína tiveram menos actividade no centro. Para a categoria actividade na periferia não há diferenças de grupo ou de sessão. Para a categoria actividade global não há diferenças de grupo ou de sessão (Figuras 8 e 9).

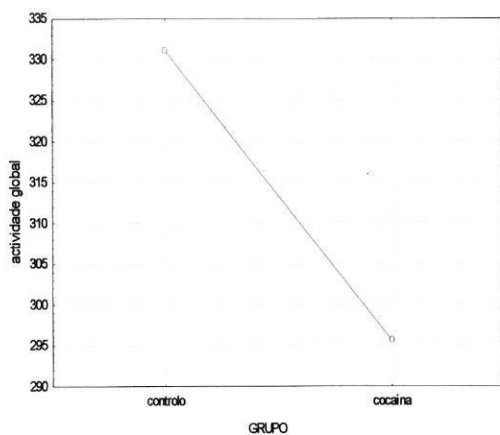


Figura 8. Actividade global no *open-field* no DPN30, efeito principal para o grupo (controle vs. cocaína) ( $F(1,78)=2,35$ ; ns).

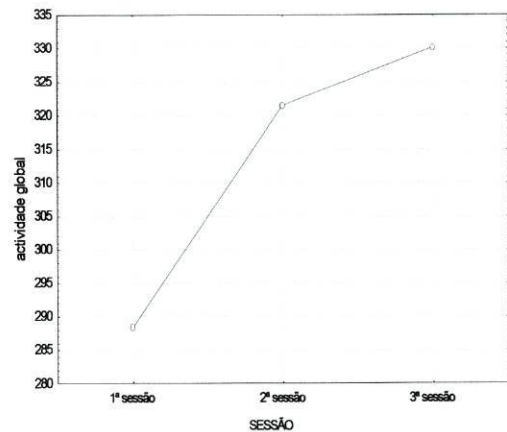


Figura 9. Actividade global no *open-field* no DPN30, efeito principal para a sessão (1ª sessão vs. 2ª sessão vs. 3ª sessão) ( $F(2,156)=1,76$ ; ns).

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

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

Para a categoria actividade global há diferenças de grupo ( $F(1,78)=5,24$ ,  $p<0,05$ ), há diferenças de idade ( $F(2,156)=63,78$ ,  $p<0,000$ ) e há interacção entre o efeito de grupo e de idade ( $F(2,156)=11,66$ ,  $p<0,000$ ), a actividade global aumentou com a idade e foi maior no grupo de ratos expostos à cocaína (Figura 10).

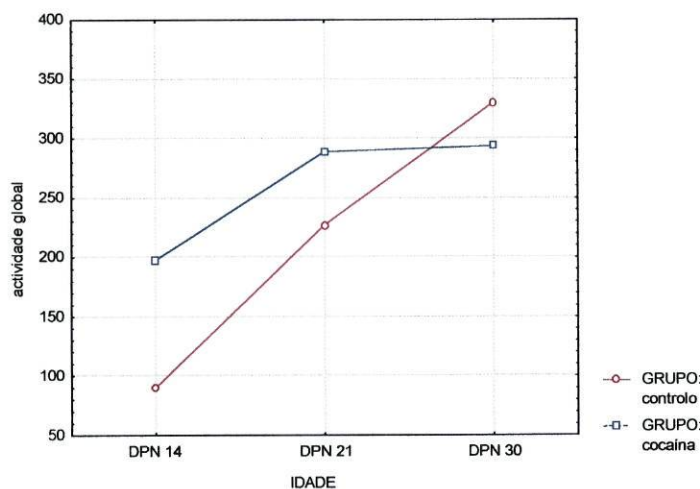


Figura 10. Actividade global no *open-field*, interacção entre efeito de grupo (controlo vs. cocaína) e de idade (DPN14 vs. DPN21 vs. DPN30) ( $F(2,156)=11,66$ ;  $p<0,000$ ).

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

Para a análise da defecação no *open-field* fez-se a média dos valores obtidos nas respectivas sessões das idades DPN21 e DPN30. Na idade DPN14 não defecaram. O Quadro 6 mostra as médias, os desvios-padrão e as diferenças para os ratos do grupo controlo e do grupo exposto à cocaína.

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

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

Da análise efectuada verificou-se não haver diferenças entre os sexos. A análise de variância efectuada, grupo (controlo vs. cocaína) X idade (DPN21 vs. DPN30), demonstrou haver interacção entre grupo e idade ( $F(1,28)=15,42$ ,  $p<0,001$ ) (Figura 11). Os animais do grupo exposto à cocaína no DPN30 defecaram mais.

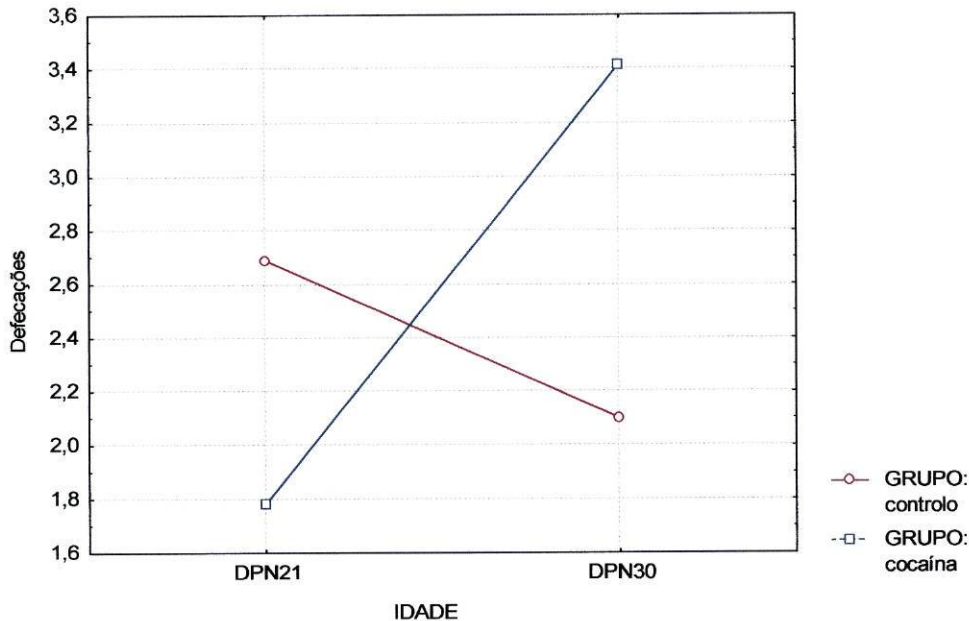


Figura 11. Defecação no *open-field*, interacção entre efeito de grupo (controlo vs. cocaína) e de idade (DPN21 vs. DPN30) ( $F(1,28)=15,42$ ;  $p<0,001$ ).

### Interacções sociais

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

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

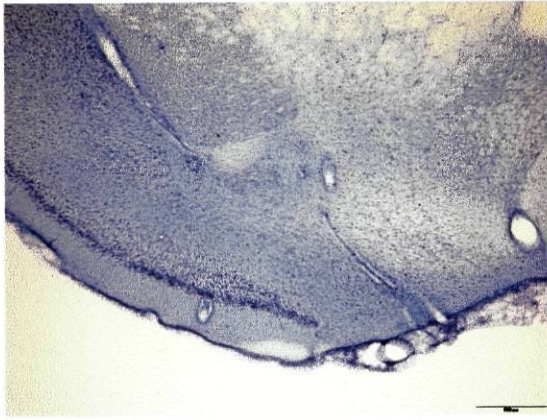
Categorias	Controlo (n=8)	Cocaína (n=12)	z	p
	M (DP)	M (DP)		
Boxe	4,88 (3,64)	4,50 (3,50)	-0,16	ns
Luta	23,88 (20,61)	36,83 (13,88)	-1,24	ns
Perseguição	6,00 (4,84)	6,75 (4,18)	-0,43	ns
Fuga	6,88 (4,26)	6,75 (3,98)	-0,12	ns
Ataque	16,25 (11,22)	19,58 (9,96)	-0,81	ns
Postura erecta ofensiva	0,00 (0,00)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

## Estudos Morfológicos

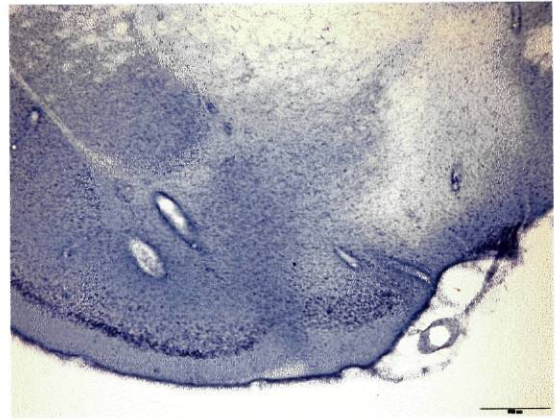
### Coloração de Nissl

A Figura 12 apresenta cortes sequenciais da amígdala direita dum animal do grupo controlo no sentido rostrocaudal. O primeiro corte corresponde ao nível 21 do Atlas de Palkovits e Brownstein (1988) e distam 240 µm entre eles. Não foram encontradas diferenças citoarquitectónicas entre o grupo de animais exposto à cocaína e o grupo controlo.

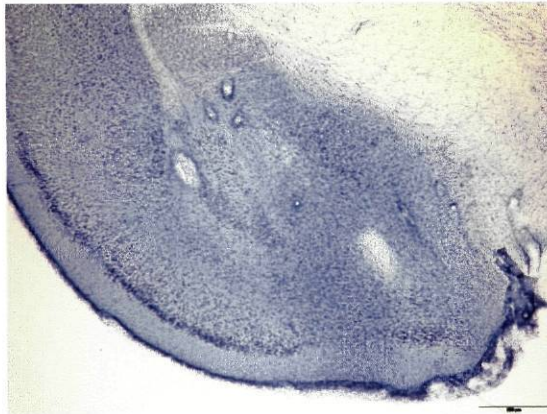
Figura 12. Fotografias de secções da amígdala direita de um animal do grupo controlo no DPN30 coradas pelo método de Nissl. A primeira secção corresponde ao nível 21 do Atlas de Palkovits e Brownstein (1988) e distam 240 µm entre si. Fotografias de a) a h) no sentido rostrocaudal. Barra=500 µm.



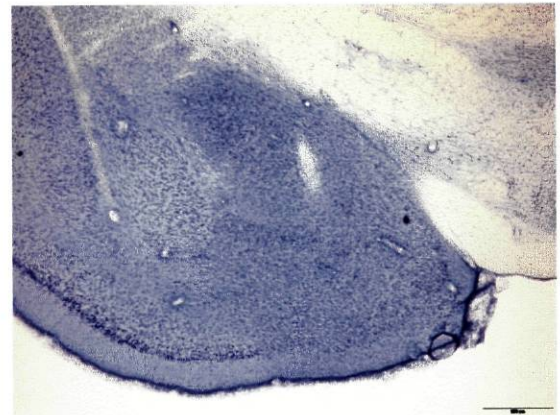
a



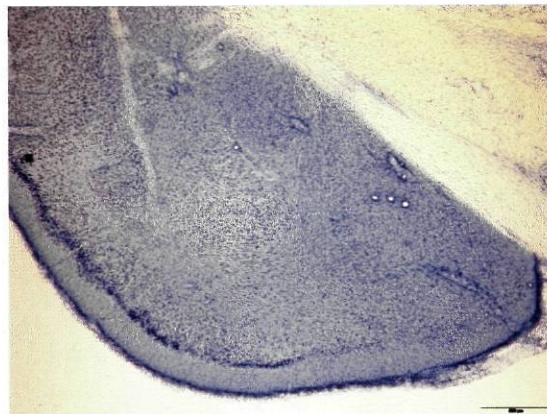
b



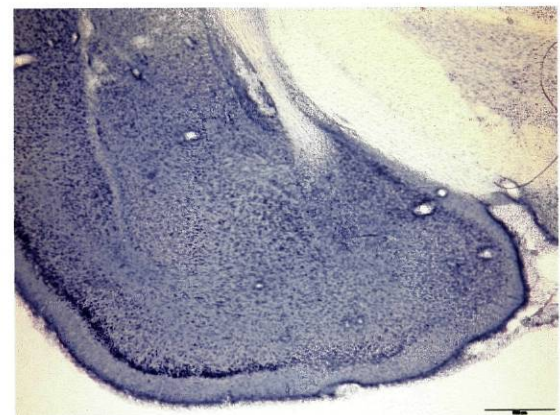
c



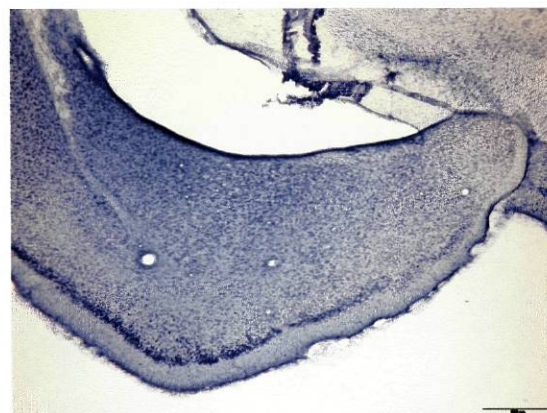
d



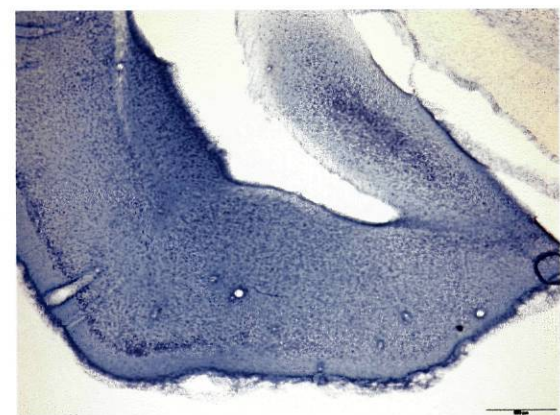
e



f



g



h

### **Expressão imunocitoquímica do anticorpo anti-TH**

Não foram observadas alterações morfológicas na expressão imunocitoquímica do anticorpo anti-TH a nível dos corpos celulares do núcleo central da amígdala (Figura 13. b, c) para o grupo de animais expostos a cocaína em relação ao grupo controlo. Também a distribuição desta expressão não parece ter sido alterada. Este núcleo foi o único a demonstrar corpos celulares com expressão do anticorpo anti-TH. Também não foram encontradas diferenças na distribuição das fibras nos núcleos central, medial e grupo basilateral de núcleos entre o grupo de animais tratados com cocaína e o grupo controlo (Figura 13. d, e).

