JULIA ZACCARELLI MAGALHÃES

Exposição prolongada de ratos a vareniclina: avaliação comportamental, níveis de neurotransmissores cerebrais e estudo bioquímico e anatomopatológico

São Paulo
2016

JULIA ZACCARELLI MAGALHÃES

Exposição prolongada de ratos a vareniclina: avaliação comportamental, níveis de neurotransmissores cerebrais e estudo bioquímico e anatomopatológico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootechnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Helenice de Souza Spinosa

De acordo:_____

Orientador

São Paulo
2016

VERSÃO CORRIGIDA

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3398
FMVZ

Magalhães, Julia Zaccarelli
Exposição prolongada de ratos a vareniclina: avaliação comportamental, níveis de neurotransmissores cerebrais e estudo bioquímico e anatomopatológico / Julia Zaccarelli Magalhães. -- 2016.
123 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof.ª Dr.ª Helenice de Souza Spinosa.

1. Vareniclina. 2. Comportamento. 3. Cognição. 4. Receptores nicotínicos. 5. Sistema nervoso central. I. Título.

São Paulo, 18 de maio de 2015

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Exposição prolongada de ratos a vareniclina: avaliações comportamental, de neurotransmissores cerebrais, bioquímica e anatomopatológica", protocolado sob o CEUA nº 3304041214, utilizando 184 Ratos heterogênicos (184 machos), sob a responsabilidade de Helenice De Souza Spinosa, foi aprovado na reunião de 11/02/2015, e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Prolonged exposure of rats to varenicline: evaluation of the behavior, cerebral neurotransmitters, hematology, biochemistry and pathology", protocol number CEUA 3304041214, utilizing 184 Heterogenics rats (184 males), under the responsibility Helenice De Souza Spinosa, was approved in the meeting of day 02/11/2015, and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENADORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

São Paulo, 04 de dezembro de 2015

À Senhora
Profª. Drª. Esther Lopes Ricci Adari de Camargo
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Após a análise do projeto de pesquisa **Avaliação dos efeitos da exposição prolongada a vareniclina no comportamento social, estereotipado e na memória de ratos Wistar**, Processo CEUA/UPM Nº 132/11/2015, sob sua responsabilidade, a Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Presbiteriana Mackenzie informa que os procedimentos encontram-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2008, do Decreto nº 6.899/2009 e das normas do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e **aprovou** os procedimentos éticos do referido projeto.

Dados do projeto de pesquisa:

Vigência - 11/2015 a 12/2016
Espécie/Linhagem - *Rattus norvegicus*
Nº de animais - 40
Peso - 300g-450g
Idade - 10 semanas
Sexo - Machos
Origem dos animais - Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ-USP

Solicitamos, por gentileza, que após a conclusão do citado projeto seja encaminhada uma cópia digital, do Relatório Final, para finalizarmos o seu processo nesta Comissão.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Elizeu Coutinho de Macedo
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Projeto analisado na Reunião Mensal de novembro.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MAGALHÃES, Julia Zaccarelli

Título: **Exposição prolongada de ratos a vareniclina**: avaliação comportamental, níveis de neurotransmissores cerebrais e estudo bioquímico e anatomopatológico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____ Julgamento:_____

AGRADECIMENTOS

Agradeço muito a todos os ratos que doaram as suas vidas para a realização deste trabalho. Tenho muito respeito por esses animais, sem eles minha pesquisa não teria acontecido.

Agradeço a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo por me dar a oportunidade incrível de desenvolver esse trabalho e de crescer na minha profissão.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processo nº 2015/05049-3) pelo apoio financeiro.

Agradeço a minha orientadora Prof.ª Dr.ª Helenice de Souza Spinosa por me abrir as portas para o mundo científico. Muito obrigada por sua orientação e confiança e por ser um exemplo de dedicação e profissionalismo.

Agradeço a Universidade Presbiteriana Mackenzie pela colaboração no meu trabalho.

Agradeço a todo o pessoal do Laboratório de Neurobiologia e Metabolismo Energético da UPM por terem me recebido e me ajudado durante os meus experimentos.

Agradeço a Esther Lopes Ricci pela amizade, parceria e confiança. Desde a graduação você me deu oportunidade de realizar o meu sonho, de ser pesquisadora. Eu não teria conseguido chegar aonde cheguei sem você.

Agradeço ao Prof.º Jorge Flório e ao Prof.º Ivo Lebrun pela ajuda nos experimentos de HPLC.

Agradeço a Angélica pela ajuda na leitura das lâminas histológicas.

Agradeço aos estagiários e alunos de iniciação científica: Fabiana, Natan, Gabriel e Bianca. Obrigada por toda a ajuda no desenvolvimento dessa pesquisa.

Agradeço a Natália, a Sayuri e a Thaisa por toda a ajuda neste trabalho, pelas conversas que tivemos e pelos momentos de descontração que foram fundamentais.

Agradeço a todos os meus amigos da pós-graduação do VPT, em especial: André, Daniel, Everton, Jéssica, Marianna, Paulinha e Tiago. Muito obrigada pela ajuda e por todos os momentos que passamos juntos!

Agradeço a todos os funcionários do Departamento de Patologia por tudo que fizeram por mim e pelo meu trabalho. Agradeço em especial ao Herculano, Nicolle, Vagner, Adriana, Milena, Luciana, Mauro, Nelson, Cláudio e Luciano.

Agradeço a toda a minha família, em especial, ao meu tio Ricardo Zaccarelli pelo interesse pelo meu trabalho e pelo meu futuro. Obrigada por acreditar em mim e por me acompanhar desde sempre.

Agradeço meus irmãos, Irene e Pedro, e meus sobrinhos, Mariana e Raul. Muito obrigada por estarem na minha vida. Vocês são muito importantes para mim!

Agradeço meu namorado Guilherme, por todo o companheirismo, ajuda e paciência durante todo esse tempo que estamos juntos. Obrigada por ser a pessoa que é!

Agradeço imensamente aos meus pais, Renata e Guilherme, por todo amor e apoio que me deram durante toda a minha vida. Pai, obrigada pelo interesse e por tudo que fez por mim. Mãe, obrigada por ser minha amiga, minha parceira em tudo na minha vida. Eu nunca serei capaz de retribuir por tudo que vocês fizeram por mim. Essa conquista também é de vocês. Amo muito vocês!

Por fim, agradeço a todos aqueles que não foram mencionados, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

MAGALHÃES, J.Z. **Exposição prolongada de ratos a vareniclina**: avaliação comportamental, níveis de neurotransmissores cerebrais e estudo bioquímico e anatomopatológico. [Varenicline prolonged exposure in rats: behavioral evaluation, central neurotransmitter levels, biochemical and histopathologic studies] 2016. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A vareniclina é uma substância química sintética utilizada para o tratamento de tabagismo; atua como agonista de receptores colinérgicos nicotínicos, em especial, como agonista parcial em receptores α4β2 e α3β4, e como agonista total do receptor α7. Levando em consideração que há uma tendência de ampliação do uso clínico da vareniclina para o tratamento da dependência à diversas substâncias de padrão abusivo e que há poucos estudos relacionados aos seus efeitos sobre o comportamento, cognição e sistema motor, tornam-se necessários mais estudos sobre essa substância. Assim, no presente trabalho foram estudados os efeitos da exposição prolongada (28 – 30 dias) de ratos à vareniclina, avaliando-se o consumo de água e de ração, o ganho de peso e o comportamento animal, por meio dos testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado, interação social, comportamento estereotipado, labirinto de Barnes e esquiva passiva. Ainda foram feitas as avaliações dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos em diferentes estruturas cerebrais, bem como avaliações hematológicas, bioquímicas séricas, urinárias e estudos anatomopatológicos e histopatológicos. Foram utilizadas três doses de vareniclina: 0,03 (dose terapêutica para o ser humano), 0,1 e 0,3 mg/kg, por via oral (gavagem). Os resultados mostraram que a exposição prolongada de ratos à diferentes doses de vareniclina não provocou toxicidade, uma vez que não houve alteração no consumo médio de água e de ração e no ganho de peso avaliados semanalmente. Quanto às avaliações comportamentais, observou-se leve aumento da atividade geral no campo aberto, bem como diminuição do tempo de interação social, não sendo capaz de alterar parâmetros neuroquímicos, hematológicos, bioquímicos séricos, urinários, anatomopatológicos e histopatológicos de ratos expostos à vareniclina.

Palavras-chave: Vareniclina. Comportamento. Cognição. Receptores nicotínicos. Sistema nervoso central.

ABSTRACT

MAGALHÃES, J.Z. **Varenicline prolonged exposure in rats:** behavioral evaluation, central neurotransmitter levels, biochemical and histopathologic studies**.** [Exposição prolongada de ratos a vareniclina: avaliação comportamental, níveis de neurotransmissores cerebrais e estudo bioquímico e anatomopatológico]. 2016. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Varenicline is a synthetic chemical used for the smoking addiction treatment; it acts as an agonist of nicotinic cholinergic receptors, in particular, as a partial agonist of receptors α4β2 and α3β4 and as a full agonist of the α7 receptor. More studies about this substance are necessary, given that its clinical use is increasingly being applied to the treatment of addiction to a variety of abusive drugs. Moreover, there are few studies on vareniciline effects on behavior, cognition and the motor system. Thus, in this study the effects of prolonged (28-30 days) exposure of rats to varenicline were evaluated. It was analyzed the water and food consumption, the weight gain and the animal behavior, through open field, elevated plus maze, social interaction, stereotyped behavior, Barnes maze and passive avoidance tests. The neurotransmitter levels and their metabolites in different brain structures were measured and hematological, serum biochemistry, urinary evaluations and pathological and histological studies were carried out. We used three doses of varenicline: 0.03 (therapeutic dose for humans), 0.1 and 0.3 mg/kg orally (gavage). The results showed that prolonged exposure of rats to different doses of varenicline did not cause toxicity, since there were no changes in average weekly consumption of water or food nor body weight gain, which were measured weekly. As for behavioral assessments, there was a slight increase in overall activity in the open field as well as decreased time of social interaction. Varenicline was not able to change neurochemical, hematological, serum biochemical, urinary, pathology and histopathology parameters of rats.

Keywords: Varenicline. Behavior. Cognition. Nicotinic receptors. Central nervous system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da vareniclina 26
Figura 2 - Estrutura simplificada do receptor colinérgico nicotínico do tipo α4β2, localizado na superfície do neurônio dopaminérgico 28
Figura 3 - Desenho esquemático da atuação da nicotina e da vareniclina nos receptores colinérgicos nicotínicos dos neurônios dopaminérgicos. A) Efeito da nicotina proveniente do cigarro. B) Efeito da falta de nicotina. C) Efeito da vareniclina 28
Figura 4 - Biotransformação da vareniclina em animais e no homem 31
Figura 5 - Rato no aparato de campo aberto 45
Figura 6 - Rato no labirinto em cruz elevado 45
Figura 7 - Rato na gaiola de metal para a avaliação do comportamento estereotipado 48
Figura 8 - Aparato do labirinto de Barnes. A) Detalhe do rato adentrando a caixa escape. B) Detalhe da caixa escape sob a plataforma. C) Detalhe das dicas visuais (figuras geométricas) fixadas na parede 49
Figura 9 - Rato no compartimento claro da caixa de esquiva passiva 50
Figura 10 - Atividade geral avaliada em campo aberto de ratos que receberam ou não (controle) uma única administração de vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem. São apresentadas as frequências de locomoção, levantar, grooming e defecação, bem como a duração de grooming e imobilidade (s). Dados apresentados em médias e respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo 67
Figura 11 - Consumo semanal de água (mL) e ração (gramas) de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo 69
Figura 12 - Ganho de peso semanal (em gramas) de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo 70

Figura 13 - Atividade geral avaliada em campo aberto de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as frequências de locomoção, levantar, grooming, e defecação, bem como a duração de grooming e imobilidade (s). Dados apresentados em médias e respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo 74
Figura 14 - Parâmetros do comportamento no labirinto em cruz elevado de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo 76
Figura 15 - Tempo de interação social de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6 duplas de animais por grupo 77
Figura 16 - Comportamento estereotipado (em escore) induzido por apomorfina (0,6 mg/kg, via subcutânea) de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 29 dias. São apresentados as medianas e seus respectivos limites. N=9-10 animais por grupo 79
Figura 17 - Parâmetros avaliados no labirinto de Barnes de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo.....80
Figura 18 - Latência (em segundos) para passar para o compartimento escuro no teste de esquiva passiva de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-7 animais por grupo 81
Figura 19 - Análise de níveis de neurotransmissores de hipotálamo de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo 84
Figura 20 - Análise de níveis de neurotransmissores de hipocampo de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3

mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo 86
Figura 21 - Análise de níveis de neurotransmissores de corpo estriado de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo 88
Figura 22 - Análise de níveis de neurotransmissores de córtex de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo.....90
Figura 23 - Análise de níveis de neurotransmissores de cerebelo de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo.....92
Figura 24 - Parâmetros avaliados no hemograma de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8-10 animais por grupo 94
Figura 25 - Parâmetros avaliados na bioquímica sérica de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo.....96
Figura 26 - Parâmetros avaliados na análise de urina de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias São apresentados as medianas e os respectivos limites, exceto para o nitrito que é apresentada a relação presença/ausência. N=10 animais por grupo 98
Figura 27 - Peso relativo dos órgãos de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo.....99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência de locomoção no campo aberto de ratos que receberam ou não (controle) uma única administração de vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo 61

Tabela 2 - Frequência de levantar no campo aberto de ratos que receberam ou não (controle) uma única administração de vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo 62

Tabela 3 - Frequência de grooming no campo aberto de ratos que receberam ou não (controle) uma única administração de vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo 63

Tabela 4 - Tempo de grooming em segundos no campo aberto de ratos que receberam ou não (controle) uma única administração de vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo 64

Tabela 5 - Tempo de imobilidade, em segundos, no campo aberto de ratos que receberam ou não (controle) uma única administração de vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo 65

Tabela 6 - Frequência de defecação no campo aberto de ratos que receberam ou não (controle) uma única administração de vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo 66

Tabela 7 - Consumo semanal de água (em mL) e de ração (em gramas) de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou

0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo 68
Tabela 8 - Ganho de peso semanal (em gramas) de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo.....69
Tabela 9 - Frequência de locomoção no campo aberto de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo.....70
Tabela 10 - Frequência de levantar no campo aberto de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo.....71
Tabela 11 - Frequência de grooming no campo aberto de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo.....71
Tabela 12 - Tempo de grooming em segundos no campo aberto de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo.....72
Tabela 13 - Tempo de imobilidade em segundos no campo aberto de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo 72
Tabela 14 - Frequência de defecação no campo aberto de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo.....73
Tabela 15 - Parâmetros do comportamento no labirinto em cruz elevado de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo 75

Tabela 16 - Tempo de interação social de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6 duplas de animais por grupo 77
Tabela 17 - Comportamento estereotipado (em escore) induzido por apomorfina (0,6 mg/kg, via subcutânea) de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 29 dias. São apresentados as medianas e os respectivos limites. N=número de animais por grupo.....78
Tabela 18 - Parâmetros avaliados no labirinto de Barnes de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo.....80
Tabela 19 - Latência (em segundos) para passar para o compartimento escuro no teste de esquiva passiva de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=número de animais por grupo.....81
Tabela 20 - Análise de níveis de neurotransmissores de hipotálamo de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo 83
Tabela 21- Análise de níveis de neurotransmissores de hipocampo de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo 85
Tabela 22 - Análise de níveis de neurotransmissores de corpo estriado de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo 87
Tabela 23 - Análise de níveis de neurotransmissores de córtex de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo.....89

Tabela 24 - Análise de níveis de neurotransmissores de cerebelo de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo 91
Tabela 25 - Parâmetros avaliados no hemograma de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=número de animais por grupo.....93
Tabela 26 - Parâmetros avaliados na bioquímica sérica de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo.....95
Tabela 27 - Parâmetros avaliados na análise de urina de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as medianas e os respectivos limites, exceto para o nitrito que é apresentada a relação presença/ausência. N=10 animais por grupo 97
Tabela 28 - Peso relativo dos órgãos de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo.....99

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Escores utilizados na avaliação do comportamento estereotipado induzido pela apomorfina 48
Quadro 2 - Escala de escores utilizados na análise de urina 54

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO** 23
2 **REVISÃO DA LITERATURA** 26
2.1 USO CLÍNICO 26
2.2 MECANISMO DE AÇÃO E RECEPTORES 27
2.3 FARMACOCINÉTICA 30
2.4 EFEITOS COLATERAIS 32
2.5 DEPENDÊNCIA DE DROGAS 33
2.5.1 **Álcool** 34
2.5.2 **Opióides** 35
2.5.3 **Cocaína** 35
2.5.4 **Anfetaminas** 36
2.6 MEMÓRIA E APRENDIZADO 37
3 **OBJETIVOS** 40
3.1 OBJETIVO GERAL 40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 40
4 **MATERIAL E MÉTODOS** 42
4.1 ANIMAIS 42
4.2 DROGAS UTILIZADAS 42
4.3 PROCEDIMENTOS 43
4.3.1 **Avaliação do consumo de água e de ração e do ganho de peso** 43
4.3.2 **Avaliações comportamentais** 43
4.3.2.1 Campo aberto 44
4.3.2.2 Labirinto em cruz elevado 45
4.3.2.3 Interação Social 46
4.3.2.4 Comportamento estereotipado induzido pela apomorfina 47
4.3.2.5 Labirinto de Barnes 48
4.3.2.6 Esquiva passiva 50
4.3.3 **Análise dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos** 51
4.3.4 **Avaliação dos parâmetros hematológicos, bioquímicos séricos e de urina** 53
4.3.5 **Análise anatomopatológica e histopatológica** 55

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....55
4.4.1 **Experimento 1: Avaliação dos efeitos da exposição à dose única de vareniclina em ratos observados no campo aberto**.....55
4.4.2 **Experimento 2: Avaliação dos efeitos da exposição prolongada à vareniclina em ratos observados no campo aberto e no labirinto em cruz elevado**.....56
4.4.3 **Experimento 3: Avaliação dos efeitos da exposição prolongada à vareniclina na interação social de rato**s.....56
4.4.4 **Experimento 4: Avaliação dos efeitos da exposição prolongada à vareniclina no comportamento estereotipado induzido por apomorfina em ratos**.....56
4.4.5 **Experimento 5: Avaliação dos efeitos da exposição prolongada à vareniclina em ratos observados no labirinto de Barnes e na esquiva passiva**.....57
4.4.6 **Experimento 6: Avaliação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos de ratos expostos ao tratamento prolongado com vareniclina**.....57
4.4.7 **Experimento 7: Avaliação dos parâmetros hematológicos, bioquímicos séricos e de urina de ratos expostos ao tratamento prolongado com vareniclina**.....58
4.4.8 **Experimento 8: Avaliação anatomopatológica e histopatológica de órgãos de ratos expostos ao tratamento prolongado com vareniclina**.....58
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....58
5 **RESULTADOS**.....61
5.1 EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À DOSE ÚNICA DE VARENICLINA EM RATOS OBSERVADOS NO CAMPO ABERTO.....61
5.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PROLONGADA À VARENICLINA EM RATOS OBSERVADOS NO CAMPO ABERTO E NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....68
5.3 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PROLONGADA À VARENICLINA NA INTERAÇÃO SOCIAL DE RATOS.....77

5.4 EXPERIMENTO 4: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PROLONGADA À VARENICLINA NO COMPORTAMENTO ESTEREOTIPADO INDUZIDO POR APOMORFINA EM RATOS 78
5.5 EXPERIMENTO 5: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PROLONGADA À VARENICLINA EM RATOS OBSERVADOS NO LABIRINTO DE BARNES E NA ESQUIVA PASSIVA 79
5.6 EXPERIMENTO 6: AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE NEUROTRANSMISSORES E SEUS METABÓLITOS DE RATOS EXPOSTOS AO TRATAMENTO PROLONGADO COM VARENICLINA.....82
5.7 EXPERIMENTO 7: AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS SÉRICOS E DE URINA DE RATOS EXPOSTOS AO TRATAMENTO PROLONGADO COM VARENICLINA.....92
5.8 EXPERIMENTO 8: AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA DE ÓRGÃOS DE RATOS EXPOSTOS AO TRATAMENTO PROLONGADO COM VARENICLINA 98
6 **DISCUSSÃO** 101
7 **CONCLUSÕES** 110
REFERÊNCIAS.....112

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O tabagismo é uma das principais causas de doenças e morte prematura no mundo, estando relacionada com doenças cardiovasculares, respiratórias, reprodutivas e com diversos tipos de câncer (CHELLADURAI; SINGH, 2014). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2013, 21% da população mundial era de fumantes, correspondendo a 1,1 bilhão de pessoas (WHO, 2015). No Brasil, a Pesquisa Nacional de Saúde de 2013 mostrou que 15% da população são usuários de tabaco, sendo a prevalência maior nas regiões rurais do país; o percentual de fumantes cai para 14,7% se considerado apenas o tabaco fumado (IBGE, 2014).

Apesar de ainda ser um hábito muito comum, 80% dos fumantes possuem o desejo de parar de fumar, mas apenas 35% conseguem de fato cessar o hábito e 5% conseguem parar sem ajuda (O'BRIEN, 2006). Um dos principais motivos para que a taxa de cessação do fumo ser tão baixa é que a nicotina, principal substância ativa presente no tabaco, causa sintomas de abstinência muito fortes (ROSE; BEHM, 2004). Há, portanto, uma grande necessidade de desenvolver novos tratamentos para o tabagismo (FAESSEL et al., 2010).

Existem sete tipos de tratamentos farmacológicos para o tabagismo aprovados pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) (KAUR et al., 2009). A maior parte desses tratamentos consiste em produtos que substituem a nicotina liberada pelo cigarro por outra forma de liberação dessa substância (JORENBY et al., 2006). Outros medicamentos utilizados são a bupropiona e a vareniclina (FAESSEL et al., 2010).

A vareniclina é uma substância química produzida a partir do alcaloide citisina, que atua como um agonista parcial dos receptores colinérgicos nicotínicos (KAUR et al., 2009). Esse mecanismo de ação faz com que a vareniclina promova os mesmos efeitos da nicotina, porém em intensidade menor, sem os efeitos de abstinência, e impede que a nicotina proveniente do cigarro se ligue aos receptores, bloqueando os efeitos reforçadores do seu uso contínuo (ROLLEMA et al., 2010; IIDA et al., 2012).

Atualmente, estão sendo feitos diversos estudos sobre outros efeitos dessa substância. Assim, pesquisadores indicaram o possível uso da vareniclina para o

tratamento da dependência de outras drogas, pois ela estimula a liberação de dopamina no estriado dorsal e no núcleo accumbens (FAESSEL et al., 2010), bem como aumenta a disponibilidade dos receptores dopaminérgicos D2 e D3 (CRUNELLE et al., 2009), que, quando em número reduzido, aumentam o risco do desenvolvimento de vício às drogas (NADER et al., 2006). Estudos feitos por Steensland et al. (2007) e Ericson et al. (2009), por exemplo, mostraram que a vareniclina possui a capacidade de reduzir o consumo de álcool através de inibição da liberação de dopamina no centro de recompensa cerebral. Dados preliminares apresentados por Hooten e Werner (2015) sugerem que a vareniclina foi capaz de diminuir os sintomas da abstinência a várias drogas.

Também estão sendo descritos efeitos da vareniclina sobre a memória e a cognição. Estudos pré-clínicos realizados por Patterson et al. (2009) mostraram que esse medicamento foi capaz de melhorar a atenção e a memória de trabalho de pacientes com apenas três dias de abstinência da nicotina. O mecanismo pelo qual a vareniclina atua na memória/aprendizado ainda não está claro, mas a hipótese é de que esses efeitos estão relacionados com a liberação de neurotransmissores pré-sinápticos, principalmente do ácido gama-aminobutírico – GABA (ROLLEMA et al., 2011).

Levando em consideração que há uma tendência de ampliação do uso clínico da vareniclina e que há poucos estudos relacionados aos seus possíveis efeitos comportamentais, cognitivos e motores, tornam-se necessários mais estudos sobre sua atuação no organismo animal. Assim, este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos da exposição prolongada (28 - 30 dias) de ratos à vareniclina, avaliando-se o comportamento animal, níveis de neurotransmissores cerebrais, exame hematológico, bioquímica sanguínea, exame de urina e achados anatomopatológicos.

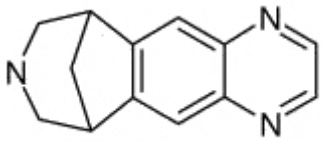
2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

A vareniclina (Figura 1) é uma substância química sintética produzida a partir do alcaloide citisina da planta *Cytisus Laburnum L*. utilizada para o tratamento de tabagismo (MIHALAK; CARROLL; LEUTJE, 2006; CRUNELLE et al., 2009; CAHILL; STEAD; LANCASTER, 2011). Essa substância química foi produzida em 1997 e aprovado pela FDA em 2006 (CAHILL; STEAD; LANCASTER, 2011). A vareniclina é comercializada pela Pfizer em mais de 90 países; nos Estados Unidos recebe o nome de Chantix®, e na União Europeia e no Brasil de Champix® (FAESSEL et al., 2010; LEUNG; PATAFIO; ROSSER, 2011; ERWIN; SLATON, 2014).

Esse medicamento possui uma taxa de cessação de fumo maior do que de outros métodos, como, por exemplo, os de reposição de nicotina (adesivo, goma de nicotina e *spray*) e outros medicamentos (bupropiona e citisina) (KING et al., 2011; NOCENTE et al., 2013).

Figura 1 - Estrutura química da vareniclina



Fonte: (adaptado de OBACH et al., 2006).

2.1 USO CLÍNICO

Para a cessação do fumo, o tratamento com esse medicamento dura 12 semanas. Do primeiro ao terceiro dia o paciente ingere um comprimido de 0,5 mg. Do quarto ao sétimo dia são dois comprimidos de 0,5 mg, um de manhã e um à tarde. Do oitavo dia até o final do tratamento são dois comprimidos de 1,0 mg, um de manhã e um à tarde (PFIZER, 2012). O paciente ainda pode fumar na primeira semana de tratamento, mas deve cessar totalmente o hábito no 8º dia (IIDA et al., 2013).

Os efeitos da vareniclina de cessação do fumo duram entre 40 e 52 semanas após o final do tratamento (CRUNELLE et al., 2009).

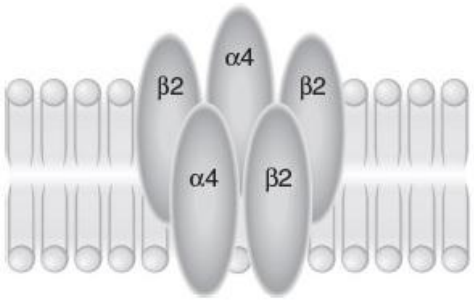
2.2 MECANISMO DE AÇÃO E RECEPTORES

A vareniclina se liga aos receptores colinérgicos nicotínicos (ARIAS et al., 2015). Esses receptores estão localizados no sistema nervoso central e periférico e são constituídos por cinco subunidades proteicas formando um canal iônico (COE et al., 2005; MIHALAK; CARROLL; LEUTJE, 2006; CUNNINGHAM; MCMAHON, 2011). Existem 17 tipos dessas subunidades (α1 - α10, β1 - β4, γ, δ e ε) que se combinam de diversos modos para produzir receptores nicotínicos diferentes (CUNNINGHAM; MCMAHON, 2011; PENG et al., 2013). Apenas as subunidades α2 - α10 e β2 - β4 estão presentes no sistema nervoso central (MILLAR; GOTTI, 2009; PENG et al., 2013).

Os receptores colinérgicos nicotínicos do sistema nervoso central estão amplamente distribuídos e relacionados com diversas condições, como ansiedade, depressão, vício às drogas, epilepsia, dor, esquizofrenia, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e Síndrome de Tourette (JENSEN et al., 2005).

A vareniclina possui alta afinidade por três tipos de receptores colinérgicos nicotínicos: α4β2, α3β4 e α7 (ROLLEMA et al., 2010). Ela atua como agonista parcial dos receptores α4β2 e α3β4 e como um agonista total dos receptores α7 (CRUNELLE et al., 2009). A Figura 2 mostra a estrutura simplificada do receptor colinérgico nicotínico do tipo α4β2, localizado na superfície do neurônio dopaminérgico.

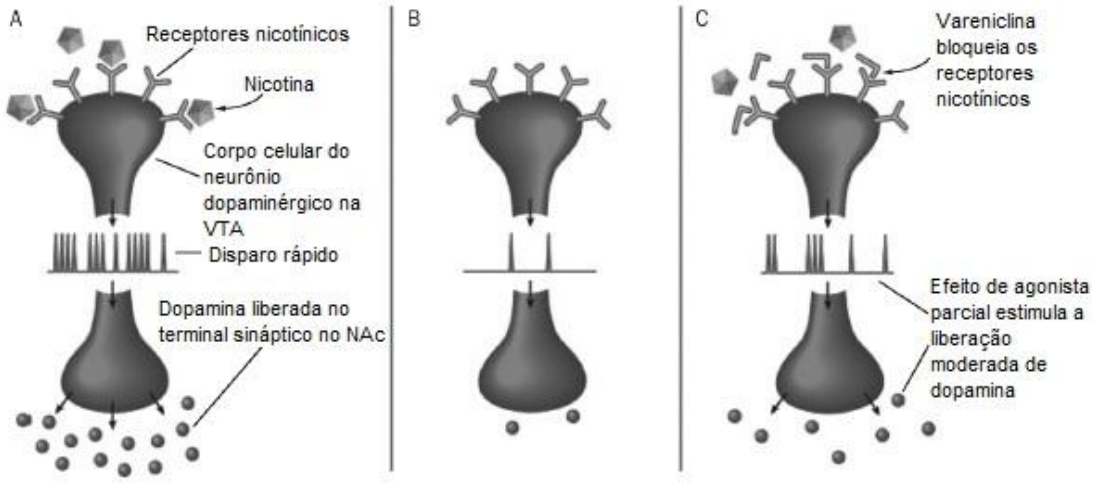
Figura 2 - Estrutura simplificada do receptor colinérgico nicotínico do tipo α4β2, localizado na superfície do neurônio dopaminérgico



Fonte: (adaptado de FOULDS et al., 2006).

Por ser um agonista parcial, a vareniclina atua de duas maneiras para exercer seu efeito terapêutico: 1) ela se liga aos receptores colinérgicos nicotínicos ativando-os, o que acarreta liberação de dopamina, promovendo os mesmos efeitos da nicotina, porém em intensidade muito menor, sem os efeitos de abstinência (efeito agonista); 2) ela impede a nicotina exógena de se ligar aos receptores colinérgicos nicotínicos, bloqueando os efeitos reforçadores do seu uso contínuo (efeito antagonista) – Figura 3 (JORENBY et al., 2006; IIDA et al., 2013).

Figura 3 - Desenho esquemático da atuação da nicotina e da vareniclina nos receptores colinérgicos nicotínicos dos neurônios dopaminérgicos. A) Efeito da nicotina proveniente do cigarro. B) Efeito da falta de nicotina. C) Efeito da vareniclina



Fonte: (adaptado de FOULDS et al., 2006).
Legenda: VTA = área tegmental ventral, NAc = núcleo accumbens

Estudos realizados por Arias et al. (2015) mostraram que a vareniclina é mais potente na sua ação antagonista do que agonista. Essa substância foi capaz de

ativar cerca de 2% dos receptores α4β2 e α3β4, e 0,05% dos receptores α7, enquanto inibiu de 42 a 56% dos receptores α4β2, 16% do α7 e 11% do α3β4.

O receptor α4β2 possui duas conformações: uma com três subunidades α4 e duas β2, conformação de menor afinidade com a nicotina, ou outra com duas subunidades α4 e três β2, conformação de maior afinidade com a nicotina (ZHOU et al., 2003; PENG et al. 2013).

Picciotto e Kenny (2013), trabalhando com camundongos *knockout*, mostraram que as subunidades α4 e β2 estão relacionadas com os efeitos reforçadores da nicotina. A subunidade α4 é necessária para a sensibilização, reforço e tolerância aos efeitos da nicotina, enquanto a subunidade β2 é indispensável para o desenvolvimento da dependência de tabaco (FOULDS et al., 2006). A interação da nicotina com esses receptores do sistema de recompensa do sistema nervoso central (sistema mesolímbico-mesocortical) aumenta os níveis sinápticos de dopamina, produzindo o efeito de prazer (ARIAS et al., 2015).

O receptor α4β2 é alvo de desenvolvimento de terapias para o vício ao tabaco devido a sua localização nos terminais pré-sinápticos de neurônios do corpo estriado e ao seu papel na modulação da liberação de dopamina (SALMINEN et al., 2004). Esse receptor também tem papel importante na modulação do humor e dos sintomas de depressão, dois fatores importantes no vício ao tabaco (PENG et al., 2013).

A vareniclina possui maior afinidade pelo receptor α4β2 do que pelos demais. Essa afinidade pode ser atribuída pelo maior número de ligações de hidrogênio na subunidade α4 quando comparada com as outras subunidades (ARIAS et al., 2015).

A ativação do receptor α7 no núcleo accumbens está relacionada com a diminuição da motivação da autoadministração de nicotina (PENG et al., 2013). Esse receptor localizado na área tegmental ventral regula a ação da nicotina exógena nas vias dopaminérgicas do núcleo accumbens (KAUR et al., 2009; NOCENTE et al., 2013). Os efeitos da vareniclina nesse receptor estão relacionados com sua dessensibilização (ROLLEMA et al., 2014).

Existem evidências de que a vareniclina possa atuar em outros tipos de receptores colinérgicos nicotínicos. Assim, estudos realizados por Arias et al. (2015) revelaram que a vareniclina também atua como agonista total dos receptores α4β4. Salas, Pieri e De Biasil (2004), em estudos com camundongos *knockout*, mostraram

que a subunidade β4 possui papel importante nos sintomas de abstinência da nicotina.

Bordia et al. (2012) mostraram que os receptores α6β2, bem como os α4β2 também estão presentes no sistema dopaminérgico e que possuem papel importante na mediação do vício à nicotina. As evidências vieram de estudos em camundongo *knockout* para as subunidades α4, α6 e/ou β2, que não fizeram a autoadministração da nicotina. Quando essas subunidades foram expressas, esses animais passaram a fazer a autoadministração da nicotina. Nesse mesmo trabalho os autores mostraram que a vareniclina se ligou ao receptor α6β2 da mesma forma que se ligou ao receptor α4β2 do corpo estriado. Contudo, são necessários mais estudos para comprovar se a vareniclina, de fato, possui efeito nesse receptor.

2.3 FARMACOCINÉTICA

A vareniclina administrada oralmente é completamente absorvida pelo trato gastrointestinal e possui biodisponibilidade muito alta (>90%), independente da administração junto com alimentos (FAESSEL et al., 2010). Esse medicamento tem a sua concentração máxima no plasma sanguíneo em 3 a 4 horas após a administração (FAESSEL et al., 2008).

Esse medicamento possui baixa capacidade de se ligar às proteínas do plasma sanguíneo. Estudos *in vitro* mostraram que a fração de vareniclina que não se ligou às proteínas plasmáticas humanas foi de cerca de 80%, a uma concentração de 100 ng/mL de vareniclina, e que se distribui de forma igual entre o sangue e o plasma (FAESSEL et al., 2010).

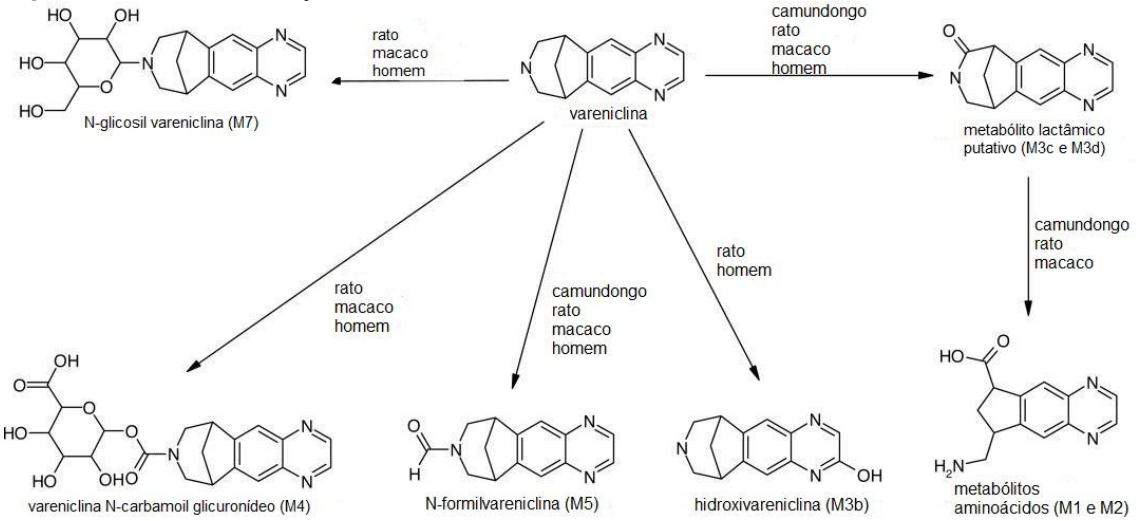
Faessel et al. (2006 a e b) mostraram que o tempo médio da vareniclina no plasma variou de 14,4 a 20,1 horas, após única dose, e de 23,8 a 33,0 horas, após doses múltiplas. Depois de atingir a concentração máxima no plasma, a concentração de vareniclina decaiu de forma bifásica, com tempo médio de 24 horas, independente da dose administrada (FAESSEL et al., 2010).

A vareniclina possui rápida distribuição pelos tecidos do corpo e atravessa facilmente a barreira hematoencefálica (RAVVA et al., 2009; ROLLEMA et al., 2010).

Ainda não se sabe se ela é excretada no leite materno (KAUR et al., 2009). Esse medicamento é considerado de baixo potencial de abuso (STEINBERG et al., 2010).

A vareniclina sofre pouca biotransformação, ocorrendo apenas no rim, e não no fígado, como a maioria dos medicamentos. Cerca de 90% da vareniclina é excretada na urina em sua forma intacta e apenas 1% é excretada nas fezes (FAESSEL et al., 2010). Apesar de pouco biotransformado, esse medicamento possui cinco metabólitos encontrados em seres humanos: N-glicosil vareniclina, vareniclina N-carbamoil glicuronide, N-formilvareniclina, hidroxivareniclina e metabólito lactâmico putativo. Em outras espécies animais, além dos mesmos cinco metábolitos encontrados no homem, há a presença de um aminoácido, derivado do metabólito lactâmico putativo (OBACH et al., 2006) – Figura 4.

Figura 4 - Biotransformação da vareniclina em animais e no homem



Fonte: (adaptado de OBACH et al., 2006).

Todos os metabólitos são derivados de reações com cadeias alicíclicas de nitrogênio. Os metabólitos N-glicosil vareniclina, vareniclina N-carbamoil glicuronide e N-formilvareniclina são encontrados na forma conjugada, devido à natureza nucleofílica do nitrogênio. Ainda não se tem conhecimento sobre as enzimas envolvidas nas reações desses metabólitos (FAESSEL et al., 2010).

Obach et al. (2006) mostraram que apenas dois metabólitos da vareniclina podem ser encontrados nas fezes, o hidroxivareniclina e o vareniclina N-carbamoil glicuronide, em quantidade muito baixa, cerca de 3 a 4% do total.

A eliminação renal da vareniclina ocorre principalmente pela filtração glomerular e pela secreção tubular, possivelmente via transportador de cátions orgânicos (PFIZER, 2008; RAVVA et al., 2009).

2.4 EFEITOS COLATERAIS

O principal efeito colateral desse medicamento é a náusea, relatado por 16% dos pacientes. Outros efeitos relatados são: dor de cabeça, insônia, distúrbios no sono, constipação, flatulência e vômito (PFIZER, 2012). Leung, Patafio e Rosser (2011) mostraram que o uso de 1 mg/kg de vareniclina duas vezes ao dia durante um período superior a seis semanas está associado a efeitos gastrointestinais, sendo náusea, constipação e flatulência os de maior prevalência.

Os estudos clínicos iniciais não mostraram mudanças de humor nem efeitos no comportamento dos pacientes. Apesar disso, alguns anos após a aprovação do medicamento pela FDA, foram acrescentados avisos de efeitos neuropsiquiátricos adversos na bula do medicamento. Esses avisos foram baseados em uma série de relatos de casos de depressão, pensamento suicida, psicose, hostilidade e comportamento anormal em pacientes (KUEHN, 2008). Segundo o laboratório fabricante (PFIZER, 2012), esses sintomas são possivelmente devidos à abstinência da nicotina e não ao efeito do medicamento em si.

Além dos efeitos adversos já citados, este medicamento pode ainda agravar distúrbios psiquiátricos já existentes, como esquizofrenia e transtorno bipolar (FREEDMAN, 2007).

A vareniclina também pode estar associada a efeitos adversos cardiovasculares, embora isso não seja unanimidade entre os pesquisadores. Uma revisão da literatura feita por Singh et al. (2011) mostrou que o uso de vareniclina por fumantes causa aumento de 72% na chance desses indivíduos apresentarem um efeito colateral cardíaco sério. Já Prochaska et al. (2012) alegaram que os efeitos cardiovasculares pelo uso da vareniclina são pequenos e clinicamente irrelevantes. Ainda, foram relatados infarto do miocardio, acidente vascular cerebral, isquemia e hemorragia (SINGH et al., 2011; SVANSTROM; PASTERNAK; HVIID, 2012).

Um estudo clínico randomizado feito por Rigotti et al. (2010) examinou a segurança do uso de vareniclina em pacientes com doenças cardiovasculares estáveis. Os resultados encontrados foram de taxas maiores de infarto do miocárdio não-fatal, revascularização coronária e doenças vasculares periféricas nos pacientes que receberam vareniclina, quando comparado ao grupo placebo.

Há três hipóteses sobre o mecanismo de ação da vareniclina nas doenças cardiovasculares: 1) através do receptor α7 na modulação da transmissão parassimpática que vai do tronco encefálico para o coração (SINGH, 2011) ; 2) por meio de um efeito trombótico semelhante ao da nicotina (SINGH, 2011); 3) pela liberação de catecolaminas (SVANSTROM; PASTERNAK; HVIID, 2012).

A vareniclina possui a capacidade de alterar o funcionamento normal das células beta do pâncreas, acarretando distúrbios na secreção de insulina e no controle glicêmico. Woynillowicz et al. (2012) evidenciaram essa alteração em células beta de pâncreas de ratos através de estudos da atividade enzimática da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e do estresse oxidativo.

2.5 DEPENDÊNCIA DE DROGAS

A dependência de drogas é uma questão séria de saúde pública no mundo e que acarreta em problemas sociais, financeiros e médicos. Atualmente, existem poucas farmacoterapias eficazes para os diferentes tipos de dependência, o que faz com que novas pesquisas sejam necessárias nessa área (CRUNELLE et al., 2010).

A vareniclina, além de ser empregada para o tratamento da dependência de nicotina, vem sendo bastante estudada como medicamento para o tratamento da dependência de diversas drogas, como álcool, opióides, cocaína e anfetamina, devido a sua modulação em receptores colinérgicos nicotínicos do sistema nervoso central, podendo ter diferentes efeitos na atividade dopaminérgica e em outros sistemas de neurotransmissores (PLEBANI et al., 2011).

Por ser um agonista parcial em receptores colinérgicos nicotínicos, essa substância não consegue atingir a resposta agonista máxima nesses receptores, fazendo com que não possua potencial de abuso (MCCOLL, 2008). Essa

propriedade faz da vareniclina um medicamento adequado para o tratamento da dependência de drogas (CRUNELLE et al., 2010).

A vareniclina estimula a liberação de dopamina no estriado dorsal e no núcleo accumbens, regiões importantes do centro de recompensa cerebral, mas em quantidade menor (cerca de 60%) do que o estímulo da nicotina (COE et al., 2005; ROLLEMA et al., 2007; FAESSEL et al., 2010).

Esse medicamento também aumenta a disponibilidade dos receptores D_2 e D_3 (CRUNELLE et al., 2009), os quais, quando em número reduzido, aumentam o risco de desenvolvimento de vício de drogas (NADER et al., 2006). Estudo realizado por Crunelle et al. (2009) mostrou que ratos tratados com 2 mg/kg de vareniclina, via subcutânea, por 14 dias tiveram aumento do número de receptores D_2 e D_3 do corpo estriado dorsal.

2.5.1 Álcool

Muitos dependentes de álcool também são fumantes (80-85%). Assim, o uso de um único agente que seja capaz de tratar as duas condições é bastante desejável, pois reduz o custo para o paciente, bem como a quantidade de comprimidos ingeridos, aumentando a probabilidade de adesão ao tratamento (ERWIN; SLATON, 2014).

A vareniclina está sendo amplamente estudada desde 2007 para testar seus efeitos benéficos no combate à dependência de álcool (CHATTERJEE et al., 2011; ERWIN; SLATON, 2014). Steensland et al. (2007) foram os primeiros a demonstrar que a vareniclina reduziu o consumo de álcool em ratos que possuíam alto nível de consumo de etanol.

Estudos mais recentes feitos em ratos por Ericson et al. (2009) mostraram evidências neuroquímicas de que a vareniclina é capaz de modular os efeitos do etanol no sistema de recompensa cerebral. Nesses estudos, a administração aguda de vareniclina inibiu a liberação aguda de dopamina induzida pelo álcool e, após cinco dias de tratamento, inibiu a liberação de dopamina no núcleo accumbens provenientes da coadministração de nicotina e etanol (ERICSON et al., 2009).

O mecanismo de ação pela qual a vareniclina atua na dependência do álcool ainda não está claro; a teoria é de que esse medicamento diminui a liberação de dopamina no núcleo accumbens, região do sistema nervoso central que regula os efeitos recompensadores da ingestão do álcool (AIT-DAOUD et al., 2006; CRUNELLE et al., 2009; MITCHELL et al., 2012). Também não se sabe ao certo quais são os receptores colinérgicos nicotínicos envolvidos, mas devido a alta seletividade de substâncias antagonistas aos receptores α4β2, α3β2 e α7 parece que são estes os receptores envolvidos com a dependência de álcool (KUZMIN, 2006).

2.5.2 Opióides

Estudos recentes sugerem que os receptores colinérgicos nicotínicos também desempenham papel importante na dependência de opióides, o que faz com que sejam alvos de terapias farmacológicas para a desintoxicação (HADJICONSTANTINOU; NEFF, 2011; HOOTEN; WARNER, 2015).

Ainda não se sabe quais são os efeitos da vareniclina na abstinência de opióides e qual a viabilidade do seu uso para o tratamento da dependência de opióides (BIALA; STANIAK; BUDZYNSKA, 2010). Dados preliminares de Hooten e Werner (2015) mostraram que os sintomas de abstinência de opióides diminuíram em pacientes que receberam vareniclina quando comparados com o grupo placebo. Esses indivíduos também não apresentaram nenhum efeito colateral do medicamento, incluindo náusea, dor e depressão.

2.5.3 Cocaína

O sistema colinérgico também está relacionado com a dependência de cocaína. Essa droga atua nos receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos de forma direta ou indireta, através dos receptores dopaminérgicos D_1 (PLEBANI et al.,

2012). Existem poucos estudos sobre os efeitos da vareniclina no uso abusivo de cocaína e os resultados obtidos são inconclusivos (MELLO et al., 2014).

Plebani et al. (2012) trabalhando com usuários de cocaína, mostraram que a administração crônica da vareniclina foi capaz de diminuir o uso de cocaína por esses indivíduos. Em macacos, estudos feitos com doses baixas de vareniclina (0,03 e 0,1 mg/kg) apontaram que essa substância não causou efeito sobre a autoadministração de cocaína (GOULD et al., 2011). Já em ratos, a administração subcutânea de 2,0 mg/kg de vareniclina diminuiu a autoadministração de cocaína e, em estudos de reintegração, altas doses de vareniclina aumentaram o comportamento de busca pela cocaína e baixas doses diminuíram esse comportamento (GUILLEM; PEOPLES, 2010).

2.5.4 Anfetaminas

A vareniclina também vem sendo testada como terapia na dependência de anfetaminas. O uso abusivo de metanfetamina, um tipo de anfetamina, é um problema sério que causa um grande impacto na saúde pública (ZORIK et al., 2009). Estudos feitos por Verrico et al. (2014) mostraram que o tratamento com 2 mg de vareniclina foi capaz de reduzir os efeitos subjetivos positivos da metanfetamina em usuários dessa droga. Esse efeito possivelmente ocorreu pelo aumento da dopamina mesolímbica através do efeito antagonista da vareniclina em receptores colinérgicos nicotínicos (ZORIK et al., 2009).

Brensilver et al. (2013) acharam resultados semelhantes em seu estudo clínico utilizando 2 mg de vareniclina por 8 semanas em voluntários usuários de metanfetamina. O resultado foi de uma melhora na retenção e nas taxas de abstinência da droga.

Estudos feitos por Pittinger et al. (2016) em ratas que receberam tanto metanfetamina quanto solução salina autoadministradas, por via intravenosa, em câmara de condicionamento mostraram que a vareniclina (1 e 3 mg/kg) foi capaz de reduzir a resposta de apertar a alavanca da câmara para receber a droga. Porém esse mesmo estudo mostrou que a vareniclina (0,3 e 1 mg/kg) aumentou a resposta de apertar a alavanca da câmara de condicionamento durante fase de reintegração

da metanfetamina, o que, segundo os autores, indica que esse medicamento estimula comportamentos relacionados com a recaída da dependência.

2.6 MEMÓRIA E APRENDIZADO

O sistema colinérgico desempenha papel muito relevante na memória e na cognição, tanto em indivíduos saudáveis, quanto em indivíduos doentes (LANGE-ASSCHENFELDT, 2016). Os receptores colinérgicos nicotínicos estão presentes em grande quantidade nos neurônios GABAérgicos do hipocampo e do córtex pré-frontal, regiões muito importantes para o aprendizado e a memória (BIRD; BURGESS, 2008; SON; WINZER-SERHAN, 2008; DUBOIS et al., 2013). O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central e possui papel fundamental na regulação das atividades cognitivas (COLOM et al., 2005).

Alguns subtipos de receptores colinérgicos nicotínicos podem ser alvos terapêuticos para diversas enfermidades que acometem o sistema nervoso central, como doença de Alzheimer, esquizofrenia, depressão, transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e perda de memória associada à idade (LANGE-ASSCHENFELDT, 2016).

Os receptores nicotínicos α4β2 estão expressos nos corpos celulares de neurônios dopaminérgicos e nos terminais nervosos de neurônios GABAérgicos, enquanto os receptores α7 estão expressos nos corpos celulares de neurônios GABAérgicos e nos terminais neuronais glutamatérgicos (GOTTI; ZOLI; CLEMENTI, 2006). Esses dois subtipos estão ainda presentes no giro denteado e no hipocampo, regiões do cérebro fundamentais para o processamento de novas informações e consolidação da memória (HURST; ROLLEMA; BERTRAND, 2013).

Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com substâncias que se ligam aos receptores α4β2 e os resultados são de uma melhora na cognição (ROLLEMA et al., 2009). Lippiello et al. (1996) administraram um agonista seletivo desse receptor, o RJR-2403, em ratos e camundongos e observaram que esses animais tiveram melhora significante na memória no teste da esquiva passiva.

A nicotina é capaz de aumentar a liberação de GABA através da ativação pré-sináptica dos receptores colinérgicos nicotínicos, em especial o receptor α4β2 e o α7

(MCCLURE-BEGLEY et al., 2009; LOUGHEAD et al., 2010). Ela também é capaz de reverter o comprometimento da memória e da atenção causados pela abstinência do fumo (DAVIS et al., 2005; PATTERSON et al., 2010).

A vareniclina, por ser semelhante estruturalmente à nicotina e por ativar as mesmas regiões cerebrais, compartilha esses efeitos, também melhorando os processos cognitivos (KING et al., 2011). Estudos pré-clínicos realizados por Patterson et al. (2009) mostraram que esse medicamento foi capaz de melhorar a atenção e a memória de trabalho de pacientes com apenas três dias de abstinência de nicotina.

O mecanismo pelo qual a vareniclina atua na memória/aprendizado ainda não está claro, mas a hipótese é de que esses efeitos estão relacionados com a liberação de neurotransmissores pré-sinápticos, incluindo o GABA (LOUGHEAD et al., 2010; ROLLEMA et al., 2011).

Estudos realizados por Dubois et al. (2013) em ratos mostraram que a vareniclina aumenta a liberação de GABA no hipocampo e no córtex pré-frontal, além de alterar a liberação de outros neurotransmissores, como a acetilcolina e a dopamina, alterando o humor e processos cognitivos.

Lange-Asschenfeldt et al. (2016) apontaram que a vareniclina foi capaz de aumentar a expressão das proteínas α4 e β2 em células neurais do neocórtex e do hipocampo de camundongos saudáveis.

Diversos estudos em animais também apontaram os efeitos pró-cognitivos da vareniclina em modelos para doenças neuropsiquiátricas (LANGE-ASSCHENFELDT et al., 2016). A administração aguda desse medicamento foi capaz de melhorar o desempenho de ratos em teste de atenção com condições de distração (simulação do TDAH) e no teste de reconhecimento de objetos (ROLLEMA et al., 2009). Estudo clínico duplo cego realizado por Shim et al. (2012) mostrou que o tratamento conjunto de vareniclina e medicamentos antipsicóticos foi capaz de melhorar as funções cognitivas de pacientes com esquizofrenia.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos comportamentais, hematológicos, bioquímicos e anatomopatológicos da exposição prolongada (28 – 30 dias) de ratos à vareniclina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da administração aguda de diferentes doses de vareniclina no comportamento de ratos observados no campo aberto, a fim de definir as doses a serem empregadas nos demais experimentos;
- Avaliar o consumo de água e de ração e o ganho de peso de ratos expostos por um período prolongado à vareniclina;
- Avaliar os efeitos da administração prolongada à vareniclina em ratos observados no campo aberto, labirinto em cruz elevado, interação social, comportamento estereotipado, labirinto de Barnes e esquiva passiva;
- Avaliar os efeitos da exposição prolongada de ratos à vareniclina nos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos em diferentes áreas do sistema nervoso central;
- Avaliar os efeitos da exposição prolongada de ratos à vareniclina nos exames hematológico, bioquímico sérico e de urina;
- Avaliar os achados anatomopatológicos e histopatológicos de ratos expostos por um período prolongado à vareniclina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) machos Wistar, de aproximadamente 90 dias de vida, provenientes do Biotério do Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP).

Os animais foram alojados em número de 2 a 4 ratos por gaiola de polipropileno (43 x 23 x 16 cm), mantidas em uma sala com a temperatura controlada (22ºC ± 2ºC) e com o ciclo de doze horas de claro e escuro (luz acesa às 6h00). Os animais tiveram água e comida *ad libitum* durante todo o procedimento experimental, exceto quando da observação do comportamento estereotipado, quando houve privação por 3 horas.

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob o protocolo de número 3304041214, e pela CEUA da Universidade Presbiteriana Mackenzie, sob o protocolo de número 132/11/2015.

4.2 DROGAS UTILIZADAS

- Tartarato de vareniclina (Champix® - Pfizer);
- Apomorfina (Sigma®): utilizada para indução do comportamento estereotipado;
- Xilazina (Xilazin®) e Cetamina (Cetamin®): utilizados para indução de anestesia profunda para eutanásia.

O tartarato de vareniclina foi diluído em água filtrada e administrado aos animais por via oral (gavagem). Foram empregadas três doses diferentes, sendo uma delas a maior dose terapêutica utilizado no homem (0,03 mg/kg) e as demais

(0,1 e 0,3 mg/kg) múltiplos dessa dose. Os animais controle receberam pela mesma via idêntico volume de água filtrada (1mL/kg). A administração da vareniclina foi realizada no período da manhã, entre 9h00 e 10h30.

A apomorfina foi diluída em água destilada e administrada aos animais por via subcutânea, na dose de 0,6 mg/kg. A solução de apomorfina foi preparada e mantida ao abrigo da luz, devido a fotossensibilidade dessa substância, e conservada em gelo para evitar a sua degradação.

A xilazina e a cetamina foram utilizadas nas doses de 10 e 70 mg/kg, respectivamente, para indução da anestesia profunda para a eutanásia dos animais, sendo administradas por via peritoneal.

4.3 PROCEDIMENTOS

4.3.1 Avaliação do consumo de água e de ração e do ganho de peso

O consumo médio de água (mL) e de ração (g), bem como o peso (g) dos animais foi mensurado semanalmente durante todo o experimento. A partir do peso corporal foi obtido o ganho de peso semanal (peso final – peso inicial).

4.3.2 Avaliações comportamentais

Todos os aparatos empregados para avaliação comportamental foram limpos, antes e após sua utilização, com solução de álcool a 5% para evitar-se a interferência dos odores de outros animais. Tomou-se o cuidado também de intercalar animais dos grupos controles e experimentais para cada uma das avaliações comportamentais.

4.3.2.1 Campo aberto

O campo aberto é amplamente empregado para avaliar a atividade motora, a exploração do ambiente, a ansiedade, a emocionalidade de animais, dentre outros comportamentos (WALSH; CUMMINS, 1976).

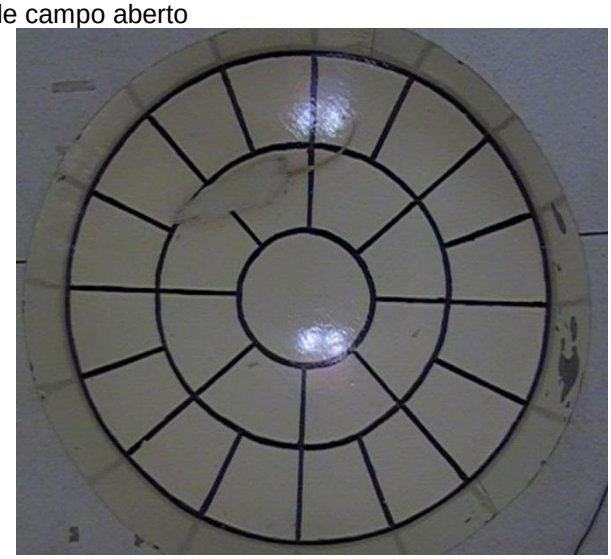
Foi empregado um campo aberto constituído de uma arena circular com 97 cm de diâmetro, circundado por uma parede de 27 cm de altura; o chão da arena é demarcado por linhas pretas formando 25 quadrantes de tamanho semelhante (Figura 5).

Para a realização do teste cada rato foi colocado no centro do aparato e seu comportamento foi filmado por 5 minutos. Esse teste foi realizado no período da manhã, entre 9h30 e 11h00. Os parâmetros observados foram:

- Frequência de locomoção: foi considerada uma unidade de locomoção quando o animal adentra com as quatro patas em cada quadrante do aparato;
- Frequência de levantar: foi considerada uma unidade de levantar quando o animal se apoia sobre as patas traseiras, ficando com o tronco ereto na posição vertical, podendo ou não tocar a parede do aparato com as patas dianteiras;
- Frequência de *grooming*: foi considerado o ato de higienização do animal;
- Tempo de *grooming*: tempo gasto, em segundos, na higienização feita pelo animal;
- Tempo de imobilidade: tempo, em segundos, em que o animal ficou imóvel;
- Frequência de defecação: número de bolos fecais encontrados ao final do experimento.

Os parâmetros observados neste teste foram analisados utilizando o programa de análises comportamentais Etholog 2.2 (OTTONI, 2000).