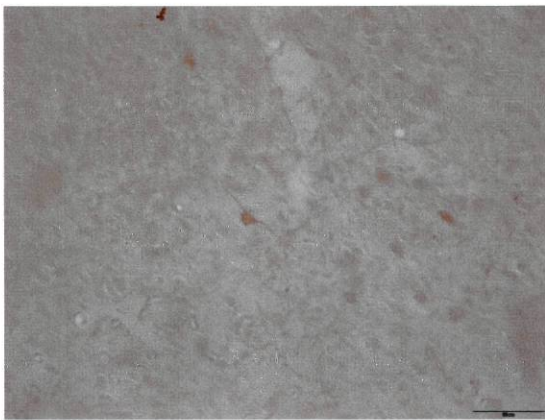
### **Expressão imunocitoquímica do anticorpo anti-5-HT**

Quanto à análise do número de células por mm<sup>2</sup> de área analisada do grupo de núcleos basilateral da amígdala de ratos com DPN30 não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos exposto à cocaína e controlo (Figura 14. f, g), bem como relativamente à morfologia e distribuição das células (Figura 14. b, c) e fibras (Figura 14. d, e). Também não se encontraram diferenças significativas devidas à lateralidade hemisférica da amígdala.

Figura 13. Fotografias da expressão imunocitoquímica do anticorpo anti-TH. a) secção de cérebro de rato do grupo controlo para mostrar a amígdala direita ampliada a 4X; barra= 500 µm. b) e c) células com expressão do anticorpo anti-TH do núcleo central da amígdala de animais do grupo controlo e exposto à cocaína respectivamente ; ampliação de 40X; barra=50 µm. d) e e) fibras com expressão do anticorpo anti-TH do núcleo central da amígdala de animais do grupo controlo e exposto à cocaína respectivamente ; ampliação de 40X; barra=50 µm.



a



b



c



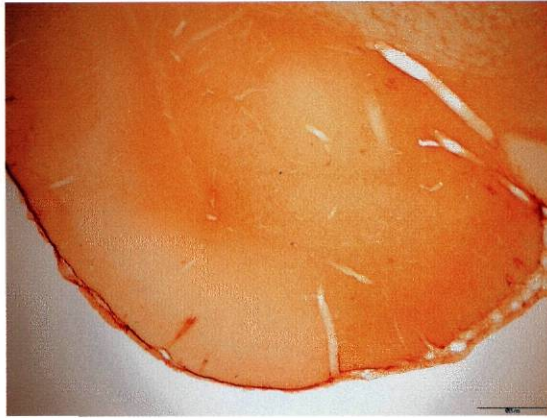
d



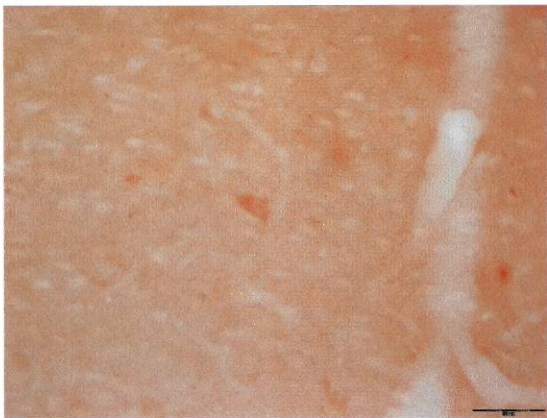
e

Do grupo controlo os machos apresentaram em média (n=3) 343 células/mm<sup>2</sup> (erro padrão da média (EPM) de 232), e as fêmeas (n=3) 364 (EPM de 246). Do grupo exposto à cocaína os machos apresentaram em média (n=3) 293 células/mm<sup>2</sup> (EPM de 16), e as fêmeas (n=3) 152 (EPM de 55). Verifica-se que apenas há diferenças significativas entre os machos e fêmeas expostos à cocaína. As fêmeas apresentaram um número maior de células com expressão do anticorpo anti-5-HT (Mann-Whitney,  $z = -1,96$ ,  $p = 0,05$ ). Quanto à análise semiquantitativa da distribuição das fibras com expressão do anticorpo anti-5-HT na amígdala, não se encontraram diferenças entre os grupos (Figura 14. d, e). No entanto, pode dizer-se que no grupo de animais exposto à cocaína a distribuição de fibras foi classificada mais frequentemente nos níveis 1 e 2 e no grupo controlo nos níveis 2 e 3.

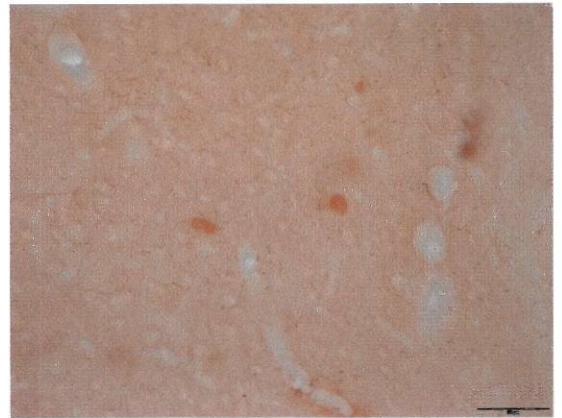
Figura 14. Fotografias da expressão imunocitoquímica do anticorpo anti-5-HT. a) secção de cérebro de rato do grupo controlo para mostrar a amígdala direita ampliada a 4X; barra= 500  $\mu$ m. b) e c) células com expressão do anticorpo anti-5-HT do núcleo lateral da amígdala de animais do grupo controlo e exposto à cocaína respectivamente; ampliação de 40X; barra=50  $\mu$ m. d) e e) fibras com expressão do anticorpo anti-5-HT do núcleo medial da amígdala de animais do grupo controlo e exposto à cocaína respectivamente; ampliação de 40X; barra=50  $\mu$ m. f) e g) área e contagem das células do grupo basilateral da amígdala de animais do grupo controlo e exposto à cocaína respectivamente; ampliação de 10X; barra=200  $\mu$ m.



a



b



c



d



e



f



g

## Determinações Neuroquímicas

A concentração de dopamina (DA) (Quadro 8) foi significativamente inferior no DPN30 no grupo de animais exposto à cocaína ( $F(1,23)=13,79$ ,  $p<0,01$ ) e houve interação entre grupo, sexo e lado ( $F(1,23)=7,85$ ,  $p<0,05$ ) (Figura 15). O teste de Scheffé revelou para a DA haver diferença significativa para a lateralidade hemisférica da amígdala em que a esquerda apresentou maior concentração ( $p<0,05$ ). Não foram encontradas diferenças para a concentração de DOPAC. A taxa de *turnover* da DA foi significativamente superior no grupo de animais exposto à cocaína ( $F(1,22)=5,02$ ,  $p<0,05$ ) (Figura 16). Não foram encontradas diferenças no conteúdo catecolaminérgico devidas à lateralidade hemisférica da amígdala relativamente à concentração de DOPAC ou ao *turnover* da DA.

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

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

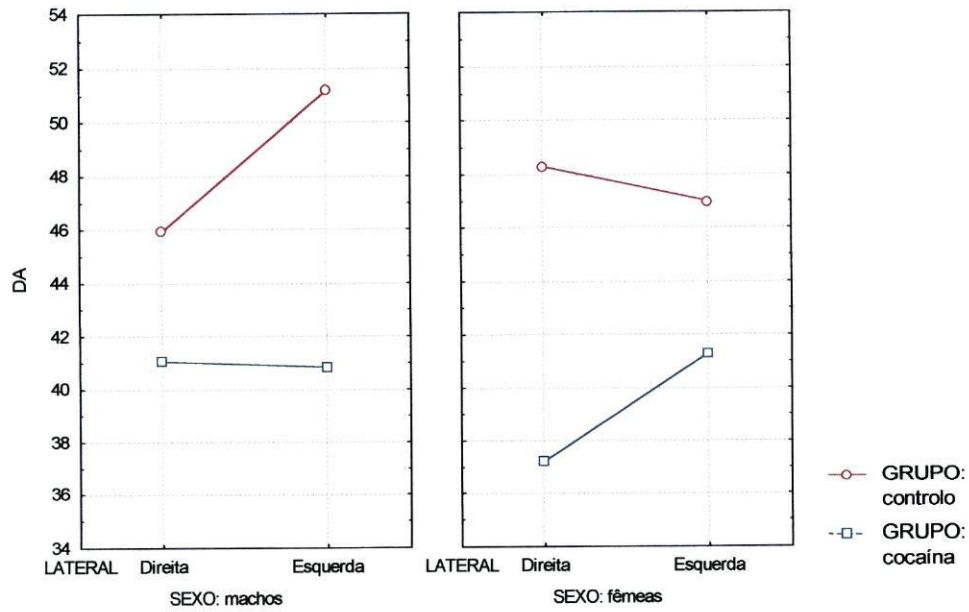


Figura 15. Doseamento neuroquímico da DA na amígdala do rato dos grupos controlo e exposto à cocaína, interação entre grupo, sexo e lado ( $F(1,23)=7,85$ ;  $p<0,05$ ).

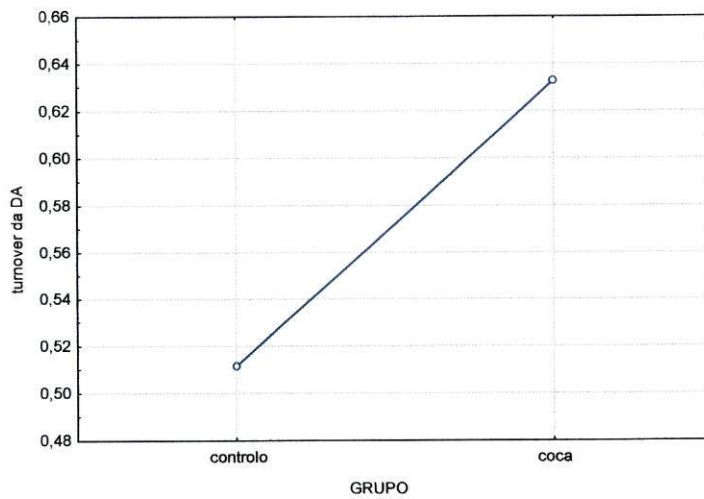


Figura 16. *Turnover* da DA na amígdala do rato dos grupos controlo e exposto à cocaína, efeito principal para o grupo ( $F(1,22)=5,02$ ;  $p<0,05$ ).

Não se encontraram diferenças significativas entre o grupo de ratos expostos à cocaína e o grupo controlo relativamente às concentrações de 5-HT, HIAA ou ao *turnover* da 5-HT (Quadro 9). Também não foram encontradas diferenças no conteúdo serotoninérgico devidas à lateralidade hemisférica da amígdala ou ao sexo do animal.

Quadro 9. Concentrações de 5-HT e HIAA, e o *turnover* da 5-HT na amígdala de ratos com DPN30 expostos à cocaína e respectivos controlos. Valores representam médias (DP) expressas em ng/100 mg peso de tecido húmido.

<b>Grupo</b>	<b>Género</b>	<b>Lado</b>	<b>5-HT</b>	<b>HIAA</b>	<b><i>turnover</i> 5-HT</b>
Controlo	Macho	Direito	432,32 (117,56) (n=5)	131,69 (20,14) (n=5)	0,32 (0,09) (n=5)
		Esquerdo	358,38 (83,88) (n=5)	119,89 (42,78) (n=5)	0,35 (0,15) (n=5)
	Fêmea	Direito	269,03 (131,43) (n=5)	193,95 (125,61) (n=5)	0,79 (0,61) (n=5)
		Esquerdo	247,06 (52,40) (n=5)	185,36 (129,36) (n=5)	0,69 (0,38) (n=5)
Cocaína	Macho	Direito	279,85 (137,46) (n=7)	164,01 (86,18) (n=8)	0,76 (0,57) (n=7)
		Esquerdo	395,01 (256,17) (n=8)	247,09 (187,58) (n=8)	0,95 (1,08) (n=8)
	Fêmea	Direito	334,91 (240,36) (n=10)	163,28 (123,05) (n=10)	0,54 (0,43) (n=10)
		Esquerdo	338,92 (164,88) (n=9)	214,49 (170,94) (n=10)	0,78 (0,86) (n=9)

## **Discussão**

A estrutura e função do cérebro constituem adaptações evolutivas para padrões de vida que enriquecem a especificidade da espécie humana. A amígdala, no contexto do desenvolvimento filogenético do SNC foi evoluindo de modo a servir a funcionalidade mais importante para cada espécie de acordo com o seu papel comum a todas elas: regulação e expressão das emoções, particularmente o medo. Nos répteis, a estimulação da amígdala é responsável pela expressão dos comportamentos de defesa que manifestam quando ameaçados por um predador, tendo sido demonstrado que a expressão destes comportamentos é reduzida ou anulada em paradigmas lesionais desta estrutura (Greenberg *et al.*, 1984; Tarr, 1977). Os mamíferos têm sido alvo de várias experiências que demonstram que a estimulação da amígdala provoca reacções do sistema nervoso autónomo e induzem imobilização, fuga e reacções de ataque defensivo (LeDoux, 1987). Estas experiências foram realizadas em diferentes espécies e os resultados demonstrados foram semelhantes, entre elas. No homem, os efeitos da estimulação da amígdala podem ser estudados com o auxílio da neurocirurgia em situações patológicas designadamente em casos de epilepsia incurável, e a experiência vivencial mais frequentemente registada é uma sensação de pressentimento do perigo, que conduz à sensação de medo (Gloor *et al.*, 1981; Halgreen, 1992). Pacientes com lesão do lobo temporal que incluem a amígdala por cirurgia para tratamento da epilepsia do lobo temporal apresentam diminuição das reacções condicionadas ao medo (Labar *et al.*, 1995). Apesar de as lesões incluírem outras regiões diferentes da amígdala sabe-se, através das experiências em animais, que a lesão da amígdala é a causa mais provável desta deficiência. Portanto, a amígdala centraliza as reacções do medo em todas as espécies que a possuem. Este é um exemplo de que sem as experiências em animais não seria possível interpretar as experiências com seres humanos.

A cocaína é uma droga de abuso usada frequentemente pelas mulheres em idade fértil decorrendo deste facto um grande número de crianças expostas durante a gestação àquela droga. A cocaína, como a maioria das drogas, atravessa a placenta entrando em contacto com o tecido fetal incluindo o cérebro (Spear *et al.*, 1989a). Vários estudos clínicos têm atribuído consequências adversas ao uso de cocaína/múltiplas drogas durante a gravidez (e.g. Chasnoff *et al.*, 1987; Oro & Dixon, 1987; Zuckerman *et al.*, 1989). A investigação tem sugerido que as crianças expostas à cocaína durante a gestação apresentam alterações do comportamento neonatal como estado organizativo deficitário, padrões de sono anormais, défices alimentares (Chasnoff *et al.*, 1987 ; Chasnoff *et al.*, 1985; Neuspiel & Hamel, 1991; Oro & Dixon, 1987), aos três meses (Mayes *et al.*, 1995) e no início da idade escolar (Delaney-Black *et al.*, 1998). No entanto, um efeito causal ainda não foi demonstrado pois as conclusões destes estudos são confundidas por vários factores que incluem má nutrição, abuso de várias drogas, doenças sexualmente transmissíveis, cuidados pré-natais deficientes, e o uso materno de tabaco e álcool (Neuspiel & Hamel, 1991).

## **Os Modelos Animais**

Muitos dos problemas metodológicos relacionados com os estudos clínicos da toxicologia do desenvolvimento das drogas de abuso não se verificam nos estudos em animais. Os estudos em animais podem ser usados para confirmar e ampliar os resultados dos estudos clínicos, antecipar outras possíveis consequências da exposição precoce às drogas de abuso, proporcionar uma compreensão dos mecanismos subjacentes aos efeitos comportamentais e sugerir eventuais abordagens terapêuticas. Assim, para determinar os efeitos biológicos da exposição à cocaína no cérebro em

desenvolvimento, especificamente atribuídos à cocaína, é necessário o uso de modelos animais apropriados. Para tal há vários aspectos a considerar. A escolha do modelo animal implica que consideremos os custos, a informação já existente sobre a espécie e o estadio de maturidade na altura do nascimento. Na altura do nascimento o cérebro do rato (um dos animais mais utilizado como modelo da exposição a drogas durante a gestação) encontra-se numa fase de desenvolvimento que corresponde grosseiramente ao cérebro humano na 19<sup>a</sup> semana de gestação (Bayer *et al.*, 1993). Portanto, a administração de cocaína ao rato no período pós-natal constitui um modelo da exposição humana à cocaína correspondente à última metade da gravidez. Outro aspecto importante a considerar é o método de administração da droga. Idealmente deveria ser usada a mesma via de exposição associada à exposição no homem. A administração de cocaína por via subcutânea ao rato tem sido associada a uma absorção rápida e completa (Misra, 1976) e os níveis máximos são atingidos 2 horas após a administração crónica diária (Nayak *et al.*, 1976). A dose da droga deve ser aquela que produz níveis no cérebro ou plasma fetais semelhantes entre o animal de experiência e o homem (Kutscher & Nelson, 1985), o que nos roedores é normalmente conseguido com a administração de doses superiores às do homem dadas as diferenças farmacocinéticas entre as espécies (Rees *et al.*, 1990). A frequência da administração de cocaína é particularmente importante dado que sendo uma droga estimulante pode induzir compensações fisiológicas diferentes (sensibilização ou tolerância) dependendo do tipo de exposição (episódica ou continua) (para revisão ver Post, 1980). Outros aspectos metodológicos importantes nos estudos de toxicologia do desenvolvimento em animais são a determinação do tamanho da amostra, usando a ninhada como unidade de análise; o controle de deficiente nutrição induzida pela droga; o controle de alterações no comportamento maternal induzidas pela droga (questão que não se coloca no presente

estudo dado o uso de um modelo de exposição pós-natal à cocaína); e a escolha das variáveis dependentes que pode consistir em testes comportamentais mais dirigidos havendo informação prévia sobre a teratologia neurocomportamental da droga ou se o seu mecanismo de acção for conhecido no adulto como é o caso da cocaína (Johanson & Fischman, 1989; Spear, 1997; Spear *et al.*, 1989b).

Os modelos animais usados para estudar a toxicidade no desenvolvimento frequentemente baseiam-se na exposição pré-natal para demonstrar a teratogenicidade comportamental da droga. Embora os estudos pré-natais abordem os efeitos das drogas na divisão e migração celulares, o período pós-natal precoce nos ratos representa um período activo de diferenciação celular e de formação de sinapses. Além disto, 80% das enzimas que sintetizam as catecolaminas, armazéns endógenos, e locais de recaptação de alta afinidade desenvolvem-se no período pós-natal nos roedores (Coyle & Axelrod, 1972; Johnston & Coyle, 1981). Durante a 1ª semana pós-natal do rato a cocaína foi capaz de inibir o *turnover* da DA no prosencéfalo, e durante as 2 primeiras semanas inibiu o *turnover* da noradrenalina, o que foi relacionado com uma redução na actividade do impulso nervoso (Seidler *et al.*, 1995). Esta capacidade transitória da cocaína em interferir com a actividade noradrenérgica e dopaminérgica durante um período em que a diferenciação é regulada pelo *input* de neurotransmissores, pode ser importante na interpretação da teratologia neurocomportamental da cocaína.

## **A Expressão Comportamental**

O TNF tem sido usado experimentalmente para estudar a depressão (e.g. Weiss *et al.*, 1998). Quando os roedores são expostos ao TNF tipicamente assumem uma postura imóvel, que é atribuída a um estado de desespero comportamental, considerando

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

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

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

Na primeira sessão do DPN14 não houve diferenças significativas entre os dois grupos de animais. Apenas na primeira sessão do DPN30 se verifica que os ratos do grupo exposto à cocaína se levantaram menos, o que pode sugerir um efeito depressivogénio da administração crónica de cocaína neste período de desenvolvimento

do rato na reacção face a um ambiente estranho. Por outro lado quer no DPN14 (nas 3 sessões) quer no DPN21 (apenas na 1ª sessão) os ratos do grupo exposto à cocaína tiveram maior actividade na periferia e global, denotando que os efeitos de estimulação motora provocados pela cocaína só se verificaram até aos 21 dias de vida, repetindo os resultados de estudos anteriores (Spear & Brick, 1979). No DPN30 não existem diferenças significativas entre os grupos exposto à cocaína e controlo para a actividade na periferia e global mas nota-se um padrão inverso ao que se verificou nas idades anteriores. Estes dados vão ao encontro dos resultados obtidos para a actividade de levantar e no centro nesta idade em que os ratos do grupo exposto à cocaína têm pontuações significativamente menores.

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

Para avaliar as interacções sociais neste estudo observamos o comportamento de ratos da mesma ninhada em interacção no DPN29 após várias sessões prévias em que os mesmos ratos já tinham sido colocados no mesmo ambiente, o que lhes permitiu habituação às condições do teste. Johns *et al.* (1998) e Wood e Spear (1998) ao estudarem ratos com exposição pré-natal à cocaína verificaram que os animais jovens se

tornaram mais agressivos quer nas interações sociais quer na competição para a o consumo de água, enquanto que outros constataram alteração no comportamento precoce de brincadeira com maior submissão e menor probabilidade de solicitar brincadeira do que outros animais (Wood *et al.*, 1994; Wood *et al.*, 1995). No presente estudo os animais do grupo exposto à cocaína apresentaram mais comportamentos de postura erecta ofensiva, postura erecta defensiva e de cheirar. O comportamento de postura erecta ofensiva é claramente uma manifestação de agressividade, pelo que este resultado vai de encontro aos de Johns *et al.* (1998) e Wood e Spear (1998), que encontraram ratos mais agressivos quando expostos à cocaína durante o desenvolvimento, embora num período diferente. O comportamento de cheirar induzido pela cocaína parece estar relacionado com a defesa, o que juntamente com o aumento do comportamento de postura erecta defensiva encontrado neste trabalho é suportado por outros estudos em que a cocaína aumenta os comportamentos defensivos (Blanchard *et al.*, 2000; Ujike *et al.*, 1996; White *et al.*, 1998)

## **A Organização Morfológica**

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

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

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

## **A Neuroquímica**

Ao sistema dopaminérgico mesolímbico é atribuído o papel principal na capacidade de a cocaína proporcionar reforço e recompensa (Weed *et al.*, 1993; Woolverton & Johnson, 1992). Sabe-se que a capacidade de reforço da cocaína depende do núcleo accumbens (Hurd *et al.*, 1989; Wise *et al.*, 1995), enquanto que a amígdala

parece ter papel importante na associação de estímulos condicionados ao consumo de cocaína (Weiss *et al.*, 2000b). Sendo assim é de esperar um efeito da administração crónica de cocaína sobre o sistema dopaminérgico que projecta para a amígdala. Neste estudo verificou-se que a administração crónica de cocaína a ratos no período neonatal induziu diminuição da DA na amígdala no DPN30. Além deste efeito ainda se verificou aumento do *turnover* da DA na mesma estrutura. A cocaína liga-se aos transportadores pré-sinápticos inibindo a recaptação da DA, 5-HT e noradrenalina, prolongando a neurotransmissão monoaminérgica (Cregler & Mark, 1986; Nunes & Rosecan, 1987; Johanson & Fischman, 1989; Volpe, 1992). A administração aguda de cocaína inibiu o *turnover* da DA no prosencéfalo na primeira semana de vida do rato, mas na terceira semana o efeito foi substituído pela resposta excitatória que caracteriza o rato adulto (Seidler *et al.*, 1995). O efeito inibidor sobre o *turnover* da DA não foi atribuído ao bloqueio da recaptação, à activação de autoreceptores ou a um efeito anestésico local, mas a reduções na actividade do impulso nervoso desencadeadas pela droga. Tem sido postulado que quer a DA quer a 5-HT actuam como factores morfogenéticos durante o desenvolvimento do cérebro dos mamíferos (Chubakov *et al.*, 1986; Whitaker-Azmitia, 1991; Whitaker-Azmitia *et al.*, 1987; para rever ver Lauder, 1988) e a administração de cocaína por via subcutânea inibe a mitose até ao DPN11 (Anderson-Brown *et al.*, 1990). Portanto, os resultados deste estudo reflectem os efeitos da administração de cocaína quer sobre o desenvolvimento dos neurónios da amígdala, quer possíveis efeitos de dessensibilização no sistema dopaminérgico e o aumento do *turnover* reflecte uma resposta à diminuição da DA.

Baumann *et al.* (1993) verificaram que o efeito da administração aguda de 15mg/Kg de cocaína a ratos adultos inibiu a síntese de DA na amígdala basilar, mas a administração crónica bi-diária de cocaína durante uma semana não alterou os níveis

basais de síntese de DA, sugerindo uma dessensibilização dos mecanismos que medeiam a supressão da síntese desta monoamina induzida pela cocaína. Wilson *et al.* (1994) não encontraram alteração dos níveis de DA na amígdala ou alteração na concentração do transportador da DA após quatro semanas de administração diária, durante 1 hora, de cocaína ao rato adulto, mas a dose de cocaína foi menor que a usada no presente estudo.