Figura 5 - Rato no aparato de campo aberto



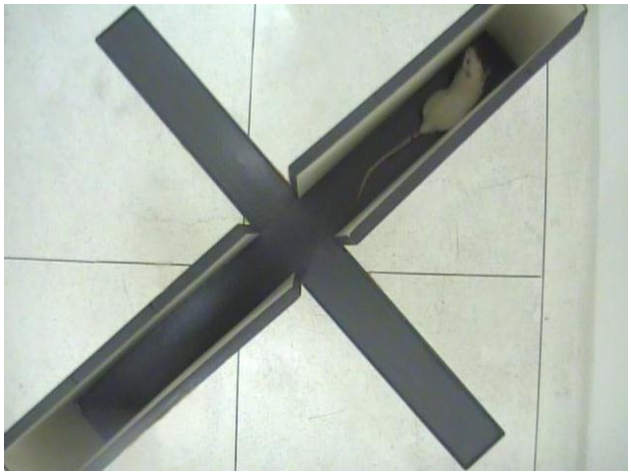
Fonte: (MAGALHÂES, 2016).

4.3.2.2 Labirinto em cruz elevado

Esse teste é utilizado para avaliar a ansiedade de roedores e fundamenta-se na aversão desses animais a espaços abertos (PELLOW et al., 1985).

O labirinto em cruz elevado é um aparato constituído por dois braços abertos opostos, com dimensões de 50 x 10 cm, dois braços fechados também opostos, com dimensões de 50 x 10 x 40 cm e uma plataforma central medindo 10 x 10 cm. Os braços estão dispostos a um ângulo de 90º e o aparato fica a uma altura de 50 cm do chão (Figura 6) (HOGG, 1996).

Figura 6 - Rato no labirinto em cruz elevado



Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

O rato foi colocado no centro do aparato com a cabeça voltada para um dos braços abertos e seu comportamento foi observado por 5 minutos. Esse teste foi realizado no período da manhã, entre 9h30 e 11h00. Os parâmetros observados foram:

- Frequência de entradas nos braços abertos: porcentagem de entradas nos braços abertos;
- Frequência de entradas nos braços fechados: porcentagem de entradas nos braços fechados;
- Tempo de permanência nos braços abertos: porcentagem de tempo (em segundos) em que o animal permanece nos braços abertos;
- Tempo de permanência nos braços fechados: porcentagem de tempo (em segundos) em que o animal permanece nos braços fechados;
- Tempo de permanência no centro: porcentagem de tempo (em segundos) em que o animal permanece no centro do aparato;
- Frequência de *head-dipping*: número de vezes em que o animal estica a cabeça para fora do aparato;
- Frequência de avaliação de risco: número de vezes em que o animal estica o corpo para farejar outra área, sem sair daquela na qual se encontra.

4.3.2.3 Interação Social

O teste de interação social, bem como o de labirinto em cruz elevado, é utilizado para avaliar a ansiedade de ratos (FILE; ZANGROSSI JR.; ANDREWS, 1993). Ele se baseia no fato de que ratos ansiosos não interagem com outros de forma semelhante a ratos não ansiosos (FILE; PELOW, 1985).

Esse teste foi realizado através da observação do comportamento de uma dupla de ratos colocada na arena do campo aberto, sendo que a variação de peso desses animais não foi superior a 20 g. Inicialmente, cada rato foi colocado isoladamente no campo aberto por 10 minutos para a habituação ao aparato. No segundo dia a dupla de animais foi colocada no campo aberto por 10 minutos para habituação ao parceiro. No terceiro dia foi realizado o teste propriamente dito, quando a dupla foi colocada novamente no campo aberto e seu comportamento foi

observado por 10 minutos, sendo avaliado o tempo total de interação social. Foi considerada interação social quando se observou os comportamentos de farejar, perseguir e passar sobre o outro animal da dupla. Esse teste foi realizado no período da manhã, entre 10h00 e 12h00.

4.3.2.4 Comportamento estereotipado induzido pela apomorfina

O comportamento estereotipado induzido pela apomorfina, agonista dopaminérgico, é utilizado para avaliar a integridade do sistema dopaminérgico (ESTRELLA; BREGONZIO; CABRERA, 2002). Esse sistema está relacionado com diversos distúrbios do sistema nervoso central, entre eles, a esquizofrenia e a doença de Parkinson (GOLDMAN et al., 1998).

Para a avaliação deste comportamento, os ratos foram colocados individualmente em uma gaiola de metal (30 x 15 x 19 cm) e tiveram livre acesso à comida e água por um período de 4 horas; após esse período os animais foram privados de comida e de água (Figura 7). Uma hora depois do início da privação de alimento, o comportamento estereotipado foi induzido pela aplicação de 0,6 mg/kg de apomorfina, por via subcutânea. A seguir, o comportamento foi avaliado em intervalos de 10 minutos durante a primeira hora e também aos 90 e 120 min, sendo quantificado por uma escala de escores (SETLER; SARAU; MCKENZIE, 1976) (Quadro 1). Esse teste foi realizado no período da tarde, entre 14h00 e 16h00.

Figura 7 - Rato na gaiola de metal para a avaliação do comportamento estereotipado

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

Quadro 1 -Escores utilizados na avaliação do comportamento estereotipado induzido pela apomorfina

Escore	Comportamento
0	Adormecido ou parado
1	Ativo
2	Predominantemente ativo, mas com curtos períodos de farejar, levantar-se estereotipado
3	Atividade estereotipada constante, tal como farejar, levantar-se ou balançar a cabeça, mas com atividade locomotora ainda presente
4	Atividade estereotipada constante realizada em um só local
5	Atividade estereotipada constante, mas com curtos períodos de lamber, roer e/ou morder
6	Lamber e/ou roer as barras da gaiola

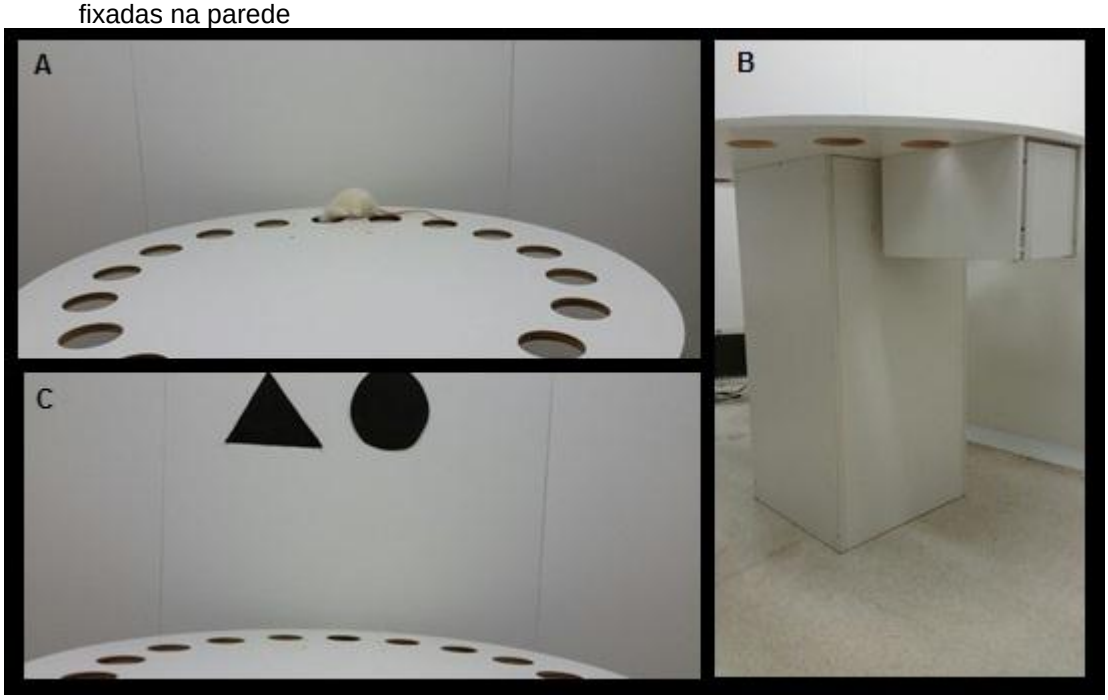
Fonte: (SETLER; SARAU; MCKENZIE, 1976).

4.3.2.5 Labirinto de Barnes

O labirinto de Barnes é um teste empregado para avaliar memória de ratos (BARNES, 1979). Este labirinto consiste em uma plataforma circular de 120 cm de diâmetro elevada a 90 cm do chão; essa plataforma possui 18 aberturas de 9 cm de diâmetro, dispostos de forma equidistante ao longo do perímetro aparato (Figura 8A) (BARNES, 1979). Uma das aberturas está ligada a uma caixa escape contendo maravalha, localizada sob a plataforma (Figura 8B). O aparato possui coloração

branca e ficou alocado em uma sala com as paredes brancas, sendo que numa delas foram fixadas duas formas geométricas pretas, que serviram de dicas visuais para o animal localizar a caixa escape (Figura 8C).

Figura 8 - Aparato do labirinto de Barnes. A) Detalhe do rato adentrando a caixa escape. B) Detalhe da caixa escape sob a plataforma. C) Detalhe das dicas visuais (figuras geométricas) fixadas na parede



Fonte: (MAGALHÂES, 2016).

O experimento consistiu em colocar o animal no centro do aparado sob uma caixa de plástico (17 x 13 x 11 cm), onde permaneceu por 30 segundos. Após esse período, a caixa de plástico foi removida e o comportamento do animal foi observado por 5 minutos, período no qual o animal deveria encontrar a caixa escape. Caso o animal não adentrasse a caixa escape no tempo limite de 5 minutos, este era conduzido gentilmente até a caixa, sendo mantido neste local por, pelo menos, 30 segundos para, então, retornar a sua gaiola moradia. O rato foi submetido a quatro dias de treino e um de teste (quinto dia), passando pelo aparato de manhã (entre 10h00 e 12h00) e de tarde (entre 14h00 e 16h00). Os parâmetros avaliados foram:

- Latência (em segundo) para entrar na caixa escape;

- Número de erros: número de aberturas que o rato farejou antes de encontrar a caixa escape.

4.3.2.6 Esquiva passiva

A esquiva passiva (ou inibitória) é um modelo comportamental empregado para avaliar aprendizado-memória, que envolve a supressão de uma resposta para evitar um evento aversivo que estava programado para ocorrer (BAGHERI et al., 2011; CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012). O aparato da esquiva passiva consiste em uma caixa com dois compartimentos, sendo um claro (45 x 15 x 22 cm) e um escuro (45 x 15 x 22 cm), interligados por uma portinhola tipo guilhotina (15 x 22 cm). O chão do compartimento escuro é formado por barras de metal acopladas a um dispositivo elétrico que emite um choque (Figura 9).

Figura 9 - Rato no compartimento claro da caixa de esquiva passiva

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

Este teste é baseado na aversão do rato a claridade, o que faz com que ele prefira ambientes escuros; ao adentrar no compartimento escuro, o animal recebe um choque elétrico (estímulo aversivo) nas patas. No dia seguinte o animal é recolocado no compartimento claro e deve permanecer neste compartimento para evitar o choque elétrico (BAGHERI et al., 2011).

O teste foi realizado em dois dias. No primeiro dia o animal foi colocado no compartimento claro e foi observada a latência para que ele entrasse no compartimento escuro. Ao adentrar nesse compartimento foi fechada a portinhola e aplicado o choque elétrico nas patas (0,5 mA, por 5 segundos) e o animal retornava

a sua gaiola moradia. No dia seguinte o animal foi recolocado no compartimento claro e foi observada a latência para que ele entrasse no compartimento escuro, por até 10 minutos, quanto, então, o animal era reconduzido a sua gaiola moradia. O teste foi realizado no período da manhã, entre 10h00 e 12h00.

4.3.3 Análise dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos

Os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação para a obtenção de diferentes estruturas cerebrais para dosagem dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos.

Após a decapitação, o encéfalo do animal foi retirado e colocado em uma placa de gelo, a fim de deixar o órgão preservado para a obtenção das seguintes estruturas cerebrais: hipotálamo, hipocampo, corpo estriado, córtex (porção anterior) e cerebelo; esse procedimento não ultrapassou o período de 3 minutos. Após a coleta, as estruturas foram colocadas em *eppendorffs* e foram acondicionadas em gelo seco para rápido congelamento. Em seguida elas foram pesadas e armazenadas, por até 20 dias, a uma temperatura de -80ºC.

Posteriormente, as estruturas coletadas foram homogeneizadas em ácido perclórico (CIHO4) a 0,1 M contendo ácido 3,4-dihidroxibenzilamina (DHBA – padrão interno) com o auxílio de uma caneta sonicadora de alta frequência, sendo o volume de ácido 10 vezes o peso do cerebelo, 15 vezes o peso do hipotálamo, do córtex e do hipocampo, e 20 vezes o peso do corpo estriado.

Após a homogeneização, as estruturas foram deixadas *overnight* em refrigerador a 10ºC para precipitação das proteínas e ácidos nucléicos. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm (centrífuga Eppendorf®-5804 R), a 4ºC por 30 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado com uma micropipeta e colocado em *eppendorffs* para ser armazenado em freezer -80ºC, até a quantificação analítica. Foram quantificados:

- Dopamina (DA) e seus metabólitos, ácido 4,4-diidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA);
- Serotonina (5HT) e seu metabólito ácido 5-hidroindol, 3-acético (5HIAA);
- Aminoácidos neurotransmissores: aspartato, glutamato, glicina e GABA.

Foi calculado também *turnover* (taxa de renovação), por meio da relação metabólito/neurotransmissor, da DA e 5HT da seguinte forma: DOPAC/DA, HVA/DA e 5HIAA/5-HT.

As análises das monoaminas (dopamina e serotonina) e seus metabólitos foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica (HPLC-ED) no Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, como descrita por Felicio et al. (1996). Para tanto foi empregado o cromatógrafo Shimadzu Modelo 20A, composto por um injetor automático com válvula injetora de volume variável (entre 1 e 100 μl), bombas de fluxo quaternárias, uma coluna cromatográfica (150 X 4,6 mm, Shimpak – ODS C 18) com filtro de linha e um detector eletroquímico Antec Decade. Foi utilizada a técnica de cromatografia em fase reserva com pareamento iônico, que é baseada na cromatografia de partição ou absorção. Para as análises foi utilizada a temperatura de 50ºC e o tempo de obtenção dos picos foi de até 24 minutos.

A fase móvel utilizada foi um sistema isocrático formado por tampão citrato 0,02 M, metanol 92:8 (v/v), 0,12 nM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) sódico e 0,0556% de ácido 1-heptanosulfônico (HSA). O pH foi ajustado para 3,0 com ácido ortofosfórico (H_3PO_4). A fase móvel foi filtrada em um sistema à vácuo antes de ser utilizada no HPLC-ED. Após esse procedimento ela circulou no sistema *overnight* para equilíbrio da coluna, que operou em um fluxo de 1 ml/min. O detector foi mantido com um potencial de 0,8 V no eletrodo de trabalho.

Para o preparo das soluções padrões de monoaminas foi utilizado padrões de concentrações 1 nM de cada neurotransmissor e seu metabólito diluídos em ácido clorídrico 0,1 M contendo 0,02% de metabissulfito de sódio e estocados em freezer –80°C por um período de até 2 meses. No momento da análise os padrões foram descongelados e diluídos de 2.500 a 10.000 vezes em ácido perclórico 0,1 M. Foram injetados pelo menos dois padrões no HPLC-ED diariamente, um antes e outro ao final das dosagens para a utilização dos valores como referência.

O equipamento foi padronizado diariamente, ao início e ao término do trabalho, com uma solução de trabalho, com concentração conhecida, de neurotransmissores, seus metabólitos e DHBA, empregando-se como diluente uma solução de ácido perclórico, 0,1M, contendo EDTA e metabissulfito de sódio.

O limite de detecção para todos os analitos variou entre 0,25 e 1 ng, o limite de quantificação foi de 10 ng/g de tecido cerebral ou 1,0 ng por 60 ng de sobrenadantes e a taxa de recuperação foi superior a 80%.

As análises dos aminoácidos foram feitas através de HPLC-DAD em colaboração com o Professor Doutor Ivo Lebrun do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan. O aparelho utilizado foi um Shimadzu com coluna cromatográfica (ACE 3 C18-300®, 150 x 3.0 mm) acoplada a um detector de arranjo de diôdos (PDA – *photo diodo array*) ajustado a um comprimento de onda de 254 nm. Sucintamente, foi utilizada a técnica de cromatografia em fase reversa com duas fases móveis: a fase móvel A foi uma solução tampão de 6% de acetronitrila e a fase móvel B foi uma solução de 80% de acetonitrila, 20% de água milli-Q e 0,02% de EDTA. A corrida analítica foi feita em até 46 minutos, em um fluxo de 0,3 mL/min na proporção de 94% de fase móvel A e 6% de fase móvel B; e o limite de detecção dos analitos foi de 20 ng.

4.3.4 Avaliação dos parâmetros hematológicos, bioquímicos séricos e de urina

Os animais foram anestesiados com 10 mg/kg de xilazina e 70 mg/kg de cetamina, por via intraperitoneal, para coleta de sangue e urina.

O sangue foi coletado por punção cardíaca. Para o hemograma completo, o sangue foi colocado em tubo com o anticoagulante EDTA e a análise foi feita por meio do sistema automatizado ABX VET®, HORIBA.

Para a análise bioquímica completa, o sangue dos animais foi coletado sem anticoagulante e mantido em temperatura ambiente por 30 minutos para a retração do coágulo. Em seguida, o material foi centrifugado a 4.000 rpm (centrífuga Eppendorf®-5804 R) por 10 minutos. Após a centrifugação o soro foi coletado e armazenado à temperatura de -80ºC para posterior análise. Os parâmetros analisados foram: albumina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato transaminase (AST), fosfatase alcalina (FAL), gama glutamil transpeptidase (GGT), proteína total, glicose, colesterol total, colesterol-*High Density Lipoproteins* (HDL),

triglicérides, creatinina e ureia. Essa análise foi feita no equipamento ChemWell-T da empresa Interteck, utilizando os *kits* comerciais da mesma marca, obedecendo as instruções do fabricante.

Para a análise de urina, esta foi coletada com uma seringa diretamente da bexiga do animal. A análise foi feita embebendo-se a fita do *kit* comercial Uriquest Plus® Labtest com urina e avaliando-se sua coloração. Os parâmetros avaliados foram: bilirrubina, urobilinogênio, cetonas, ácido ascórbico, glicose, proteína, sangue, pH, nitrito, leucócitos e densidade. Esses parâmetros foram quantificados por uma escala de escores (Quadro 2), com exceção do nitrito que foi considerado apenas positivo ou negativo.

Quadro 2 -Escala de escores utilizados na análise de urina

Parâmetro	Leitura	Escore	Parâmetro	Leitura	Escore
Bilirubina	Negativo + ++ +++	1 2 3 4	Proteína	Negativo Traço 30 100 500	1 2 3 4 5
Urobilinogênio	Normal 2 (35) 4 (70) 8 (140) 12 (200)	1 2 3 4 5	Sangue	Negativo +ca. 5-10 ++ca. 50 +++ ca. 300 ca. 5-10 ca. 50 ca. 300	1 2 3 4 5 6 7
Cetonas	Negativo Traço + ++ +++	1 2 3 4 5	pH	5 6 6,5 7 8 9	5 6 6,5 7 8 9
Ácido Ascórbico	Negativo + ++	1 2 3	Leucócitos	Negativo ca.25 ca.75 ca.500	1 2 3 4
Glicose	Normal 50 (2,8) 100 (5,6) 250 (14) 500 (28) ≥1000 (56)	1 2 3 4 5 6	Densidade	1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030	1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

4.3.5 Análise anatomopatológica e histopatológica

Os animais foram anestesiados (10 mg/kg de xilazina e 70 mg/kg de cetamina, por via intraperitoneal) para coleta de: rins, glândulas adrenais, coração, pulmóes, fígado e baço. Os órgãos foram pesados individualmente em balança analítica para análise de peso relativo, segundo a fórmula: peso do órgão (g) / peso do animal (g) x 100.

Para o estudo histopatológico foram utilizados os mesmos órgãos do estudo anatomopatológico. Eles foram fixados em formol 10% tamponado e processados para confecção de lâminas histológicas coradas com hematoxilina-eosina para análise.

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.4.1 Experimento 1: Avaliação dos efeitos da exposição à dose única de vareniclina em ratos observados no campo aberto

Quarenta ratos machos foram separados em quatro grupos (10 animais por grupo): um grupo controle, que recebeu água (1 mL/kg) e três grupos experimentais que receberam, 0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg de vareniclina, por via oral (gavagem). Os animais foram colocados no campo aberto aos 30 minutos, às 1, 2, 4, 6, 24, 48 e 72 horas, e no 7º dia após a administração do medicamento ou água (controle), sendo observados os parâmetros, conforme descrito no item 4.3.2.1.

4.4.2 Experimento 2: Avaliação dos efeitos da exposição prolongada à vareniclina em ratos observados no campo aberto e no labirinto em cruz elevado

Quarenta ratos machos foram separados em quatro grupos (10 animais por grupo): um grupo controle, que recebeu água (1 mL/kg) e três grupos experimentais que receberam, 0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg de vareniclina, por via oral (gavagem), durante 28 dias. Durante o tratamento o peso e o consumo de água e de ração foram mensurados semanalmente.

Os animais foram submetidos ao teste do campo aberto no 7º, 14º, 21º e 28º dia após o início do tratamento, conforme descrito no item 4.3.2.1. No 28º dia, imediatamente após a observação no campo aberto, os animais foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado, conforme descrito no item 4.3.2.2.

4.4.3 Experimento 3: Avaliação dos efeitos da exposição prolongada à vareniclina na interação social de ratos

Quarenta e oito ratos machos foram separados em quatro grupos (12 animais por grupo): um grupo controle, que recebeu água (1 mL/kg) e três grupos experimentais que receberam, 0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg de vareniclina, por via oral (gavagem), durante 30 dias. Os animais foram submetidos ao teste de interação social do 28º ao 30º dia após o início do tratamento, conforme descrito no item 4.3.2.3.

4.4.4 Experimento 4: Avaliação dos efeitos da exposição prolongada à vareniclina no comportamento estereotipado induzido por apomorfina em ratos

Quarenta ratos machos foram separados em quatro grupos (10 animais por grupo): um grupo controle, que recebeu água (1 mL/kg) e três grupos experimentais

que receberam, 0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg de vareniclina, por via oral (gavagem), durante 29 dias. No 29º dia de tratamento, foi feita a avaliação do comportamento estereotipado induzido pela apomorfina (0,6 mg/kg, via subcutânea), como descrito no item 4.3.2.4.

4.4.5 Experimento 5: Avaliação dos efeitos da exposição prolongada à vareniclina em ratos observados no labirinto de Barnes e na esquiva passiva

Quarenta ratos machos foram separados em quatro grupos (10 animais por grupo): um grupo controle, que recebeu água (1 mL/kg) e três grupos experimentais que receberam, 0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg de vareniclina, por via oral (gavagem), durante 30 dias. Do 24º ao 27º dia de tratamento os animais foram submetidos ao treinamento no labirinto de Barnes, passando pelo aparato uma vez pela manhã e uma à tarde; no 28º dia os animais realizaram o teste do labirinto de Barnes, conforme descrito no item 4.3.2.5. No 29º e 30º dia os animais foram submetidos à esquiva passiva, conforme descrito no item 4.3.2.6.

4.4.6 Experimento 6: Avaliação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos de ratos expostos ao tratamento prolongado com vareniclina

Neste experimento foram empregados os mesmos ratos do Experimento 2. Assim, no 30º dia de tratamento todos os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação para a coleta das estruturas cerebrais e posterior análise dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos, conforme descrito no item 4.3.3.

4.4.7 Experimento 7: Avaliação dos parâmetros hematológicos, bioquímicos séricos e de urina de ratos expostos ao tratamento prolongado com vareniclina

Neste experimento foram empregados os mesmos ratos do Experimento 5. Assim, no 30º dia de tratamento, os animais foram submetidos a anestesia profunda e foi feita a coleta de sangue para a análise do hemograma, bioquímica sérica e urina, conforme descrito no item 4.3.4.

4.4.8 Experimento 8: Avaliação anatomopatológica e histopatológica de órgãos de ratos expostos ao tratamento prolongado com vareniclina

Neste experimento foram empregados os mesmos ratos do Experimento 5. Assim, no 30º dia de tratamento, os animais foram pesados e submetidos a anestesia profunda para a coleta dos órgãos. Os órgãos foram pesados para o cálculo do peso relativo e foi feita a análise anatomopatológica e histopatológico, conforme item 4.3.5.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com auxílio do software GraphPad Prism 6® (GraphPad software, Inc., San Diego, California, USA). O teste de Bartlett foi utilizado para a verificação da homocedasticidade dos dados. Para os dados paramétricos foram utilizados ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Dunnett ou de Tukey, quando tinha apenas um fator (tratamento) a ser avaliado e ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni, quando tinham dois fatores (tratamento e tempo) a serem avaliados. Para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunns. O teste de

contingência foi empregado para avaliar os dados da presença ou ausência de nitrito na urina.

O nível de significância para todas as análises foi considerado $p<0,05$. Os dados foram expressos pela média ± erro padrão.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À DOSE ÚNICA DE VARENICLINA EM RATOS OBSERVADOS NO CAMPO ABERTO

As Tabelas 1 a 6 e a Figura 10 mostram os resultados dos parâmetros avaliados no campo aberto. Em relação à frequência de locomoção, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não apontou diferenças significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(3,36)=2,374$, $p>0,05$), porém há diferenças significantes quanto ao tempo ($F(8,288)=51,900$, $p<0,0001$), sem interação entre os fatores ($F(24,288)=1,195$, $p>0,05$). O pós-teste de Bonferroni apontou aumento na frequência de locomoção dos animais do grupo 0,3 mg/kg às 6 horas quando comparados com o grupo controle ($p<0,05$) – Tabela 1 e Figura 15.

Tabela 1 - Frequência de locomoção no campo aberto de ratos que receberam ou não (controle) uma única administração de vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo

Tempo	Controle	Vareniclina (mg/kg)		
		0,03	0,1	0,3
30 min	98,20 ± 10,03	128,30 ± 13,81	135,60 ± 9,68	126,60 ± 9,31
1 h	81,50 ± 10,42	89,10 ± 16,08	83,20 ± 12,29	83,30 ± 14,64
2 h	39,40 ± 9,89	55,00 ± 13,75	71,20 ± 12,76	62,00 ± 10,48
4 h	17,30 ± 5,99	33,50 ± 9,50	37,90 ± 8,71	55,30 ± 10,28
6 h	17,10 ± 6,35	17,20 ± 3,45	28,00 ± 8,18	62,40 ± 11,92*
24 h	40,00 ± 10,82	40,30 ± 8,89	45,00 ± 10,79	54,30 ± 7,35
48 h	38,20 ± 9,10	40,30 ± 4,73	51,70 ± 13,99	51,10 ± 5,34
72 h	27,20 ± 7,69	52,50 ± 10,46	53,20 ± 11,81	61,20 ± 8,45
7 dias	32,10 ± 10,58	40,80 ± 5,73	43,20 ± 11,05	59,70 ± 7,42

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

*p<0,05, ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni.

Em relação à frequência de levantar, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não apontou diferenças significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(3,36)=1,298$, $p>0,05$), porém há diferenças significantes quanto ao tempo ($F(8,288)=73,410$, $p<0,0001$), sem interação entre os fatores ($F(24,288)=1,494$, $p>0,05$). O pós-teste de Bonferroni apontou aumento deste parâmetro dos animais do grupo 0,1 mg/kg aos 30 minutos, quando comparados com os animais do grupo controle ($p<0,05$) – Tabela 2 e Figura 15.

Tabela 2 - Frequência de levantar no campo aberto de ratos que receberam ou não (controle) uma única administração de vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo

Tempo	Controle	Vareniclina (mg/kg)		
		0,03	0,1	0,3
30 min	20,80 ± 1,71	19,50 ± 2,38	27,40 ± 2,28*	21,90 ± 2,73
1 h	11,40 ± 1,87	7,60 ± 1,79	10,20 ± 2,43	9,00 ± 2,73
2 h	3,30 ± 0,78	4,30 ± 1,25	8,90 ± 1,20	6,90 ± 2,03
4 h	2,80 ± 1,27	2,80 ± 0,71	5,10 ± 1,23	5,70 ± 2,04
6 h	2,20 ± 1,35	1,60 ± 0,78	2,80 ± 0,70	6,90 ± 1,32
24 h	5,50 ± 1,48	7,30 ± 1,98	6,00 ± 1,29	6,70 ± 1,56
48 h	5,20 ± 1,66	5,90 ± 1,12	6,10 ± 1,57	6,20 ± 1,45
72 h	3,70 ± 0,94	6,30 ± 1,83	5,50 ± 0,78	7,60 ± 2,19
7 dias	3,90 ± 1,63	2,80 ± 0,88	3,50 ± 0,82	5,30 ± 1,05

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

*$p<0,05$, ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni.

Em relação à frequência de *grooming*, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não apontou diferenças significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(3,36)=0,397$, $p>0,05$) e ao tempo ($F(8,288)=1,296$, $p>0,05$), sem interação entre os fatores ($F(24,288)=0,8584$, $p>0,05$) – Tabela 3 e Figura 15.