O presente estudo não encontrou alterações nos níveis de 5-HT ou no *turnover* da 5-HT na amígdala no DPN30 após exposição à cocaína desde o DPN1, apenas demonstrou alterações no sistema dopaminérgico. Frick e Dow-Edwards (1995) administrando uma dose superior de cocaína (25 mg/Kg) diariamente a ratos, entre o DPN11 e o DPN21, verificaram que a inibição da recaptção da DA contribui de forma mais significativa para os efeitos metabólicos da cocaína do que a inibição da recaptção da 5-HT. Baumann *et al.* (1993) também não encontraram alteração dos níveis basais de síntese de 5-HT na amígdala após exposição crónica bi-diária de cocaína, embora tenham usado ratos adultos e a exposição tenha apenas durado uma semana. Wilson *et al.* (1994) que, embora com uma dose menor de cocaína, ao fim de 4 semanas de administração diária durante uma hora a ratos adultos, não encontraram alteração dos níveis de 5-HT na amígdala.

## **Sinopse**

O presente estudo mostra que a exposição crónica à cocaína no período pós-natal precoce leva à diminuição da DA na amígdala no DPN30 e que ao longo deste período se verifica alteração do comportamento dos ratos de tal modo que, até aos 21 dias de vida, estes apresentam maior actividade, menor defecação e depois invertem este

padrão. Foi também verificado que no TNF passam mais tempo imóveis e em interacções sociais têm mais comportamentos de cheirar e de posições erectas ofensiva e defensiva. É de realçar que as crianças expostas no período pré-natal à cocaína apresentam, aos 3 meses, menor reactividade à novidade, o que sugere deficiências na regulação da atenção e da activação (Mayes *et al.*, 1995). Tem sido, do mesmo modo, atribuído papel importante à amígdala nestas funções (Holland & Gallagher, 1999) tendo sido demonstrado por Eyler *et al.* (1998) relação negativa entre a quantidade de cocaína consumida no 3º trimestre de gravidez com orientação, atenção e resposta de alerta nos recém-nascidos. Dado que o período pós-natal precoce do rato corresponde grosseiramente à última metade de gestação do homem (Bayer *et al.*, 1993) os resultados da presente dissertação sugerem que as alterações do comportamento que têm sido encontradas nos filhos de mães que consumiram cocaína durante a gravidez, como a deficiente regulação da atenção e da activação, desenvolvimento anormal de vinculações sociais e estado organizativo deficitário poderão estar relacionadas com diminuição da DA na amígdala.

## **Conclusões**

O consumo de cocaína tem aumentado nos últimos anos nas mulheres em idade fértil (Balsa *et al.*, 2001; Musto, 1989) e, conseqüentemente, o número de crianças que foram expostas àquela droga durante a gestação é cada vez mais elevado. Estas crianças apresentam múltiplos problemas que incluem alterações do comportamento como, por exemplo, desenvolvimento anormal de vinculações sociais, estado organizativo deficitário, padrões de sono anormais, défices alimentares, irritabilidade e deficiências na regulação da atenção e da activação (Chasnoff *et al.*, 1987; Chasnoff *et al.*, 1985; Dixon *et al.*, 1987; Doberczak *et al.*, 1987; Mayes *et al.*, 1995; Neuspiel & Hamel, 1991; Oro & Dixon, 1987). A amígdala está relacionada com o comportamento emocional e social e com o controlo da atenção (Aggleton, 1993; Holland & Gallagher, 1999) funções que se sabe serem alteradas pelo consumo de cocaína nos períodos de desenvolvimento activo do SNC. Neste contexto, o presente trabalho pretende contribuir para a compreensão dos mecanismos subjacentes àquelas alterações comportamentais no que depende da amígdala, já que o modelo animal usado constitui um paradigma da exposição humana à cocaína na última metade da gestação.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que, neste modelo animal de exposição neonatal à cocaína, o grupo experimental apresenta:

- Menor esperança de escapar no TNF.
- Alteração do comportamento no *open-field* passando de mais activos até ao DPN21 e menor defecação a menos activos e com maior defecação após aquele dia.
- Mais comportamentos de cheirar e de posições erectas ofensiva e defensiva em interações sociais

- Diminuição dos níveis de DA e aumento do *turnover* da DA na amígdala, no DPN30, relativamente aos ratos controlo e não apresentam alteração dos níveis do metabolito da DA, o DOPAC.
- Maior nível de DA na amígdala esquerda.
- Níveis não significativamente diferentes de 5-HT e HIAA e do *turnover* de 5-HT na amígdala relativamente aos controlos.
- Idêntica expressão imunocitoquímica do anti-corpo anti-5-HT, no DPN30, no grupo basilateral de núcleos da amígdala relativamente aos controlos, mas as fêmeas do grupo exposto apresentam maior número de células no grupo basilateral com expressão do anticorpo anti-5-HT.

Estes resultados permitem concluir que a administração de cocaína ao rato, no período de desenvolvimento pós-natal, diminui a esperança de escapar no TNF colocando-os num estado “pré-depressivo”; condiciona maior actividade e menor defecação até ao DPN21 e depois deste dia menor actividade e maior defecação tornando-os “ratos emocionais”; determina em interações sociais mais comportamentos de cheirar, de posições erectas ofensiva e defensiva denotando maior agressividade e defesa. Estas alterações do comportamento estão associadas a diminuição do *tonus* dopaminérgico na amígdala mas não com alterações serotoninérgicas na mesma estrutura.

Estes resultados sugerem que as alterações de comportamento como a deficiente regulação da atenção e activação, desenvolvimento anormal de vinculações sociais e estado organizativo deficitário encontradas nas crianças expostas à cocaína durante a gestação poderão estar relacionadas com diminuição da DA na amígdala.

Tal como sugerido por Koob e Bloom (1998) o grande desafio da comunidade científica consiste agora em encontrar uma sequência interna consistente que explique os mecanismos moleculares subjacentes aos achados comportamentais, celulares e neuroquímicos que produzem alterações profundas e permanentes na cognição, motivação e comportamento. Deste modo, será possível modificar a resposta do Homem, de cada Homem, ao consumo de drogas.

## **Bibliografia**

- Abercrombie, H.C., Larson, C.L., Ward, R.T. (1996) *Neuroimage*, 3, S217.
- Adolphs, R., Tranel, D., Damasio, H. & Damasio, A. (1994) Impaired recognition of emotion in facial expressions following bilateral damage to the human amygdala. *Nature*, 372, 669-671.
- Aggleton, J.P. (1993) The contribution of the amygdala to normal and abnormal emotional states. *Trends Neurosci*, 16, 328-333.
- Alheid, G.F., de Olmos, J. & Beltramino, C.A. (1995) Amygdala and extended amygdala. In G. Paxinos (Ed.), *The rat Nervous System*, pp. 495-579. California: Academic Press.
- Ali, S.F., David, S.N. & Newport, G.D. (1993) Age-related susceptibility to MPTP-induced neurotoxicity in mice. *Neurotoxicology*, 14, 29-34.
- Amaral, D.G., Price, J.L., Pitkänen, A. & Carmichael, S.T. (1992) Anatomical organization of the primate amygdaloid complex. In J.P. Aggleton (Ed.), *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory, and Mental Dysfunction*, pp. 1-66. New York: Wiley-Liss.
- Ambrosio, E., Sharpe, L.G. & Pilotte, N.S. (1997) Regional binding to corticotropin releasing factor receptors in brain of rats exposed to chronic cocaine and cocaine withdrawal. *Synapse*, 25, 272-276.
- Anderson-Brown, T., Slotkin, T.A. & Seidler, F.J. (1990) Cocaine acutely inhibits DNA synthesis in developing rat brain regions: evidence for direct actions. *Brain Res*, 537, 197-202.
- Bachevalier, J. (2000) The amygdala, social cognition, and autism. In J.P. Aggleton (Ed.), *The Amygdala. A Functional Analysis*, 2nd ed., pp. 509-543. New York: Oxford University Press.
- Bain, G.T. & Kornetsky, C. (1987) Naloxone attenuation of the effect of cocaine on rewarding brain stimulation. *Life Sci*, 40, 1119-1125.
- Baker, D.A., Fuchs, R.A., Tran-Nguyen, L.T., Palmer, A.J., Marshall, J.F., McPherson, R.J. & Neisewander, J.L. (1999) Cocaine-seeking behavior and Fos expression in the amygdala produced by cocaine or a cocaine self-administration environment. *Ann N Y Acad Sci*, 877, 796-799.
- Balsa, C., Farinha, T., Nunes, J.P. & Chaves, M. (2001) Inquérito nacional ao consumo de substâncias psico-ativas na população portuguesa. CEOS. Lisboa: Fac. de Ciências Sociais e Humanas, Universidade Nova de Lisboa.
- Baron-Cohen, S., Ring, H.A., Wheelwright, S., Bullmore, E.T., Brammer, M.J., Simmons, A. & Williams, S.C. (1999) Social intelligence in the normal and autistic brain: an fMRI study. *Eur J Neurosci*, 11, 1891-1898.
- Baumann, M.H., Raley, T.J., Partilla, J.S. & Rothman, R.B. (1993) Biosynthesis of dopamine and serotonin in the rat brain after repeated cocaine injections: a microdissection mapping study. *Synapse*, 14, 40-50.

- Bayer, S.A., Altman, J., Russo, R.J. & Zhang, X. (1993) Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology*, 14, 83-144.
- Bechara, A., Tranel, D., Damasio, H., Adolphs, R., Rockland, C. & Damasio, A.R. (1995) Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humans. *Science*, 269, 1115-1118.
- Bilitzke, P.J. & Church, M.W. (1992) Prenatal cocaine and alcohol exposure affect rat behavior in a stress test (the Porsolt swim test). *Neurotoxicol Teratol*, 14, 359-364.
- Birbaumer, N., Grodd, W., Diedrich, O., Klose, U., Erb, M., Lotz, M., Schneider, F., Weiss, U. & Flor, H. (1998) fMRI reveals amygdala activation to human faces in social phobics. *Neuroreport*, 9(6), 1223-1226.
- Blanchard, D.C. & Blanchard, R.J. (1999) Cocaine potentiates defensive behaviors related to fear and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*, 23, 981-991.
- Blanchard, R.J., Hebert, M.A., Dulloog L., Kaawaloa N., Nishimura O. & Blanchard D.C. (1998) Acute cocaine effects on stereotypy and defense: an ethoexperimental approach. *Neurosci Biobehav Rev*, 23, 179-188.
- Blanchard, R.J., Hebert, M., Dulloog, L., Markham, C., Figueira, R., Nishimura, O., Newsham, K., Kaawaloa, J.N. & Blanchard, D.C. (2000) Cocaine-induced sniffing stereotypy changes in response to threat. *Pharmacol Biochem Behav*, 66, 249-256.
- Bogerts, B. (1984) Neuropathology of schizophrenias. *Fortschr Neurol Psychiatr*, 52, 428-437.
- Bogerts, B., Meertz, E. & Schonfeldt-Bausch, R. (1985) Basal ganglia and limbic system pathology in schizophrenia. A morphometric study of brain volume and shrinkage. *Arch Gen Psychiatry*, 42, 784-791.
- Bonne, O., Brandes, D., Gilboa, A., Gomeri, J.M., Shenton, M.E., Pitman, R.K. & Shalev, A.Y. (2001) Longitudinal MRI study of hippocampal volume in trauma survivors with PTSD. *Am J Psychiatry*, 158, 1248-1251.
- Bonson, K.R., Grant, S.J., Contoreggi, C.S., Links, J.M., Metcalfe, J., Weyl, H.L., Kurian, V., Ernst, M. & London, E.D. (2002) Neural systems and cue-induced cocaine craving. *Neuropsychopharmacology*, 26, 376-386.
- Borsini, F. & Meli, A. (1988) Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology(Berlin)*, 94, 147-160.
- Braak, H. & Braak, E. (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, 82, 239-258.
- Brothers, L. (1989) A biological perspective on empathy. *Am J Psychiatry*, 146, 10-19.
- Brown, E.E. & Fibiger, H.C. (1993) Differential effects of excitotoxic lesions of the amygdala on cocaine-induced conditioned locomotion and conditioned place preference. *Psychopharmacology*, 113, 123-130.

- Brown, E.E., Robertson, G.S. & Fibiger, H.C. (1992) Evidence for conditional neuronal activation following exposure to a cocaine-paired environment: role of forebrain limbic structures. *J Neurosci*, 12, 4112-4121.
- Burns, L.H., Robbins, T.W. & Everitt, B.J. (1993) Differential effects of excitotoxic lesions of the basolateral amygdala, ventral subiculum and medial prefrontal cortex on responding with conditioned reinforcement and locomotor activity potentiated by intra-accumbens infusions of D-amphetamine. *Behav Brain Res*, 55, 167-183.
- Cabib, S., Zocchi, A. & Puglisi-Allegra, S. (1995) A comparison of the behavioral effects of minaprine, amphetamine and stress. *Psychopharmacology (Berl)*, 121, 73-80.
- Cador, M., Robbins, T.W. & Everitt, B.J. (1989) Involvement of the amygdala in stimulus-reward associations: interaction with the ventral striatum. *Neuroscience*, 30, 77-86.
- Cahill, L. & McGaugh, J.L. (1998) Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci*, 21, 294-299.
- Caine, S.B., Heinrichs, S.C., Coffin, V.L. & Koob, G.F. (1995) Effects of the dopamine D-1 antagonist SCH 23390 microinjected into the accumbens, amygdala or striatum on cocaine self-administration in the rat. *Brain Res*, 692, 47-56.
- Canteras, N.S., Simerly, R.B. & Swanson, L.W. (1995) Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: A PHAL study in the rat. *J Comp Neurol*, 360, 213-245.
- Caroleo, M.C., Arbirio, M., Di Francesco, P., Pulvirenti, L., Garaci, E. & Nistico, G. (1998) Cocaine induced T cell proliferation in the rat: role of amygdala dopamine D1 receptors. *Neurosci Lett*, 256, 61-64.
- Cestari, V., Mele, A., Oliverio, A. & Castellano, C. (1996) Amygdala lesions block the effect of cocaine on memory in mice. *Brain Research*, 713, 286-289.
- Chasnoff, I.J., Burns, K.A. & Burns, W.J. (1987) Cocaine use in pregnancy: perinatal morbidity and mortality. *Neurotoxicol Teratol*, 9, 291-293.
- Chasnoff, I.J., Burns, W.J., Schnoll, S.H. & Burns, K.A. (1985) Cocaine use in pregnancy. *N Engl J Med*, 313, 666-669.
- Childress, A.R., Mozley, P.D., Mozley, P.D., McElgin, W., Fitzgerald, J., Reivich, M. & O'Brien, C.P. (1999) Limbic activation during cue-induced cocaine craving. *Am J Psychiatry*, 156, 11-18.
- Chow, T.W. & Cummings, J.L. (2000) The amygdala and Alzheimer's disease. In J.P. Aggleton (Ed.), *The Amygdala. A Functional Analysis*, 2nd ed., pp. 655-680. New York: Oxford University Press.
- Chubakov, A.R., Gromova, E.A., Konovalov, G.V., Sarkisova, E.F. & Chumasov, E.I. (1986) The effects of serotonin on the morpho-functional development of rat cerebral neocortex in tissue culture. *Brain Res*, 369, 285-297.

- Ciccocioppo, R., Sanna, P.P. & Weiss, F. (2001) Cocaine-predictive stimulus induces drug-seeking behavior and neural activation in limbic brain regions after multiple months of abstinence: reversal by D(1) antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 1976-1981.
- Connor, T.J., Kelliher, P., Harkin, A., Kelly, J.P. & Leonard, B.E. (1999) Reboxetine attenuates forced swim test-induced behavioural and neurochemical alterations in the rat. *Eur J Pharmacol*, 379, 125-133.
- Connor, T.J., Kelliher, P., Shen, Y., Harkin, A., Kelly, J.P. & Leonard, B.P. (2000) Effect of subchronic antidepressant treatments on behavioral, neurochemical, and endocrine changes in the forced-swim test. *Pharmacol Bioch Behav*, 65, 591-597.
- Connor, T.J., Kelly, J.P. & Leonard, B.E. (1997) Forced swim test-induced neurochemical, endocrine, and immune changes in the rat. *Pharmacol Bioch Behav*, 58, 961-967.
- Costall, B., Naylor, R.J. & Tyers, M.B. (1990) The psychopharmacology of 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Pharmacol Ther*, 47, 181-202.
- Corrigall, W.A. & Coen, K.M. (1991) Opiate antagonists reduce cocaine but not nicotine self-administration. *Psychopharmacology*, 104, 167-170.
- Couceyro, P.R., Koyle, E.O. & Kuhar, M.J. (1997) Further studies on the anatomical distribution of CART by in situ hybridization. *J Chem Neuroanat*, 12, 229-241.
- Coyle, J.T. & Axelrod, J. (1972) Tyrosine hydroxylase in rat brain: developmental characteristics. *J Neurochem*, 19, 1117-1123.
- Cregler, L.L. & Mark, H. (1986) Medical complications of cocaine abuse. *N Engl J Med*, 315, 1495-1500.
- Cunningham, K.A., Paris, J.M. & Goeders, N.E. (1992) Chronic cocaine enhances serotonin autoregulation and serotonin uptake binding. *Synapse*, 11, 112-123.
- Daenen, E.W., Van der Heyden, J.A., Kruse, C.G., Wolterink, G. & Van Ree, J.M. (2001) Adaptation and habituation to an open field and responses to various stressful events in animals with neonatal lesions in the amygdala or ventral hippocampus. *Brain Res*, 918, 153-165.
- Daenen, E.W., Wolterink, G., Gerrits, M.A. & Van Ree, J.M. (2002) Amygdala or ventral hippocampal lesions at two early stages of life differentially affect open field behaviour later in life; an animal model of neurodevelopmental psychopathological disorders. *Behav Brain Res*, 131, 67-78.
- Davis, M. (2000) The role of the amygdala in conditioned and unconditioned fear and anxiety. In J.P. Aggleton (Ed.), *The Amygdala. A Functional Analysis*, 2th edn. pp. 213-287. New York: Oxford University Press.
- Day, H.E., Badiani, A., Uslander, J.M., Oates, M.M., Vittoz, N.M., Robinson, T.E., Watson Jr., S.J. & Akil, H. (2001) Environmental novelty differentially affects c-fos mRNA expression

- induced by amphetamine or cocaine in subregions of the bed nucleus of the stria terminalis and amygdala. *J Neurosci*, 21, 732-740.
- De Bellis, M.D., Hall, J., Boring, A.M., Frustaci, K. & Moritz, G. (2001) A pilot longitudinal study of hippocampal volumes in pediatric maltreatment-related posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*, 50, 305-309.
- Delaney-Black, V., Covington, C., Templin, T., Ager, J., Martier, S. & Sokol, R. (1998) Prenatal cocaine exposure and child behavior. *Pediatrics*, 102, 945-950.
- deLong, G. R. (1992) Autism, amnesia, hippocampus, and learning. *Neurosci Biobehav Rev*, 16, 63-70.
- de Olmos, J., Alheid, G.F. & Beltramino, C.A. (1985) Amygdala. In G. Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System*, pp. 317-223. Australia: Academic Press.
- Di Chiara, G. & Imperato, A. (1988) Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 244, 1067-1080.
- Dixon, S.D., Coen, R.W. & Crutchfield, S. (1987) Visual dysfunction in cocaine exposed infants. *Pediatr Res*, 21, 359A.
- Doberczak, T.M., Shanzer, S. & Kandall, S.R. (1987) Neonatal effects of cocaine abuse in pregnancy. *Pediatr Res*, 21, 359A.
- Douglass, J., McKinzie, A.A. & Couceyro, P. (1995) PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci*, 15, 2471-2481.
- Dow-Edwards, D.L. (1991) Cocaine effects on fetal development: a comparison of clinical and animal research findings. *Neurotoxicol Teratol*, 13, 347-352.
- Drevets, W.C., Videen, T.O., Price, J.L., Preskorn, S.H., Carmichael, S.T. & Raichle, M.E. (1992) A functional anatomical study of unipolar depression. *J Neurosci*, 12, 3628-3641.
- Drevets, W.C., Spitznagel, E. & Raichle, M.E. (1995) Functional anatomical differences between major depressive subtypes. *J Cerebral Blood Flow Metab*, 15, S93.
- Driessen, M., Herrmann, J., Stahl, K., Zwaan, M., Meier, S., Hill, A., Osterheider, M. & Petersen, D. (2000) Magnetic resonance imaging volumes of the hippocampus and the amygdala in women with borderline personality disorder and early traumatization. *Arch Gen Psychiatry*, 57, 1115-1122.
- Due, D.L., Hall, W.G. & Ruben, D.C. (2000) Smoking cues induce neural activation in deprived smokers (abstract). *Neuroimage*, 11, S37.
- Duncan, G.E., Breese, G.R., Criswell, H., Stumpf, W.E., Mueller, R.A. & Covey, J.B. (1986) Effects of antidepressant drugs injected into the amygdala on behavioral responses of rats in the forced swim test. *J Pharmacol Exp Therap*, 238, 758-762.

- Duncan, G.E., Johnson, K.B. & Breese, G.R. (1993) Topographic patterns of brain activity in response to swim stress: assessment by 2-deoxyglucose uptake and expression of Fos-like immunoreactivity. *J Neurosci*, 13, 3932-3943.
- Edwards, D.A., Nahai, F.R. & Wright, P. (1993) Pathways linking the olfactory bulbs with the medial preoptic anterior hypothalamus are important for intermale aggression in mice. *Physiol Behav*, 53, 611-615.
- Ehrman, R.N., Robbins, S.J., Childress, A.R., & O'Brien, C.P. (1992) Conditioned responses to cocaine-related stimuli in cocaine abuse patients. *Psychopharmacology*, 107, 523-529.
- Emery, N.J., Machado, C.J., Mendonza, S.P., Capitanio, J.P., Mason, W.A. & Amaral, D.G. (1998) Role of the amygdala in dyadic social interactions and the stress response in monkeys. *Society for Neuroscience Abstracts*, 24, 780.
- Ettenberg, A., Pettit, H.O., Bloom, F.E. & Koob, G.F. (1982) Heroin and cocaine intravenous self-administration in rats: mediation by separate neural systems. *Psychopharmacology*, 78, 204-209.
- Everitt, B.J., Cador, M. & Robbins, T.W. (1989) Interactions between the amygdala and ventral striatum in stimulus-reward associations: studies using a second-order schedule of sexual reinforcement. *Neuroscience*, 30, 63-75.
- Eyler, F.D., Behnke, M., Conlon, M., Woods, N.S. & Wobie, K. (1998) Birth outcome from a prospective, matched study of prenatal crack/cocaine use: II. Interactive and dose effects on neurobehavioral assessment. *Pediatrics*, 101, 237-241.
- Fagergren, P. & Hurd, Y.L. (1999) Mesolimbic gender differences in peptide CART mRNA expression: effects of cocaine. *Neuroreport*, 10, 3449-3452.
- File, S.E. (1980) The use of social interaction as a method for detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs. *J Neurosci Methods*, 2, 219-238.
- File, S.E. (1993) The social interaction test of anxiety. *Neurosci Protocols*, 10, 1-7.
- File, S.E., Gonzalez, L.E. & Andrews, N. (1996) Comparative study of pre- and postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests. *J Neurosci*, 16, 4810-4815.
- File, S.E. & Hyde, J.R. (1978) Can social interaction be used to measure anxiety? *Br J Pharmacol*, 62, 19-24.
- Forman, L.J. & Estilow, S. (1988) Cocaine influences beta-endorphin levels and release. *Life Sci*, 43, 309-315.
- Forstl, H., Burns, A., Luthert, P., Cairns, N., Lantos, P. & Levy, R. (1992) Clinical and neuropathological correlates of depression in Alzheimer's disease. *Psychol Med*, 22, 877-884.

- Frick, G.S. & Dow-Edwards, D.L. (1995) The effects of cocaine on cerebral metabolic function in periweanling rats: the roles of serotonergic and dopaminergic uptake blockade. *Brain Res Dev Brain Res*, 88, 158-170.
- Fudge, J. L., Powers, J. M., Haber, S.N. & Caine, E.D. (1998) Considering the role of the amygdala in psychotic illness: a clinicopathological correlation. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 10, 383-394.
- Gaffan, D., Murray, E.A. & Fabre-Thorpe, M. (1993) Interaction of the amygdala with the frontal lobe in reward memory. *Eur J Neurosci*, 5, 968-975.
- Gingras, J.L., Weese-Mayer, D.E., Hume, R.F., Jr. & O'Donnell, K.J. (1992) Cocaine and development: mechanisms of fetal toxicity and neonatal consequences of prenatal cocaine exposure. *Early Hum Dev*, 31, 1-24.
- Gironi Carnevale, U.A., Vitullo, E. & Sadile, A.G. (1990) Post-trial NMDA receptor allosteric blockade differentially influences habituation of behavioral responses to novelty in the rat. *Behav Brain Res*, 39, 187-195.
- Gloor, P., Olivier, A. & Myers, C.E. (1981) The role of the amygdala in the expression of psychic phenomena in temporal lobe seizures. In Y. Ben-Ari (Ed.), *The Amygdaloid Complex*, pp. 489-498. New York: Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
- Goddard, G. (1967) Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature*, 214, 1020-1021.
- Gomes-da-Silva, J., Perez-Rosado, A., de Miguel, R., Fernandez-Ruiz, J., Silva, M. C. & Tavares, M. A. (2000) Neonatal methamphetamine in the rat: evidence for gender-specific differences upon tyrosine hydroxylase enzyme in the dopaminergic nigrostriatal system. *Ann N Y Acad Sci*, 914, 431-438.
- Gonzalez, L.E., Andrews, N. & File, S.E. (1996) 5-HT<sub>1A</sub> and benzodiazepine receptors in the basolateral amygdala modulate anxiety in the social interaction test, but not in the elevated plus-maze. *Brain Res*, 732, 145-153.
- Grant, S., London, E.D., Newlin, D.B., Villemagne, V.L., Liu, X., Contoreggi, C., Phillips, R.L., Kimes, A.S. & Margolin, A. (1996) Activation of memory circuits during cue-elicited cocaine craving. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 12040-12045.
- Greenberg, N., Scott, M. & Crews, D. (1984) Role of the amygdala in the reproductive and aggressive behavior of the lizard, *Anolis carolinensis*. *Physiol Behav*, 32, 147-151.
- Halgren, E. (1992) Emotional neurophysiology of the amygdala within the context of human cognition. In J.P. Aggleton (Ed.), *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory, and Mental Dysfunction*, pp. 191-228. New York: Wiley-Liss.
- Hammer, R.P., Jr. & Cooke, E.S. (1994) Gradual tolerance of metabolic activity is produced in mesolimbic regions by chronic cocaine treatment, while subsequent cocaine challenge activates extrapyramidal regions of rat brain. *J Neurosci*, 14, 4289-4298.