Tabela 3 - Frequência de grooming no campo aberto de ratos que receberam ou não (controle) uma única administração de vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo

Tempo	Controle	Vareniclina (mg/kg)		
		0,03	0,1	0,3
30 min	0,80 ± 0,33	1,30 ± 0,40	1,10 ± 0,59	0,90 ± 0,64
1 h	1,40 ± 0,58	1,00 ± 0,33	1,50 ± 0,73	1,40 ± 0,65
2 h	0,50 ± 0,22	1,00 ± 0,42	2,10 ± 0,57	1,30 ± 0,54
4 h	1,40 ± 0,56	1,80 ± 0,53	1,60 ± 0,50	2,20 ± 0,81
6 h	0,90 ± 0,43	1,00 ± 0,26	1,60 ± 0,34	1,80 ± 0,73
24 h	1,20 ± 0,36	1,10 ± 0,28	2,20 ± 0,79	1,80 ± 0,51
48 h	1,40 ± 0,62	2,30 ± 0,52	1,00 ± 0,30	1,70 ± 0,58
72 h	1,50 ± 0,58	1,40 ± 0,58	1,30 ± 0,40	2,20 ± 0,79
7 dias	1,00 ± 0,52	1,20 ± 0,44	1,20 ± 0,42	1,50 ± 0,43

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

$p>0,05$, ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni.

Em relação ao tempo de *grooming*, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não apontou diferenças significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(3,36)=1,246$, $p>0,05$), porém há diferenças significantes quanto ao tempo ($F(8,288)=3,524$, $p<0,001$), sem interação entre os fatores ($F(24,288)=0,8654$, $p>0,05$). O pós-teste de Bonferroni não apontou diferenças significantes entre os grupos ($p>0,05$) – Tabela 4 e Figura 15.

Tabela 4 - Tempo de grooming em segundos no campo aberto de ratos que receberam ou não (controle) uma única administração de vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo

Tempo	Controle	Vareniclina (mg/kg)		
		0,03	0,1	0,3
30 min	4,00 ± 1,67	4,65 ± 2,65	1,88 ± 1,50	3,67 ± 2,48
1 h	1,49 ± 0,64	5,53 ± 2,94	3,79 ± 2,22	3,65 ± 1,93
2 h	0,40 ± 0,18	3,53 ± 2,18	6,04 ± 2,48	3,43 ± 1,26
4 h	6,84 ± 3,74	9,32 ± 3,13	8,55 ± 3,22	11,50 ± 3,87
6 h	5,47 ± 2,49	6,01 ± 1,78	10,78 ± 2,53	6,77 ± 2,61
24 h	3,14 ± 1,75	5,81 ± 2,42	10,46 ± 4,35	9,89 ± 4,29
48 h	4,64 ± 2,21	10,52 ± 2,28	2,19 ± 0,88	8,80 ± 3,50
72 h	6,25 ± 2,02	7,07 ± 2,77	9,05 ± 2,98	10,48 ± 3,26
7 dias	1,44 ± 0,74	6,50 ± 2,11	8,21 ± 2,85	5,09 ± 1,45

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

$p>0,05$, ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni.

Em relação ao tempo de imobilidade, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas apontou diferenças significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(3,36)=3,652$, $p<0,05$) e ao tempo ($F(8,288)=29,380$, $p<0,0001$), com interação entre os fatores ($F(24,288)=1,647$, $p<0,05$). O pós-teste de Bonferroni apontou diminuição deste parâmetro dos animais do grupo de 0,1 mg/kg às 2 horas ($p<0,05$), às 4 horas ($p<0,05$) e às 6 horas ($p<0,01$), e do grupo de 0,3 mg/kg às 4 horas ($p<0,01$), às 6 horas ($p<0,0001$) e às 72 horas ($p<0,05$) em relação ao grupo controle – Tabela 5 e Figura 15.

Tabela 5 - Tempo de imobilidade, em segundos, no campo aberto de ratos que receberam ou não (controle) uma única administração de vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo

Tempo	Controle	Vareniclina (mg/kg)		
		0,03	0,1	0,3
30 min	12,59 ± 7,24	2,60 ± 1,32	0,23 ± 0,17	1,77 ± 1,23
1 h	30,29 ± 10,22	31,34 ± 10,91	34,52 ± 21,79	29,47 ± 12,43
2 h	94,34 ± 21,46	50,48 ± 17,40	26,79 ± 6,79*	35,73 ± 9,39
4 h	133,75 ± 19,19	79,39 ± 15,94	55,69 ± 20,05*	51,70 ± 21,20**
6 h	176,04 ± 20,66	138,86 ± 20,14	93,24 ± 18,86**	62,85 ± 20,04****
24 h	128,28 ± 29,42	93,61 ± 24,58	71,35 ± 19,65	80,68 ± 14,75
48 h	115,91 ± 26,32	73,12 ± 10,81	84,94 ± 23,87	78,22 ± 15,11
72 h	141,97 ± 23,98	75,38 ± 12,31	83,35 ± 20,94	70,26 ± 17,57*
7 dias	138,95 ± 23,55	101,42 ± 20,45	102,05 ± 22,30	75,74 ± 11,62

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

*p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001, ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni.

Em relação à frequência defecação, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não apontou diferenças significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(3,36)=0,757$, $p>0,05$)), porém há diferenças significantes quanto ao tempo ($F(8,288)=2,210$, $p<0,05$), sem interação entre os fatores ($F(24,288)=1,172$, $p>0,05$). O pós-teste de Bonferroni apontou diminuição deste parâmetro dos animais do grupo de 0,3 mg/kg às 48 horas ($p<0,05$) em relação ao grupo controle – Tabela 6 e Figura 15.

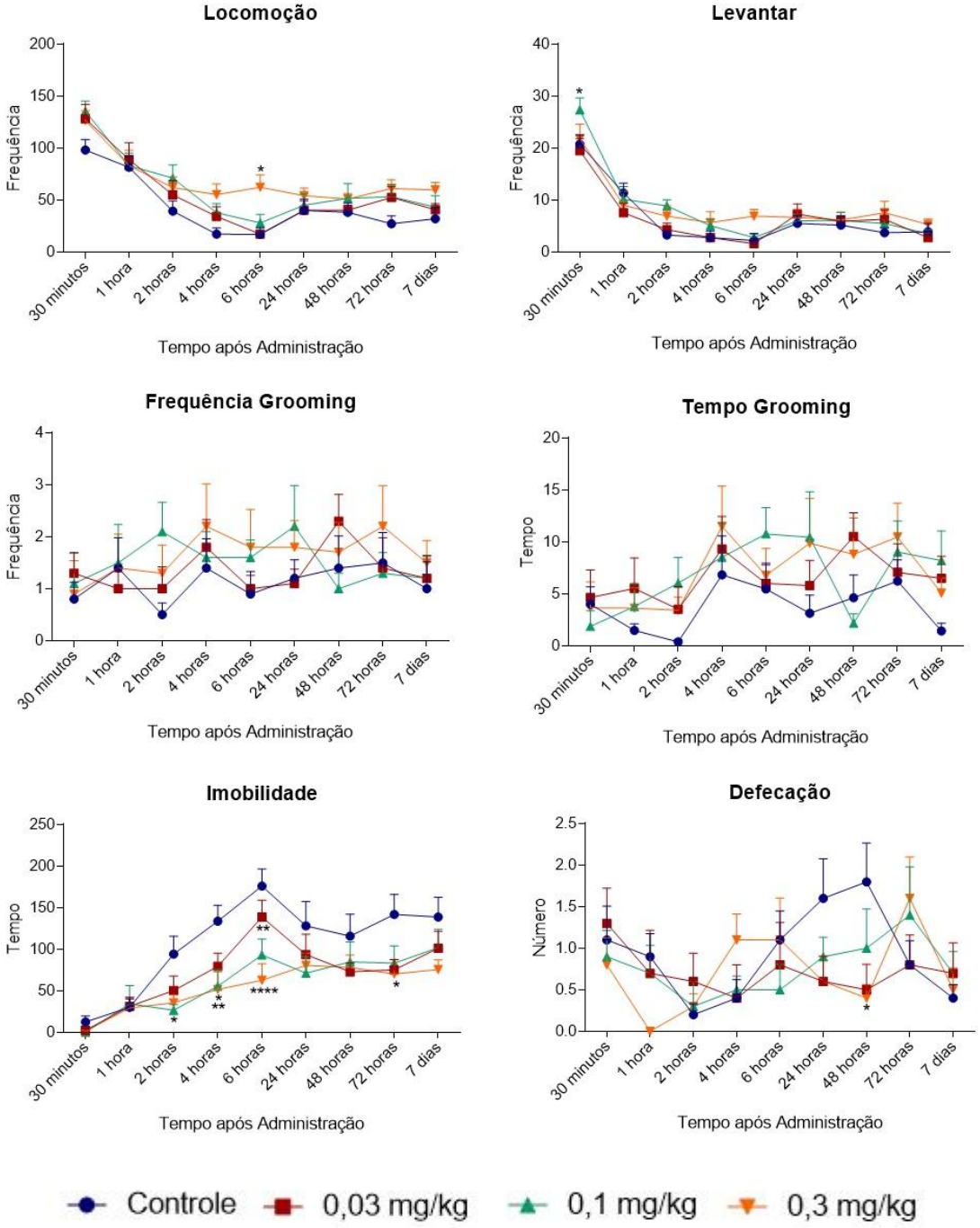
Tabela 6 - Frequência de defecação no campo aberto de ratos que receberam ou não (controle) uma única administração de vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo

Tempo	Controle	Vareniclina (mg/kg)		
		0,03	0,1	0,3
30 min	1,10 ± 0,41	1,30 ± 0,42	0,90 ± 0,31	0,80 ± 0,33
1 h	0,90 ± 0,28	0,70 ± 0,52	0,70 ± 0,33	0,00 ± 0,00
2 h	0,20 ± 0,13	0,60 ± 0,34	0,30 ± 0,30	0,30 ± 0,15
4 h	0,40 ± 0,22	0,40 ± 0,40	0,50 ± 0,17	1,10 ± 0,31
6 h	1,10 ± 0,35	0,80 ±0,51	0,50 ± 0,31	1,10 ± 0,50
24 h	1,60 ± 0,48	0,60 ± 0,31	0,90 ± 0,23	0,60 ± 0,31
48 h	1,80 ± 0,47	0,50 ± 0,31	1,00 ± 0,47	0,40 ± 0,16*
72 h	0,80 ± 0,29	0,80 ± 0,36	1,40 ± 0,58	1,60 ± 0,50
7 dias	0,40 ± 0,16	0,70 ± 0,37	0,70 ± 0,26	0,50 ± 0,27

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

*p<0,05, ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni.

Figura 10 - Atividade geral avaliada em campo aberto de ratos que receberam ou não (controle) uma única administração de vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem. São apresentadas as frequências de locomoção, levantar, grooming e defecação, bem como a duração de grooming e imobilidade (s). Dados apresentados em médias e respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo



Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

Nota: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001, ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni.

5.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PROLONGADA À VARENICLINA EM RATOS OBSERVADOS NO CAMPO ABERTO E NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

A Tabela 7 e a Figura 11 mostram os resultados do acompanhamento do consumo de água e de ração dos animais durante o tratamento. Em relação ao consumo de água, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas apontou diferenças significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(3,36)=3,985$, $p<0,05$) e ao tempo ($F(3,108)=112,6$, $p<0,0001$), sem interação entre os fatores ($F(9,108)=1,594$, $p>0,05$). O pós-teste de Bonferroni mostrou aumento no consumo de água dos animais do grupo de 0,1 mg/kg de vareniclina na terceira semana de tratamento ($p<0,01$).

Em relação ao consumo semanal de ração, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não mostrou diferenças significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(3,36)=2,063$, $p>0,05$), mas apontou diferenças significantes quanto ao tempo ($F(3,108)=68,26$, $p<0,0001$), com interação entre os fatores ($F(9,108)=2,398$, $p<0,05$). O pós-teste de Bonferroni não apontou diferenças significantes entre os grupos ($p>0,05$) – Tabela 7 e Figura 11.

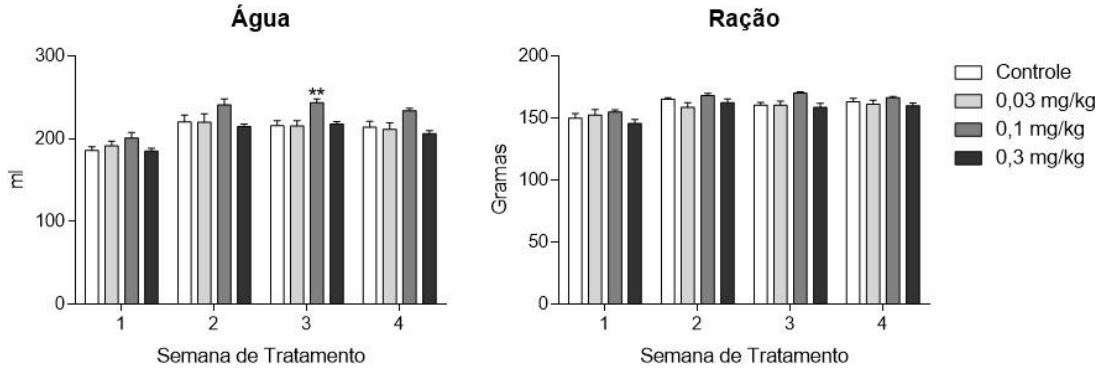
Tabela 7 - Consumo semanal de água (em mL) e de ração (em gramas) de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo

Consumo	Semana	Controle	Vareniclina (mg/kg)		
			0,03	0,1	0,3
Água	1ª	185,60 ± 4,63	191,30 ± 5,84	200,77 ± 6,54	184,90 ± 3,47
	2ª	220,10 ± 8,24	219,90 ± 10,14	240,93 ± 7,22	214,70 ± 3,04
	3ª	215,50 ± 6,40	215,40 ± 6,51	243,40 ± 4,82**	217,50 ± 3,14
	4ª	213,90 ± 6,92	211,43 ± 7,66	233,83 ± 2,91	206,10 ± 3,58
Ração	1ª	149,90 ± 3,74	152,37 ± 4,41	154,73 ± 1,77	145,50 ± 3,49
	2ª	165,00 ± 1,32	158,63 ± 3,65	168,13 ± 1,76	162,40 ± 2,94
	3ª	160,40 ± 2,21	160,30 ± 3,36	170,10 ± 0,92	158,50 ± 3,33
	4ª	163,10 ± 2,74	161,17 ± 3,01	166,37 ± 1,04	159,90 ± 2,24

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

**p<0,01, ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni.

Figura 11 - Consumo semanal de água (mL) e ração (gramas) de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo



Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

Nota: **p<0,01, ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni.

A Tabela 8 e a Figura 12 mostram os resultados do acompanhamento do ganho de peso dos animais durante o tratamento. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não mostrou diferenças significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(3,36)=2,029$, $p>0,05$), porém mostrou diferenças significantes quanto ao tempo ($F(3,108)=5,775$, $p<0,01$), com interação entre os fatores ($F(9,108)=0,9874$, $p<0,05$). O pós-teste de Bonferroni não apontou diferenças significantes entre os grupos ($p>0,05$).

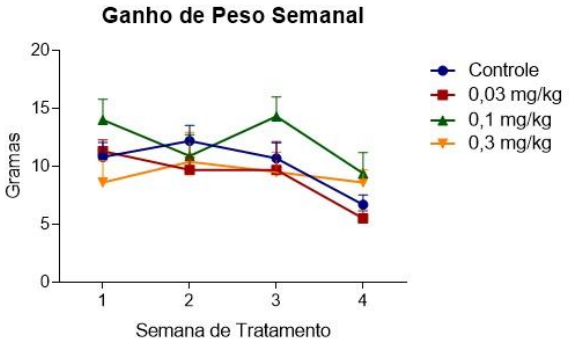
Tabela 8 - Ganho de peso semanal (em gramas) de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo

Semana	Controle	Vareniclina (mg/kg)		
		0,03	0,1	0,3
1	10,80 ± 1,25	11,30 ± 0,99	14,00 ± 1,78	8,60 ± 1,87
2	12,20 ± 1,32	9,70 ± 1,05	10,90 ± 1,83	10,40 ± 2,54
3	10,70 ± 1,32	9,70 ± 2,43	14,30 ± 1,69	9,50 ± 1,71
4	6,70 ± 0,84	5,50 ± 0,65	9,40 ± 1,77	8,60 ± 1,10

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

p>0,05, ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni.

Figura 12 - Ganho de peso semanal (em gramas) de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo



Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

Nota: p>0,05, ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni.

As Tabelas 9 a 14 e a Figura 13 mostram os resultados dos parâmetros avaliados no campo aberto. Em relação à frequência de locomoção, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não apontou diferenças significantes entre os grupos em relação ao tratamento (F(3,36)=2,035, p>0,05), porém há diferenças significantes quanto ao tempo (F(3,108)=154,2, p<0,0001), sem interação entre os fatores (F(9,108)=1,564, p>0,05). O pós-teste de Bonferroni apontou aumento na frequência de locomoção dos animais do grupo 0,03 mg/kg no 14º dia de tratamento quando comparados com o grupo controle (p<0,01) – Tabela 9 e Figura 13.

Tabela 9 - Frequência de locomoção no campo aberto de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo

Dia	Controle	Vareniclina (mg/kg)		
		0,03	0,1	0,3
7	121,90 ± 10,60	146,60 ± 8,81	151,70 ± 8,91	153,30 ± 9,97
14	57,70 ± 6,08	100,80 ± 9,43**	74,80 ± 6,88	81,10 ± 13,96
21	56,70 ± 4,25	59,90 ± 10,63	53,20 ± 7,44	58,60 ± 12,26
28	34,90 ± 7,13	49,00 ± 8,41	38,70 ± 4,85	40,00 ± 6,01

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

**p<0,01, ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni.

Em relação à frequência de levantar, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não apontou diferenças significantes entre os grupos em relação ao tratamento (F(3,36)=0,4302, p>0,05), porém há diferenças significantes quanto ao

tempo (F(3,108)=78,69, p<0,0001), sem interação entre os fatores (F(9,108)=1,143, p>0,05). O pós-teste de Bonferroni não apontou diferenças significantes entre os grupos (p>0,05) – Tabela 10 e Figura 13.

Tabela 10 - Frequência de levantar no campo aberto de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo

Dia	Controle	Vareniclina (mg/kg)		
		0,03	0,1	0,3
7	22,60 ± 2,18	20,90 ± 1,65	23,90 ± 2,99	25,60 ± 1,99
14	7,70 ± 1,55	13,50 ± 2,19	11,00 ± 2,30	10,60 ± 1,91
21	9,30 ± 2,08	8,10 ± 1,26	6,30 ± 1,45	9,10 ± 2,08
28	6,70 ± 0,83	6,70 ± 1,68	6,50 ± 1,05	8,30 ± 1,93

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

p>0,05, ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni.

Em relação à frequência de *grooming*, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não apontou diferenças significantes entre os grupos em relação ao tratamento (F(3,36)=1,724, p>0,05) e ao tempo (F(3,108)=0,6035, p>0,05), e não há interação entre os fatores (F(9,108)=0,9780, p>0,05) – Tabela 11 e Figura 13.

Tabela 11 - Frequência de grooming no campo aberto de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo

Dia	Controle	Vareniclina (mg/kg)		
		0,03	0,1	0,3
7	0,60 ± 0,34	0,50 ± 0,22	0,10 ± 0,10	0,20 ± 0,13
14	0,40 ± 0,27	0,90 ± 0,23	0,10 ± 0,10	0,50 ± 0,31
21	0,20 ± 0,13	0,30 ± 0,15	0,10 ± 0,10	0,60 ± 0,22
28	0,40 ± 0,31	0,40 ± 0,22	0,30 ± 0,21	0,60 ± 0,16

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

p>0,05, ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni.

Em relação ao tempo de *grooming*, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não apontou diferenças significantes entre os grupos em relação ao

tratamento (F(3,36)=2,439, p>0,05) e ao tempo (F(3,108)=2,008, p>0,05) e não há interação entre os fatores (F(9,108)=1,328, p>0,05) – Tabela 12 e Figura 13.

Tabela 12 - Tempo de grooming em segundos no campo aberto de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo

Dia	Controle	Vareniclina (mg/kg)		
		0,03	0,1	0,3
7	2,50 ± 1,38	2,00 ± 1,02	0,40 ± 0,40	1,60 ± 1,11
14	3,80 ± 2,74	5,60 ± 1,79	0,60 ± 0,60	4,20 ± 2,27
21	0,50 ± 0,40	1,80 ± 0,95	0,10 ± 0,10	5,30 ± 2,36
28	0,70 ± 0,60	1,00 ± 0,67	0,90 ± 0,60	4,70 ± 2,02

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

p>0,05, ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni.

Em relação ao tempo de imobilidade, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não apontou diferenças significantes entre os grupos em relação ao tratamento (F(3,36)=0,9917, p>0,05), mas apontou diferenças significantes em relação ao tempo (F(3,108)=47,47, p<0,0001), sem interação entre os fatores (F(9,108)=1,293, p>0,05). O pós-teste de Bonferroni apontou diminuição deste parâmetro dos animais do grupo de 0,03 mg/kg no 14º dia de tratamento quando comparados com o grupo controle (p<0,05) – Tabela 13 e Figura 13.

Tabela 13 - Tempo de imobilidade em segundos no campo aberto de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo

Dia	Controle	Vareniclina (mg/kg)		
		0,03	0,1	0,3
7	6,80 ± 6,26	0,30 ± 0,30	1,00 ± 0,33	0,70 ± 0,50
14	60,60 ± 9,61	19,80 ± 6,88*	30,70 ± 6,32	47,10 ± 15,54
21	58,70 ± 10,81	58,90 ± 13,51	61,60 ± 11,90	61,10 ± 13,74
28	79,20 ± 15,35	60,90 ± 7,74	56,30 ± 10,27	54,30 ± 10,46

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

*p<0,05, ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni.

Em relação à frequência defecação, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não apontou diferenças significantes entre os grupos em relação ao

tratamento ($F(3,36)=1,659$, $p>0,05$) e ao tempo ($F(3,108)=2,041$, $p>0,05$), e não há interação entre os fatores ($F(9,108)=0,1403$, $p>0,05$) – Tabela 14 e Figura 13.

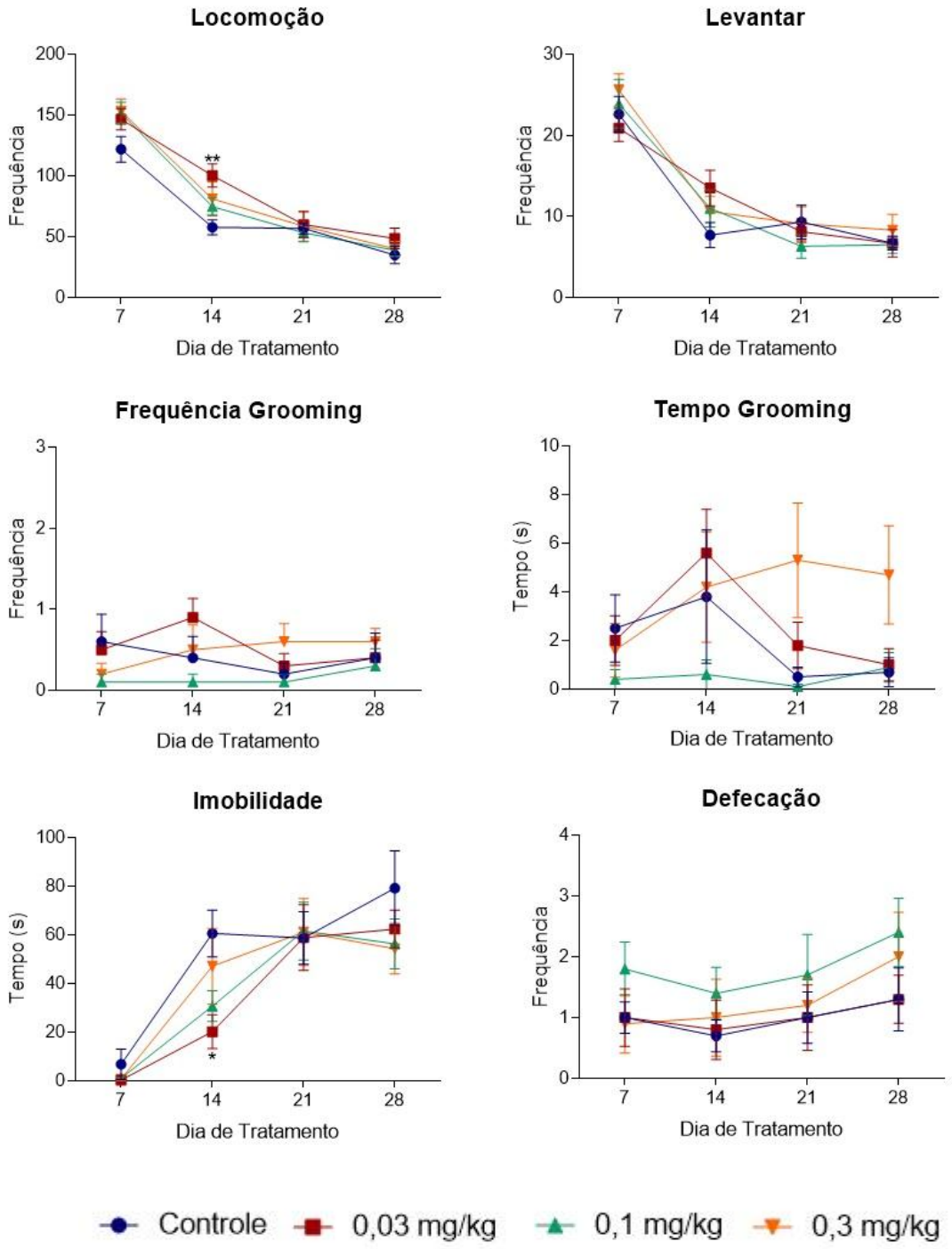
Tabela 14 - Frequência de defecação no campo aberto de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo

Dia	Controle	Vareniclina (mg/kg)		
		0,03	0,1	0,3
7	1,00 ± 0,26	1,00 ± 0,50	1,80 ± 0,44	0,90 ± 0,48
14	0,70 ± 0,26	0,80 ± 0,40	1,40 ± 0,43	1,00 ± 0,63
21	1,00 ± 0,42	1,00 ± 0,53	1,70 ± 0,67	1,20 ± 0,44
28	1,30 ± 0,52	1,30 ± 0,37	2,40 ± 0,56	2,00 ± 0,73

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

$p>0,05$, ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni.

Figura 13 - Atividade geral avaliada em campo aberto de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentadas as frequências de locomoção, levantar, grooming, e defecação, bem como a duração de grooming e imobilidade (s). Dados apresentados em médias e respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo



Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

Nota: *p<0,05, **p<0,01, ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni.

A Tabela 15 e a Figura 14 mostram os resultados dos parâmetros avaliados no labirinto em cruz elevado no 28º dia de tratamento. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos nos seguintes parâmetros avaliados: frequência de entrada nos braços abertos ($F(3,36)=2,503$, $p>0,05$), frequência de entrada nos braços fechados ($F(3,36)=1,440$, $p>0,05$), tempo de permanência nos braços abertos ($F(3,36)=0,8251$, $p>0,05$), tempo de permanência nos braços fechados ($F(3,36)=1,699$, $p>0,05$), frequência de *head-dipping* ($F(3,36)=1,408$, $p>0,05$) e frequência de avaliação de risco ($F(3,36)=1,120$, $p>0,05$).

A ANOVA de uma via apontou diferenças significantes entre os grupos no tempo de permanência no centro do aparato ($F(3,36)=5,658$, $p<0,01$). O pós-teste de Dunnett mostrou que os animais dos grupos de 0,1 e de 0,3 mg/kg ficaram menos tempo no centro do labirinto quando comparado com o grupo controle ($p<0,001$ e $p<0,05$, respectivamente) – Tabela 15 e a Figura 19.

Tabela 15 - Parâmetros do comportamento no labirinto em cruz elevado de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo

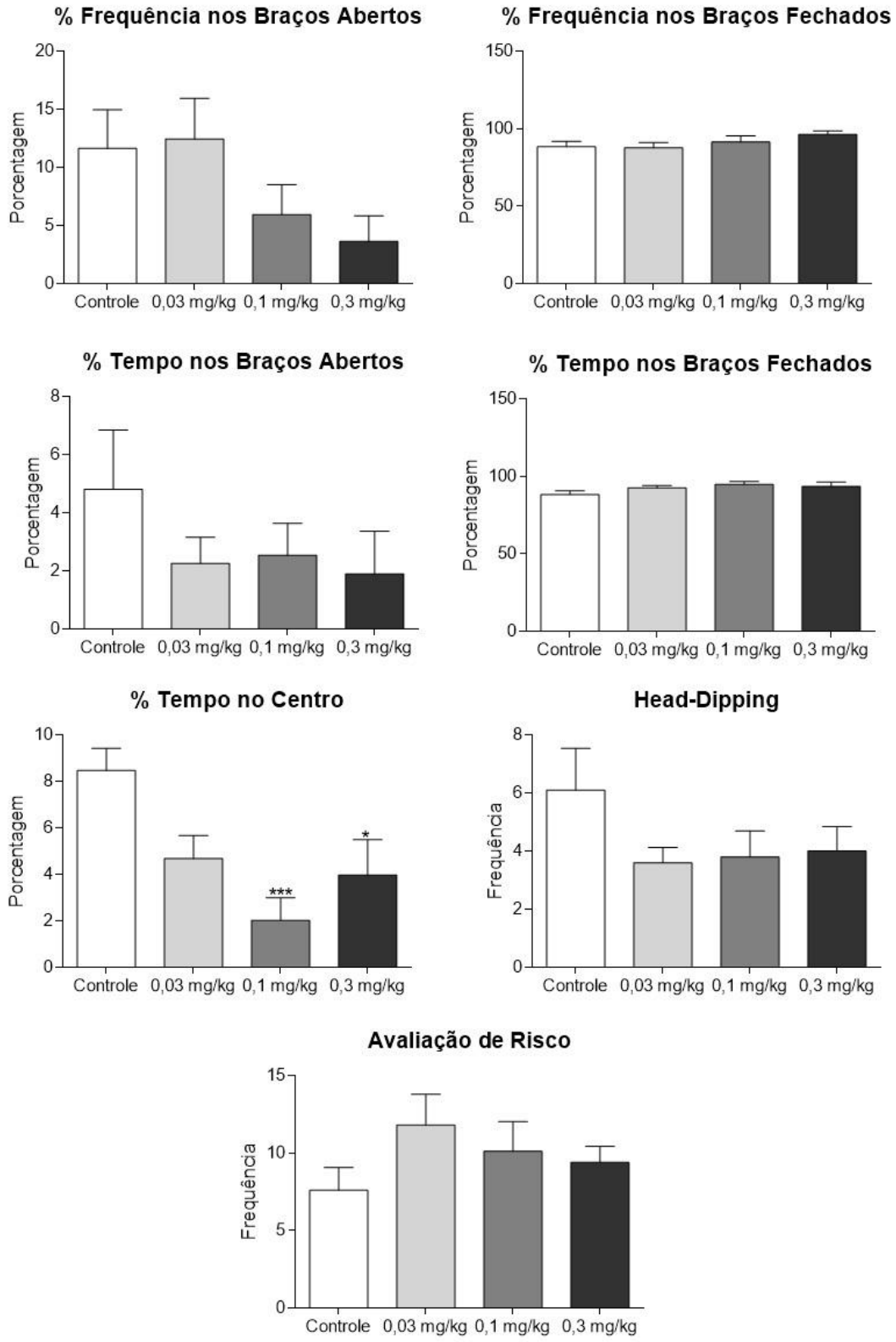
Parâmetros	Controle	Vareniclina (mg/kg)		
		0,03	0,1	0,3
% Entrada BA	11,63 ± 3,33	15,86 ± 5,14	5,94 ± 2,56	3,63 ± 2,22
% Entrada BF	88,36 ± 3,33	87,55 ± 3,49	91,29 ± 3,99	96,36 ± 2,22
% Tempo BA	4,80 ± 2,04	2,26 ± 0,90	2,54 ± 1,10	1,90 ± 1,46
% Tempo BF	88,13 ± 2,39	92,60 ± 1,50	94,75 ± 1,78	93,39 ± 2,86
% Tempo Centro	8,46 ± 0,96	4,68 ± 0,99	2,02 ± 0,98***	3,97 ± 1,51*
Head-dipping	6,10 ± 1,43	3,60 ± 0,52	3,80 ± 0,89	4,00 ± 0,84
Avaliação de Risco	7,60 ± 1,45	11,80 ± 1,98	10,10 ± 1,92	9,40 ± 1,03

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

*p<0,05, ***p<0,01, ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett.