- Harris, V.S. & Sachs, B.D. (1975) Copulatory behavior in male rats following amygdaloid lesions. *Brain Res*, 86, 514-518.
- Hatfield, T., Han, J.S., Conley, M., Gallagher, M. & Holland, P. (1996) Neurotoxic lesions of basolateral, but not central, amygdala interfere with Pavlovian second-order conditioning and reinforcer devaluation effects. *J Neurosci*, 16, 5256-5265.
- Hebert, M.A., Blanchard, D.C. & Blanchard, R.J. (1999) Intravenous cocaine precipitates panic-like flight responses and lasting hyperdefensiveness in laboratory rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 63, 349-360.
- Herzog, A.G. & Kemper, T.L. (1980) Amygdaloid changes in aging and dementia. *Arch Neurol*, 37, 625-629.
- Higgins, G.A., Jones, B.J., Oakley, N.R. & Tyers, M.B. (1991) Evidence that the amygdala is involved in the disinhibitory effects of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists. *Psychopharmacology*, 104, 545-551.
- Hines, M., Allen, L.S. & Gorski, R.A. (1992) Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Brain Res*, 579, 321-326.
- Hirayasu, Y., Shenton, M.E., Salisbury, D.F., Dickey, C.C., Fischer, I.A., Mazzoni, P., Kislner, T., Arakaki, H., Kwon, J.S., Anderson, J.E., Yurgelun-Todd, D., Tohen, M. & McCarley, R.W. (1998) Lower left temporal lobe MRI volumes in patients with first-episode schizophrenia compared with psychotic patients with first-episode affective disorder and normal subjects. *Am J Psychiatry*, 155, 1384-1391.
- Hobson, R.P., Ouston, J. & Lee, A. (1988) Emotion recognition in autism: coordinating faces and voices. *Psychol Med*, 18, 911-923.
- Holland, P.C. & Gallagher, M. (1999) Amygdala circuitry in attentional and representational processes. *Trends Cogn Sci*, 3, 65-73.
- Homberg, J.R., van den Akker, M., Raaso, H.S., Wardeh, G., Binnekade, R., Schoffelmeer, A.N. & de Vries, T.J. (2002) Enhanced motivation to self-administer cocaine is predicted by self-grooming behaviour and relates to dopamine release in the rat medial prefrontal cortex and amygdala. *Eur J Neurosci*, 15, 1542-1550.
- Houdi, A.A., Bardo, M.T. & Van Loon, G.R. (1989) Opioid mediation of cocaine-induced hyperactivity and reinforcement. *Brain Res*, 497, 195-198.
- Hurd, Y.L. (1996) Differential messenger RNA expression of prodynorphin and proenkephalin in the human brain. *Neuroscience*, 72, 767-783.
- Hurd, Y.L., McGregor, A. & Pontén, M. (1997) In vivo amygdala dopamine levels modulate cocaine self-administration behaviour in the rat: D1 dopamine receptor involvement. *Eur J Neurosci*, 9, 2541-2548.

- Hurd, Y.L. & Fagergren P. (2000) Human cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) mRNA is highly expressed in limbic- and sensory-related brain regions. *J Comp Neurol*, 425, 583-98.
- Hurd, Y.L., Svensson, P. & Ponten, M. (1999) The role of dopamine, dynorphin, and CART systems in the ventral striatum and amygdala in cocaine abuse. *Ann N Y Acad Sci*, 877, 499-506.
- Hurd, Y.L., Weiss, F., Koob, G.F., And, N.E. & Ungerstedt, U. (1989) Cocaine reinforcement and extracellular dopamine overflow in rat nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study. *Brain Res*, 498, 199-203.
- Hutchings, D.E. (1993) The puzzle of cocaine's effects following maternal use during pregnancy: are there reconcilable differences? *Neurotoxicol Teratol*, 15, 281-286.
- Irwin, W., Davidson, R.J., Lowe, M.J., Mock, B.J., Sorenson, J.A. & Turski, P.A. (1996) Human amygdala activation detected with echo-planar functional magnetic resonance imaging. *NeuroReport*, 7, 1765-1769.
- Ito, C., Onodera, K., Sakurai, E., Sato, M. & Watanabe, T. (1997) Effect of cocaine on the histaminergic neuron system in the rat brain. *J Neurochem*, 69, 875-878.
- Itzhak, Y. (1993) Differential regulation of brain opioid receptors following repeated cocaine administration to guinea pigs. *Drug Alcohol Depend*, 33, 53-59.
- Jaffe, J.H. (1990) Drug addiction and drug abuse. In A.G. Gilman, T.W. Rall, A.S. Nies & P. Taylor (Eds.), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8<sup>th</sup> edn., pp.522-573. New York: Pergamon Press.
- Johanson, C.E. & Fischman, M.W. (1989) The pharmacology of cocaine related to its abuse. *Pharmacol Rev*, 41, 3-52.
- Johns, J.M., Means, M.J., Anderson, D.R., Means, L.W. & McMillen, B.A. (1992) Prenatal exposure to cocaine. II: Effects on open-field activity and cognitive behavior in Sprague-Dawley rats. *Neurotoxicol Teratol*, 14, 343-349.
- Johns, J.M., Noonan, L.R., Zimmerman, L.I., McMillen, B.A., Means, L.W., Walker, C.H., Lubin, D.A., Meter, K.E., Nelson, C.J., Pedersen, C.A., Mason, G.A. & Lauder, J.M. (1998) Chronic cocaine treatment alters social/aggressive behavior in Sprague-Dawley rat dams and in their prenatally exposed offspring. *Ann N Y Acad Sci*, 846, 399-404.
- Johnston, M.V. & Coyle, J.T. (1981) Development of central neurotransmitter systems. *Ciba Found Symp*, 86, 251-270.
- Kalivas, P.W., Duffy, P., DuMars, L.A. & Skinner, C. (1988) Behavioral and neurochemical effects of acute and daily cocaine administration in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 245, 485-492.

- Kalynchuk, L.E., Pearson, D.M., Pinel, J.P. & Meaney, M.J. (1999) Effect of amygdala kindling on emotional behavior and benzodiazepine receptor binding in rats. *Ann N Y Acad Sci*, 877, 737-741.
- Kalynchuk, L.E., Pinel, J.P., Treit, D. & Kippin, T.E. (1997) Changes in emotional behavior produced by long-term amygdala kindling in rats. *Biol Psychiatry*, 41, 438-451.
- Kantak, K.M., Black, Y., Valencia, E., Green-Jordan, K. & Eichenbaum, H.B. (2002) Dissociable effects of lidocaine inactivation of the rostral and caudal basolateral amygdala on the maintenance and reinstatement of cocaine-seeking behavior in rats. *J Neurosci*, 22, 1126-1136.
- Kelly, P.H. & Iversen, S.D. (1976) Selective 6OHDA-induced destruction of mesolimbic dopamine neurons: abolition of psychostimulant-induced locomotor activity in rats. *Eur J Pharmacol*, 40, 45-56.
- Kirby, L.G., Allen, A.R. & Lucki, I. (1995) Regional differences in the effects of forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Brain Res*, 682, 189-196.
- Kling, A.S. (1972) Effects of amygdectomy on social-affective behavior in non-human primates. In B.E. Eleftheriou (Ed.), *The Neurobiology of the Amygdala*, pp. 511-536. New York: Plenum Press.
- Kling, A.S. & Brothers, L. (1992) Anatomical organization of the primate amygdaloid complex. In J.P. Aggleton (Ed.), *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory, and Mental Dysfunction*, pp. 353-377. New York: Wiley-Liss.
- Kling, A., Steklis, H.D. & Deutsch, S. (1979) Radiotelemetered activity from the amygdala during social interactions in the monkey. *Exp Neurol*, 66, 88-96.
- Koegler, S.M., Seidler, F.J., Spencer, J.R. & Slotkin, T.A. (1991) Ischemia contributes to adverse effects of cocaine on brain development: suppression of ornithine decarboxylase activity in neonatal rat. *Brain Res Bull*, 27, 829-834.
- Koob, G.F. (1999) The role of the striatopallidal and extended amygdala systems in drug addiction. *Ann N Y Acad Sci*, 877, 445-460.
- Koob, G.F. & Bloom, F.E. (1998) Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science*, 242, 715-723.
- Koylu, E.O., Couceyro, P.R., Lambert, P.D. & Kuhar, M.J. (1998) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide immunohistochemical localization in the rat brain. *J Comp Neurol*, 391, 115-132.
- Kutscher, C.L. & Nelson, B.K. (1985) Dosing considerations in behavioral teratology testing. *Neurobehav Toxicol Teratol*, 7, 663-664.
- LaBar, K.S., LeDoux, J.E., Spencer, D.D. & Phelps, E.A. (1995) Impaired fear conditioning following unilateral temporal lobectomy in humans. *J Neurosci*, 15, 6846-6855.

- Lauder, J.M. (1988) Neurotransmitters as morphogens. *Prog Brain Res*, 73, 365-387.
- LeDoux, J.E. (1987) Emotion. In F. Plum (Ed.), *Handbook of Physiology. Section 1: The Nervous System. Vol. 5; Higher Functions of the Brain*, pp. 419-460, Bethesda, MD: American Physiological Society.
- LeDoux, J. (2000) The amygdala and emotion: A view through fear. In J.P. Aggleton (Ed.), *The Amygdala. A Functional Analysis*, 2nd ed., pp. 289-310. New York: Oxford University Press.
- Lee, M.A., Paris, J.M. & Cunningham, K.A. (1991) Cocaine-induced behavioral sensitization is not associated with loss of GABA-immunoreactive neurons in the amygdala. *Brain Res*, 545, 351-354.
- Lehman, M.N. & Winans, S.S. (1982) Vomeronasal and olfactory pathways to the amygdala controlling male hamster sexual behavior: autoradiographic and behavioral analyses. *Brain Res*, 240, 27-41.
- Lehman, M.N., Winans, S.S. & Powers, J.B. (1980) Medial nucleus of the amygdala mediates chemosensory control of male hamster sexual behavior. *Science*, 210, 557-560.
- Li, S.J., Sivam, S.P., McGinty, J.F., Jiang, H.K., Douglass, J., Calavetta, L. & Hong, J.S. (1988) Regulation of the metabolism of striatal dynorphin by the dopaminergic system. *J Pharmacol Exp Ther*, 246, 403-408.
- London, E.D., Cascella, N.G., Wong, D.F., Phillips, R.L., Dannals, R.F., Links, J.M., Herning, R., Grayson, R., Jaffe, J.H. & Wagner, H.N., Jr. (1990) Cocaine-induced reduction of glucose utilization in human brain. A study using positron emission tomography and [fluorine 18]-fluorodeoxyglucose. *Arch Gen Psychiatry*, 47, 567-574.
- Luiten, P.G., Koolhaas, J.M., de Boer, S. & Koopmans, S.J. (1985) The cortico-medial amygdala in the central nervous system organization of agonistic behavior. *Brain Res*, 332, 283-297.
- Macdonald, H., Rutter, M., Howlin, P., Rios, P., Le Conteur, A., Evered, C. & Folstein, S. (1989) Recognition and expression of emotional cues by autistic and normal adults. *J Child Psychol Psychiatry*, 30, 865-877.
- Magalhães, A., Summavielle, T., Tavares, M.A. & de Sousa, L. (2001a) Open-field activity along the development of rats postnatally exposed to cocaine. Livro de resumos do 8<sup>th</sup> Meeting of the International Neurotoxicology Association. 120.
- Magalhães, A., Castro-Vale, I., Tavares, M.A. & de Sousa, L. (2001b) The effects of postnatal cocaine exposure in the performance of rats in a forced swim test. Livro de resumos do 8<sup>th</sup> Meeting of the International Neurotoxicology Association. 121.
- Markowitsch, H.J., Calabrese, P., Würker, M., Durwen, H.F., Kessler, J., Babinsky, R., Brechtelsbauer, D., Heuser, L. & Gehlen, W. (1994) The amygdala's contribution to memory-a study on two patients with Urbach-Wiethe disease. *NeuroReport*, 5, 1349-1352.