Legenda: BA = braços abertos, BF = braços fechados.

Figura 14 - Parâmetros do comportamento no labirinto em cruz elevado de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo



Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

Nota: *p<0,05, ***p<0,001, ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett.

5.3 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PROLONGADA À VARENICLINA NA INTERAÇÃO SOCIAL DE RATOS

A Tabela 16 e a Figura 15 mostram os resultados da avaliação da interação social. A ANOVA de uma via mostrou diferenças significantes entre os grupos ($F(3,20)=3,892$, $p<0,05$). O pós-teste de Dunnett apontou que os animais dos grupos de 0,1 e 0,3 mg/kg tiveram uma diminuição no tempo de interação social quando comparados com o grupo controle ($p<0,05$).

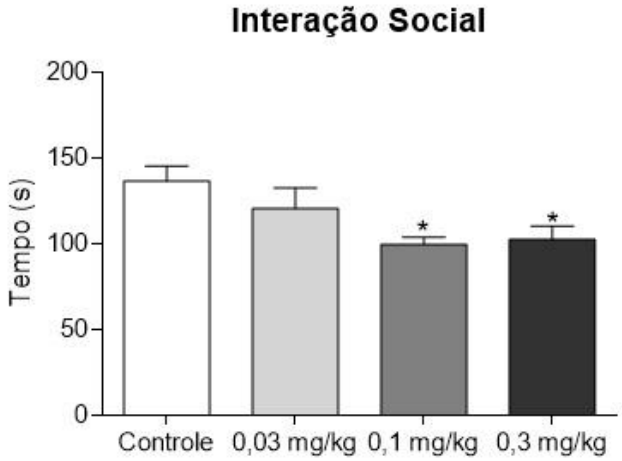
Tabela 16 - Tempo de interação social de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6 duplas de animais por grupo

Interação Social	Controle	Vareniclina (mg/kg)		
		0,03	0,1	0,3
Tempo (s)	136,50 ± 8,89	120,67 ± 11,97	99,67 ± 4,33*	102,50 ± 7,90*

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

*p<0,05, ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett.

Figura 15 - Tempo de interação social de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6 duplas de animais por grupo



Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

Nota: *p<0,05, ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett.

5.4 EXPERIMENTO 4: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PROLONGADA À VARENICLINA NO COMPORTAMENTO ESTEREOTIPADO INDUZIDO POR APOMORFINA EM RATOS

A Tabela 17 e a Figura 16 mostram os resultados da avaliação do comportamento estereotipado. A ANOVA de duas vias não mostrou diferenças significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(3,350)=0,04343$, $p>0,05$), porém há diferenças significantes quanto ao tempo ($F(7,245)=4,451$, $p<0,001$), sem interação entre os fatores ($F(21,245)=1,115$, $p>0,05$). O pós-teste de Bonferroni não apontou diferenças significantes entre os grupos ($p>0,05$).

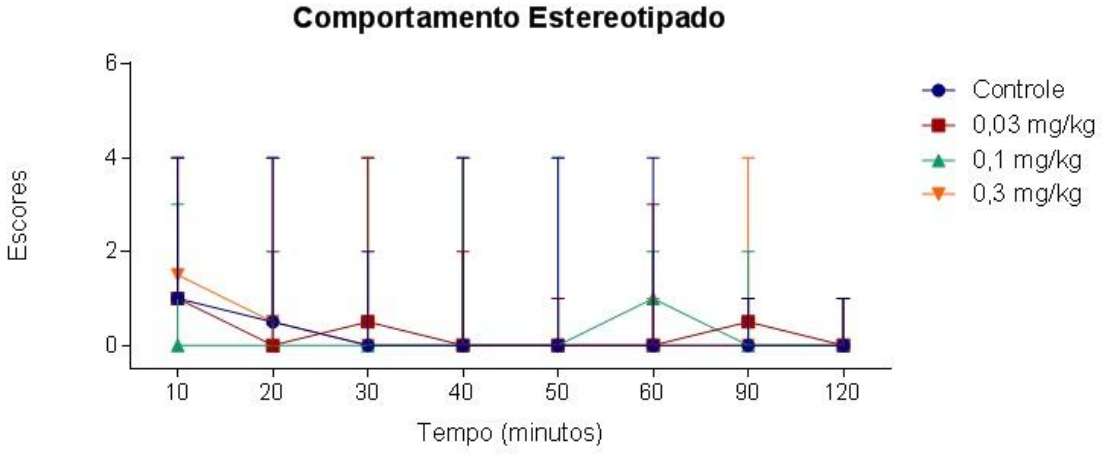
Tabela 17 - Comportamento estereotipado (em escore) induzido por apomorfina (0,6 mg/kg, via subcutânea) de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 29 dias. São apresentados as medianas e os respectivos limites. N=número de animais por grupo

Tempo (min)	Controle (n=10)	Vareniclina (mg/kg)		
		0,03 (n=10)	0,1 (n=9)	0,3 (n=10)
10	1 (0-4)	1 (0-4)	0 (0-3)	2 (0-4)
20	1 (0-4)	0 (0-4)	0 (0-2)	1 (0-2)
30	0 (0-2)	1 (0-4)	0 (0-4)	0 (0-4)
40	0 (0-4)	0 (0-2)	0 (0-4)	0 (0-4)
50	0 (0-4)	0 (0-1)	0 (0-4)	0 (0-1)
60	0 (0-4)	0 (0-3)	1 (0-2)	0 (0-1)
90	0 (0-1)	1 (0-1)	0 (0-2)	0 (0-4)
120	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

$p>0,05$, ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni.

Figura 16 - Comportamento estereotipado (em escore) induzido por apomorfina (0,6 mg/kg, via subcutânea) de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 29 dias. São apresentados as medianas e seus respectivos limites. N=9-10 animais por grupo



Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

p>0,05, ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni.

5.5 EXPERIMENTO 5: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PROLONGADA À VARENICLINA EM RATOS OBSERVADOS NO LABIRINTO DE BARNES E NA ESQUIVA PASSIVA

A Tabela 18 e a Figura 17 mostram os resultados do labirinto de Barnes. Em relação ao número de erros cometidos pelos animais, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não apontou diferenças significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(3,36)=0,6223$, $p>0,05$), mas mostrou diferenças significantes em relação ao tempo ($F(4,144)=5,075$, $p<0,001$), sem interação entre os fatores ($F(12,144)=0,1527$, $p>0,05$).

Em relação à latência para encontrar a caixa de escape, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não mostrou diferenças significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(3,36)=0,5621$, $p>0,05$), mas apontou diferenças significantes em relação ao tempo ($F(4,144)=35,53$, $p<0,0001$), sem interação entre os fatores ($F(12,144)=0,2898$, $p>0,05$) – Tabela 18 e a Figura 22.

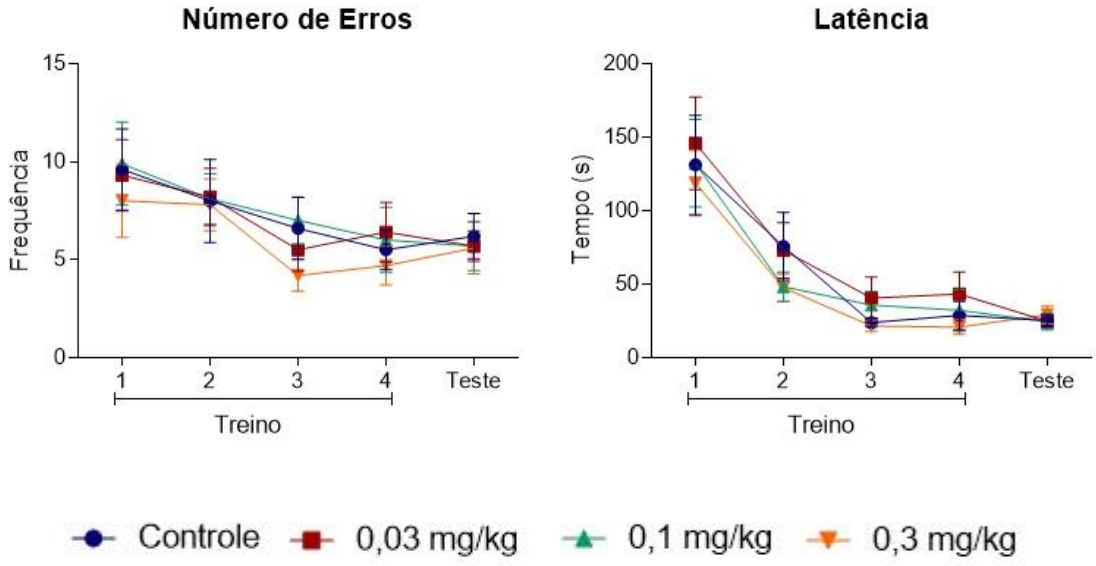
Tabela 18 - Parâmetros avaliados no labirinto de Barnes de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo

Parâmetro	Dia de teste	Controle	Vareniclina (mg/kg)		
			0,03	0,1	0,3
Nº Erros	1	9,60 ± 2,07	9,30 ± 1,81	9,90 ± 2,12	8,00 ± 1,87
	2	8,00 ± 2,12	8,20 ± 1,45	8,10 ± 1,29	7,80 ± 1,32
	3	6,60 ± 1,58	5,50 ± 1,10	7,00 ± 1,19	4,20 ± 0,80
	4	5,50 ± 1,00	6,40 ± 1,52	6,00 ± 1,67	4,70 ± 0,98
	5	6,20 ± 1,16	5,70 ± 0,78	5,70 ± 1,25	5,60 ± 1,32
Latência (s)	1	131,20 ± 33,78	145,90 ± 31,43	132,30 ± 29,75	118,70 ± 22,16
	2	75,70 ± 23,17	73,00 ± 18,90	48,30 ± 9,97	47,50 ± 9,24
	3	23,90 ± 3,18	40,50 ± 14,19	35,80 ± 9,31	21,50 ± 3,67
	4	28,70 ± 9,74	43,30 ± 14,98	32,20 ± 14,25	20,80 ± 5,04
	5	25,20 ± 4,29	24,80 ± 3,78	24,40 ± 5,67	29,20 ± 6,05

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

p>0,05, ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni.

Figura 17 - Parâmetros avaliados no labirinto de Barnes de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 28 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo



Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

Nota: p<0,05, ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni.

A Tabela 19 e a Figura 18 mostram os resultados do teste de esquiva passiva. A ANOVA de duas vias não apontou diferenças significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(3,44)=1,201$, $p>0,05$), porém há diferenças significantes quanto ao tempo ($F(1,44)=197,5$, $p<0,0001$), sem interação entre os fatores ($F(3,44)=1,431$, $p>0,05$). O pós-teste de Bonferroni não mostrou diferenças significantes entre os grupos ($p>0,05$).

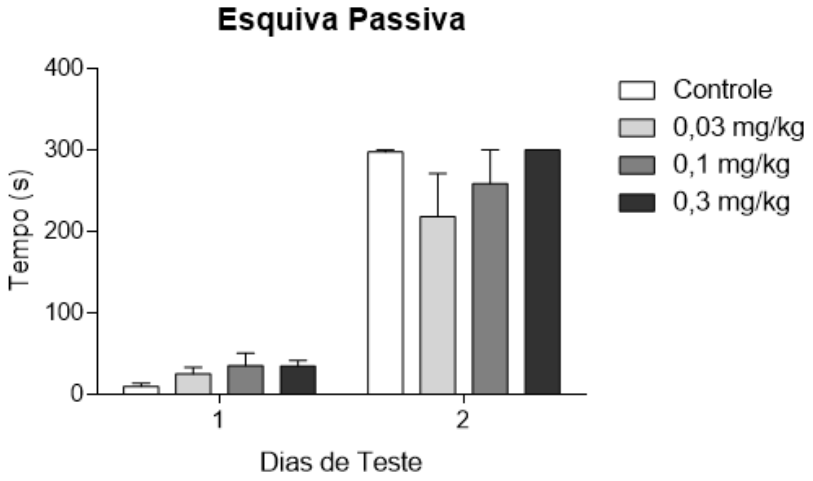
Tabela 19 - Latência (em segundos) para passar para o compartimento escuro no teste de esquiva passiva de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=número de animais por grupo

Dia	Controle (n=6)	Vareniclina (mg/kg)		
		0,03 (n=6)	0,1 (n=7)	0,3 (n=7)
1	9,67 ± 3,70	25,00 ± 8,16	35,29 ± 15,23	34,43 ± 7,03
2	297,50 ± 2,50	218,33 ± 52,89	258,86 ± 41,14	300,00 ± 0,00

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

p>0,05, ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni.

Figura 18 - Latência (em segundos) para passar para o compartimento escuro no teste de esquiva passiva de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-7 animais por grupo



Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

Nota: p>0,05, ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni.

5.6 EXPERIMENTO 6: AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE NEUROTRANSMISSORES E SEUS METABÓLITOS DE RATOS EXPOSTOS AO TRATAMENTO PROLONGADO COM VARENICLINA

As Tabelas 20 a 24 e as Figura 19 a 23 mostram o resultado da avaliação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos nas diferentes estruturas cerebrais. Em relação ao hipotálamo, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos nos seguintes analitos testados: DA ($F(3,36)=1,053$, $p>0,05$), DOPAC ($F(3,36)=1,817$, $p>0,05$), *turnover* DOPAC/DA ($F(3,36)=1,437$, $p>0,05$), 5HT ($F(3,36)=0,2350$, $p>0,05$), 5HIAA ($F(3,36)=0,4394$, $p>0,05$), *turnover* 5HIAA/5HT ($F(3,36)=0,4250$, $p>0,05$), aspartato ($F(3,36)=0,1440$, $p>0,05$), glutamato ($F(3,36)=0,5147$, $p>0,05$) e GABA ($F(3,36)=1,511$, $p>0,05$).

A ANOVA de uma via apontou diferenças significantes entre os grupos em relação aos níveis de glicina ($F(3,36)=3,134$, $p<0,05$). O pós-teste de Dunnett mostrou que os animais dos grupos 0,03 e 0,1 mg/kg tiveram uma diminuição nos níveis desse neurotransmissor quando comparados com os animais do grupo controle ($p<0,05$) – Tabela 20 e Figura 24.

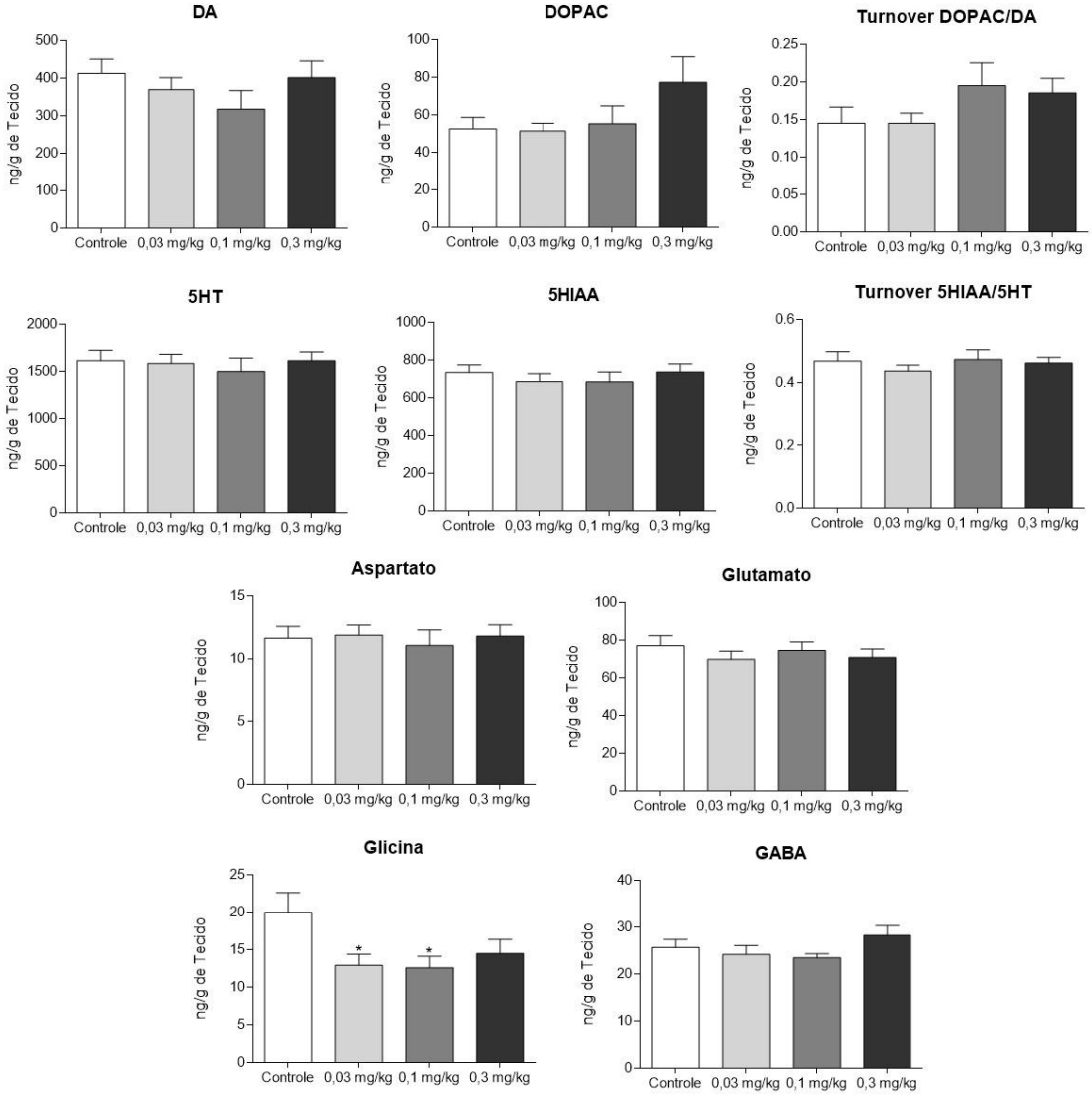
Tabela 20 - Análise de níveis de neurotransmissores de hipotálamo de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo

Analito	Controle	Vareniclina (mg/kg)		
		0,03	0,1	0,3
DA	412,63 ± 37,92	369,30 ± 32,01	317,60 ± 49,55	401,51 ± 44,46
DOPAC	52,54 ± 6,20	51,40 ± 4,13	55,30 ± 9,48	77,30 ± 13,54
DOPAC/DA	0,15 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,20 ± 0,03	0,19 ± 0,02
5HT	1614,74 ± 108,72	1583,80 ± 96,60	1498,20 ± 142,88	1611,80 ± 94,21
5HIAA	733,89 ± 40,05	685,00 ± 43,18	683,40 ± 52,63	737,10 ± 42,01
5HIAA/5HT	0,47 ± 0,03	0,44 ± 0,02	0,47 ± 0,03	0,46 ± 0,02
Aspartato	11,63 ± 0,94	11,89 ± 0,79	11,05 ± 1,25	11,79 ± 0,91
Glutamato	77,03 ± 5,34	69,77 ± 4,33	74,52 ± 4,49	70,79 ± 4,51
Glicina	19,96 ± 2,65	12,90 ± 1,48*	12,58 ± 1,50*	14,49 ± 1,86
GABA	25,64 ± 1,76	24,16 ± 1,93	23,45 ± 0,87	28,24 ± 2,08

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

*p<0,05, ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett.
Legenda: DA = dopamina, DOPAC = ácido 4,4-diidroxifenilacético, 5HT = serotonina, 5HIAA = ácido 5-hidroindol, 3-acético.

Figura 19 - Análise de níveis de neurotransmissores de hipotálamo de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo



Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

Nota: *p<0,05, ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett.
Legenda: DA = dopamina, DOPAC = ácido 4,4-diidroxifenilacético, 5HT = serotonina, 5HIAA = ácido 5-hidroindol, 3-acético.

Em relação ao hipocampo, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos analitos testados: DA ($F(3,36)=0,7324$, $p>0,05$), DOPAC ($F(3,36)=2,337$, $p>0,05$), *turnover* DOPAC/DA ($F(3,36)=0,9956$, $p>0,05$), 5HT ($F(3,36)=0,2488$, $p>0,05$), 5HIAA ($F(3,36)=0,3073$, $p>0,05$), *turnover* 5HIAA/5HT ($F(3,36)=0,4292$, $p>0,05$), aspartato ($F(3,36)=0,4555$, $p>0,05$), glutamato ($F(3,36)=0,6210$, $p>0,05$), glicina ($F(3,36)=0,6964$, $p>0,05$), GABA ($F(3,36)=2,331$, $p>0,05$) – Tabela 21 e Figura 25.

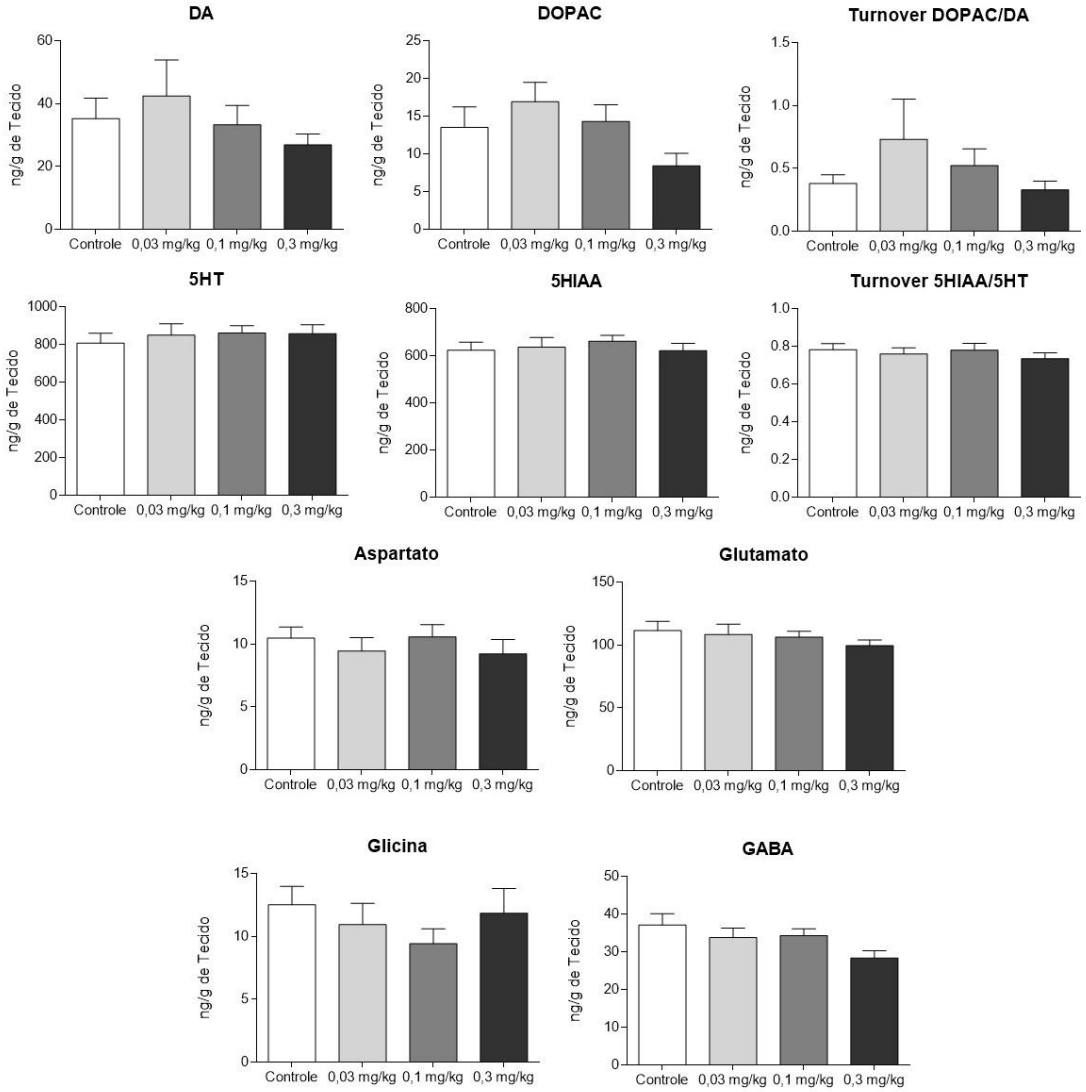
Tabela 21- Análise de níveis de neurotransmissores de hipocampo de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo

Analito	Controle	Vareniclina (mg/kg)		
		0,03	0,1	0,3
DA	35,20 ± 6,50	42,40 ± 11,47	33,30 ± 6,07	26,92 ± 3,43
DOPAC	13,50 ± 2,72	16,90 ± 2,58	14,30 ± 2,20	8,41 ± 1,69
DOPAC/DA	0,38 ± 0,07	0,73 ± 0,32	0,52 ± 0,13	0,33 ± 0,07
5HT	806,10 ± 52,26	849,00 ± 60,80	860,20 ± 39,48	857,20 ± 46,58
5HIAA	623,00 ± 34,79	636,30 ± 40,70	661,50 ± 25,00	621,60 ± 30,99
5HIAA/5HT	0,78 ± 0,03	0,76 ± 0,03	0,78 ± 0,04	0,73 ± 0,03
Aspartato	10,47 ± 0,88	108,27 ± 8,22	10,56 ± 0,99	9,22 ± 1,14
Glutamato	111,39 ± 7,38	108,27 ± 8,22	106,20 ± 4,80	99,40 ± 4,58
Glicina	12,50 ± 1,46	10,93 ± 1,69	9,42 ± 1,18	11,84 ± 1,97
GABA	37,05 ± 3,08	33,76 ± 2,50	34,26 ± 1,80	28,34 ± 1,95

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

$p>0,05$, ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett.
Legenda: DA = dopamina, DOPAC = ácido 4,4-diidroxifenilacético, 5HT = serotonina, 5HIAA = ácido 5-hidroindol, 3-acético.

Figura 20 - Análise de níveis de neurotransmissores de hipocampo de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo



Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

Nota: p>0,05, ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett.
Legenda: DA = dopamina, DOPAC = ácido 4,4-diidroxifenilacético, 5HT = serotonina, 5HIAA = ácido 5-hidroindol, 3-acético.

Em relação ao corpo estriado, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos nos seguintes analitos testados: DA (F(3,36)=0,7457, p>0,05), DOPAC (F(3,36)=1,071, p>0,05), *turnover* DOPAC/DA (F(3,36)=1,870, p>0,05), HVA (F(3,36)=0,7047, p>0,05), *turnover* HVA/DA (F(3,36)=0,8384, p>0,05), 5HT (F(3,36)=0,7794, p>0,05), 5HIAA (F(3,36)=0,7125, p>0,05), *turnover* 5HIAA/5HT (F(3,36)=0,2194, p>0,05), aspartato (F(3,36)=2,424, p>0,05), glicina (F(3,36)=0,8167, p>0,05) e GABA (F(3,36)=2,244, p>0,05) – Tabela 22 e Figura 26.

A ANOVA de uma via apontou diferenças significantes entre os grupos em relação aos níveis de glutamato ($F(3,36)=3,106$, $p<0,05$). O pós-teste de Dunnett mostrou que os animais dos grupos 0,03 tiveram aumento nos níveis desse neurotransmissor quando comparados com os animais do grupo controle ($p<0,05$) – Tabela 22 e Figura 21.

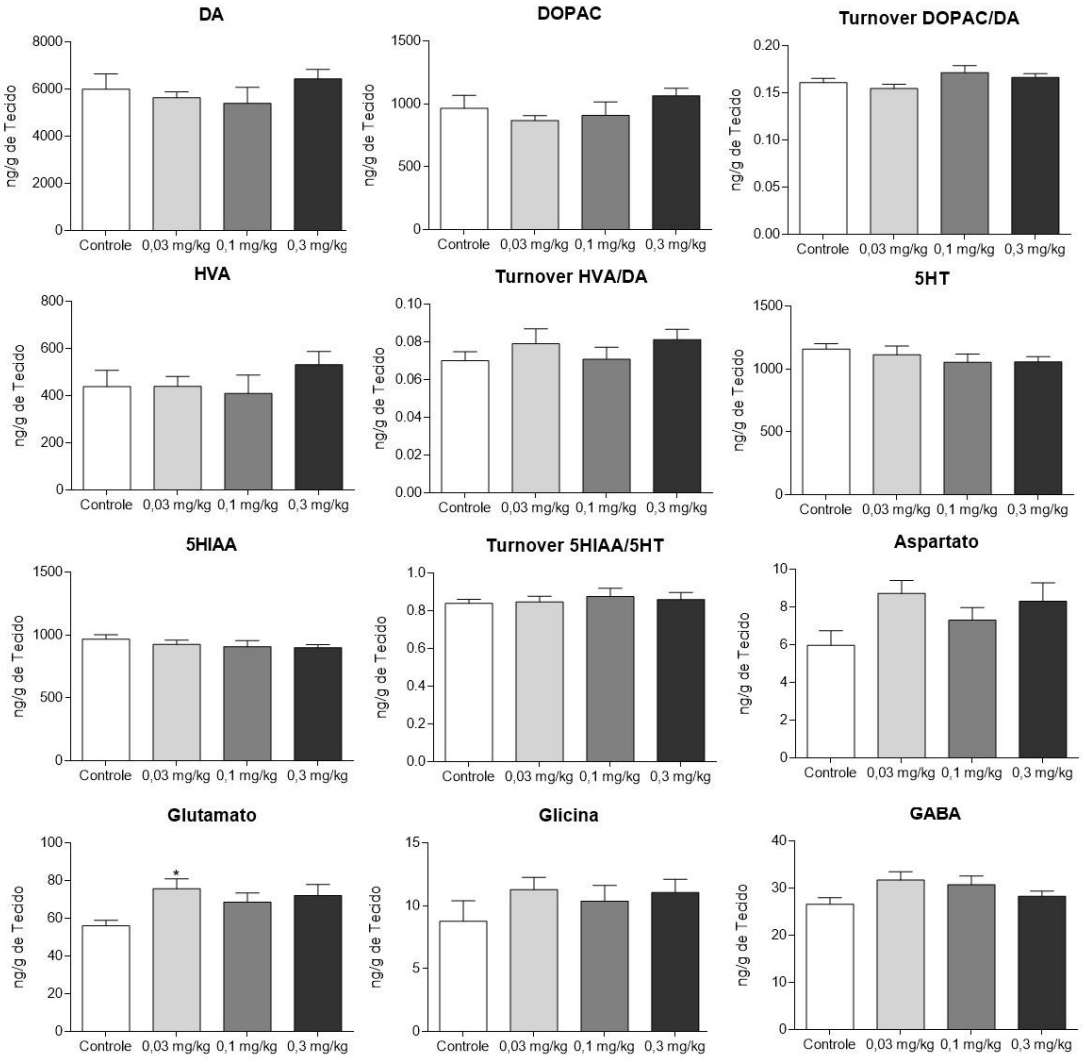
Tabela 22 - Análise de níveis de neurotransmissores de corpo estriado de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo

Analito	Controle	Vareniclina (mg/kg)		
		0,03	0,1	0,3
DA	5994,40 ± 646,59	5628,40 ± 255,37	5396,10 ± 674,04	6432,00 ± 400,37
DOPAC	964,50 ± 103,37	866,90 ±39,00	908,10 ± 107,76	1064,70 ± 59,95
DOPAC/DA	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,17 ±0,01	0,17 ± 0,01
HVA	438,50 ± 68,91	439,30 ± 42,48	409,60 ±77,74	530,80 ± 56,15
HVA/DA	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01
5HT	1157,10 ± 43,62	1112,10 ± 69,31	1053,10 ± 64,72	1056,10 ± 42,34
5HIAA	967,10 ± 34,54	924,50 ± 33,48	907,30 ± 48,06	898,20 ± 24,91
5HIAA/5HT	0,84 ± 0,02	0,85 ± 0,03	0,87 ± 0,04	0,86 ± 0,04
Aspartato	5,96 ± 0,78	8,72 ± 0,69	7,30 ± 0,66	8,30 ± 0,98
Glutamato	56,04 ± 2,80	75,60 ± 5,27*	68,56 ± 4,86	72,06 ± 5,85
Glicina	8,75 ± 1,64	11,27 ± 0,99	10,36 ± 1,24	11,04 ± 1,05
GABA	26,59 ± 1,39	31,73 ± 1,76	30,71 ± 1,85	28,27 ± 1,12

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

*p<0,05, ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett.
Legenda: DA = dopamina, DOPAC = ácido 4,4-diidroxifenilacético, HVA = ácido 5-hidroxindolacético, 5HT = serotonina, 5HIAA = ácido 5-hidroindol, 3-acético.

Figura 21 - Análise de níveis de neurotransmissores de corpo estriado de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo



Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

Nota: *p<0,05, ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett.
Legenda: DA = dopamina, DOPAC = ácido 4,4-diidroxifenilacético, HVA = ácido 5-hidroxindolacético, 5HT = serotonina, 5HIAA = ácido 5-hidroindol, 3-acético.

Em relação ao córtex, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos nos seguintes analitos testados: DOPAC ($F(3,36)=1,427$, $p>0,05$), *turnover* DOPAC/DA ($F(3,36)=0,9844$, $p>0,05$), HVA ($F(3,36)=2,813$, $p>0,05$), *turnover* HVA/DA ($F(3,36)=1,068$, $p>0,05$), 5HT ($F(3,36)=0,3766$, $p>0,05$), 5HIAA ($F(3,36)=2,406$, $p>0,05$), *turnover* 5HIAA/5HT ($F(3,36)=1,346$, $p>0,05$), aspartato ($F(3,36)=0,2657$, $p>0,05$), glutamato ($F(3,36)=0,9412$, $p>0,05$), glicina ($F(3,36)=2,257$, $p>0,05$) e GABA ($F(3,36)=0,3035$, $p>0,05$) – Tabela 23 e Figura 27.

A ANOVA de uma via apontou diferenças significantes entre os grupos em relação aos níveis de DA ($F(3,36)=2,525$, $p<0,05$). O pós-teste de Dunnett mostrou que os animais dos grupos 0,03 tiveram aumento nos níveis desse neurotransmissor quando comparados com os animais do grupo controle ($p<0,05$) – Tabela 23 e Figura 27.

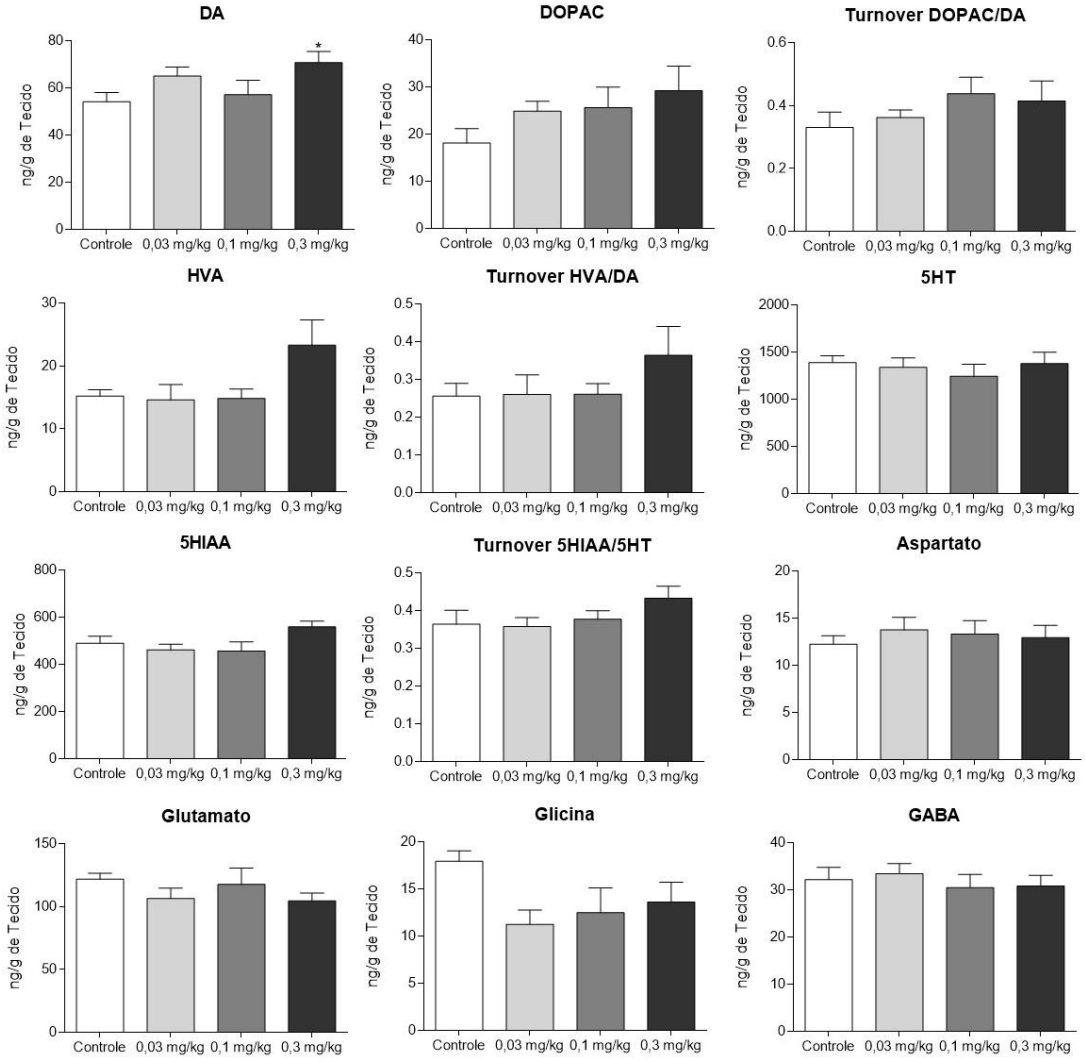
Tabela 23 - Análise de níveis de neurotransmissores de córtex de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo

Analito	Controle	Vareniclina (mg/kg)		
		0,03	0,1	0,3
DA	70,27 ± 11,46	65,00 ± 3,85	57,11 ± 6,12	70,63 ± 4,74*
DOPAC	19,72 ± 3,45	24,89 ± 2,06	25,56 ± 4,39	29,25 ± 5,23
DOPAC/DA	0,29 ± 0,04	0,35 ± 0,03	0,44 ± 0,05	0,41 ± 0,06
HVA	15,13 ± 1,00	14,55 ± 2,43	14,78 ± 1,53	23,38 ± 4,01
HVA/DA	0,26 ± 0,03	0,26 ± 0,05	0,26 ± 0,03	0,36 ± 0,08
5HT	1382,00 ± 71,94	1337,89 ± 99,62	1244,00 ± 126,45	1377,25 ± 121,84
5HIAA	486,92 ± 30,41	461,44 ± 24,48	456,11 ± 39,45	558,63 ± 25,04
5HIAA/5HT	0,36 ± 0,04	0,36 ± 0,02	0,38 ± 0,02	0,43 ± 0,03
Aspartato	12,22 ± 0,91	13,76 ± 1,33	13,30 ± 1,43	12,93 ± 1,32
Glutamato	121,68 ± 4,74	106,38 ± 8,36	117,61 ± 12,99	104,57 ± 6,12
Glicina	17,92 ± 1,12	11,24 ± 1,52	12,47 ± 2,64	13,60 ± 2,11
GABA	32,19 ± 2,58	33,42 ± 2,16	30,44 ± 2,83	30,83 ± 2,25

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

*p<0,05, ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett.
Legenda: DA = dopamina, DOPAC = ácido 4,4-diidroxifenilacético, HVA = ácido 5-hidroxindolacético, 5HT = serotonina, 5HIAA = ácido 5-hidroindol, 3-acético.

Figura 22 - Análise de níveis de neurotransmissores de córtex de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo



Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

Nota: *p<0,05, ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett.
Legenda: DA = dopamina, DOPAC = ácido 4,4-diidroxifenilacético, HVA = ácido 5-hidroxindolacético, 5HT = serotonina, 5HIAA = ácido 5-hidroindol, 3-acético.

Em relação ao cerebelo, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos analitos testados: DA ($F(3,36)=1,774$, $p>0,05$), DOPAC ($F(3,36)=2,812$, $p>0,05$), *turnover* DOPAC/DA ($F(3,36)=1,281$, $p>0,05$), 5HT ($F(3,36)=0,2993$, $p>0,05$), 5HIAA ($F(3,36)=2,598$, $p>0,05$), *turnover* 5HIAA/5HT ($F(3,36)=2,558$, $p>0,05$), aspartato ($F(3,36)=1,194$, $p>0,05$), glutamato ($F(3,36)=0,1364$, $p>0,05$), glicina ($F(3,36)=1,178$, $p>0,05$), GABA ($F(3,36)=0,7844$, $p>0,05$) – Tabela 24 e Figura 23.

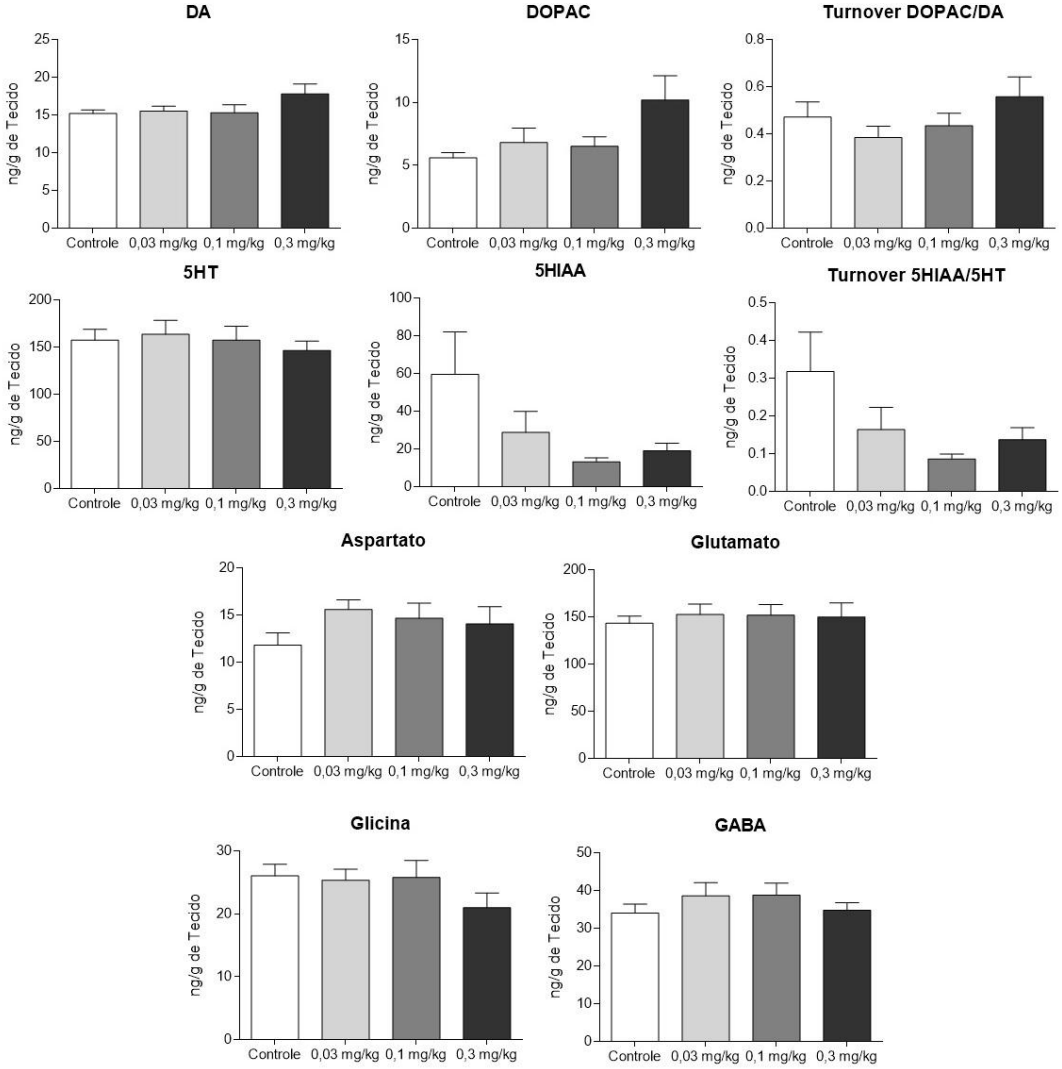
Tabela 24 - Análise de níveis de neurotransmissores de cerebelo de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo

Analito	Controle	Vareniclina (mg/kg)		
		0,03	0,1	0,3
DA	15,20 ± 0,47	15,50 ± 0,65	15,30 ± 1,05	17,80 ± 1,31
DOPAC	6,37 ± 0,62	7,00 ± 1,15	6,50 ± 0,76	10,20 ± 1,92
DOPAC/DA	0,47 ± 0,07	0,45 ± 0,08	0,43 ± 0,05	0,56 ± 0,08
5HT	157,20 ± 11,52	163,50 ± 14,90	157,20 ± 14,81	146,40 ± 10,00
5HIAA	59,50 ± 22,57	28,80 ± 11,13	13,20 ± 2,12	19,00 ± 4,04
5HIAA/5HT	0,32 ± 0,10	0,16 ± 0,06	0,09 ± 0,01	0,14 ± 0,03
Aspartato	11,81 ± 1,30	15,59 ± 1,02	14,66 ± 1,61	14,05 ± 1,83
Glutamato	143,20 ± 7,51	152,65 ± 10,90	151,71 ± 11,45	149,93 ± 15,07
Glicina	26,05 ± 1,83	25,35 ± 1,75	25,75 ± 2,74	20,95 ± 2,37
GABA	34,01 ± 2,36	38,60 ± 3,47	38,79 ± 3,21	34,79 ± 1,99

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

$p>0,05$, ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett.
Legenda: DA = dopamina, DOPAC = ácido 4,4-diidroxifenilacético, 5HT = serotonina, 5HIAA = ácido 5-hidroindol, 3-acético.

Figura 23 - Análise de níveis de neurotransmissores de cerebelo de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo



Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

Nota: p>0,05, ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett.
Legenda: DA = dopamina, DOPAC = ácido 4,4-diidroxifenilacético, 5HT = serotonina, 5HIAA = ácido 5-hidroindol, 3-acético.

5.7 EXPERIMENTO 7: AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS SÉRICOS E DE URINA DE RATOS EXPOSTOS AO TRATAMENTO PROLONGADO COM VARENICLINA

A Tabela 25 e a Figura 24 mostram os resultados dos parâmetros avaliados no hemograma, realizado no 30º dia de tratamento dos animais. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos

parâmetros avaliados: células brancas (WBC) ($F(3,31)=1,293$, $p>0,05$), células vermelhas (RBC) ($F(3,31)=0,1246$, $p>0,05$), hemoglobina (HGB) ($F(3,31)=0,4841$, $p>0,05$), hematócrito (HCT) ($F(3,31)=0,5555$, $p>0,05$), volume corpuscular médio (MCV) ($F(3,31)=1,903$, $p>0,05$), hemoglobina corpuscular média (MCH) ($F(3,31)=0,5381$, $p>0,05$), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) ($F(3,31)=1,307$, $p>0,05$) e plaquetas (PLT) ($F(3,31)=0,8081$, $p>0,05$).

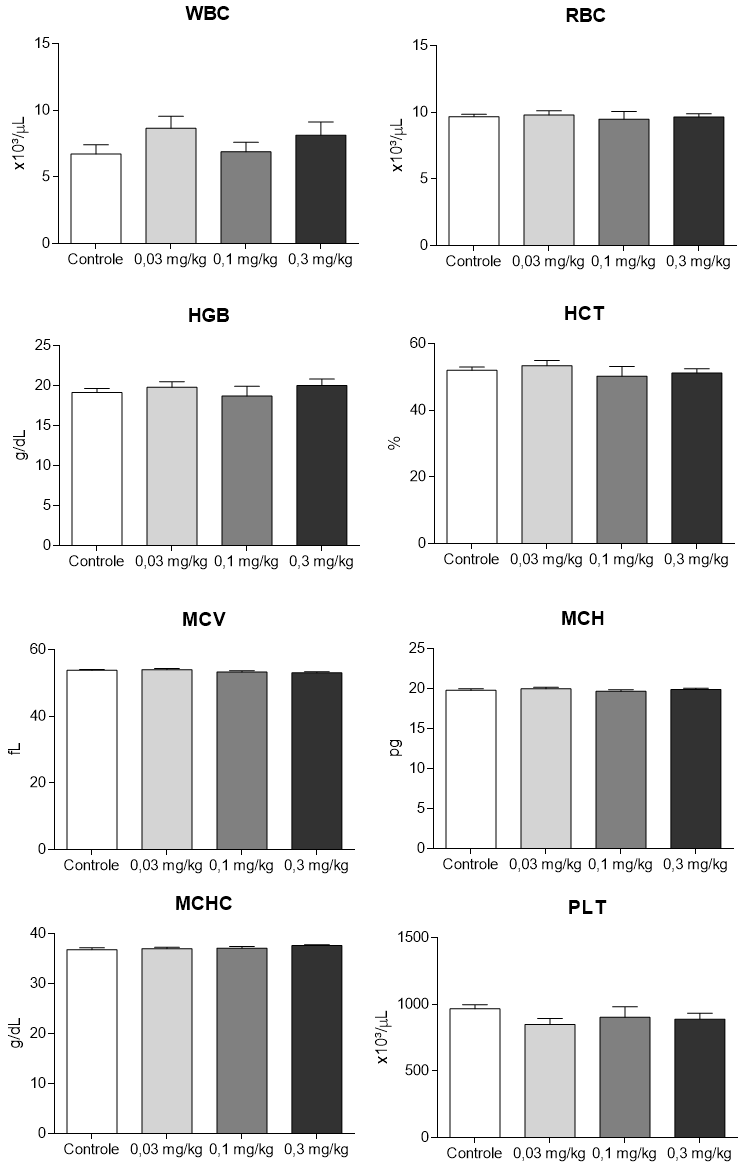
Tabela 25 - Parâmetros avaliados no hemograma de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=número de animais por grupo

Parâmetros	Controle (n=8)	Vareniclina (mg/kg)		
		0,03 (n=10)	0,1 (n=9)	0,3 (n=8)
WBC (x10³/µL)	6,71 ± 0,69	8,64 ± 0,90	6,88 ± 0,71	8,13 ± 0,99
RBC (x10³/µL)	9,67 ± 0,18	9,79 ± 0,32	9,48 ± 0,58	9,64 ± 0,24
HGB (g/dL)	19,14 ± 0,51	19,78 ± 0,70	18,69 ± 1,23	20,01 ± 0,81
HCT (%)	51,98 ± 1,01	53,39 ± 1,53	50,20 ± 2,91	51,16 ± 1,24
MCV (fL)	53,80 ± 0,22	53,99 ± 0,33	53,28 ± 0,39	53,05 ± 0,28
MCH (pg)	19,79 ± 0,18	19,97 ± 0,18	19,67 ± 0,20	19,89 ± 0,16
MCHC (g/dL)	36,80 ± 0,35	36,99 ± 0,25	37,08 ± 0,36	37,61 ± 0,17
PLT (x10³/µL)	965,13 ± 31,28	848,70 ± 44,24	902,44 ± 78,51	888,50 ± 44,01

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

$p>0,05$, ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey.
Legenda: WBC = células brancas, RBC = células vermelhas, HGB = hemoglobina, HCT = hematócrito, MCV = volume corpuscular médio, MCH = hemoglobina corpuscular média, MCHC = concentração de hemoglobina corpuscular média e PLT = plaquetas.

Figura 24 - Parâmetros avaliados no hemograma de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8-10 animais por grupo



Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

Nota: p>0,05, ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey.
Legenda: WBC = células brancas, RBC = células vermelhas, HGB = hemoglobina, HCT = hematócrito, MCV = volume corpuscular médio, MCH = hemoglobina corpuscular média, MCHC = concentração de hemoglobina corpuscular média e PLT = plaquetas.

A Tabela 26 e a Figura 25 mostram os resultados dos parâmetros avaliados na bioquímica sanguínea sérica, realizada no 30º dia de tratamento dos animais. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos nos seguintes parâmetros testados: albumina ($F(3,36)=0,5517$, $p>0,05$), AST ($F(3,36)=2,307$, $p>0,05$), glicose ($F(3,36)=2,739$, $p>0,05$), colesterol total

(F(3,36)=1,791, p>0,05), HDL (F(3,36)=1,755, p>0,05), triglicérides (F(3,36)=0,4460, p>0,05) e creatinina (F(3,36)=0,9366, p>0,05).

A ANOVA de uma via apontou diferenças significantes entre os grupos em relação aos seguintes parâmetros: ALT (F(3,36)=3,513, p<0,05), FAL (F(3,36)=5,178, p<0,01), GGT (F(3,36)=3,565, p<0,05), proteína total (F(3,36)=3,183, p<0,05) e uréia (F(3,36)=5,889, p<0,01). O pós-teste de Dunnett mostrou que os animais do grupo 0,1 mg/kg tiveram diminuição nos níveis de ALT (p<0,05), FAL (p<0,01), proteína total (p<0,05) e ureia (p<0,05) e os animais do grupo 0,3 mg/kg tiveram diminuição dos níveis de FAL (p<0,05) e ureia (p<0,05) quando comparados ao grupo controle – Tabela 26 e Figura 30.

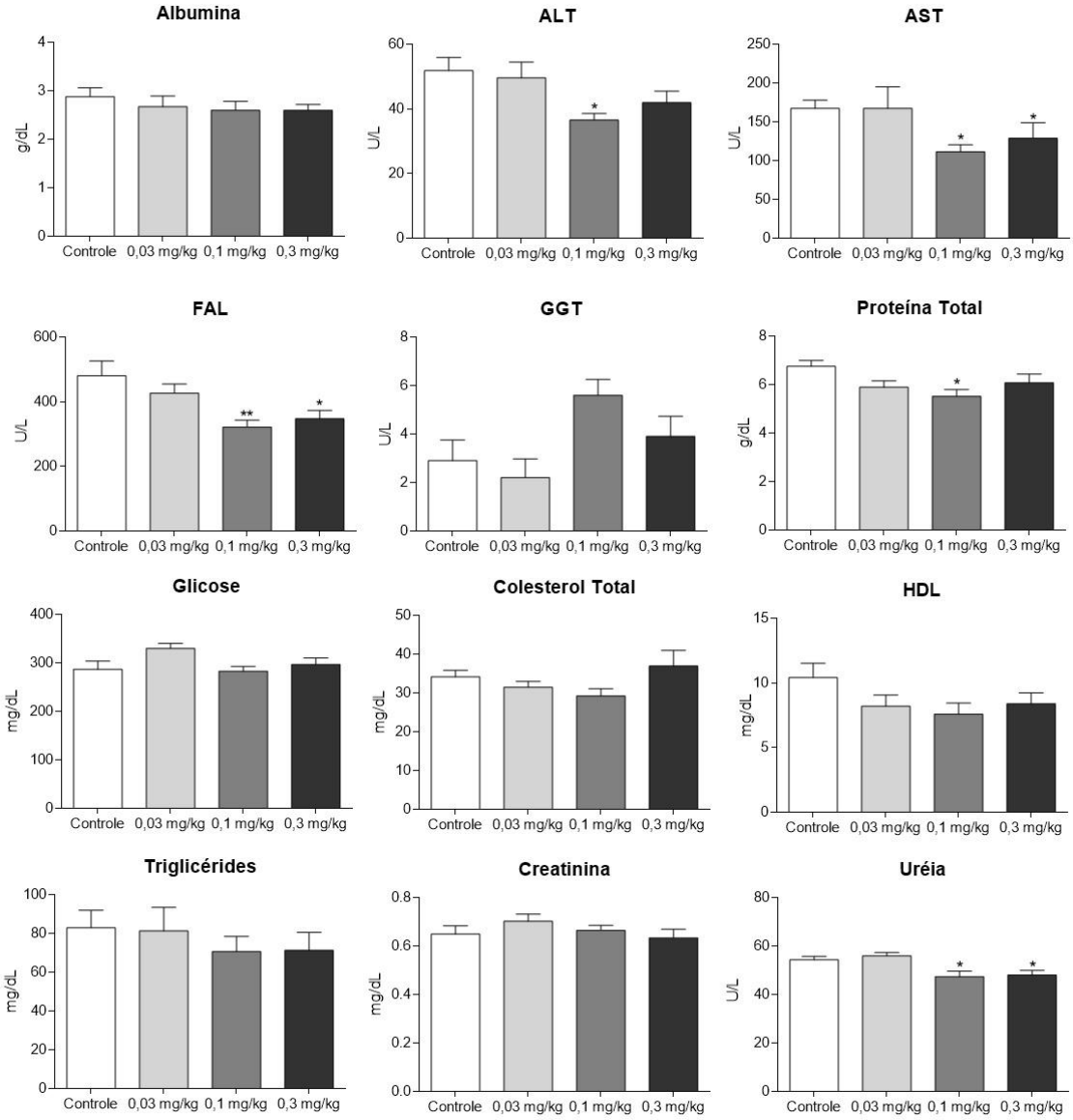
Tabela 26 - Parâmetros avaliados na bioquímica sérica de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo

Parâmetros	Controle	Vareniclina (mg/kg)		
		0,03	0,1	0,3
Albumina (g/dL)	2,87 ± 0,18	2,67 ± 0,22	2,60 ± 0,18	2,60 ± 0,12
ALT (U/L)	51,85 ± 4,01	49,60 ± 4,89	36,53 ± 2,03*	41,91 ± 3,55
AST (U/L)	167,22 ± 10,69	167,25 ± 27,92	111,43 ± 8,88*	128,86 ± 19,92*
FAL (U/L)	480,23 ± 46,19	426,01 ± 28,54	321,12 ± 21,88**	347,12 ± 26,17*
GGT (U/L)	2,89 ± 0,85	2,20 ± 0,77	5,63 ± 0,65	3,90 ± 0,84
PT (g/dL)	6,75 ± 0,25	5,89 ± 0,26	5,52 ± 0,28*	6,08 ± 0,36
Glicose (mg/dL)	286,82 ± 16,85	329,86 ± 10,28	282,68 ± 10,24	296,97 ± 13,15
Col.Total (mg/dL)	34,15 ± 1,66	31,49 ± 1,49	29,23 ± 1,87	36,92 ± 4,03
HDL (mg/dL)	10,41 ± 1,10	8,20 ± 0,87	7,58 ± 0,86	8,39 ± 0,84
TRI (mg/dL)	82,91 ± 9,05	81,29 ± 12,07	70,66 ± 7,82	71,26 ± 9,30
Creatinina (mg/dL)	0,65 ± 0,03	0,70 ± 0,03	0,66 ± 0,02	0,63 ± 0,03
Ureia (U/L)	54,30 ± 1,43	55,92 ± 1,36	47,37 ± 2,24*	48,00 ± 1,98*

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

*p<0,05, **p<0,01, ANOVA de uma via seguida de teste de Dunnett
Legenda: ALT = alanina aminotransferase, AST = aspartato transaminase, FAL = fosfatase alcalina, GGT = gama glutamil transpeptidase, PT = proteína total, HDL = *High Density Lipoproteins*, TRI = triglicérides.