- Mash, D.C. & Staley, J.K. (1999) D3 dopamine and kappa opioid receptor alterations in human brain of cocaine-overdose victims. *Ann N Y Acad Sci*, 877, 507-522.
- Mayes, L.C., Bornstein, M.H., Chawarska, K. & Granger, R.H. (1995) Information processing and developmental assessments in 3-month-old infants exposed prenatally to cocaine. *Pediatrics*, 95, 539-545.
- McDonald, A.J. (1998) Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol*, 55, 257-332.
- McGregor, A., Baker, G. & Roberts, D.C. (1994) Effect of 6-hydroxydopamine lesions of the amygdala on intravenous cocaine self-administration under a progressive ratio schedule of reinforcement. *Brain Res*, 646, 273-278.
- McKim, W.A. (1991) Psychomotor stimulants. In W.A. McKim (Ed.), *Drugs and Behavior. An Introduction to Behavioral Pharmacology*, 2<sup>nd</sup> edn., pp. 201-226. New Jersey: Prentice Hall.
- Meil, W.M. & See, R.E. (1997) Lesions of the basolateral amygdala abolish the ability of drug associated cues to reinstate responding during withdrawal from self-administered cocaine. *Behav Brain Res*, 87, 139-148.
- Mello, N.K. & Negus, S.S. (2000) Interactions between kappa opioid agonists and cocaine. Preclinical studies. *Ann N Y Acad Sci*, 909, 104-132.
- Misra, A.S. (1976) Disposition and biotransformation of cocaine. In S.J. Mule (Ed.), *Cocaine: Chemical, Biological, Clinical, Social and Treatment Aspects*, pp. 73-90. Cleveland, OH: CRC Press.
- Moldow, R.L. & Fischman, A.J. (1987) Cocaine induced secretion of ACTH, beta-endorphin, and corticosterone. *Peptides*, 8, 819-822.
- Molina, V.A., Wagner, J.M. & Spear, L.P. (1994) The behavioral response to stress is altered in adult rats exposed prenatally to cocaine. *Physiol Behav*, 55, 941-945.
- Moore, R.Y. & Bloom, F.E. (1978) Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the dopamine systems. *Annu Rev Neurosci*, 1, 129-169.
- Morales, M., Battenberg, E. & Bloom, F.E. (1998) Distribution of neurons expressing immunoreactivity for the 5HT<sub>3</sub> receptor subtype in the rat brain and spinal cord. *J Comp Neurol*, 402, 385-401.
- Morgan, H.D., Watchus, J.A., Milgram, N.W. & Fleming, A.S. (1999) The long lasting effects of electrical stimulation of the medial preoptic area and medial amygdala on maternal behavior in female rats. *Behavioural Brain Research*, 99, 61-73.
- Mori, E., Ikeda, M., Hirono, N., Kitagaki, H., Himamura, T. & Shimomura, T. (1999) Amygdala volume and emotional memory in Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry*, 156, 216-222.

- Morris, J.S., Frith, C.D., Pertt, D.I., Rowland, D., Young, A.W., Calder, A.J. & Dolan, R.J. (1996) A differential neural response in the human amygdala to fearful and happy facial expressions. *Nature*, 383, 812-813.
- Musto, D.F. (1989) Evolution of American attitudes toward substance abuse. In D.E. Hutchings (Ed.), *Prenatal Abuse of Licit and Illicit Drugs*, *Ann N Y Acad Sci*, 562, 3-7.
- Nayak, P.K., Misra, A.L. & Mule, S.J. (1976) Physiological disposition and biotransformation of (3H) cocaine in acutely and chronically treated rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 196, 556-569.
- Neuspiel, D.R. & Hamel, S.C. (1991) Cocaine and infant behavior. *J Dev Behav Pediatr*, 12, 55-64.
- Nevins, M.E. & Anthony, E.W. (1994) Antagonists at the serotonin-3 receptor can reduce the fear-potentiated startle response in the rat: evidence for different types of anxiolytic activity? *J Pharmacol Exp Ther*, 268, 248-254.
- Nunes, E.V. & Rosecan, J.S. (1987) Human neurobiology of cocaine. In H.I. Spitz & J.S. Rosecan (Eds.), *Cocaine Abuse: New directions in treatment and research*, pp. 48-93. New York: Brunner/Hazel Publisher.
- Oro, A.S. & Dixon, S.D. (1987) Perinatal cocaine and methamphetamine exposure: maternal and neonatal correlates. *J Pediatr*, 111, 571-578.
- Overstreet, D.H., Moy, S.S., Lubin, D.A., Gause, L.R., Lieberman, J.A. & Johns, J.M. (2000) Enduring effects of prenatal cocaine administration on emotional behavior in rats. *Physiol Behav*, 70, 149-156.
- Packard, M.G., Cahill, L. & McGaugh, J.L. (1994) Amygdala modulation of hippocampal-dependent and caudate nucleus-dependent memory processes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 8477-8481.
- Palkovits, M. & Brownstein, M.J. (1988) *Maps and guide to microdissection of the rat brain*. New York: Elsevier Science Publishing.
- Paré, D. & Smith, Y. (1998) Intrinsic circuitry of the amygdaloid complex: common principles of organization in rats and cats. *Trends Neurosci*, 21, 240-241.
- Pearlson, G. D., Barta, P.E., Powers, R.E., Menon, R.R., Richards, S.S., Aylward, E.H., Federman, E.B., Chase, G.A., Petty, R.G. & Tien, A.Y. (1997) Medial and superior temporal gyral volumes and cerebral asymmetry in schizophrenia versus Bipolar Disorder. *Biol Psychiatry*, 41, 1-14.
- Perrett, D. L., Smith, P. A., Potter, D. D., Mistlin, A. J., Head, A. S., Milner, A. D. & Jeeves, M. A. (1984) Neurones responsive to faces in the temporal cortex: studies of functional organization, sensitivity to identity and relation to perception. *Hum Neurobiol*, 3, 197-208.

- Pfaus, J.G., Kleopoulos, S.P., Mobbs, C.V., Gibbs, R.B. & Pfaff, D.W. (1993) Sexual stimulation activates c-fos within estrogen-concentrating regions of the female rat forebrain. *Brain Res*, 624, 253-267.
- Pierce, R.C., Reeder, D.C., Hicks, J., Morgan, Z.R. & Kalivas, P.W. (1998) Ibotenic acid lesions of the dorsal prefrontal cortex disrupt the expression of behavioral sensitization to cocaine. *Neuroscience*, 82, 1103-1114.
- Pilla, M., Perachon, S., Sautel, F., Garrido, F., Mann, A., Wermuth, C.G., Schwartz, J.C., Everitt, B.J. & Sokoloff, P. (1999) Selective inhibition of cocaine-seeking behaviour by a partial dopamine D3 receptor agonist. *Nature*, 400, 371-375.
- Pitkänen, A. (2000) Connectivity of the rat amygdaloid complex. In J.P. Aggleton (Ed.), *The Amygdala. A Functional Analysis*, 2nd edn., pp. 31-115. New York: Oxford University Press.
- Pitkänen, A., Savander, V. & LeDoux, J.E. (1997) Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends in Neuroscience*, 20, 517-523.
- Phelps, E. A., LaBar, K.S., Anderson, A.K., O'Connor, K.J., Fullbright, R.K. & Spencer, D.D. (1998) Specifying the contributions of the human amygdala to emotional memory: A case study. *Neurocase*, 4, 527-540.
- Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N. & Jalfre, M. (1978) Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol*, 47, 379-391.
- Porsolt, R.D., Le Pichon, M. & Jalfre, M. (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266, 730-732.
- Post, R. (1976) Clinical aspects of cocaine: assessment of acute and chronic effects in animals and men. In S.J. Mule (Ed.), *Cocaine: Chemical, Biological, Social, and Treatment Aspects*, pp. 203-215. Cleveland.
- Post, R.M. (1975) Cocaine psychoses: a continuum model. *Am J Psychiatry*, 132, 225-231.
- Post, R.M. (1980) Intermittent versus continuous stimulation: effect of time interval on the development of sensitization or tolerance. *Life Sci*, 26, 1275-1282.
- Post, R. M., Weiss, S. R., Li, H., Smith, M.A., Zhang, L.X., Xing, G., Osuch, E.A. & McCann, U.D. (1998) Neural plasticity and emotional memory. *Dev Psychopathol*, 10, 829-855.
- Post, R., Weiss, S. & Smith, M. (1995a) Sensitization and kindling: implications for the evolving neural substrates of PTSD. In M. Friedman, D. Charney, & A. Deutch (Eds.), *Neurobiology and Clinical Consequences of Stress From Normal Adaptation to PTSD*, pp. 203-224. New York: Raven Press.
- Post, R.M., Weiss, S.R., Smith, M., Rosen, J. & Frye, M. (1995b) Stress, conditioning, and the temporal aspects of affective disorders. *Ann N Y Acad Sci*, 771, 677-696.

- Price, J.L., Russchen, F.T. & Amaral, D.G. (1987) The limbic region. II: The amygdaloid complex. In A. Björklund, T. Hökfelt & L.W. Swanson (Eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol. 5, Integrated Systems of the CNS, Part I*, pp. 279-388. Amsterdam: Elsevier.
- Rajendren, G. & Moss, R.L. (1993) The role of the medial nucleus of amygdala in the mating-induced enhancement of lordosis in female rats: the interaction with luteinizing hormone-releasing hormone neuronal system. *Brain Res*, 617, 81-86.
- Rees, D.C., Francis, E.Z. & Kimmel, C.A. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicants: a workshop summary. *Neurotoxicology*, 11, 257-269.
- Richter, R.M., Pich, E.M., Koob, G.F. & Weiss, F. (1995) Sensitization of cocaine-stimulated increase in extracellular levels of corticotropin-releasing factor from the rat amygdala after repeated administration as determined by intracranial microdialysis. *Neurosci Lett*, 187, 169-172.
- Richter, R.M. & Weiss, F. (1999) In vivo CRF release in rat amygdala is increased during cocaine withdrawal in self-administering rats. *Synapse*, 32, 254-261.
- Rolls, E.T. (1994) A theory of emotion and consciousness, and its application to understanding the neural basis of emotion. In M.S. Gazzaniga (Ed.), *The Cognitive Neurosciences*, pp. 1091-1106. Cambridge, Massachusetts: MIT Press.
- Roozendaal, B., Koolhaas, J.M. & Bohus, B. (1991) Central amygdala lesions affect behavioral and autonomic balance during stress in rats. *Physiol Behav*, 50, 777-781.
- Royce, J.R. (1977) On the construct validity of open-field measures. *Psychological Bulletin*, 84, 1098-1106.
- Sadile, A.G. (1996) Long term habituation of theta-related activity components of albino rats in the lát-maze. In P.R. Sanberg, K.P. Ossenkopp & M. Kovaliers (Eds.), *Motor activity and movement disorders*, pp. 3-55. Totowa: Humana Press.
- Sajdyk, T.J. & Gehlert, D.R. (2000) Astressin, a corticotropin releasing factor antagonist, reverses the anxiogenic effects of urocortin when administered into the basolateral amygdala. *Brain Res*, 877, 226-234.
- Sajdyk, T.J. & Shekhar, A. (2000) Sodium lactate elicits anxiety in rats after repeated GABA receptor blockade in the basolateral amygdala. *Eur J Pharmacol*, 394, 265-273.
- Sajdyk, T.J. & Shekhar, A. (1997) Excitatory amino acid receptors in the basolateral amygdala regulate anxiety responses in the social interaction test. *Brain Res*, 764, 262-264.
- Sajdyk, T.J., Schober, D.A., Smiley, D.L. & Gehlert, D.R. (2002) Neuropeptide Y-Y2 receptors mediate anxiety in the amygdala. *Pharmacol Biochem Behav*, 71, 419-423.
- Schafe, G.E. & Bernstein, I.L. (1996) Forebrain contribution to the induction of a brainstem correlate of conditioned taste aversion: I. The amygdala. *Brain Res*, 741, 109-116.

- Schneider, F., Grood, W., Weiss, U., Klose, U., Mayer, K.R., Nägele, T. & Gur, R.C. (1997) Functional MRI reveals left amygdala activation during emotion. *Psychiatry Res*, 76, 75-82.
- Schneider, F., Gur, R. E., Mozley, L.H., Smith, R.J., Mozley, P.D., Censits, D.M., Alavi, A. & Gur, R.C. (1995) Mood effects on limbic blood flow correlate with emotional self-rating: a PET study with oxygen-15 labeled water. *Psychiatry Res*, 61, 265-283.
- Schneider, F., Habel, U., Wagner, M., Franke, P., Salloum, J.B., Shah, N.J., Toni, I., Sulzbach, C., Höning, K., Maier, W., Gaebel, W. & Zilles, K. (2001) Subcortical Correlate of Craving in Recently Abstinent Alcoholic Patients. *Am J Psychiatry*, 158, 1075-1082.
- Schulteis, G., Ahmed, S.H., Morse, A.C., Koob, G.F. & Everitt, B.J. (2000) Conditioning and opiate withdrawal. *Nature*, 405, 1013-1014.
- Seidler, F.J. & Slotkin, T.A. (1993) Prenatal cocaine and cell development in rat brain regions: effects on ornithine decarboxylase and macromolecules. *Brain Res Bull*, 30, 91-99.
- Seidler, F.J., Temple, S.W., McCook, E.C. & Slotkin, T.A. (1995). Cocaine inhibits central noradrenergic and dopaminergic activity during the critical developmental period in which catecholamines influence cell development. *Brain Res Dev Brain Res*, 85, 48-53.
- Sheline, Y., Gado, M.H. & Price, J.L. (1998) Amygdala core nuclei volumes are decreased in recurrent major depression. *NeuroReport*, 9, 2023-2028.
- Shin, L.M., Kosslyn, S.M., McNally, R.J., Alpert, N.M., Thompson, W.L., Rauch, S.L., Macklin, M.L. & Pitman, R.K. (1997) Visual imagery and perception in posttraumatic stress disorder. A positron emission tomographic investigation. *Arch Gen Psychiatry*, 54, 233-241.
- Silva, M.C., Silva-Araújo, A., Abreu, S., Xavier, M.R., Monteiro, L.S. & Tavares, M.A. (1995) Effects of prenatal cocaine exposure on postnatal growth patterns of male Wistar rats. *Neurotoxicol Teratol*, 17, 471-477.
- Silva-Araújo, A., Abreu-Dias, P., Silva, M.C. & Tavares, M.A. (1995a) Effects of prenatal cocaine exposure in the photoreceptor cells of the rat retina. *Mol Neurobiol*, 11, 77-86.
- Silva-Araújo, A., Salgado-Borges, J., Cardoso, V., Silva, M.C., Castro-Correia, J. & Tavares, M.A. (1993) Changes in the retinal ganglion cell layer and optic nerve of rats exposed neonatally to cocaine. *Exp Eye Res*, 56, 199-206.
- Silva-Araújo, A., Salgado-Borges, J. & Tavares, M.A. (1991a) Morphological changes in the optic nerve after chronic exposure of neonatal rats to cocaine and amphetamine. *Ophthalmic Res*, 23, 295-302.
- Silva-Araújo, A., Salgado-Borges, J. & Tavares, M.A. (1991b) Morphometric study of the optic nerve after postnatal exposure to psychostimulants in the rat. *Eur J Neurosci*, Suppl. 2, 265.
- Silva-Araújo, A., Silva, M.C., Abreu-Dias, P. & Tavares, M.A. (1995b) Effects of prenatal cocaine exposure in the retinal ganglion cell layer of the rat. A morphometric analysis. *Mol Neurobiol*, 11, 87-97.