Figura 25 - Parâmetros avaliados na bioquímica sérica de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo



Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

Nota: *p<0,05, **p<0,01, ANOVA de uma via seguida de teste de Dunnett
Legenda: ALT = alanina aminotransferase, AST = aspartato transaminase, FAL = fosfatase alcalina, GGT = gama glutamil transpeptidase, HDL = *High Density Lipoproteins*.

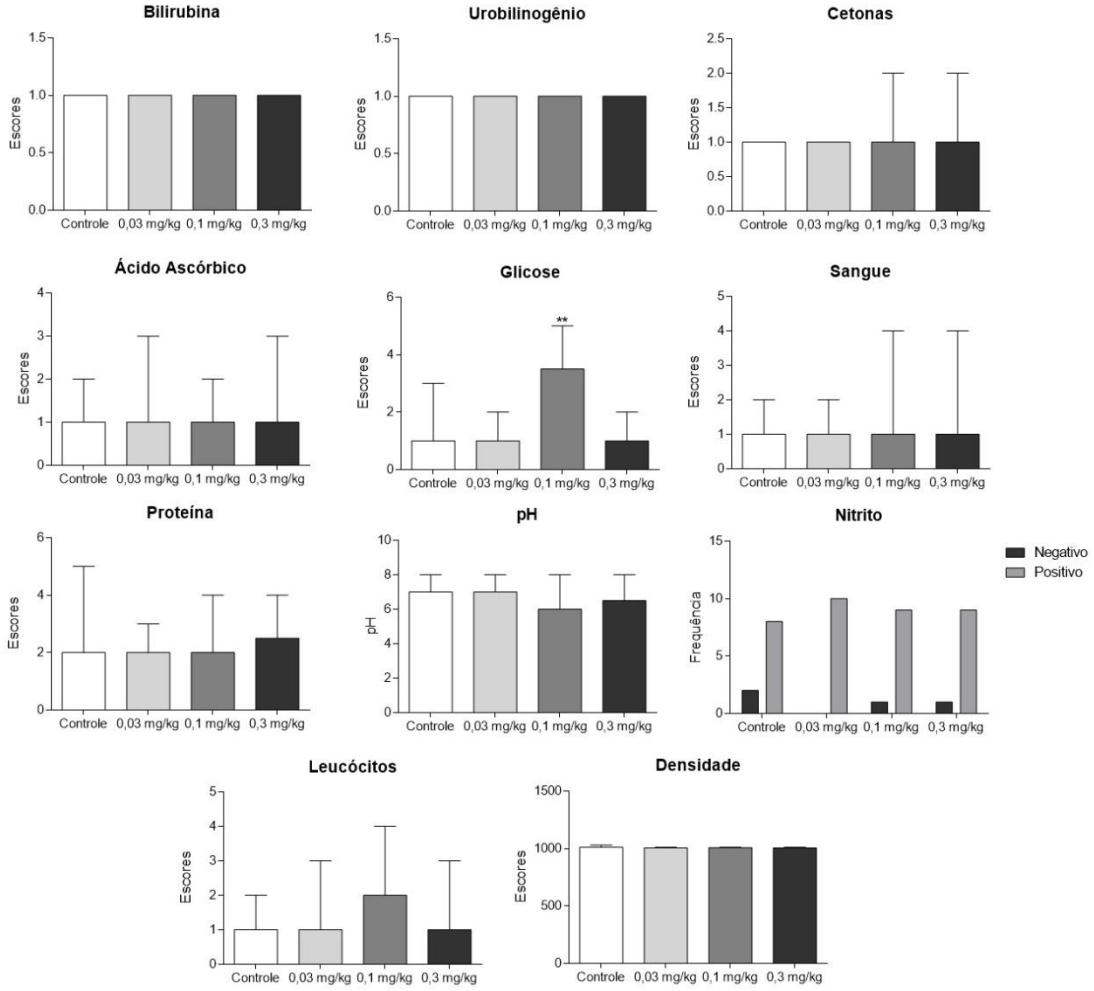
A Tabela 27 e a Figura 26 mostram os resultados dos parâmetros avaliados na análise de urina, realizado no 30º dia de tratamento dos animais. A análise de variância não paramétrica (Kruskal-Wallis) não apontou diferenças significantes entre os grupos (p>0,05), exceto para a glicose (KW=18,36, p<0,0004) que se mostrou aumentada no grupo 0,01 mg/kg em relação ao grupo controle. O teste de contingência empregado para avaliar a presença de nitrito também não apontou diferença significante entre os grupos (Qui-quadrado=2,222, df=3, p>0,05).

Tabela 27 - Parâmetros avaliados na análise de urina de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as medianas e os respectivos limites, exceto para o nitrito que é apresentada a relação presença/ausência. N=10 animais por grupo

Parâmetros	Controle	Vareniclina (mg/kg)		
		0,03	0,1	0,3
Bilirubina	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)
Urobilinogênio	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)
Cetonas	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)
Ác. Ascórbico	1 (1-2)	1 (1-3)	1 (1-2)	1 (1-3)
Glicose	1 (1-3)	1 (1-2)	4 (1-5)**	1 (1-2)
Proteína	2 (1-5)	2 (2-3)	2 (1-4)	3 (1-4)
Sangue	1 (1-2)	1 (1-2)	1 (1-4)	1 (1-4)
pH	7 (5-8)	7 (6-8)	6 (6-8)	7 (6-8)
Nitrito	8/2	10/0	9/1	9/1
Leucócitos	1 (1-2)	1 (1-3)	2 (1-4)	1 (1-3)
Densidade	1010 (1005-1030)	1005 (1005-1010)	1008 (1005-1010)	1005 (1005-1010)

Fonte: (MAGALHÃES, 2016).
**p>0,01, análise de variância não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de teste de Dunn's e para o nitrito empregou-se o teste de contingência.

Figura 26 - Parâmetros avaliados na análise de urina de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias São apresentados as medianas e os respectivos limites, exceto para o nitrito que é apresentada a relação presença/ausência. N=10 animais por grupo



Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

Nota: **p>0,01, análise de variância não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de teste de Dunn's e para o nitrito empregou-se o teste de contingência.

5.8 EXPERIMENTO 8: AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA DE ÓRGÃOS DE RATOS EXPOSTOS AO TRATAMENTO PROLONGADO COM VARENICLINA

A Tabela 28 e a Figura 27 mostram o peso relativo dos órgãos. A análise de variância não paramétrica (Kruskal-Wallis) não apontou diferenças significantes entre os grupos (p>0,05) em nenhum dos parâmetros analisados.

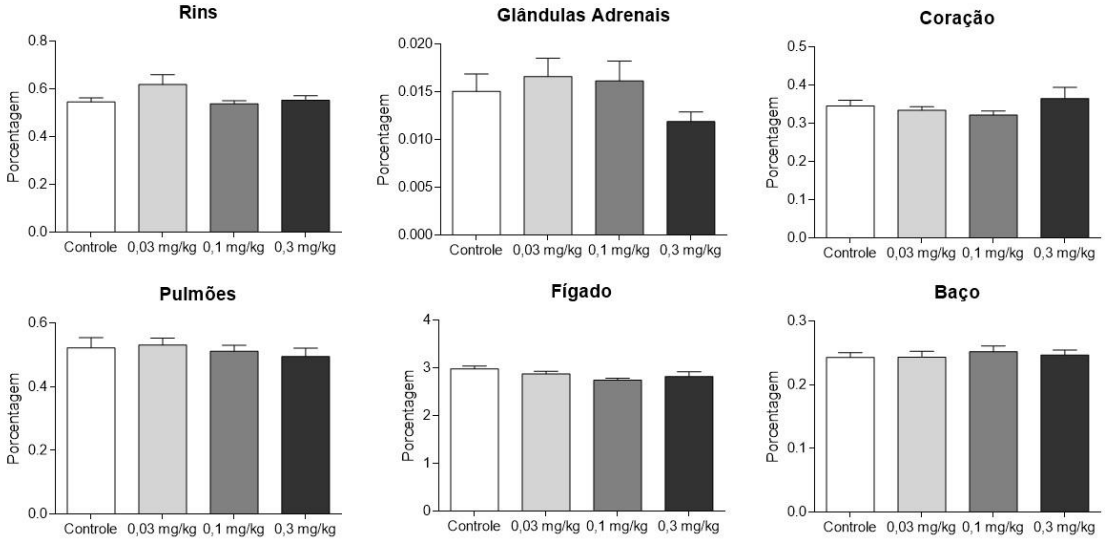
Tabela 28 - Peso relativo dos órgãos de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo

Órgão	Controle	Vareniclina (mg/kg)		
		0,03	0,1	0,3
Rins	0,5449 ± 0,0172	0,6184 ± 0,0411	0,5379 ± 0,0121	0,5522 ± 0,0186
Adrenais	0,0150 ± 0,0018	0,0166 ± 0,0019	0,0161 ± 0,0021	0,0199 ± 0,0010
Coração	0,3454 ± 0,0148	0,3341 ± 0,0088	0,3213 ± 0,0109	0,3650 ± 0,0290
Pulmões	0,5219 ± 0,0320	0,5303 ± 0,0217	0,5109 ± 0,0187	0,4945 ± 0,0261
Fígado	2,9786 ± 0,0581	2,8721 ± 0,0550	2,7400 ± 0,0426	2,8181 ± 0,1005
Baço	0,2428 ± 0,0075	0,2431 ± 0,0093	0,2516 ± 0,0092	0,2467 ± 0,0078

Fonte: (MAGALHLÃES, 2016).

p>0,05, análise de variância não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de teste de Dunn's.

Figura 27 - Peso relativo dos órgãos de ratos que receberam ou não (controle) vareniclina (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), por gavagem, durante 30 dias. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=10 animais por grupo



Fonte: (MAGALHÃES, 2016).

Nota: p>0,05, Análise de variância não paramétrica (Kruskal-Wallis).

Nas avaliações anatomopatológica e histopatológica, de modo geral, não foram observadas alterações dignas de nota entre os grupos.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foi empregada a dose terapêutica de vareniclina empregada no ser humano (0,03 mg/kg) e múltiplos dessa dose (0,1 e 0,3 mg/kg), bem como a via de administração oral (gavagem). Isso foi feito de acordo com os protocolos para avaliação de toxicidade que preconizam o emprego de pelo menos três doses diferentes e a via de administração que o indivíduo estará exposto em condições naturais (OECD, 2008; RIGHI; SPINOSA; PALERMO-NETO, 2008). Esses protocolos sugerem também que sejam avaliados o consumo de água e de ração, bem como o ganho de peso dos animais.

O consumo de água e de ração, bem como o ganho de peso dos animais avaliados semanalmente durante todo o tratamento prolongado com vareniclina não se mostraram alterados, indicando ausência de toxicidade nas doses empregadas no presente estudo.

Neste trabalho foram avaliados os efeitos da administração de vareniclina no comportamento de ratos utilizando diferentes modelos comportamentais, a fim de determinar os efeitos dessa substância no sistema nervoso central. O teste do campo aberto foi empregado para avaliar a atividade motora, emocionalidade e ansiedade dos animais; os testes de labirinto em cruz elevado e interação social foram utilizados para avaliar ansiedade; o teste de comportamento estereotipado foi usado para avaliar a integridade do sistema dopaminérgico; e os testes de labirinto de Barnes e esquiva passiva foram empregados para avaliar aprendizado-memória.

O teste do campo aberto foi desenvolvido por Calvin Hall em 1934 (HALL, 1934) e foi introduzido no Brasil por Masur em 1970 (CARLINI; MENDES, 2011). Hall utilizou a quantidade de bolos fecais eliminada pelo rato no campo aberto como indicativo de emocionalidade (CARLINI; MENDES, 2011). Atualmente, esse teste é utilizado em grande número de espécies de invertebrados, aves e mamíferos, como, por exemplo, roedores, suínos, coelhos, equinos e primatas (CHOLERIS et al., 2001; PRUT; BELZUNG, 2003).

Inicialmente, o campo aberto foi proposto como um teste para medir emocionalidade dos animais, mas atualmente ele é utilizado para as mais diversas finalidades, como medir a atividade locomotora, a hiperatividade, o comportamento exploratório e a ansiedade, sendo um dos testes comportamentais mais utilizados

(HABR et al., 2011). A ansiedade no campo aberto é um comportamento desencadeado por dois fatores: o isolamento e a agorafobia (medo de espaços abertos), o que torna esse teste ideal para roedores, que são animais sociáveis e possuem medo inato de espaços abertos (BOURIN et al., 2003).

O campo aberto originalmente era utilizado para estudos psicológicos de comportamento animal, e, atualmente, seu uso foi expandido para outras áreas do conhecimento, como a neurociência e a farmacologia; em estudos farmacológicos, os animais são colocados na arena do campo aberto e são avaliados os efeitos de fármacos sobre a duração e a frequência de alguns parâmetros comportamentais, como locomoção, levantar, higiene (*grooming*) e sono (CHOLERIS et al., 2001).

Neste trabalho foram avaliados os seguintes parâmetros: frequência de locomoção, frequência de levantar, frequência e tempo de *grooming*, tempo de imobilidade e frequência de defecação do rato.

A locomoção e o levantar são parâmetros relacionados com o comportamento exploratório do animal; quando estão aumentados podem indicar maior atividade geral e menor grau de emocionalidade do animal. O *grooming* também é um parâmetro relacionado com a emocionalidade, sendo expresso em situações em que o animal não está com medo (VALLE, 1971). A imobilidade é um parâmetro que reflete alto grau de ansiedade e medo do animal. Assim, quanto mais tempo o rato permanece imóvel, maior o grau de ansiedade (BERNARDI; PALERMO-NETO, 1980). A defecação também é utilizada como um indicativo de emocionalidade (WALSH; CUMMINS, 1976).

A administração de dose única de vareniclina em ratos observados no campo aberto causou poucas alterações. Observou-se aumento da frequência de locomoção do grupo de maior dose às 6 horas e diminuição do tempo de imobilidade nas doses de 0,1 (2, 4 e 6 horas) e 0,3 mg/kg (4, 6 e 72 horas). Esses dados indicam leve aumento da atividade geral no campo aberto dos animais que receberam as maiores doses, provavelmente em função do pico plasmático de vareniclina, uma vez que se sabe que ocorre ao redor de 3 a 4 horas (FAESSEL; BURSTEIN; TROUTMAN, 2008).

A administração prolongada de vareniclina também causou poucas alterações nos parâmetros observados no campo aberto, de forma semelhante ao observado quando administrada em dose única.

A ansiedade é uma resposta adaptativa a situações ameaçadoras ou perigosas causada por diferentes alterações neuroquímicas no organismo (JUDD; BURROWS; NORMAN, 1985). Atualmente, existem diversos modelos animais desenvolvidos para avaliar ansiedade; cada um desses modelos avalia essa resposta causada por mecanismos diferentes (FILE; ZANGROSSI JR.; ANDREWS, 1993).

O labirinto em cruz elevado é um teste amplamente utilizado para estudar a ansiedade de roedores (PELLOW et al., 1985). Ele foi proposto por Handley e Mithani, na década de 1980, a partir das observações feitas por Montgomery, na década de 1950, de que ambientes novos causam simultaneamente curiosidade e medo nos animais, e que roedores possuem aversão natural a espaços abertos, bem iluminados e altos (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2000; ANDRADE et al., 2003; KUMAR; BHAT; KUMAR, 2013; ACEVEDO et al., 2014). Além disso, os roedores não conseguem realizar o comportamento de tigmotaxia (tendência de fazer contato das vibrissas com superfícies verticais), o que contribui para o medo do animal aos braços abertos do labirinto (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994).

Atualmente, o labirinto em cruz elevado é muito empregado para avaliar o efeito de fármacos na ansiedade dos roedores (ACEVEDO et al., 2014). Pellow et al. (1985) mostraram que fármacos ansiolíticos fazem com que os animais aumentem a exploração dos braços abertos do labirinto, indicando diminuição na ansiedade dos animais. Já fármacos ansiogênicos aumentam o tempo em que os animais ficam nos braços fechados do labirinto, indicativo de ansiedade (HO; EICHENDORFF; SCHWARTING, 2002; BORTA; SCHWARTING, 2005).

No presente estudo a vareniclina administrada prolongadamente não interferiu nos parâmetros avaliados no labirinto em cruz elevado, exceto no tempo de permanência no centro do aparato em ratos dos grupos de 0,1 e 0,3 mg/kg, que permaneceram menos tempo nesse local, quando comparados com os animais do grupo controle. Esses achados sugerem ausência de efeitos ansiolíticos/ansiogênicos da vareniclina no labirinto em cruz elevado.

A interação social é outro teste também utilizado para medir a ansiedade dos animais. Ele foi criado por File e Hyde em 1978 e utiliza um comportamento natural dos roedores como método de medida (FILE; SETH, 2003). Esse teste parte da premissa de que o comportamento social dos animais é incompatível com aumento

de ansiedade. Desse modo, o aumento da ansiedade diminui o tempo de interação social com outro animal (LAPIZ-BLUHM et al., 1999).

Neste trabalho a exposição prolongada à vareniclina foi capaz de reduzir o tempo de interação social dos ratos dos grupos de 0,1 e 0,3 mg/kg, em comparação com os animais do grupo controle. Esse resultado indica que a vareniclina possui efeito ansiogênico, quando se considera o teste de interação social.

A estereotipia consiste em movimentos repetidos sem finalidade aparente, como cheirar, lamber e morder, mediados pela ativação do sistema dopaminérgico (CARLINI; MENDES, 2011). Este comportamento é utilizado para estudos de farmacologia comportamental como forma de avaliar a integridade do sistema dopaminérgico do animal (TIEPPO; FELICIO; NASELLO, 2001). A apomorfina é um agonista dopaminérgico utilizado para induzir este comportamento (ESTRELLA; BREGONZIO; CABRERA, 2002).

As diferentes manifestações do comportamento estereotipado que os roedores apresentam são resultado da ativação do sistema dopaminérgico em diferentes áreas cerebrais; o comportamento de cheirar, por exemplo, se deve predominantemente à ativação do sistema dopaminérgico mesolímbico, enquanto os comportamentos de lamber e roer se devem à ativação do sistema dopaminérgico nigro-estriatal (SURMANN; HAVEMANN-REINECKE, 1995; ESTRELLA; BREGONZIO; CABRERA, 2002).

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que os animais tratados por período prolongado com vareniclina não apresentaram alterações neste comportamento induzido pela apomorfina, indicando que a vareniclina aparentemente não interfere com a função do sistema dopaminérgico central.

Outro comportamento avaliado neste trabalho foi o aprendizado-memória dos animais. Diversos neurotransmissores estão envolvidos no processo de aprendizado-memória, dentre eles a acetilcolina e o GABA. O sistema colinérgico possui papel importante no aprendizado-memória, principalmente, associado às regiões do hipocampo, da amidala e do corpo estriado (GOLD, 2003). Assim, antagonistas colinérgicos são utilizados para induzir amnésia em seres humanos e em animais, enquanto agonistas colinérgicos possuem efeito benéfico na memória (BARATTI; BOCCIA; BLAKE, 2009). A vareniclina, por ser um agonista parcial dos receptores colinérgicos, poderia promover algum efeito benéfico na memória.

Outra hipótese é de que a vareniclina poderia atuar no aprendizado-memória via GABA, uma vez que os receptores colinérgicos nicotínicos estão presentes em grande quantidade em neurônios GABAérgicos do hipocampo e do córtex pré-frontal; a ligação da vareniclina com os receptores nicotínicos causaria aumento da liberação de GABA nessas estruturas cerebrais importantes para o aprendizado-memória (BIRD; BURGESS, 2008; SON; WINZER-SERHAN, 2008; DUBOIS et al., 2013).

No presente trabalho foram utilizados dois testes para avaliar aprendizado-memória: o labirinto de Barnes e a esquiva passiva. O labirinto de Barnes é um teste que foi desenvolvido por Carol Barnes em 1979 utilizado para avaliar memória (BARNES, 1979). Esse teste se baseia na habilidade do animal em aprender e lembrar a localização da caixa escape, utilizando as dicas visuais. No presente estudo este labirinto foi empregado visando avaliar se a administração prolongada de vareniclina seria capaz de alterar a memória espacial dos animais. Os resultados observados mostraram ausência de alterações significantes tanto no número de erros, quanto na latência para achar a caixa escape. Isso indica, que a exposição à vareniclina não interferiu na memória espacial dos animais.

O teste de esquiva passiva é empregado para avaliar a memória de curto prazo de ratos associada a eventos emocionais, como evitar a entrada num ambiente escuro para fugir do choque elétrico nas patas (CARLINI; MENDES, 2011UKAI; WATANABI; KAMEYAMA, 2011). Os resultados obtidos mostraram que não houve alterações significantes em relação à latência para os animais passaram para o compartimento escuro. Esses achados indicam que a vareniclina não foi capaz de alterar a memória de curto prazo desses animais.

No presente estudo foram avaliados os níveis de neurotransmissores e seus metabólitos em diferentes estruturas cerebrais (hipotálamo, hipocampo, corpo estriado, córtex frontal e cerebelo).

O hipotálamo é uma estrutura que possui funções endócrinas, autonômicas e comportamentais; participa do controle hormonal, através do eixo hipotálamo-hipófise, da regulação da temperatura corporal, do controle da ingestão de alimentos, do comportamento sexual, da manutenção da homeostase e da mediação de respostas emocionais (GUYTON; HALL, 2002).

O hipocampo é uma estrutura cerebral importante para a cognição e faz parte do sistema límbico. Essa estrutura é dividida em duas grandes regiões: a região

dorsal, responsável pelo aprendizado-memória, e a região ventral, relacionada com as emoções (FANSELOW; HONG-WEI-DONG, 2010). Em seres humanos, disfunções do hipocampo estão relacionadas com distúrbios psicológicos, como o estresse pós-traumático, o transtorno bipolar e a depressão (BONNE et al., 2008).

O corpo estriado faz parte dos núcleos da base e participa do controle de movimentos voluntários (HIKOSAKA; TAKIKAWA; KAWAGOE, 2000). Essa estrutura é formada por três núcleos: o caudado, o putâmen e o estriado ventral (BÁEZ-MENDOZA; SCHULTZ, 2013). O corpo estriado também está relacionado com o sistema de recompensa do cérebro e com a tomada de decisões, sendo, portanto, uma região importante no abuso de drogas (BÁEZ-MENDOZA; SCHULTZ, 2013; DO et al., 2016).

O córtex pré-frontal está localizado no lobo frontal, região mais anterior do encéfalo que engloba também o córtex motor primário, o córtex pré-motor, o córtex medial e a área da broca (DAMASIO; ANDERSON, 2003). O córtex pré-frontal se conecta com diversas regiões do encéfalo e desempenha papel importante em diversas funções complexas, como julgamentos, planejamento motor, pensamento fundamentado (SEMRUD-CLIKEMAN; ELLISON, 2009).

O cerebelo, também chamado de cérebro posterior, está localizado atrás do tronco cerebral e se conecta com o mesencéfalo e com a medula. Esta estrutura está envolvida principalmente com a função motora do organismo (SEMRUD-CLIKEMAN; ELLISON, 2009).

Os resultados do presente estudo mostraram poucas alterações nos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos no hipotálamo, no corpo estriado e no córtex frontal. Em relação ao hipotálamo, houve diminuição nos níveis de glicina nos animais do grupo de 0,03 e 0,1 mg/kg em relação aos animais do grupo controle. No corpo estriado houve aumento nos níveis de glutamato do grupo de 0,03 mg/kg em relação aos animais do grupo controle. No córtex frontal houve aumento da dopamina no grupo de 0,3 mg/kg em relação ao grupo controle. Essas poucas alterações observadas aparentemente não têm relevância biológica, indicando que a vareniclina não foi capaz de alterar os níveis de neurotransmissores e de seus metabólitos cerebrais.

Neste trabalho foi realizada a avaliação hematológica do sangue dos animais tratados por período prolongado com vareniclina. Os parâmetros avaliados foram: número de células brancas e de células vermelhas, hemoglobina, hematócrito,

volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média e número de plaquetas. Os resultados mostraram ausência de alterações em todos os parâmetros do hemograma.

A análise bioquímica sérica do sangue dos animais tratados por período prolongado com vareniclina foi realizada com o intuito de avaliar se essa substância interferia em três perfis bioquímicos: hepático, lipídico e renal. Para o perfil hepático foram dosadas albumina, ALT, AST, FAL, GGT e proteína total. Para o perfil lipídico foram utilizados como parâmetros a quantidade de glicose, colesterol total, colesterol-HDL e triglicérides. Para o perfil renal foram quantificadas a creatinina e a ureia.

Os resultados da bioquímica sanguínea mostram diminuição de ALT, AST, FAL, proteína total e ureia no grupo de 0,1 mg/kg e diminuição de AST, FAL e ureia no grupo de 0,3 mg/kg, quando comparados com o grupo controle. Embora a análise estatística tenha apontado diferenças significantes nesses parâmetros, esses valores se encontram dentro do intervalo de variação fisiológica da espécie (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008) e a redução nos níveis desses parâmetros carece de significado biológico.

Neste estudo também foi realizada a análise de urina dos animais tratados por período prolongado com vareniclina, através de um *kit* comercial. Dentre todas as variáveis analisadas (bilirrubina, urobilinogênio, cetonas, ácido ascórbico, glicose, proteína, sangue, pH, nitrito, leucócitos e densidade), observou-se apenas aumento na quantidade de glicose na urina em ratos tratados com 0,1 mg/kg de vareniclina. Esse achado isolado aparentemente tem pouco significado biológico, uma vez que não foi acompanhado do aumento nos níveis plasmáticos de glicose.

No presente estudo as avaliações anatomopatológica e histopatológica dos rins, glândulas adrenais, coração, pulmões, fígado e baço foram feitas a fim de examinar os possíveis efeitos macroscópicos e microscópicos da exposição prolongada à vareniclina nesses órgãos. Os resultados obtidos apontaram ausência de alterações significantes no peso relativo dos órgãos estudados, bem como nas análises anatomopatológica e histopatológica.

Os resultados tomados em conjunto mostraram que a exposição prolongada de ratos à diferentes doses de vareniclina promoveu poucos efeitos comportamentais, não sendo capaz de alterar parâmetros neuroquímicos,

hematológicos, bioquímicos séricos, urinários, anatomopatológicos e histopatológicos.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho mostraram que a vareniclina:

- Não provocou toxicidade quando administrada por período prolongado, uma vez que não houve alteração no consumo médio de água e de ração e no ganho de peso avaliados semanalmente;
- Promoveu leve aumento da atividade geral no campo aberto de ratos expostos a dose única e a período prolongado ao fármaco;
- Não promoveu alteração no comportamento de ratos observados no labirinto em cruz elevado, no comportamento estereotipado induzido pela apomorfina, no labirinto de Barnes e na esquiva passiva, quando administrada por período prolongado;
- Promoveu diminuição do tempo de interação social de ratos expostos às maiores doses de vareniclina por período prolongado;
- Não promoveu alteração dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos, quando administrada por período prolongado;
- Não promoveu alteração dos parâmetros avaliados no hemograma, na bioquímica sérica e na urina de ratos expostos por período prolongado;
- Não promoveu alteração no peso relativo de órgãos e não foram observadas alterações nos estudos anatomopatológico e histopatológico de ratos expostos por período prolongado.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ACEVEDO, M. B.; NIZHNIKOV, M. E.; MOLINA, J. C.; PAUTASSI, R. M. Relationship between ethanol-induced activity and anxiolysis in the open field, elevated plus maze, light-dark box, and ethanol intake in adolescent rats. **Behavioural Brain Research**, v. 265, p. 203–215, 2014.

AIT-DAOUD, N.; LYNCH, W. J.; PENBERTHY, J. K.; BRELAND, A. B.; MARZANI-NISSEN G. R.; JOHNSON, B. A. Treating smoking dependence in depressed alcoholics. **Alcohol Research and Health**, v. 29, p. 213-220, 2006.

ANDRADE, M. M. M.; TOMÉ, M. F.; SANTIAGO, E. S.; LÚCIA-SANTOS, A.; ANDRADE, T. G. C. S. Longitudinal study of daily variation of rats' behavior in the elevated plus-maze. **Physiology & Behavior**, v. 78, p. 125– 133, 2003.