- Silva-Araújo, A., Silva, M.C., Simon, A., Nguyen-Legros, J., Ali, S.F. & Tavares, M.A. (1996a) The effects of prenatal exposure to cocaine on the dopaminergic cells in the rat retina. An immunocytochemical and neurochemical study. *Exp Eye Res*, 62, 697-708.
- Silva-Araújo, A.L. & Tavares, M.A. (1995) Expression of glial fibrillary acidic protein in the rat retina after exposure to psychostimulants. *Retina*, 15, 241-247.
- Silva-Araújo, A., Tavares, M.A., Patacao, M.H. & Carolino, R.M. (1996b) Retinal hemorrhages associated with in utero exposure to cocaine. Experimental and clinical findings. *Retina*, 16, 411-418.
- Silva-Araújo, A., & Tavares, M.A. (1996) Development of the eye after gestational exposure to cocaine. Vascular disruption in the retina of rats and humans. *Ann N Y Acad Sci*, 801, 274-288.
- Simerly, R.B., Chang, C., Muramatsu, M. & Swanson, L.W. (1990) Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol*, 294, 76-95.
- Simerly, R.B., Young, B.J., Capozza, M.A. & Swanson, L.W. (1989) Estrogen differentially regulates neuropeptide gene expression in a sexually dimorphic olfactory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 4766-4770.
- Spanagel, R., Herz, A. & Shippenberg, T.S. (1990) The effects of opioid peptides on dopamine release in the nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem*, 55, 1734-1740.
- Spanagel, R., Herz, A. & Shippenberg, T.S. (1992) Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 2046-2050.
- Spear, L.P. (1997) Neurobehavioral abnormalities following exposure to drugs of abuse during development. In B.A. Johnson, J.D. Roache (Eds.), *Drug Addiction and its Treatment: Nexus of Neuroscience and Behavior*, pp 233-255. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
- Spear, L.P. & Brick, J. (1979). Cocaine-induced behavior in the developing rat. *Behavioral and Neural Biology*, 26, 401-415.
- Spear, L.P., Frambes, N.A. & Kirstein, C.L. (1989a) Fetal and maternal brain and plasma levels of cocaine and benzoylecgonine following chronic subcutaneous administration of cocaine during gestation in rats. *Psychopharmacology*, 97, 427-431.
- Spear, L.P. & Heyser, C.J. (1992) Cocaine and the developing nervous system: laboratory findings. In I.S. Zagon & T.A. Slotkin (Eds.), *Maternal Substance Abuse and the Developing Nervous System*, pp. 155-175. San Diego: Academic Press.

- Spear, L.P., Kirstein, C.L. & Frambes, N.A. (1989b) Cocaine effects on the developing central nervous system: behavioral, psychopharmacological, and neurochemical studies. *Ann N Y Acad Sci*, 562, 290-307.
- Summavielle, T., Magalhães, A., Castro-Vale, I., de Sousa, L. & Tavares, M.A. (2002) Neonatal exposure to cocaine: altered dopamine levels in the amygdala and behavioral outcomes in the developing rat. *Ann N Y Acad Sci*, 965, 515-521.
- Summavielle, T., Silva-Araujo, A., Silva, M.C. & Tavares, M.A. (2000) Effects of neonatal exposure to cocaine in the development of the neurotransmitters retinal systems: an immunocytochemical and neurochemical study. *Ann N Y Acad Sci*, 914, 418-430.
- Tarr, R.S. (1977) Role of the amygdala in the intraspecies aggressive behavior of the iguanid lizard, *Sceloporus occidentalis*. *Physiol Behav*, 18, 1153-1158.
- Tavares, M.A. & Silva, M.C. (1993) Body weight gain and hippocampal volumes of rats exposed neonatally to psychostimulants. *Brain Res*, 619, 137-145.
- Tavares, M.A. & Silva, M.C. (1996) Differential effects of prenatal exposure to cocaine and amphetamine on growth parameters and morphometry of the prefrontal cortex in the rat. *Ann N Y Acad Sci*, 801, 256-273.
- Tavares, M.A., Silva, M.C., Silva-Araujo, A., Xavier, M.R. & Ali, S.F. (1996) Effects of prenatal exposure to amphetamine in the medial prefrontal cortex of the rat. *Int J Dev Neurosci*, 14, 585-596.
- Taylor, M.D., de Ceballos, M.L., Jenner, P. & Marsden, C.D. (1991) Acute effects of D-1 and D-2 dopamine receptor agonist and antagonist drugs on basal ganglia [Met5]- and [Leu5]-enkephalin and neurotensin content in the rat. *Biochem Pharmacol*, 41, 1385-1391.
- Tebartz van Elst, L., Woermann, F.G., Lemieux, L. & Trimble, M.R. (1999) Amygdala enlargement in dysthymia--a volumetric study of patients with temporal lobe epilepsy. *Biol Psychiatry*, 46, 1614-1623.
- Tebartz van Elst, L., Woermann, F., Lemieux, L. & Trimble, M.R. (2000) Increased amygdala volumes in female and depressed humans. A quantitative magnetic resonance imaging study. *Neurosci Lett*, 281, 103-106.
- Tober, C., Rostock, A., Rundfeldt, C. & Bartsch, R. (1996) D-23129: a potent anticonvulsant in the amygdala kindling model of complex partial seizures. *Eur J Pharmacol*, 303, 163-169.
- Trujillo, K.A., Day, R. & Akil, H. (1990) Regulation of striatonigral prodynorphin peptides by dopaminergic agents. *Brain Res*, 518, 244-256.
- Ujike, H., Kuroda, S. & Otsuki, S. (1996) sigma Receptor antagonists block the development of sensitization to cocaine. *Eur J Pharmacol*, 296, 123-128.
- Unterwald, E.M., Horne-King, J. & Kreek, M.J. (1992) Chronic cocaine alters brain mu opioid receptors. *Brain Res*, 584, 314-318.

- Unterwald, E.M., Rubenfeld, J.M. & Kreek, M.J. (1994) Repeated cocaine administration upregulates kappa and mu, but not delta, opioid receptors. *Neuroreport*, 5, 1613-1616.
- Vathy, I., Katay, L. & Mini, K.N. (1993) Sexually dimorphic effects of prenatal cocaine on adult sexual behavior and brain catecholamines in rats. *Brain Res Dev Brain Res*, 73, 115-122.
- Vochteloo, J.D. & Koolhaas, J.M. (1987) Medial amygdala lesions in male rats reduce aggressive behavior: interference with experience. *Physiol Behav*, 41, 99-102.
- Volpe, J.J. (1992) Effect of cocaine use on the fetus. *N Engl J Med*, 327, 399-407.
- Vrang, N., Tang-Christensen, M., Larsen, P.J. & Kristensen, P. (1999) Recombinant CART peptide induces c-Fos expression in central areas involved in control of feeding behaviour. *Brain Res*, 818, 499-509.
- Walsh, R.N. & Cummins, R.A. (1976) The open-field test: a critical review. *Psychological Bulletin*, 83, 482-504.
- Weed, M.R., Vanover, K.E. & Woolverton, W.L. (1993) Reinforcing effect of the D1 dopamine agonist SKF 81297 in rhesus monkeys. *Psychopharmacology*, 113, 51-52.
- Weiss, J.M., Cierpial, M.A. & West, C.H. (1998) Selective breeding of rats for high and low motor activity in a swim test: toward a new animal model of depression. *Pharmacol Biochem Behav*, 61, 49-66.
- Weiss, S.R.B., Li, H., Sitcoske-O'Shea, M. & Post, R.M. (2000a) Amygdala plasticity: the neurobiological implications of kindling. In J.P. Aggleton (Ed.), *The Amygdala. A Functional Analysis*, 2nd edn., pp. 155-194. New York: Oxford University Press.
- Weiss, F., Maldonado-Vlaar, C.S., Parsons, L.H., Kerr, T.M., Smith, D.L. & Ben-Shahar, O. (2000b) Control of cocaine-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats: effects on recovery of extinguished operant-responding and extracellular dopamine levels in amygdala and nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 4321-4326.
- Whitaker-Azmitia, P.M. (1991) Role of serotonin and other neurotransmitter receptors in brain development: basis for developmental pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43, 553-561.
- Whitaker-Azmitia, P.M., Lauder, J.M., Shemmer, A. & Azmitia, E.C. (1987) Postnatal changes in serotonin receptors following prenatal alterations in serotonin levels: further evidence for functional fetal serotonin receptors. *Brain Res*, 430, 285-289.
- White, I.M., Doubles, L. & Rebec, G.V. (1998) Cocaine-induced activation of striatal neurons during focused stereotypy in rats. *Brain Res*, 810, 146-152.
- Whitelaw, R.B., Markou, A., Robbins, T.W. & Everitt, B.J. (1996) Excitotoxic lesions of the basolateral amygdala impair the acquisition of cocaine-seeking behaviour under a second-order schedule of reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)*, 127, 213-224.

- Wilson, J.M., Nobrega, J.N., Corrigall, W.A., Coen, K.M., Shannak, K. & Kish, S.J. (1994) Amygdala dopamine levels are markedly elevated after self- but not passive-administration of cocaine. *Brain Res*, 668, 39-45.
- Wise, R.A., Newton, P., Leeb, K., Burnette, B., Pocock, D. & Justice, J.B., Jr. (1995) Fluctuations in nucleus accumbens dopamine concentration during intravenous cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 120, 10-20.
- Wood, R.D., Bannoura, M.D. & Johanson, I.B. (1994) Prenatal cocaine exposure: effects on play behavior in the juvenile rat. *Neurotoxicol Teratol*, 16, 139-144.
- Wood, R.D., Molina, V.A., Wagner, J.M. & Spear, L.P. (1995) Play behavior and stress responsivity in periadolescent offspring exposed prenatally to cocaine. *Pharmacol Biochem Behav*, 52, 367-374.
- Wood, R.D. & Spear, L.P. (1998) Prenatal cocaine alters social competition of infant, adolescent, and adult rats. *Behav Neurosci*, 112, 419-431.
- Woods, J.R., Jr., Plessinger, M.A. & Clark, K.E. (1987) Effect of cocaine on uterine blood flow and fetal oxygenation. *Jama*, 257, 957-961.
- Woolverton, W.L. & Johnson, K.M. (1992) Neurobiology of cocaine abuse. *Trends Pharmacol Sci*, 13, 193-200.
- Yachnis, A.T., Powell, S.Z., Olmsted, J.J. & Eskin, T.A. (1997) Distinct neurodevelopmental patterns of bcl-2 and bcl-x expression are altered in glioneuronal hamartias of the human temporal lobe. *J Neuropathol Exp Neurol*, 56, 186-198.
- Yuferov, V., Zhou, Y., Spangler, R., Maggos, C.E., Ho, A. & Kreek, M.J. (1999) Acute "binge" cocaine increases mu-opioid receptor mRNA levels in areas of the rat mesolimbic mesocortical dopamine system. *Brain Res Bull*, 48, 109-112.
- Zeigler, S., Lipton, J., Toga, A. & Ellison, G. (1991) Continuous cocaine administration produces persisting changes in brain neurochemistry and behavior. *Brain Res*, 552, 27-35.
- Zuckerman, B., Frank, D.A., Hingson, R., Amaro, H., Levenson, S.M., Kayne, H., Parker, S., Vinci, R., Aboagye, K., Fried, L.E., Cabral, H., Timperi, R. & Bauchner, H. (1989) Effects of maternal marijuana and cocaine use on fetal growth. *N Engl J Med*, 320, 762-768.