ARIAS, H. R.; FEUERBACH, D.; TARGOWSKA-DUDA, K.; KACZOR, A. A.; POSO, A.; JOZWIAK, K. Pharmacological and molecular studies on the interaction of varenicline with different nicotinic acetylcholine receptor subtypes. Potential mechanism underlying partial agonism at human α4β2 and α3β4 subtypes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1848, n. 2, p. 731–741, 2015.

BÁEZ-MENDOZA, R.; SCHULTZ, W. The role of the striatum in social behavior. **Frontiers of Neuroscience**, v. 7, p. 1-14, 2013.

BAGHERI, M.; JOGHATAEI, M.; MOHSENI, S.; ROGHANI, M. Genistein ameliorates learning and memory deficits in amyloid b(1–40) rat model of Alzheimer's disease. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 95, p. 270-276, 2011.

BARATTI, C. M.; BOCCIA, M. M.; BLAKE, M. G. Pharmacological effects and behavioral interventions on memory consolidation and reconsolidation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, p. 148-154, 2009.

BARNES, C. A. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. **Journal of Comparative Physiology**, v. 93, n. 1, p. 74-104, 1979.

BERNARDI, M. M.; PALERMO-NETO, J. Atividade geral: conceito e medidas. **Psicologia**, v. 6, n. 1, p. 43-55, 1980.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. **Behavioural Brain Research**, v. 108, p. 197–203, 2000.

BIALA, G.; STANIAK, N.; BUDZYNSKA, B. Effects of varenicline and mecamylamine on the acquisition, expression, and reinstatement of nicotine-conditioned place

preference by drug priming in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 381, p. 361–370, 2010.

BIRD, C. M.; BURGESS, N. The hippocampus and memory: insights from spatial processing. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, p. 182-194, 2008.

BONNE, O.; VYTHILINGAM, M.; INAGAKI, M.; WOOD, S.; NEUMEISTER, A.; NUGENT, A. C.; SNOW, J.; LUCKENBAUGH, D. A.; BAIN, E. E.; DREVETS, W. C.; CHARNEY, D. S. Reduced posterior hippocampal volume in posttraumatic stress disorder. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 69, p. 1087–1091, 2008.

BORDIA, T.; HRACHOVA, M.; CHIN, M.; MCINTOSH, M.; QUIK, M. Varenicline is a potent partial agonist at α6β2 nicotinic acetylcholine receptors in rat and monkey striatum. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 342, n. 2, p. 327-334, 2012.

BORTA, A.; SCHWARTING, R. K. W. Inhibitory avoidance, pain reactivity, and plus-maze behavior in Wistar rats with high versus low rearing activity. **Physiology & Behavior**, v. 84, p. 387–396, 2005.

BOURIN, M.; PETIT-DEMOULIÈRE, B.; DHONNCHADHA, B. N.; HASCÖET, M. Animal models of anxiety in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 21, p. 567–574, 2007.

BRENSILVER, M.; HEINZERLING, K. G.; SWANSON, A. N.; TELESCA, D.; FURST, B. A.; SHOPTAW, S. J. Cigarette smoking as a target for potentiating outcomes for methamphetamine abuse treatment. **Drug and Alcohol Review**, v. 32, p. 96–99, 2013.

CAHILL, K.; STEAD, L. F.; LANCASTER, T. Nicotine receptor partial agonists for smoking cessation (Review). **The Cochrane Collaboration,** v. 130, n. 5, p. 346-347,2011.

CARLINI, E. A.; MENDES, F. R. **Protocolos em psicofarmacologia comportamental**. São Paulo: Editora Fap-Unifesp, 2011. 399 p.

CHATTERJEE, S.; STEENSLAND, P.; SIMMS, J. A. Partial agonist of the α3β4 neuronal nicotinic acetylcholine receptor reduces ethanol consumption and seeking in rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, p. 603–615, 2011.

CHELLADURAI, Y.; SINGH, S. Varenicline and cardiovascular adverse events: a perspective review. **Therapeutic Advances in Drug Safety**, v. 5, n. 4, p. 167-172, 2014.

CHOLERIS, E.; THOMAS, A. W.; KAVALIERS, M.; PRATO, F. S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam,

chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 235-260, 2001.

COE, J. W; BROOKS, P. R.; VETELINO, M. G.; WIRTZ, M. C.; ARNOLD, E. P.; HUANG, J.; SANDS, S. B.; DAVIS, T. I.; LEBEL, L. A.; FOX, C. B.; SHRIKHANDE, A.; HEYM, J. H.; SCHAEFFER, E.; ROLLEMA, H.; LU, Y.; MANSBACH, R. S.; CHAMBERS, L. K.; ROVETTI, C. C.; SCHULZ, D. W.; TINGLEY III, F. W.; O'NEILL, B.T. Varenicline: an α4β2 nicotinic receptor partial agonist for smoking cessation. **Journal of Medicine Chemistry**, v. 48, p. 3474-3477, 2005.

COLOM, L. V.; CASTANEDA, M. T.; REYNA, T.; HERNANDEZ, S.; GARRIDO-SANABRIA, E. Characterization of medial septal glutamatergic neurons and their projection to the hippocampus. **Synapse**, v. 58, p. 151-164, 2005.

CRUNELLE, C. L.; MILLER, M. L.; BOOIJ, J.; BRINK, W. V. D. The nicotinic acetylcholine receptor partial agonist varenicline and the treatment of drug dependence: A review. **European Neuropsychopharmacology**, v. 20, p. 69-79, 2010.

CRUNELLE, C. L.; MILLER, M. L.; BRUIN, K.; BRINK, W.; BOOIJ, J. Varenicline increases striatal dopamine D2/3 receptor binding in rats. **Addiction Biology**, v. 14, p. 500-502, 2009.

CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 49, n. 1, p. 171-176, 1994.

CRUZ, A. P. M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotonérgicas. In: LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; FUKUSIMA, S. S. **Métodos em neurociência**. São Paulo: Editora Manole, 2012. 386 p.

CUNNINGHAM, C. S.; MCMAHON, L. R. The effects of nicotine, varenicline, and cytisine on schedule-controlled responding in mice: differences in α4β2 nicotinic receptor activation. **European Journal of Pharmacology**, v. 654, p. 47-52, 2011.

DAMASIO, A. R.; ANDERSON, S. W. The frontal lobes. In Falta sobrenome do autor??? K. M. HEILMAN, K. M.; VALENSTEIN, E. **Clinical neuropsychology**. 4 ed. New York: Oxford, 2003. p. 404-446.

DAVIS, J. A.; JAMES, J. R.; SIEGEL, S. J.; GOULD, T. J. Withdrawal from chronic nicotine administration impairs contextual fear conditioning in C57BL/6 mice. **Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 8708–8713, 2005.

DO, J.; KIM, J. I.; BAKES, J.; LEE, K.; KAANG, B. K. Functional roles of neurotransmitters and neuromodulators in the dorsal striatum. **Learning & Memory**, v. 20, n. 1, p. 21-28, 2012.

DUBOIS, D. W.; DAMBORSKY, J. C.; FINCHER, A. S.; FREY, G. D.; WINZER-SERHAN, U. H. Varenicline and nicotine enhance GABAergic synaptic transmission in rat CA1 hippocampal and medial septum/diagonal band neurons. **Life Science**, v. 92, p. 337-344, 2013.

ERICSON, M.; LÖF, E.; STOMBERG, R.; SÖDERPALM, B. The smoking cessation medication varenicline attenuates alcohol and nicotine interactions in the rat mesolimbic dopamine system. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 329, n. 1, p. 225-230, 2009.

ERWIN, B. L.; SLATON, R. M. Varenicline in the treatment of alcohol use disorders. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 48, n. 11, p. 1445-1455, 2014.

ESTRELLA, C. R.; BREGONZIO, C.; CABRERA, R. J. Differential responses in central dopaminergic activity induced by apomorphine in IPL nude rat. **Behavioral Brain Research**, v. 133, p. 143-148, 2002.

FAESSEL, H. M.; BURSTEIN, A. H.; TROUTMAN, M. D. Lack of a pharmacokinetic interaction between a new smoking cessation therapy, varenicline, and digoxin in adult smokers. **Europe Journal of Clinic Pharmacology**, v. 64, p. 1101-1109, 2008.

FAESSEL, H. M.; GIBBS, M. A.; CLARK, D. J.; ROHRBACHER, K.; STOLAR, M.; BURSTEIN, A. H. Multiple-dose pharmacokinetics of the selective nicotinic receptor partial agonist, varenicline, in healthy smokers. **Journal of Clinic Pharmacology**, v. 46, n. 12, p. 1439-1448, 2006b.

FAESSEL, H. M.; OBACH, R. S.; ROLLEMA, H.; RAVVA, P.; WILLIAMS, K. E.; BURSTEIN, A. H. A review of the clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of varenicline for smoking cessation. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 49, n. 12, p. 799-816, 2010.

FAESSEL, H. M.; SMITH, B. J.; GIBBS, M. A.; GOBEY, J. S.; CLARK, D. J.; BURSTEIN, A. H. Single-dose pharmacokinetics of varenicline, a selective nicotinic receptor partial agonist, in healthy smokers and nonsmokers. **Journal of Clinic Pharmacology**, v. 46, n. 9, p. 991-998, 2006a.

FANSELOW, M. S.; HONG-WEI-DONG. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 1-25, 2010.

FELICIO, L. F.; FLORIO, J. C.; SIDER, L. H.; CRUZ-CASALLAS, P. E.; BRIDGES, R. S. Reproductive experience increases striatal and hyphothalamic dopamine levels in pregnant rats. **Brain Research Bulletin**, v. 40, p. 253-256, 1996.

FILE, S. E.; PELOW, S. The effects of triazolobenzodiazepines in two animal tests of anxiety and in the holeboard. **British Journal of Pharmacology**, v. 86, p. 729-735, 1985.

FILE, S. E.; SETH, P. A review of 25 years of the social interaction test. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 35– 53, 2003.

FILE, S. E.; ZANGROSSI JR, H.; ANDREWS, N. Social interaction and elevated plus-maze tests: changes in release and uptake of 5-HT and GABA. **Neuropharmacology**, v. 32, n. 3, p. 217-221, 1993.

FOULDS, J. The neurobiological basis for partial agonist treatment of nicotine dependence: varenicline. **Journal of Clinical Practice**, v. 60, n. 5, p. 571-576, 2006.

FREEDMAN, R. Exacerbation of schizophrenia by varenicline. **American Journal of Psychiatry**, v. 164, p. 1269, 2007.

GOLD, P. E. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 80, p. 194-210, 2003.

GOLDMAN, W. P.; BATY, J. D.; BUCKLES, V. D.; SAHRMANN, S.; MORRIS, J. C. Cognitive and motor functioning in Parkinson disease: subjects with and without questionable dementia. **Archives of Neurology**, v. 55, p. 674-680, 1998.

GOTTI, C.; ZOLI, M.; CLEMENTI, F. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 9, p. 482–491, 2006.

GOULD, R. W.; CZOTY, P. W.; NADER, S. H.; NADER, M. A. Effects of varenicline on the reinforcing and discriminative stimulus effects of cocaine in rhesus monkeys. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 339, n. 2, p. 678-686, 2011.

GUILLEM, K.; PEOPLES, L. L. Varenicline effects on cocaine self-administration and reinstatement behavior. **Behavior Pharmacology**, v. 21, n. 2, p. 96–103, 2010.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Endocrinologia e reprodução. In: _____. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 905-916.

HABR, S. F.; BERNARDI, M. M.; CONCEIÇÃO, I. M.; FREITAS, T. A.; FELICIO, L. F. Open field behavior and intra-nucleus accumbens dopamine release in vivo in virgin and lactating rats. **Psychology & Neuroscience**, v. 4, n. 1, p. 115-121, 2011.

HADJICONSTANTINOU, M.; NEFF, N. H. Nicotine and endogenous opioids: neurochemical and pharmacological evidence. **Neuropharmacology**, v. 60, p. 209-1220, 2011.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat: defecation and urination as measures of individual differences in the emotionality. **Journal of Comparative Physiology**, v. 18, n. 3, p. 385-403, 1934.

HIKOSAKA, O.; TAKIKAWA, Y.; KAWAGOE, R. Role of the basal ganglia in the control of purposive saccadic eye movements. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 3, p. 953-978, 2000.

HO, Y.; EICHENDORFF, J.; SCHWARTING, R. K. W. Individual response profiles of male Wistar rats in animal models for anxiety and depression. **Behavioural Brain Research**, v. 136, p. 1-12, 2002.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, p. 21-30, 1996.

HOOTEN, W. M.; WARNER, D. O. Varenicline for opioid withdrawal in patients with chronic pain: A randomized, single-blinded, placebo controlled pilot trial. **Addictive Behaviors**, v, 42, p. 69-72, 2015.

HURST, R.; ROLLEMA, H.; BERTRAND, D. Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 137, n. 1, p. 22-54, 2013.

IIDA, M.; IIDA, H.; TAKENAKA, M.; TANABE, K.; IWATA, K. Preventive effect of varenicline on impairment of endothelial function in cerebral vessels induced by acute smoking in rats. **Journal of Anesthesia**, v. 26, p. 928-931, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa Nacional de Saúde 2013**. Rio de Janeiro: IBGE, 2014. 181 p.

JENSEN, A. A.; FRØLUND, B.; LILJEFORS, T.; KROGSGAARD-LARSEN, P. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 15, p. 4707-4745, 2005.

JORENBY, D. E.; HAYS, J. T.; RIGOTTI, N. A.; AZOULAY, S.; WATSKY, E. J.; WILLIAMS, K. E.; BILLING, C. B.; GONG, J.; REEVES, K. R. Efficacy of varenicline, an α4β2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist vs placebo or sustained-release bupropion for smoking cessation: a randomized controlled trial. **Journal of American Medical Association**, v. 296, n. 1, p. 56-63, 2006.

JUDD, F. K.; BURROWS, G. D.; NORMAN, T. R. The biological basis of anxiety: an overview. **Journal of Affective Disorders**, v. 9, p. 271-284, 1985.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of domestic animals**. 6. ed. Burlington: Academic Press, 2008. 928 p.

KAUR, K.; KAUSHAL, S.; CHOPRA, S. C. Varenicline for smoking cessation: a review of the literature. **Current Therapeutic Research**, v. 70, n. 1, p. 35-54, 2009.

KING, J.; HUANG, W.; CHEN, W.; HEFFERNAN, M.; SHIELDS, J.; RANE, P.; BIRCHER, R.; DIFRANZA, J. R. A comparison of brain and behavioral effects of varenicline and nicotine in rats. **Behavioral Brain Research**, v. 223, p. 42-47, 2011.

KUEHN, B. M. FDA warns of adverse events linked to smoking cessation drug and antiepileptics. **Journal of American Medical Association**, v. 299, n. 10, p. 1121-1122, 2008.

KUMAR, V.; BHAT, Z. A.; KUMAR, D. Animal models of anxiety: a comprehensive review. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 68, p. 175–183, 2003.

KUZMIN, A.; JERLHAG, E.; LILJEQUIST, S.; ENGEL, J. Effects of subunit selective nACh receptors on operant ethanol self-administration and relapse-like ethanoldrinking behavior. **Psychopharmacology**, v. 203, p. 99–108, 2009.

LANGE-ASSCHENFELDT, C.; SCHÄBLE, S.; SUVORAVA, T.; FAHIM, E. G.; BISHA, M.; STERMANN, T.; HENNING, U.; KOJDA, G. Effects of varenicline on alpha4-containing nicotinic acetylcholine receptor expression and cognitive performance in mice. **Neuropharmacology**, v. 107, p. 100-110, 2016.

LAPIZ-BLUHM, M. D. S.; BONDI, C. O.; DOYEN, J.; RODRIGUEZ, G.; BÉDARD-ARANA, T.; MORILAK, D. A. Behavioral assays to model cognitive and affective dimensions of depression and anxiety in rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, n. 10, p. 1115-1137, 2008.

LEUNG, L. K.; PATAFIO, F. M.; ROSSER, W. W. Gastrointestinal adverse effects of varenicline at maintenance dose: a meta-analysis. **BMC Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 15, p. 1-8, 2011.

LIPPIELLO, P. M.; BENCHERIF, M.; GRAY, J. A.; PETERS, S.; GRIGORYAN, G.; HODGES, H.; COLLINS, A. C. RJR-2403: a nicotinic agonist with CNS selectivity II. In vivo characterization. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 279, n. 3, p. 1422-1429, 1996.

LOUGHEAD, J.; RAY, R.; WILEYTO, E. P.; RUPAREL, K.; SANBORN, P.; SIEGEL, S.; GUR, R. C.; LERMAN, C. Effects of the α4β2 partial agonist varenicline on brain activity and working memory in abstinent smokers. **Biological Psychiatry**, v. 67, p. 715-721, 2010.

MCCLURE-BEGLEY, T. D.; KING, N. M.; COLLINS, A. C.; STITZEL, J. A.; WEHNER, J. M.; BUTT, C. M. Acetylcholinestimulated [3H]GABA release from mouse brain synaptosomes is modulated by α4β2 and α4α5β2 nicotinic receptor subtypes. **Molecular Pharmacology**, v. 75, p. 918–926, 2009.

MCCOLL, S. L.; BURSTEIN, A. H.; REEVES, K. R.; BILING JR, C. B.; STOLAR, M.; SELLERS, E. M. Human abuse liability of the smoking cessation drug varenicline in

smokers and nonsmokers. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 83, n. 4, p. 607–614, 2008.

MELLO, N. K.; FIVEL, P. A.; KOHUT, S. J.; CARROLL, F. I. Effects of chronic varenicline treatment on nicotine, cocaine, and concurrent nicotine+cocaine self-administration. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, p. 1222–1231, 2014.

MIHALAK, K. B.; CARROLL, F. I.; LEUTJE, C. W. Varenicline is a partial agonist at α4β2 and a full agonist at α7 neuronal nicotinic receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 70, n. 3, p. 801-805, 2006

MILLAR, N. S.; GOTTI, C. Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. **Neuropharmacology**, v. 56, p. 237-246, 2009.

MITCHELL, J. M.; TEAGUE, C. H.; KAYSER, A. S.; BARTLETT, S. E.; FIELDS, H. L. Varenicline decreases alcohol consumption in heavydrinking smokers. **Psychopharmacology**, v. 223, p. 299-306, 2012.

NADER, M. A.; MORGAN, D.; GAGE, H. D.; NADER, S. H.; CALHOUNI, T. L.; BUCHHEIMER, N.; EHRENKAUFER, R.; MACH, R. H. PET imaging of dopamine D2 receptors during chronic cocaine self-administration in monkeys. **Nature Neuroscience**, v. 9, n. 8, p. 1050-1056, 2006.

NOCENTE, R.; VITALI, M.; BALDUCCI, G.; ENEA, D.; KRANZLER, H. R.; CECCANTI, M. Varenicline and neuronal nicotinic acetylcholine receptors: a new approach to the treatment of co-occurring alcohol and nicotine addiction? **The American Journal on Addictions**, v. 22, p. 453-459, 2013.

OBACH, R. S.; REED-HAGEN, A. E.; KRUEGER, S. S.; OBACH, B. J.; O'CONNELL, T. N.; ZANDI, K. S.; MILLER, S.; COE, J. W. Metabolism and disposition of varenicline, a selective α4β2 acetylcholine receptor partial agonist, in vivo and in vitro. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 34, n. 1, p. 121-130, 2006.

O'BRIEN, C. P. Drug addiction and drug abuse. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11th ed. New York: McGraw Hill, 2006.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guideline for the testing of chemicals**: repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents. [S.l.]: OECD, 2008. p. 1-13.

OTTONI, E. Etholog 2.2: A tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. **Behavior Research Methods, Instruments & Computers**, v. 32, p. 446-449, 2000.

PATTERSON, F.; JEPSON, C.; LOUGHEAD, J.; PERKINS, K.; STRASSER, A. A.; SIEGEL, S. Working memory deficits predict short-term smoking resumption following brief abstinence. **Drug and Alcohol Depend**, v. 106, p. 61– 64, 2010.

PATTERSON, F.; JEPSON, C.; STRASSER, A. A.; LOUGHEAD, J.; PERKINS, K. A.; GUR, R. C.; FREY, J. M.; SIEGEL, S.; LERMAN, C. Varenicline improves mood and cognition during smoking abstinence. **Biological Psychiatry**, v. 65, p. 144-149, 2009.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.

PENG, C.; STOKES, C.; MINEUR, Y. S.; PICCIOTTO, M. R.; TIAN, C.; EIBL, C.; TOMASSOLI, I.; GUENDISCH, D.; PAPKE, R. L. Differential modulation of brain nicotinic acetylcholine receptor function by cytisine, varenicline, and two novel bispidine compounds: emergent properties of a hybrid molecules. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 347, p. 424-437, 2013.

PFIZER. **Chantix**. New York: PFZER, 2008.

PFIZER. **Medication Guideline**. New York: PFZER, 2012.

PICCIOTTO, M. R.; KENNY, P. J. Molecular mechanisms underlying behaviors related to nicotine addiction. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 1, p. 1-12, 2013.

PITTENGER, S. T.; BARRETT, S. T.; CHOU, S.; BEVINS, R. A. The effects of varenicline on methamphetamine self-administration and drug-primed reinstatement in female rats. **Behavioural Brain Research**, v. 300, p. 150–159, 2016.

PLEBANI, J. G.; LYNCH, K. G.; YU, Q.; PETTINATI, H. M.; O'BRIEN, C. P.; KAMPMAN, K.M. Results of an initial clinical trial of varenicline for the treatment of cocaine dependence. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 121, p. 163-166, 2012.

PROCHASKA, J. J.; HILTON, J. F. Risk of cardiovascular serious adverse events associated with varenicline use for tobacco cessation: systematic review and meta-analysis. **British Medical Journal**, v. 344, p. 1-11, 2012. e2856. Disponível em: <http://www.bmj.com/content/344/bmj.e2856>. Acesso em: 22 jun. 2016.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 3– 33, 2003.

RAVVA, P.; GASTONGUAY, M. R.; TENSFELDT, T. G.; FAESSEL, H. M. Population pharmacokinetic analysis of varenicline in adult smokers. British **Journal of Clinic Pharmacology**, v. 68, n. 5, p. 669–681, 2009.

RIGHI, D. A.; SPINOSA, H. S.; PALERMO-NETO, J. Capítulo 3: Avaliação da toxicidade. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. Barueri: Manole, 2008. p. 41-70.

RIGOTTI, N. A.; PIPE, A. L.; BENOWITZ, N. L.; ARTEAGA, C.; GARZA, D.; TONSTAD, S. Efficacy and safety of varenicline for smoking cessation in patients with cardiovascular disease: a randomized trial. **Circulation**, v. 121, p. 221-229, 2010.

ROLLEMA, H.; SHRIKHANDE, A.; WARD, K. M.; TINGLEY III, F. D.; COE, J. W.; O'NEILL, B. T.; TSENG, E.; WANG, E. Q.; MATHER, R. J.; HURST, R. S.; WILLIAMS, K. E.; DE VRIES, M.; CREMERS, T.; BERTRAND, S.; BERTRAND, D. Pre-clinical properties of the α4β2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonists varenicline, cytisine and dianicline translate to clinical efficacy for nicotine dependence. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, p. 334-345, 2010.

ROLLEMA, H.; CHAMBERS, L. K.; COE, J. W.; GLOWA, J. ; HURST, R. S.; LEBEL, L. A.; LU, Y.; MANSBACH, R. S.; MATHER, R. J.; ROVETTI, C. C.; SANDS, S. B.; SCHAEFFER, E.; SCHULZ, D. W.; TINGLEY III, F. D.; WILLIAMS, K. E. Pharmacological profile of the α4β2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist varenicline, an effective smoking cessation aid. **Neuropharmacology**, v. 52, p. 985-994, 2007.

ROLLEMA, H.; HAJÓS, M.; SEYMOUR, P. A.; KOZAK, R.; MAJCHRZAK, M. J.; GUANOWSKY, V.; HORNER, W. E.; CHAPIN, D. S.; HOFFMANN, W. E.; JOHNSON, D. E.; MCIEAN, S.; FREEMAN, J.; WILLIAMS, K. E. Preclinical pharmacology of the α4β2 nAChR partial agonist varenicline related to effects on reward, mood and cognition. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, p. 813-824, 2009.

ROLLEMA, H.; RUSS, C.; LEE, T. C.; HURST, R. S.; BERTRAND, D. Functional interactions of varenicline and nicotine with nAChR subtypes implicated in cardiovascular control. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 1, p. 733-742, 2014.

ROLLEMA, H.; WILSON, G. G.; LEE, T. C.; FOLGERING, J. H. A.; FLIK, G. Effect of co-administration of varenicline and antidepressants on extracellular monoamine concentrations in rat prefrontal cortex. **Neurochemistry International**, v. 58, p. 78-84, 2011.

ROSE, J. E.; BEHM, F. M. Extinguishing the rewarding value of smoke cues: pharmacological and behavioral treatments. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 6, p. 523-532, 2004.

SALAS, R.; PIERI, F.; DE BIASI, M. Decreased signs of nicotine withdrawal in mice null for the β2 nicotinic acetylcholine receptor subunit. **Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 10035-10039, 2004.

SALMINEN, O.; MURPHY, K. L.; MCINTOSH, J. M.; DRAGO, J.; MARKS, M. J.; COLLINS, A. C.; GRADY, S. R. Subunit composition and pharmacology of two classes of striatal presynaptic nicotinic acetylcholine receptors mediating dopamine release in mice. **Molecular Pharmacology**, v. 65, n. 6, p. 1526–1535, 2004.

SEMRUD-CLIKEMAN, M.; ELLISON, P. A. T. Functional neuroanatomy. In: SEMRUD-CLIKEMAN, M.; ELLISON, P. A. T. **Child Neuropsychology**: Assessment and interventions for neurodevelopmental disorders. 2. ed. New York: Springer, 2009. 488 p.

SETLER, P.; SARAU, H.; MCKENZIE, G. Differential attenuation of some effects of haloperidol in rats given scopolamine. **European Journal of Pharmacology**, v. 39, p. 117-126, 1976.

SHIM, J. C.; JUNG, D. U.; JUNG, S. S.; SEO, Y. S.; CHO, D. M.; LEE, J. H.; LEE, S. W.; KONG, B. G.; KANG, J. W.; OH, M. K.; KIM, S. D.; MCMAHON, R. P.; KELLY, D. L. Adjunctive varenicline treatment with antipsychotic medications for cognitive impairments in people with schizophrenia: a randomized double-blind placebo controlled trial. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 3, p. 660-668, 2012.

SINGH, S.; LOKE, Y. K.; SPANGLER, J. G.; FURBERG, C. D. Risk of serious adverse cardiovascular events associated with varenicline: a systematic review and meta-analysis. **Canadian Medical Association Journal**, v. 183, n. 12, p. 1359-1366, 2011.

SON, J. H.; WINZER-SERHAN, U. H. Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs in rat hippocampal GABAergic interneurons. **Journal of Comparative Neurology**, v. 511, p. 286–299, 2008.

STEENSLAND, P.; SIMMS, J. A.; HOLGATE, J.; RICHARDS, J. K.; BARTLETT, S. E. Varenicline, an a4b2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, selectively decreases ethanol consumption and seeking. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 12518–12523, 2007.

STEINBERG, M. B.; BOVERB, M. T.; RICHARDSONB, D. L.; SCHMELZERB, A. C.; WILLIAMSA, J. M.; FOULDS, J. Abstinence and psychological distress in co-morbid smokers using various pharmacotherapies. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 114, p. 77-81, 2011.

SURMANN, A.; HAVEMANN-REINECKE, U. Injection of apomorphine: a test to predict individual different dopaminergic sensitivity? **Journal of Neural Transmission**, v. 45, p. 143-155, 1995.

SVANSTROM, H.; PASTERNAK, B.; HVIID, A. Use of varenicline for smoking cessation and risk of serious cardiovascular events: nationwide cohort study. **British Medical Journal**, v. 345, p. 1-12, 2012. Disponível em: <http://www.bmj.com/content/ 345/bmj.e7176>. Acesso em: 13 ago. 2016.

TIEPPO, C. A.; FELICIO, L. F.; NASELLO, A. G. Cholecystokinin modulation of apomorphine- or amphetamine-induced stereotypy in rats: opposite effects. **Peptides**, v. 22, p. 1291–1298, 2001.

UKAI, M.; WATANABI, Y.; KAMEYAMA, T. Endomorphins 1 and 2, endogenus γ-opioid receptor agonists, impair passive avoidance learning in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 421, p. 115–119, 2001.

VALLE, F. P. Rats performance on repeated test in open-field as a function of age. **Psychonomic Science**, v. 23, p. 333-335, 1972.

VERRICO, C. D.; MAHONEY, J. J.; THOMPSON-LAKE, D. G.; BENNETT, R. S.; NEWTON, T. F.; DE LA GARZA, R. Safety and efficacy of varenicline to reduce positive subjectiveeffects produced by methamphetamine in methamphetamine-dependentvolunteers. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 17, p. 223–233, 2014.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open-field test: a critical review. **Psychological Bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO Report on the global tobacco epidemic, 2015: Raising taxes on tobacco**. Luxemburgo: WHO, 2015. 103 p.

WOYNILLOWICZ, A. K.; RAHA, S.; NICHOLSON, C. J.; HOLLOWAY, A. C. The effect of smoking cessation pharmacotherapies on pancreatic beta cell function. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 265, p. 122-127, 2012.

ZHOU, Y.; NELSON, M. E.; KURYATOV, A.; CHOI, C.; COOPER, J.; LINDSTROM, J. Human α4β2 acetylcholine receptors formed from linked subunits. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 27, p. 9004 –9015, 2005.

ZORIK, T.; SEVAK, R. J.; MIOTTO, K.; SHOPTAW, S.; SWANSON, A. N.; CLEMENT, C.; NEWTON, T. F.; LONDON, E. D. Pilot safety evaluation of varenicline for the treatment of methamphetaminedependence. **Journal of Experimental Pharmacology**, v. 2010, n. 2, p. 13–18, 2009.